

Aus dem Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin Berlin

DISSERTATION

MHC II-Bibliothek zur Restriktionsanalyse von T-Zell-
Rezeptoren

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Maria Lietz

aus Braunschweig

Datum der Promotion: 01. März 2019

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	4
1 Abstract.....	6
2 Einleitung.....	8
2.1 Verteilung und Struktur der MHC-Moleküle.....	9
2.2 Antigenpräsentation.....	10
2.2.1 Aufnahme von Pathogenen.....	10
2.2.2 Antigenprozessierung und Beladung von MHC-Molekülen.....	10
2.3 MHC-Nomenklatur und -Vererbung beim Menschen.....	12
2.4 Die immunologische Synapse zwischen TCR und MHC.....	13
2.4.1 Ursprung der MHC-Restriktion der TCR.....	15
2.4.2 T-Zell-Priming.....	17
2.5 Restriktionsanalyse eines TCR.....	17
2.5.1 MHC-Multimere zur Färbung von T-Zellen.....	18
2.5.2 Funktionelle Assays mit Zelllinien von bekanntem MHC-Haplotyp.....	20
2.6 Ziel dieser Arbeit.....	22
3 Materialien und Methoden.....	23
3.1 Materialien.....	23
3.1.1 Quellen der HLA und der Ii und verwendete Primerpaare.....	23
3.1.2 Sequenzierungsprimer.....	24
3.1.3 Retrovirale Vektoren.....	25
3.1.4 Zellen und Kulturmedien.....	25
3.1.5 FACS-Antikörper.....	25
3.1.6 Antigene.....	26
3.1.7 TCR.....	26
3.2 Methoden.....	26
3.2.1 RNA-Isolierung.....	26
3.2.2 cDNA (komplementäre DNA)-Synthese.....	26
3.2.3 PCR.....	27
3.2.4 Überlappungs-Extensions-PCR.....	27
3.2.5 Reinigung der PCR-Produkte.....	30
3.2.6 Restriktionsverdau der PCR-Produkte und der Vektoren.....	30
3.2.7 Ligation, Transformation, Herstellung von Plasmid-DNA.....	31
3.2.8 Zellkultur.....	31
3.2.8.1 Kultivierung und Kryopräservierung von K562 Zellen und PBL.....	31
3.2.8.2 Isolierung und Stimulation von PBL.....	32
3.2.8.3 Transfektion.....	32
3.2.8.4 Transduktion.....	33
3.2.8.5 Durchflusszytometrie.....	34
3.2.8.6 Generierung von HLA-DRA-Klonen.....	34
3.2.9 Auswahl von K562 DRA/DRB Zellen für die Restriktionsanalyse des HPV 16 L1 spezifischen TCR.....	34
3.2.10 Ko-Kultur.....	35
3.2.10.1 Elektroporation.....	35
3.2.11 IFN- γ ELISA.....	36
3.2.12 Ablauf der Experimente.....	37
4 Ergebnisse.....	38
4.1 Generierung DRA-transduzierter K562 Zellen als Basis für die Erstellung einer DR- Bibliothek.....	38
4.1.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die Restriktionsanalyse und Klonierung von	

DRA.....	38
4.1.2 Herstellung des DRA-Retrovirus und Transduktion der HLA-negativen Zelllinie K562.....	38
4.2 Generierung von K562 DRA/DRB Zellen.....	39
4.2.1 Klonierung und Transfektion einer DRB-Bibliothek.....	39
4.2.2 DRB-transduzierte K562 Zellen exprimieren keine DR-Komplexe auf der Zelloberfläche.....	40
4.2.3 Transgene Expression von DRA mit DRB-Allelen in K562 Zellen.....	41
4.3 Validierung der MHC II-Zellbibliothek.....	43
4.3.1 Transfektion und Transduktion des HPV 16 L1 spezifischen TCR.....	43
4.3.2 Auswahl von K562 DRA /DRB Zellen für die Restriktionsanalyse des HPV 16 spezifischen TCR.....	44
4.3.3 Der HPV 16 spezifische TCR ist DRA/DRB1*07:01 restringiert.....	45
4.3.4 K562 Zellen können das L1 Epitop endogen prozessieren und auf DRA/DRB1*07:01 präsentieren.....	46
4.4 Optimierung der MHC II-Zellbibliothek.....	46
4.4.1 Herstellung von DRA-Zellklonen durch limitierte Verdünnung.....	47
4.4.2 Transduktion der DRA-Klone mit DRB1*07:01.....	48
4.4.3 DRA-Klone/DRB1*07:01 werden von TCR-td PBL erkannt.....	48
4.5 Untersuchung der Rolle von Ii und DM in der MHC II-Restriktionsanalyse.....	51
4.5.1 Transduktion von K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen, DRA-Klon 3/ DRB 1*07:01 und DRA-Klon 5/DRB1*07:01 mit Ii, DM, Ii und DM.....	52
4.5.2 Einfluss von Ii und DM auf die Antigenprozessierungseffizienz.....	53
5 Diskussion.....	56
5.1 K562 Zelllinie als Gerüst für die MHC II-Zellbibliothek.....	56
5.2 Klonierung der MHC II-Allele.....	57
5.3 Transduktion der MHC II-Allele.....	57
5.4 Die MHC II-Zellbibliothek in der Übersicht.....	58
5.5 Validierung der MHC II-Zellbibliothek.....	58
5.5.1 Auswahl der Zielzellen.....	58
5.5.2 Restriktionsanalyse.....	58
5.6 Untersuchung der Antigenprozessierung.....	59
5.7 Optimierung der MHC II-Zellbibliothek.....	60
5.7.1 Herstellung der DRA-Klone.....	60
5.7.2 Untersuchung der Rolle von Ii und DM in der MHC II-Restriktionsanalyse.....	61
5.8 K562-basierte MHC II-Zellbibliothek im Vergleich mit anderen Methoden der Restriktionsanalyse.....	62
5.8.1 MHC II-Tetramere.....	62
5.8.2 LCL-basierte MHC II-Zellbibliotheken.....	62
5.8.3 Vorteile einer K562-basierten MHC II-Zellbibliothek.....	63
5.9 Mögliche Limitationen der MHC II-Zellbibliothek.....	63
5.10 Anwendungsgebiete.....	64
6 Abkürzungsverzeichnis.....	65
7 Literaturverzeichnis.....	67
Eidesstattliche Versicherung.....	75
Lebenslauf.....	77
Publikationen.....	79
Danksagung.....	80

1 Zusammenfassung

Die adoptive T-Zell-Therapie hat zum Ziel, T-Zellen mit einem Tumorantigen-spezifischen TCR (T-Zell-Rezeptor) auszustatten, sie *in vitro* zu vermehren, einem Tumorpatienten zu injizieren und so eine gegen den Tumor gerichtete Immunantwort zu induzieren. Für die Verwendung dieses TCR in anderen Tumorpatienten muss bekannt sein, auf welches MHC (major histocompatibility complex)-Molekül er restringiert ist. Dafür können mit diesem TCR transduzierte PBL (Lymphozyten des peripheren Blutes) mit MHC-Tetrameren angefärbt oder mit LCL (B-Lymphoblasten-Zelllinien) ko-kultiviert werden. Die Tetramer-Färbung ist für CD8 (cluster of differentiation)-TCR eine etablierte Methode. Für die Restriktionsanalyse an CD4-TCR hat sie sich als ungeeignet erwiesen.

In dieser Arbeit wurde eine MHC II-Zellbibliothek etabliert, indem HLA (humanes Leukozytenantigen, humanes MHC)-DRA, 13 verschiedene HLA-DRB-Allele und die für die Antigenprozessierung bedeutsamen Moleküle HLA-DM und Ii (Invariant Chain) mittels PCR mit spezifischen Primern aus LCL isoliert und in MP71 Retrovirusvektoren kloniert wurden. Eine Verpackungszelllinie wurde mit den einzelnen Plasmiden transfiziert und es wurden retrovirale Zellkulturüberstände gewonnen. Die HLA-negative humane K562 Zelllinie wurde mit den retroviralen Überständen aus HLA-DRA und einzelnen HLA-DRB transduziert und die Expression der Transgene durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Zellen der auf diese Weise entstandenen MHC II-Zellbibliothek wurden nach Beladung mit Peptid 16.01 des L1 Kapsidproteins des HPV 16 (Humanen Papillomvirus 16) oder nach Elektroporation mit *ivt*RNA (in vitro transkribierter RNA) des vollständigen L1 Antigens mit PBL ko-kultiviert, die zuvor mit einem Peptid 16.01 spezifischen CD4-TCR transduziert wurden. In den Ko-Kultur-Überständen wurde die Interferon- γ -Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die gleichen Versuche wurden nach Transduktion von K562 Zellen der MHC II-Bibliothek mit Ii, HLA-DM und beiden Transgenen durchgeführt sowie mit monoklonal HLA-DRA-exprimierenden K562 Zellen.

Es wurde gezeigt, dass K562 Zellen alle einzeln transduzierten HLA-DRB-Allele im Komplex mit HLA-DRA auf der Zelloberfläche exprimieren. Die Ko-Kultur mit den PBL zeigte, dass der TCR auf HLA-DRA/HLA-DRB1*07:01 restringiert ist.

Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass K562 Zellen L1 effektiv prozessieren und präsentieren können.

Monoklonale K562 HLA-DRA/HLA-DRB1*07:01 Zellen und K562 HLA-DRA/HLA-DRB1*07:01 Zellen, transduziert mit Ii und/oder HLA-DM, zeigten keine bessere Antigenpräsentationsfähigkeit.

Damit konnte bestätigt werden, dass mithilfe der hier vorgestellten MHC II-Bibliothek die Restriktion eines CD4-TCR analysiert werden kann. Dafür muss weder eine spezifische Epitopsequenz bekannt sein, noch braucht es Ii oder HLA-DM.

1 Abstract

Adoptive T-cell therapy aims at genetically engineering T cells to express a tumor-antigen specific TCR (T-cell receptor), cultivating those cells in vitro and injecting them into a tumor patient, where they are supposed to induce an immune reaction against the tumor.

For therapeutic use in other patients, the MHC (major histocompatibility complex) restriction of this TCR needs to be identified. Therefore, TCR-transduced PBLs (peripheral blood lymphocytes) can be stained with MHC tetramers or co-cultured with LCLs (B-lymphoblastoid cell lines). Tetramer staining is a well-established method for restriction analysis of CD8 (cluster of differentiation) TCRs but proved unsuitable regarding CD4 TCRs.

In this thesis, an MHC II cell library was established by isolating HLA (human leukocyte antigen; human MHC)-DRA, 13 different HLA-DRB alleles, HLA-DM and Ii (invariant chain) from LCLs via PCR with specific primers and cloned into MP71 retroviral vectors. A packaging cell line was transfected with the plasmids and retroviral supernatants were harvested. The HLA-negative, human K562 cell line was transduced with retroviral supernatants derived from HLA-DRA and individual HLA-DRB alleles. Expression of the transgenes was analyzed with flow cytometry.

Cells from this MHC II cell library were exogenously loaded with peptide 16.01 from the L1 capsid protein of the human papilloma virus 16 or electroporated with ivtRNA (in vitro-transcribed RNA) from the whole L1 antigen and co-cultured with PBLs previously transduced with a peptide 16.01 specific CD4 TCR. Interferon- γ concentration in the co-culture supernatant was measured with ELISA. The same experiments were conducted with the MHC II cell library after transduction with HLA-DM and/or Ii and with monoclonally HLA-DRA expressing K562 cells.

It could be shown that K562 cells express all individually transduced HLA-DRB alleles with HLA-DRA on their cell surfaces. Co-culture with the TCR-transduced PBLs revealed the TCR to be restricted to HLA-DRA/HLA-DRB1*07:01.

Furthermore, the experiments disclosed for K562 cells to be able to efficiently process and present L1.

Besides, monoclonal K562 HLA-DRA/HLA-DRB1*07:01 cells and those which were

transduced with Ii and/or HLA-DM did not exhibit a better antigen presentation ability. Thereby, the MHC II cell library is an appropriate tool for restriction analysis in CD4 TCRs for which the experimenter neither needs HLA-DM, Ii nor the exact epitope sequence.

2 Einleitung

Während das angeborene Immunsystem evolutionär konservierte, molekulare Muster von Krankheitserregern erkennt und so eine Vielzahl von verschiedenen Pathogenen unspezifisch abwehren kann, ohne jedoch eine langanhaltende Immunität zu entwickeln, wird davon das adaptive Immunsystem unterschieden. Das adaptive Immunsystem bildet eine spezifische Immunreaktion gegen ein Pathogen aus, entweder in Form von Antikörperbildung durch B-Zellen oder durch spezifische Toxizität gegenüber infizierten Zellen seitens T-Zellen. Oftmals wird dabei ein immunologisches Gedächtnis ausgebildet, das über einen längeren Zeitraum eine schnelle und spezifische Abwehr des Erregers gewährleistet (Janeway et al., 2001b). Die adaptive Immunantwort der T-Zellen läuft dabei im Prinzip folgendermaßen ab:

Dringen Pathogene beispielsweise über eine Hautverletzung in den Organismus ein, löst dies eine Entzündungsreaktion aus, die ortsständige, unreife APZ (antigenpräsentierende Zellen), in diesem Fall DZ (dendritische Zellen), anregt, die Pathogene aufzunehmen und intrazellulär in kurze Peptidsequenzen zu zerlegen (Janeway et al., 2009). Diese Peptidsequenzen werden auf MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle geladen, bei denen man die Subtypen MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Moleküle unterscheidet. MHC I- und II-Moleküle werden ihrerseits noch einmal in zahlreiche Subtypen mit jeweils teilweise tausenden von Allelen unterteilt. Daneben gibt es noch MHC-Klasse-III-Moleküle, bei denen es sich unter anderem um Komplementfaktoren und TNF- α (Tumornekrosefaktor- α) handelt (Janeway et al., 2001d).

Die DZ wandern über afferente Lymphbahnen zum nächstgelegenen Lymphknoten und differenzieren sich zu reifen DZ. Sie transportieren die Komplexe aus MHC-Molekülen und den Antigenen auf ihre Zelloberfläche (Antigenpräsentation). In den Lymphknoten treten sie mit vielen tausend T-Zellen in Kontakt, bis eine T-Zelle über ihren TCR (T-Zell-Rezeptor) den Komplex aus MHC-Molekül und Antigen mit ausreichender Affinität bindet (Janeway et al., 2009).

Damit die Affinität für eine Bindung und damit für eine Aktivierung der T-Zelle ausreicht, muss der TCR zum einen das Antigenpeptid (Epitop) spezifisch binden, zum anderen aber auch das präsentierende MHC-Molekül. Diese Interaktion ist abhängig von der MHC-Restriktion des TCR auf ein bestimmtes MHC-Allel: Jeder TCR bindet sein spezifisches Peptid nur, wenn es von einem bestimmten MHC-Allel präsentiert wird. Die MHC-Restriktion ist eine Folge der T-Zell-Entwicklung im Thymus. Je nach T-Zell-Subtyp führt die Aktivierung dann zur Sekretion von Botenstoffen oder zur Abtötung der DZ (Janeway et al., 2001b).

Die Analyse der MHC-Restriktion eines TCR ist in diesem Zusammenhang *in vitro* wie *in vivo* und damit sowohl in der Grundlagenforschung als auch in der Klinik von hohem Interesse, um die Reaktion des Immunsystems während einer Infektion, im Rahmen von Autoimmunerkrankungen, Allergien und Tumorleiden zu verstehen und zu therapieren.

2.1 Verteilung und Struktur der MHC-Moleküle

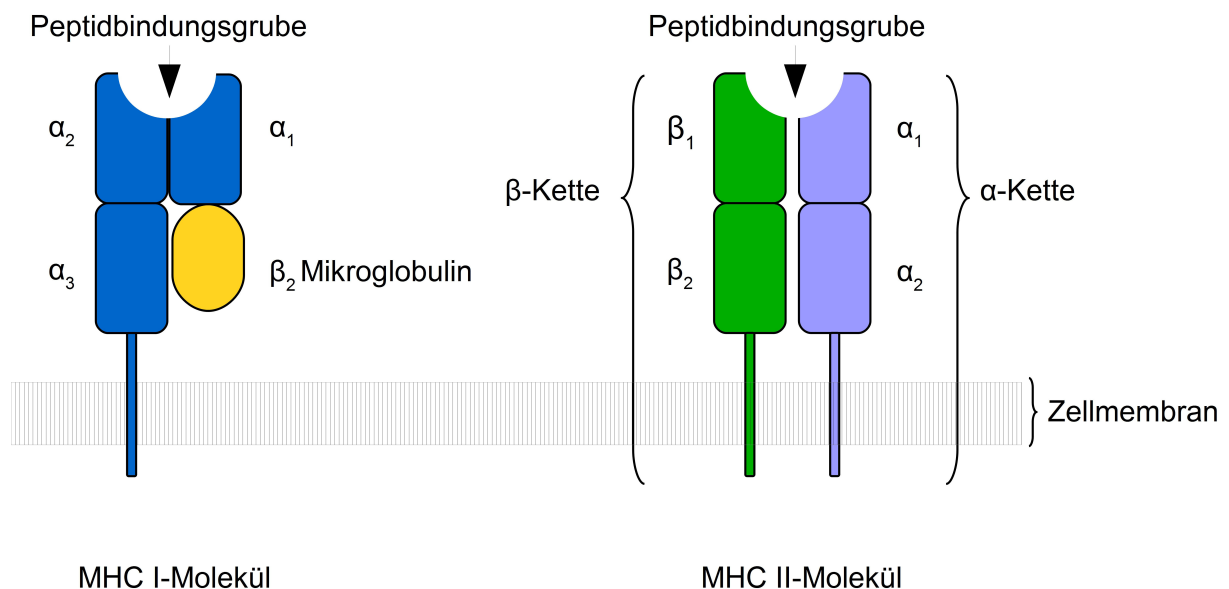


Abbildung 1: Die Struktur der MHC-Molekülklassen I und II. Adaptiert nach Janeway et al., 2001a.

MHC I-Moleküle (in Bezug auf den Menschen auch als HLA I, humanes Leukozytenantigen I, bezeichnet) werden von allen kernhaltigen Zellen im Körper exprimiert. Sie setzen sich aus einer α -Kette zusammen, die aus drei Domänen besteht, und einem nicht-kovalent gebundenen β_2 -Mikroglobulin, das die vierte Domäne bildet. Lediglich die α -Kette ist in der Zellmembran verankert (Abbildung 1, links). Die α_1 - und α_2 -Domäne formen die Peptidbindungsgrube, in die Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren hineinpassen (Janeway et al., 2001a).

Dagegen finden sich MHC II-Moleküle (in Bezug auf den Menschen auch als HLA II, humanes Leukozytenantigen II, bezeichnet) auf der Oberfläche von DZ, B-Zellen und Makrophagen („professionelle“ APZ), sind aber durch IFN- γ (Interferon- γ) und pathologische Stimuli auch auf weiteren Zellen induzierbar (Neefjes et al., 2011). Es handelt sich bei ihnen um Dimere aus einer α - und einer β -Kette (Abbildung 1, rechts), die beide aus zwei Domänen bestehen (α_1 und α_2 sowie β_1 und β_2) und über transmembranäre Teile in der Zellmembran verankert sind. Ihre Peptidbindungsgrube wird aus der α_1 - und der β_1 -Domäne gebildet und ist an beiden Enden offen. Die mit dem MHC II-Molekül interagierende Sequenz des gebundenen Peptids ist 9

Aminosäuren lang. Die Peptidbindungsgrube ist jedoch so angelegt, dass die Länge potenzieller Peptidliganden nicht begrenzt ist und somit Peptid-flankierende Regionen herausragen können (Holland et al., 2013)

Beiden MHC-Molekülklassen ist die dreidimensionale Struktur der Peptidbindungsgrube gemeinsam: Zwei antiparallele α -Helices formen eine Einbuchtung und acht antiparallele β -Faltblätter bilden spezifische Bindungstaschen am Boden dieser Einbuchtung (Holland et al., 2013).

Ob ein Peptid an ein MHC-Molekül binden kann, ist zum einen von seiner Länge, zum anderen von der Affinität seiner Aminosäure-Seitenketten zu den korrespondierenden Aminosäure-Seitenketten der Peptidbindungsgrube abhängig. Letztere variieren von Allel zu Allel, sodass T-Zellen ein großes Spektrum an Peptiden präsentiert werden kann (James et al., 2009).

2.2 Antigenpräsentation

2.2.1 Aufnahme von Pathogenen

Eine APZ kann Pathogene grundsätzlich über fünf verschiedene Mechanismen aufnehmen, um sie, genauso wie Proteine aus der extrazellulären Umgebung und intrazelluläre Proteine, über die zwei MHC-Molekülklassen an T-Zellen zu präsentieren: (1) Über rezeptorvermittelte Phagozytose und (2) Makropinozytose extrazellulärer Flüssigkeit werden Pathogene aufgenommen, deren Antigene auf MHC II-Moleküle geladen und präsentiert werden, und über (3) Virusinfektion und (4) Kreuzpräsentation phagozytierter und makropinozytierter viraler Peptide werden Pathogenbestandteile auf MHC I-Moleküle geladen und von diesen präsentiert. Es wurden auch verschiedene Mechanismen der (5) Übertragung von vollständigen MHC I/II-Antigen-Komplexen von einer APZ auf eine andere berichtet. Mechanismus (5) ist weitestgehend ungeklärt (Janeway et al., 2009).

2.2.2 Antigenprozessierung und Beladung von MHC-Molekülen

Die von MHC I-Molekülen präsentierten Peptide werden von Proteasomen aus zytosolischen Proteinen gebildet, unter denen sich nach Infektion mit Viren auch virale Proteine befinden. Sie werden über den TAP-Transporter (transporter associated with antigen presentation) in das ER (endoplasmatische Retikulum) gepumpt und können in Kontakt mit den sich dort assemblierenden MHC I-Molekülen kommen. Nach Peptidbindung werden die MHC I-Moleküle, nachdem ihre Chaperone Calreticulin, ERp57, PDI (Proteindisulfidisomerase) und Tapasin sich gelöst haben, über Vesikelabschnürung an die Zelloberfläche verbracht. Durch

Verschmelzung mit Endosomen können die MHC I-Moleküle in den Vesikeln auch mit endosomalen Peptiden beladen werden (Kreuzpräsentation endozytierter Antigene) (Neeffjes et al., 2011).

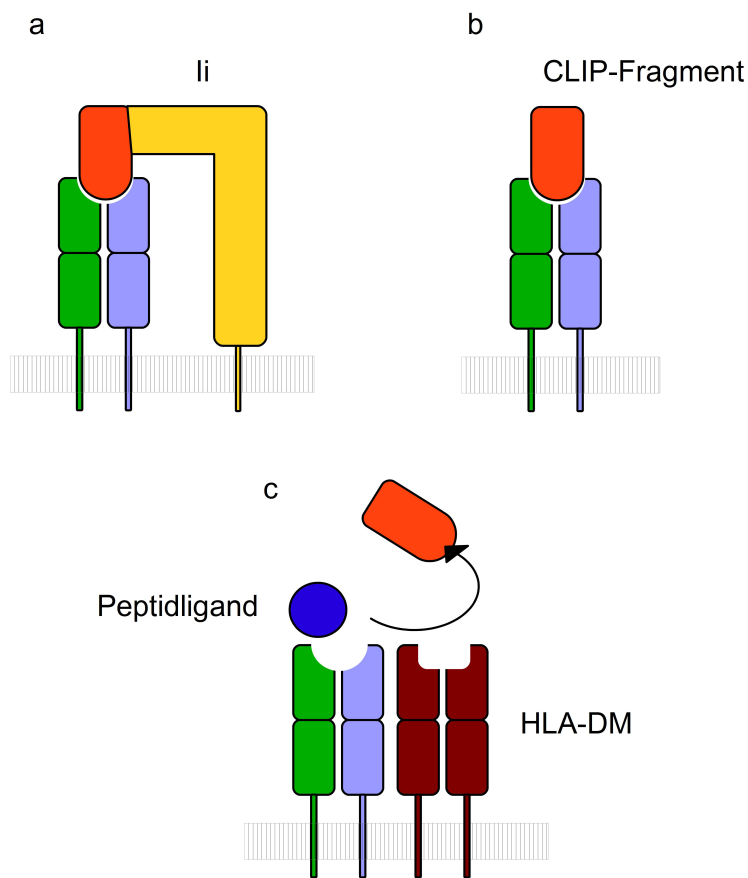


Abbildung 2: a, Ii stabilisiert im ER die Dimerbildung zwischen α - und β -Kette eines MHC II-Moleküls, indem es an die Peptidbindungsgrube bindet. b, in den MHC II-Kompartimenten wird Ii bis auf das CLIP-Fragment abgebaut. c, HLA-DM katalysiert den Austausch von CLIP gegen einen Liganden. Adaptiert nach Janeway et al., 2001c.

Während MHC II-Moleküle im ER assembliert werden, blockiert die CLIP-Region der Ii (invariant chain, invariante Kette, auch CD74 oder HLA Klasse II Histokompatibilitätsantigen γ -Kette genannt) ihre Peptidbindungsgrube. Damit ist die MHC II-Peptidbindungsgrube für Peptide innerhalb des ERs unzugänglich (Abbildung 2a). Drei Ii-Moleküle mit je einem MHC II-Molekül aus α - und β -Kette bilden zusammen Nonamere. In diesem Zusammenhang unterstützt Ii auch die korrekte Faltung der MHC II-Polypeptidketten und verhindert deren Aggregatbildung (Stumpfner-Cuvelette et al., 2002). Vom ER

schnüren sich Vesikel mit den darin enthaltenen MHC II-Ii-Nonameren ab. Die Ii-Aminosäuresequenz enthält Sortierungsmotive, die von Motorproteinen und ihren Adapterproteinen erkannt werden. Auf diese Weise werden die Vesikel, nachdem sie den trans-Golgi passiert haben, zu ihrem Bestimmungsort transportiert, dem späten endosomalen Kompartiment MIIC. In dem sauren Milieu von MIIC werden die Proteasen Cathepsin S und L aktiv, die Ii soweit abbauen, dass lediglich das CLIP-Fragment in der Peptidbindungsgrube der MHC II-Moleküle verbleibt (Abbildung 2b). Das MIIC verschmilzt mit Endosomen, die Proteine aus der extrazellulären Umgebung enthalten und ebenfalls zu Peptidfragmenten degradiert werden.

Der Austausch des CLIP-Fragments gegen ein Peptid aus dem MIIC-Pool wird von HLA-DM, einem nicht-klassischen MHC II-Molekül, katalysiert (Neefjes et al., 2011) (Abbildung 2c). Da HLA-DM eine destabilisierende Wirkung auf MHC II-Peptid-Komplexe ausübt, können nur Peptide mit hoher Affinität ausreichend lange stabil binden, um letztlich auf der Zelloberfläche präsentiert zu werden. Auf diese Weise nimmt HLA-DM Einfluss auf das präsentierte Peptidrepertoire (Mellins et al., 2014). Neben dieser klassischen intrazellulären Aufgabe kann HLA-DM auf der Zellmembran und in frühen endosomalen Kompartimenten von unreifen DZ, B-Zellen und LCL (B-Lymphoblasten-Zelllinien) eine weitere übernehmen: Im Komplex mit „leeren“ MHC II-Molekülen hält es diese in einer rezeptiven Konformation, die es ermöglicht, Peptide aus der extrazellulären Umgebung, die also keiner endosomalen Proteolyse ausgesetzt wurden, zu binden. Auf diese Weise können auch chemisch labilere Liganden präsentiert werden, die in dem sauren endosomalen pH schnell zerfallen würden (Arndt et al., 2000). Nachdem die CLIP-Fragmente gegen Peptidliganden aus den Endosomen ausgetauscht wurden, verschmelzen die MIIC-Membranen mit der Zellmembran, sodass die beladenen MHC II-Moleküle ihre Antigene auf der Zelloberfläche T-Zellen präsentieren können (Neefjes et al., 2011).

