

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Lösungen und Puffer

Ammoniumchlorid	Merck
BCA	Pierce
Dimethylsulfoxid	Sigma
Ethanol	Merck
L-Glutamin	Gibco
Glyzerin	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma
Natriumacetat	Sigma
Natriumazid	Sigma
Natriumchlorid	Sigma
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma
Penicillin-Streptomycin	Gibco
RPMI 1640	Gibco
Methyl- ³ H-Thymidin	NEN [®] - DuPont
Wasserstoffperoxid	Sigma
Coating-Puffer:	0,1 M NaHCO ₃ , pH 9
Wasch-Puffer:	PBS, 0,05 % TWEEN
Substrat-Puffer:	25,7 ml 0.2 M Na ₂ HPO ₄ , 50 ml H ₂ O, 24,3 ml 0.1 M Zitronensäure
PBS-Puffer:	130 mM NaCl, 10 mM
Natriumphosphatpuffer,	2,7 mM KCl, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,4
Ery-Lysis-Puffer:	0,83 % NH ₄ Cl (w/v) in PBS
FACS-Puffer:	PBS / 1% BSA 0,01 % NaN ₃

Alle Lösungen und Feststoffe wurden in analysenreiner Qualität bezogen.

2.1.2 Zellkulturmedien und Seren

- Komplett-Medium: RPMI 1640, 10 % FCS (1h Hitze-deaktiviert bei 56 °C),
 2 mM Glutamin, 20 µM 2-Mercaptoethanol,
 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin,
 1 mM Natriumpyruvat
- Wasch-Medium: RPMI 1640, 10% Komplett-Medium
- Einfrier-Medium: 90% FCS, 10% DMSO
- CTLL-2-Medium: RPMI 1640, 75 U/ml humanes IL-2

Medien und Medienzusätze wurden von der Firma Gibco Life Science bezogen, fötales Kälber-Serum (FCS) von Sigma. Alle Kunststoffartikel und Verbrauchsmaterialien wurden bei den Firmen Costar, Eppendorf und Greiner bestellt.

2.1.3 Zelllinien

- CTLL-2 Zellen: IL-2 produzierende zytotoxische T-Zellen, zur Verfügung gestellt vom Max-Planck-Institut, Berlin.
- Hybridomzellen: Die T-Zell Hybridome wurden durch zwei unabhängige Fusionen, wie in (Maier al., 2000) beschrieben, gewonnen.
- Priess-Zellen: HLA-DRA*0101/HLA-DRB*0401 homozygote EBV-transformierte B-Zellen wurden in Komplett-Medium bis zu einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro ml in Kultur gehalten.

2.1.4 Versuchstiere

Die HLA-DRA*0101/HLA-DRB*0401, humanes CD4 (huCD4) dreifach-transgenen Mäuse (H-2 I-A^q), erstmals in (Fugger et al., 1994) beschrieben, wurden auf dem DBA/1J-Hintergrund an der Research animal facility an der Stanford University (Kalifornien, USA) gehalten und von Dr. Grete Sönderstrup McDevitt (Stanford University) zur Verfügung gestellt. Die (DBA/1J x A.CA) F1-Generation wurde auf A.CA zurückgekreuzt, und HLA-DRA*0101/HLA-DRB*0401/huCD4 transgene Nachkommen wurden selektiert. Dabei enthalten die DBA/1 x A.CA-Mausgenerationen die Haplotypen H-2 I-A^q und H-2 I-A^f, welche beide H-2 I-E negativ sind. Dadurch werden HLA-DR α /H-2 I-E β -Hybridkonstellationen verhindert (Lawrance et al., 1989). Die (DBA/1 x A.CA) F1-Generation wurde von Drs. D. Mathis und C. Benoist zur Verfügung gestellt und im Verlauf mit I-A β ^f Mäusen (Gosgrove et al., 1991) verpaart, wodurch die β -Kette des murinen MHC-Klasse-II Gens I-A ausgekreuzt wurde. Die Mäuse wurden auf die Expression

von HLA-DR/huCD4 auf peripheren mononukleären Blutzellen mit Hilfe von Standard-FACS-Analysen (Congia et al., 1998) untersucht. Alle Experimente wurden anhand der Instituts- und staatlichen Richtlinien durchgeführt.