2.3 MHC-Nomenklatur und -Vererbung beim Menschen

Die MHC-Moleküle werden beim Menschen auf Chromosom 6p21.31 kodiert (Horton et al., 2004). Der MHC-Lokus ist polygen: Man unterscheidet in Bezug auf MHC I zwischen dem HLA-A-, -B- und -C-Gen und bei MHC II zwischen HLA-DRA- und -DRB-, -DQA- und -DQB-, -DPA- und -DPB -Genen, die jeweils für die α - und die β -Kette der HLA-DR-, -DQ- und -DP-Dimere kodieren. Das β_2 -Mikroglobulin wird beim Menschen auf Chromosom 15 kodiert. Alle diese Gene sind polymorph: Für den DRB1-Locus allein sind derzeit 1751 kodierende Allele bekannt (Stand: 21. Januar 2018) (Robinson et al., 2000, 2015). Eine Ausnahme bildet DRA mit nur zwei kodierenden Allelen, deren Translationsprodukte von identischer Aminosäuresequenz sind. Gegebenenfalls gibt es neben dem DRB1-Gen, das immer auf mütterlichem und väterlichem Chromosom zu finden ist, noch ein weiteres DRB-Gen: Dabei kann es sich um DRB3, DRB4 oder DRB5 handeln (siehe Abbildung 3) (Hurley et al., 2001). DRB2, 6, 7 und 8 sind Pseudogene, d.h. Gene, die nicht für funktionelle Proteine kodieren (Horton et al., 2004). Zur Vielfalt der MHC II-Moleküle auf der Zelloberfläche trägt neben dem Polymorphismus ihre kodominante Expression bei. Sofern eine professionelle APZ auf beiden homologen Chromosomen 6p21.31 sowohl DRB1 als auch DRB3, DRB4 oder DRB5 trägt und für alle MHC II-Allele, darunter auch DP und DQ, heterozygot ist, kann sie bis zu 12

verschiedene MHC II-Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimieren, wenn noch in Betracht

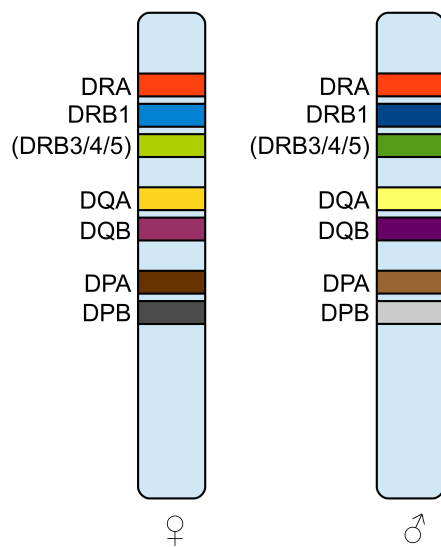


Abbildung 3: Schematische Darstellung des humanen, homologen mütterlichen und väterlichen Chromosoms 6p21.31. Das Translationsprodukt des monomorphen DRA-Gens (roter Abschnitt auf beiden Chromosomen), die DR α -Kette, kann mit den Translationsprodukten aller polymorphen DRB-Loci (verschiedene Blautöne/Grüntöne), den DR β -Ketten, DR-Dimere bilden. Ein DRB1-Gen ist immer auf beiden Chromosomen zu finden. Zusätzlich kann es auf einem oder beiden Chromosomen ein DRB3-, DRB4- oder DRB5-Gen geben (in Klammern gesetzt). Die Translationsprodukte des polymorphen DQA bilden auf die selbe Weise DQ-Dimere mit den Translationsprodukten der polymorphen DQB-Gene. Das gleiche gilt für die DP-Gene. Adaptiert nach Hurley et al., 2001.

gezogen wird, dass die translatierten α - und β -Ketten des einen Chromosoms mit den translatierten α - und β -Ketten des homologen Chromosoms Dimere bilden können. Entsprechend differenziert ist die Nomenklatur der MHC-Allele (Marsh et al., 2010). Der „HLA“-Präfix wird gefolgt von einem oder zwei Buchstaben (evtl. in Kombination mit einer Zahl), die für das Gen stehen, durch das ein MHC-Molekül kodiert wird, z.B. HLA-DR. Bei MHC-Klasse II-Allelen kennzeichnet ein „A“ oder „B“ das Gen für die α - oder β -Kette, z.B. HLA-DRB. Die

nachfolgende Zahl beschreibt die Nummer des Gens an dem jeweiligen Genort, z.B. HLA-DRB1. Ein Asterisk trennt die weiteren Spezifizierungen des Allels ab. Die erste darauffolgende Nummer beschreibt eine Allelgruppe, z.B. HLA-DRB1*13. Die Allele dieser Gruppe kodieren das DR13-Antigen (korrespondiert in diesem Fall mit dem Serotyp) oder weisen Sequenzhomologien zu anderen DRB1*13-Allelen auf. Die nächsten zwei Ziffern, durch einen Doppelpunkt abgegrenzt, spezifizieren das HLA-

Protein, z.B. HLA-DRB1*13:01. Allele, die Unterschiede in den ersten vier Ziffern aufweisen, unterscheiden sich in einem oder mehreren Nukleotiden, was in einer veränderten Aminosäuresequenz resultiert. Die weiteren Zahlengruppen beschreiben Varianten, die synonyme DNA-Substitutionen aufweisen und Varianten in nicht-kodierenden Regionen (Robinson et al., 2000, 2015).

2.4 Die immunologische Synapse zwischen TCR und MHC

Seit 1974 ist bekannt, dass ein TCR seinen spezifischen Liganden nur im Komplex mit dem MHC-Molekül erkennt, auf das er restringiert ist (Zinkernagel et al., 1974), weshalb in Anlehnung an die Verknüpfungen zwischen Neuronen von einer immunologischen „Synapse“ zwischen dem TCR (Struktur siehe Abbildung 4), dem von diesem spezifisch erkannten Peptid und dem MHC-Molekül die Rede ist. Zusätzlich zur TCR-Peptid-MHC-Wechselwirkung braucht es die ko-stimulatorischen Moleküle CD (cluster of differentiation) 4 oder CD8 auf der

Oberfläche von T-Zellen. Daneben ist CD3 mit für die intrazelluläre Signalübertragung zuständig.

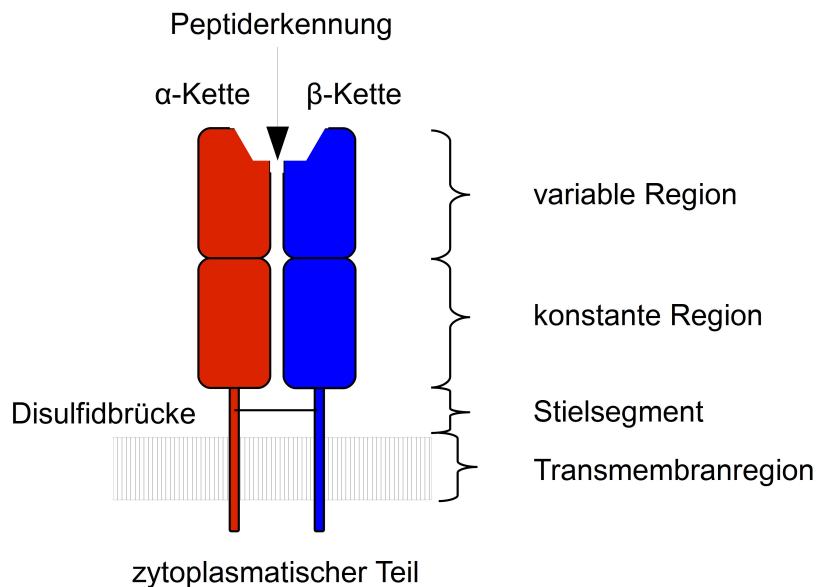


Abbildung 4: Struktur des $\alpha\beta$ TCR, einem Dimer aus α - und β -Kette. Die variable Region ist der Teil, mit dem ein TCR einen Komplex aus spezifischem Peptid und restringierendem MHC-Molekül erkennt. Ihre Struktur ist das Produkt einer zufälligen Gensegmentumlagerung des α - und des β TCR-Locus – daher sind Selektionsmechanismen von Nöten, die dafür sorgen, dass T-Zellen, die TCR, welche „selbst“-Peptide erkennen und TCR, die kein MHC-Molekül erkennen, in Apoptose gehen. Adaptiert nach Janeway et al., 2001a.

Die Expression von CD4 oder CD8 charakterisiert zwei funktionell unterschiedliche T-Zell-Subtypen: CD4- und CD8-T-Zellen. MHC I-Moleküle präsentieren Antigene an CD8-T-Zellen. Das ko-stimulatorische, transmembranäre CD8-Glykoprotein kann aus einer extrazellulären α - und β -Domäne, zwei α -Domänen oder zwei β -Domänen bestehen (Li et al., 2013). CD8-T-Zellen

sezernieren in Reaktion auf die spezifische Stimulation durch einen MHC I-Peptid-Komplex unter anderem Perforin, Granzyme, $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ und $TNF-\beta$ und exprimieren Fas-Ligand auf ihrer Oberfläche. Auf diese Weise können sie ihre Zielzellen direkt und spezifisch lysieren oder ihre Apoptose induzieren: Sie vermitteln die zelluläre Immunität und dienen vor allem der Abwehr intrazellulärer viraler Infektionen (Zhang et al., 2012).

MHC II-Moleküle dagegen präsentieren Peptide an CD4-T Zellen (siehe Abbildung 5). CD4 ist ein monomeres Glykoprotein aus vier extrazellulären Untereinheiten, D1 bis D4, das eine schwache Bindung mit MHC II-Molekülen eingeht. Es gibt zahlreiche funktionelle CD4-T-Effektorzell-Phänotypen, von denen die am besten beschriebenen die T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} (Typ 1-, Typ 2-, Typ 17-T-Helferzellen) und die T_{reg} (regulatorischen T-Zellen) darstellen. T_{H1} aktivieren Makrophagen und sind vor allem für die Bekämpfung intrazellulärer Pathogene zuständig, wohingegen T_{H2} B-Zellen als Teil der humoralen Immunität zu Wachstum und Antikörperklassenwechsel stimulieren und Eosinophile aktivieren. T_{H17} spielen bei der Immunantwort gegen Pilzinfektionen und extrazelluläre Bakterien eine Rolle. Im Gegensatz dazu haben T_{reg} mit der Sekretion des antiinflammatorischen IL-10 (Interleukin 10) vor allem eine immuninhibito-

rische Funktion (Geginat et al., 2013).

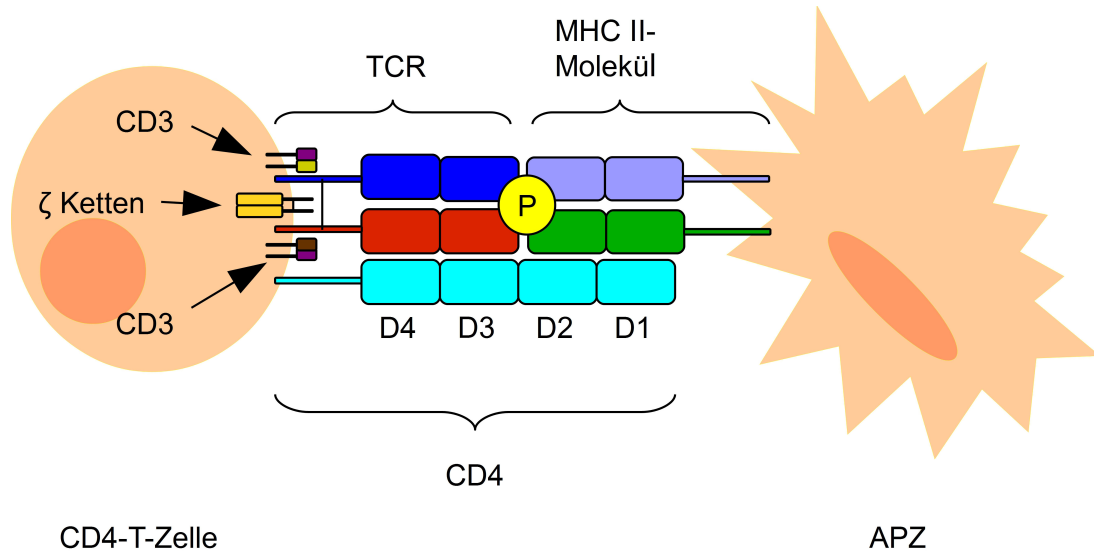


Abbildung 5: Interaktion zwischen einer APZ, die über ein MHC II-Molekül ein Peptid (P) auf ihrer Zelloberfläche präsentiert (rechts) und einer CD4-T-Zelle (links), die das Peptid MHC-restringiert über ihren TCR spezifisch bindet. Die TCR-MHC II-Interaktion wird vom CD4-Molekül unterstützt. Zu einem funktionellen TCR-Komplex gehören nicht nur die TCR α - und TCR β -Kette, sondern auch die dargestellten CD3-Dimere und die intrazellulären ζ -Ketten, welche zusammen für die intrazelluläre Signalübertragung nach spezifischer MHC-Peptid-Bindung zuständig sind. Adaptiert nach Janeway et al., 2001a.

Werden CD4-T-Zellen spezifisch durch APZ aktiviert, sezernieren sie Zytokine, die Proliferation, Differenzierung und Rekrutierung von CD8-T-Zellen fördern, darunter IFN, TNF, IL-2, -3, -4, -5, -10, -13 und GM-CSF (Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor) (Ostrand-Rosenberg, 2005). Auf diese Weise können CD4-T-Zellen zur Tumorlyse beitragen. Zusätzlich hemmen sie die Tumorangio-genese (Kim et al., 2014).

In den APZ selbst lösen CD4-T-Zellen eine verstärkte Expression von MHC II-Molekülen aus. Darüber hinaus gibt es CD4-T-Zell-Subpopulationen, die direkt Zielzellen abtöten. CD4-T-Zellen mit zytotoxischer Aktivität wurden z.B. bei Infektionen mit CMV (Cytomegalievirus)-, EBV (Epstein-Barr-Virus-) und HIV1 (Humanes Immundefizienzvirus 1) und Poliovirus-vakzinierten Menschen gefunden (Marshall et al., 2011). Sie entfalten ihre zytotoxische Aktivität u.a. über die Sekretion von Granzym B, was die direkte Eradikation von Tumorzellen grundsätzlich ermöglicht (Quezada et al., 2010).

2.4.1 Ursprung der MHC-Restriktion der TCR

T-Zellen differenzieren sich aus Stammzellen, die in der embryonalen Entwicklungsphase aus dem Dottersack und der fetalen Leber und beim Erwachsenen aus dem Knochenmark in den Thymus migrieren (Owen et al., 1970). Bei dem Thymus handelt es sich um ein primäres lymphatisches Organ, das beim Menschen dem Herzbeutel vorgelagert ist. Er ist in zahlreiche

Läppchen unterteilt, die aus einer äußeren Rindenregion und einer inneren Markregion bestehen (Westermann, 2010). Das Thymusstroma setzt sich aus einem epithelialen Netzwerk zusammen, in das die Vorläufer-T-Zellen eingebettet sind. Diese räumliche Aufteilung stellt Mikroumgebungen mit verschiedensten APZ zur Verfügung, welche für die sich entwickelnden T-Zellen unterschiedliche Selektionsnischen bieten. Im Laufe der Reifung verändern sich dadurch bedingt sowohl die Antigenrezeptorgene durch Rekombination der zahlreichen Antigenrezeptorgensegmente – und somit auch die Beschaffenheit der Ligandenbindungsstelle der entstandenen TCR –, als auch die Oberflächenmolekülexpression der $\alpha\beta$ -T-Progenitorzellen (Starr et al., 2003).

Die T-Vorläuferzellen wandern über die kortikomedulläre Grenze in den äußeren Thymuskortex ein. Sie sind sowohl CD4- als auch CD8-negativ, also „doppelt negativ“ (DN). Die DN-Phase lässt sich in vier Stadien unterteilen, DN1 bis DN4. DN1-Zellen sind CD44-positiv und CD25-negativ. Während ihrer weiteren Migration im Thymus beginnen sie, CD25 zu exprimieren, und werden damit zu DN2-Zellen. Als nächstes regulieren sie CD44 herunter, was sie zu DN3-Zellen macht. DN3-Zellen beginnen, das β -TCR-Gen durch die Aktivität von RAG (Rekombination-aktivierendes Gen) zu rekombinieren. Es kann zu mehreren Umlagerungsversuchen kommen, bis ein β -TCR-Gen entsteht, dessen Genprodukt mit einer vorläufigen, invarianten α -TCR-Kette einen prä-TCR im Komplex mit dem ko-stimulatorischen Molekül CD3 bildet. Zu diesem Zeitpunkt wird CD25 wieder herabreguliert (DN4). Anschließend werden erstmals CD4 und CD8 gleichzeitig exprimiert. Die Zellen werden daher „doppelt positiv“ (DP) genannt. Die DP-Tochterzellen lagern nunmehr das TCR- α -Gen um (Starr et al., 2003).

Sobald DP-Zellen einen TCR mit umgelagerter α - und β -Kette auf der Oberfläche exprimieren, werden sie einem entscheidenden Auswahlschritt unterworfen: der positiven Selektion. Der Selektionsdruck wird dabei vor allem von den cTEC (kortikalen Thymusepithelzellen) ausgeübt. Diese bilden eine dichte Matrix, die enge Kontakte zu den DN- und DP-Thymozyten fördert. Ihr Ligandom, das heißt die Summe der von ihnen präsentierten Liganden, ist charakteristisch und findet sich bei keinem anderen Zelltyp. In Hinblick auf die MHC II-Präsentation unterscheiden sich cTEC von anderen APZ darin, dass sie lysosomal TSSP (Thymus-spezifische Serinprotease) exprimieren. Wenn TSSP fehlt oder defekt ist, ist die Selektion von CD4-T-Zellen empfindlich gestört. Darüber hinaus betreiben cTEC in besonderem Maße Makroautophagie. So gelangen intrazelluläre Peptide in die MIIC und können auf MHC II-Moleküle geladen werden (Klein et al., 2014). Ist eine DP-Zelle in der Lage, mit ihrem TCR

eines der MHC-Moleküle auf der Oberfläche einer cTEC zu binden, ist sie positiv selektiert: Sie erhält dadurch rechtzeitig Überlebenssignale, bevor sie durch Vernachlässigung in Apoptose geht. Dadurch reguliert sie außerdem je nach Signalgeber (MHC I- oder MHC II-Molekül) entweder CD4 oder CD8 herunter, was sie „einfach positiv“ (single positive, SP) macht. Gelingt es einer DP-Zelle nicht, eines der MHC-Moleküle zu erkennen, dann baut sie den α -TCR-Locus weiter um und kann so unter Umständen TCR mit neuer α -Kette hervorbringen, bis einer von diesen ein MHC-Molekül auf den cTEC erkennt oder die DP-Zelle durch Vernachlässigung abstirbt (Klein et al., 2014).

Die Resultate der Genumlagerungsprozesse, die Strukturen der Ligandenbindungsstelle der TCR, sind zufällig. Die positive Selektion sorgt dafür, dass nur T-Zellen den Thymus verlassen, deren TCR MHC-restringiert „fremd“-Antigene erkennen. Der nächste entscheidende Schritt im T-Zell-Entwicklungsprozess besteht darin, diejenigen T-Zellen in der Medulla des Thymus durch Apoptoseinduktion negativ zu selektieren, deren TCR spezifisch für körpereigene Antigene sind. Dies ist nur möglich, weil die mTEC (medullären Thymusepithelzellen) in der Lage sind, das gesamte „selbst“-Peptidrepertoire des Organismus zu präsentieren. Dafür ist die Aktivität von AIRE (Autoimmunregulator Protein) entscheidend: AIRE kann sowohl Gewebe- als auch Differenzierungsstadien-spezifisch exprimierte Gene anschalten (Klein et al., 2014).

2.4.2 T-Zell-Priming

Nachdem die selektierten, selbsttoleranten und MHC-restringierten T-Zellen den Thymus verlassen haben, werden sie als „naiv“ bezeichnet. In diesem Stadium verkehren sie zwischen den Blut- und Lymphgefäßen sowie den Lymphknoten. Letztere erhöhen durch ihre anatomische Beschaffenheit und ihre Lokalisation als Durchflusstationen für die Lymphe die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen den naiven T-Zellen und DZ, die in den peripheren Geweben Antigene „gesammelt“ haben und sie den T-Zellen in den Lymphknoten präsentieren (Lämmermann et al., 2008). Sie werden in hoher Durchsatzrate von T-Zellen auf der Suche nach spezifisch bindenden Antigenen gewissermaßen „abgetastet“. Bei CD4-T-Zellen ist dabei das herrschende Zytokinmilieu zum Zeitpunkt des „Primings“, also des Erstkontakts mit dem spezifischen Liganden auf dem restringierenden MHC II-Molekül, ausschlaggebend für die Phänotypentwicklung in Richtung T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} oder T_{reg} (Swain et al., 2006).

2.5 Restriktionsanalyse eines TCR

Wie in den vorausgegangenen Kapiteln dargestellt, dienen T-Zellen im Rahmen der adaptiven

Immunantwort unter anderem der Bekämpfung von Infektionserregern. Die beschriebenen zytotoxischen Eigenschaften macht man sich in der Entwicklung adoptiver T-Zell-Therapien von Tumorerkrankungen zu nutze.

Das Prinzip der adoptiven T-Zell-Therapie besteht darin, einzelne TCR aus tumorreaktiven T-Zellen eines Patienten zu isolieren. Zeigt ein isolierter TCR eine ausreichende Affinität zu einem Tumorantigen, ohne gleichzeitig andere körpereigene Strukturen in klinisch relevantem Maße zu erkennen, kann er als Transgen in die T-Zellen eines anderen Patienten eingebracht werden. Diese T-Zellen erhalten damit eine neue Antigen-spezifität, die es ihnen ermöglicht, den Tumor anzugreifen (Restifo et al., 2012).

Damit dieser tumorreaktive TCR im Patienten sein spezifisches Tumorantigen erkennt, muss dieses auf dem MHC-Molekül präsentiert werden, auf das der TCR restringiert ist. Es muss daher präklinisch sowohl der MHC-Haplotyp des Patienten bekannt sein, der die adoptive T-Zell-Therapie erhalten soll, als auch die MHC-Restriktion der Kandidaten-TCR für eine adoptive T-Zell-Therapie. Sie wird in MHC-Restriktionsanalysen ermittelt. Diese MHC-Restriktionsanalysen sind nicht nur für die Entwicklung adoptiver T-Zell-Therapien von Relevanz. Sie können überall dort zum Einsatz kommen, wo T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankungen (z.B. Multiple Sklerose), Allergien des Typs IV und Immunantworten auf Infektionserkrankungen und Neoplasien *in vitro* erforscht werden. Sie sind damit ein universelles Werkzeug zur Charakterisierung einzelner TCR von der immunologischen Grundlagen- bis hin zur klinisch orientierten, translationalen Forschung. Dabei gibt es bisher zwei Vorgehensweisen: Die Färbung mit MHC-Multimeren und funktionelle Assays mit Zelllinien von bekanntem MHC-Haplotyp.

2.5.1 MHC-Multimere zur Färbung von T-Zellen

Bei MHC-Multimeren handelt es sich um lösliche MHC-Peptid-Komplexe, die mit einem Fluorochrom konjugiert sind (Klenerman et al., 2002). So sind durchflusszytometrische Analysen der auf diese Weise angefärbten Zellen möglich. Am gebräuchlichsten sind MHC-Multimere, bei denen eine der MHC-Ketten eine Biotin-Bindungsstelle enthält, sodass hinzugefügtes (Strept-)Avidin mit seinen vier Biotin-Bindungsstellen mit vier MHC-Biotin-Komplexen ein Tetramer bildet (Altman et al., 1996).

Durch die hohe Spezifität und Sensitivität der Tetramere können genaue Restriktionsanalysen an bereits sehr kleinen Probenmengen von T-Zellen vorgenommen werden. Das ist in begrenztem Maße auch dann möglich, wenn es sich um erschöpfte T-Zellen handelt, die nicht mehr in der Lage wären, in funktionellen Assays Zytokine freizusetzen (Klenerman et al., 2002). In Bezug

auf MHC I-Moleküle ist die Verwendung von Tetrameren Methode der Wahl (Casalegno-Garduño et al., 2010).

Da es eine Vielzahl an verschiedenen MHC II-Allelen gibt, deren Translationsprodukte sich in ihren Peptidbindungs-, Lösungs- und Stabilitätseigenschaften unterscheiden, hat es sich bislang als schwierig erwiesen, aus allen MHC II-Molekülen funktionierende MHC II-Tetramere zu generieren (Buckner et al., 2002).

Daneben sind Tetramere schlecht mit kleinen Fluorophoren konjugierbar, was dem Experimentator bei kommerziell hergestellten oft nicht mehr als die Wahl zwischen PE (Phycoerythrin) und APC (Allophycocyanin) lässt und somit Multiparameter-Durchflusszytometer-Analysen (FACS, fluorescence-activated cell sorting) in ihren Möglichkeiten einschränkt (Ramachandiran et al., 2007).

Hinzu kommt, dass in Bezug auf MHC II-Moleküle im Vergleich zu MHC I-Molekülen grundsätzlich eine geringere Avidität zu ihren korrespondierenden TCR beobachtet wurde, was das Anfärben zusätzlich erschwert (Falta et al., 2005; Gebe et al., 2003; Jaiswal et al., 2003; Kotzin et al., 2000; Mallet-Designé et al., 2003).

Ein weiterer Nachteil ist, dass das gewünschte Peptid vor der Herstellung des Tetramers bekannt sein muss. TCR mit unbekannter MHC-Restriktion und Epitopspezifität können auf diese Weise nicht angefärbt werden.

Es hat bereits zahlreiche Versuche gegeben, die hier angeführten Probleme der MHC II-Tetramerfärbung zu lösen. So wurden Vektoren geschaffen, die mit dem MHC II-Molekül zusammen für einen kurzen Peptid-Linker in Verbindung mit dem benötigten MHC-Liganden kodieren. Diese kovalente Bindung mit dem Liganden erhöht die strukturelle Stabilität des MHC II-Moleküls (Kozono et al., 1994). Allerdings ist bei dieser Methode für jedes MHC II ein separater Vektor notwendig, ebenso wie für jedes zu testende Peptid, was die Analyse verschiedener Peptid-MHC II-Kombinationen sehr aufwendig macht. Zudem besteht die Gefahr, dass der Peptid-Linker immunogen sein könnte, oder dass die Bindung zu dem MHC II-Molekül unphysiologisch stark sein könnte (Vollers et al., 2008).

In ähnlicher Weise können Vektoren konstruiert werden, die neben den MHC II-Ketten die Ii-Sequenz enthalten – so kann die physiologische Chaperon-Funktion von Ii genutzt werden (Day et al., 2003). Um das CLIP-Fragment dann aus der Peptidbindungsgrube zu lösen und es gegen ein Antigen einzutauschen, kann *in vitro* HLA-DM hinzugegeben werden (Sloan et al., 1995). Außerdem wurden MHC II-Moleküle, zu stabilisierenden Zwecken, auch schon mit

Immunglobulin-Gerüsten hergestellt (Schneck, 2000).

Rodenko et al. (2006) dagegen haben an lösliche MHC I-Moleküle zu Stabilisierungszwecken gebundene Peptide UV-induziert gegen die gewünschten Liganden ausgetauscht – für MHC II-Moleküle wäre dieser Ansatz ebenfalls denkbar. Das würde auch die Analyse verschiedener TCR-MHC-Peptid-Interaktionen vereinfachen.

Daneben gibt es Versuche, die Anzahl potenzieller Fluorochrome zu erhöhen: Zum einen binden Oktamere kleinere, nicht-proteinöse Fluorochrome besser, zum anderen kommen vermehrt sogenannte Quantum Dots zum Einsatz, bei denen es sich um fluoreszierende Halbleiter-Nanokristalle mit engem Emissions- und breitem Anregungsspektrum handelt (Guillaume et al., 2003; Jaiswal et al., 2003). Diese wurden in Kombination mit dem UV-induzierten Ligandenaustausch von Andersen et al. (2012) bereits erfolgreich verwendet.

In der Massenzytometrie werden Zellen alternativ mit an Schwermetallionen gebundenen Antikörpern markiert – so wird die Zahl beobachtbarer Phänotypmerkmale noch vervielfacht (Bendall et al., 2011).

Mallet-Designé et al. (2003) haben fluoreszierende Liposomen, die in ihrer Lipiddoppelmembran die gewünschten MHC II-Moleküle tragen, als künstliche APZ verwendet. Die MHC-Moleküle in den Membranen sind beweglich, außerdem haben die Liposomen jeweils eine große Oberfläche mit vielen MHC-Molekülen. Sie konnten zeigen, dass die geometrischen Eigenschaften dieser Konstellation für eine effektive TCR-Bindung günstiger sind als bei der Färbung mit Tetrameren.

Weiterhin wird mit weiteren Valenzen experimentiert; zu MHC II- Mono-, Di-, Penta- und Oktameren gibt es allerdings wenige publizierte Daten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Herstellung von MHC-Multimeren aufwendig, teuer und oftmals nicht für jedes Allel möglich ist, zumal das zu bindende Epitop vor der Herstellung bereits bekannt sein muss. Insgesamt stellen Tetramer-Färbungen aber aktuell noch die Methode der Wahl in der Restriktionsanalyse dar.

2.5.2 Funktionelle Assays mit Zelllinien von bekanntem MHC-Haplotyp

In den 1980ern brachte man erstmals einzelne HLA in Mausfibroblasten-Zelllinien ein. So wurden zunächst die Spezifitäten von mAb (monoclonal antibodies, monoklonale Antikörper), die gegen HLA II gerichtet waren, bestimmt. Außerdem zeigte sich, dass T-Zellen in der Lage waren, die HLA-transduzierten Fibroblasten HLA-restringiert zu erkennen (Austin et al., 1985). Die Mausfibroblasten wurden bald von humanen, EBV-transformierten LCL abgelöst. So

entstanden die ersten HLA-„Bibliotheken“ (Chen et al., 1987). Man machte sich dabei zu nutze, dass B-Zellen im Laufe der Transformation durch das Virus an Heterozygotität verlieren und so auch für den HLA-Locus homozygot werden (Honma, 2005). Auf der anderen Seite gewann man die LCL aus B-Zellen homozygoter Spender. Um die Zahl der exprimierten HLA durch einzelne LCL zusätzlich zu reduzieren, sind Verfahren der chemischen (Pious et al., 1977) und bestrahlungsinduzierten (Kavathas et al., 1980) Mutagenese zum Einsatz gekommen. Ziel war es stets, möglichst LCL zu erhalten, die jeweils nur ein HLA-Allel tragen, um so valide, einfache Restriktionsanalysen an T-Zellen durchführen zu können.

Um die Zahl potenziell restringierender HLA II-Moleküle einzugrenzen, werden in diesem Sinne zunächst Assays durchgeführt, in denen T-Zellen mit autologen APZ ko-kultiviert werden, deren HLA II-Moleküle vorher mit mAb gegen HLA-DR, -DQ oder -DP blockiert wurden. Allerdings ist nicht für jedes HLA II-Molekül der passende Antikörper verfügbar. Anschließend wird die Restriktion auf ein spezifisches Allel in Ko-Kultur mit LCL bestimmt (Doherty et al., 1998). Es handelt sich dabei also um einen mehrschrittigen experimentellen Ansatz. Die hierfür verwendeten LCL sind zwar homozygot für die einzelnen HLA-Loci, exprimieren aber durch die Polygenität des MHC in der Summe dennoch verschiedene HLA-Allele gleichzeitig auf ihrer Zelloberfläche. Daher lässt sich nicht sicher eingrenzen, auf welchem MHC der getestete TCR sein Antigen spezifisch erkennt.

LCL sind in der Lage, Antigene endogen zu prozessieren (Chen et al., 1998), was den größten Vorteil einer Zell-basierten Restriktionsanalyse gegenüber einer Tetramer-Färbung darstellt: Es muss vor einer Restriktionsanalyse lediglich das Protein bekannt sein, nicht das spezifische Peptidfragment. Es wird also der Zelle überlassen, welche Epitope tatsächlich aus der Antigenprozessierung entstehen.

Die Zytokin-Expressionsmuster können zwischen den verschiedenen LCL heterogen sein. Die Sekretion des T-Zell-inhibierenden IL-10 wurde beobachtet (Wroblewski et al., 2002). Das kann sich negativ auf die Aussagekraft von Restriktionsanalysen im Sinne falsch niedriger IFN- γ -Werte auswirken. Weil LCL das EBV-Genom enthalten, kann es in Ko-Kulturen mit T-Zellen zu EBV-Reaktivität kommen (Britten et al., 2002), da über 90% der Bevölkerung EBV-Träger sind (Ali et al., 2015).

Alles in allem zeigen HLA-exprimierende Zellen wie LCL hinsichtlich einer Restriktionsanalyse zwar zahlreiche Vorteile gegenüber der Tetramer-Färbung, aber aufgrund der polygenen HLA-Expression, der IL-10-Sekretion und der EBV-Infektion handelt es sich bei LCL nicht um

die optimalen Zelllinien für eine MHC II-Restriktionsanalyse.

2.6 Ziel dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, eine MHC II-Zellbibliothek auf Basis einer Zelllinie herzustellen, mit deren Hilfe Restriktionsanalysen an TCR von CD4-T-Zellen durchgeführt werden können. Dabei sollten die Zellen dieser MHC II-Zellbibliothek im Gegensatz zu den bisher üblicherweise verwendeten LCL lediglich jeweils ein einzelnes MHC II-Allel exprimieren und außerdem keine EBV-Reaktivität bei den getesteten T-Zellen auslösen. Daraus ergaben sich folgende Aufgabenstellungen:

1. Identifikation einer geeigneten Zelllinie
2. Auswahl eines stabilen Transgen-Transfersystems
3. Isolierung des monoallelischen DRA und verschiedener DRB-Allele und Einbringen der Gene in die Vektoren des Transgen-Transfersystems
4. Herstellung einzeln-MHC II-exprimierender Zellpopulationen
5. Validierung der entstandenen MHC II-Zellbibliothek durch Charakterisierung der MHC II-Restriktion eines CD4-TCR
6. Herstellung von Klonen der DRA/DRB-exprimierenden Zelllinie
7. Vergleich der Antigenpräsentationsfähigkeit zwischen polyklonaler DRA/DRB-exprimierender Zelllinie und monoklonalen DRA/DRB-exprimierenden Zelllinien
8. Identifikation weiterer für die MHC II-Antigenpräsentation bedeutsamer Proteine
9. Einbringen der Gene dieser Proteine in Vektoren des Transgen-Transfersystems
10. Evaluation der Notwendigkeit dieser Proteine für die MHC II-Zellbibliothek im Rahmen der MHC II-Restriktionsanalyse

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Quellen der HLA und der Ii und verwendete Primerpaare

Alle Primer wurden von Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert.

Protein	Primer für Ligation mit MP71 (<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>), MP71-DRA-ires-CFP (<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>), MP71-ires-GFP (f/fwd = forward, r/rev = reverse)	LCL cDNA
HLA-DRA*01:01:01:01	DRA*01_Not_f: atagcggccgccATGGCCATAAGTGGAGTC DRA*01_Eco_r: atagaattcTTACAGAGGCCCCCTGCG	WIN
HLA-DRB1*01:01	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCAGGAATCCTGTTGGC DRB1*01_Sall_f: atagtcgaccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_NotI_r: atagcggccgcTCAGCTCAGGAATCCTG	KAS116
HLA-DRB1*03:01	DRB1*03_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_EcoRI_r: ctcgaattcTCAGCTCAGGAATCCTC DRB1*03_Sall_f: atagtcgaccgccATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_NotI_r: atagcggccgc TCA GCT CAG GAA TCC TC	DUCAF
HLA-DRB1*07:01	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCAGGAATCCTGTTGGC	WIN
HLA-DRB1*11:01	DRB1*03_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_EcoRI_r: ctcgaattcTCAGCTCAGGAATCCTC DRB1*03_Sall_f: atagtcgaccgcc ATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_NotI_r: atagcggccgc TCAGCTCAGGAATCCTC	SPO010
HLA-DRB1*12:01	DRB1*03_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_EcoRI_r: ctcgaattcTCAGCTCAGGAATCCTC	BM16
HLA-DRB1*13*02	DRB1*03_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_EcoRI_r: ctcgaattcTCAGCTCAGGAATCCTC DRB1*03_Sall_f: atagtcgaccgccATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_NotI_r: atagcggccgcTCAGCTCAGGAATCCTC	WT47
HLA-DRB1*14:54	DRB1*03_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAG DRB1*03_EcoRI_r: ctcgaattcTCAGCTCAGGAATCCTC	EK
HLA-DRB1*15:01	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCAGGAATCCTGTTGGC DRB1*01_Sall_f: atagtcgaccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_NotI_r: atagcggccgcTCAGCTCAGGAATCCTG	Andreas Moosmann, München
HLA-DRB3*01*01	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCAGGAATCCTGTTGGC	VAVY
HLA-DRB3*02:02	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCAGGAATCCTGTTGGC DRB1*01_Sall_f: atagtcgaccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_NotI_r: atagcggccgcTCAGCTCAGGAATCCTG	DUCAF
HLA-DRB3*03:01	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCAGGAATCCTGTTGGC	WT47

Protein	Primer für Ligation mit MP71 (<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>), MP71-DRA-ires-CFP (<i>NotI</i> , <i>EcoRI</i>), MP71-ires-GFP (f/fwd = forward, r/rev = reverse)	LCL cDNA
	DRB1*01_Sall_f: atagtcgaccgccATGGTGTGTCTGAA DRB1*01_NotI_r: atagcggccgcTCAGCTCAGGAATCCTG	
HLA-DRB5*01:01	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB5*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCACGAGTCCTGTTGG G DRB1*01_Sall_f: atagtcgaccgccATGGTGTGTCTGAA DRB5*01_NotI_r: atagcggccgcTCAGCTCACGAGTCCTG	Andreas Moosmann, München
HLA-DRB5*02:01	DRB1*01_NotI_f: atagcggccgccATGGTGTGTCTGAA DRB5*01_EcoRI_r: atagaattcTCAGCTCACGAGTCCTGTTGG G	KAS011
HLA-DMA*01:01	HLA-DMA_p2a_fwd: AGCCTGCTGAAACAGGCCGGCGA CGTGGAAGAAAACCCCGGGCCCATGGGTCATGAACAGAAC CAAGGAGCTGCG HLA-DMA_Eco_rev: TAGAATTCTCAGTCACCTGAGCAAGGC TTCCGGAAGTA	WT47
HLA-DMB*01:01	HLA-DMB_Not_fwd: tagaattctcacatggggactgggcccagatc HLA-DMB_p2a_rev: GTCGCCGGCCTGTTTCAGCAGGCTGA AGTTGGTGGCGCCGGAGCCGAAATGTGCCATCCTTCTGA ATAATTGGACCC	VAVY
HLA-DMB-p2a- HLA-DMA	HLA-DMB_Not_fwd: TAGCGGCCGCCATGATCACATTCCTGC CGCTGCTGC HLA-DMA_Eco_rev: TAGAATTCTCAG TCACCTGAGCAAGGC TTCCGGAAGTA	VAVY und WT47
Invariant Chain, Isoform 2	CD74_Not_fwd: TAGCGGCCGCCATGCACAGGAGGAGAAGC AGGAGCTG CD74_Eco_rev: TAGAATTCTCACATGGGGACTGGGCCCAGATC	WT47

3.1.2 Sequenzierungsprimer

Name	Sequenz
MP71 forward	ATTTGTCTGAAAATTAGCTCGA
MP71 reverse	CATTTAAATGTATACCCAAATCAA
MP71-ires reverse	AAGTTACGGGAAGGGAGTAT

3.1.3 Retrovirale Vektoren

ame	Beschreibung	Quelle
MP71	siehe Engels et al., 2003	/
MP71-ires-GFP (grün fluoreszierendes Protein)	siehe Leisegang et al., 2008	/
MP71-ires-CFP	Das Transgen ist in diesem Vektor über ein ires-Element (internal ribosomal entry site) an CFP (cyan fluoreszierendes Protein) gekoppelt.	AG Uckert

3.1.4 Zellen und Kulturmedien

Zellen	Quelle	Beschreibung	Kulturmedium
LCL	Prof. Dolores J. Schendel, Helmholtz-Zentrum München	Zelllinien aus humanen, EBV (Epstein-Barr-Virus)-transformierten B-Zellen	RPMI III = RPMI 1640 500 ml (Gibco, Paisley, Schottland) + 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml) (Gibco) + 5,5 ml Minimum Essential Medium (MEM) (Gibco) + 5,5 ml Natriumpyruvat (NAP) (Gibco) + 55 ml Hitze-inaktiviertes fetales Kälberserum (FCS) (Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland)
K562 Zellen	ATCC, Manassas, USA	Humane, erythroleukämische Zelllinie	RPMI III = RPMI 1640 500ml + 5,5 ml Penicillin/Streptomycin (100 IU/ml) + 5,5 ml MEM + 5,5 ml NAP + 55 ml Hitze-inaktiviertes FCS
PBL (periphere Blutlymphozyten)	gesunder Spender	Aus Vollblutspenden	RPMI III + 1 : 1000 (400 IU/ml) bzw. 1 : 10.000 (40 IU/ml) IL-2 (Interleukin 2) (Novartis, Basel, Schweiz)

3.1.5 FACS-Antikörper

Spezifität	Konjugat	Isotyp	Hersteller
humanes HLA-DR	APC (Allophycocyanin)	Maus IgG1 anti-human	BioLegend, San Diego, Kalifornien, USA
humanes CLIP	FITC (Fluorescein Isothiocyanat)	Maus IgG1 anti-human	BioLegend
humanes HLA-DM	PE (Phycoerythrin)	Maus IgG1 anti-human	BioLegend
C-Region der murinen TCR- β -Kette	PE	Hamster IgG2 anti-Maus	BD Pharmingen, San Diego, Kalifornien, USA
humanes CD4	APC	Maus IgG1 anti-human	BD Pharmingen

3.1.6 Antigene

Für die exogene Beladung der Ko-Kultur-Zielzellen wurde das HPV 16 (Humanes Papillomvirus 16) L1 Peptid epitop 16.01, Sequenz: TNIYYHAGTSRLLAV, verwendet (zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Kaufmann, Charité Universitätsmedizin Berlin). Für die Versuche zur Prozessierung des L1 Antigens wurde ivtRNA (in vitro transkribierte RNA) aus einem HPV L1-pGEM-Plasmid (zur Verfügung gestellt von Dr. Felix Lorenz, AG Uckert) hergestellt (mMessage mMachin T7 Transcription Kit, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) und polyadenyliert (poly(A) Kit, Thermo Fisher Scientific).

3.1.7 TCR

Es wurde die MHC II-Restriktion eines HPV 16 L1 (Peptid 16.01) spezifischen TCR getestet, der aus einem CD4-T-Zell-Klon isoliert wurde (Dr. F. Lorenz). Die CD4-T-Zellen (Dr. A. Kaufmann) stammten aus einer mit Cervarix (GlaxoSmithKline, London, GB) gegen HPV 16 und 18 vakzinierten Spenderin. Das α - und das β -Kettengen (TRA und TRB) des TCR wurden cysteinisiert und murinisiert (Dr. F. Lorenz; Uckert et al., 2009).

3.2 Methoden

3.2.1 RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll (Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit, Stratec Biomedical AG, Birkenfeld, Deutschland).

3.2.2 cDNA (komplementäre DNA)-Synthese

Reaktionslösung, Temperatur und Zeit
2,5 μ g RNA
1,0 μ l 10mM dNTP (Desoxyribonukleosidtriphosphate) (Thermo Fisher Scientific)
1,0 μ l Random Primer (Roche, Basel, Schweiz)
→ 10 Min. Inkubation bei 70 °C
→ 1 Min. auf Eis
+ 4,0 μ l 5x First Strand Buffer (Thermo Fisher Scientific)
+ 2,0 μ l 0,1 M Dithiothreitol (Thermo Fisher Scientific)
+ 0,5 μ l RNase OUT (Thermo Fisher Scientific)
+ 1,0 μ l Reverse Transkriptase (Invitrogen Superscript II) (Thermo Fisher Scientific)
→ 1 Std. 42 °C
→ 5 Min. 95 °C

3.2.3 PCR

Reaktionslösung
35,0 µl H ₂ O
0,5 µl – 2,0 µl cDNA
10,0 µl GC-Puffer (Thermo Fisher Scientific)
1,0 µl dNTPs
1,0 µl Primer forward 50 µM
1,0 µl Primer reverse 50 µM
0,5 µl Phusion Polymerase (Thermo Fisher Scientific)
Temperatur und Zeit
1. 98 °C, 30 Sek.
2. 98 °C, 10 Sek.
3. 55 °C – 65 °C, 20 Sek.
4. 72 °C, 60 Sek.
5. 72 °C, 10 Min.
→ Schritt 2 – 4: 35x wiederholen

3.2.4 Überlappungs-Extensions-PCR

Als erstes wurden HLA-DMA*01:01 (DMA) und HLA-DMB*01:01 (DMB) unabhängig voneinander mit Primern aus LCL cDNA amplifiziert, wobei der DMB reverse-Primer eine p2a-Linkersequenz enthielt und der DMA forward-Primer die dazu komplementäre p2a-Linkersequenz (Abbildung 6, PCR 1 und 2) (Leisegang et al., 2008). Anschließend wurde durch schrittweise Temperaturreduktion (Tabelle PCR 3A) die *NotI*-DMB-p2a- und p2a-DMA-*EcoRI*-Doppelstrang-DNA in Einzelstränge denaturiert und deren Hybridisierung über ihre p2a-Sequenzen ermöglicht (Abbildung 6, PCR 3A). So entstand eine DMB-p2a-DMA-Kassette, die im Folgenden über spezifische Primer amplifiziert wurde (Abbildung 6, PCR 3B). Sie wurde in den pMP71 Vektor kloniert. Die Kopplung zweier DNA-Sequenzen über eine p2a-Linkersequenz führt dazu, dass diese in einen gemeinsamen mRNA-Strang transkribiert werden. Während der Translation sorgt p2A dafür, dass von dem Ribosom aus der gemeinsamen mRNA zwei getrennte Proteine translatiert werden (ribosomal skipping). Bei der Kopplung zweier DNA-Sequenzen über p2a geht man von einer Translation der beiden Gene in einem 1:1-Verhältnis aus.

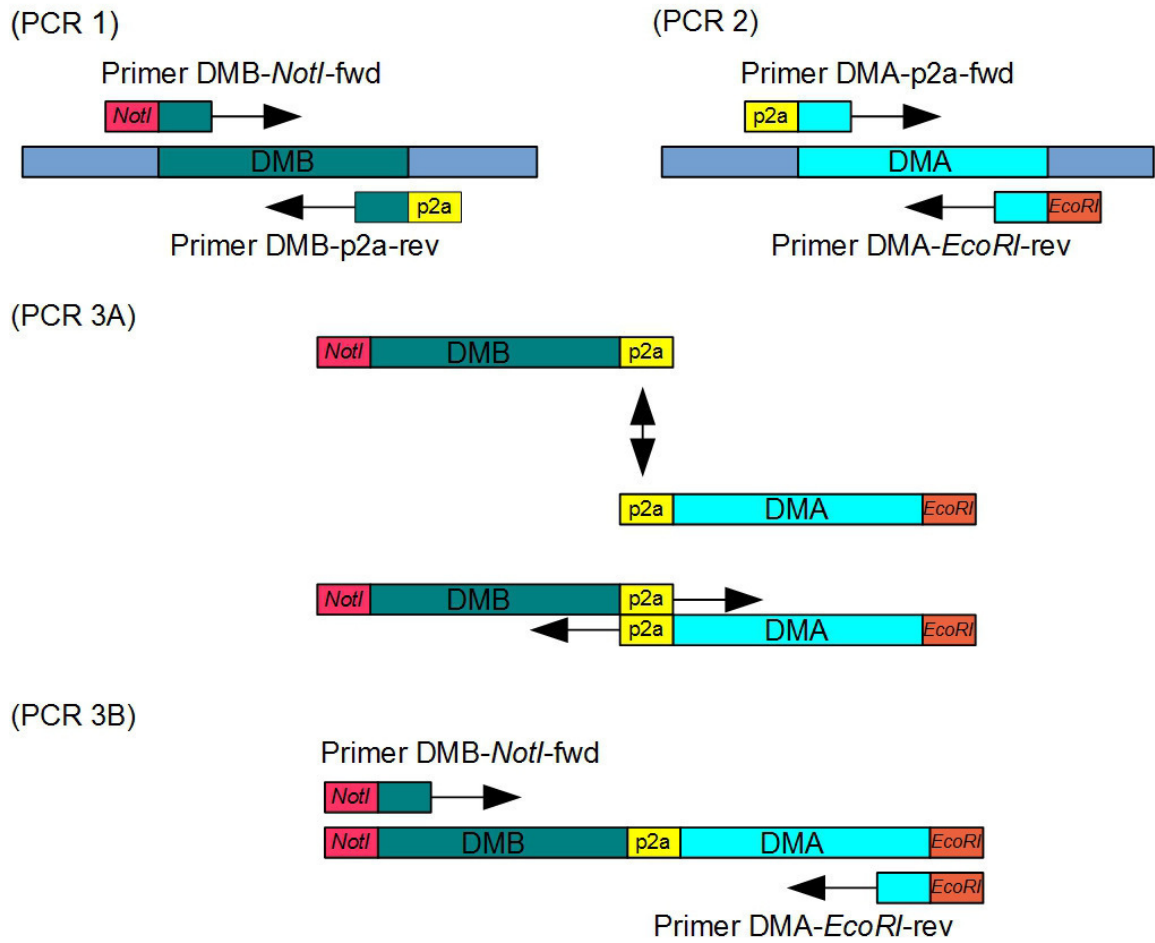


Abbildung 6: Generierung der DMB-p2a-DMA-Kassette. PCR 1 und PCR 2, zwei unabhängige PCRs zur Isolierung von DMB und DMA. Die Primer enthalten komplementäre Sequenzen für das p2a-Linkerelement. PCR 3A, Überlappungs-Extensions-Schritt über die p2a-Sequenz. PCR 3B, Amplifikation der DMB-p2a-DMA-Kassette. DMA, HLA-DMA*01:01; DMB, HLA-DMB*01:01.

PCR 1
Reaktionslösung
35,0 µl H ₂ O
2,0 µl cDNA
10,0 µl GC-Puffer
1,0 µl dNTPs
1,0 µl Primer HLA-DMB_Not_fwd 50 µM
1,0 µl Primer HLA-DMB_p2a_rev 50 µM
0,5 µl Phusion Polymerase
Temperatur und Zeit
1. 98 °C, 30 Sek
2. 98 °C, 10 Sek.
3. 64 °C, 20 Sek.
4. 72 °C, 1 Min.
5. 72 °C, 10 Min.
→ Schritt 2 – 4: 35x wiederholen

PCR 2
Reaktionslösung
35,0 µl H ₂ O
2,0 µl cDNA
10,0 µl GC-Puffer
1,0 µl dNTPs
1,0 µl Primer HLA-DMA_p2a_fwd 50 µM
1,0 µl Primer HLA-DMA_Eco_rev 50 µM
0,5 µl Phusion Polymerase
Temperatur und Zeit
1. 98 °C, 30 Sek
2. 98 °C, 10 Sek.
3. 64 °C, 20 Sek.
4. 72 °C, 1 Min.
5. 72 °C, 10 Min.
→ Schritt 2 – 4: 35x wiederholen

PCR 3A
Reaktionslösung
ad 48,5 µl H ₂ O
50 ng/100 ng PCR-Produkt DMA,
50 ng/100 ng PCR-Produkt DMB
10,0 µl GC-Puffer
1,0 µl dNTPs
0,5 µl Phusion Polymerase
Temperatur und Zeit
1. 98 °C, 30 Sek.
2. 98 °C, 10 Sek.
3. 95 °C, 5 Sek.
4. 90 °C, 5 Sek.
5. 85 °C, 5 Sek.
6. - 10. je 5 °C tiefer, je 5 Sek.
11. 55 °C, 5 Sek.
12. 72 °C, 1 Min.
13. 72 °C, 10 Min.
→ Schritt 2 – 12: 15x wiederholen

PCR 3B
Reaktionslösung aus 3A
+ 1,0 µl HLA-DMB_Not_fwd
+ 1,0 µl HLA-DMA_Eco_rev
+ 0,5 µl Phusion Polymerase
Temperatur und Zeit
1. 98 °C, 2 Min.
2. 98 °C, 40 Sek.
3. 60 °C, 40 Sek.
4. 72 °C, 1,2 Min.
5. 72 °C, 10 Min.
→ Schritt 2 – 4: 30x wiederholen

3.2.5 Reinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte wurden in die Taschen von 1%-igem Agarose-Gel pipettiert und es wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Zur Einordnung der Fragmentlängen diente eine 1 kb (Kilobasen) DNA-Leiter. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V über 15 Min. Danach wurden die DNA-Fragmente ausgeschnitten, gereinigt (Fragment CleanUp Kit, Invisorb, Stratec Biomedical AG) und in H₂O gelöst.