2.1.5 Rekombinante Proteine und Peptide

Rekombinantes, lipidiertes OspA (lOspA) vom *B. burgdorferi*-Stamm ZS7 (GenBank-Nummer X1647) wurde von Dr. Y. Lobet (SKB, Rixensart, Belgien) zur Verfügung gestellt. Nicht-lipidiertes, rekombinantes OspA wurde von TibMolBiol (Berlin) bezogen.

Hinsichtlich der Peptide wurde ein Set von insgesamt 52 Peptiden von jeweils 20 Aminosäuren Länge (20-mer Peptide), die sich jeweils um 15 Aminosäuren überlappen und die komplette OspA-Sequenz von 273 Aminosäuren umfassen, von der OspA-Sequenz von *B. burgdorferi* N40 abgeleitet. Diese wurde mittels HPLC auf ihre Reinheit geprüft und mit Fmoc von der Firma BioTez (Berlin) synthetisiert. Zur Kartierung und Charakterisierung der OspA-Epitope wurden an Zellulose gebundene Peptide im Spot-Syntheseverfahren hergestellt. Diese Methode wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. J. Schneider-Mergener erstmals beschrieben (Kramer und Schneider-Mergener, 1997). Sämtliche Peptide der Verkürzungsanalysen, der Substitutionsanalysen sowie der nach Datenbanksuche synthetisierten Selbstpeptide wurden mit dieser Methode hergestellt. Aus chemisch-synthetischen Gründen erhielten die Peptide am C-Terminus einen zusätzlichen Glyzin-Rest. Während der Synthese waren die Peptide kovalent an die Zellulose gebunden, später wurde die Ester-Bindung durch Ammoniakgas gespalten. Jeder Spot wurde in sterilem, zweifach-destilliertem Wasser in einer Menge von 200 µl in NUNC Aufbewahrungsgefäßen gelöst, was einer Endkonzentration von ca. 100-150 µM des Aminosäurengemisches entsprach. Für ca. 4 Stunden wurden die Peptide auf dem Vortexer (Schüttler) in Lösung gebracht.

Für die Titrationsexperimente wurden konventionell synthetisierte Peptide (Pulverform) nach Standard Fmoc-Protokollen verwendet (Abimed, Peptid-Synthetisierer, Langenfeld, Deutschland). Die Reinheit wurde durch HPLC und MALDI-TOF-Massenspektroskopie überprüft.

2.1.6 Antikörper

To-Pro³-Iodid: Anti-Apoptose Antikörper, DNA-Färbung der apoptotischen Zellen.

Ausgangskonzentration 1 mM, Bindungskonzentration 10 nM

Anti-CD4-PE: Verdünnung 1:200 (Endkonzentration 5 µg/ml)

Anti-HLA-DR-FITC: Verdünnung 1:100 (Endkonzentration 5 µg/ml).

Sämtliche Antikörper wurden von der Firma Becton Dickinson bezogen.

2.2 Methoden

2.2.1 Kultur von Hybridomzellen

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen wie folgt im Inkubator (Heraeus) kultiviert:

Kulturmedium: Komplettes Medium

CO₂-Konzentration: 5 %

Temperatur: 37°C

Luftfeuchtigkeit: 95 %

2.2.2 Einfrieren von Hybridomzellen

Zum Einfrieren von Zellen wurde eine Lösung aus FCS und 10 % DMSO wie beschrieben verwendet. Das Zellgemisch wurde bei 4 °C abzentrifugiert, auf Eis gestellt und im Einfriermedium resuspendiert. Alle Zellen wurden in 15 ml Röhrchen für 6 min bei 200 x g abzentrifugiert, das Pellet in 1 ml Gefrier-Medium resuspendiert, in Einfrierröhrchen (Greiner) überführt und schließlich bei -70 °C über Nacht eingefroren, um am Folgetag in flüssigem Stickstoff langzeitgelagert zu werden. Generell wurden zwischen 1×10^6 und 1×10^7 Zellen eingefroren.

2.2.3 Auftauen von Hybridomzellen

Gekühltes Wasch-Medium (ca. 10 ml) wurde in 15 ml Röhrchen gegeben, anschließend die Einfrierröhrchen im Wasserbad (37 °C) unter leichtem Schütteln bis zur Ablösung des Zellgemisches von der Wand aufgetaut, in das Waschmedium überführt und zentrifugiert (200 x g für 6 min). Nach zweimaligem Waschen der Zellen erfolgte die Resuspension in Komplet-Medium für weitere Experimente.

2.2.4 Zählen von Hybridomzellen

Hierbei wurde ein kleines Probevolumen (20 µl) aus der Zellkultur entnommen und im Verhältnis 1:1 mit Trypan-Blau verdünnt. Unter dem Mikroskop erschienen die abgestorbenen Zellen durch Zellkernfärbung blau und die lebendigen Zellen gelblich und wenig granulär. Für die Zählung wurde eine Neubauer-Zählkammer benutzt, die aus 4 großen Quadraten besteht, die wiederum in 16 kleine Quadrate unterteilt sind. Die Zellzahl ergibt sich aus der Anzahl der Zellen in einem großen Quadrat multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert mit 10^4 .
Zellzahl (ml) = $n \times VF \times 10^4$ (n: Zellen in großem Quadrat, VF: Verdünnungsfaktor).

2.2.5 Bestrahlung von antigenpräsentierenden Zellen

Die APZ in den Versuchsansätzen wurden zur Verhinderung weiterer Zellteilungen bestrahlt. Priess-Zellen wurden mit 10000 rad durch eine Kobalt-Quelle für insgesamt 30 min bestrahlt. Dazu wurden die Zellen auf Eis in das Bestrahlungsgerät eingelegt. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch zweimaliges Waschen in Wasch-Medium entfernt.

2.2.6 Kultivierung der CTLL-2 Zelllinien

Die Zelllinien wurden in Komplet-Medium mit jeweils 75 U/ml IL-2-Zusatz kultiviert. Ab einer Zelldichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml wurden die Zellen in einer Verdünnung von 1:5 unter Zusatz von 75 U/ml IL-2 expandiert. Bei der letzten Expansion vor einer Testreihe wurden 50 U/ml IL-2 hinzugefügt, um die Zellen optimal zu sensibilisieren. Dies entsprach in der Regel dem dritten Tag nach der letzten Mediumzugabe.

2.2.7 Herstellung der Hybridomzellen

Die in dieser Arbeit verwendeten T-Zell Hybridome wurden durch Vorarbeiten von Bert Maier in unserem Labor (Maier et al., 2000) hergestellt. Zusammenfassend wurden HLA-DRA*0101/HLA-DRB*0401, huCD4 transgene I- $\text{A}\beta^{-/-}$ Mäuse mit insgesamt 100 µg aufgereinigtem, lipidiertem OspA durch sub cutan (s.c.)-Injektion in die Schwanzbasis immunisiert (OspA von Dr.Y.Lobet, SKB, Rixensart, Belgien). Im folgenden wurden die T-Zellen mit der T-Zell-Rezeptor I- $\text{A}\beta^{-/-}$ Variante der BW 5147 Thymomzelllinie wie beschrieben (Congia et al., 1998) fusioniert. Die Zellen wurden nach der Fusion in einem speziellen Medium selektioniert und anschließend kloniert.

2.2.8 Klonierung der Hybridomzellen

Wo angezeigt, wurden für die Epitopanalysen klonierte Hybridomzellen verwendet, insbesondere für die Analysen der Epitopbereiche OspA₁₄₆₋₁₅₅, OspA₁₆₄₋₁₇₅ und OspA₂₃₆₋₂₄₅. Dazu wurde das zu klonierende Hybridom auf eine Dichte von $0,5 \times 10^6$ Zellen pro ml gebracht und einmal in Wasch-Medium gewaschen. Anschließend wurde der Antikörper topro-3-iodid in einer Endkonzentration von 10 nM hinzugefügt, wobei das Volumenverhältnis der Hybridome zur Fluoreszenz 10:1 betrug. Nach einer Anfärbezeit von 20 Minuten bei 4°C waren die Zellen bereit für die Sortierung im FACS-Gerät (Becton Dickinson). Der Farbstoff markierte die abgestorbenen Zellen, so dass im nachfolgenden Sortierungsschritt ausschließlich intakte Hybridomzellen Verwendung fanden. Die Vereinzelung der Zellen wurde mit dem FACS-Vantage Sortierer (Becton Dickinson) durchgeführt. Es wurden zehn 96er Kulturplatten pro Hybridom angesetzt, wobei ein Heranwachsen von klonierten Hybridomen in durchschnittlich 15 Vertiefungen pro Platte zu verzeichnen war. Unter dem Mikroskop war nach etwa einer Woche ein Wachstum erkennbar. Nach zirka zehn Tagen waren die Zellen dicht genug ($0,4-0,8 \times 10^6$ Zellen pro ml) für den Transfer auf eine 24er Lochplatte. Bei Dichtewerten um 1×10^6 Zellen pro ml wurden diese auf die Erkennung von OspA und OspA-assoziierten Peptiden getestet.