3.2.6 Restriktionsverdau der PCR-Produkte und der Vektoren

Für die 5'-/3'-Überhang-Klonierung in MP71-ires-GFP und MP71 wurden in den PCR-Produkten durch Restriktionsverdau sowohl des Vektors als auch der Inserts mit *Sall/NotI* bzw. *NotI/EcoRI* (Thermo Fisher Scientific) überhängende Nukleotide geschaffen. Die blunt-end Klonierung in MP71-ires-CFP erforderte eine Klenow fill-in-Reaktion (Roche). Verdaute Vektoren und PCR-Produkte wurden auf ein 1%-iges Agarose-Gel aufgetragen und es wurde jeweils 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Zur Einordnung der Fragmentlängen diente eine 1 kb DNA-Leiter. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V über 15 Min. Die DNA-Banden wurden daraufhin ausgeschnitten und mit einem Fragment CleanUp Kit gereinigt.

Verdau der PCR-Produkte	
<i>NotI/EcoRI</i>-amplifizierte PCR-Produkte	<i>Sall/NotI</i>-amplifizierte PCR-Produkte
41,0 µl gereinigtes PCR-Produkt	
2,0 µl <i>NotI</i>	2,0 µl <i>Sall</i>
2,0 µl <i>EcoRI</i>	2,0 µl <i>NotI</i>
5,0 µl Buffer O	5,0 µl Buffer O
→ 1 Std. 37 °C	

Vektorverdau		
MP71-ires-CFP	MP71-ires-GFP	MP71
H ₂ O ad 40,0 µl		
2,0 µg Vektor DNA		
2,0 µl <i>PmlI</i>	2,0 µl <i>Sall</i>	2,0 µl <i>NotI</i>
	2,0 µl <i>NotI</i>	2,0 µl <i>EcoRI</i>
4,0 µl Buffer T	5,0 µl Buffer O	
→ 1 Std. 37 °C		
+ 53,0 µl H ₂ O		
+ 6,0 µl Buffer Phosphatase (Roche)		
+ 1,0 µl Alkalische Phosphatase (Roche)		
→ 30 Min. 37 °C		
+ 1,0 µl Alkalische Phosphatase		
→ 30 Min. 37 °C		

Klenow fill-in
verdautes PCR-Produkt
0,4 µl dNTPs
2,0 µl 10x Klenow Buffer
1,0 µl Klenow Enzym
H ₂ O ad 20,0 µl
→ 20 Min. Raumtemperatur
→ 20 Min. 37 °C
→ 10 Min. 75 °C

3.2.7 Ligation, Transformation, Herstellung von Plasmid-DNA

Ligation und Transformation chemisch kompetenter *E. coli* (*Mach I*, Life Technologies, Carlsbad, Kalifornien) sowie Herstellung von pDNA (Plasmid-DNA) wurde wie von Kieback (2008; Dissertation) beschrieben durchgeführt. Nach Anfertigung von Mini-Präparationen wurden diese zur Kontrolle der richtigen Ligation verdaut (*PstI*, *BglI* oder *AflIII*, Thermo Fisher Scientific) und die resultierenden DNA-Fragmente in einem 1%-igen Agarosegel nachgewiesen. Die Sequenzierung der pDNA wurde jeweils mit Plasmid-spezifischen Primern vorgenommen (Source Bioscience Lifesciences, Nottingham, UK oder Eurofins MWG Operon). Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mit der IMGT/HLA-Database überprüft (Robinson et al., 2015).

3.2.8 Zellkultur

3.2.8.1 Kultivierung und Kryopräservierung von K562 Zellen und PBL

Das Auftauen und Einfrieren der Zellen erfolgte gemäß Kieback (2008; Dissertation). Sie wurden bei 38 °C, 6,5% CO₂ und 95% Luftfeuchtigkeit in einem Binder Brutschrank (Tuttlingen, Deutschland) inkubiert.

3.2.8.2 Isolierung und Stimulation von PBL

Zur Isolierung von PBL wurde einem aufgeklärten Spender Blut entnommen. Das Vollblut wurde 1 : 1 mit RPMI gemischt. Dann wurden Röhren mit je 15,0 ml Ficoll vorbereitet und je 25,0 ml Vollblut-RPMI-Mischung aufgeschichtet. Die Röhren wurden für 20 Min. bei 1800 rpm (rounds per minute) zentrifugiert (Eppendorf Centrifuge 5810 R, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurde die Leukozytenschicht abpipettiert und in neue Röhren überführt, wo sie mit RPMI ad 45,0 ml aufgefüllt wurden. Diese wurden 10 Min. bei 1200 rpm und 20 °C zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden abgesaugt und die Pellets in 45,0 ml RPMI aufgenommen. Der letzte Zentrifugationsschritt wurde wiederholt und die Pellets erneut in je 45,0 ml RPMI resuspendiert. Die Röhren wurden dann 15 Min. bei 800 rpm zentrifugiert. Die entstandenen Pellets aus allen Röhren wurden in RPMI III aufgenommen und vereint, die Zellen gezählt und auf $1 \times 10^6/\text{ml}$ verdünnt. Daraufhin wurden sie zu je 1,0 ml/well in 24-well Platten (TPP, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) mit anti-CD3/-CD28-Beschichtung unter Zugabe von IL-2 1 : 1000 (400 IU IL-2/ml) eingesät. Für die Beschichtung wurde je 1,0 ml PBS (phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung) mit 5,0 µg/ml anti-CD3 (OKT-3) (BD Pharmingen) und 1,0 µg/ml anti-CD28 (BD Pharmingen) verwendet und 2 Std. inkubiert, dann mit 2,0 ml PBS (2% BSA, bovines Serumalbumin) geblockt und mit PBS gewaschen. Nach 48 Std. wurde das Transduktionsprotokoll begonnen.

3.2.8.3 Transfektion

HEK-GALV Zellen wurden an Tag 1 in einer Dichte von $0,85 \times 10^6/3 \text{ ml}$ in eine 6-well Platte eingesät. An Tag 2 (nach 24 Std.) wurden sie mit dem oben beschriebenen Transfektionsansatz transfiziert und in einem Brutschrank bei 38 °C und 6,5% CO₂ inkubiert. 6 Std. nach Transfektion wurde der Überstand abgesaugt und durch 5,0 ml frisches RPMI III ersetzt. An Tag 4 (nach weiteren 18 Std.) wurde der virale Überstand geerntet und durch 0,45 µm-Poren-Filter in Polystyrolröhren gefiltert. Die Röhren wurden bei -80 °C kryokonserviert oder der Überstand direkt nach dessen Ernte für die Transduktion weiterverwendet. HEK-GALV Zellen enthalten die retroviralen Gene gag (kodiert Matrix-, Kapsid- und Nukleokapsidproteine), pol (kodiert Protease, Reverse Transkriptase und Integrase) und env (kodiert Hüllproteine). Durch Transfektion von pDNA werden neben dem Transgen die für den Zusammenbau von Viruspartikeln zusätzlich benötigten LTR (long terminal repeats: DNA-Wiederholungssequenzen an beiden Enden des Genoms, welche eine Funktion als Enhancer und Promotor

khaben, die Transkription initiieren und terminieren und ein Polyadenylierungssignal enthalten), MP71 (Promotor) und Ψ (Signal für das Verpacken der RNA in die Viruspartikel) zur Verfügung gestellt (Nolan, o. J.).

Transfektionspuffer
16,0 g NaCl
740,0 mg KCl
10,0 g HEPES (H4034, Sigma-Aldrich)
einstellen mit NaOH 4N
→ pH 6,76
→ steril filtrieren
→ -20 °C Lagerung

Reaktionslösung pro Transfektionsansatz
18,0 µg pDNA
15,0 µl CaCl ₂
H ₂ O ad 150,0 µl
unter ständigem Rühren der Reaktionslösung mit einem Vortexer (Stufe 6): + 150,0 µl Transfektionspuffer, tröpfchenweise hinzugeben
→ 20 Min. Inkubation bei Raumtemperatur

3.2.8.4 Transduktion

K562 Zellen wurden in 24-well Platten 0,3 x 10⁶/ml eingesät. Die Rand-wells wurden dabei ausgespart und mit je 2,0 ml PBS gefüllt. Zu den eingesäten K562 Zellen wurde nach 24 Std. je 1,0 ml viralen Überstandes und 8,0 µl Protaminsulfat (Sigma-Aldrich) hinzugefügt. Die Zellen wurden daraufhin 90 Min. bei 32 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden sie 32 Std. in einem Brutschrank bei 38 °C und 6,5% CO₂ kultiviert und dann in T25 Zellkulturflaschen mit 13,0 ml RPMI III gespült, aufrecht in einem Brutschrank bei 38 °C und 6,5% CO₂ kultiviert und nach Ablauf von weiteren 2 Tagen durchflusszytometrisch untersucht.

Die Transduktion der PBL erfolgte RetroNectin-gestützt (Cat. T100B, TaKaRa, Clontech, Mountain View, Kalifornien, USA). Die PBL wurden insgesamt 2x transduziert. Das erste Mal wurde 48 Std. nach ihrer Isolierung (siehe 3.2.8.2) je 0,5 ml TRA und TRB-Virusüberstand (TCR α - und β -Kettengen), 8,0 µl Protaminsulfat und 1,0 µl IL-2 zu den PBL in die anti-CD3/-CD28-beschichteten Platten gegeben. Sie wurden bei 32 °C und 2000 rpm 90 Min. zentrifugiert und danach 24 Std. bei 38 °C inkubiert.

Für die zweite Transduktion wurden 12-well non-tissue Platten mit 1,0 ml Retronectin/well (25,0 µg/ml) beschichtet und 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde Retronectin abgesaugt und BSA 2% für 30 Min. bei 38 °C hinzugegeben. Danach wurde BSA abgesaugt und die Platten mit 3,0 ml PBS gewaschen. Es wurden anschließend je 1,0 ml TRA- und TRB-Virusüberstand hinzugegeben und die Platten bei 4 °C und 4000 rpm 2 Std. zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, je 1,0 ml PBL aus den CD3-/CD28-beschichteten 24-well Platten, 1,0 ml zusätzliches Medium und IL-2 1 : 1000 (400 IU/ml) hinzugefügt und 5 Min. bei 32 °C

und 2000 rpm zentrifugiert.

Die PBL wurden bis Tag 13 nach ihrer Isolierung kultiviert und, wenn notwendig, mit RPMI III und IL-2 1 : 1000 (400 IU/ml) versorgt. An Tag 14 nach ihrer Isolierung wurden die PBL abzentrifugiert und in der Hälfte des ursprünglichen RPMI III-Volumens unter Zugabe von IL-2 1 : 10.000 (40 IU/ml) aufgenommen, um die Proliferation zu inhibieren, bis sie 48 Std. später (Tag 16) bei –80 °C kryokonserviert wurden.

3.2.8.5 Durchflusszytometrie

Für die durchflusszytometrische Färbung wurden je 250,0 µl Zellsuspension in eine 96-well v-Platte pipettiert und bei 2000 rpm 2 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und das Pellet in 50,0 µl PBS/Antikörper-Lösung aufgenommen. Diese enthielt bei der Färbung von K562 Zellen je 1,0 µl anti-DR-APC mAbs (monoklonale Antikörper) und/oder 0,5 µl anti-DM-PE mAbs und/oder 3,0 µl anti-CLIP-FITC mAbs. Nach mindestens 20 Min. Inkubation bei 4 °C wurden 200,0 µl PBS hinzugefügt und die Zellen erneut bei 2000 rpm 2 Min. zentrifugiert. Sie wurden daraufhin in 100,0 µl PBS aufgenommen. Die FACS-Analyse wurde mit einem MACSQuant (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland) durchgeführt. Es wurde die jeweilige MFI (mean fluorescence intensity) der Färbungen bestimmt. Die Datenauswertung erfolgte mit der Software FlowJo (Version 5.7.2.0, Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA).

3.2.8.6 Generierung von HLA-DRA-Klonen

Nach Herstellung von K562 HLA-DRA Zellen wurden die Zellen auf 1,5 Zellen/ml verdünnt und davon je 200,0 µl in 96-well u-Platten eingesät (~ 0,3 Zellen/well, d.h. ~ 1 Zelle in jedem 3. well). Die CFP-Expression wurde mit FACS analysiert und die monoklonal CFP-exprimierenden K562 Zellen weiter kultiviert.

3.2.9 Auswahl von K562 DRA/DRB Zellen für die Restriktionsanalyse des HPV 16 L1 spezifischen TCR

Die potentiell restringierenden MHC II-Moleküle wurden nach folgendem Schema ermittelt: Zunächst wurde die Sequenz des 15-mer L1-Epitops 16.01 (TNIYYHAGTSRLLAV) in die Immune Epitope Database (IEDB) (Vita et al., 2015) und die Datenbank NetMHCII 2.2 (Nielsen et al., 2009, 2007) eingegeben. In Bezug auf die IEDB wurde die von der Datenbank vorgegebene Referenz-HLA-Liste für die Vorhersage verwendet (darunter 15 HLA-DR-Allele),

bei NetMHCII 2.2 alle 14 von dieser Datenbank hinsichtlich Epitopaffinität vorhersagbaren HLA-DR-Allele.

3.2.10 Ko-Kultur

Die K562 Zielzellen wurden einen Tag vor der Ko-Kultur aufgetaut und in Kultur genommen. Sie wurden für die Ko-Kultur in 96-well v-Platten eingesät. Die verwendete Peptidkonzentration zur exogenen Beladung der Zielzellen betrug $1,5 \mu\text{g/ml} \hat{=} 1,0 \mu\text{M}$.

Die Effektoren (PBL) wurden kurz vor der Ko-Kultur aufgetaut und in einem Verhältnis von 2 : 1 oder 1 : 1 zu den Zielzellen in die 96-well v-Platten eingesät (das entsprach $100.000/100,0 \mu\text{l} : 50.000/100,0 \mu\text{l}$ bzw. $50.000/100,0 \mu\text{l} : 50.000/100,0 \mu\text{l}$, absolute Zellzahl). Zur Ermittlung des IFN- γ Minimum-Wertes (min) wurde RPMI III pipettiert, zur Ermittlung des IFN- γ Maximum-Wertes (max) wurden PBL mit Ionomycin/Phorbol-12-myristat-13-acetat zu je $1,0 \mu\text{g/ml}$ inkubiert. Als Kontrolle dienten PBL nach Transduktion mit Überstand von HEK-GALV, die ohne pDNA transfiziert wurden. Die Ko-Kultur-Zeit betrug 18 Std., dann wurde ein anti-human IFN- γ -ELISA durchgeführt (BD, Heidelberg, Deutschland).

Für alle Versuche, in denen die Antigenpräsentations- und Antigenprozessierungseffizienz von K562 HLA-DRA/HLA-DRB Zellen oder HLA-DRA-Klonen/HLA-DRB verglichen wurde, wurden die mit Peptid exogen beladenen/mit ivtRNA elektroporierten und inkubierten K562 Zielzellen in RPMI III auf $0,1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt (effektive Zielzellen, d.h. orientiert an der Rate von Zellen, die die gewünschten Transgene enthalten) und zu je $100,0 \mu\text{l}$ in 96-well v-Platten eingesät. Dann wurden die Effektoren aufgetaut, gezählt, ebenfalls in RPMI III auf $0,1 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt (effektive Effektoren, d.h. orientiert an der Rate CD4-positiver/mC β -positiver PBL) und je $100,0 \mu\text{l}$ zu den Zielzellen in die 96-well v-Platten pipettiert. Das entsprach einem Verhältnis effektiver Effektoren zu effektiven Zielzellen von $10.000/100,0 \mu\text{l} : 10.000/100,0 \mu\text{l}$ (1 : 1). Die Ko-Kultur-Zeit betrug 18 Std. Danach wurde ein anti-human IFN- γ -ELISA des Ko-Kultur-Überstandes durchgeführt.

3.2.10.1 Elektroporation

Wurde ivtRNA als Antigen verwendet, so wurden die Zielzellen abzentrifugiert, einmal in OptiMem (Gibco) gewaschen und dann in einer Konzentration von 5 oder $10 \times 10^6/\text{ml}$ in OptiMem aufgenommen. Davon wurden je $200,0 \mu\text{l}$ in $0,4 \text{ cm}$ Elektroporationsküvetten (Bio-Rad, Hercules, Kalifornien, USA) pipettiert. Einstellungen des Elektroporators: $0,35 \text{ kV}$, 250 Kapazität , $\infty \text{ Widerstand}$. Kurz vor der Elektroporation wurden je $10,0 \mu\text{g}$ ivtRNA hinzugegeben. Bei der Elektroporation werden Zellmembranen durch einen kurzen elektrischen

Impuls vorübergehend permeabel für ivtRNA. Die Zellen wurden danach aus den Küvetten mit RPMI III in Polystyroltubes gespült und dort 3 Std. inkubiert, bevor sie für die Ko-Kultur in die 96-well v-Platten eingesät wurden.

3.2.11 IFN- γ ELISA

Es wurden Kits von BD Pharmingen mit Maus anti-human IFN- γ -Antikörper verwendet. In 96-well ELISA u-Platten wurden 50,0 μ l Beschichtungspuffer und 1 : 1000 anti-IFN- γ Capture-Antikörper pro well pipettiert. Die 96-well u-Platten wurden als Verdunstungsschutz in Folie gewickelt und über Nacht bei 4 °C gelagert.

Am nächsten Tag wurden die Platten 3x mit Waschpuffer gewaschen (500,0 ml 10x PBS und 2,5 ml Tween ad 5,0 l H₂O). Daraufhin wurde 100,0 μ l/well Blockierungspuffer hinzugegeben (1x PBS und 10% FCS) und die Platten 1 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden sie erneut 3x mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden 50,0 μ l Ko-Kultur-Überstand/well hinzugefügt und ein IFN- γ -Standard von 4000 oder 8000 pg/ml verwendet, der in einer Verdünnungsreihe mit Blockierungspuffer pipettiert wurde. Dann wurden die Platten 2 Std. bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Danach wurden sie 5x mit Waschpuffer gewaschen und 50,0 μ l/well Detektor-Antikörper-Lösung hinzugegeben (Blockierungspuffer, 1 : 1000 Detektions-Antikörper, 1 : 1000 Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase). Die Platten wurden 1 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 7x mit Waschpuffer gewaschen. Es wurden 50,0 μ l/well Substratlösung hinzugefügt (1 : 1 Substrat A und B). Die Farbreaktion wurde mit 25,0 μ l/well H₂SO₄ gestoppt. Die Lichtabsorption wurde bei 450 und 570 nm Wellenlänge mit einem Photometer bestimmt.

3.2.12 Ablauf der Experimente

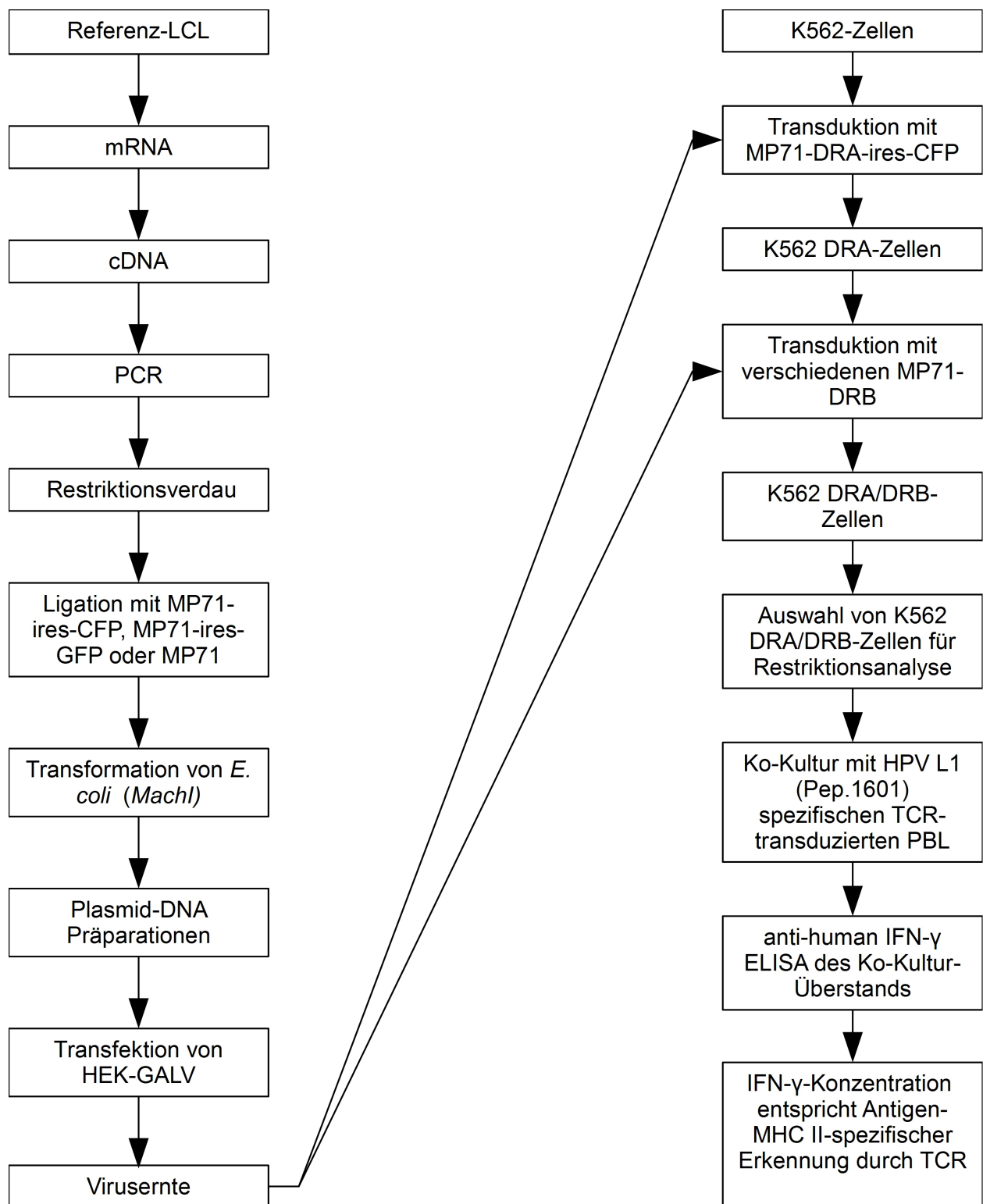


Abbildung 7: Ablauf der Experimente.

4 Ergebnisse

4.1 Generierung DRA-transduzierter K562 Zellen als Basis für die Erstellung einer DR-Bibliothek

4.1.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie für die Restriktionsanalyse und Klonierung von DRA

K562 Zellen sind HLA- und EBV-negativ. Sie wurden daher für die Etablierung einer Zellbasierten MHC II-Bibliothek ausgewählt.

Das monoallelische DRA bildet mit allen DRB-Allelen funktionelle DR-Komplexe. Daher wurde zunächst mRNA aus Referenz-LCL des Histocompatibility Workshops (Hurley und Johnson, 2001) amplifiziert, in cDNA revers transkribiert und DRA mittels PCR mit spezifischen Primern isoliert. Die Richtigkeit der DRA-Sequenz wurde über Abgleich mit der IMGT/HLA-Database bestätigt. DRA wurde daraufhin in einen MP71-ires-CFP Vektor (Engels et al., 2003; Leisegang et al., 2008) kloniert, sodass die DRA-Expression ohne Antikörperfärbung in K562 Zellen sichtbar gemacht werden kann, und eine pDNA-Präparation hergestellt.

4.1.2 Herstellung des DRA-Retrovirus und Transduktion der HLA-negativen Zelllinie K562

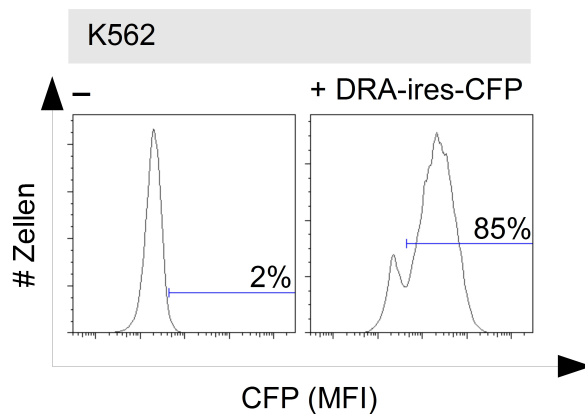


Abbildung 8: K562 Zellen nach Transduktion mit MP71-DRA-ires-CFP. Die Prozentzahlen geben den Anteil DRA-ires-CFP-exprimierender K562 Zellen wieder.

HEK-GALV Zellen wurden mit MP71-DRA-ires-CFP pDNA transfiziert. Der entstandene virale Überstand wurde geerntet, gefiltert und zu K562 Zellen hinzugefügt. Die DRA-Expression wurde durchflusszytometrisch über die korrespondierende CFP-MFI quantifiziert. Untransduzierte K562 Zellen zeigten einen Anteil von 2% CFP-positiven Zellen. Transduktion von K562 Zellen mit DRA ergab einen Anteil CFP-positiver Zellen von 85 %

(Abbildung 8).

In Abbildung 9 ist zu sehen, dass die DRA-transduzierten K562 Zellen sich nicht mit Antikörpern gegen den DR-Komplex anfärben ließen. Daraus lässt sich schließen, dass K562 Zellen kein endogenes DRB exprimieren, das mit dem Translationsprodukt des transduzierten DRA Dimere bilden kann, die auf die Zelloberfläche verbracht werden.

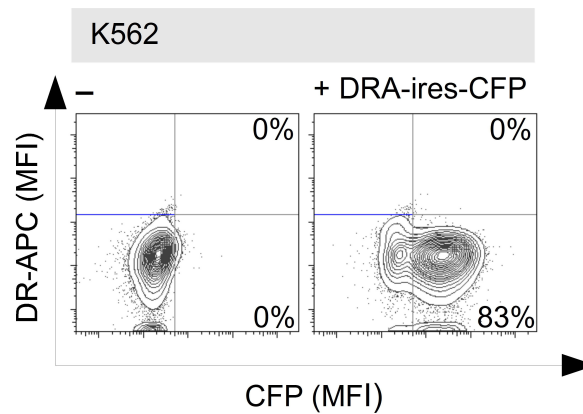


Abbildung 9: K562 Zellen nach Transduktion mit DRA-ires-CFP. Färbung mit anti-DR-APC-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil DRA-ires-CFP- und DR-APC-exprimierender K562 Zellen im jeweiligen Quadranten wieder.

4.2 Generierung von K562 DRA/DRB Zellen

4.2.1 Klonierung und Transfektion einer DRB-Bibliothek

Im nächsten Schritt wurden aus weiteren Referenz-LCL nach der selben Vorgehensweise wie bei DRA 13 DRB-Allele isoliert und in MP71-, MP71-ires-GFP und/oder MP71-ires-CFP Vektoren kloniert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Liste aller klonierten DRB-Allele.