2.2.9 Kontrolle der Zuchtmäuse auf die Expression von HLA-DR4/hu CD4

Die Methode der FACS-Messung (fluorescence activated cell sorter) basiert auf dem Prinzip der Einzelzelldarstellung in einer Suspension mit ihren Lichtstreuungseigenschaften und der emittierten Fluoreszenzstrahlung (Radbruch, 1992). Es erfolgt eine Messung der Zellgröße, der Granularität und drei weiterer verschiedener Fluoreszenzfarben. Das System besteht aus dem Laser (Argonlaser 488 nm, 200mW), aus dem Flüssigkeitssystem und aus dem optischen Bereich, in welchem die Streuung der Zellen ausgewertet wird. Folgende Parameter wurden bei der Zellanalyse gemessen:

- Forward Scatter (FSC): Vorwärtsstreuung ist proportional zur Zellgröße
- Sideward Scatter (SSC): Seitwärtsstreuung ist proportional zur Granularität
- Fluoreszenzintensität 1: Proportional zu der Intensität der Anfärbung mit Fluoresceinisothiozyanat (FITC)
- Fluoreszenzintensität 2: Proportional zur Intensität der Anfärbung einer Zelle mit R-Phycoerythrin (PE)

2.3 Probenvorbereitung

Die Proben wurden in jeweils 100 µl der Vertiefung einer 96er Lochplatte gegeben und mit 100 µl 0,83 % NH₄Cl vermischt, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach 8 min Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurden die Zellen zweimal in Wasch-Medium gewaschen und in 5ml PBS resuspendiert. Dann wurden die Zellen mit HLA-DR-FITC (Endkonzentration: 5 µg/ml) für 20 min im Dunkeln inkubiert. Daran anschließend wurde die Platte bei 200 x g für 6 min abzentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen mit 100 µl FACS-Puffer gewaschen und die ungebundenen Antikörper entfernt. Nun wurden die Zellen in 100 µl PBS/NaN₃ resuspendiert und die zweite Färbung hinzugegeben (anti-mCD4-PE in einer Endkonzentration von 5µg/ml). Nach 20 min Inkubationszeit wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgenommen und am FACS-Scan analysiert.

2.3.1 Antigenerkennung durch die klonierten Hybridome im Testansatz

Im Testansatz wurden durchschnittlich $0,5-1 \times 10^5$ Hybridomzellen pro Vertiefung mit $2,5 \times 10^5$ EBV-transformierten B-Zellen (homozygot für HLA-DRA*0101/HLA-DRB*0401) ausplattiert. Zuvor wurden diese wie unter Abschnitt 2.2.5 auf Seite 13 beschrieben, bestrahlt. Hybridomzellen wurden in einem Volumen von 100 µl mit den APZ (50 µl) und den OspA-Peptiden inkubiert, so dass sich in der U-Bodenvertiefung ein Gesamtvolumen von etwa 150µl befand. Als Nullkontrolle wurden die Zellen in Medium ohne Antigenzugabe inkubiert. Für die Analyse der Epitopbereiche OspA₁₄₆₋₁₅₅, OspA₁₆₄₋₁₇₅ und OspA₂₃₆₋₂₄₅ wurden ausschließlich klonierte Hybridome verwendet. Nach 48 h Inkubation wurden 100 µl Überstand zur Messung der IL-2-Konzentration abgenommen.

2.4 Analytische Methoden

2.4.1 Enzym-gekoppelter Immunnachweis (ELISA)

Für die Selektion der OspA-Spezifität der Hybridome wurde eine Europium-basierte Detektion der IL-2-Konzentration durchgeführt. Alle anderen Tests wurden mittels einer Peroxidase-Reaktion ausgeführt.