Allel	MP71	MP71-ires-CFP	MP71-ires-GFP
DRB1*01:01	✓	✓	✓
DRB1*03:01	✓		✓
DRB1*07:01	✓		
DRB1*11:01	✓		✓
DRB1*12:01	✓		
DRB1*13:02	✓		✓
DRB1*14:54	✓		
DRB1*15:01	✓		✓
DRB3*01:01	✓		
DRB3*02:02	✓		✓
DRB3*03:01	✓	✓	✓
DRB5*01:01	✓		✓
DRB5*02:01	✓		

4.2.2 DRB-transduzierte K562 Zellen exprimieren keine DR-Komplexe auf der Zelloberfläche

Unter 4.1.2, Abbildung 9, wurde gezeigt, dass DRA-transduzierte K562 Zellen nicht mit einem gegen den DR-Komplex gerichteten Antikörper anfärbbar sind. Im Folgenden wurde untersucht, ob dies auch auf DRB-transduzierte K562 Zellen zutrifft. Dafür wurden diese jeweils exemplarisch mit DRB1*01:01, DRB1*11:01, DRB1*13:02, DRB1*15:01 und DRB5*01:01 transduziert. Abbildung 10 zeigt, dass K562 Zellen, die mit diesen ausgewählten DRB einzeln transduziert wurden, ebenfalls nicht mit einem gegen den DR-Komplex gerichteten Antikörper angefärbt werden konnten. Somit konnte gezeigt werden, dass K562 Zellen weder ein endogenes DRA noch ein endogenes DRB exprimieren, das mit den Translationsprodukten des transduzierten DRA oder der transduzierten DRB-Allele komplexiert und auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

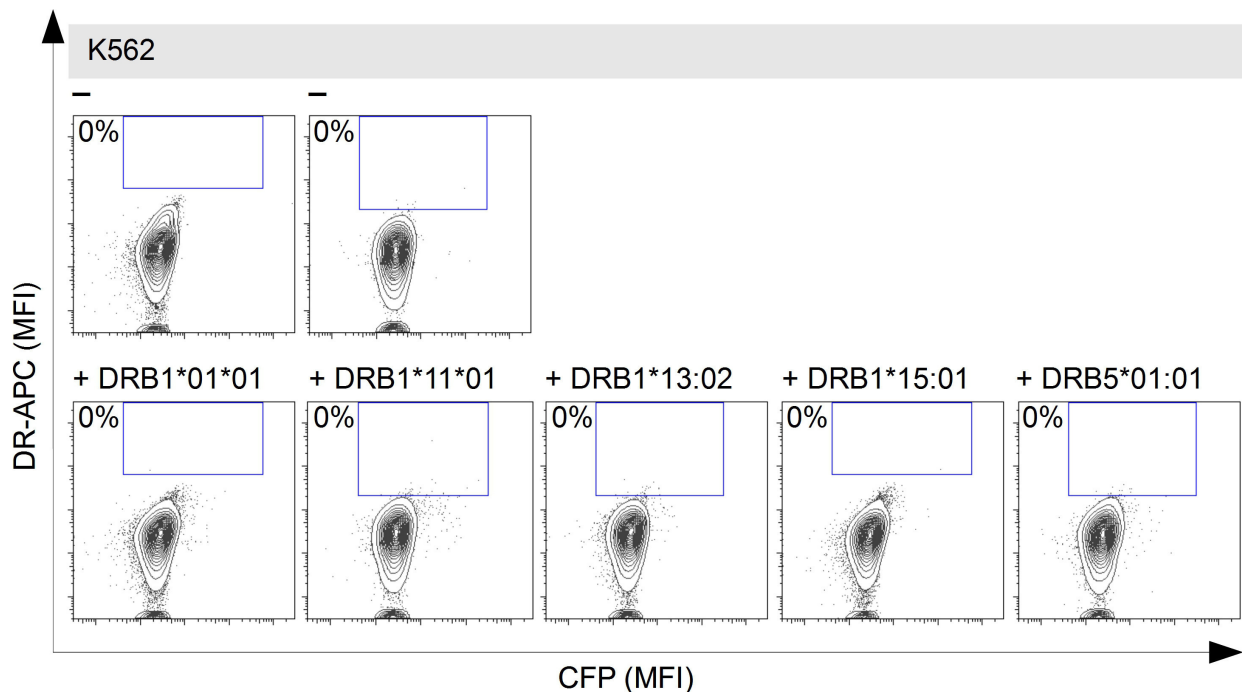


Abbildung 10: DRB-transduzierte K562 Zellen exprimieren keine DR-Komplexe auf der Zelloberfläche. Färbung mit anti-DR-APC-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil gleichzeitig DRA-ires-CFP- und DR-APC-exprimierender K562 Zellen in dem markierten Bereich wieder. Da die Ergebnisse aus zwei unterschiedlichen Experimenten zusammengestellt wurden, sind zwei Kontrollen abgebildet.

4.2.3 Transgene Expression von DRA mit DRB-Allelen in K562 Zellen

Die K562 DRA Zellen wurden mit den verschiedenen DRB-Allelen transduziert, um einzel-DR-exprimierende K562 Zelllinien einer MHC II-Zellbibliothek herzustellen. Abbildung 11 zeigt exemplarisch die Ergebnisse der Transduktion von K562 DRA Zellen mit DRB1*01:01 und DRB1*15:01. Sobald DRA und ein DRB-Allel gemeinsam in K562 Zellen eingebracht wurden, exprimierten diese einen DR-Komplex auf der Zelloberfläche.

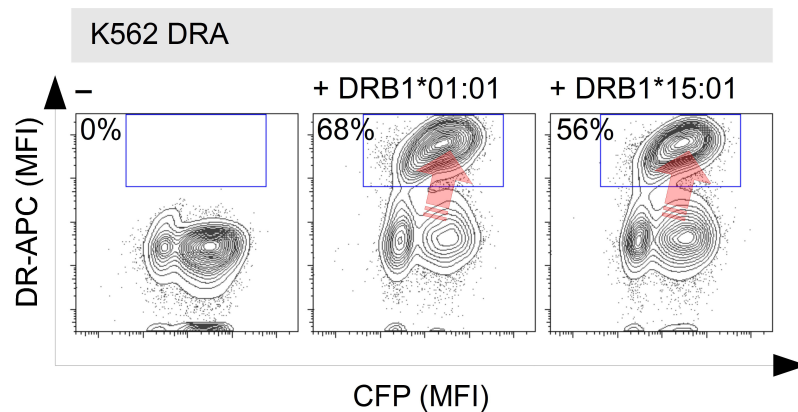


Abbildung 11: K562 DRA Zellen nach Transduktion mit DRB1*01:01 und DRB1*15:01. Färbung mit anti-DR-APC-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil gleichzeitig DRA-ires-CFP- und DR-APC-exprimierender K562 Zellen in dem markierten Bereich wieder.

Abbildung 12 zeigt die Ergebnisse der Transduktion der K562 Zellen und K562 DRA Zellen mit den verschiedenen DRB-Allelen: K562 DRA Zellen exprimierten alle 13 jeweils einzeln transduzierten DRB-Allele mit DRA als DR-Komplexe auf der Zelloberfläche, wo sie mit dem gegen den DR-Komplex gerichteten APC-gekoppelten mAb angefärbt werden konnten. Die DR-Expressionsrate lag dabei zwischen 39% für K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen und 79% für K562 DRA/DRB1*11:01 Zellen und K562 DRA/DRB5*01 Zellen. Zum Vergleich sind K562 Zellen zu sehen, die mit einigen ausgewählten DRB einzeln transduziert wurden und keine DR-Oberflächenexpression auswiesen.

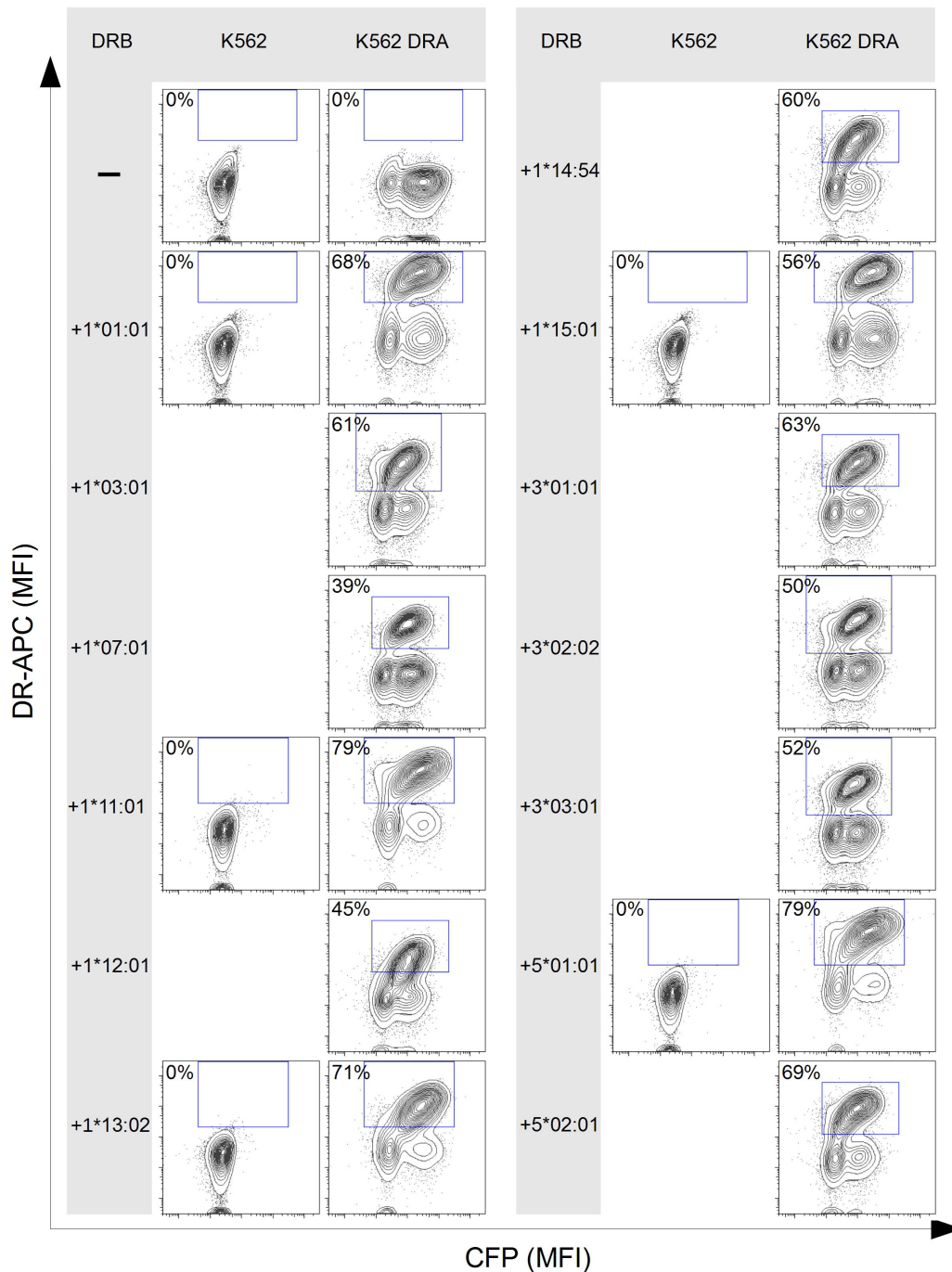


Abbildung 12: Die MHC II-Zellbibliothek: K562- und K562 DRA Zellen nach Transduktion mit verschiedenen DRB-Allelen. Färbung mit anti-DR-APC-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil gleichzeitig DRA-ires-CFP- und DR-APC-exprimierender K562 Zellen in dem markierten Bereich wieder. Die Ergebnisse wurden aus unterschiedlichen Experimenten zusammengestellt, daher unterscheiden sich die Markierungen.

Tabelle 2 ist zu entnehmen, wie häufig die hier transduzierten DRB1-Allele in der deutschen Bevölkerung vorkommen. Die im Rahmen dieser Arbeit erstellte MHC II-Bibliothek deckt somit einen großen Teil der in der Bevölkerung häufig vertretenen DRB1-Allele ab. Zur Häufigkeit der DRB3- und DRB5-Allele liegen keine Daten vor.

Tabelle 1: Prozentuale Häufigkeit der DRB1-Allele in der deutschen Bevölkerung (Gonzalez-Galarza et al., 2011)

DRB1-Allel	Häufigkeit in % (n = 11.407)
1*01	21,0
1*03	20,0
1*07	23,6
1*11	23,5
1*12	3,7
1*13	24,1
1*14	6,1
1*15	26,4

4.3 Validierung der MHC II-Zellbibliothek

Die MHC II-Zellbibliothek wurde auf ihre Eignung für die Restriktionsanalyse von MHC II-restringierten TCR geprüft, indem ein HPV 16 L1 (Peptid 16.01) spezifischer TCR getestet wurde, der aus einem CD4-T-Zell-Klon isoliert wurde. Die CD4-T-Zellen stammten aus einer gegen HPV 16 und 18 vakzinierten Spenderin.

4.3.1 Transfektion und Transduktion des HPV 16 L1 spezifischen TCR

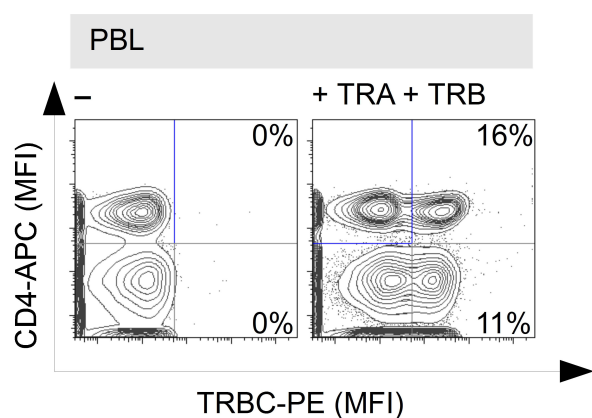


Abbildung 13: Spender-PBL nach gleichzeitiger Transduktion mit TRA- und TRB-retroviralem Überstand. Färbung mit anti-CD4-APC- und anti-TRBC-PE-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil CD4-APC- und TRBC-PE-exprimierender PBL im jeweiligen Quadranten wieder.

Das α - und β -Kettengen (TRA und TRB) des TCR wurden cysteinisiert und murinisiert (Dr. F. Lorenz, AG Uckert) (Uckert und Schumacher, 2009), einzeln jeweils in einen MP71 Vektor kloniert und HEK-GALV Zellen einzeln mit der präparierten pDNA transfiziert. Dann wurde TRA- und TRB-retroviraler Überstand gewonnen. PBL wurden aus humanem Spendervollblut gereinigt und aktiviert. Die aktivierten PBL wurden mit TRA- und dem TRB-retroviralem Überstand gleichzeitig

transduziert (im Folgenden als TCR-td PBL bezeichnet). Abbildung 13 zeigt, dass 11% der CD4-positiven PBL das Translationsprodukt des transduzierten TRB auf der Zelloberfläche exprimieren.

4.3.2 Auswahl von K562 DRA/DRB Zellen für die Restriktionsanalyse des HPV 16 spezifischen TCR

Tabelle 3: Ergebnis der IEDB-Analyse nach Eingabe der Sequenz TNYIYHAGTSRLLAV des HPV 16 L1 Epitops, sortiert von niedrigstem Perzentilenrang (entsprechend hoher Affinität) zu höchstem Perzentilenrang (entsprechend niedriger Affinität) von oben nach unten und von links nach rechts. *Blau*, TCR-Spenderin ist Trägerin dieses Allels; *rosa*, als Kontrollen eingeschlossene DRB1-Allele; *gelb*, von NetMHCII 2.2 und IEDB vorhergesagte DRB-Allele, die nicht DRB1 sind.

Allel	Perzentilenrang	Allel	Perzentilenrang	Allel	Perzentilenrang
DRB3*02:02	0,06	DPA1*02:01/ DPB1*14:01	6,80	DRB1*12:01	25,71
DRB1*09:01	0,09	DRB3*01:01	8,92	DPA1*02:01/ DPB1*01:01	29,95
DRB1*01:01	0,19	DRB1*08:02	9,17	DRB1*13:02	30,87
DRB1*07:01	0,27	DPA1*01:03/ DPB1*02:01	9,99	DPA1*02:01/ DPB1*05:01	35,62
DRB1*04:01	1,29	DRB1*03:01	10,25	DQA1*04:01/ DQB1*04:02	43,47
DRB1*04:05	2,24	DRB1*11:01	10,67	DQA1*05:01/ DQB1*02:01	45,93
DRB5*01:01	4,69	DPA1*01/ DPB1*04:01	11,71	DRB4*01:01	56,90
DRB1*15:01	5,80	DPA1*03:01 /DPB1*04:02	16,06	DQA1*01:01/ DQB1*05:01	60,98
DQA1*05:01/ DQB1*03:01	6,60	DQA1*01:02/ DQB1*06:02	16,23	DQA1*03:01/ DQB1*03:02	63,31

Zunächst wurde bestimmt, welche der transduzierten DRB eine ausreichende Affinität zu Peptid 16.01 haben, um es dem HPV 16 spezifischen TCR zu präsentieren. Die Affinität eines Epitops zu verschiedenen MHC-Molekülen lässt sich mit den Algorithmen der Datenbanken IEDB und NetMHCII 2.2 vorhersagen.

Die Ergebnisse der IEDB-Analyse sind in Tabelle 3 dargestellt (Wang et al., 2008, 2010). Die Affinität des Peptids 16.01 zu dem betreffenden MHC II-Molekül ist umso höher, je niedriger der angegebene Perzentilenrang ist. Die TCR-Spenderin wurde lediglich für den DRB1-Lokus

haplotypisiert – sie ist Trägerin der in Tabelle 3 blau unterlegten Allele. K562 DRA/DRB1*01:01 Zellen und K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen wurden daher in die Restriktionsanalyse eingeschlossen. Als Kontrollen zu diesen DRB1-Allelen wurden außerdem K562 DRA/DRB1*03:01 Zellen und K562 DRA/DRB1*15:01 Zellen (Tabelle 3, rosa unterlegt) für die Restriktionsanalyse ausgewählt, also DRB1-Allele, welche die TCR-Spenderin nicht trägt. Die Allele der anderen DRB-Loci DRB3, 4 und 5 wurden mangels Informationen zu dem Haplotyp der Spenderin durch einen Abgleich der Ergebnisse von NetMHCII 2.2 und IEDB ausgewählt. Da beide Datenbanken für DRB3*01:01 und DRB5*01:01 eine vergleichsweise hohe Affinität zu Peptid 16.01 vorhersagten, wurden auch K562 DRA/DRB3*01:01 Zellen und K562 DRA/DRB5*01:01 Zellen in die Restriktionsanalyse des HPV 16 spezifischen TCR eingeschlossen (Tabelle 3, gelb unterlegt).

4.3.3 Der HPV 16 spezifische TCR ist DRA/DRB1*07:01 restringiert

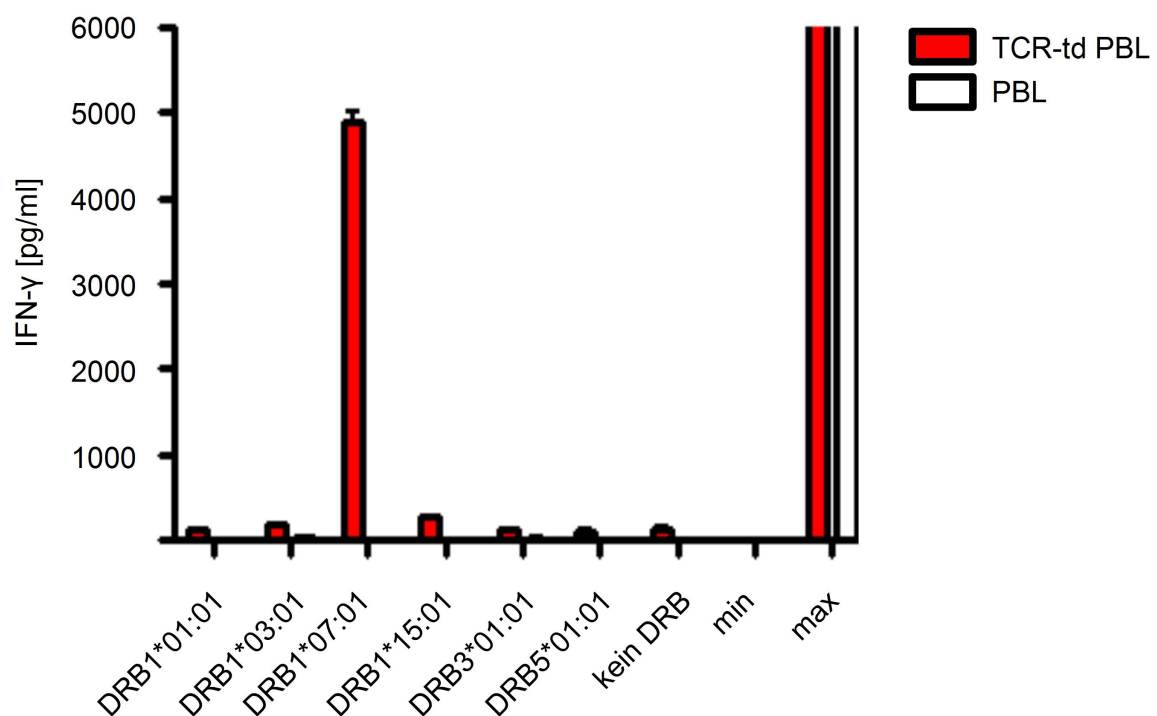


Abbildung 14: Restriktionsanalyse des HPV 16 spezifischen TCR. ELISA des Ko-Kultur-Überstandes von TCR-td PBL und untransduzierten PBL mit den K562 DRA/DRB Zellen nach exogener Beladung mit Peptid 16.01.

Die unter 4.3.2 ausgewählten K562 DRA/DRB Zellen wurden mit den TCR-td PBL über Nacht ko-kultiviert. Anschließend wurde die IFN- γ -Sekretion der TCR-td PBL in den Überständen der Kultur gemessen (Abbildung 14). Unter Präsentation des Peptids 16.01 auf K562

DRA/DRB1*07:01 Zellen kommt es zu der höchsten IFN- γ -Sekretion, d.h. der HPV 16 spezifische TCR ist auf DRB1*07:01 restringiert.

4.3.4 K562 Zellen können das L1 Epitop endogen prozessieren und auf DRA/DRB1*07:01 präsentieren

Der L1-pGEM Vektor wurde linearisiert und aus diesem ivtRNA des L1-Antigens hergestellt. K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen wurden mit L1 ivtRNA elektroporiert. Nach Ko-Kultur der K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen mit TCR-td PBL und untransduzierten PBL wurde die IFN- γ -Sekretion in den Ko-Kultur-Überständen bestimmt.

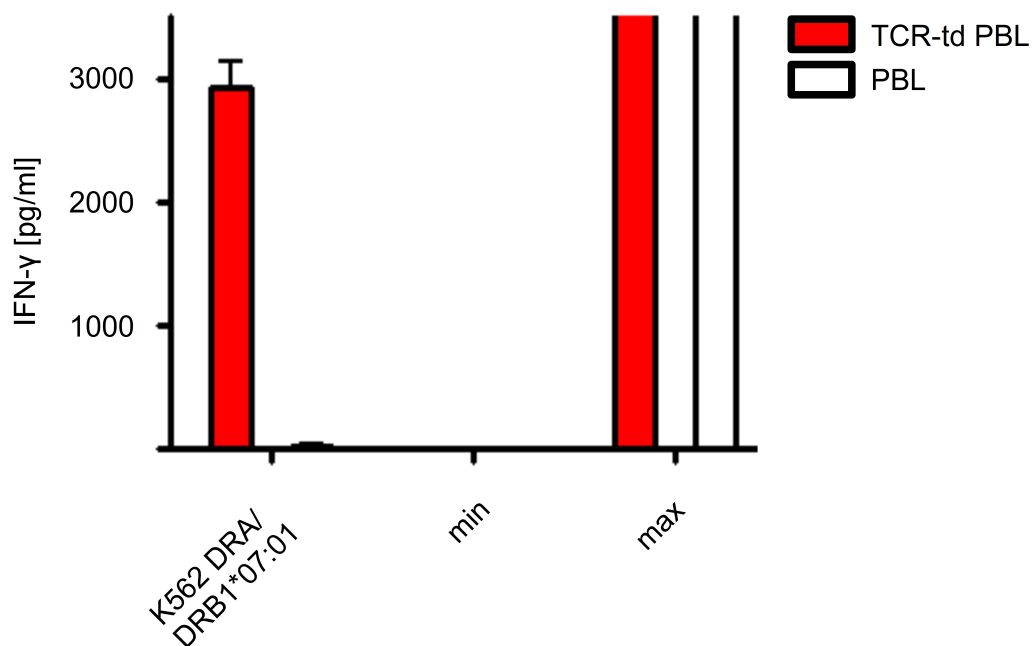


Abbildung 15: Testung der Antigenprozessierungsfähigkeit von K562 Zellen. ELISA des Ko-Kultur-Überstandes TCR-td PBL und untransduzierter PBL mit K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen, die mit L1 ivtRNA elektroporiert wurden.

In Abbildung 15 ist zu sehen, dass mit L1 ivtRNA elektroporierte K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen eine spezifische IFN- γ -Sekretion der TCR-td PBL hervorrufen. Sie sind somit in der Lage, aus translatiertem L1 Antigen das Epitop 16.01 zu prozessieren und zu präsentieren.

4.4 Optimierung der MHC II-Zellbibliothek

Da die Transduktion der K562 Zellen mit MP71-DRA-ires-CFP die Grundlage für alle weiteren Experimente lieferte und es sich bei den daraus etablierten K562 DRA Zellen um eine polyklonale, also heterogene Zellpopulation handelte, wurden DRA-Zellklone etabliert und die mit der vergleichsweise höchsten Wachstumsrate mit dem HPV L1 TCR-restringierenden

DRB1*07:01 transduziert. Über Beladung mit Peptid 16.01 und Elektroporation mit L1 ivtRNA wurden die DRA-Klone auf etwaige Unterschiede in Antigenpräsentations- und Antigenprozessierungsfähigkeit getestet, um den DRA-Zellklon mit den für die MHC II-Restriktionsanalyse günstigsten Eigenschaften auswählen zu können.

Darüber hinaus wurde mit dem Ziel einer potentiellen Verbesserung der MHC II-Zellbibliothek die Rolle von Ii und DM bei der Präsentation von L1 aufgeschlüsselt. Damit wurde die Frage geklärt, ob diese beiden Proteine, deren Rolle in der MHC II-Antigenpräsentation als zentral gilt, für MHC II-Restriktionsanalysen notwendig sind.

4.4.1 Herstellung von DRA-Zellklonen durch limitierte Verdünnung

Aus K562 DRA Zellen wurden über limitierte Verdünnung DRA-Zellklone herangezogen mit der Absicht, sie im Hinblick auf Antigenprozessierungsfähigkeit, -effizienz und -präsentationsvermögen für L1 vergleichend zu untersuchen. Aus acht 96-well Platten mit ~ 1 Zelle in jedem 3. well konnten 24 K562 DRA-Klone herangezogen werden, von denen sich 19 als monoklonal erwiesen. Die fünf Zellklone, welche den höchsten Anteil CFP-exprimierender Zellen aufwiesen und am schnellsten wuchsen, wurden für die weiteren Versuche ausgewählt.

Im Vergleich zu den polyklonalen K562 DRA Zellen wiesen die fünf ausgewählten DRA-Klone in der durchflusszytometrischen Analyse einen einzigen, schmalen CFP-Peak auf, der auf eine

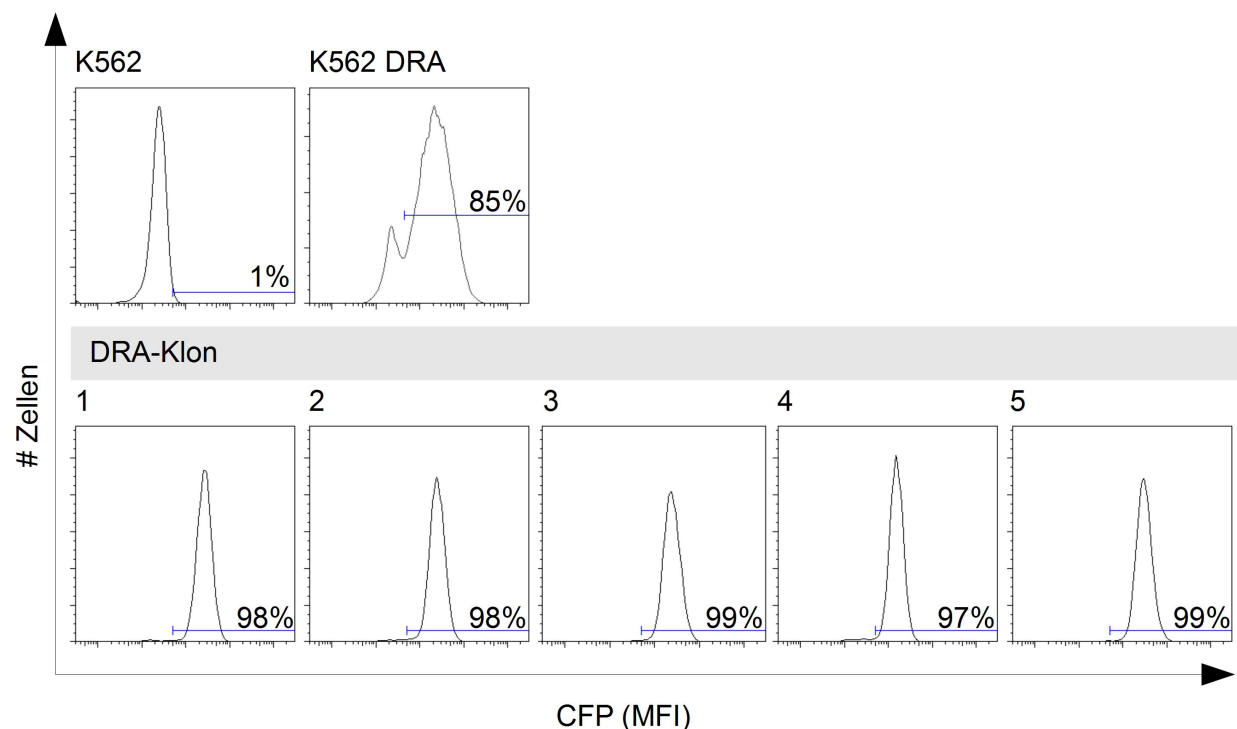


Abbildung 16: Etablierung von DRA-Klonen aus K562 DRA Zellen. Die Prozentzahlen geben den Anteil DRA-ires-CFP-exprimierender K562 Zellen wieder.

homogene Zellpopulation schließen ließ (Abbildung 16). Es wurde außerdem die CFP-MFI der fünf Zellklone bestimmt (Abbildung 17). Die Zellen des DRA-Klons 5 exprimierten am meisten CFP, und somit auch am meisten DRA.

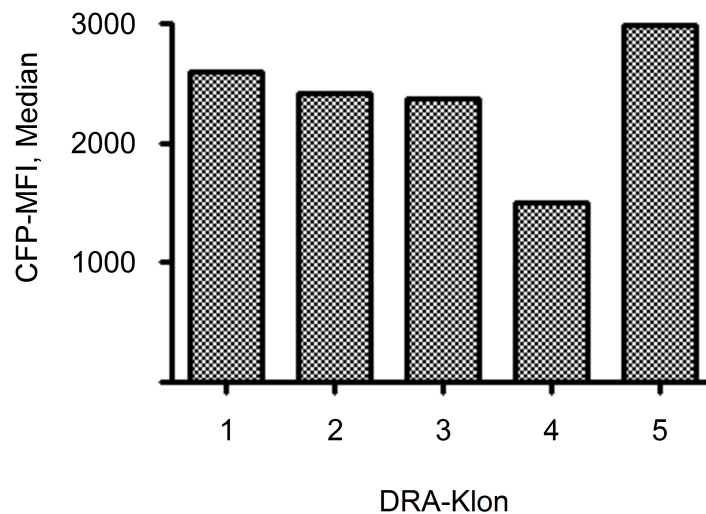


Abbildung 17: Vergleich der CFP-MFI der DRA-Klone.

4.4.2 Transduktion der DRA-Klone mit DRB1*07:01

Es wurden alle fünf DRA-Klone mit DRB1*07:01 transduziert und nach vier Tagen auf Expression von DR-Komplexen getestet. Die Transduktionsraten lagen zwischen 9% für DRA-Klon 4 und 19% für DRA-Klon 3 (Abbildung 18). DRA-Klon 4 wurde aufgrund der vergleichsweise niedrigen Transduktionsrate von den weiteren Versuchen ausgeschlossen.

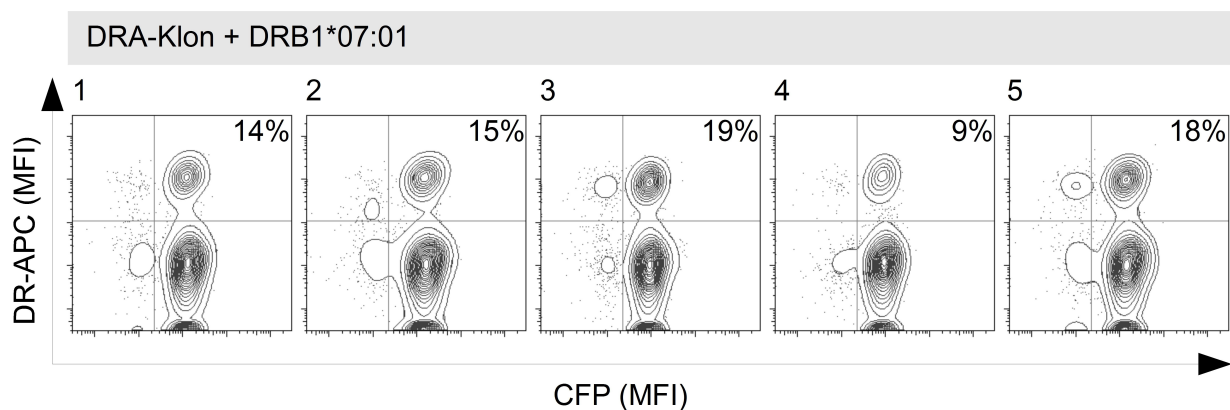


Abbildung 18: DR-Expression der DRA-Klone nach Transduktion mit DRB1*07:01. Färbung mit anti-DR-APC-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil gleichzeitig DRA-ires-CFP- und DR-APC-exprimierender K562 Zellen in dem Quadranten wieder.

4.4.3 DRA-Klone/DRB1*07:01 werden von TCR-td PBL erkannt

K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen und die DRA-Klone/DRB1*07:01 wurden nach exogener Beladung mit Peptid 16.01 mit TCR-td PBL ko-kultiviert, um die IFN- γ -Sekretion in den Ko-

Kultur-Überständen vergleichend zu bestimmen und damit den für die MHC II-Restriktionsanalyse geeignetsten DRA-Klon auswählen zu können.

Abbildung 19 zeigt, dass K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen die höchste IFN- γ -Sekretion auslösten. DRA-Klone 1, 2 und 3 zeigten keinen Unterschied. DRA-Klon 5 löste unter allen Klone die höchste IFN- γ -Sekretion aus.

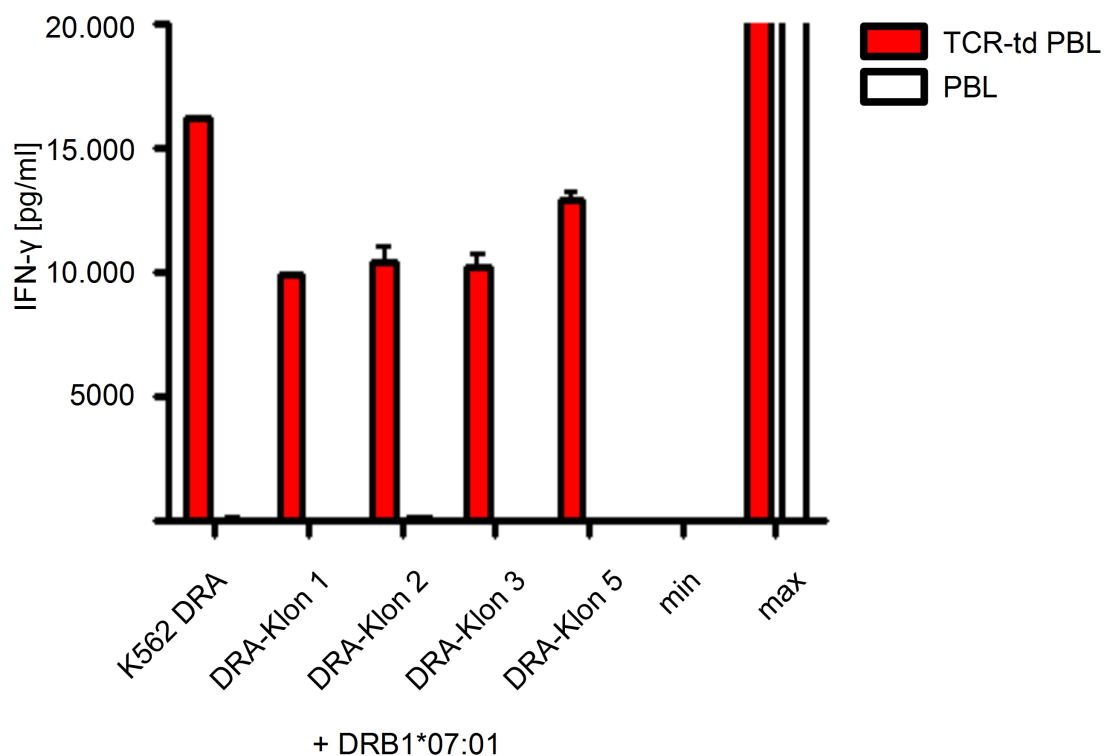


Abbildung 19: Vergleich der Antigenpräsentationseffizienz. ELISA des Ko-Kultur-Überstandes TCR-td PBL und untransduzierter PBL mit K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen und den DRA-Klonen/DRB1*07:01 nach exogener Beladung mit Peptid 16.01.

4.4.4 DRA-Klone sind in der Lage, Antigen effizient zu prozessieren und zu präsentieren

K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen und die DRA-Klone/DRB1*07:01 wurden nach Elektroporation der L1 ivtRNA mit aktivierten TCR-td PBL ko-kultiviert, um ihre Antigenprozessierungs- und folgende Antigenpräsentationseffizienz zu vergleichen. Am folgenden Tag wurde die IFN- γ -Sekretion der TCR-td PBL in den Ko-Kultur-Überständen analysiert. Abbildung 20 zeigt, dass die IFN- γ -Sekretion sich jeweils kaum unterschied. Die Ko-Kultur von TCR-td PBL mit DRA-Klon 3/DRB1*07:01 führte vergleichsweise zu der höchsten IFN- γ -Sekretion. K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen, DRA-Klon 3/DRB1*07:01 und DRA-Klon 5/DRB1*07:01 wurden für die weiteren Versuche ausgewählt.

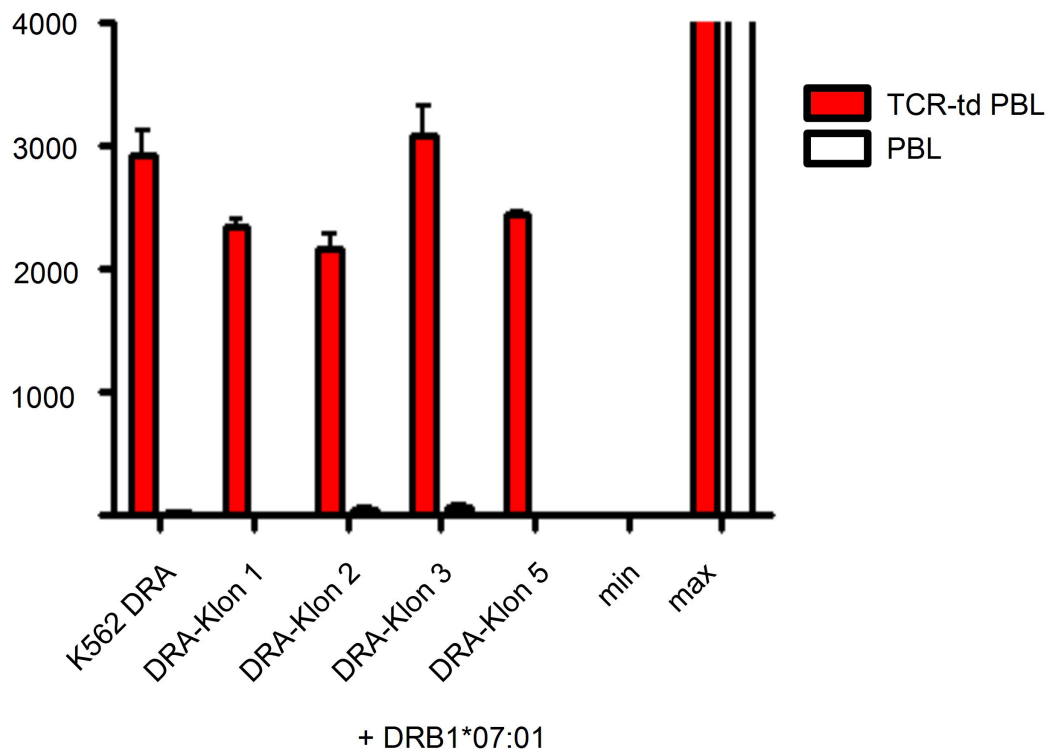


Abbildung 20: Vergleich der Antigenprozessierungseffizienz. ELISA des Ko-Kultur-Überstandes TCR-td PBL und untransduzierter PBL mit K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen und den DRA-Klonen/DRB1*07:01 nach Elektroporation von L1 ivtRNA.

4.5 Untersuchung der Rolle von Ii und DM in der MHC II-Restriktionsanalyse

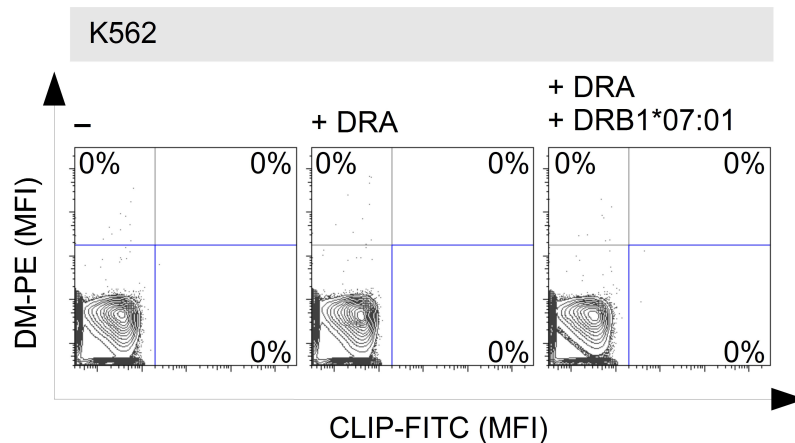


Abbildung 21: Analyse der DM- und Ii-Expression von K562 Zellen, K562 DRA Zellen und K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen. Färbung mit anti-DM-PE- und anti-CLIP-FITC-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil DM-PE- und CLIP-FITC-exprimierender K562 Zellen im jeweiligen Quadranten wieder.

K562 Zellen lassen sich weder gegen das Ii-Fragment CLIP noch gegen DM färben. Das ist auch bei K562 DRA Zellen und bei K562 Zellen, die sowohl DRA als auch ein DRB exprimieren, der Fall (Abbildung 21) (Butler et al., 2010).

Auf NCBI sind Referenzsequenzen von drei Transkriptionsvarianten der Ii veröffentlicht, die als Isoform a (891 Nukleotide), b (699 Nukleotide) und c (483 Nukleotide) bezeichnet werden (NCBI, 2017).

a entspricht Transkriptionsvariante CD74-201, b entspricht CD74-202 und c entspricht CD74-203 auf ensembl.org (Aken et al., 2016; Ensembl, 2017). Eine PCR aus 11 verschiedenen LCL-cDNA mit Ii-spezifischen Primern, die alle drei Isoformen amplifizieren können, ergab Gelbanden, die alle unterhalb der Höhe der 700 bp-Markerbande rangierten (Abbildung 22). Die Sequenz der gereinigten DNA-Bande entsprach Isoform b. Ii wurde daraufhin in den MP71 Vektor kloniert. DMA und DMB wurden mit spezifischen Primern aus LCL-cDNA amplifiziert, welche eine p2a-Linkersequenz enthielten. In einer Überlappungs-Extensions-PCR entstand eine DMB-p2a-DMA-Kassette, die in den MP71 Vektor kloniert wurde.

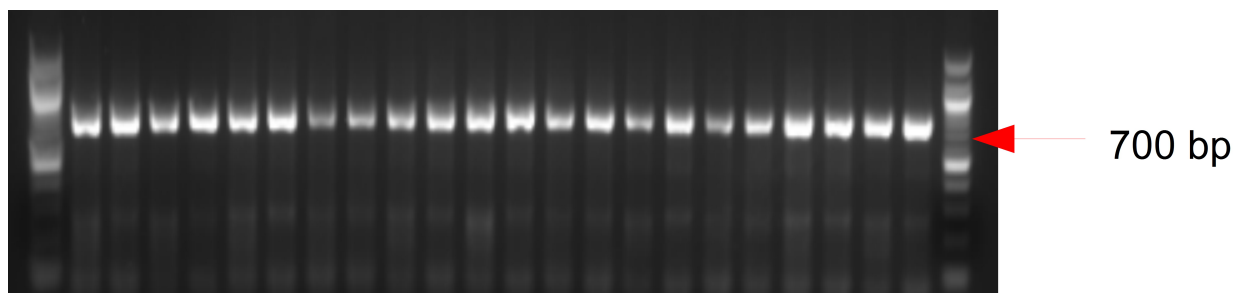


Abbildung 22: Gelbild der PCR-Produkte aus 11 verschiedenen LCL (bei je 2 verschiedenen Annealing-Temperaturen). Alle DNA-Banden liegen unterhalb der Höhe der 700 bp-Markerbande. Die Sequenz der gereinigten DNA entspricht Isoform b der Ii. Ganz links und rechts: DNA-Leitern zum Vergleich.

4.5.1 Transduktion von K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen, DRA-Klon 3/ DRB1*07:01 und DRA-Klon 5/DRB1*07:01 mit Ii, DM, Ii und DM

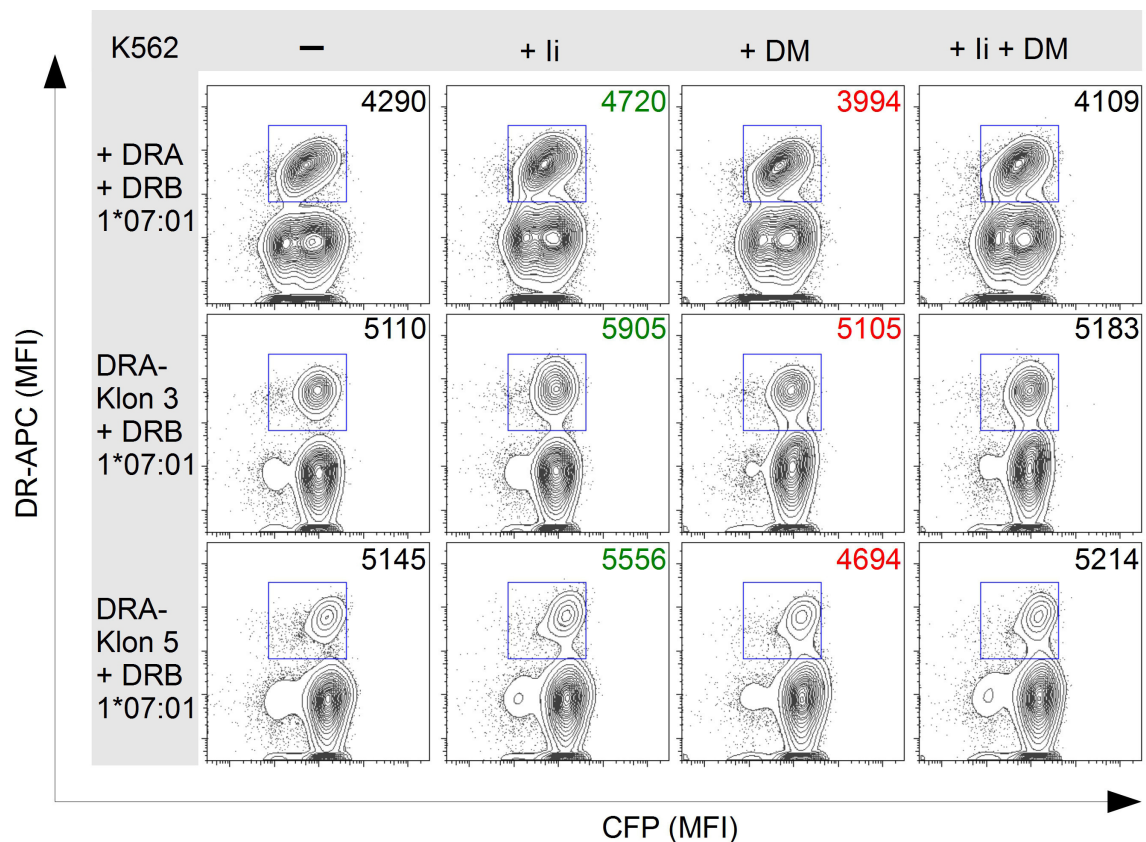


Abbildung 23: Transduktion von K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen, DRA-Klon 3/DRB1*07:01 und DRA-Klon 5/DRB1*07:01 mit Ii und DM einzeln und Ii und DM gleichzeitig. Färbung mit anti-DR-APC-mAb. Die Zahlen geben die CFP-MFI der markierten Zellpopulation wieder. Grün: MFI gestiegen; rot: MFI gesunken.

Über Transfektion der HEK-GALV Zellen wurde DMB-p2a-DMA- und Ii-haltiger Virusüberstand hergestellt. Es wurden daraufhin K562 DRA/DRB1*07*01 Zellen, DRA-Klon 3/DRB1*07*01 und DRA-Klon 5/DRB1*07*01 (i) mit Ii-haltigem Virus, (ii) mit DMB-p2a-DMA-haltigem Virus, oder (iii) mit gepooltem Ii- und DMB-p2a-DMA-haltigem Virus transduziert, wobei die jeweilige Menge an Virus, die für die Transduktion verwendet wurde, equilibriert wurde. Vier Tage nach Transduktion wurden die Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Abbildung 23 zeigt die Ergebnisse der Messung: Die Expression der DR-Komplexe stieg demzufolge leicht in Anwesenheit von Ii (2. Spalte, grüne Ziffern). Nach Transduktion von DM sank die DR-Expression in allen drei Populationen leicht (Vergleich 1. Spalte und 3. Spalte, rote Ziffern). War sowohl Ii als auch DM in den Zellen präsent, verringerte sich die DR-Expression bei den K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen und stieg leicht bei DRA-Klon 3/DRB1*07*01 und DRA-Klon 5/DRB1*07*01 (Vergleich 4. Spalte und 1. Spalte).

Die in Abbildung 23 markierten DR-APC-positiven Zellpopulationen wurden auf Expression von Ii und DM untersucht (Abbildung 24). Sowohl Ii als auch DM ließ sich nach Einzeltransduktion auf der Zelloberfläche nachweisen. Doppelt transduzierte K562 DRA/ DRB1*07:01 Zellen bzw. DRA-Klone/DRB1*07:01 exprimierten dabei auf der Zelloberfläche weniger CLIP als solche, die nur mit Ii transduziert wurden. Auch die DM-Oberflächenexpression war bei ihnen gegenüber der Einzeltransduktion mit DM verringert. In der letzten Spalte der Abbildung ist zu sehen, dass keine der transduzierten Populationen Ii und DM gleichzeitig exprimierten. Die CLIP-FITC-positiven Populationen waren jedoch gegenüber der 2. Spalte verringert.