2.4.1.1 Europium-basierte Detektion

Die Detektion der IL-2 Überstände aus den Hybridom-Tests wurden sämtlich auf 96er Lochplatten durchgeführt. Die Platte wurde zwischen den Antikörpergaben mit Waschpuffer sorgfältig gewaschen. Zunächst wurde der Antikörper 3H12 JES-6 als Primär-Antikörper in

einer Konzentration von 2 µg/ml in Coating-Puffer gelöst und zu je 50 µl pro Vertiefung ausplattiert. Die Platte wurde über Nacht bei 4 °C belassen und am nächsten Tag mit 200 µl Blocking-Puffer für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend wurden 100 µl der Hybridom-Test-Überstände auf die so vorbereitete Platte übertragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der biotinylierte Antikörper 1H12 JES-6 in einer Konzentration von 1 µg/ml in 100 µl pro Vertiefung für eine Stunde auf die Platte gegeben. Anschließend wurde die Platte mit Europium (LKB-Wallac) 100 µl pro Napf (0,1 ng/ml) für eine Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden 50 µl einer Verstärkerlösung (LKB-Wallac) zu den Nöpfen gegeben und die Platten in einem Fluoreszenz-Platten-Lesegerät (LKB-Wallac) gemessen.

2.4.1.2 Peroxidase-basierte Detektion

Bis zur Extravidin-Kopplung waren die einzelnen Arbeitsschritte identisch zur Europium-basierten Detektion. Nach Zugabe des biotinylierten Sekundär-Antikörpers wurde die Platte mit Extravidin-Peroxidase 1:1000 in 100 µl pro Napf für eine halbe Stunde inkubiert. Für die Farbreaktion wurde TMB (3,3',5',5'-Tetramethylbenzidine Dihydrochloride) eingesetzt. Das Biotin bindet mit hoher Affinität an Streptavidin, welches anschließend an eine Peroxidase gekoppelt wird, die das Substrat H₂O₂ in Gegenwart von TMB (Elektronendonator) zu H₂O umsetzt. Das oxidierte TMB bildet den blauen Farbumschlag, welches bei hoher Proteinkonzentration intensiv blau aufleuchtet und proportional zur Peroxidase-Konzentration ist. Unter Schwefelsäure-Zugabe stoppte die Enzymreaktion mit einer gelben Entfärbung. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 450 nm im ELISA-Messgerät (Dynatech).

2.4.1.3 Auswertung der ELISA-Messwerte

Gemessene Werte \leq Mittelwert der Hintergrund-Kontrolle + 2fache Standardabweichung wurden als negativ gewertet.

Gemessene Werte \geq Mittelwerte der Hintergrund-Kontrolle + 2fache Standardabweichung wurden als positiv gewertet.

2.5 CTLL-2 Zelllinien

Die CTLL-2 Zellen wurden drei bis vier Tage nach Fütterung für die Detektion des IL-2 aus den Überständen der Kulturen eingesetzt. Die Zellen wurden vor dem Ausplattieren dreifach in Komplet-Medium gewaschen und in einer Konzentration von 2×10^4 Zellen pro Vertiefung einer 96er Lochplatte in 100 µl Volumen verwendet. Die gefrorenen IL-2-Überstände wurden bis

auf 37 °C aufgewärmt. Nun wurden jeweils 50 µl des Überstandes zu den CTLL-2 Zellen gegeben. Auf jeder Platte wurde eine Standardreihe IL-2 (rekombinantes Maus-IL-2, rmIL-2) in Triplets als Positivkontrolle mitgeführt. Als Negativkontrolle diente Medium ohne Antigenzusatz. Die IL-2 Verdünnungsreihen begannen bei 50 ng/50 µl und wurde im Verhältnis 1:4 bis zu 3 pg/50 µl verdünnt. Die Endkonzentrationen lagen zwischen 16 ng/ml und 1 pg/ml. Die Platten verblieben bei 37 °C im Inkubator. Nach einer Inkubationsphase von 24 Stunden und Abnahme der Überstände wurde 1 µCi ³H Thymidin (³H THY) (NEN[®]-DuPont) pro Vertiefung in 20 µl RPMI zugegeben, die Zellen für weitere 16 Stunden inkubiert und dann für mindestens 24 Stunden eingefroren. Die Zelllinie wurde im experimentfreien Intervall alle drei bis vier Tage im Verhältnis 1:5 geteilt und mit 10 U/ml rmIL-2 gefüttert.

2.5.1 Zytokinbestimmung und Proliferationsmessung

Nach dem Ausplattieren der Zellen wurde die Platte für 48 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden jeweils 100 µl pro Vertiefung des zellfreien Überstandes abgenommen und auf eine andere 96er Lochplatte übertragen. Die Überstände wurden zur Analyse des Zytokingehaltes im ELISA oder CTLL-2 Bioassay abgenommen und bis zur weiteren Verwertung für mindestens 48 h bei -20 °C aufbewahrt. Nach Abnahme der Überstände wurde 1 µCi ³H Thymidin (³H THY) (NEN[®]-DuPont) pro Vertiefung in 20 µl RPMI zugegeben und die Zellen für weitere 16 h inkubiert. Zum Messen der Proliferation wurden die Zellen aufgetaut, auf einer Filterplatte (Costar) geerntet und nach Zugabe von Szintillationsflüssigkeit bei einer Trocknungsphase von 15 min bei 50 °C mittels eines sogenannten β-Counters (Canberra Packard) die Inkorporation des ³H THY gemessen. Die gemessene Radioaktivität wurde als cpm (engl.: counts per minute) ausgegeben.

2.6 Statistik

Sämtliche in den Experimenten ermittelten Werte (z.B. Proliferation in Triplets) wurden als Mittelwerte mit Standardfehler angegeben. Der Standardfehler wurde nach folgender Formel berechnet:

$$SEM = \frac{\sqrt{n \sum x^2 - (\sum x)^2}}{n^2}$$

Dabei wird der Standardfehler (SEM) (engl.: standard error of the mean) aus dem Mittelwert \bar{x} und aus n Einzelwerten gebildet. Alle statistischen Analysen wurden mit dem Programm Excel[®] von Microsoft[®] durchgeführt.

2.7 Datenbanksuche und Peptidsynthese

Anhand der Erkennungsmotive der Hybridome (Supertope) wurden öffentliche Datenbanken wie SwissProt und TREMBL (software ExPasy) (www.expasy.ch) (Bairoch, 1997) nach humanen und murinen Peptiden, die die strukturellen Anforderungen der Erkennungsmotive (Supertope) der Hybridome erfüllten (Tabelle 1), durchsucht (www.expasy.org/tools/scanprosite) (ScanProsite-Software). Eine konventionelle Sequenzhomologie-Suche in SwissProt und TREMBL-Datenbanken (www.expasy.org/tools/blastp) (blastp software) wurde durchgeführt, um Human- und Mauspeptid-Homologe zu identifizieren.

2.8 Strukturmodellierung nach dem ICM-Programm

ICM (engl.: internal coordinate modeling) ist in der Arbeitsgruppe von Dr. Ruben Abagyan entwickelt worden (Abagyan et al., 1994a und 1994 b). Hintergrund ist die Möglichkeit der Modifikation von Peptidstrukturen in der Arzneistoffherstellung, da bei bekannter Peptidsequenz die Peptidstrukturen oft unbekannt sind. Mit Hilfe dieses Programms lässt sich die Struktur eines Peptids bei bekannter Sequenz unter bestimmten systemeigenen Variablen optimieren und in einem virtuellen Bild vom MHC-Peptid-Komplex mit seiner Oberflächenstruktur sichtbar machen. In dieser Arbeit wurde ein sogenanntes Monte-Carlo-Programm gewählt, welches die freien Variablen zufällig verändert, wobei als freie Variablen sogenannte Seitenketten-Dihedralwinkel eingesetzt wurden. Dies diente dazu, die optimale Lage der Seitenketten im MHC-Peptid-Komplex bei erhaltenem Peptidrückgrat zu ermitteln. Die Komponenten der MHC-Peptid-Bindung können nach elektrostatischen Eigenschaften eingefärbt werden, um so die Wechselwirkungen besser sichtbar zu machen. Die für diese Simulation notwendigen Verankerungspositionen des Peptids mit dem MHC-Molekül konnten aus den Supertopemotiven der einzelnen Hybridome abgeleitet werden. Für die Modellierung wurde eine Auswahl der Selbstpeptide des OspA₁₆₄₋₁₇₅-Bereichs verwendet und mit den schon definierten OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridomen und der Positivkontrolle *GYVLEGLTAEK* zusammen getestet. Die Auswertung der Versuche erfolgte mit dem beschriebenen CTLL-2 Bioassay.