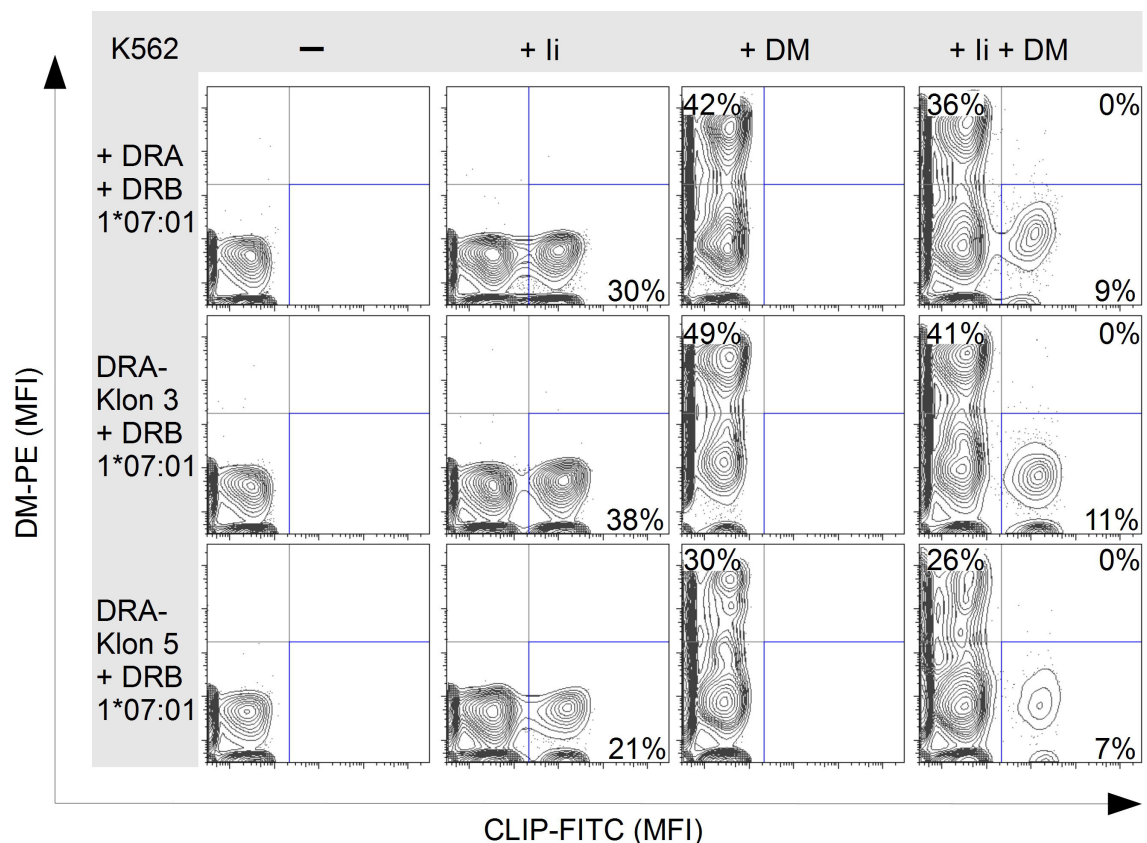


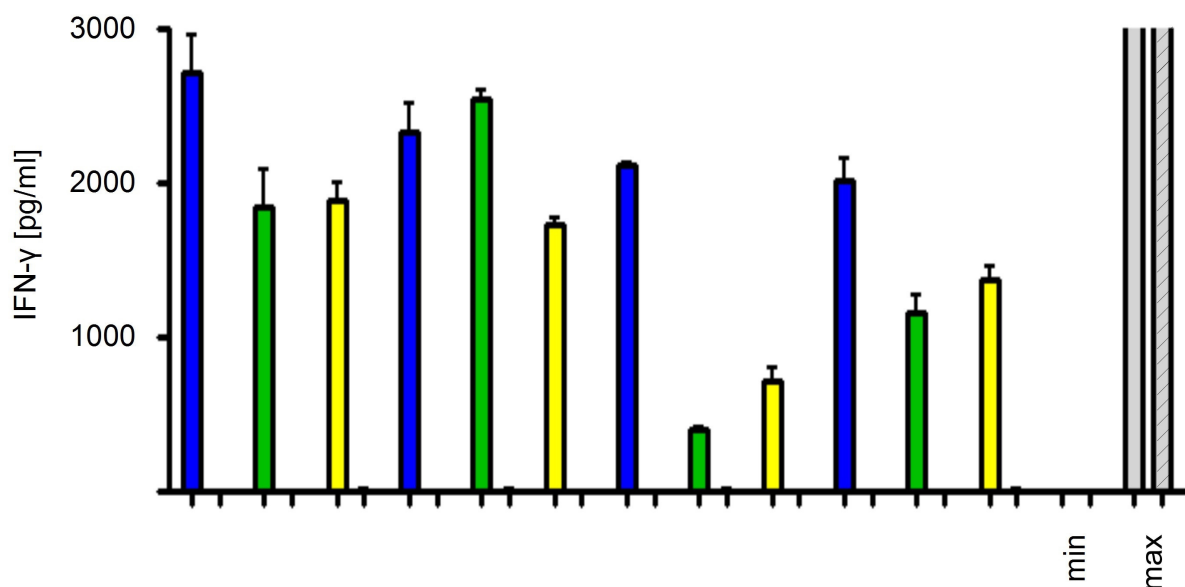
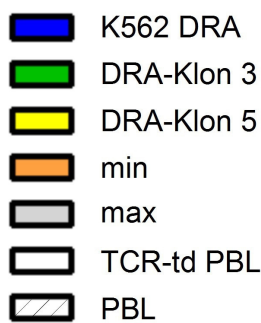
Abbildung 24: K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen, DRA-Klon 3/DRB1*07:01 und DRA-Klon 5/DRB1*07:01 nach Transduktion mit Ii und DM einzeln und Ii und DM gleichzeitig. Färbung mit anti-DM-PE- und anti-CLIP-FITC-mAb. Die Prozentzahlen geben den Anteil DM-PE- und CLIP-FITC-exprimierender K562 Zellen an den DR-APC-positiven K562 Zellen aus Abbildung 23 wieder.

4.5.2 Einfluss von Ii und DM auf die Antigenprozessierungseffizienz

K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen, DRA-Klon 3/DRB1*07:01, DRA-Klon 5/DRB1*07:01 transduziert mit Ii, DM, und Ii und DM zusammen, wurden mit L1 ivtRNA elektroporiert und mit TCR-td PBL ko-kultiviert. Am folgenden Tag wurde ein IFN- γ -ELISA mit dem Überstand der Kultur durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 zu sehen: K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen ohne Ii und DM lösten die höchste IFN- γ -Freisetzung in dem Versuch aus. Nach

Transduktion mit Ii sank die IFN- γ -Freisetzung durch K562 DRA/DRB 1*07:01 Zellen und DRA-Klon 5/DRB1*07:01, während DRA-Klon 3/ DRB1*07:01/Ii eine höhere IFN- γ -Freisetzung hervorrief als DRA-Klon 3/DRB1*07:01; diese überstieg allerdings nicht die durch K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen ausgelöste IFN- γ -Antwort.

Die Transduktion von DM bewirkte einen Abfall der IFN- γ -Konzentration in der Ko-Kultur mit allen drei Zellpopulationen sowohl gegenüber den Ii-transduzierten Zellen als auch den Ii- und DM-negativen Zellen, wobei insbesondere die IFN- γ -Freisetzung durch die Klone deutlich geringer war. Wurden Ii und DM in Kombination transduziert, stieg die durch DRA-Klon 3/DRB1*07:01 und DRA-Klon 5/DRB1*07:01 hervorgerufene IFN- γ -Freisetzung gegenüber



DRB1*07:01	+	+	+	+
Ii	-	+	-	+
DM	-	-	+	+

Abbildung 25: Vergleich der Antigenprozessierungseffizienz L1 ivtRNA elektroporierter K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen und DRA-Klon 3/DRB1*07:01 und 5/DRB1*07:01 nach Transduktion mit Ii und DM einzeln und in Kombination. ELISA des Ko-Kultur-Überstandes mit TCR-td PBL und untransduzierten PBL.

DRA-Klon 3/DRB1*07:01/DM und DRA-Klon 5/DRB1*07:01/DM wieder geringfügig, während K562 DRA/DRB1*07:01/Ii/DM Zellen eine ähnliche IFN- γ -Antwort auslösten wie K562 DRA/DRB1*07:01/DM.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde eine MHC II-Zellbibliothek hergestellt, deren K562 Zellen einzelne MHC exprimieren.

Zu diesem Zweck wurde das monoallelische DRA und 13 verschiedene, in der deutschen Bevölkerung häufig vertretene DRB-Allele erfolgreich kloniert. Eine Verpackungszelllinie wurde jeweils mit der präparierten pDNA transfiziert und virale Überstände gewonnen. K562 Zellen wurden erst mit dem viralen Überstand aus DRA und dann jeweils mit einzelnen DRB-Allelen transduziert. Die Expression von DR-Komplexen auf der Oberfläche der transduzierten K562 Zellen wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen.

Es konnte gezeigt werden, dass die generierten, einzelne MHC II exprimierenden K562 Zellen von TCR-td PBL erkannt werden. Die Erkennung war sowohl nach Beladung der K562 Zielzellen mit Peptid als auch nach Elektroporation der K562 Zielzellen mit der ivtRNA des Antigens erfolgreich.

Die Verwendung monoklonal DRA-exprimierender K562 Zellen/DRB für die Restriktionsanalyse führte nicht zu einer besseren Erkennung durch TCR-td PBL.

Darüber hinaus hat sich gezeigt, dass die Proteine Ii und DM, die in vivo eine zentrale Rolle bei der Antigenbeladung von MHC II-Molekülen spielen, im Rahmen der MHC II-Restriktionsanalyse in den K562 Zellen nicht benötigt werden.

5.1 K562 Zelllinie als Gerüst für die MHC II-Zellbibliothek

Die Zelllinie K562 bildet das Rückgrat dieser MHC II-Zellbibliothek. Der entscheidende Vorteil Zell-basierter MHC II-Bibliotheken gegenüber MHC-Tetrameren ist die Möglichkeit der endogenen Antigenprozessierung. Wie bereits in der Einleitung darauf hingewiesen, erlaubt dies die Restriktionsanalyse von TCR ohne genaue Kenntnis der von diesen spezifisch erkannten Peptidsequenz. Darüber hinaus sind die Peptide bei einer Zell-basierten MHC II-Bibliothek austauschbar, wohingegen die von Herstellern gelieferten Tetramere irreversibel an ein zuvor festgelegtes Peptid gebunden sind. Damit sind MHC II-Zellbibliotheken flexibler in der Handhabung als MHC-Tetramere.

Im Gegensatz zu LCL als APZ sind K562 Zellen dabei nicht nur in der Lage, endogen Antigen zu prozessieren, wie im Rahmen dieser Arbeit für das L1 Protein gezeigt. Sie sind darüber hinaus auch komplett MHC-negativ. Dadurch fällt das Ausschalten einzelner Allele über Bestrahlung oder Mutagenese weg, wie dies für LCL nötig ist, wenn die Expression einzelner MHC II-Allele

erreicht werden soll. Unter Anwendung solcher Verfahren kann es zu unvorhersagbaren Mutationsereignissen kommen. Stattdessen werden K562 Zellen einzeln mit den gewünschten MHC II-Genen transduziert.

Zum anderen ist von K562 Zellen keine Sekretion des T-Zell-inhibierenden IL-10 bekannt. Nachteilige Einflüsse dieses Zytokins auf den Ausgang einer Ko-Kultur sind somit unwahrscheinlich. Das leitet auch zum nächsten Vorteil der K562 Zellen über: Die IL-10-Sekretion durch viele LCL ist eine Folge davon, dass sie EBV-positiv sind. Da K562 Zellen jedoch EBV-negativ sind, kommt es nicht zu unerwünschter Reaktivität ko-kultivierter T-Zellen durch Präsentation von EBV-Antigenen, einem im Rahmen der Restriktionsanalyse unerwünschten Effekt, der im Falle der Nutzung von LCL nicht ausgeschlossen werden kann.

5.2 Klonierung der MHC II-Allele

Die DR-Allele wurden in verschiedene MP71 Vektoren kloniert. Die Verwendung des MP71 Vektors, der zu hoher und stabiler Transgenexpression führt, ist in der Arbeitsgruppe etabliert (Engels et al., 2003).

Die DRA-Sequenz wurde durch Klonierung in MP71-ires-CFP über ein ires-Element an CFP gekoppelt. Das bedeutet, dass DRA und CFP als zusammenhängende mRNA unter Kontrolle des LTRs transkribiert werden. Die Initiation der Translation des DRA ist von der 5'-Cap abhängig. Die Translation des CFP wird von ires mediiert. Dabei wird das Gen, das ires nachgeschaltet ist, stets in signifikant geringerem Maße translatiert – die CFP-Expression reflektiert daher nicht 1 : 1 das DRA-Expressionsniveau (Leisegang et al., 2008).

Die DRB-Allele wurden alle in MP71 kloniert, einige davon auch in MP71-ires-GFP. Für die Virusproduktion wurden nur die MP71-Plasmide verwendet, da Ii später über einen anti-CLIP-FITC-mAb angefärbt werden sollte (anti-CLIP-mAbs mit anderer Fluoreszenzkopplung sind kommerziell nicht erhältlich) und FITC- und GFP-Emission im FACS im selben Kanal detektiert werden.

5.3 Transduktion der MHC II-Allele

K562 Zellen wurden zunächst jeweils nur mit DRA und einzelnen DRB transduziert. Auf diese Weise sollte sichergestellt werden, dass die transduzierten Allele nicht mit gegebenenfalls doch endogen existierenden Allelen Dimere bilden. In einer Veröffentlichung von Papadimitriou et al. (2008) wird eine geringe intrazelluläre DR-Expression in den leichten endosomalen Kompartimenten von K562 Zellen gezeigt. Die Autoren sprechen von dort „arretierten“ DR-

Dimeren. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Butler et al. (2010) konnte dies hier nicht bestätigt werden, da es zu keiner Oberflächenexpression potentieller endogener DR α - oder DR β -Ketten mit den Translationsprodukten des transduzierten DRA oder der transduzierten DRB-Allele kommt, die auf der Zelloberfläche durch Anfärbung des vollständigen DR-Komplexes nachweisbar wäre.

5.4 Die MHC II-Zellbibliothek in der Übersicht

Da K562 DRA alle 13 transduzierten DRB-Allele jeweils im Komplex mit DRA auf der Zelloberfläche exprimierten, ist anzunehmen, dass dies mit allen anderen MHC II-Allelen ebenfalls funktioniert. Damit wurde erstmals eine Zell-basierte MHC II-Bibliothek hergestellt, deren Zellen nur einzelne MHC II-Allele auf der Zelloberfläche exprimieren, die humanen Ursprungs sind, und die nicht durch Mutation mit Chemikalien oder Bestrahlung hergestellt wurden.

5.5 Validierung der MHC II-Zellbibliothek

5.5.1 Auswahl der Zielzellen

Der MHC II-Haplotyp der PBL-Spenderin, aus deren CD4-T-Zellen der HPV 16 L1, Peptid 16.01 spezifische TCR isoliert wurde, war nur für den DRB1-Lokus bekannt. Daher wurde über IEDB und NetMHCII 2.2 die potentielle Affinität des Peptids 16.01 zu verschiedenen MHC II-Molekülen geprüft, um die Auswahl von K562 Zielzellen, die einzelne HLA-DR-Allele exprimieren, für die Restriktionsanalyse des TCR einzugrenzen.

5.5.2 Restriktionsanalyse

TCR-td PBL wurden mit K562 Zellen aus der erstellten MHC II-Zellbibliothek ko-kultiviert, die DRA in Kombination mit jeweils einem der vorhergesagten DRB-Allele exprimierten und mit Peptid 16.01 beladen wurden. TCR-td PBL zeigten eine klare Reaktion auf K562 DRA/DRB1*07:01. Daraus lässt sich schließen, dass der TCR auf DRA/DRB1*07:01 restringiert ist. In Reaktion auf die Präsentation des Peptids durch andere DRB konnte eine sehr geringe IFN- γ -Konzentrationen gemessen werden. Es gibt einige mögliche Ursachen dafür: Zum einen könnte es sich um Messhintergrund handeln. Es wurde mit einem IFN- γ -Standard von 4000,0 pg/ml gearbeitet, die transduzierten PBL zeigten aber in Reaktion auf DRA/DRB1*07:01 eine IFN- γ -Konzentration > 4000,0 pg/ml, sodass über die tatsächliche Höhe der IFN- γ -Konzentration keine genaue Aussage getroffen werden kann. Sie könnte weit über 4000,0 pg/ml

liegen. Wäre der Ko-Kultur-Überstand vor Durchführung des ELISAs soweit verdünnt worden, dass die IFN- γ -Konzentration für DRA/DRB1*07:01 im Bereich von 4000,0 pg/ml gelegen hätte, wären die Messhintergründe vermutlich unter dem Detektionslimit des ELISAs geblieben. Darüber hinaus könnten die transgene TR α - und TR β -Kette Heterodimere mit endogenen TCR-Ketten der PBL mit neuer MHC-Restriktion gebildet haben. Da der transgene TCR allerdings murinisiert und cysteinisiert ist, also bevorzugt von den T-Zellen exprimiert werden sollte, ist die Gefahr einer Fehlpaarung mit endogenen Ketten reduziert (Uckert et al., 2009). Zudem erscheint dieser Einwand unwahrscheinlich, weil das Peptid 16.01 spezifisch erkannt wurde und Heterodimere aus transgenen und endogenen TCR-Ketten auch eine neue Spezifität aufweisen sollten.

5.6 Untersuchung der Antigenprozessierung

Es ist bereits gezeigt worden, dass K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen vollständige Peptid-Antigene pinozytieren, prozessieren und präsentieren. Dieser Effekt konnte durch Transduktion von CD64, den Fc γ I-Rezeptor, noch verstärkt werden: Komplexe aus einem Antigen und IgG wurden von K562 Zellen vermehrt rezeptorvermittelt endozytiert (Butler et al., 2010).

In dieser Arbeit wurde erstmals experimentell belegt, dass selbst elektroporierte ivtRNA eines vollständigen L1 Antigens von K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen effizient translatiert, in den MHC II-Antigenpräsentationspfad geschleust, prozessiert und erfolgreich präsentiert wird. Dies hat gegenüber der Stimulation der Endozytose durch in Proteinform angebotenes Antigen den Vorteil, dass ivtRNA in jedem Labor selbstständig innerhalb einiger Stunden unter geringem Kosten- und Geräteaufwand hergestellt werden kann. Außerdem ist so die Transduktion der HLA II-positiven K562 Zellen mit CD64 nicht notwendig, um eine ausreichend hohe Antigenaufnahme für die Restriktionsanalyse zu erreichen.

Auf welche Weise aus der elektroporierten ivtRNA translatiertes Antigen in den MHC II-Antigenpräsentationspfad eingeschleust wird, bleibt Gegenstand der Forschung. Denkbar wäre, dass das Antigen mittels Autophagozytose in Vesikel geschlossen wird, die daraufhin mit den MIIC fusionieren (Crotzer et al., 2009). Solche Prozesse könnten insbesondere im Sinne einer Gleichgewichtsverlagerung hin zu MHC II-Präsentation eine Rolle spielen, da die K562 Zellen in diesem System keine HLA I-Moleküle exprimieren.

Einschränkend muss gesagt werden, dass es sich bei L1 um ein virales Kapsidprotein handelt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass es, wie unter pathophysiologischen Bedingungen bei HPV 16-Infektion einer Zelle, intrazelluläre Transportmechanismen zur Zelloberfläche nutzt, die

es in den MHC II-Antigenpräsentationspfad einbringen, über welchen das Virion die Zelle verlassen kann. Demnach kann momentan noch keine Aussage über die Effizienz der MHC II-Präsentation anderer Antigene aus elektroporierter ivtRNA durch K562 DRA/DRB Zellen getroffen werden.

5.7 Optimierung der MHC II-Zellbibliothek

5.7.1 Herstellung der DRA-Klone

Nach Etablierung eines stabilen Restriktionsanalyse-Systems aus TCR-td PBL und K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen war es möglich, potenzielle Optimierungen an der MHC II-Zellbibliothek vorzunehmen.

Zu diesem Zweck wurden zunächst aus der K562 DRA (Bulk-)Kultur DRA-Klone hergestellt. Sie wurden auf etwaige Unterschiede in der Antigenprozessierungs- und Präsentationseffizienz untersucht. Im Hinblick auf die Präsentation von exogen beladenem Epitop wiesen die DRA-Klone kaum Unterschiede auf; die K562 DRA Zellen präsentierten in diesem Versuch vergleichsweise am effizientesten, gefolgt von DRA-Klon 5 und DRA-Klon 2.

Nach Elektroporation von L1 ivtRNA löste die Antigenpräsentation durch DRA-Klon 3 die höchste IFN- γ -Sekretion aus, die nächst höchste lösten K562 DRA Zellen und DRA-Klon 5 aus. Alles in allem sind die klonalen Unterschiede jedoch gering.

Die Präsentation von exogen beladenem Peptid rief eine deutlich höhere IFN- γ -Sekretion hervor als die Präsentation von Epitopen, die über elektroporierte ivtRNA prozessiert wurden. Dafür kommt eine Reihe von Gründen in Frage. Denkbar ist, dass ein Teil des exogen angebotenen Antigens ohne Umweg über die Endozytose und anschließende MHC II-Beladung schon direkt auf der Zelloberfläche von den MHC II-Molekülen gebunden wird, sodass weniger Antigen intrazellulär abgebaut statt präsentiert wird.

Auf der anderen Seite wird die angebotene ivtRNA erst translatiert und dann prozessiert, ehe sie auf MHC II-Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche präsentiert wird. Dabei ist bei jedem dieser Teilschritte mit einem Materialverlust zu rechnen: Ein Teil der ivtRNA wird abgebaut statt translatiert, ein Teil des entstandenen Proteins wird nach der Prozessierung nicht in den Antigenpräsentationspfad geschleust, sondern abgebaut, und schließlich ist Peptid 16.01 nur eines von vielen Peptiden, die bei der Prozessierung entstehen und anschließend präsentiert werden.

Nicht zuletzt sind die Unterschiede auch auf den Versuchsaufbau zurückzuführen. Die im

Experiment eingesetzte Zellzahl orientiere sich am Anteil der Zellen, die die gewünschten transgenen Translationsprodukte auf der Zelloberfläche exprimierten. Damit ist nicht bekannt, wieviele transgene Translationsprodukte sich zum Messzeitpunkt intrazellulär befanden.

5.7.2 Untersuchung der Rolle von Ii und DM in der MHC II-Restriktionsanalyse

Da eine retrovirale Transduktionsrate im Allgemeinen nie 100% beträgt, schrumpft nach Einbringen jedes Transgens der Anteil der Zellen, der alle Transgene gleichzeitig exprimiert. Daher wurden die nahezu 100% DRA-positiven K562-Klone auch für die Transduktion mit DRB1*07:01, Ii und DM genutzt, um den Anteil untransduzierter oder unvollständig transduzierter Zellen gering zu halten.

Dabei zeigte sich, dass K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen nach Ii-Transduktion geringfügig mehr MHC II-Komplexe auf der Zelloberfläche exprimierten. Dies liegt nahe, da das Protein die Assemblierung der α - und β -Kette von MHC II-Molekülen, deren richtige Faltung und Beförderung in den MHC II-Präsentationspfad fördert (Fortin et al., 2013).

Demgegenüber sank die DR-Expression nach DM-Transduktion etwas. Denkbar ist, dass DM- und DR-Komplexe um den begrenzten Platz auf der Zelloberfläche konkurrieren. Dies ist nach Ii-Transduktion nicht der Fall, weil das Protein bis auf das CLIP-Fragment abgebaut wird, welches auf den DR-Komplexen gebunden ist.

CLIP und DM waren nach Einzel- und Doppeltransduktion auf der Zelloberfläche jeweils anfärbbar. CLIP stabilisiert auf diese Weise den Komplex aus DR α - und DR β -Kette (Fortin et al., 2013), DM erhält auf der Zelloberfläche die DR-Komplexe in einer Peptid-rezeptiven Konformation (Anders et al., 2011). Die CLIP-Expression war nach Doppeltransduktion deutlich geringer als nach Einzeltransduktion. Dies entspricht den Resultaten von Butler et al. (2010), die ebenfalls K562 DRA/DRB1*07:01 Zellen mit Ii und DM transduziert haben. Dies ist dadurch zu erklären, dass DM intrazellulär das CLIP-Fragment gegen andere Peptide austauscht. Auf diese Weise wird weniger CLIP mit den DR-Komplexen zusammen auf der Oberfläche exprimiert. Man kann davon ausgehen, dass die wenigen übrigen CLIP-FITC-positiven K562 Zellen aus der Doppeltransduktion ungenügend mit DM transduziert waren, und im Umkehrschluss bei effizienterer DM-Transduktion ebenfalls CLIP-FITC-negativ und dafür DM-PE-positiv geworden wären.

K562 DRA/DRB1*07:01/Ii Zellen, K562 DRA/DRB1*07:01/DM Zellen und K562 DRA/DRB1*07:01/Ii/DM Zellen wurden nach Elektroporation mit L1 ivtRNA mit TCR-td PBL ko-kultiviert, um Auswirkungen von Ii und DM auf die Antigenpräsentationsfähigkeit von K562

Zellen in einer Restriktionsanalyse einschätzen zu können. Aus den Ergebnissen dieser Ko-Kultur resultiert, dass die Transduktion von DM sich nachteilig auf die Antigenpräsentation auswirkt, während Ii nur in DRA-Klon 3 einen vernachlässigbaren Vorteil liefert.

In diesem Zusammenhang muss allerdings bedacht werden, dass der MP71 Vektor, in den Ii kloniert wurde, eine unphysiologisch hohe Ii-Expression vermittelt. Das könnte in diesem Übermaß eher zu einer Blockade der MHC II-Peptidbindungsstellen führen, statt nur das Beladen mit Peptidfragmenten aus dem endoplasmatischen Retikulum zu verhindern. Hinzu kommt, dass es weitere Transkriptionsvarianten von Ii gibt, deren Funktionalität im Rahmen dieser Arbeit nicht analysiert wurde.

Demzufolge sind K562 Zellen nach Transduktion mit MHC II-Allelen ohne zusätzliche Faktoren der MHC II-Antigenpräsentation sowohl exogen mit Peptid beladen als auch mit AntigenivtRNA elektroporiert voll funktionsfähige APZ, die valide Restriktionsanalysen von TCR ermöglichen.

5.8 K562-basierte MHC II-Zellbibliothek im Vergleich mit anderen Methoden der Restriktionsanalyse

5.8.1 MHC II-Tetramere

Da die hier vorgestellte MHC II Bibliothek Zell-basiert ist, umgeht sie zahlreiche Probleme, mit denen sich die Tetramer-Technologie konfrontiert sieht. Die Konformation der intrazellulär in K562 Zellen assemblierten MHC II-Moleküle dürfte derjenigen in professionell antigenpräsentierenden Zellen entsprechen. Die Frage nach ausreichender Löslichkeit und Stabilität der MHC II-Moleküle stellt sich bei einem Zell-basierten Verfahren ebenfalls nicht.

5.8.2 LCL-basierte MHC II-Zellbibliotheken

Da K562 Zellen für alle HLA-Allele negativ sind, sind sie nach Transduktion mit einzelnen MHC II α - und β -Ketten einfach HLA-positiv. In Restriktionsanalysen bleiben dadurch Artefakte in der IFN- γ -Messung aus, wie sie bei LCL entstehen können, weil die verwendeten Antigene durch mehrere HLA gleichzeitig präsentiert werden. Je nach Größe der Artefakte kann nicht ausgeschlossen werden, dass der getestete TCR auf mehrere HLA II-Moleküle kreuz-restringiert ist (Lang et al., 2002).

Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, hat es Versuche gegeben, die HLA-Gene von LCL durch Bestrahlung oder chemische Mutagenese auszuschalten. Da beides unspezifisch das gesamte LCL-Genom schädigen kann, ist unvorhersehbar, wie sich diese Vorbehandlung auf die

Antigenpräsentationseffizienz der LCL und damit auf die Validität von Restriktionsanalysen auswirkt. Davon abgesehen müssen aus den behandelten Zellen erneut Klone etabliert werden, um eine monoklonale, HLA-negative Zelllinie zu erhalten. Im Fall der K562 Zellen sind diese Arbeitsschritte und ihre Folgen nichtig.

K562 Zellen bieten noch weitere Vorteile gegenüber LCL. Neben ihrer EBV-Negativität produzieren sie, zumindest nach heutiger Kenntnis, kein IL-10. Deswegen müssen zum einen keine unerwünschten, EBV-spezifischen Reaktionen TCR-transduzierter PBL befürchtet werden, welche die Ergebnisse der Restriktionsanalyse im Sinne eines „Hintergrundrauschens“ beeinträchtigen und im schlimmsten Fall sogar zu falschen Schlüssen verleiten könnten. Auf der anderen Seite ist eine Hemmung der IFN- γ -Sekretion, und dadurch unklare Analyseergebnisse, ebenfalls nicht zu erwarten.

5.8.3 Vorteile einer K562-basierten MHC II-Zellbibliothek

Es braucht lediglich zwei Transgene, HLA-DRA und -DRB, um K562 Zellen zu voll funktionsfähigen APZ für eine Restriktionsanalyse zu machen. Wie sich im Rahmen dieser Arbeit gezeigt hat, ist es für eine erfolgreiche Restriktionsanalyse in diesem Zusammenhang irrelevant, wie hoch die HLA II-Expressionsraten ausfallen. Es ist ausreichend, bei der Ko-Kultivierung mit TCR-td PBL die Zahl funktioneller APZ, also erfolgreich transduzierter, in ein günstiges Verhältnis zu den funktionellen, also ebenfalls erfolgreich transduzierten Effektoren zu bringen. Eine Anreicherung der HLA II-positiven K562 vor der TCR-Testung ist daher nicht notwendig, wäre aber bei Bedarf beispielsweise mittels Magnet Associated Cell Sorting (MACS) möglich.

Nachdem die Zahl potenziell restringierender HLA II-Allele eingegrenzt wurde, können die HLA II-positiven K562 Zellen exogen mit dem spezifischen Peptid beladen oder mit der benötigten Antigen-ivtRNA elektroporiert und mit PBL ko-kultiviert werden, die zuvor mit dem zu testenden TCR transduziert worden sind. Die Ergebnisse der Restriktionsanalyse sind, wie hier gezeigt wurde, stabil reproduzierbar.

5.9 Mögliche Limitationen der MHC II-Zellbibliothek

Über die Zytokinsekretionsmuster der K562 Zellen ist bis jetzt nicht genügend bekannt, um völlig ausschließen zu können, dass die Zelllinie auf andere Weise als eine TCR-MHC-Peptid-Bindung mit PBL interagiert, die eine Restriktionsanalyse beeinflussen könnte.

Ebenso wenig kann in diesem Sinne eine Aussage über die Relevanz endogen exprimierter und MHC II-präsentierter tumorspezifischer oder -assoziierter Antigene getroffen werden. K562 Zellen tragen Leukämie-assoziierte Antigene auf der Zelloberfläche (Lozzio et al., 1979), außerdem exprimieren sie WT1, PRAME und Proteinase 3 (Greiner et al., 2004; Inoue et al., 1997; Yan et al., 2011).

Es wurde bereits angedeutet, dass L1 hinsichtlich des Transports in den MHC II-Antigenpräsentationspfad als virales Kapsidprotein eine Ausnahme darstellen könnte. Das ließe sich untersuchen, indem ein anderes Antigen ivtRNA-TCR-MHC II-Testungs-System verwendet würde, das nicht auf viralen Antigenen beruht.

5.10 Anwendungsgebiete

Restriktionsanalysen, wie die hier vorgestellte K562 MHC II-Zellbibliothek sie ermöglicht, eröffnen zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten. Dies beinhaltet zum einen die Analyse der Restriktion bereits isolierter Tumor- und Virusantigen-spezifischer TCR, zum anderen die Isolation neuer TCR, die gegen spezifische MHC II-Peptid-Kombinationen reaktiv sind. Anders herum können mit dieser Methode der Restriktionsanalyse eine Vielzahl von immunogenen MHC II-Peptid-Kombinationen flexibel analysiert werden. In diesem Zusammenhang könnten in Zukunft TCR präklinisch für eine Anwendung in der adoptiven T-Zell-Therapie evaluiert werden, um eine individuell MHC-adaptierte Therapie für jeden Tumorpatienten zu gestalten. Darüber hinaus ist die MHC II-Zellbibliothek auch für die Erforschung rheumatologischer- und anderer Autoimmunerkrankungen von Interesse, bei denen dysfunktionale CD4-T-Zell-Reaktionen eine Rolle spielen.

6 Abkürzungsverzeichnis

AIRE	Autoimmunregulator Protein
APC	Allophycocyanin
APZ	antigenpräsentierende Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation, immunphänotische Oberflächenmarker
CFP	cyan fluoreszierendes Protein
CMV	Cytomegalievirus
cTEP	kortikale Thymusepithelzelle
D	Domäne
DN	doppelt negativ
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphate
DP	doppelt positiv
DZ	dendritische Zelle
EBV	Epstein-Barr-Virus
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierender Faktor
HIV1	Humanes Immundefizienzvirus 1
HLA	humanes Leukozytenantigen
HPV	Humanes Papillomavirus
IEDB	immune epitope database
IFN- γ	Interferon- γ
Ii	invariante Kette, auch CD74 oder HLA Klasse II Histokompatibilitätsantigen γ -Kette genannt
IL	Interleukin
ivtRNA	in vitro transkribierte RNA
L1	spätes Kapsidprotein 1
LCL	Lymphoblastenzelllinie

mAb	monoklonale Antikörper
MFI	durchschnittliche Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
mRNA	Boten-RNA
mTEC	medulläre Thymusepithelzelle
P	Peptid
PBL	Lymphozyten des peripheren Blutes
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
RAG	Rekombination-aktivierendes Gen
SP	einfach positiv
TCR	T-Zell-Rezeptor
TCR-td	TCR-transduziert
T _H	T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
TRA	TCR α -Kettengen
TRB	TCR β -Kettengen
T _{reg}	regulatorische T-Zelle
TSSP	Thymus-spezifische Serinprotease

7 Literaturverzeichnis

- Aken, B. L., Ayling, S., Barrell, D., Clarke, L., Curwen, V., Fairley, S., Fernandez Banet, J., Billis, K., García Girón, C., Hourlier, T., Howe, K., Kähäri, A., Kokocinski, F., Martin, F. J., Murphy, D. N., Nag, R., Ruffier, M., Schuster, M., Tang, Y. A., Vogel, J.-H., White, S., Zadissa, A., Flicek, P., Searle, S. M. J. (2016). The Ensembl gene annotation system. *Database*, 2016, 1–19.
- Ali, A. S., Al-Shraim, M., Al-Hakami, A. M., & Jones, I. M. (2015). Epstein- Barr Virus: Clinical and Epidemiological Revisits and Genetic Basis of Oncogenesis. *The Open vVirology Journal*, 9, 7–28.
- Altman, J. D., Moss, P. A. H., Goulder, P. J. R., Barouch, D. H., McHeyzer-Williams, M. G., Bell, J. I., McMichael, A. J., & Davis, M. M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science (New York, N.Y.)*, 274(5284), 94–6.
- Anders, A.-K., Call, M. J., Schulze, M.-S. E. D., Fowler, K. D., Schubert, D. A., Seth, N. P., Sundberg, E. J., & Wucherpfennig, K. W. (2011). HLA-DM captures partially empty HLA-DR molecules for catalyzed removal of peptide. *Nature Immunology*, 12(1), 54–61.
- Andersen, R. S., Kvistborg, P., Frøsig, T. M., Pedersen, N. W., Lyngaa, R., Bakker, A. H., Shu, C. J., Straten, P. thor, Schumacher, T. N., & Hadrup, S. R. (2012). Parallel detection of antigen-specific T cell responses by combinatorial encoding of MHC multimers. *Nature Protocols*, 7(5), 891–902.
- Arndt, S. O., Vogt, A. B., Markovic-Plese, S., Martin, R., Moldenhauer, G., Wölpl, A., Sun, Y., Schadendorf, D., Hämmerling, G. J., & Kropshofer, H. (2000). Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *The EMBO Journal*, 19(6), 1241–51.
- Austin, P., Trowsdale, J., Rudd, C., Bodmer, W., Feldmann, M., & Lamb, J. (1985). Functional expression of HLA-DP genes transfected into mouse fibroblasts. *Nature*, 313, 61–64.
- Bendall, S. C., Simonds, E. F., Qiu, P., Amir, E. D., Krutzik, P. O., Finck, R., Bruggner, R. V., Melamed, R., Trejo, A., Ornatsky, O. I., Balderas, R. S., Plevritis, S. K., Sachs, K., Pe'er, D., Tanner, S. D., & Nolan, G. P. (2011). Single-cell mass cytometry of differential immune and drug responses across a human hematopoietic continuum. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6030), 687–96.
- Britten, C. M., Meyer, R. G., Kreer, T., Drexler, I., Wölfel, T., & Herr, W. (2002). The use of HLA-A*0201-transfected K562 as standard antigen-presenting cells for CD8+ T lymphocytes in IFN- γ ELISPOT assays. *Journal of Immunological Methods*, 259(1), 95–110.
- Buckner, J. H., Holzer, U., Novak, E. J., Reijonen, H., Kwok, W. W., & Nepom, G. T. (2002). Defining antigen-specific responses with human MHC class II tetramers. *J Allergy Clin Immunol*, 110(2), 199–208.

- Butler, M. O., Ansén, S., Tanaka, M., Imataki, O., Berezovskaya, A., Mooney, M. M., Metzler, G., Milstein, M. I., Nadler, L. M., & Hirano, N. (2010). A panel of human cell-based artificial APC enables the expansion of long-lived antigen-specific CD4⁺ T cells restricted by prevalent HLA-DR alleles. *International Immunology*, 22(11), 863–73.
- Casalegno-Garduño, R., Schmitt, A., Yao, J., Wang, X., Xu, X., Freund, M., & Schmitt, M. (2010). Multimer technologies for detection and adoptive transfer of antigen-specific T cells. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 59(2), 195–202.
- Chen, B. P., DeMars, R., & Sondel, P. M. (1987). Presentation of soluble antigen to human T cells by products of multiple HLA-linked loci: analysis of antigen presentation by a panel of cloned, autologous, HLA-mutant Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell lines. *Human Immunology*, 18(1), 75–91.
- Chen, M., Shirai, M., Liu, Z., Arichi, T., Takahashi, H., & Nishioka, M. (1998). Efficient class II major histocompatibility complex presentation of endogenously synthesized hepatitis C virus core protein by Epstein-Barr virus-transformed B-lymphoblastoid cell lines to CD4(+) T cells. *Journal of Virology*, 72(10), 8301–8.
- Crotzer, V. L., & Blum, J. S. (2009). Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 182(6), 3335–41.
- Day, C. L., Seth, N. P., Lucas, M., Appel, H., Gauthier, L., Lauer, G. M., Robbins, G. K., Szczepiorkowski, Z. M., Casson, D. R., Chung, R. T., Bell, S., Harcourt, G., Walker, B. D., Klenerman, P., & Wucherpfennig, K. W. (2003). Ex vivo analysis of human memory CD4 T cells specific for hepatitis C virus using MHC class II tetramers. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(6), 831–42.
- Doherty, D. G., Penzotti, J. E., Koelle, D. M., Kwok, W. W., Lybrand, T. P., Masewicz, S., & Nepom, G. T. (1998). Structural Basis of Specificity and Degeneracy of T Cell Recognition: Pluriallelic Restriction of T Cell Responses to a Peptide Antigen Involves Both Specific and Promiscuous Interactions Between the T Cell Receptor, Peptide, and HLA-DR. *The Journal of Immunology*, 161(7), 3527–3535.
- Engels, B., Cam, H., Schüler, T., Indraccolo, S., Gladow, M., Baum, C., Blankenstein, T., & Uckert, W. (2003). Retroviral vectors for high-level transgene expression in T lymphocytes. *Human Gene Therapy*, 14(12), 1155–68.
- Ensembl. (2017). Gene: CD74.
https://doi.org/http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000019582;r=5:150401670-150412929;t=ENST00000353334
- Falta, M. T., Fontenot, A. P., Rosloniec, E. F., Crawford, F., Roark, C. L., Bill, J., Marrack, P., Kappler, J., & Kotzin, B. L. (2005). Class II major histocompatibility complex-peptide tetramer staining in relation to functional avidity and T cell receptor diversity in the mouse

- CD4(+) T cell response to a rheumatoid arthritis-associated antigen. *Arthritis and Rheumatism*, 52(6), 1885–96.
- Fortin, J.-S., Cloutier, M., & Thibodeau, J. (2013). Exposing the Specific Roles of the Invariant Chain Isoforms in Shaping the MHC Class II Peptidome. *Frontiers in Immunology*, 4, 1–8.
- Gebe, J. A., Falk, B. A., Rock, K. A., Kochik, S. A., Heninger, A. K., Reijonen, H., Kwok, W. W., & Nepom, G. T. (2003). Low-avidity recognition by CD4+ T cells directed to self-antigens. *European Journal of Immunology*, 33(5), 1409–17.
- Geginat, J., Paroni, M., Facciotti, F., Gruarin, P., Kastirr, I., Caprioli, F., Pagani, M., & Abrignani, S. (2013). The CD4-centered universe of human T cell subsets. *Seminars in Immunology*, 25(4), 252–62.
- Gonzalez-Galarza, F. F., Christmas, S., Middleton, D., & Jones, A. R. (2011). Allele frequency net: a database and online repository for immune gene frequencies in worldwide populations. *Nucleic Acids Research*, 39(Database issue), D913-9.
- Greiner, J., Ringhoffer, M., Taniguchi, M., Li, L., Schmitt, A., Shiku, H., Döhner, H., & Schmitt, M. (2004). mRNA expression of leukemia-associated antigens in patients with acute myeloid leukemia for the development of specific immunotherapies. *International Journal of Cancer: Journal International Du Cancer*, 108(5), 704–11.
- Holland, C. J., Cole, D. K., & Godkin, A. (2013). Re-Directing CD4(+) T Cell Responses with the Flanking Residues of MHC Class II-Bound Peptides: The Core is Not Enough. *Frontiers in Immunology*, 4, 1–9.
- Honma, M. (2005). Generation of loss of heterozygosity and its dependency on p53 status in human lymphoblastoid cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 45(2–3), 162–76.
- Horton, R., Wilming, L., Rand, V., Lovering, R. C., Bruford, E. A., Khodiyar, V. K., Lush, M. J., Povey, S., Talbot, C. C., Wright, M. W., Wain, H. M., Trowsdale, J., Ziegler, A., & Beck, S. (2004). Gene map of the extended human MHC. *Nature Reviews Genetics*, 5(12), 889–99.
- Hurley, C. K., & Johnson, A. H. (2001). HLA Type of EBV-Transformed Human B Cell Lines. *Current Protocols in Immunology*, 30(1G:A.1G.1–A.1G.6.), 1–6.
- Inoue, K., Ogawa, H., Sonoda, Y., Kimura, T., Sakabe, H., Oka, Y., Miyake, S., Tamaki, H., Oji, Y., Yamagami, T., Tatekawa, T., Soma, T., Kishimoto, T., & Sugiyama, H. (1997). Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. *Blood*, 89(4), 1405–12.
- Jaiswal, J. K., Mattoussi, H., Mauro, J. M., & Simon, S. M. (2003). Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nature Biotechnology*, 21(1), 47–51.
- James, E. A., Moustakas, A. K., Bui, J., Nouv, R., Papadopoulos, G. K., & Kwok, W. W. (2009). The binding of antigenic peptides to HLA-DR is influenced by interactions between pocket 6 and pocket 9. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(5), 3249–58.

- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001a). Antigen recognition by T cells. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.). New York: Garland Science.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001b). Principles of innate and adaptive immunity. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.). New York: Garland Science.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001c). The generation of T-cell receptor ligands. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.). Garland Science.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001d). The major histocompatibility complex and its functions. In *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. (5th ed.). Garland Science.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2009). 8.6 Dendritische Zellen prozessieren Antigene aus einem breiten Spektrum von Krankheitserregern. In *Janeway Immunologie* (7., p. 422). Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Kavathas, P., Bacht, F. H., & Demars, R. (1980). Gamma ray-induced loss of expression of HLA and glyoxalase I alleles in lymphoblastoid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77(7), 4251–4255.
- Kieback, E. (2008). *A new safeguard eliminates T cell receptor gene-modified auto-reactive T cells after adoptive therapy*. Humboldt-Universität zu Berlin.
- Kim, H.-J., & Cantor, H. (2014). CD4 T-cell Subsets and Tumor Immunity: The Helpful and the Not-so-Helpful. *Cancer Immunology Research*, 2(2), 91–98.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P. M., & Hogquist, K. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nature Reviews Immunology*, 14(6), 377–91.
- Klenerman, P., Cerundolo, V., & Dunbar, P. R. (2002). Tracking T cells with tetramers: new tales from new tools. *Nature Reviews Immunology*, 2(4), 263–72.
- Kotzin, B. L., Falta, M. T., Crawford, F., Rosloniec, E. F., Bill, J., Marrack, P., & Kappler, J. (2000). Use of soluble peptide-DR4 tetramers to detect synovial T cells specific for cartilage antigens in patients with rheumatoid arthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(1), 291–296.
- Kozono, H., White, J., Clement, J., Marrack, P., & Kappler, J. (1994). Production of soluble MHC class II proteins with covalently bound single peptides. *Nature*, 369(6476), 151–4.
- Lämmermann, T., & Sixt, M. (2008). The microanatomy of T-cell responses. *Immunological Reviews*, 221, 26–43.

- Lang, H. L. E., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., Stuart, D. I., Bell, J. I., Jones, E. Y., & Fugger, L. (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nature Immunology*, 3(10), 940–943.
- Leisegang, M., Engels, B., Meyerhuber, P., Kieback, E., Sommermeyer, D., Xue, S.-A., Reuss, S., Stauss, H., & Uckert, W. (2008). Enhanced functionality of T cell receptor-redirectioned T cells is defined by the transgene cassette. *Journal of Molecular Medicine*, 86(5), 573–83.
- Li, Y., Yin, Y., & Mariuzza, R. A. (2013). Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation. *Frontiers in Immunology*, 4(July), 1–11.
- Lozzio, B. B., & Lozzio, C. B. (1979). Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line. *Leukemia Research*, 3(6), 363–370.
- Mallet-Designe, V. I., Stratmann, T., Homann, D., Carbone, F., Oldstone, M. B. A., & Teyton, L. (2003). Detection of Low-Avidity CD4+ T Cells Using Recombinant Artificial APC: Following the Antiovalbumin Immune Response. *The Journal of Immunology*, 170(1), 123–131.
- Marsh, S. G. E., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Fernández-Viña, M., Geraghty, D. E., Holdsworth, R., Hurley, C. K., Lau, M., Lee, K. W., Mach, B., Maiers, M., Mayr, W. R., Müller, C. R., Parham, P., Petersdorf, E. W., Sasazuki, T., Strominger, J. L., Svejgaard, A., Terasaki, P. I., Tiercy, J.-M., Trowsdale, J. (2010). Nomenclature for factors of the HLA system, 2010. *Tissue Antigens*, 75(4), 291–455.
- Marshall, N. B., & Swain, S. L. (2011). Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *Journal of bBomedicine & Biotechnology*, 2011, 1–8.
- Mellins, E. D., & Stern, L. J. (2014). HLA-DM and HLA-DO, key regulators of MHC-II processing and presentation. *Current Opinion in Immunology*, 26, 115–122.
- NCBI. (2017). CD74 molecule [Homo sapiens (human)]. <https://doi.org/https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/972> [16.10.2017]
- Neefjes, J., Jongsma, M. L. M., Paul, P., & Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 823–36.
- Nielsen, M., & Lund, O. (2009). NN-align. An artificial neural network-based alignment algorithm for MHC class II peptide binding prediction. *BMC Bioinformatics*, 10, 296.
- Nielsen, M., Lundegaard, C., & Lund, O. (2007). Prediction of MHC class II binding affinity using SMM-align, a novel stabilization matrix alignment method. *BMC Bioinformatics*, 8(1), 238.
- Nolan, G. P. (n.d.). Long terminal repeats: The retroviral promotor.

https://doi.org/http://web.stanford.edu/group/nolan/_OldWebsite/tutorials/retcl_3_ltrs.html
[19.09.2015]

- Ostrand-Rosenberg, S. (2005). CD4+ T lymphocytes: a critical component of antitumor immunity. *Cancer Investigation*, 23(5), 413–9.
- Owen, J. J. T., & Raff, M. C. (1970). Studies on the Differentiation of Thymus-derived Lymphocytes. *From the Department of Human Anatomy, University of Oxford, Oxford, England, and the National Institute for Medical Research, Mill Hill, London N. W. 7 England*, 1216–1232.
- Papadimitriou, L., Morianos, I., Michailidou, V., Dionyssopoulou, E., Vassiliadis, S., & Athanassakis, I. (2008). Characterization of intracellular HLA-DR, DM and DO profile in K562 and HL-60 leukemic cells. *Molecular Immunology*, 45(15), 3965–3973.
- Pious, D., Soderland, C., & Gladstone, P. (1977). Induction of HLA Mutations by Chemical Mutagens in Human Lymphoid Cells. *Immunogenetics*, 4, 437–448.
- Quezada, S. A., Simpson, T. R., Peggs, K. S., Merghoub, T., Vider, J., Fan, X., Blasberg, R., Yagita, H., Muranski, P., Antony, P. A., Restifo, N. P., & Allison, J. P. (2010). Tumor-reactive CD4(+) T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(3), 637–50.
- Ramachandiran, V., Grigoriev, V., Lan, L., Ravkov, E., Mertens, S. A., & Altman, J. D. (2007). A robust method for production of MHC tetramers with small molecule fluorophores. *Journal of Immunological Methods*, 319(1–2), 13–20.
- Restifo, N. P., Dudley, M. E., & Rosenberg, S. A. (2012). Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nature Reviews. Immunology*, 12(4), 269–81.
- Robinson, J., Halliwell, J. A. ., Hayhurst, J. D., Flicek, P., Parham, P., & Marsh, S. G. E. (2015). The IPD and IMGT / HLA database : allele variant databases. *Nucleic Acids Research*, 43, 423–431.
- Robinson, J., Malik, A., Parham, P., Bodmer, J. G., & Marsh, S. G. E. (2000). IMGT / HLA Database – a sequence database for the human major histocompatibility complex. *Tissue Antigens*, 55, 280–287.
- Rodenko, B., Toebes, M., Hadrup, S. R., Esch, W. J. E. Van, Molenaar, A. M., Schumacher, T. N. M., & Ovaas, H. (2006). Generation of peptide – MHC class I complexes through UV-mediated ligand exchange. *Nature Protocols*, 1(3), 1120–1132.
- Schneck, J. P. (2000). Monitoring antigen-specific T cells using MHC-Ig dimers. *Immunological Investigations*, 29(2), 163–9.
- Sloan, V. S., Cameron, P., Porter, G., Gammon, M., Amaya, M., Mellins, E., & Zaller, D. M.

- (1995). Mediation by HLA-DM of dissociation of peptides from HLA-DR. *Nature*, 375(29 June), 802–806.
- Starr, T. K., Jameson, S. C., & Hogquist, K. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annual Review of Immunology*, 21, 139–76.
- Stumptner-Cuvelette, P., & Benaroch, P. (2002). Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1542(1–3), 1–13.
- Swain, S. L., Agrewala, J. N., Brown, D. M., Jelley-Gibbs, D. M., Golech, S., Huston, G., Jones, S. C., Kamperschroer, C., Lee, W.-H., McKinstry, K. K., Román, E., Strutt, T., & Weng, N. (2006). CD4 + T-cell memory : generation and multi-faceted roles for CD4 + T cells in protective immunity to influenza. *Immunological Reviews*, 211, 8–22.
- Uckert, W., & Schumacher, T. N. M. (2009). TCR transgenes and transgene cassettes for TCR gene therapy: status in 2008. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 58(5), 809–22.
- Vita, R., Overton, J. A., Greenbaum, J. A., Ponomarenko, J., Clark, J. D., Cantrell, J. R., Wheeler, D. K., Gabbard, J. L., Hix, D., Sette, A., & Peters, B. (2015). The immune epitope database (IEDB) 3.0. *Nucleic Acids Research*, 43(Database issue), D405-12.
- Vollers, S. S., & Stern, L. J. (2008). Class II major histocompatibility complex tetramer staining: progress, problems, and prospects. *Immunology*, 123(3), 305–13.
- Wang, P., Sidney, J., Dow, C., Mothé, B., Sette, A., & Peters, B. (2008). A systematic assessment of MHC class II peptide binding predictions and evaluation of a consensus approach. *PLoS Computational Biology*, 4(4), 1–10.
- Wang, P., Sidney, J., Kim, Y., Sette, A., Lund, O., Nielsen, M., & Peters, B. (2010). Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics*, 11(568), 1–12.
- Westermann, J. (2010). Organe des Abwehrsystems. In *Anatomie* (pp. 355–375). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Wroblewski, J. M., Copple, A., Batson, L. P., Landers, C. D., & Yannelli, J. R. (2002). Cell surface phenotyping and cytokine production of Epstein-Barr Virus (EBV)-transformed lymphoblastoid cell lines (LCLs). *Journal of Immunological Methods*, 264, 19–28.
- Yan, M., Himoudi, N., Basu, B. P., Wallace, R., Poon, E., Adams, S., Hasan, F., Xue, S.-A., Wilson, N., Dalglish, A., Williams, O., & Anderson, J. (2011). Increased PRAME antigen-specific killing of malignant cell lines by low avidity CTL clones, following treatment with 5-Aza-2'-Deoxycytidine. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60(9), 1243–55.
- Zhang, N., & Bevan, M. J. (2012). CD8+ T Cells: Foot Soldiers of the Immune System. *Immunity*, 35(2), 161–168.

Zinkernagel, R. M., & Doherty, P. C. (1974). Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature*, 248(5450), 701–702.

Eidesstattliche Versicherung

Ich, Maria Lietz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „MHC II-Bibliothek zur Restriktionsanalyse von T-Zell-Rezeptoren“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Maria Lietz hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen: Lorenz, Felix K. M., Ellinger, Christian, Kieback, Elisa, Wilde, Susanne, Lietz, Maria, Schendel, Dolores J., & Uckert, Wolfgang (2017). Unbiased identification of T cell receptors targeting immunodominant peptide-MHC complexes for T cell receptor immunotherapy. *Human Gene Therapy*, 1–37, DOI: 10.1089/hum.2017.122

Beitrag im Einzelnen (bitte kurz ausführen): Es wurden die Zervixkarzinomzelllinien CaSki und SiHa kultiviert (siehe Seite 15 des Artikels). Die auf Seite 16 erwähnte, weiterhin in Entwicklung befindliche MHC II-Bibliothek zur Identifikation neuer MHC II-Epitope als Zielstrukturen für CD4-T-Zell-basierte Immuntherapien wird in der vorliegenden Dissertation dargestellt.

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationen

Lorenz, Felix K. M., Ellinger, Christian, Kieback, Elisa, Wilde, Susanne, Lietz, Maria, Schendel, Dolores J., & Uckert, Wolfgang (2017). Unbiased identification of T cell receptors targeting immunodominant peptide-MHC complexes for T cell receptor immunotherapy. *Human Gene Therapy*, 1–37.

Danksagung

Als erstes möchte ich Wolfgang danken: Das Thema ist ein Traum für jemanden, der schon immer „was mit Immunologie“ machen wollte – danke, dass du es mir überlassen hast, die ich zu Beginn gerade vier Hochschulsesemester Medizin hinter mir hatte, und im Grunde nichts als meinen Enthusiasmus für T-Zellen mitgebracht habe. Deine Korrekturen habe ich sehr geschätzt, weil sie amüsant, bissig und prägnant waren.

Felix und Mareen haben mir in theoretisch-naturwissenschaftlicher wie praktischer Hinsicht alle Methoden beigebracht, die zur Anwendung kamen. Bei Problemen und Rückfragen waren die beiden ausnahmslos immer erreichbar für mich. Ihr seid Gold wert.

Danke auch an Carolin und Kordelia, die mich immer wieder an ihrer Weisheit teilhaben ließen.

Dem Stipendium der Deutschen Forschungsgemeinschaft verdanke ich, dass ich mich ein ganzes Jahr lang voll und ganz dieser Arbeit widmen durfte.

Nicht zuletzt: Lieber Florian, liebe Mama, lieber Papa, liebe Oma, danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt.