

Aus dem Institut für Klinische Neuroimmunologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktion: Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld,
Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Untersuchungen zur Antigenerkennung von T-Zellen bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Geraldine Rühl

aus Frankfurt am Main

2016

**Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Betreuer: PD Dr. Klaus Dornmair

Zweitgutachter: Prof. Dr. Elfriede Nößner

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 25.10.2016

Teile dieser Arbeit sind oder werden veröffentlicht

Rühl, G.,* Niedl, A. G.,* Patronov, A., Siewert, K., Pinkert, S., Kalemanov, M., Friese, M. A., Attfield, K. E., Antes, I., Hohlfeld, R. und Dornmair, K. (2016). Multiple sclerosis: Molecular mimicry of an anti-myelin HLA class-I restricted T cell receptor. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 3, e241.

Arakawa, A., Siewert, K., Stöhr, J., Besgen, P., Kim, S.-M., **Rühl, G.**, Nickel, J., Vollmer, S., Thomas, P., Krebs, S., Prinkert, S., Spannagl, M., Held, K., Kammerbauer, C., Besch, R., Dornmair, K. und Prinz, J. C. (2015). Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J. Exp. Med.* 212, 2203-2212.

Held, K., Bhonsle-Deeng, L., Siewert, K., Sato, W., Beltran, E., Schmidt, S., **Rühl, G.**, Ng, J.K.M., Engerer, P., Moser, M., Klinkert, W. E., Babbe, H., Misgeld, T., Wekerle, H., Laplaud, D. A., Hohlfeld, R. und Dornmair, K. (2015). $\alpha\beta$ T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 2, e107.

Rühl, G.,* Schönwetter, M.,* Beltran, E., Held, K. und Dornmair, K. Counting individual plasmids in single cells by *Next Generation Sequencing*, Manuskript in Vorbereitung.

* Diese Autoren trugen gleichermaßen zur Arbeit bei.

Zusammenfassung

CD8⁺-T-Zellen spielen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Infektions-, Tumor- und Autoimmunerkrankungen. Die allermeisten Zielstrukturen der T-Zell-Rezeptoren dieser CD8⁺-T-Zellen sind gegenwärtig nicht bekannt, sodass deren Identifizierung von großer Bedeutung für die Aufklärung der Pathomechanismen und der Ätiologien vieler Krankheiten wäre. Eine kürzlich in unserer Arbeitsgruppe entwickelte Technologie, die auf Plasmid-kodierten kombinatorischen Peptidbibliotheken basiert, könnte sich zukünftig als vielversprechend für die Identifizierung von CD8⁺-T-Zell Zielstrukturen erweisen. Bislang wurde diese Technologie nur an einem Modellsystem mit einem T-Zell-Rezeptor mit bereits bekannter Spezifität verifiziert.

In der vorliegenden Arbeit konnte diese Technologie erstmals an zwei unterschiedlichen T-Zell-Rezeptoren validiert werden. Erstens wurde ein autoreaktiver, humaner T-Zell-Rezeptor analysiert, dessen Pathogenität in einem Tiermodell der Multiplen Sklerose bereits beschrieben war. Eine vorangegangene Studie beschrieb mittels dieser Technologie vier potentielle Kandidatenantigene dieses Rezeptors. Diese wurden hier mit biochemischen Analysen untersucht und es konnte gezeigt werden, dass nur eines dieser Peptide biologisch relevant ist. Zweitens wurden mit dieser Technologie drei antigene Peptide eines autoreaktiven, vermutlich pathogenen T-Zell-Rezeptors identifiziert, der aus einer Hautläsion eines Patienten mit Psoriasis vulgaris kloniert worden war. Dies trug zur Charakterisierung eines Kandidatenantigens des vermutlich pathogenen T-Zell-Rezeptors bei und führte somit zu einer neuen Hypothese zum Pathomechanismus der Psoriasis vulgaris.

Um die Technologie weiter zu verbessern, wurden parallel dazu Transfektionsbedingungen etabliert, die es erlauben, eine definierte Anzahl an kombinatorischen Peptidkodierenden Plasmiden in antigenpräsentierenden Zellen zu generieren. Die durchschnittliche Anzahl der Plasmide pro Zelle wurde erst mittels quantitativer PCR bestimmt. Eine detaillierte Charakterisierung des Plasmid-Repertoires, das für unterschiedliche Peptide kodiert, erfolgte dann erstmals in einzelnen Zellen. Dazu wurde eine vor Kurzem entwickelte Methode verwendet, die *unique identifier* Sequenzen und *Next Generation Sequencing* einsetzt, um einzelne Plasmide in einzelnen Zellen zu zählen. Die so bestimmte Anzahl und die Verteilung verschiedener Plasmide pro Einzelzelle kann verwendet werden, um zukünftig die Identifizierung der Zielstrukturen von CD8⁺-T-Zellen innerhalb kürzerer Zeit zu ermöglichen.

Summary

CD8⁺ T cells play a key role in the pathogenesis of infectious, tumor and autoimmune diseases. At present, most of the target structures of T cell receptors are unknown. Therefore, their identification would be of great importance for the elucidation of pathomechanisms and etiologies of many diseases. A novel technology that is based on plasmid-encoded combinatorial peptide libraries was recently developed in our group and seems promising for prospective identifications of target structures of CD8⁺ T cells. So far, this technology was only verified in a model system with a T cell receptor of known specificity.

In the present thesis this technology was validated for the first time with two different T cell receptors. First, an autoreactive, human T cell receptor was analyzed whose pathogenicity is described in an animal model of multiple sclerosis. In a previous study four potential candidate antigens were identified with this technology. Here, these potential antigens were tested with different types of biochemical analyses. Thereby, only one of these peptides turned out to be biologically relevant. Second, using this technology three antigenic peptides of an autoreactive, presumably pathogenic T cell receptor were identified. This T cell receptor was cloned from a skin lesion of a patient with psoriasis vulgaris. They led to the discovery of a new candidate antigen and a new hypothesis for the pathomechanism of psoriasis vulgaris.

To improve the antigen-search technology, transfection conditions were established that generate antigen presenting cells with a defined amount of combinatorial peptide-encoded plasmids. The average amount of plasmids was determined by quantitative PCR. A detailed characterization of the plasmid repertoire that encodes for different peptides was performed for the first time in single antigen presenting cells. To this end, a recently developed method using *unique identifier* sequences and *Next Generation Sequencing* was employed to count individual plasmids in single cells. In the future, knowledge about the amount and distribution of individual plasmids per single cell could allow the identification of target structures of CD8⁺ T cells within a shorter period of time.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	CD8 ⁺ -T-Zellen	2
1.2.1	Generierung und Selektion des T-Zell-Repertoires	3
1.2.2	Struktur von T-Zell-Rezeptoren	4
1.3	Antigenerkennung von CD8 ⁺ -T-Zellen	5
1.3.1	Präsentation von Antigenen auf HLA-Klasse-I-Molekülen	7
1.3.2	Besonderheiten der Peptid:HLA-TZR-Wechselwirkungen	7
1.4	Technologien zur Identifizierung von T-Zell Antigenen	9
1.5	Analyse krankheitsrelevanter CD8 ⁺ -T-Zellen	12
1.6	Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen	14
1.7	Autoimmunerkrankungen	14
1.7.1	Multiple Sklerose	15
1.7.1.1	CD8 ⁺ -T-Zellen in MS	15
1.7.1.2	PLP(45-53) spezifische humane CD8 ⁺ -T-Zellen im Tiermodell der MS	16
1.7.1.3	MAIT-Zellen in MS	17
1.7.2	Psoriasis	17
1.8	Fragestellung	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Material	20
2.1.1	Geräte	20
2.1.2	Puffer und Lösungen	21
2.1.3	Verbrauchsmaterial	23
2.1.4	Reagenzien und kommerzielle Kits	23
2.1.5	Synthetische Peptide	24
2.1.6	Primer	25
2.1.7	Plasmide	26
2.1.8	Zelllinien	27
2.2	DNA basierte Methoden	28
2.2.1	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.2.2	DNA-Konzentrationsbestimmungen	28
2.2.3	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	28
2.2.4	Reinigung von DNA-Fragmenten	28
2.2.5	Präzipitation von DNA durch Ethanol	29
2.2.6	Mutagenese-PCR	29
2.2.7	Enzymatischer Verdau von DNA-Fragmenten	29
2.2.8	Ligation von DNA-Fragmenten	30

2.2.9	Klonierung von HLA-A2- und β_2m -pET-21c(+)	30
2.2.10	DNA Isolierung von transfizierten und nicht transfizierten COS-7 Zellen	31
2.2.11	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Zellen	31
2.2.12	Sequenzierung von DNA-Proben	31
2.3	Mikrobiologische Methoden	31
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i>	31
2.3.1.1	Transformation durch Hitzeschock	31
2.3.1.2	Transformation durch Elektroporation	32
2.3.2	Expression von HLA-A2 sowie β_2m in <i>E. coli</i>	32
2.3.3	Expression von GPCPD1(1-118) in <i>E. coli</i>	33
2.4	Protein basierte Methoden	33
2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
2.4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.4.3	Proteinfärbung mit Coomassie [®] Brillant Blau	34
2.4.4	Reinigung der Proteindomäne GPCPD1(1-118) aus <i>E. coli</i>	34
2.4.5	Reinigung von Proteinen aus <i>inclusion bodies</i>	35
2.4.6	Rückfaltung von Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen	35
2.4.7	Enzymatische Biotinylierung von Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen	36
2.4.8	Multimerisierung von biotinylierten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2: β_2m - Komplexen mit Streptavidin	36
2.5	Methoden mit eukaryotischen Zellen	36
2.5.1	Allgemeine Zellkulturbedingungen	36
2.5.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	37
2.5.3	Bestimmung der Lebendzellzahl	37
2.5.4	Trypsinierung von adhärennten COS-7 Zellen	37
2.5.5	Transfektion von COS-7 Zellen mit PECPL- und HLA Plasmid-DNA	38
2.5.5.1	Transfektion mit FuGENE [®] HD	38
2.5.5.2	Transfektion durch Nukleofektion	39
2.5.6	Bestimmung der Transfektionseffizienz transfizierter COS-7 Zellen	40
2.5.7	Generierung von Makrophagen aus CD14 ⁺ -Monozyten	40
2.5.8	Versuche zur Harnstoff-vermittelten Kreuzpräsentation von GPCPD1(1-118) durch Makrophagen	40
2.5.9	Aktivierungsversuche mit T-Hybridomzellen	41
2.5.9.1	Aktivierungsversuche mit synthetischen Peptiden	41
2.5.9.2	Aktivierungsversuche mit Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen	41
2.5.9.3	Aktivierungsversuche mit Plasmid-kodierten Peptiden	42
2.5.9.4	Aktivierungsversuche mit PECPL zur Identifizierung von Mimotopen	42
2.5.9.4.1	Identifizierung aktivierender APC	42
2.5.9.4.2	Isolierung aktivierender APC	42
2.5.9.4.3	Amplifizierung und Klonierung von Peptid-kodierenden Sequenzen der PECPL- Plasmide isolierter APC	43

2.5.9.4.4	Reaktivierungsversuche mit PECPL-Plasmiden isolierter APC und <i>subpools</i>	43
2.5.9.4.5	Anreicherung und Identifizierung des Plasmid-kodierten Mimotops.....	43
2.5.10	Färbung von T-Hybridomzellen mit PE-markierten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2:β ₂ m-Komplexen.....	44
2.5.11	Detektion der Expression von sGFP durch Fluoreszenzmikroskopie	44
2.6	Quantifizierung von PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle mittels quantitativer PCR.....	45
2.6.1	Primer Spezifitätstest	45
2.6.2	Herstellung der PECPL-Standards.....	46
2.6.3	Quantifizierung mittels qPCR.....	46
2.7	Analyse des PECPL-Repertoires einzelner COS-7 Zellen 48 h nach Nukleofektion durch NGS.....	47
2.7.1	Sortierung von PECPL-transfizierten Einzelzellen	48
2.7.2	Einbau der UID-Nukleotide.....	48
2.7.3	Amplifizierung UID-markierter PECPL-Sequenzen.....	48
2.7.4	Einbau von Einzelzell-spezifischen Indices und Illumina Plattform kompatiblen Adaptoren.....	49
2.7.5	Analyse von NGS-Daten	50
3	Ergebnisse	51
3.1	Identifizierung und Validierung von Antigenen des TZR 2D1 im Kontext von HLA-A2	51
3.1.1	TZR 2D1 erkennt Mimotope als synthetische Okta- und Nonamere	52
3.1.2	Identifizierung natürlich vorkommender HLA-A2-restringierter Antigene des TZR 2D1.....	54
3.1.3	Rückfaltung von funktionalen Peptid:HLA-A2:β ₂ m-Komplexen	56
3.1.4	Proteinprozessierung in Makrophagen	59
3.1.5	Analyse der beiden α-Ketten des „ <i>dual alpha</i> “ TZR 2D1.....	60
3.2	Versuche zur Identifizierung von Antigenen des MAIT-verwandten TZR V[7.2J]58-V[1J]2.3	62
3.3	Identifizierung von Mimotopen des TZR V[3S1J]45.1-V[13S1J]1.1 im Kontext von HLA-C6.....	63
3.4	Optimierung der Technologie zur Identifizierung von CD8⁺-T-Zell Antigenen ..	65
3.4.1	Quantifizierung von PECPL-Plasmiden durch qPCR	66
3.4.1.1	Überprüfung der Spezifität der Primer	66
3.4.1.2	Etablierung der Standardkurve	66
3.4.2	Quantifizierung der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle nach Transfektion mit verschiedenen Methoden	67
3.4.2.1	Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion mit dem FuGENE [®] HD-Standardprotokoll	68

3.4.2.2	Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle nach FuGENE® HD Transfektionen mit verschiedenen PECPL-Konzentrationen.....	69
3.4.2.3	Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach Nukleofektionen mit verschiedenen PECPL-Konzentrationen.....	71
3.4.3	Charakterisierung des PECPL-Repertoires einzelner COS-7 Zellen durch NGS ..	74
4	Diskussion	79
4.1	Validierung der PECPL-Technologie und weitere Charakterisierung des TZR	
	2D1	79
4.1.1	Identifizierung oktamerer und nonamerer HLA-A2-restringierter Epitope des TZR 2D1	80
4.1.2	Bindungsmotive der antigenen Peptid:HLA-A2-Komplexe des TZR 2D1	81
4.1.3	Molekulare Ursachen der unterschiedlichen Aktivierungspotentiale nonamerer und oktamerer Peptid:HLA-A2-Komplexe gegenüber TZR 2D1	82
4.1.4	Zwei strukturell unterschiedliche Peptid:HLA-Komplexe aktivieren den TZR 2D1	84
4.1.5	<i>In vitro</i> Prozessierung von GPCPD1	86
4.2	Charakterisierung des TZR V[3S1J]45.1-V[13S1J]1.1	88
4.3	Versuche zur Identifizierung von Antigenen des MAIT-verwandten TZR	
	V[7.2J]58-V[1J]2.3 durch PECPL	90
4.4	Optimierung und Standardisierung der Antigensuchtechnologie.....	91
4.4.1	Anzahl der PECPL-Plasmide in APC	91
4.4.1.1	FuGENE® HD vs. Nukleofektion	92
4.4.1.2	Charakterisierung des PECPL-Repertoires auf Einzelzellebene	93
4.4.2	Mögliche zukünftige Optimierungen der PECPL-Technologie.....	95
4.5	Ausblick.....	98
	Literaturverzeichnis	100
	Abkürzungsverzeichnis	112
	Appendix.....	114
	Eidesstattliche Versicherung	121
	Danksagung.....	122

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das humane Immunsystem dient dem menschlichen Organismus zum Schutz vor infizierten sowie vor entarteten körpereigenen Zellen. Beim Menschen wird das Immunsystem in zwei Abwehrmechanismen gegliedert, die angeborene und die adaptive Immunität. Die angeborene Immunität umfasst physikalische und chemische Barrieren, entzündliche Reaktionen, das Komplementsystem sowie unterschiedliche Zelltypen, wie beispielsweise Granulozyten, Makrophagen und natürliche Killerzellen. Diese Immunabwehr reagiert schnell und erkennt konservierte Struktur motive verschiedener Pathogene durch invariante Rezeptoren. Letzteres impliziert, dass sich dieser Abwehrmechanismus nicht gegen neue oder abgewandelte, pathogene Strukturen richten kann.

Eine bedeutend spezifischere Immunantwort wird hingegen durch die adaptive Immunität erzielt, die sich in die humorale und zelluläre Immunantwort unterteilen lässt. Die adaptive Immunität umfasst T- und B-Lymphozyten (T- und B-Zellen), die aufgrund ihrer vielfältigen und hochgradig spezifischen Oberflächenrezeptoren zielgerichtete Immunreaktionen gegen nahezu sämtliche Antigene hervorrufen können. B-Zellen erkennen ihre Antigene in nativer Form und produzieren infolge des Antigenkontakts z. B. lösliche Antikörper, die durch Neutralisation, Opsonisierung oder Komplementaktivierung zur Immunabwehr führen. Zur zellulären Immunität zählen auch $CD4^+$ - und $CD8^+$ -T-Zellen (Abbildung 1). $CD4^+$ -T-Zellen erkennen exogene Antigene, die von antigenpräsentierenden Zellen (APC) auf Haupthistokompatibilitätskomplex- (*major histocompatibility complex*, MHC) Klasse-II-Molekülen präsentiert werden. Nach Antigenerkennung setzen sie Zytokine frei, die weitere Immunantworten auslösen und zudem B-Zellen stimulieren. $CD8^+$ -T-Zellen hingegen werden durch zytosolische Antigene im Kontext von MHC-Klasse-I-Molekülen aktiviert. Beispiele sind virale Antigene bei Infektionen oder Neoantigene in Tumoren. Die Aktivierung führt zur Beseitigung der infizierten bzw. entarteten Zellen durch zytotoxische Mechanismen. Die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems ein immunologisches Gedächtnis auszubilden, garantiert eine schnellere und effizientere Immunreaktion bei erneuter Exposition mit demselben Antigen.

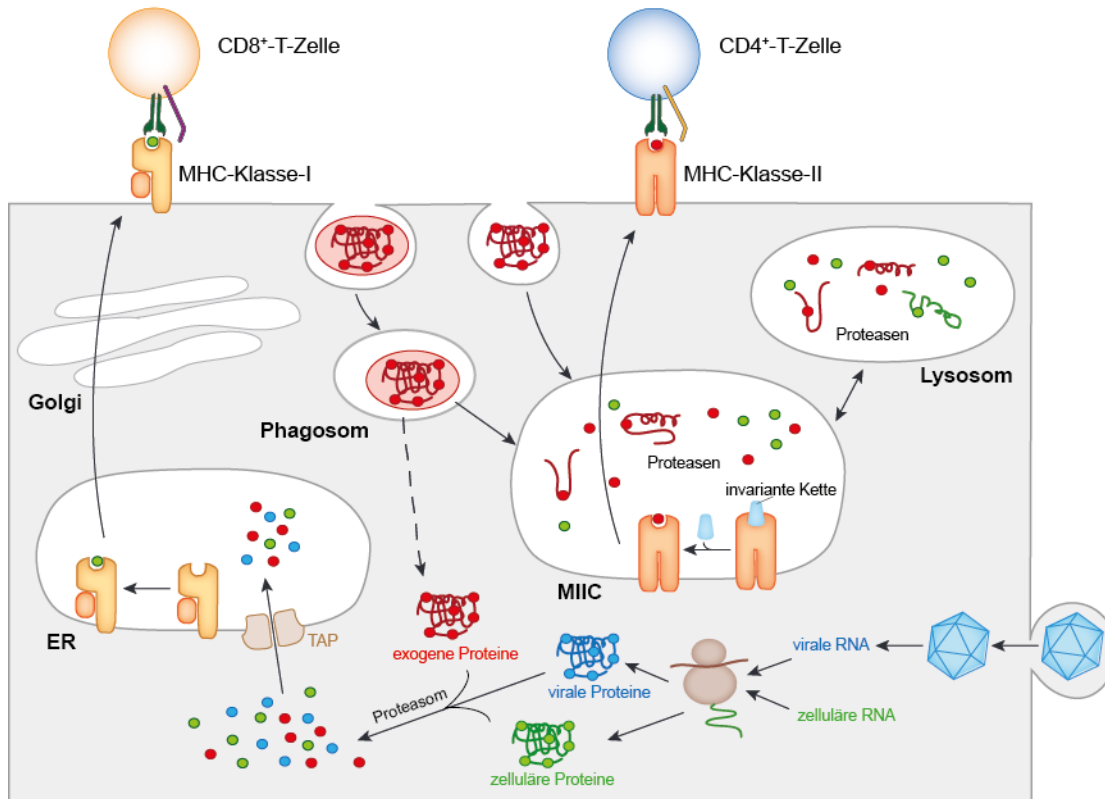


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Antigengenerierung zur Aktivierung von CD8⁺- sowie CD4⁺-T-Zellen der adaptiven Immunität.

Für die Präsentation von Antigenen durch MHC-Klasse-I-Moleküle an CD8⁺-T-Zellen (links oben) werden zelluläre oder auch virale Proteine im Fall einer virusinfizierten Zelle im Zytosol durch das Proteasom (links unten) prozessiert. Die dabei entstehenden kurzen Peptide gelangen anschließend über den Antigenpeptid-Transporter (TAP) in das Endoplasmatische Retikulum (ER), wo sie auf MHC-Klasse-I-Moleküle beladen werden. Peptid:MHC-Klasse-I-Komplexe gelangen über den Golgi-Apparat auf die Zelloberfläche und können CD8⁺-T-Zellen aktivieren. Exogene Proteine werden überwiegend von MHC-Klasse-II-Molekülen (rechts) präsentiert. Die exogenen Proteine gelangen durch Endozytose ins Zellinnere, wo die Vesikel mit Endosomen und Lysosomen fusionieren. In angesäuerten Endosomen und Lysosomen werden die Proteine durch Proteasen abgebaut. Im MHC-Klasse-II-Kompartiment (MIIC) werden die resultierenden Peptide auf MHC-Klasse-II-Moleküle beladen und an die Zelloberfläche transportiert, wo sie CD4⁺-T-Zellen aktivieren können. Neu synthetisierte MHC-Klasse-II-Moleküle werden im ER mit einer invarianten Kette zusammengelagert, die den Transport zum MIIC dirigiert und die Bindung von Peptiden verhindert. Die Freisetzung der invarianten Kette durch Proteolyse ermöglicht schließlich die Bindung von Peptiden. Werden exogene Peptide von MHC-Klasse-I-Molekülen an der Zelloberfläche präsentiert, bezeichnet man diesen Vorgang als Kreuzpräsentation. Die exogenen Peptide gelangen u. a. über die retrograde Translokation aus Phagosomen in das Zytosol (adaptiert von Blum et al., 2013).

1.2 CD8⁺-T-Zellen

Die CD8⁺-T-Zellen der adaptiven Immunität sind entscheidend bei der Beseitigung von Infektionen und verhindern ein Ausbreiten dieser im Organismus. CD8⁺-T-Zellen erkennen eine infizierte Zelle spezifisch über ihren membranständigen Oberflächenrezeptor, dem sogenannten T-Zell-Rezeptor (TZR), und sind in der Lage diese selektiv

zu eliminieren, sodass dabei benachbarte, nicht infizierte Zellen verschont bleiben. Diese äußerst zielgerichtete Eliminierung erfolgt dabei über zwei zytotoxische Mechanismen, die polarisierte Sekretion von Perforin und Granzymen sowie die Expression des Fas-Liganden CD95L (Harty et al., 2000; Walter and Santamaria, 2005).

1.2.1 Generierung und Selektion des T-Zell-Repertoires

Um ein breites Spektrum von Antigenen erkennen zu können, ist ein äußerst vielfältiges T-Zell-Repertoire erforderlich. Das T-Zell-Repertoire wird während der T-Zell-Entwicklung im Thymus über die somatische Rekombination der variablen (V), diversen (D) und *joining* (J) TZR-Gensegmente erzeugt (Schatz and Ji, 2011). Die variable Domäne der α -TZR-Kette wird durch Verknüpfung von V _{α} -, D _{α} - und J _{α} -Gensegmenten erzeugt, während die der β -TZR-Kette durch Verbindung von V _{β} - und J _{β} -Gensegmenten entsteht. Durch die Kombination von 40-48 V _{α} -, 2 D _{α} - mit 12-13 J _{α} - sowie 43-45 V _{β} - mit 50 J _{β} -funktionellen Gensegmenten und durch das Vorhandensein von P- und N-Nukleotiden an den Verknüpfungsstellen können theoretisch bis zu 10^{18} verschiedene humane α/β -TZR generiert werden (Davis and Bjorkman, 1988; Lefranc and Lefranc, 2001; Turner et al., 2006). Bislang konnten in der Peripherie beim Menschen experimentell $2,5 \times 10^7$ verschiedene TZR nachgewiesen werden (Arstila et al., 2000). Eine geringe Anzahl dieser TZR ist „allgemein“, d. h. dass diese in verschiedenen Individuen gefunden werden; der Großteil hingegen ist für ein Individuum einzigartig und wird als „privat“ bezeichnet (Attaf et al., 2015). Experimentell wurden sehr viel weniger TZR gefunden als theoretisch möglich wären, weil die TZR durch die positive und negative Selektion der T-Zellen im Thymus eliminiert werden. Üblicherweise gelangt nur eine von 100 T-Zellen nach der Selektion in die Peripherie (Attaf et al., 2015; Goldrath and Bevan, 1999).

Bei der positiven Selektion im Thymus überleben zunächst nur unreife T-Zellen, deren TZR eine ausreichende Affinität gegenüber Selbst-Peptid:MHC-Komplexen aufweisen. Die Selbstantigene werden hierbei überwiegend durch das Thymoproteasom der kortikalen Epithelzellen des Thymus generiert und von körpereigenen MHC-Molekülen an ihren Oberflächen präsentiert (Laufer et al., 1996; Murata et al., 2007). Unreife T-Zell-Klone, die Selbstantigene mit einer hohen Affinität erkennen, werden durch Apoptose deletiert. Diesen Prozess bezeichnet man als negative Selektion. Medulläre Epithelzellen des Thymus (mTEC) stellen dabei sicher, dass fast alle gewebsspezifischen Selbstantigene ektopisch exprimiert werden und sie direkt oder indirekt durch konventionelle dendritische Zellen präsentiert werden (Derbinski et al., 2001; Gotter et al., 2004;

Hubert et al., 2011; Klein et al., 2014). Die Anzahl und Vielfalt der selektierten T-Zellen werden demnach über die verfügbaren Liganden reguliert, die im Thymus prozessiert und präsentiert werden (Attaf et al., 2015).

1.2.2 Struktur von T-Zell-Rezeptoren

CD8⁺-T-Zellen exprimieren an ihrer Zelloberfläche neben dem Corezeptor CD8 den TZR (Meuer et al., 1983). Dieser transmembrane Glykoproteinkomplex ähnelt im Aufbau dem Fab-Fragment eines Antikörpers und besteht aus multiplen Untereinheiten, die für die Antigenbindung sowie für die Signaltransduktion zuständig sind. Die antigenbindende Untereinheit besteht aus einer α - sowie einer β -Polypeptidkette, deren jeweiligen extrazellulären Amino-Termini über drei hochvariable komplementaritätsbestimmende Regionen (*complementarity determining regions*, CDR) verfügen, die zusammen die Antigenbindungsstellen bilden. Beide Polypeptidketten sind über nicht-kovalente Bindungen mit dem CD3-Komplex verknüpft, der aus sechs invarianten Polypeptidketten ($\gamma\delta\epsilon_2\zeta_2$) besteht (Abbildung 2).

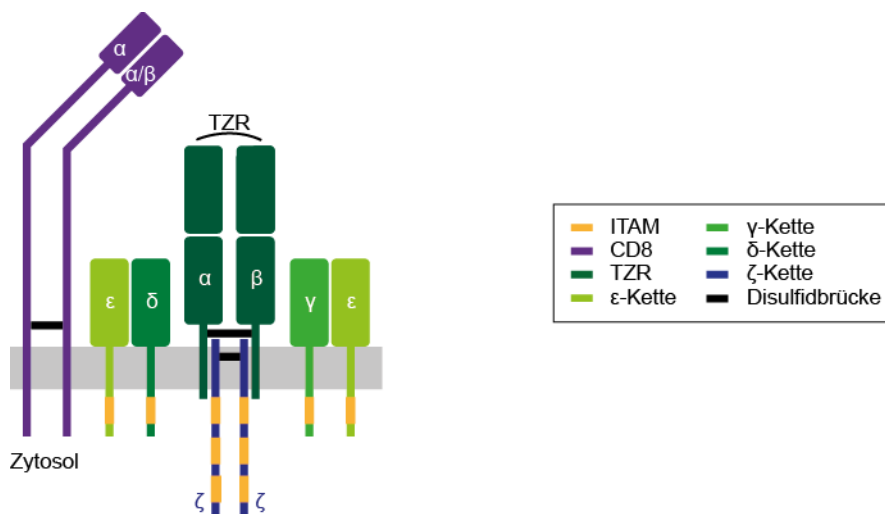


Abbildung 2: Schematische Abbildung eines TZR-CD3-Komplexes einer CD8⁺-T-Zelle.

Das α/β -Heterodimer des TZR (dunkelgrün) einer CD8⁺-T-Zelle ist über eine Disulfidbrücke (schwarz) miteinander verknüpft und assoziiert mit dem CD3-Komplex. Dieser besteht aus einer homodimeren (ζ/ζ) und zwei heterodimeren (ϵ/δ und ϵ/γ) Polypeptidkette(n), die jeweils die konservierten Sequenzmotive *immunoreceptor tyrosine-based activation motifs* (ITAMs) (gelb) enthalten. Zudem exprimieren CD8⁺-T-Zellen den Corezeptor CD8, der sich aus α/β - oder α/α -Polypeptidketten (lila) zusammensetzt (adaptiert von Rühl, 2011).

Der CD3-Komplex ist für die Signalübertragung der Antigenerkennung an eine intrazelluläre Signalkaskade zuständig. Die Initiation der Signaltransduktion erfolgt durch die Phosphorylierung der ITAMs, die jede CD3-Komplexuntereinheit in ihrer zytoplasma-

tischen Domäne enthält (van der Merwe and Dushek, 2011). Die Aktivierung der Signalkaskade resultiert u. a. in der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors *nuclear factor of activated T cells* (NFAT) und der Expression von Interleukin-2 (IL-2) (Nohara et al., 2015).

1.3 Antigenerkennung von CD8⁺-T-Zellen

TZR von CD8⁺-T-Zellen erkennen kurze Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert werden. MHC-Klasse-I-Moleküle, die beim Menschen als *human leukocyte antigen* (HLA) benannt werden, sind Glykoproteine, die sich aus einer schweren α -Kette (45 kDa) und einer löslichen, nicht-kovalent assoziierten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin (β_2m , 13 kDa), zusammensetzen. Die α -Kette besteht aus drei extrazellulären α - (α_1 - α_3), einer transmembranen sowie einer kurzen intrazellulären Domäne (Abbildung 3). Die beiden α_1 - und α_2 -Domänen bilden eine Furche, in die Peptide binden können (Bjorkman et al., 1987). MHC-Klasse-I-Moleküle sind nur stabil und werden an die Zelloberfläche befördert, wenn sie ein Peptid gebunden haben. Die antigenen Peptide weisen überwiegend eine Länge von acht bis zehn Aminosäuren auf. Die Länge der Peptide wird zum einen durch das Proteasom vorgegeben, indem dieses vorzugsweise acht bis elf Aminosäuren lange Fragmente generiert (Wenzel, 1994). Zum anderen ist sie in der Größe der MHC-Bindungsfurche begründet. Peptide, die länger als zehn Aminosäuren sind, machen mit ungefähr 5 % aller gebundenen Peptide, lediglich einen kleinen Beitrag aus (Burrows et al., 2006; Hickman et al., 2004). Das bisher längste bekannte Peptid ist 14 Aminosäuren lang und wird von HLA-B*35:01 präsentiert (Probst-Kepper et al., 2001). Kurze Peptide sind vollständig in der Bindungsfurche eingebettet, während bei längeren Peptiden lediglich der N- und C-Terminus innerhalb dieser liegt. Die zentralen Aminosäuren des Peptids hingegen wölben sich aus der Bindungsfurche in Richtung des TZR aus. N- und C-Terminus jeglicher gebundener Peptide werden jeweils über Wasserstoffbrücken und ionische Wechselwirkungen innerhalb der Bindungsfurche stabilisiert.

Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexe weisen Dissoziationskonstanten von bis zu 500 nM auf. Peptide mit einer Dissoziationskonstanten von < 50 nM werden als starke Binder klassifiziert. Derzeit ist eine Vielzahl an Programmen, wie z. B. NetMHC oder *MHC-I binding tool* frei verfügbar, die Bindungsaffinitäten von Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen berechnen (Kim et al., 2012b; Roomp et al., 2010). Darüber hinaus können mit der Moleküldynamik Strukturmodelle von Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen simuliert werden.

HLA-Klasse-I-Moleküle verfügen innerhalb der α_3 -Domäne über eine konservierte Bindungsstelle für das transmembrane Glykoprotein CD8 (Salter et al., 1989). CD8 fungiert als Corezeptor und stabilisiert die niedrig-affine Wechselwirkung zwischen TZR und HLA-Klasse-I-Molekül (Laugel et al., 2011).

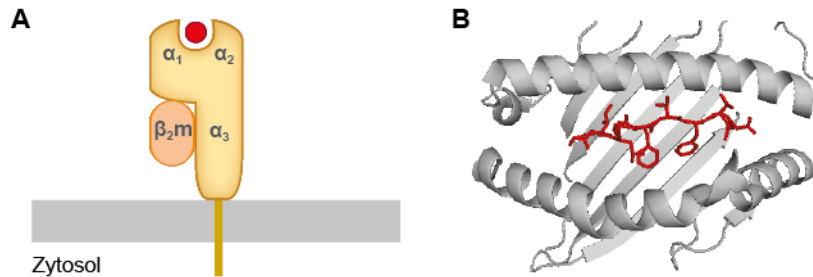


Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexes.

(A) Die α -Kette der HLA-Klasse-I-Moleküle (gelb) besteht aus drei Domänen (α_1 - α_3), von denen die α_1 - und α_2 -Domäne eine Furche bilden, in die das Peptid (rot) bindet. β_2m (orange) ist mit der α -Kette assoziiert. (B) Strukturmodell der α_1 - und α_2 -Domäne (grau) mit gebundenem nonamerem Peptid (rot) aus der Perspektive des TZR (Darstellung und Adaption der pdb-Datei 1OGA (Stewart-Jones et al., 2003) erfolgte mit The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.1r1 Schrödinger, LLC).

Beim Menschen sind HLA-Klasse-I-Moleküle auf dem Chromosom 6 lokalisiert (Trowsdale and Knight, 2013). HLA-Klasse-I-Moleküle sind polygen, jeweils drei HLA-Klasse-I-Moleküle mütterlicher- und väterlicherseits werden kodominant auf der Zelloberfläche exprimiert. Darüber hinaus sind sie äußerst polymorph. Derzeit sind 3.107 HLA-A-, 3.887 HLA-B- und 2.623 HLA-C-Allele bekannt (Robinson et al., 2014). HLA-Klasse-I-Allele unterscheiden sich überwiegend in ihrer Aminosäurezusammensetzung an bestimmten Positionen innerhalb der Bindungsfurche. Diese Unterschiede führen dazu, dass Allele an diesen Positionen bevorzugt Peptide mit bestimmten Aminosäuren binden. Diese Positionen werden auch als Anker-Positionen bezeichnet (Falk et al., 1991). Die Polygenie sowie der Polymorphismus sorgen dafür, dass ein großes Peptidrepertoire von HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden kann. Binden beispielsweise nur 1 % aller möglichen acht Aminosäuren langen Peptide an ein spezifisches HLA-Klasse-I-Molekül, so werden über $2,6 \times 10^8$ Peptide präsentiert (Sewell, 2012).

Im Vergleich zu anderen Regionen des Genoms ist die HLA-Region am stärksten mit Krankheiten, insbesondere Infektionen und Autoimmunerkrankungen, assoziiert (Price et al., 1999; Trowsdale and Knight, 2013). Multiple Sklerose (MS) ist beispielsweise am stärksten mit dem HLA-Klasse-II-Allel HLA-DRB1*15:01 verknüpft. Darüber hin-

aus werden HLA-Klasse-I-Allele als Risikofaktoren angesehen (Beecham et al., 2013; Patsopoulos et al., 2013). Während dem HLA-A*02:01 (HLA-A2) eine vor MS schützende Funktion zugewiesen wird, so wird dem HLA-A*03:01 (HLA-A3) ein erhöhtes Risiko an MS zu erkranken, zugesprochen, weil es genetisch mit HLA-DRB1*15:01 verknüpft ist („*linkage disequilibrium*“) (Brynedal et al., 2007; Fogdell-Hahn et al., 2000; Harbo et al., 2004). Bei Psoriasis wird das HLA-Klasse-I-Allel HLA-C*06:02 (HLA-C6), das von über 60 % der Patienten exprimiert wird, als kausales Risikogen der Erkrankung betrachtet (Nair et al., 2006).

1.3.1 Präsentation von Antigenen auf HLA-Klasse-I-Molekülen

Endogene Proteine sowie exogene Proteine, die über den retrograden Transport in das Zytosol gelangen, werden im Zytosol durch das Proteasom in kurze Peptidfragmente prozessiert (Abbildung 1). Die dabei entstehenden Peptide werden über den sogenannten Peptidbeladungskomplex (PLC) auf die jeweiligen HLA-Klasse-I-Moleküle beladen. Der PLC setzt sich aus den folgenden sechs Proteinen zusammen: der schweren HLA-Klasse-I-Kette, β_2m , TAP, Tapasin, Calreticulin (CRT) und Erp57. Der heterodimere Proteinkomplex TAP, dessen Untereinheiten in der Membran des ER verankert sind, transportiert aktiv die zytosolischen Peptide in das ER-Lumen (Blum et al., 2013). Zahlreiche Peptide, die in das ER-Lumen transportiert werden, sind länger als die von HLA-Klasse-I-Molekülen bevorzugten acht bis zehn Aminosäuren langen Reste und werden von der ER Aminopeptidase 1 und 2 (ERAP1/2) an ihren N-Termini verkürzt (Saric et al., 2002; Saveanu et al., 2005; York et al., 2002). TAP wechselwirkt darüber hinaus mit Tapasin und CRT. Tapasin ist ein transmembranes Glykoprotein und rekrutiert das Chaperon CRT und Dimere, bestehend aus einer schweren HLA-Klasse-I-Kette sowie einem β_2m -Molekül, zum PLC (Sadasivan et al., 1996). Die Anlagerung an den PLC stabilisiert das leere HLA-Klasse-I-Molekül und bewahrt die Peptidbindungsfurche in einem Konformationszustand, der die Bindung von hoch-affinen Peptiden ermöglicht. Der Faltungsprozess wird dabei durch CRT und Erp57 unterstützt. Sobald durch die Bindung eines Peptids ein stabiler Peptid:HLA: β_2m -Komplex entsteht, wird dieser freigesetzt und gelangt über den Golgi-Apparat an die Zelloberfläche, auf der dieser schließlich von $CD8^+$ -T-Zellen erkannt werden kann (Blum et al., 2013).

1.3.2 Besonderheiten der Peptid:HLA-TZR-Wechselwirkungen

Die Wechselwirkung eines TZR mit einem Peptid:HLA-Komplex ist von besonders niedriger Affinität gekennzeichnet. Im Gegensatz zu B-Zellen durchlaufen T-Zellen nach

ihrer Antigen-spezifischen Aktivierung keine Affinitätsreifung durch somatische Hypermutationen. Daher sind die Dissoziationskonstanten der Peptid:HLA-TZR-Wechselwirkung, die im Bereich von 10^{-6} bis 10^{-4} M liegen, signifikant schwächer im Vergleich zu denen der Antikörper-Antigen-Wechselwirkung (10^{-9} bis 10^{-12} M) (Rudolph et al., 2006; Stone et al., 2009). Aufgrund der niedrig-affinen Wechselwirkung können beispielsweise keine fluoreszenzmarkierten monomeren Peptid:HLA-Komplexe verwendet werden, um TZR anzufärben. Diese Problematik kann umgangen werden, indem Peptid:HLA-Multimere verwendet werden (Altman et al., 1996; Davis et al., 2011). Hierbei wird die niedrige Affinität der monovalenten Peptid:HLA-TZR-Bindung durch die Avidität kompensiert, die sich aus den Bindungsstärken aller multivalenten Bindungen zusammensetzt.

Ein weiteres Charakteristikum der Peptid:HLA-TZR-Wechselwirkung stellt die Kreuzreaktivität dar und beschreibt die Fähigkeit eines TZR zwei oder mehrere Peptid:HLA-Komplexe zu erkennen (Petrova et al., 2012). Es wurde abgeschätzt, dass ein TZR von bis zu 10^6 verschiedenen Antigenen aktiviert werden kann (Wooldridge et al., 2012). Unterschiedliche Mechanismen wurden bereits beschrieben, die auf molekularer Ebene die Kreuzreaktivität erklären (Abbildung 4).

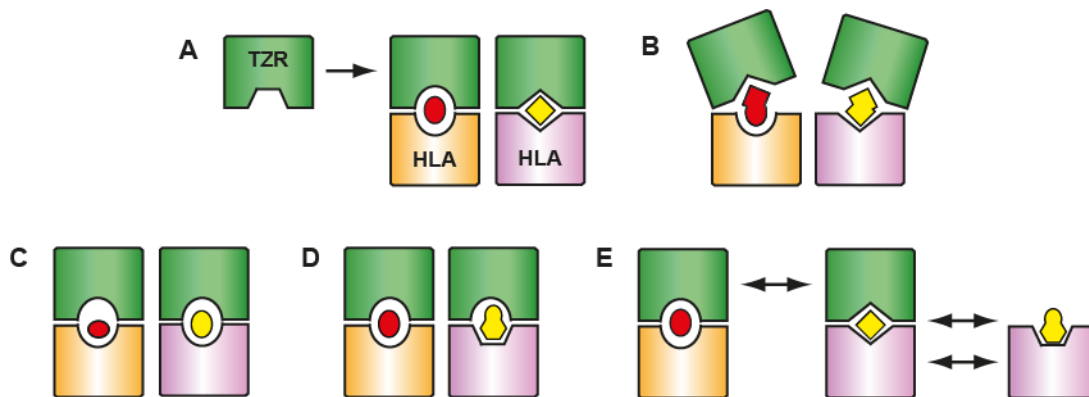


Abbildung 4: Schematische Darstellung der möglichen Mechanismen der Kreuzreaktivität.

(A) Konformationsänderungen (Pfeil) in der antigenbindenden Region des TZR (grün) ermöglichen die Erkennung beider Peptid:HLA-Komplexe (orange/rosa) (*induced-fit*). (B) Unterschiedliche Orientierungen des TZR zu einem Peptid:HLA-Komplex ermöglichen die Erkennung verschiedener Peptid:HLA-Komplexe. (C) Das Fehlen spezifischer Wechselwirkungen zwischen Peptid und TZR ermöglicht die Erkennung von weiteren Peptiden, obgleich diese an der TZR-Bindungsstelle über andere chemische Eigenschaften verfügen. (D) Verschiedene Peptid:HLA-Komplexe können ähnliche Oberflächenstrukturen aufweisen, die von einem TZR erkannt werden (molekulare Mimikry). (E) Die Erkennung von verschiedenen Peptid:HLA-Komplexen wird sowohl durch Konformationsänderungen des TZR, als auch durch Konformationsänderungen des Peptids und HLA-Moleküls beim Zusammentreffen der trimolekularen Strukturen ermöglicht (adaptiert von Yin and Mariuzza, 2009).

Darüber hinaus sind TZR in der Lage, durch Peptid:HLA-Komplexe, bei denen das HLA-Molekül nicht körpereigen ist, stimuliert zu werden. Dieses Phänomen bezeichnet man als Alloreaktivität. Als mögliche Ursachen hierfür werden zwei verschiedene Modelle diskutiert. Bei dem Peptid-abhängigen Modell erkennt der TZR strukturelle Ähnlichkeiten zwischen dem körpereigenen und „fremden“ HLA-Molekül und reagiert allein auf das gebundene Peptid. Bei dem HLA-abhängigen Modell reagiert der TZR auf polymorphe Reste des HLA-Moleküls (Rossjohn et al., 2015).

1.4 Technologien zur Identifizierung von T-Zell Antigenen

Eine effiziente Hochdurchsatzanalyse zur Identifizierung von T-Zell Antigenen ist derzeit nicht verfügbar, sodass die Entdeckung und Charakterisierung von Antigenen im Vergleich zu anderen Forschungsgebieten weit im Rückstand ist (Sharma and Holt, 2014). Die Ursachen hierfür liegen in der Besonderheit der TZR-Antigen-Wechselwirkung. Erstens können TZR ihre Antigene im Vergleich zu Antikörpern nur mit niedriger Affinität binden (1.3.2). Klassische affinitätsbasierte, biochemische Methoden, die zur Identifikation von Rezeptor-Liganden Paaren herangezogen werden, sind daher ungeeignet. Zweitens sind TZR polyspezifisch (1.3.2), wodurch die Ermittlung des natürlichen Antigens erschwert wird. Die Prozessierung von antigenen Proteinen muss so ausgeführt werden, wie sie *in vivo* von natürlichen APC erfolgt. Drittens stellt allein das große TZR-Repertoire sowie die beachtliche Anzahl potentiell möglicher antigener Peptide eine enorme Herausforderung dar.

In den letzten drei Jahrzehnten wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung von T-Zell Antigenen entwickelt. In einer der frühesten Arbeiten wurden cDNA Bibliotheken in Melanoma-Zelllinien transfiziert und ihr Aktivierungspotential gegenüber CD8⁺-T-Zellen analysiert (van der Bruggen et al., 1991). Diese Methode fand jedoch keine breite Anwendung, da die *in vitro* verwendeten APC antigene Proteine nicht wie die natürlichen APC spalten. Diese Problematik wurde durch Herangehensweisen umgangen, die kombinatorische Peptidbibliotheken verwenden. Die Länge der Peptide wird dabei so gewählt, dass intrazelluläre Prozessierungsschritte nicht nötig sind. Zunächst wurden APC mit kurzen, synthetischen kombinatorischen Peptidbibliotheken gepulst, die an einer Position eine definierte und an den verbleibenden Positionen willkürliche Aminosäure(n) enthalten (Gundlach et al., 1996). In darauffolgenden Ansätzen wurden diese sogenannten *positional scanning peptide combinatorial libraries* mit biometrischen Datenanalysen kombiniert (Hemmer et al., 1999; Nino-Vasquez et al., 2004; Sospedra et al., 2003; Zhao et al., 2001). Die Hauptschwäche dieser Methode ist jedoch, dass

aktivierende Peptide in nicht-aktivierenden Peptiden sehr stark verdünnt sind und nicht wiedergefunden bzw. amplifiziert werden können. Zudem können aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften nicht alle Aminosäuren eingesetzt werden. So wird beispielsweise die Aminosäure Cystein im Allgemeinen nicht verwendet, da diese leicht oxidiert und Disulfidbrücken ausbildet (Sewell, 2012).

Eine Weiterentwicklung der synthetischen Peptidbibliotheken sind *plasmid encoded combinatorial peptide libraries* (PECPL) (Adams et al., 2011; Pan et al., 2014; Siewert et al., 2012; Wang et al., 2005). Hier können gegebenenfalls auch einzelne Plasmide, die für aktivierende Peptide kodieren, durch PCR amplifiziert und kloniert werden. Dabei werden APC mit Plasmidbibliotheken transfiziert, und diejenigen APC, die aktivierende Peptide exprimieren, mit TZR-Tetrameren (Adams et al., 2011; Wang et al., 2005) angefärbt. Dies setzt jedoch eine gewisse Affinität zwischen TZR und Peptid:HLA-Komplexen voraus. Dadurch ist diese Methode nur für hoch-affine TZR geeignet. Um diese Limitation auszugleichen, wurde kürzlich in unserer Arbeitsgruppe eine neue Technologie entwickelt. Diese verwendet ebenfalls PECPL, um Antigene von CD8⁺-T-Zellen zu identifizieren (Siewert et al., 2012). Anstatt TZR-Tetramere zu verwenden, werden T-Hybridomzellen erzeugt, die die gewünschten α - und β -TZR-Ketten rekombinant exprimieren. Dabei werden 58 $\alpha\beta$ Hybridomzellen (Blank et al., 1993) verwendet, die keine eigenen TZR-Ketten exprimieren. Zudem werden sie mit den humanen CD8 α - und β -Ketten sowie dem Reporter gen sGFP transfiziert, das unter der Kontrolle des NFAT-Promoters steht (Abbildung 5 A).

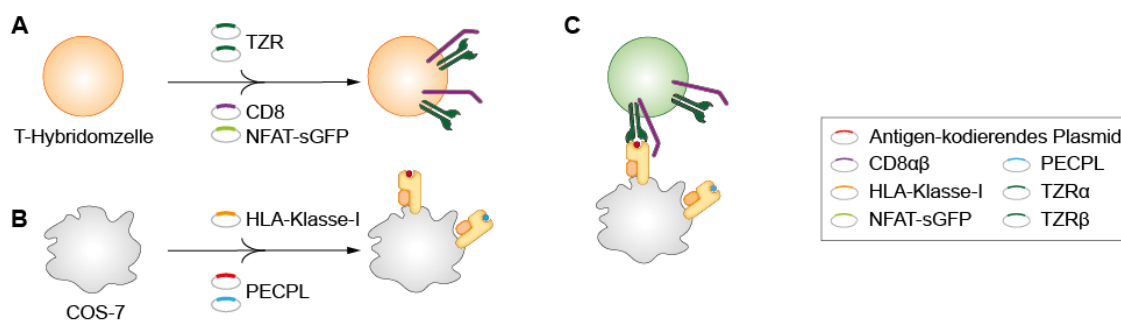


Abbildung 5: Schematische Darstellung der PECPL-Technologie zur Identifizierung von Antigenen von CD8⁺-T-Zellen.

(A) 58 $\alpha\beta$ Zellen werden stabil mit Plasmiden transfiziert, die für die folgenden Proteine kodieren: α - und β -Kette des TZR, humane CD8 α - und β -Ketten sowie sGFP, das unter der Kontrolle des NFAT-Promoters steht. (B) COS-7, die als APC fungieren, werden mit Plasmiden transfiziert, die für HLA-Klasse-I-Moleküle sowie für PECPL kodieren. (C) T-Hybridomzellen aus (A) und APC aus (B) werden in Kocultur genommen. T-Hybridomzellen, die durch direkten Kontakt mit dem antigenen Peptid:HLA-Komplex aktiviert wurden, fluoreszieren grün. Aus der unterliegenden APC wird das Antigen-kodierende Plasmid isoliert und identifiziert.

Als APC dienen COS-7 Zellen, die neben den Patienten-spezifischen HLA-kodierenden Plasmiden mit den PECPL transfiziert werden (Abbildung 5 B). Bei den PECPL handelt es sich um Plasmidbibliotheken, die für Peptide mit willkürlicher Aminosäurezusammensetzung und einer definierten Anzahl an Aminosäuren kodieren. Sie enthalten zudem den SV40 Replikationsursprung, anhand dessen sie von der APC amplifiziert werden. Das heißt, in den transfizierten Zellen entstehen aus jedem Plasmid, das initial aufgenommen wurde, viele Plasmide. Im nächsten Schritt werden die T-Hybridomzellen mit den APC kokultiviert. T-Hybridomzellen, die in direktem Kontakt mit einer APC stehen, die das Antigen präsentiert, werden aktiviert und fluoreszieren daraufhin grün (Abbildung 5 C). Die unterliegende APC, die das Plasmid für das antigene Peptid enthält, wird mittels einer Kapillare unter einem Fluoreszenzmikroskop isoliert. In einem mehrstufigen Prozess wird aus dieser Zelle schließlich das Plasmid identifiziert, das für das Antigen kodiert.

Das Auslesesystem dieser Methodik ist sehr sensitiv, sodass das aktivierende antigene Peptid innerhalb kurzer Zeit aus mehreren Millionen potentieller Peptide detektiert werden kann. T-Hybridomzellen und APC werden durch die Gravitationskraft in direktem Kontakt zueinander gehalten, sodass die Methode unabhängig von hoch-affinen TZR-Antigen-Wechselwirkungen ist (Siewert et al., 2012). Dies ist ein grundlegender Vorteil gegenüber affinitätsbasierten Methoden, die TZR- oder Peptid:HLA-Tetramere verwenden, um TZR Antigene zu identifizieren (Adams et al., 2011; Pan et al., 2014; Wang et al., 2005).

Es gibt allerdings noch Schritte dieser neuen Methode, die effizienter gestaltet werden könnten. So ist z. B. nicht bekannt,

- wie viele APC bei der Transfektion tatsächlich Plasmide aufnehmen. Experimente mit Reportermolekülen (z. B. GFP) beantworten diese Frage nur unzulänglich, da sie ein hohes Detektionslimit haben und niedrige Plasmidanzahlen nicht gemessen werden können.
- wie viele verschiedene Plasmide in einer transfizierten Zelle initial aufgenommen werden. Dieser Schritt ist höchstwahrscheinlich abhängig von den Details der Transfektionsmethode.
- wie schnell und effizient die Plasmide in der APC amplifiziert werden.

Die genaue Anzahl der verschiedenen PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle sowie die Oberflächendichte der rekombinanten Peptide, die benötigt werden um die T-Hybr-

domzelle zu aktivieren, sind also nicht bekannt. Beide Faktoren sind jedoch entscheidend für eine erfolgreiche Identifizierung von Antigenen. Ist das Antigen-kodierende Plasmid in der APC zu sehr durch andere Plasmide verdünnt, so ist es möglich, dass das antigene Peptid nicht in ausreichender Zelloberflächendichte präsentiert wird und infolgedessen die T-Hybridomzellen nicht aktiviert werden (Abbildung 6). Dies wäre z. B. der Fall, wenn sehr viele unterschiedliche Plasmide gleichzeitig aufgenommen werden, und jedes einzelne dann nicht stark amplifiziert wird. Werden nur sehr wenige Plasmide aufgenommen, und jedes dann stark amplifiziert, so müssen sehr viele APC analysiert werden, da nur sehr wenige Plasmide für das „richtige“ Peptid kodieren.

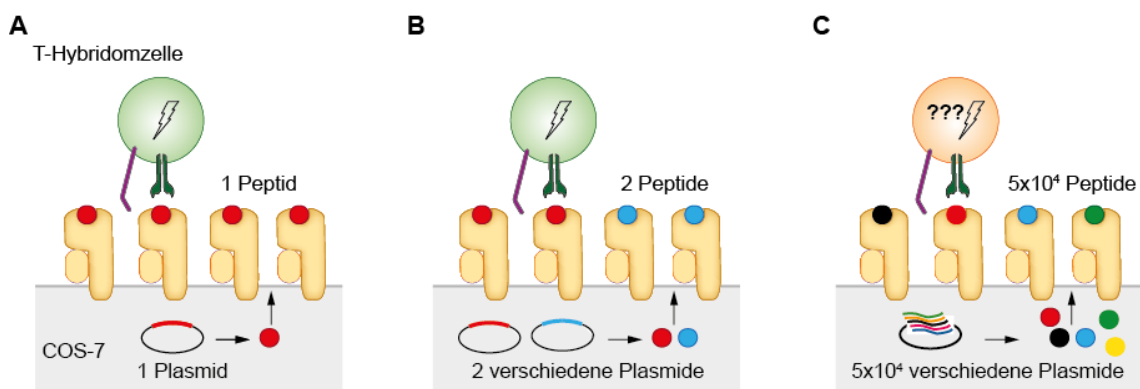


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Aktivierung von T-Hybridomzellen in Abhängigkeit von der Anzahl an transfizierten PECPL-Plasmiden in COS-7 Zellen.

Nach der Transfektion mit PECPL-Plasmiden amplifiziert die COS-7 Zelle (grau) die verschiedenen Plasmide, exprimiert die kodierten Peptide und präsentiert diese auf entsprechenden kotransfizierten HLA-Klasse-I-Molekülen (gelb) an ihrer Zelloberfläche. (A) Bei der Transfektion einer einzelnen Spezies von Antigen-kodierenden Plasmiden (rot) erfolgt ausschließlich die Präsentation des antigenen Peptids (rot) an der Zelloberfläche. Die T-Hybridomzelle, die in direktem Kontakt zur APC steht, wird aktiviert (Blitz) und fluoresziert grün. (B) Wird die APC neben dem Plasmid, das für das Antigen kodiert (rot) mit einem weiteren PECPL-Plasmid (blau) transfiziert, werden zwei verschiedene Peptide präsentiert. Die Oberflächendichte des antigenen Peptids ist für eine Aktivierung der T-Hybridomzelle sicherlich ausreichend. (C) Eine APC wird mit 5×10^4 PECPL-Plasmiden transfiziert, unter denen sich auch das Antigen-kodierende Plasmid (rot) befindet, und präsentiert die kodierten Peptide an der Zelloberfläche. Bei einer geschätzten Oberflächendichte von ca. 10^5 HLA-Molekülen pro Zelle, würden also nur zwei Peptide eines Plasmids präsentiert. Es ist zu vermuten, dass hier die Oberflächendichte damit nicht ausreicht, um eine T-Hybridomzelle zu aktivieren.

1.5 Analyse krankheitsrelevanter CD8⁺-T-Zellen

Die Analyse humaner, krankheitsrelevanter T-Zellen ist von großer Bedeutung, da sie zusammen mit ihren Antigenen direkten Aufschluss über die Pathogenese geben könnten. Die Hauptschwierigkeit liegt darin im Gewebe die krankheitsrelevanten T-Zellen von irrelevanten („bystander“) T-Zellen zu unterscheiden, die durch das ent-

zündliche Milieu angelockt wurden, und von solchen, die zufällig, z. B. in Blutgefäßen vorhanden sind. Deshalb können Gewebeproben nicht im Ganzen analysiert werden, sondern es müssen erst krankheitsrelevante T-Zellen identifiziert und isoliert werden, um dann zusammengehörende α - und β -TZR-Ketten aus Einzelketten zu charakterisieren. Kriterien für Krankheitsrelevanz sind:

- klonale Expansionen, da man annimmt, dass bestimmte Antigene das Wachstum spezifischer Klone fördern (Babbe et al., 2000; Held et al., 2015; Skulina et al., 2004);
- die Morphologie in der Läsion, z. B. direkter Kontakt mit einer Zielzelle (Arakawa et al., 2015);
- Aktivierungsmarker auf der Oberfläche, z. B. CD69, CD134, oder CD137, oder im Inneren der T-Zelle, z. B. Perforin oder Granzyme (Goebels et al., 1996).

Die Analyse von Einzelzellen ist abhängig von der Qualität der Gewebeproben, insbesondere vom Erhaltungszustand der mRNA. Oftmals können keine lebenden T-Zellen aus den Biopsien kultiviert werden, da es sich um gefrorene oder fixierte Proben handelt. Darüber hinaus sind Gewebeproben nur begrenzt vorhanden, zumal diese nicht immer routinemäßig bei allen Erkrankungen entnommen werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurde eine Methode entwickelt, die die Identifizierung zusammengehörender α - und β -TZR-Ketten einzelner humaner T-Zellen ermöglicht. Mittels Einzelzell-Multiplex-RT-PCR können TZR-Sequenzen jeglicher T-Zellen aus gefrorenem Gewebe sowie von lebenden T-Zellen, wie z. B. aus Blut oder *Liquor cerebrospinalis* (CSF), bestimmt werden (Kim et al., 2012a; Seitz et al., 2006). Gewebeschnitte können immunhistochemisch mit Antikörpern gegen T-Zell-spezifische Oberflächen- und Aktivierungsmarker gefärbt werden. Positive Zellen, die sich in akut entzündetem Gewebe oder in direktem Kontakt mit einer Zielzelle befinden, können dann durch Laser-Mikrodissektion isoliert werden. CD8⁺-T-Zellen aus Blut- oder CSF-Proben können mit Hilfe von antikörperbeschichteten magnetischen Partikeln oder nach Färbung mit Antikörpern mit einem *fluorescence-activated cell sorter* (FACS) spezifisch extrahiert werden.

In den letzten Jahren erfolgten zunehmend Studien des TZR-Repertoires mit *Next Generation Sequencing* (NGS)-Technologien (Calis and Rosenberg, 2014). Diese geben u. a. Aufschluss über klonal expandierte TZR-Ketten. Die klonale Expansion eines TZR weist auf eine Antigen-vermittelte Immunantwort hin. Die Kombination der zuvor be-

schriebenen Einzelzellanalyse mit NGS ermöglicht die Identifizierung klonal expandierter, pathogener, funktionaler TZR von CD8⁺-T-Zellen.

Ist ein TZR und dessen Antigen bekannt, können Peptid:HLA-Multimere verwendet werden, um die Frequenzen dieser Antigen-spezifischen T-Zellen innerhalb kürzester Zeit in verschiedenen Patienten zu analysieren (Davis et al., 2011). Treten diese Antigen-spezifischen T-Zellen bei Patienten im Vergleich zu gesunden Individuen häufiger auf, so würde dies die Pathogenität dieses TZR unterstreichen.

1.6 Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen

Mukosa-assoziierte invariante T (MAIT)- Zellen stellen neben γ/δ - und natürlichen Killer-T-Zellen eine T-Zellsubpopulation dar, die über eine eingeschränkte TZR-Repertoire Diversität verfügt. „Klassische“, humane MAIT-Zellen exprimieren überwiegend die invariante Va7.2-Ja33-Kette, die mit einer limitierten Anzahl an β -Ketten assoziiert, und CD161 (Martin et al., 2009; Tilloy et al., 1999). Vor Kurzem wurden MAIT-Zellen entdeckt, deren Va7.2-Segment mit den Ja12- und Ja20-Gensegmenten verknüpft ist (Reantragoon et al., 2013). MAIT-Zellen werden durch bakterielle Vitamin B Metaboliten aktiviert, die durch das Restriktionselement *MHC-related protein 1* (MR1) präsentiert werden (Kjer-Nielsen et al., 2012). Nach dem aktuellen Stand der Forschung nehmen MAIT-Zellen vermutlich eine wichtige Funktion in der Verteidigung gegen Mikroorganismen ein (Le Bourhis et al., 2010; Gold et al., 2010).

1.7 Autoimmunerkrankungen

Verschiedene zelluläre und genetische Kontrollmechanismen eines gesunden Organismus stellen sicher, dass das Immunsystem nicht auf körpereigene Strukturen reagiert. Zelluläre Strategien, wie z. B. die negative Selektion im Thymus (1.2.1) sowie die periphere Toleranz, sorgen dafür, dass potentiell autoreaktive Lymphozyten durch Apoptose, Anergie oder regulatorische T-Zellen eliminiert werden (Goodnow et al., 2005). Überwindet ein autoreaktiver Lymphozyt die Toleranz, indem einer dieser Mechanismen ausfällt, kann dieser in der Peripherie aktiviert werden und Autoimmunerkrankungen hervorrufen. Psoriasis, Diabetes mellitus Typ I, rheumatoide Arthritis, systemischer Lupus erythematodes sowie MS können als Beispiele für Autoimmunerkrankungen genannt werden. Die zugrunde liegenden Mechanismen, die die Entstehung der Autoimmunität bewirken, sind derzeit nicht vollständig bekannt. Als mögliche Ursache wird ein Zusammenspiel von genetischer Prädisposition, Genmutationen, Umwelt-

faktoren sowie Infektionen diskutiert (Rioux and Abbas, 2005). Darüber hinaus werden Zusammenhänge zwischen molekularer Mimikry und Autoimmunerkrankungen in Betracht gezogen (Banki et al., 1994; Chastain and Miller, 2012; Oldstone, 1987; Valdimarsson et al., 2009; Wucherpfennig and Strominger, 1995). Molekulare Mimikry beruht auf Sequenzhomologien zwischen Antigenen aus pathogenen Organismen und humanen, körpereigenen Antigenen. Auf diese Weise könnten Kreuzreaktionen ausgelöst werden, d. h. die T-Zelle „verwechselt“ unterschiedliche, aber ähnliche Antigene (1.3.2).

1.7.1 Multiple Sklerose

MS ist eine der häufigsten chronisch-entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems (ZNS) und zeichnet sich durch Demyelinisierung und axonale Degeneration aus. Die Krankheitssymptome variieren zwischen verschiedenen Individuen abhängig von den jeweilig betroffenen Regionen des ZNS (Bø et al., 2003; Lucchinetti et al., 2000). Die beiden überwiegend vorkommenden Verlaufsformen stellen die schubförmig-remittierende und primär-progrediente MS dar (Compston and Coles, 2008). Die Ätiologie sowie die Pathogenese von MS sind weitgehend unbekannt. Neben einem komplexen Zusammenspiel genetischer Faktoren und Umwelteinflüssen (Beecham et al., 2013; Fugger et al., 2009; Hemmer et al., 2015; Sawcer et al., 2011) werden Infektionen (Cepok et al., 2005; Derfuss et al., 2001; Martin, 1981; Pohl, 2009; Serafini et al., 2007) als mögliche Ursachen angesehen.

Die Klassifizierung von MS als Autoimmunerkrankung ist in den folgenden Beobachtungen begründet. Zum einen sind die Läsionen im ZNS von Immunzellen, wie beispielsweise Makrophagen sowie T- und B-Zellen, infiltriert (Kutzelnigg and Lassmann, 2014). Zum anderen enthält der CSF intrathekale, oligoklonale Antikörper (Stangel et al., 2013). Zwar ist MS derzeit nicht heilbar, jedoch sind verschiedene Immuntherapien vorhanden, die ein Voranschreiten der Krankheit verzögern (Haghikia et al., 2013). Darüber hinaus sind zahlreiche Genvarianten, die mit dem Immunsystem verwandt sind, genetische Risikofaktoren (Sawcer et al., 2014).

1.7.1.1 CD8⁺-T-Zellen in MS

Autoreaktiven T-Zellen wurden in den letzten Jahren eine entscheidende Funktion in der Pathogenese von MS zugesprochen. Anfängliche Forschungen haben sich dabei überwiegend auf CD4⁺-T-Zellen fokussiert, weil MS am stärksten mit HLA-DRB1*15:01 verknüpft ist und Tiermodelle der MS mit CD4⁺-T-Zellen etabliert waren.

In den letzten Jahren wurden zunehmend Hinweise für eine maßgebende Beteiligung der CD8⁺-T-Zellen erbracht (Hohlfeld et al., 2016a, 2016b). Die Anzahl an CD8⁺-T-Zellen übertrifft die der CD4⁺-T-Zellen in Gehirnläsionen (Booss et al., 1983; Friese and Fugger, 2009; Hauser et al., 1986). Darüber hinaus wurden oligoklonal expandierte CD8⁺-T-Zellen im Gehirn, CSF sowie im Blut von MS-Patienten nachgewiesen (Babbe et al., 2000; Held et al., 2015; Jacobsen et al., 2002; Junker et al., 2007; Skulina et al., 2004). Therapien, die sich nur gegen CD4⁺-T-Zellen richten, sind nicht so effektiv wie solche, die gegen CD4⁺- sowie CD8⁺-T-Zellen wirken (Willing and Friese, 2012). Genetische Studien zeigen, dass HLA-Klasse-I-Allele sowohl in risikobehaftender (HLA-A3) als auch in schützender (HLA-A2) Weise mit MS assoziiert sind (1.3). Zudem konnten Studien von Tiermodellen den CD8⁺-T-Zellen Bedeutung in der humanen Pathogenese beimessen (Friese et al., 2008).

Bisher wurden Myelinbestandteile, wie beispielsweise Proteolipid-Protein 1 (PLP) (Biddison et al., 1997; Honma et al., 1997; Tsuchida et al., 1994), Myelin-Basische Protein (MBP) (Zhang et al., 1994) und Transaldolase (Niland et al., 2005) sowie virale Antigene, wie z. B. Epstein-Barr-Virus (Serafini et al., 2007), als Zielstrukturen von CD8⁺-T-Zellen diskutiert.

1.7.1.2 PLP(45-53) spezifische humane CD8⁺-T-Zellen im Tiermodell der MS

Friese et al. erstellten ein transgenes Mausmodell für die Untersuchung der beiden HLA-Klasse-I-Moleküle HLA-A3 und HLA-A2 sowie des humanen TZR 2D1 in der Pathogenese von MS (Friese et al., 2008). Der TZR 2D1 wurde aus CD8⁺-T-Zellen aus dem Blut eines MS-Patienten isoliert und erkennt spezifisch die Aminosäuren 45-53 von PLP (PLP(45-53)) in Zusammenhang mit HLA-A3 (Honma et al., 1997). Mäuse, die zweifach transgen für den TZR 2D1 sowie das risikobehaftete HLA-A3 (1.3) waren, entwickelten spontan oder nach Immunisierung mit PLP(45-53) MS-ähnliche Symptome. Bei dreifach transgenen Mäusen, die zusätzlich das schützende HLA-A2 exprimierten (1.3), konnten hingegen keine Symptome beobachtet werden. Dies konnte darauf zurückgeführt werden, dass die autoreaktiven CD8⁺-T-Zellen durch negative Selektion im Thymus entfernt wurden und der TZR 2D1 mit HLA-A2 kreuzreagiert. Der TZR 2D1 erkennt jedoch PLP(45-53) nicht, wenn es von HLA-A2 präsentiert wird. Deshalb wird vermutet, dass die Deletion der 2D1 T-Zellen durch den Kontakt mit bisher unbekanntem autologen Peptiden im Komplex mit HLA-A2 erfolgte. Die große Ähnlichkeit der TZR-Bindungsflächen auf HLA-A3 und HLA-A2 unterstützen zu-

dem diese Annahme (McMahon et al., 2011). Es wäre also von großem Interesse, das unbekannte Antigen zu identifizieren, das im Kontext von HLA-A2 erkannt wird. Tatsächlich konnten in unserer Arbeitsgruppe mögliche Kandidaten identifiziert werden, die vom TZR 2D1 auf HLA-A2 erkannt werden (Niedl, 2014). Von besonderem Interesse sind hierbei Peptide der Proteine *Echinoderm microtubule-associated protein-like 5* (EML5), *DmX-like protein 2* (DMXL2), Neurocan (NCAN) und *Glycerophosphocholine phosphodiesterase 1* (GPCPD1), da diese sowohl in der Maus als auch im Menschen vorkommen. Eine Validierung dieser Kandidaten steht jedoch noch aus.

1.7.1.3 MAIT-Zellen in MS

Erste Hinweise auf eine Verbindung zwischen MAIT-Zellen und MS ergaben sich durch eine Studie von Illés et al., bei der $V\alpha 7.2-J\alpha 33^+$ -T-Zellen innerhalb von Läsionen im ZNS sowie in der Peripherie von MS-Patienten nachgewiesen wurden (Illés et al., 2004). Spätere Arbeiten (Annibali et al., 2011; Miyazaki et al., 2011; Willing et al., 2014) bestätigten diesen Befund. In einer $CD8^+$ -T-Zell-Repertoirestudie unserer Arbeitsgruppe wurde eine expandierte $V\beta 1^+$ -T-Zellpopulation in Läsionen im Gehirn eines MS-Patienten gefunden, deren $V\beta 1^+$ -Kette neben der klassischen MAIT $V\alpha 7.2-J\alpha 33$ -Kette mit den drei $V\alpha 7.2-J\alpha 16$ -, $V\alpha 7.2-J\alpha 24.2$ - und $V\alpha 7.2-J\alpha 58$ -Ketten exprimiert wird (Held et al., 2015). Die TZR-Ketten konnten nicht nur zum Zeitpunkt des Krankheitsbeginns, sondern auch mehrere Jahre danach im Blut und im CSF nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen weisen auf eine Antigen-vermittelte Rekrutierung der T-Zellen in Läsionen hin (Held et al., 2015). Die drei $V\alpha 7.2$ -verwandten Ketten weisen erhebliche Ähnlichkeiten in ihrer CDR3 Region auf, verfügen jedoch nicht über das konservierte Try95, das für die Vitamin B Metabolit-induzierte Aktivierung von klassischen MAIT-Zellen ausschlaggebend ist (Reantragoon et al., 2013). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die Aktivierung dieser MAIT-verwandten T-Zellen nicht durch Vitamin B Derivate, sondern möglicherweise durch niedermolekulare Liganden oder Peptide induziert wird.

1.7.2 Psoriasis

Psoriasis ist eine T-Zell-vermittelte, chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut. Weltweit sind 2-3 % der Bevölkerung von der Krankheit betroffen. Psoriasis vulgaris (PV) ist die häufigste Form der Psoriasis und zeichnet sich durch begrenzte, rötliche

Plaques der Haut aus, die mit silbrig glänzenden Schuppen bedeckt sind (Perera et al., 2012). HLA-C6 wird als Hauptrisikofaktor für die Erkrankung angesehen (1.3). Diese HLA-Assoziation steht im Einklang mit der Beobachtung, dass T-Zellen an der Immunpathogenese beteiligt sind (Prinz, 2003). CD4⁺-T-Zellen sind dabei primär in der Dermis psoriatischer Läsionen zu finden, während CD8⁺-T-Zellen überwiegend in der Epidermis lokalisiert sind. Für die Induktion von PV sind die epidermalen CD8⁺-T-Zellen ausschlaggebend (Conrad et al., 2007). Expandierte CD8⁺-T-Zell-Klone wurden in der Epidermis nachgewiesen, die auf eine Aktivierung durch spezifische Antigene schließen lassen (Chang et al., 1995; Kim et al., 2012a). Die TZR einiger dieser krankheitsrelevanten Klone konnten molekular charakterisiert werden (Kim et al., 2012a). Einer dieser Klone war besonders interessant, da dieser ein unbekanntes Autoantigen erkannte, das von Melanozyten präsentiert wurde, vorausgesetzt diese exprimierten HLA-C6. Es war also von großem Interesse, das Autoantigen dieses V β 3S1J β 45.1-V β 13S1J β 1.1 exprimierenden Klons zu identifizieren.

1.8 Fragestellung

CD8⁺-T-Zellen wird eine herausragende Beteiligung an der Pathogenese von infektiösen, neoplastischen und autoimmunen Erkrankungen zugesprochen. Die Spezifität dieser Zellen ist jedoch im Allgemeinen weitestgehend unbekannt. Dies ist überwiegend in der niedrig-affinen Wechselwirkung zwischen TZR und Antigen sowie in der Polyspezifität des TZR begründet. Vor Kurzem wurde in unserer Arbeitsgruppe eine neuartige Technologie entwickelt, die eine Charakterisierung von CD8⁺-T-Zell Antigenen ermöglicht (1.4). Eine Identifizierung von Zielstrukturen krankheitsrelevanter T-Zellen mittels dieser Technologie könnte erheblich zum Verständnis der Pathogenese der jeweiligen Krankheit beitragen und die Grundlage für neue Therapien und Diagnostika bilden.

Im Fokus der vorliegenden Arbeit standen daher die nachfolgenden Aufgaben:

- Validierung der Technologie durch Bestätigung der HLA-A2-restringierten Epitope des autoreaktiven, im Tiermodell extensiv untersuchten TZR 2D1 (1.7.1.2) durch PECPL unabhängige Methoden;
- Anwendung der Technologie zur Identifizierung von Antigenen des MAIT verwandten TZR V \square 7.2J \square 58-V \square 1J \square 2.3 (1.7.1.3) sowie des TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 (1.7.2), die zum Verständnis der Pathogenese von MS bzw. PV beitragen könnten;
- Optimierung und Standardisierung der Technologie durch:
 - Quantifizierung von PECPL-Plasmiden pro APC,
 - Etablierung von Transfektionsbedingungen zur Generierung von APC mit definierter Anzahl an PECPL-Plasmiden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Die innerhalb dieser vorliegenden Arbeit für Versuche und zur Analyse verwendeten Geräte sind in Tabelle 1 unter Angabe des Modells sowie des Herstellers aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	DX-150	Systec (Linden, D)
Durchflusszytometer	FACSVerse™	Becton Dickinson (BD; Franklin Lakes, USA)
Elektrophoreseapparatur		
Polyacrylamid	XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Agarose	Pharmacia LKB-ECPS 3000/150	Werkstatt Max-Planck-Institut (MPI) (Martinsried, D) Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, SWE)
ELISA-Plate-Reader	Wallac 1420 VICTOR ² ™	Perkin Elmer (Waltham, USA)
FPLC		
Kontrolleinheit	LCC-501-Plus	Amersham Pharmacia Biotech
UV-Detector	Uvicord SD	
Pumpen		
Geldokumentation		
Polyacrylamid	Perfection 4990 Photo	Epson (Suwa, JP)
Agarose	Molecular Imager® Gel Doc™ XR System Quantity One® Basic Software Alpha Innotech AlphaImager™	Bio-Rad Laboratories (Hercules, USA) Alpha Innotech (San Leandro, USA)
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, D)
Mikroskop	Wilovert S	Helmut Hund (Wetzlar, D)
Objektive	<u>AxioVert 200 M</u> Plan-Apochromat® 5x/0,16 Plan-Apochromat® 10x/0,45; ∞/0,17 Plan-Apochromat® 20x/0,8	Zeiss (Oberkochen, D) Zeiss Zeiss
CCD Kamera	CoolSNAP HQ	Zeiss Photometrics (Tucson, USA)
Lichtquelle	LQ-HXP R 120	Leistungselektronik JENA (Jena, D)
XYZ-Tisch	BioPrecision2	Ludl Electronic Products (Hawthorne, USA)
Tischsteuerung	MAC 6000	Ludl Electronic Products
Nukleofektor	4D-Nucleofector™ Core und X unit	Lonza (Basel, CH)

pH-Meter	pH521	WTW (Weilheim, D)
Schüttelinkubator	HT Multitron II	Infors AG (Bottmingen, CH)
Thermocycler	Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System TPersonal 48 Mastercycler® pro Mastercycler	Applied Biosystems (Foster City, USA) Biometra (Göttingen, D) Eppendorf Eppendorf
Ultraschallgerät	Sonifier 450	Branson (St. Louis, USA)
UV-Transilluminator	BL-312T	BIOS corporation
UV/Vis-Spektrometer	NanoDrop1000, NanoDrop2000	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Wasseraufbereitungssystem	Milli-Q® Advantage A10	Merck Millipore (Billerica, USA)
Werkbank		Werkstatt MPI
Zentrifugen	Optima™ XE 90K Avanti® J-26 XP Sprout Minizentrifuge Centrifuge 5417R Heraeus™ Megafuge™ 1.0 R PlateFuge™ MicroCentrifuge	Beckman Coulter (Brea, USA) Beckman Coulter Biozym (Hessisch Oldendorf, D) Eppendorf Thermo Fisher Scientific Benchmark Scientific (Edison, USA)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer und Lösungen sind mit ihrer jeweiligen Zusammensetzung in Tabelle 2 angegeben. Die dabei verwendeten Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* von den nachfolgenden Firmen bezogen: BD, Bio-Rad, Sigma-Aldrich (Sigma; St. Louis, USA), Merck/Biochrome (Darmstadt, D), Carl Roth (Karlsruhe, D), Invitrogen/Life Technologies™ (Carlsbad, USA) sowie AppliChem (Chicago, USA).

Tabelle 2: Verwendete Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
6 x DNA Auftragspuffer	50 % (v/v) Glycerin (Carl Roth), 0,02 % (w/v) Bromphenolblau (Merck), 10 mM Tris-HCl (Sigma), 0,02 % (w/v) Xylencyanol (Bio-Rad)
Biotinylierungspuffer	0,1 M Tris-HCl (pH 7,5) (Sigma), 0,2 M NaCl (Carl Roth), 5 mM MgCl ₂ (Sigma), 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF, gelöst in 2-Propanol; beide Sigma)
Coomassie-Färbelösung	0,1 % (w/v) Coomassie® Brilliant Blue R-250 (Bio-Rad), 40 % (v/v) Methanol (Sigma), 10 % (v/v) Essigsäure (Carl Roth)
co-RPMI	2 mM L-Glutamin (Sigma), 10 % Fötale Kälberserum (FCS, Biochrome), 1 mM Natriumpyruvat (Invitrogen), 1 % Penicillin/Streptomycin (Invitrogen), 1 x Nichtessenzielle Aminosäuren (Invitrogen), RPMI-1640 (Sigma); gegebenenfalls wurde für Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop RPMI-1640 Medium ohne Phenolrot (Biological Industries, Beit HaEmek, IL) eingesetzt

Material und Methoden

Einfriermedium	10 % (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) (Sigma) in FCS (Biochrome)
Entfärbelösung	50 % (v/v) Methanol (Sigma), 7 % (v/v) Essigsäure (Carl Roth)
FACS Puffer	1 % FCS (Biochrome), PBS (s. u.) gegebenenfalls wurde der Puffer mit einer 1:6.000 Verdünnung an TO-PRO [®] -3 Iodide (1 mM in DMSO, Life Technologies [™]) versetzt
Harnstoff-Elutions-Puffer (pH 8,0)	6 M Harnstoff (Merck), 50 mM NaH ₂ PO ₄ (Carl Roth), 300 mM NaCl (Carl Roth), 250 mM Imidazol (Merck)
Harnstoff-Lyse-Puffer (pH 8,0)	6 M Harnstoff (Sigma), 50 mM NaH ₂ PO ₄ (Carl Roth), 300 mM NaCl (Carl Roth), 10 mM Imidazol (Merck)
Harnstoff-Wasch-Puffer (pH 8,0)	6 M Harnstoff (Sigma), 50 mM NaH ₂ PO ₄ (Carl Roth), 300 mM NaCl (Carl Roth), 20 mM Imidazol (Merck)
IB-Puffer	8 M Harnstoff (Sigma), 50 mM 2-(<i>N</i> -Morpholino)ethansulfonsäure (pH 6,5) (Merck), 0,1 mM ETDA (Merck), 0,1 mM DTT (Sigma)
IB-Wasch-Puffer	0,2 M NaCl (Carl Roth), 1 % Desoxycholsäure (w/v) (Sigma), 1 % IGEPAL [®] -CA-630 (v/v) (Sigma), 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) (Sigma), 2 mM EDTA (Merck)
Injektionspuffer (pH 4,2)	3 mM Guanidiniumchlorid (Merck), 10 mM Natriumacetat (Sigma), 10 mM EDTA (Merck)
Laufpuffer	90 mM Tris-HCl (Sigma), 90 mM Borsäure (Sigma), 2 mM EDTA (Merck)
LB Agar	LB Medium mit 1,5 % (w/v) Bacto [™] Agar (BD), autoklaviert, mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma) versetzt und in sterile Plastikschalen gegossen
LB Medium	0,1 % (w/v) NaCl (Carl Roth), 0,05 % (w/v) Hefeextrakt (BD), 0,1 % (w/v) Bacto [™] Tryptone (BD), autoklaviert; gegebenenfalls wurde das Medium mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma) (= LB _{Amp} Medium) oder mit 1 % Glukose (Merck) versetzt
Lösung A:	0,2 M NaOH (Merck), 2,5 % (w/v) SDS (Carl Roth), 0,025 % (w/v) CuSO ₄ x 5H ₂ O (Merck), 0,05 % Na-Tartrat (AppliChem), 2,5% (w/v) Na ₂ CO ₃ (Merck)
Lyse-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0) (Sigma), 25 % Saccharose (w/v) (Merck), 1 mM EDTA (Merck)
Lysozym-Puffer	10 mg/ml Lysozym (Sigma) in Lyse-Puffer
PBS	150 mM NaCl (Carl Roth), 8,4 mM Na ₂ HPO ₄ (Merck), 2 mM NaH ₂ PO ₄ (Merck)
Rückfaltungspuffer (pH 8,0)	100 mM Tris-HCl, 0,4 mM L-Arginin, 5 mM reduziertes Glutathion, 0,5 mM oxidiertes Glutathion, 100 mM PMSF (gelöst in 2-Propanol; alle Sigma), 2 mM EDTA (Merck)
SDS-Auftragspuffer (reduzierend, 3 x)	0,15 M Tris-HCl (pH 6,8) (Sigma), 15 % (w/v) SDS (Carl Roth), 5 % (v/v) Glycerin (Carl Roth), 6 % (v/v) β-Mercaptoethanol (Merck), 0,01 % (w/v) Bromphenolblau (Merck)
SDS-Auftragspuffer (nicht-reduzierend, 5 x)	0,2 M Tris-HCl (pH 6,8) (Sigma), 7,5 % (w/v) SDS (Carl Roth), 20 % (v/v) Glycerin (Carl Roth), 0,02 % (w/v) Bromphenolblau (Merck)
Stopp-Lösung	10 % FCS (Biochrome) in RPMI-1640 (Sigma)
Triton-EDTA-Lösung	0,5 % Triton X-100 (Carl Roth), 1 mM EDTA (Merck)
Trypanblau-Lösung	0,1 % <i>Trypan Blue Solution</i> (Sigma), 1 x PBS (Invitrogen)

2.1.3 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen, Messpipetten, Reaktionsgefäße sowie Zentrifugenröhrchen wurden von den Firmen BD, Beckman Coulter, Eppendorf, Corning Inc. (Corning, USA) und Biozym bezogen. Um die Adsorption von Proteinen und DNA an Gefäßwände zu reduzieren, wurden Pipettenspitzen bzw. Reaktionsgefäße mit *low binding* Oberflächen-Technologie von Biozym bzw. Eppendorf verwendet. Filterspitzen wurden eingesetzt, wenn Kontaminationen mit Aerosol gebundener DNA vermieden werden sollten.

2.1.4 Reagenzien und kommerzielle Kits

In Tabelle 3 werden die Reagenzien und kommerziell erhältlichen Kits unter Angabe des Herstellers aufgelistet, die innerhalb dieser vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 3: Verwendete Reagenzien und kommerzielle Kits

Bezeichnung	Hersteller
Agencourt [®] AMPure [®] XP <i>AseI</i> (10.000 U/ml)	Beckman Coulter NEW ENGLAND BioLabs (NEB, Ipswich, USA)
DEPC behandeltes H ₂ O	Invitrogen
dNTP (10 mM)	Qiagen (Venlo, NL)
<i>EcoRI</i> -HF [®] (20.000 U/ml)	NEB
FuGENE [®] HD Transfection Reagent	Promega (Madison, USA)
iProof [™] High-Fidelity Master Mix	Bio-Rad
KAPA HiFi HotStart ReadyMix PCR Kit	peqlab (Erlangen, D)
<i>MfeI</i> (10.000 U/ml)	NEB
MinElute [™] Gel Extraction Kit	Qiagen
Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go! [®] Kit	eBioscience (San Diego, USA)
<i>NdeI</i> (20.000 U/ml)	NEB
Nextera [®] Index Kit (96 indexes)	Illumina (San Diego, USA)
NuPAGE [®] MOPS SDS Running Buffer (20 x)	Invitrogen
PBS, pH 7,4	Invitrogen
pcDNA [™] 3.1 Directional TOPO [®] Expression Kit	Invitrogen
PCR Puffer (10x)	Roche (Basel, CH)
QIAamp [®] DNA Mini Kit	Qiagen
QIAprep [®] Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick [®] PCR Purification Kit	Qiagen
QuantiTect [®] Multiplex PCR Kit	Qiagen
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Roche
SE Cell Line 4D-Nucleofector [®] X Kit L	Lonza (Basel, CH)
SeeBlue [®] Plus2 Pre-stained Protein Standard	Invitrogen
Streptavidin, R-Phycoerythrin Conjugate (SAPE) (1 mg/ml)	Life Technologies [™]
T4 DNA Ligase (1 U/μl)	Invitrogen
T4 DNA Ligase Puffer (5 x)	Invitrogen
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Roche
Trypsin EDTA (1x) (0,05 %/0,025 % in PBS)	GE Healthcare (Chalfont St Giles, GB)

2.1.5 Synthetische Peptide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten synthetischen Peptide wurden von Thermo Fisher (Unterelchingen, D) mittels Fmoc-Festphasen-Technologie synthetisiert und mittels HPLC gereinigt. Die Peptide wurden mit einer Reinheit von > 95 % in lyophilisierter Form bezogen und ihre Aminosäuresequenzen werden in Tabelle 4 aufgelistet. Abweichend davon wies das Peptid *T-lymphotrophic virus-2 protein* (11-19) (TAX(11-19)), das in Rückfaltungsexperimenten verwendet wurde, eine Reinheit von > 85 % auf. Ferner wurde das Peptid Flu(58-66) von Stephan Übel am MPI für Biochemie in Martinsried zur Verfügung gestellt. Die Peptide wurden entsprechend ihrer Löslichkeit in H₂O oder DMSO gelöst.

Tabelle 4: Verwendete synthetische Peptide

Bezeichnung	Aminosäuresequenz
DMXL2(813-820)	LIGEVFNI
DMXL2(812-820)	KLIGEVFNI
M-DMXL2(813-820)	MLIGEVFNI
EML5(997-1004)	MEGEVWGL
EML5(996-1004)	HMEGEVWGL
M-EML5(997-1004)	MMEGEVWGL
Flu(58-66)	GILGFVFTL
Mimo1	LIGEVFVL
M-Mimo1	MLIGEVFVL
Mimo2	LVGEVWGL
M-Mimo2	MLVGEVWGL
Mimo3	LLGEVFEL
M-Mimo3	MLLGEVFEL
GPCPD1(15-22)	LPGEVF AI
GPCPD1(14-22)	LLPGEVF AI
M-GPCPD1(15-22)	MLPGEVF AI
NCAN(257-264)	LGGEVFYV
NCAN(256-264)	ELGGEVFYV
M-NCAN(257-264)	MLGGEVFYV
TAX(11-19)	LLFGYPVYV

2.1.6 Primer

In Tabelle 5 werden die Primer sowie ihre Nukleotidsequenzen aufgelistet, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden. Alle Primer wurden von Metabion (Martinsried, D) in gelöster Form mit einer Konzentration von 100 pmol/ μ l bezogen.

Tabelle 5: Verwendete Primer

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
81-for	5´-GAACTAAACCATGGCCAAGC-3´
81-rev	5´-GCTACAATCAACAGCATCCC-3´
A02- <i>AseI</i> -for	5´-CGCGCATTAATATGGGCTCTCACTCCATGAGG-3´
β_2 m- <i>MfeI</i> -rev	5´-GCGCCAATTGTTACATGTCTCGATCCCCTT-3´
β_2 m- <i>NdeI</i> -for	5´-CGCGCCATATGATGATCCAGCGTACTCCAAAGATTC-3´
HLA-avi-rev	5´-GCGCGAATTCTCATTCGTGCCATTCGATTTTCTGAGCCTCGAAGATGTCGTTC AGGCCCCCGGGAGCTCCTCGAGAGAGCCCTCCCATCTCAGGGTGAGG-3´
Illu-for	5´-ACACUGACGACATGGUTCTACGAGUNNNNNUNNNUNNNNUCTTCACTAUAGGG AGACCCAAGC-3´
Illu-rev	5´-ACGGUAGCAGAGACTUGGTCGAUAGGCTUACCUTCGAAGG-3´
Nextera-for	5´-TCGTCCGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGACACTGACGACATGGTTCTA C-3´
Nextera-rev1	5´-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGTCGCCTTAACGGTAGCAGA GACTTGGTC-3´
Nextera-rev2	5´-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGCTAGTACGACGGTAGCAGA GACTTGGTC-3´
Nextera-rev3	5´-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGCTCAGGAACGGTAGCAGA GACTTGGTC-3´
P5	5´-AATGATACGGCGACCACCGA-3´
P7	5´-CAAGCAGAAGACGGCATAACGA-3´
pcDNA-2 nd -for- TOPO	5´-CACCTCCGGCGCGCCACCATG-3´
pcDNA-for1	5´-CACTGCTTACTGGCTTATCG-3´
pcDNA-rev3	5´-TGGTGATGGTGATGATGACC-3´
T7 Prom	5´-TAATACGACTCACTATAGGG-3´
T7 Term	5´-GCTAGTTATTGCTCAGCGG-3´

2.1.7 Plasmide

Die innerhalb der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide sind unter Angabe ihrer Eigenschaften und Herkunft in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Größe	Resistenzgene	Anwendung	Herkunft
□ ₂ m-pET-21c(+)	5,7 kb	amp ^R	Expression von □ ₂ m in <i>E. coli</i>	Siehe 2.2.9
□ ₂ m-pHSE	9,1 kb	amp ^R , neo ^R	Template für die □ ₂ m kodierende Sequenz	K. Dornmair
HLA-A2-pET-21c(+)	6,3 kb	amp ^R	Expression von HLA-A2 in <i>E. coli</i>	Siehe 2.2.9
HLA-A2-pHSE	9,2 kb	amp ^R , neo ^R	Template für die HLA-A*02:01 kodierende Sequenz; Expression von HLA-A2 in COS-7 Zellen	K. Dornmair
MR1-pHSE	10,2 kb	amp ^R , neo ^R	Expression von MR1 in COS-7 Zellen	K. Dornmair
pcDNA-GPCPD1(15-22)	5,1 kb	amp ^R , bls ^R	Expression des Peptids GPCPD1(15-22) in COS-7 Zellen	K. Dornmair
pcDNA-PLP(45-53)	5,1 kb	amp ^R , bls ^R	Expression des Peptids PLP(45-53) in COS-7 Zellen	K. Dornmair
pcDNA-sGFP	5,1 kb	amp ^R , bls ^R	Expression von sGFP in COS-7 Zellen	K. Dornmair
pcDNARc-spacer	7,6 kb	amp ^R , bls ^R	Transfektionskontrolle für COS-7 Zellen	K. Dornmair
PECPL 8X*	5,1 kb	amp ^R , bls ^R	PECPL, kodiert für acht Aminosäuren lange Peptide mit zufälliger Zusammensetzung; siehe Abbildung 7	K. Dornmair
PECPL 9X*	5,1 kb	amp ^R , bls ^R	wie PECPL 8X, kodiert jedoch für neun Aminosäure lange Peptide mit zufälliger Zusammensetzung	K. Dornmair
pET-21c(+)	5,4 kb	amp ^R	Expressionsvektor für die Klonierung von □ ₂ m- und HLA-A2-pET-21c(+)	Novagen
pQE-30-His6-GPCPD(1-118)-V5	3,5 kb	amp ^R	Expression von GPCPD1(1-118) in <i>E. coli</i>	K. Dornmair

* PECPL 8X bzw. 9X (X= Aminosäure) wurden wie beschrieben generiert, indem die nachfolgenden Sequenzen, die für randomisierte oktamerer bzw. nonamerer Peptide kodieren, in das *AscI/NotI* verdaute Plasmid pcDNARc-spacer eingefügt wurden (Siewert et al., 2012). Bei der Klonierung verwendete Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme wurden angegeben.

PECPL 8X: GGCGCGCCACCATG(NNK)₈TGAGCGGCCCGC

PECPL 9X: GGCGCGCCACCATG(NNK)₉TGAGCGGCCCGC

mit N=A,T,G oder C; K=G oder T; *AscI*; *NotI*.

2.1.8 Zelllinien

Eukaryotische Zelllinien, die innerhalb dieser vorliegenden Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 7 angegeben. Darüber hinaus werden die Herkunft der verwendeten Zellen sowie ihre jeweiligen Eigenschaften angegeben.

Tabelle 7: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
58-2D1-CD8-sGFP	58 \square \square Zellen, die den dualen TZR 2D1 (V \square 2J \square 21- und V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7), die humane CD8 \square - und \square -Kette sowie sGFP unter der Kontrolle des NFAT Promoters stabil exprimieren. Infolge einer Aktivierung des TZR exprimieren die Zellen sGFP und sekretieren IL-2 in den Zellkulturüberstand.	K. Dornmair
58-V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7-CD8	58 \square \square Zellen, die den TZR V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7 sowie die humane CD8 \square - und \square -Kette stabil exprimieren. Infolge einer Aktivierung des TZR sekretieren die Zellen IL-2 in den Zellkulturüberstand.	M. Friese
58-V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7-CD8	58 \square \square Zellen, die den TZR V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7 sowie die humane CD8 \square - und \square -Kette stabil exprimieren. Infolge einer Aktivierung des TZR sekretieren die Zellen IL-2 in den Zellkulturüberstand.	M. Friese
58-V \square 3S1-V \square 13S1-CD8-sGFP	58 \square \square Zellen, die den TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 sowie die humane CD8 \square - und \square -Kette stabil exprimieren. Infolge einer Aktivierung des TZR sekretieren die Zellen IL-2 in den Zellkulturüberstand.	K. Dornmair
58-JM22-CD8-sGFP	58 \square \square Zellen, die den TZR JM22 (V \square 10.1J \square 42-V \square 17J \square 2.7), die humane CD8 \square - und \square -Kette sowie sGFP unter der Kontrolle des NFAT Promoters stabil exprimieren. Infolge einer Aktivierung des TZR exprimieren die Zellen sGFP.	K. Dornmair
58-B7-CD8-sGFP	58 \square \square Zellen, die den TZR B7 (V \square 17.2J \square 54-V \square 12.3J \square 2.7), die humane CD8 \square - und \square -Kette sowie sGFP unter der Kontrolle des NFAT Promoters stabil exprimieren. Infolge einer Aktivierung des TZR exprimieren die Zellen sGFP und sekretieren IL-2 in den Zellkulturüberstand.	K. Dornmair
58-J \square 58-CD8-sGFP	58 \square \square Zellen, die den TZR V \square 7.2J \square 58-V \square 1 \square 2.3, die humane CD8 \square - und \square -Kette sowie sGFP unter der Kontrolle des NFAT Promoters stabil exprimieren. Infolge einer Aktivierung des TZR exprimieren die Zellen sGFP.	K. Dornmair
COS-7	Adhärente Zelllinie aus Nierenzellen afrikanischer Grünmeerkatzen, die mit SV40 transformiert wurden.	ATCC [®] CRL-1651 [™] und DSMZ
COS-7-A2	COS-7 Zellen, die das HLA-A*02:01 stabil exprimieren.	K. Dornmair
COS-7-A3	COS-7 Zellen, die das HLA-A*03:01 stabil exprimieren.	K. Dornmair
COS-7-C6	COS-7 Zellen, die das HLA-C*06:02 stabil exprimieren.	K. Dornmair

2.2 DNA basierte Methoden

2.2.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden durch Agarose-Gelelektrophorese gemäß ihrer Größe in einer Gelmatrix aufgetrennt. Abhängig von der erwarteten Größe entsprechender DNA-Fragmente wurden 0,9-2,5 % (w/v) Agarose (Biozym) in 1 x TBE Puffer durch Erhitzen gelöst. Um eine Detektion der DNA-Fragmente unter UV-Licht zu ermöglichen, wurde die Agarose-Lösung mit einem DNA-interkalierenden und UV-absorbierenden Farbstoff versetzt. Dazu wurde die Agarose-Lösung, bevor sie in die entsprechende Elektrophoreseapparatur (Volumen: 40 und 200 ml) gegossen wurde, mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid (Carl Roth) oder mit peqGREEN (peqlab) gemäß Herstellerangaben versetzt. Zu den DNA-Proben wurde ein entsprechendes Volumen an 6 x DNA Auftragspuffer hinzugefügt, bevor sie auf die Agarose-Gelmatrix aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte in Laufpuffer bei 120 V für 40 ml bzw. 180 V für 200 ml Gele für 30 bis 60 min. Die Größe der DNA-Fragmente wurde bestimmt, indem 50 bp (peqlab) und 1 kbp DNA-Längenstandards (NEB) parallel mitgeführt wurden.

2.2.2 DNA-Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentration von DNA-Proben wurde gemäß dem Absorptionsmaximum der DNA bei 280 nm unter Verwendung eines UV/Vis-Spektrometers bestimmt. Darüber hinaus wurde die Konzentration teilweise nach Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese abgeschätzt, indem die Intensität der jeweiligen Bande unter einem UV-Transilluminator mit der eines mitgeführten DNA-Standards in Relation gesetzt wurde (2.2.1).

2.2.3 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

PCR-Produkte sowie durch Restriktionsenzyme geschnittene Plasmide wurden nach Durchführung einer Agarose-Gelelektrophorese (2.2.1) mit einem Skalpell unter einem UV-Transilluminator aus der Gelmatrix ausgeschnitten. Die DNA-Fragmente wurden aus der Gelmatrix unter Verwendung des MinEluteTM Gel Extraction Kit gemäß Herstellerangaben extrahiert. Die Elution erfolgte dabei im Allgemeinen mit 12 µl EB Puffer. Die Proben für NGS wurden dagegen in 20 µl EB Puffer eluiert.

2.2.4 Reinigung von DNA-Fragmenten

PCR-Produkte sowie durch Restriktionsenzyme geschnittene DNA-Fragmente wurden mit dem QIAquick[®] PCR Purification Kit gemäß Herstellerangaben gereinigt. PCR-

Produkte für NGS wurden mit Agencourt[®] AMPure[®] XP *beads* im Volumenverhältnis von 1:1 gemäß Herstellerangaben gereinigt. Abweichend davon wurde in den Waschsritten 80%iger Ethanol verwendet.

2.2.5 Präzipitation von DNA durch Ethanol

Geringe DNA-Mengen aus Ligationsansätzen wurden mit Ethanol präzipitiert. Die Ligationsansätze wurden zunächst mit 20 µg Glykogen (Roche) als Träger-DNA sowie mit 2 µl Pellet Paint[®] Co-Precipitant (Merck) zur Färbung des Präzipitats versetzt. Anschließend wurden die Proben mit 1/10 Volumen an 3 M Natriumacetat (Merck) gemischt, bevor die Präzipitation durch Zugabe des 2,5 fachen Volumens an Ethanol (absolut, Sigma) und einer Inkubation von 30 min bei -80 °C erfolgte. Nach Zentrifugation der Ansätze bei 4 °C, 20.817 x g für 1 h wurden die DNA-Sedimente zweimal mit jeweils 200 µl Ethanol (80 %) gewaschen, um mitgefällte Salze zu entfernen. Die gewaschenen DNA-Sedimente wurden an der Luft getrocknet und mit 2 µl H₂O resolubilisiert.

2.2.6 Mutagenese-PCR

Für die Klonierung der Plasmide β_2m - sowie HLA-A2-pET21c(+) wurden die jeweiligen Sequenzen, die für β_2m sowie für die zytoplasmatische Domäne des HLA-A2-Moleküls kodieren (2.2.9), durch eine Mutagenese-PCR N- und C-terminal mit den Erkennungssequenzen für *NdeI/MfeI* (β_2m) bzw. *AseI/EcoRI* (HLA-A2) verlängert. Die Sequenz der zytoplasmatischen HLA-Domäne wurde dabei zudem C-terminal durch einen GS Linker mit einer BirA Biotinylierungssequenz (LERAPGGLNDIFEAQKIEW HE) verbunden. Als Template für die Sequenzen, die für die beiden Proteine kodieren, dienten die Plasmide β_2m - und HLA-A2-pHSE. Der Ansatz der Mutagenese-PCR enthielt 0,5 µg Template, 1 x PCR Puffer, 200 µM dNTPs, 5 U Taq Polymerase sowie 0,5 µM der nachfolgenden Primer: β_2m -*NdeI*-for/ β_2m -*MfeI*-rev für β_2m bzw. A02-*AseI*-for/HLA-avi-rev für HLA-A2 (finales Volumen: 100 µl). Die Amplifizierung erfolgte unter den nachfolgenden Bedingungen: 3 min bei 94 °C für einen Zyklus; 1 min bei 94 °C, 1 min bei 56 °C und 1 min 30 sec bei 72 °C für 30 Zyklen; 10 min bei 72 °C für einen Zyklus.

2.2.7 Enzymatischer Verdau von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente oder Plasmide wurden mit Restriktionsenzymen von NEB gemäß Herstellerangaben geschnitten. Um Star-Aktivität zu verhindern, erfolgte der Verdau bei

37 °C für höchstens 16 h. Die beiden Restriktionsschnittstellen der Mutagenese-PCR-Produkte (2.2.6) sind > 100 bp voneinander lokalisiert, sodass ein gleichzeitiger Verdau mit den entsprechenden Restriktionsenzymen erfolgte. Der Expressionsvektor pET-21c(+) wurde zunächst mit *EcoRI*-HF[®] und nach Hitzeinaktivierung (65 °C für 20 min) mit *NdeI* geschnitten. Die geschnittenen DNA-Fragmente wurden anschließend gereinigt (2.2.3 und 2.2.4).

2.2.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Die gereinigten und *NdeI/MfeI*- bzw. *AseI/EcoRI*-geschnittenen Mutagenese-PCR-Produkte von β_2m bzw. HLA-A2 wurden im molaren Verhältnis von 3:1 in den gereinigten *NdeI/EcoRI*-linearisierten Expressionsvektor pET-21c(+) ligiert (2.2.7). Die Ligation erfolgte mit der T4 DNA Ligase gemäß Herstellerangaben. Hierfür wurden 100 ng dephosphorylierter Vektor in einem 20 μ l Ligationsansatz eingesetzt und 30 min bei RT inkubiert. Der Vektor wurde mit dem Rapid DNA Dephos & Ligation Kit gemäß Herstellerangaben dephosphoryliert, um mögliche Eigenligationen des Vektors zu reduzieren.

2.2.9 Klonierung von HLA-A2- und β_2m -pET-21c(+)

Für die Rückfaltung von Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen wurden die Sequenzen, die für β_2m sowie für die zytoplasmatische Domäne des HLA-A2-Moleküls (Aminosäuren 1 bis 275) kodieren, aus den Plasmiden β_2m - sowie HLA-A2-pHSE erhalten und in den Expressionsvektor pET-21c(+) eingefügt (Sequenzen siehe Appendix I). Die Sequenz der zytoplasmatischen HLA-Domäne wurde dabei zudem C-terminal durch einen GS Linker mit einer BirA Biotinylierungssequenz verbunden. Hierfür erfolgten Mutagenese-PCR mit den A02-*AseI*-for/HLA-avi-rev bzw. β_2m -*NdeI*-for/ β_2m -*MfeI*-rev Primer (2.2.6). Die gereinigten PCR-Produkte wurden mit den Restriktionsenzymen *AseI/EcoRI* (HLA-A2) bzw. *NdeI/MfeI* (β_2m) geschnitten und erneut gereinigt, bevor sie in den dephosphorylierten, *NdeI/EcoRI*-geschnittenen Expressionsvektor pET-21c(+) ligiert wurden (2.2.7 und 2.2.8). Die beiden dabei erhaltenen Plasmide wurden mittels Hitzeschock in One Shot[®] BL21(DE3) *E. coli* (Invitrogen) transformiert (2.3.1). Die Sequenz der beiden Plasmide wurde mittels Sanger-Sequenzierung unter Verwendung der T7 Prom und T7 Term Primer bestätigt (2.2.12). Die Plasmid-DNA wurde hierfür aus den *E. coli*-Kulturen isoliert (2.2.11).

2.2.10 DNA Isolierung von transfizierten und nicht transfizierten COS-7 Zellen

Die DNA von transfizierten und nicht transfizierten COS-7 Zellen wurde mit dem QIAamp[®] DNA Mini Kit gemäß Herstellerangaben isoliert. Die Elution der DNA erfolgte in AE Puffer, sodass eine finale Zellkonzentration von 5.000 Zellen/µl vorlag. Für die weitere Verwendung wurden die Proben 1:10 in DEPC behandeltem Wasser verdünnt.

2.2.11 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* Zellen

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*-Kulturen (Volumen: 2 ml) erfolgte gemäß Herstellerangaben mit dem QIAprep[®] Spin Miniprep Kit, das auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht.

2.2.12 Sequenzierung von DNA-Proben

Die Sequenzierung von DNA-Proben erfolgte von dem Sequenzierservice der LMU München an der Fakultät für Biologie unter Anwendung des Protokolls „*Cycle, Clean & Run (BigDye v3.1)*“. Die dabei erhaltenen Sequenzen wurden mit der Software „Chromas Lite 2.1.1“ von Technelysium Pty Ltd. (South Brisbane, AU) analysiert. NGS erfolgte von IMG M Laboratories GmbH (Martinsried, D) unter Verwendung des „Illumina MiSeq[®] next generation sequencing system“ sowie der „2 x 150 bp paired end v2 read chemistry“. Dafür wurden die drei zu analysierenden Proben nach Quantifizierung und Qualitätskontrollen durch IMG M Laboratories GmbH äquimolar vereinigt. 3 pM des vereinigten Ansatzes wurden mit 20 % PhiX *control library* versetzt, bevor der Ansatz auf die MiSeq[®] *flow cell* geladen wurde und die Sequenzierung erfolgte.

2.3 Mikrobiologische Methoden

2.3.1 Transformation von *E. coli*

2.3.1.1 Transformation durch Hitzeschock

Die Plasmide HLA-A2- und \square_2 m-pET-21c(+) wurden durch Hitzeschock in „One Shot[®] BL21(DE3) *E. coli* cells“ (Invitrogen) transformiert. Dazu wurden die *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Ligationsansatz (2.2.8) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min auf Eis erfolgte der Hitzeschock der Bakterien für 30 sec bei 42 °C im Wasserbad. Die Zellen wurden für weitere 2 min auf Eis inkubiert, bevor 250 µl S.O.C. Medium (Invitrogen) hinzugefügt wurden. Die transformierten Bakterien wurden für

1 h bei 37 °C im Schüttelinkubator inkubiert und anschließend auf LB Agar bei 37 °C kultiviert.

Das Plasmid pQE-30-His6-GPCPD(1-118)-V5 wurde in „MAX Efficiency[®] DH5 α F'IQ[™] Competent Cells“ (Invitrogen) transformiert. Der Hitzeschock erfolgte dabei wie zuvor beschrieben.

2.3.1.2 Transformation durch Elektroporation

„ElectroMAX[™] DH10B[™] T1 Phage-Resistant Competent Cells“ (Invitrogen) wurden mit präzipitierten Ligationsansätzen durch Elektroporation transformiert. Hierzu wurden die *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und 20 μ l der Bakterien zu 2 μ l resolubilisiertem Ligationsansatz (2.2.8) hinzugefügt. Der Transformationsansatz wurde dann in eine vorgekühlte Gene Pulser[®] Elektroporationsküvette mit 0,1 cm Elektrodenabstand (Bio-Rad) überführt. Die Transformation erfolgte mit dem Gene Pulser[®] (Bio-Rad) unter den nachfolgenden Bedingungen: 2,0 kV, 25 μ F und 200 Ω . Die transformierten Zellen wurden im direkten Anschluss mit 1 ml S.O.C. Medium (Invitrogen) versetzt und im Schüttelinkubator bei 37 °C für 1 h inkubiert. Um die Anzahl an Bakterienklonen zu bestimmen, wurden zuvor definierte Volumina der Bakteriensuspensionen auf LB Agar bei 37 °C kultiviert, bevor die restliche Bakteriensuspension in 20 ml LB_{Amp} Medium über Nacht bei 37 °C kultiviert wurde.

2.3.2 Expression von HLA-A2 sowie β_2m in *E. coli*

Die Expression von HLA-A2 sowie β_2m erfolgte wie beschrieben (Altman and Davis, 2003). Einzelkolonien der transformierten BL21(DE3) *E. coli* (2.3.1.1) wurden in 5 ml LB Medium kultiviert, jeweils 500 ml LB_{Amp} Medium, 1 % Glucose wurden mit diesen beimpft, über Nacht bei 37 °C geschüttelt und anschließend bei 5.000 x g für 10 min zentrifugiert, um die Glucose zu entfernen. Die resuspendierten Zellsedimente wurden zu jeweils 37 °C warmen LB_{Amp} Medium (5 l) hinzugefügt. Nach einer Inkubation der Bakteriensuspension von ca. 30 min bei 37 °C im Schüttelinkubator (optische Dichte bei 600 nm (OD_{600 nm}): 0,6-1,0) wurde die Proteinexpression durch 1 mM Isopropylthio- β -Galaktosid (IPTG, Carl Roth) induziert. Die Bakterien wurden nach weiteren 4 h im 37 °C Schüttelinkubator durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min sedimentiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.3.3 Expression von GPCPD1(1-118) in *E. coli*

Für die Expression der Proteindomäne GPCPD1(1-118) wurden die DH5 α F'IQTM *E. coli* Bakterien, die mit pQE-30-His6-GPCPD(1-118)-V5 transformiert wurden (2.3.1.1), in 50 ml LB_{Amp} Medium, 1 % Glucose über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriensuspension wurde bei 5.000 x g für 10 min zentrifugiert, um die Glucose zu entfernen. Das Zellsediment wurde in 500 ml LB_{Amp} Medium resuspendiert und die Expression von GPCPD1(1-118) wurde nach einer Inkubation von 30 min bei 37 °C im Schüttelinkubator mit 1 mM IPTG induziert. Die Bakterienzellen wurden für 4 h bei 37 °C geschüttelt, durch Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min sedimentiert und bei -20 °C aufbewahrt.

2.4 Protein basierte Methoden

2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe erfolgte gemäß Peterson, 1977 und beruht auf der Methode von Lowry et al., 1951. 100 μ l der zu analysierenden Probe wurden mit 100 μ l Lösung A gemischt und 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde mit 50 μ l einer 1:6 Verdünnung an Folin & Ciocalteus Phenol Reagenz (Sigma) versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurden 100 μ l des Ansatzes in ein Well einer 96-Well-Platte überführt und dessen OD_{600nm} mit dem ELISA Reader bestimmt. In einem Parallelansatz wurden Proteinstandards mit definierten Konzentrationen an BSA (20, 40, 60, 80, 100, 120 sowie 140 μ g/ml; Sigma) mitgeführt, um eine Standardkurve zu erstellen. Als Blindwert wurde das Vehikel gemessen, in dem das zu analysierende Protein gelöst wurde. Der gemessene OD_{600 nm}-Wert der zu analysierenden Probe wurde anschließend in Relation zur Standardkurve gesetzt, um die Proteinkonzentration der Probe zu berechnen.

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Hierfür wurden NuPAGE[®] Novex[®] 12 % Bis-Tris Protein Gele (1.0 mm, 12 Well, 8 cm x 8 cm; Invitrogen) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x NuPAGE[®] MOPS SDS Running Buffer bei 120 V für 90 min. Das Molekulargewicht der Proteine wurde bestimmt, indem der SeeBlue[®] Plus2 Pre-stained Protein Standard parallel mitgeführt wurde. Die Auftrennung der Proteine erfolgte unter reduzierenden und nicht-reduzierenden-

den Bedingungen. Unter nicht-reduzierenden Bedingungen wurde die Probe mit 5 x nicht-reduzierenden SDS-Auftragspuffer versetzt, während sie unter reduzierenden Bedingungen mit 3 x reduzierenden SDS-Auftragspuffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung zudem bei 95 °C für 5 min inkubiert wurde. Die Proben wurden bei 20.817 x g für 5 min zentrifugiert, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

2.4.3 Proteinfärbung mit Coomassie® Brillant Blau

Für die Detektion und das Fixieren von Proteinen in der Gelmatrix nach einer SDS-PAGE wurden die Polyacrylamidgele für 30 min mit Coomassie-Färbelösung gefärbt. Unspezifische Hintergrundfärbungen wurden mit Entfärbelösung entfernt.

2.4.4 Reinigung der Proteindomäne GPCPD1(1-118) aus *E. coli*

Die Reinigung der rekombinanten Proteindomäne GPCPD1(1-118) aus DH5αF'IQTM *E. coli* Bakterien erfolgte über das N-terminale His₆-Peptid des Proteins durch Nickel-Chelat-Affinitätschromatographie gemäß dem „*The QIAexpressionTM System*“ (Qiagen). Das Bakteriensediment, das die Proteindomäne enthält (2.3.3), wurde aufgetaut und die Bakterienzellen durch Zusatz von 100 ml Harnstoff-Lyse-Puffer und einer 15-minütigen Exposition im Ultraschall lysiert. Das Lysat wurde bei 20 °C, 10.000 x g für 1 h zentrifugiert. Der Überstand, der die Proteindomäne enthält, wurde mit einer Flussrate von 1,5 ml/min auf eine Luer-Lock-Säule (1,5 x 10 cm) mit Ni-NTA-Agarose (Qiagen, Volumen: 5 ml) geladen. Die verwendete Ni-NTA-Agarose wurde zuvor mit Harnstoff-Lyse-Puffer äquilibriert. Unspezifisch gebundene Proteine wurden durch Waschen der Säule mit 50 ml Harnstoff-Wasch-Puffer entfernt. Die Elution von GPCPD1(1-118) erfolgte an der *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC)-Apparatur mit UV-Detektor durch Harnstoff-Elutions-Puffer. Hierfür wurden die beiden Pumpen der FPLC-Apparatur mit Wasser gespült, bevor eine der Pumpen mit Harnstoff-Wasch-Puffer und die andere mit Harnstoff-Elutions-Puffer gefüllt wurden. Die Säule wurde nun an das FPLC-System angeschlossen und der vorherige Waschschrift solange fortgesetzt, bis keine Detektion von unspezifisch gebundenen Proteinen bei 277 nm mit dem UV-Detektor erfolgte. Anschließend wurde die Säule mit Harnstoff-Elutions-Puffer beladen und das Eluat mit dem gewünschten Protein gesammelt, dessen Absorption am UV-Detektor verfolgt wurde. Das Eluat wurde gegen 4 M Harnstoff (Sigma) mit 2 mM DTT (Sigma) dialysiert (Spectra/Por® Dialysemembran mit Molekulargewichtsausschlussgröße (MWCO) von 12-14 kDa) und auf eine Konzentration von 1 mg/ml eingestellt.

2.4.5 Reinigung von Proteinen aus *inclusion bodies*

Die in Rückfaltungsexperimenten von Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen verwendeten Proteine HLA-A2 und β_2m wurden wie beschrieben aus *inclusion bodies* (IB) gereinigt (Nagai and Thøgersen, 1987). Hierfür wurden die Bakteriensedimente (2.3.2) in Lyse-Puffer (4 °C) resuspendiert. Die Bakterienzellen wurden durch Zugabe von Lysozym-Puffer für 30 min auf Eis lysiert. Zur Hydrolyse der DNA, die im Lysat vorlag, wurden 10 mM MgCl₂ (Merck), 1 mM MnCl₂ sowie 10 µg/ml DNaseI (beide Sigma) zu dem Lysat hinzugefügt. Nach einer Inkubation von 30 min auf Eis wurde IB-Wasch-Puffer hinzugegeben und der Ansatz zweimal bei 5.000 x g für 10 min zentrifugiert. Membranbestandteile, die neben den IB in den Sedimenten enthalten waren, wurden durch zweimaliges Waschen mit Triton-EDTA-Lösung und anschließender Zentrifugation bei 5.000 x g für 10 min entfernt. Das Sediment mit den IB wurde wie beschrieben in IB-Puffer gelöst und für 30 min bei 150.000 x g zentrifugiert (Garboczi et al., 1992). Die dabei erhaltenen Protein-Lösungen wurden teilweise gegen 8 M Harnstoff (Sigma), 10 mM EDTA (Merck), 25 mM MES, pH 6,0 (Merck) mit 2 mM DTT (Sigma) und anschließend gegen denselben Puffer mit 0,1 mM DTT jeweils über Nacht bei RT dialysiert (Spectra/Por[®] Dialysemembran, MWCO: 12-14 kDa). Die Protein-Lösungen wurden bei -80 °C aufbewahrt.

2.4.6 Rückfaltung von Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen

Die Rückfaltung der heterotrimeren Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexe wurde wie beschrieben durchgeführt (Altman and Davis, 2003) und erfolgte durch Verdünnung von denaturiertem HLA-A2 und β_2m (2.4.5) in Rückfaltungspuffer in Gegenwart des entsprechenden Peptids. Hierfür wurden zunächst 24 µg/ml β_2m und anschließend 31 µg/ml HLA-A2 (beide in Injektionspuffer aufgenommen) zu 4 °C gekühltem Rückfaltungspuffer hinzugefügt, der 10 µg/ml Peptid enthielt. Der Rückfaltungsansatz wurde für 24 h bei 4 °C inkubiert, bevor erneut die gleiche Menge an HLA-A2 hinzugesetzt wurde. Nach ca. 40 h bei 4 °C wurde der Rückfaltungsansatz anschließend bei 4 °C, 200.000 x g für 1 h zentrifugiert, um präzipitiertes Protein zu entfernen. Der Überstand mit rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen wurde mittels der Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheit „Amicon[®] Ultra-15“ (Ultracel[®]-10K, Merk Millipore) auf ein Volumen von ca. 0,5-2 ml konzentriert. HLA-A2: β_2m -Komplexe wurden in Gegenwart der folgenden Peptide rückgefaltet: GPCPD1(15-22), DMXL2(813-820), EML5(997-1004), NCAN(257-264), M-GPCPD1(15-22), M-DMXL2(813-820), M-EML5(997-

1004) sowie M-NCAN(257-264). Als Kontrolle wurden die beiden HLA-A2 bindenden Peptide Flu(58-66) sowie TAX(11-19) mitgeführt.

2.4.7 Enzymatische Biotinylierung von Peptid:HLA-A2: β_2 m-Komplexen

Die rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2 m-Komplexe (2.4.6) wurden mit der Biotin-Ligase BirA (Avidity LLC, Aurora, USA) wie beschrieben biotinyliert (Altman and Davis, 2003). Die rückgefalteten Komplexe aus 2.4.6 wurden zunächst gegen Biotinylierungspuffer dialysiert (Dialysekapseln mit Spectra/Por[®] Dialysemembran, MWCO: 12-14 kDa), bevor sie in Biotinylierungspuffer, der zusätzlich 0,4 mM Biotin (gelöst in 200 mM Tris-HCl (beide Sigma)), 5 mM ATP (Sigma) sowie 1,5 μ g/ml BirA enthielt, über Nacht bei RT inkubiert wurden. Die Ansätze wurden mittels der Zentrifugen-Ultrafiltrationseinheit „Amicon[®] Ultra-4“ (Ultracel[®]-10K, Merk Millipore) auf ein Volumen von ca. 0,5-1 ml konzentriert. Um freies Biotin und ATP zu entfernen, wurden die Proben gegen 20 mM Tris-HCl (Sigma), 150 mM NaCl (Carl Roth), pH 8,0 über Nacht bei 4 °C dialysiert (Dialysekapseln mit Spectra/Por[®] Dialysemembran, MWCO: 12-14 kDa).

2.4.8 Multimerisierung von biotinylierten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2: β_2 m-Komplexen mit Streptavidin

Die Multimerisierung der biotinylierten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2: β_2 m-Komplexe erfolgte wie beschrieben, indem die biotinylierten Komplexe (2.4.7) mit PE-konjugiertem Streptavidin versetzt wurden (Altman and Davis, 2003). Abweichend davon wurde das Volumen an eingesetztem PE-konjugiertem Streptavidin so berechnet, dass biotinylierte Peptid:HLA-A2: β_2 m-Komplexe im Verhältnis von 4:1 gegenüber Bindungsstellen für Biotin vorlagen.

2.5 Methoden mit eukaryotischen Zellen

2.5.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Die in dieser vorliegenden Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien wurden in co-RPMI bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Verschieden große Gewebeskulturflaschen (BD) sowie Corning[®] Costar[®]-Flachboden-Mikrotiterplatten (Corning Inc.) wurden verwendet. Alle nachstehenden Zentrifugationsschritte mit eukaryotischen Zellen erfolgten, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C, 211 x g für 6 min.

Alle stabil transfizierten eukaryotischen Zelllinien wurden einem permanenten Antibio-

tikaselektionsdruck ausgesetzt. COS-7 Zellen, die HLA-Klasse-I-Moleküle stabil exprimieren, wurden in co-RPMI kultiviert, das 1,5 mg/ml G418-Sulfat (Invitrogen oder Santa Cruz) enthielt; 58-2D1-CD8-sGFP sowie 58-B7-CD8-sGFP Zellen wurden in co-RPMI kultiviert, das 0,8 mg/ml G418-Sulfat und 3 µg/ml Blastocidin S (Invitrogen) enthielt; 58-JM22-CD8-sGFP, 58-J□58-CD8-sGFP sowie 58-V□3S1-V□13S1-CD8-sGFP Zellen wurden in co-RPMI kultiviert, das 1,5 mg/ml G418-Sulfat, 0,3 mg/ml Hygromycin B (Invitrogen), 1 µg/ml Puromycin (Biomol) sowie 3 µg/ml Blastocidin S enthielt.

2.5.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die eukaryotischen Zellen in Einfriermedium resuspendiert und in Kryoröhrchen (Nunc[®] CryoTubes[®], 1,8 ml, Thermo Fisher Scientific) überführt. Die Zellsuspension wurde unter Verwendung eines Nalgene[®] Mr. Frosty[™] Gefrierbehälter (Thermo Fisher Scientific) langsam (1 °C/h) auf -80 °C gekühlt. Nach 48 h wurden die Zellen für die Langzeitaufbewahrung in flüssigen Stickstoff (-196 °C) überführt.

Für das Auftauen von Zellen wurden die Zellsuspensionen zügig auf RT gebracht, in 5 ml co-RPMI überführt und im direkten Anschluss zentrifugiert, um das zytotoxische DMSO des Einfriermediums vollständig zu entfernen. Das Zellsediment wurde dann in co-RPMI resuspendiert. Je nach Bedarf wurde das Kultivierungsmedium nach einer Kultivierungszeit von zwei Tagen mit Antibiotika versetzt (2.5.1).

2.5.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Lebendzellzahl wurde mittels einer Zählkammer (Neubauer Improved, Laboroptik, Lancing, GB) bestimmt. Dazu wurde ein Aliquot der Zellsuspension mit einem gleichen Volumen an Trypanblau-Lösung versetzt und in die Zählkammer überführt. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der in Zellen mit defekter Zellmembran eindringt und ihr Zytoplasma blau färbt. In lebende Zellen, die eine intakte Zellmembran aufweisen, kann sich dieser Farbstoff hingegen nicht einlagern. Die Lebendzellzahl wurde folglich durch Zählen ausschließlich farbloser Zellen unter dem Lichtmikroskop bestimmt.

2.5.4 Trypsinierung von adhärennten COS-7 Zellen

Die adhärennten COS-7 Zellen wurden mittels des proteolytischen Enzyms Trypsin von den Gefäßwänden abgelöst. Die Zellen wurden mit 1 x PBS (Invitrogen) gewaschen bevor sie mit 1 x Trypsin EDTA (4 ml/75 cm³ bzw. 10 ml/175 cm³ Kultivierungsflasche)

versetzt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei 37 °C wurde der Ansatz mit dem doppelten Volumen an Stopp-Lösung versetzt, um die Spaltung der extrazellulären Proteine durch Trypsin zu stoppen.

2.5.5 Transfektion von COS-7 Zellen mit PECPL- und HLA Plasmid-DNA

2.5.5.1 Transfektion mit FuGENE® HD

Für Aktivierungsversuche von 58-2D1-CD8-sGFP, 58-V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7-CD8 und 58-V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7-CD8 Zellen wurden COS-7-A2 und -A3 Zellen mit FuGENE® HD transient mit Plasmiden transfiziert, die für die Peptide PLP(45-53) und GPCPD1(15-22) kodieren. Dazu wurden jeweils 0,5 μ g pcDNA-PLP(45-53) bzw. pcDNA-GPCPD1(15-22) Plasmid-DNA pro Transfektionsansatz zu RPMI-1640 Medium hinzugegeben (finales Volumen: 25 μ l). Als Negativkontrolle wurde ein Transfektionsansatz parallel mitgeführt, der 0,5 μ g pcDNArc-spacer enthielt. Der jeweilige Transfektionsansatz wurde mit 1,75 μ l FuGENE® HD versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 15 min bei RT wurde dieser Ansatz zu jeweils $1,5 \times 10^5$ COS-7-A2 und -A3 Zellen hinzugegeben, die 4 h zuvor in einem Well einer 24-Well-Platte ausgesät wurden.

Die Transfektion von COS-7-C6 Zellen mit Plasmid-DNA von klonierten PECPL-Plasmiden isolierter APC oder von *subpools* erfolgte wie zuvor beschrieben.

Für die Quantifizierung der Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle wurden COS-7 Zellen gemäß Herstellerangaben mit FuGENE® HD mit PECPL- und HLA-A2-pHSE Plasmid-DNA transfiziert. Hierzu wurden 24 h vor der Transfektion 2×10^5 COS-7 Zellen/Well einer 6-Well-Platte ausgesät. Jeweils 10 ng/ μ l HLA-A2-pHSE sowie variierende Mengen an PECPL 8X Plasmid-DNA (10 ng/ μ l, 3,3 ng/ μ l, 1,0 ng/ μ l, 0,33 ng/ μ l und 0,10 ng/ μ l) wurden pro Transfektionsansatz zu RPMI-1640 Medium hinzugefügt (finales Volumen: 100 μ l). Der jeweilige Transfektionsansatz wurde mit 7 μ l FuGENE® HD versetzt, gemischt und 15 min bei RT inkubiert, bevor dieser zu den COS-7 Zellen hinzugefügt wurde. Darüber hinaus wurden Transfektionsansätze mitgeführt, die neben der HLA-A2-pHSE Plasmid- und PECPL-DNA zusätzlich Heringssperma-DNA als Träger-DNA enthielten. Die Konzentration an Träger-DNA entsprach der Differenz der eingesetzten Konzentration an PECPL-DNA im Vergleich zum ursprünglichen Standardprotokoll (10 ng/ μ l PECPL). Als Negativkontrolle wurden im Allgemeinen Transfektionsansätze ohne Zusatz von FuGENE® HD zu

den Zellen hinzugefügt. Als Transfektionskontrolle wurden Transfektionsansätze mit entsprechender Konzentration an pcDNA-sGFP Plasmid-DNA mitgeführt.

Zur Identifizierung von potentiellen Antigenen des TZR V[7.2J]58-V[1]2.3 wurden COS-7 Zellen mit FuGENE[®] HD transient mit jeweils PECPL 9X sowie mit MR1-pHSE Plasmid-DNA transfiziert. Hierfür wurden 6×10^5 COS-7 Zellen in einer 3,5 cm Kultivierungsschale in 3 ml co-RPMI ausgesät und für 4 h kultiviert. Die Transfektion erfolgte durch Zugabe eines Transfektionsansatzes, der 2 µg der entsprechenden Plasmid-DNA in 125 µl RPMI enthielt. Der Transfektionsansatz wurde mit 8,75 µl FuGENE[®] HD (Roche/Promega) versetzt, gemischt und nach einer Inkubation von 15 min zu den Zellen hinzugefügt.

Zur Identifizierung von Mimotopen des TZR V[3S1J]45.1-V[13S1J]1.1 erfolgte die Transfektion von COS-7-C6 Zellen mit 2 µg PECPL 9X wie zuvor beschrieben.

2.5.5.2 Transfektion durch Nukleofektion

Für die transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit PECPL- und HLA-A2-pHSE Plasmid-DNA durch Nukleofektion wurde die Lebendzellzahl von trypsinierten COS-7 Zellen, die 24 h zuvor gesplittet wurden, bestimmt (2.5.3 und 2.5.4). 1×10^6 COS-7 Zellen pro Ansatz wurden bei 300 x g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend vollständig abgenommen. Zu 100 µl Nukleofektor Lösung SE, die mit *supplement* versetzt wurde und RT hatte, wurden 10 ng/µl HLA-A2-pHSE und verschiedene Konzentrationen an PECPL 8X DNA (10 ng/µl, 1 ng/µl und 0,1 ng/µl) hinzugefügt. Darüber hinaus wurden Transfektionsansätze mitgeführt, die neben der HLA-A2-pHSE Plasmid- und PECPL-DNA zusätzlich mit Heringssperma-DNA als Träger-DNA versetzt wurden. Die Konzentration an Träger-DNA entsprach der Differenz der eingesetzten PECPL-Konzentration im Vergleich zum Standardprotokoll (10 ng/µl PECPL). Als Transfektionskontrolle wurden parallel Transfektionsansätze mit 10 ng/µl, 1 ng/µl und 0,1 ng/µl pcDNA-sGFP Plasmid-DNA mitgeführt. Unmittelbar vor der Nukleofektion wurden die COS-7 Zellen in der entsprechenden Nukleofektor-DNA-Lösung resuspendiert und anschließend in eine Küvette überführt, die im Nukleofektor Kit enthalten ist. Die Küvette wurde in die entsprechende Vorrichtung der 4D-Nukleofektor[®] X Unit positioniert und das Programm CM-130 durchgeführt. Nach der Nukleofektion wurde die Zell-DNA-Suspension zunächst 10 min bei RT inkubiert bevor 500 µl 37 °C warmes co-RPMI hinzugefügt wurden. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min bei RT wurde der Ansatz mit einer Plastikpipette, die im

Nukleofektor Kit enthalten ist, vorsichtig in eine 3,5 cm Kultivierungsschale überführt, die bereits 2 ml 37 °C warmes co-RPMI enthielt, und wie gewöhnlich kultiviert.

2.5.6 Bestimmung der Transfektionseffizienz transfizierter COS-7 Zellen

Zur Bestimmung der Transfektionseffizienz von FuGENE[®] HD oder Nukleofektion (2.5.5) wurden COS-7 Zellen in Parallelansätzen mit pcDNA-sGFP transfiziert und auf ihre Expression von sGFP mit einem Fluoreszenzmikroskop (2.5.11) sowie mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die Durchflusszytometrie wurden die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen, bevor sie in TO-PRO[®]-3-haltigem FACS Puffer resuspendiert und anschließend mit dem FACSVerse[™] analysiert wurden. TO-PRO[®]-3 wurde hinzugesetzt, um tote Zellen zu detektieren und um ausschließlich lebende Zellen zu analysieren. Für die Auswertung der Daten wurde das Programm FlowJoV7.6.4 (Tree Star Inc., Ashland, USA) verwendet.

2.5.7 Generierung von Makrophagen aus CD14⁺-Monozyten

Für die Generierung von Makrophagen aus CD14⁺-Monozyten wurden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*; PBMC) aus dem Blut eines HLA-A*02:01 homozygoten sowie eines HLA-A2 negativen, gesunden Spenders eingesetzt. Die verwendeten PBMC wurden hierfür freundlicherweise von Kathrin Held nach Dichtegradientenzentrifugation von Blutproben der jeweiligen Spender mit Ficoll zur Verfügung gestellt. CD14⁺-Monozyten wurden unter Verwendung von CD14 MicroBeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D) gemäß Herstellerangaben aus den PBMC isoliert. Die Differenzierung zu Makrophagen erfolgte wie beschrieben durch Stimulation mit Monozytenkolonien-stimulierenden Faktor (M-CSF) für acht Tage (Martinez et al., 2006). Hierfür wurden 1,44 x 10⁶ CD14⁺-Monozyten/Well einer 6-Well-Platte in 3 ml 37 °C warmes RPMI-1640 Medium ausgesät, das 20 % FCS und 100 ng/ml M-CSF (R&D Systems, Minneapolis, USA) enthielt.

2.5.8 Versuche zur Harnstoff-vermittelten Kreuzpräsentation von GPCPD1(1-118) durch Makrophagen

Um zu überprüfen, ob Makrophagen die Proteindomäne GPCPD1(1-118) auf die Weise prozessieren können, sodass dabei das antigene Peptid GPCPD1(14-22) entsteht, erfolgten wie beschrieben Versuche zur Harnstoff-vermittelten Kreuzpräsentation mit der Proteindomäne (Barabas et al., 2008). Hierfür wurden 2,5 x 10⁴ differenzierte HLA-A2⁺-Makrophagen (2.5.7) in einem Well einer 96-Well-Platte ausgesät, nachdem die

Zellen zuvor durch eine Inkubationszeit von 25 min auf Eis von der Kultivierungsschale abgelöst und für 10 min bei 300 x g zentrifugiert wurden. Nach 24 h wurden die Zellen über einen Zeitraum von ca. 28 h mit der Proteindomäne GPCPD1(1-118) inkubiert, die in harnstoffhaltigem Vehikel gelöst wurde (2.4.4), bevor ihr Aktivierungspotential gegenüber 6×10^4 58-2D1-CD8-sGFP Zellen analysiert wurde (finale Konzentration: 15 µg/ml). Parallel dazu wurden die Makrophagen mit dem synthetischen Peptid GPCPD1(14-22) als Positivkontrolle (finale Konzentration: 1,5 mM) sowie mit dem harnstoffhaltigem Vehikel als Negativkontrolle inkubiert. Darüber hinaus wurden HLA-A2-Makrophagen (2.5.7) in Parallelansätzen als weitere Negativkontrollen mitgeführt. Die Aktivierung von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen wurde 16 h später analysiert (2.5.9.1).

2.5.9 Aktivierungsversuche mit T-Hybridomzellen

2.5.9.1 Aktivierungsversuche mit synthetischen Peptiden

Die Validierung von potentiell antigenen Peptiden, die durch PECPL identifiziert wurden, erfolgte durch synthetisch hergestellte Peptide. Hierzu wurden zunächst 3×10^4 COS-7-A2 Zellen/Well einer 96 Well-Platte ausgesät und für 4 h kultiviert, bevor 0,5 mM der zu untersuchenden synthetischen Peptide hinzugefügt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurden 3×10^4 T-Hybridomzellen mit den COS-7-A2 Zellen kokultiviert. Die T-Hybridomzellen wurden 16 h später unter einem Fluoreszenzmikroskop auf die Expression von sGFP untersucht (2.5.11). Darüber hinaus wurde der Zellkulturüberstand auf IL-2 Sekretion mittels ELISA analysiert. Für alle Experimente wurden Nunc-ImmunoTM MaxiSorpTM 96-Well-Flachbodenplatten (Thermo Fisher Scientific) und das Mouse IL-2 ELISA Ready-SET-Go![®] Kit gemäß Herstellerangaben verwendet. Die verwendeten Zellkulturüberstände wurden so verdünnt, dass diese im linearen Bereich des mitgeführten Standards lagen.

2.5.9.2 Aktivierungsversuche mit Peptid:HLA-A2:□₂m-Komplexen

Zur Validierung von TZR Antigenen wurde das Aktivierungspotential von Peptid:HLA-A2:□₂m-Komplexen, die in einem zellunabhängigen System *in vitro* rückgefaltet wurden, gegenüber T-Hybridomzellen in Aktivierungsversuchen untersucht. Die rückgefalteten und biotinylierten Peptid:HLA-A2:□₂m-Komplexe (2.4.7) wurden in einem Well einer Streptavidin-gekoppelten Mikrotiterplatte (Pierce[®] High Sensitivity Streptavidin Coated Plates, Thermo Fisher Scientific) immobilisiert, das zuvor dreimal

mit 1 x PBS gewaschen wurde. Nach einer Inkubationszeit von 30 min bei RT wurde der Überstand abgenommen und 1×10^5 T-Hybridomzellen hinzugefügt. Die Aktivierung wurde 16 h später analysiert (2.5.9.1).

2.5.9.3 Aktivierungsversuche mit Plasmid-kodierten Peptiden

Das Aktivierungspotential von Plasmid-kodierten Peptiden gegenüber einem TZR wurde untersucht, indem COS-7-A2 und-A3 Zellen mit den Plasmiden transient mittels FuGENE[®] HD transfiziert wurden (2.5.5.1) und die Zellen 56 h nach der Transfektion mit $1,5 \times 10^5$ T-Hybridomzellen kokultiviert wurden. Die Aktivierung wurde 16 h später analysiert (2.5.9.1).

2.5.9.4 Aktivierungsversuche mit PECPL zur Identifizierung von Mimotopen

Zur Identifizierung von Plasmid-kodierten Mimotopen erfolgten die Versuche der Abschnitte 2.5.9.4.1-2.5.9.4.5 wie beschrieben (Siewert et al., 2012).

2.5.9.4.1 Identifizierung aktivierender APC

Zur Detektion von APC, die das Plasmid-kodierte Mimotop exprimieren und aufgrund dessen die T-Hybridomzellen aktivieren, wurden COS-7 und COS-7-C6 Zellen transient mit FuGENE[®] HD transfiziert (2.5.5.1) und 32 h und/oder 56 h nach der Transfektion mit $1,5 \times 10^6$ T-Hybridomzellen in co-RPMI oder DNase-Medium kokultiviert. Die APC wurden zuvor zweimal mit 1 x PBS gewaschen, um unspezifisch gebundene PECPL-Plasmide von der Zellmembran zu entfernen. Die Kokultur wurde 16 h später unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (2.5.11). APC, die sich in direktem Kontakt mit aktivierten T-Hybridomzellen befanden, wurden isoliert (2.5.9.4.2).

2.5.9.4.2 Isolierung aktivierender APC

Einzelne Antigen-exprimierende COS-7-C6 Zellen wurden mit Glaskapillaren (Durchmesser: 14 μ m, abgeschrägte Spitze; BioMedical Instruments, Zöllnitz, D) isoliert, die in einen Mikroinjektor (CellTram[®] vario (Eppendorf) mit Mikromanipulator LN 25 Mini Unit (Luigs & Neumann, Ratingen, D) als Steuereinheit) eingespannt waren. Die Zellen wurden unmittelbar nach ihrer Isolierung in ein Reaktionsgefäß überführt, das 7 μ l NH₃ (25 %, Sigma) enthielt, und für 5 min bei 80 °C inkubiert, um die Aktivität der DNase zu inhibieren. Die isolierten APC wurden bis zur Amplifizierung und Klonierung der Peptid-kodierenden Sequenzen ihrer PECPL-Plasmide (2.5.9.4.3) auf Eis aufbewahrt.

2.5.9.4.3 Amplifizierung und Klonierung von Peptid-kodierenden Sequenzen der PECPL-Plasmide isolierter APC

Die Amplifizierung der Peptid-kodierenden Sequenzen der PECPL-Plasmide isolierter COS-7-C6 Zellen (2.5.9.4.2) erfolgte durch PCR. Um NH_3 aus den Reaktionsgefäßen mit den isolierten Zellen zu verflüchtigen, wurden die Gefäße bei RT unter einer Werkbank für 30 min geöffnet, die zuvor mit UV bestrahlt wurde. Die Proben wurden mit PCR-Mix versetzt, sodass pro finalem Ansatz 1x iProofTM High-Fidelity Master Mix, 0,5 μM pcDNA-2nd-for-TOPO und 0,5 μM pcDNA-rev3 vorlagen (finale Volumen: 100 μl). Die Amplifizierung erfolgte unter den nachfolgenden Bedingungen: 3 min bei 98 °C für einen Zyklus; 20 sec bei 98 °C, 20 sec bei 56 °C und 30 sec bei 72 °C für 40 Zyklen; 10 min bei 72 °C für einen Zyklus. Die dabei erhaltenen PCR-Produkte wurden anschließend gereinigt (2.2.4) und jeweils 1 ng gereinigtes PCR-Produkt in den pcDNATM3.1D/V5-His-TOPO[®] Vektor des pcDNATM3.1 Directional TOPO[®] Expression Kit gemäß Herstellerangaben ligiert. Die Ligationsprodukte wurden durch Ethanol präzipitiert (2.2.5), bevor sie in den *E. coli*-Stamm DH10BTM transformiert wurden (2.3.1.2).

2.5.9.4.4 Reaktivierungsversuche mit PECPL-Plasmiden isolierter APC und subpools

Klonierte PECPL-Plasmide isolierter APC sowie *subpools* wurden auf das Vorhandensein des Plasmid-kodierten Mimotops untersucht, indem ihr Aktivierungspotential gegenüber dem TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 analysiert wurde. Hierzu wurde die Plasmid-DNA aus *subpools* (2.5.9.4.5) oder *E. coli* Zellen isoliert (2.2.11), die mit klonierten PECPL-Plasmiden isolierter APC transformiert wurden (2.5.9.4.3). COS-7-C6 Zellen wurden anschließend transient mit der isolierten Plasmid-DNA transfiziert (2.5.5.1). 32 h und 56 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit $2,5 \times 10^5$ 58-V \square 3S1-V \square 13S1-CD8-sGFP Zellen kokultiviert. Die Kokultur wurde nach 16 h auf aktivierte T-Hybridomzellen untersucht (2.5.11), die auf die Präsenz des Plasmid-kodierten Mimotops in den klonierten PECPL-Plasmiden bzw. *subpools* hinweisen.

2.5.9.4.5 Anreicherung und Identifizierung des Plasmid-kodierten Mimotops

Unter der Annahme, dass sich ein Plasmid des Plasmid-kodierten Mimotops unter den klonierten PECPL-Plasmiden isolierter APC befindet (2.5.9.4.4), wurde das Plasmid-kodierte Mimotop in sogenannten *subpools* angereichert. Ein *subpool* bestand dabei aus 30 LB_{Amp}-Flüssigkulturen, die jeweils 1/10 der ursprünglichen Anzahl der Bakterien-

klone (2.3.1.2) bzw. des vorherigen *subpools* enthielten. *Subpools* wurden auf ihr Aktivierungspotential gegenüber 58-V \square 3S1-V \square 13S1-CD8-sGFP Zellen getestet (2.5.9.3). Aktivierten PECPL-Plasmide einer Flüssigkultur den TZR, so wurde ausgehend von dieser ein weiterer *subpool* erzeugt. Die Generierung von *subpools* wurde so lange fortgeführt, bis Flüssigkulturen mit einzelnen Bakterienklonen erhalten wurden. Plasmid-DNA der positiv getesteten Flüssigkultur des Einzelklons wurde mit dem Primer pcDNA-for-1 sequenziert (2.2.12), um die Sequenz des Plasmid-kodierten Mimotops zu erhalten.

Anmerkung: Die Bestimmung der Anzahl der Bakterienklone einer Flüssigkultur, aus der ein *subpool* generiert wurde, erfolgte durch Messen der OD_{600nm}. Ab dem Erreichen von *subpools* mit einer Anzahl von \square 300 Bakterienklonen wurde für die Generierung des nachfolgenden *subpools* ein aliquoter Teil der positiv getesteten Flüssigkultur auf LB_{Amp} Agar kultiviert. Die benötigte Anzahl an Bakterienklonen der darauffolgenden Flüssigkultur wurde dadurch erhalten, indem mit einzelnen, aus LB_{Amp} Agar isolierten Klonen LB_{Amp} Medium beimpft wurde.

2.5.10 Färbung von T-Hybridomzellen mit PE-markierten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2: \square ₂m-Komplexen

Die biologische Funktionalität sowie Spezifität der PE-markierten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2: \square ₂m-Tetramere (2.4.8) wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden 3×10^5 mit FACS Puffer gewaschene 58-2D1-CD8-sGFP Zellen mit einer 1:10 Verdünnung der PE-markierten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2: \square ₂m-Tetramere in FACS Puffer für 1 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit FACS Puffer wurden die Zellen in TO-PRO[®]-3-haltigem FACS Puffer resuspendiert und anschließend mit dem FACSVerse[™] analysiert. TO-PRO[®]-3 wurde hinzugesetzt, um tote Zellen zu detektieren und um ausschließlich lebende Zellen zu analysieren. Zur Kontrolle wurden in einem Parallelansatz 58-B7-CD8-sGFP Zellen mitgeführt. Darüber hinaus wurden ungefärbte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm FlowJoV7.6.4.

2.5.11 Detektion der Expression von sGFP durch Fluoreszenzmikroskopie

Aktiviert T-Hybridomzellen sowie mit pcDNA-sGFP transfizierte COS-7 Zellen wurden auf ihre Expression von sGFP mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200 M analysiert. sGFP wurde mit einem 472/30 nm Bandpassfilter angeregt und dessen Emission mit einem 520/35 nm Bandpassfilter detektiert (BrightLine[®]

Fluorescence Filter, Semrock, Rochester, USA). Um autofluoreszierende Artefakte auszuschließen, wurde ein 545/25 nm Bandpassfilter für die Anregung und ein 605/70 nm Bandpassfilter (beide Zeiss) für die Detektion von Cy3 verwendet. Aufnahmen erfolgten mit einer Belichtungszeit von 600 ms bzw. 400 ms im grünen bzw. roten Kanal sowie mit 100 ms im Durchlicht unter Verwendung der Software „MetaMorph V6.3r6“ (Molecular Devices, Sunnyvale, USA) und wurden mit ImageJ 1.48i (NIH, Bethesda, USA) bearbeitet. Die zu analysierenden Zellen wurden in co-RPMI kultiviert, das mit phenolrothaltigen oder -freien RPMI-1640 angesetzt wurde.

2.6 Quantifizierung von PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle mittels quantitativer PCR

2.6.1 Primer Spezifitätstest

Zur Überprüfung der Spezifität der Primer, die ein 81 bp langes Amplikon im PECPL-Plasmid-Rückgrat erzeugen (siehe Abbildung 7), erfolgte eine PCR mit PECPL 8X DNA.

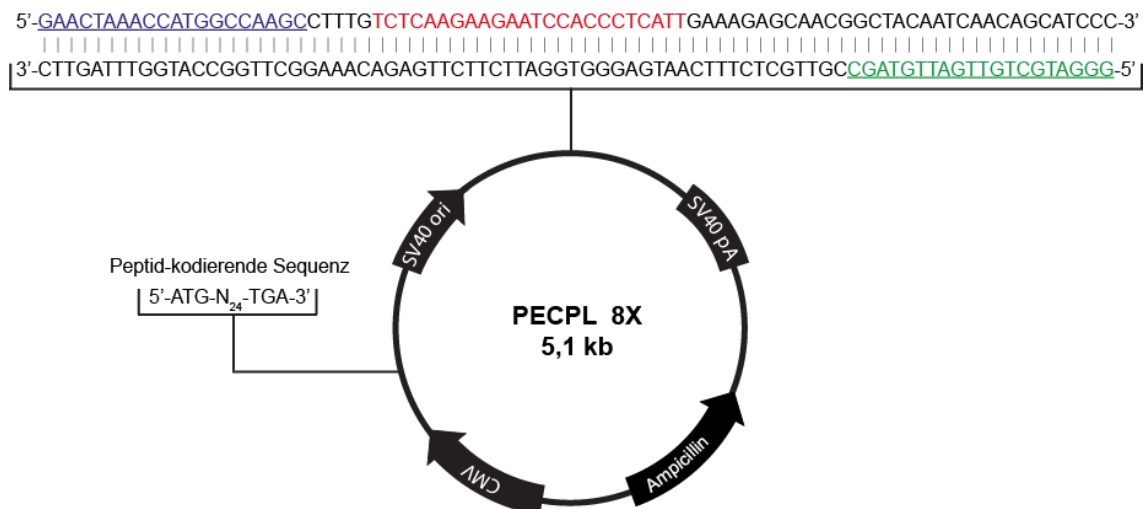


Abbildung 7: Schematische Darstellung des PECPL 8X-Plasmids, das mittels quantitativer PCR (qPCR) detektiert wird.

Die 81 bp lange Nukleotidsequenz des Amplikons wurde zur Veranschaulichung der Bindestellen der beiden Primer sowie der Sonde angegeben, die bei der qPCR eingesetzt werden (81-for: blau, 81-rev: grün, 81-FAM-BQH1: rot). Zudem wurde dargestellt, wo die Peptid-kodierende Sequenz (5'-ATG-N₂₄-TGA-3'), der SV40 Replikationsursprung (SV40 ori), das SV40 Polyadenylierungssignal (SV40 pA), das Ampicillin-Resistenzgen und der Promotor des humanen Cytomegalovirus (CMV) auf dem 5,1 kb großen PECPL-Plasmid lokalisiert sind.

Der PCR-Ansatz enthielt 30 ng PECPL 8X, 1 x PCR Puffer, 200 µM dNTPs, 5 U Taq Polymerase sowie jeweils 0,5 µM 81-for und 81-rev (finales Volumen: 100 µl). Die

Amplifizierung erfolgte unter den nachfolgenden Bedingungen: 3 min bei 94 °C für einen Zyklus; 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C und 1 min bei 72 °C für 40 Zyklen; 10 min bei 72 °C für einen Zyklus. Als Negativkontrollen wurden in einem Parallelansatz die isolierte, genomische DNA von 1×10^3 COS-7 Zellen (2.2.10) sowie HLA-A2-pHSE Plasmid-DNA anstelle der PECPL-DNA verwendet. Die PCR-Produkte der drei Ansätze wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert (2.2.1). DNA-Fragmente wurden isoliert (2.2.3) und mittels der Primer 81-for und 81-rev sequenziert (2.2.12).

2.6.2 Herstellung der PECPL-Standards

Für die Quantifizierung von PECPL-Plasmiden pro transfizierter COS-7 Zelle durch qPCR wurden PECPL-Standards mit definierter Anzahl an PECPL-Plasmiden im Bereich von 10^4 bis 10^8 PECPL-Plasmiden/ μl erstellt. Die Anzahl an PECPL-Plasmiden (N) wurde mit der nachfolgenden Gleichung berechnet:

$$N = (m \times N_A) / M;$$

mit m = Masse [g], $N_A = 6,022 \times 10^{23}$ (Avogadro-Konstante) und M = Molekulargewicht des Plasmids (hier PECPL 8X: $M = 5.142 \times 660 \text{ g mol}^{-1}$). Ausgehend von 10^9 PECPL-Plasmiden/ μl wurden serielle Verdünnungen erstellt, um die zuvor beschriebenen Standards zu erhalten. Die PECPL-Standards wurden bei einer qPCR stets mitgeführt.

2.6.3 Quantifizierung mittels qPCR

Für die Quantifizierung der Anzahl der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle wurden COS-7 Zellen durch FuGENE[®] HD oder Nukleofektion mit PECPL- und HLA-A2-pHSE Plasmid-DNA transfiziert (2.5.5). Zu definierten Zeitpunkten nach der Transfektion wurden die Zellen trypsiniert (2.5.4), viermal mit $1 \times$ PBS gewaschen, um unspezifische Plasmide, d. h. Plasmide, die von den Zellen nicht aufgenommen wurden, zu entfernen. Dazu wurden die Zellen in 1 ml $1 \times$ PBS (4 °C) resuspendiert und bei 4 °C, $612 \times g$ für 3 min zentrifugiert. Die Lebendzellzahl wurde bestimmt (2.5.3), 5×10^5 (FuGENE[®] HD) bzw. 2×10^5 (Nukleofektion) Zellen wurden erneut zentrifugiert und der Überstand bis auf ein Volumen von 200 μl abgenommen. Die Zellsedimente wurden bis zur DNA Isolierung bei -20 °C aufbewahrt. Die DNA dieser COS-7 Zellen wurde unmittelbar vor Durchführung der qPCR isoliert (2.2.10).

Die Bestimmung der PECPL-Plasmidanzahl pro transfizierter COS-7 Zelle erfolgte mittels TaqMan[™] PCR Technologie. Unter Verwendung der beiden Primer 81-for und

81-rev wurde ein 81 bp langes Fragment amplifiziert. Die Detektion der Amplifikate erfolgte über den Abbau der Sonde 81-FAM-BHQ1 (5'-Fam-TCTCAAGAAGAATCC ACCCTCATT-BHQ-1-3'; Metabion). Für die qPCR wurde die isolierte DNA, die 1×10^3 transfizierte bzw. nicht transfizierte COS-7 Zellen repräsentiert (2.2.10), mit einem qPCR-Mix versetzt, sodass pro finalem Ansatz 200 nM 81-for, 200 nM 81-rev, 200 nM 81-FAM-BHQ1, 1 x QuantiTect[®] Multiplex PCR Master Mix vorlagen (finales Volumen: 20 μ l). Negativkontrollen, die anstelle der DNA DEPC behandeltes Wasser enthielten, wurden stets mitgeführt, um eventuelle Plasmid Kontaminationen auszuschließen. Darüber hinaus wurden 10^4 bis 10^8 PECPL-Plasmide als Standards in Parallelansätzen bei jeder qPCR mitgeführt. Die Amplifizierung jedes Ansatzes erfolgte in Triplikaten mit dem Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System unter den folgenden Bedingungen: 15 min bei 95 °C für einen Zyklus; 1 min bei 94 °C und 1 min bei 60 °C für 40 Zyklen.

Die Anzahl der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle einer zu analysierenden Probe wurde bestimmt, indem der Schwellenwert-Zyklus (*cycle threshold*, Ct)-Wert der Probe in Relation zu denen des mitgeführten Standards gesetzt wurde. Hierfür wurde mit den Ct-Werten eines jeden Standards eine Standardkurve erstellt, indem die jeweiligen Ct-Werte gegen den dekadischen Logarithmus (\log_{10}) ihrer ursprünglichen Anzahl an PECPL-Plasmiden aufgetragen wurden.

Anmerkung: Um mögliche Kontaminationen mit PECPL-Plasmiden zu vermeiden, erfolgten sämtliche Schritte nach Trypsinierung der transfizierten COS-7 Zellen jeweils unter einer geschlossenen Werkbank, die zuvor mit UV Licht bestrahlt wurde. Zudem wurden aus diesem Grund die PECPL-Standards sowie alle verwendeten Reagenzien im Vorfeld aliquotiert. Um Ungenauigkeiten aufgrund des Pipettierens zu verhindern, wurden ausschließlich Volumen $\square 4 \mu$ l pipettiert.

2.7 Analyse des PECPL-Repertoires einzelner COS-7 Zellen 48 h nach Nukleofektion durch NGS

Die Analyse des PECPL-Repertoires einzelner COS-7 Zellen erfolgte 48 h nach Nukleofektion von COS-7 Zellen mit drei verschiedenen PECPL-Konzentrationen durch NGS unter Anwendung der exogenen *unique identifier* (UID)-Strategie (Kinde et al., 2011; Kivioja et al., 2011). Diese Strategie ist in 3.4.3 und Abbildung 20 dargestellt.

2.7.1 Sortierung von PECPL-transfizierten Einzelzellen

COS-7 Zellen wurden hierfür in drei Parallelansätzen transfiziert (2.5.5.2). 48 h nach der Transfektion wurden die jeweiligen Zellen trypsiniert (2.5.4) und viermal mit 1 x PBS gewaschen, um unspezifisch gebundene PECPL-Plasmide zu entfernen, bevor sie mittels eines FACS-Sorters vereinzelt wurden. Die Sortierung erfolgte von Markus Moser am MPI für Biochemie in Martinsried unter Verwendung eines FACSAria™ II (BD). Für die drei verschiedenen Transfektionsansätze wurde in 94 Wells einer 96-Well-Platte, die jeweils 6 µl 1 x PCR Puffer enthielten, jeweils eine COS-7 Zelle/Well sortiert. Als Negativkontrollen wurden jeweils zwei Wells ohne Einzelzellen mitgeführt. Die sortierten Zellen wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.7.2 Einbau der UID-Nukleotide

Der Einbau der UID-Nukleotide in die einzelnen Sequenzen der PECPL-Plasmide einer COS-7 Zelle erfolgte durch PCR mit dem Primer-Satz Illu-for/-rev. Die 3'-Enden dieses Primer-Satzes waren jeweils komplementär zur PECPL-Sequenz und die 5'-Enden enthielten definierte Nukleotidsequenzen (*tags*). Der UID wurde zwischen dem *tag* und der PECPL komplementären Sequenz des *forward*-Primer angehängt und setzte sich aus zwölf zufällig angeordneten Nukleotiden zusammen (Shugay et al., 2014). Für die PCR wurde zu den Einzelzellen ein PCR-Mix hinzugefügt, sodass pro Well final 1 x PCR Puffer, 200 µM dNTPs, 0,5 U Taq Polymerase, 0,5 µM Illu-for sowie 0,5 µM Illu-rev Primer vorlagen (finales Volumen: 10 µl). Die Amplifizierung erfolgte unter den nachfolgenden Bedingungen: 3 min bei 94 °C für einen Zyklus; 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C und 30 sec bei 72 °C für 15 Zyklen; 7 min bei 72 °C für einen Zyklus. Die einzelnen PCR-Ansätze wurden mit jeweils 10 µl H₂O versetzt und mittels Agencourt® AMPure® XP *beads* gereinigt (2.2.4). Die Elution der PCR-Produkte von den *beads* erfolgte in 40 µl H₂O.

2.7.3 Amplifizierung UID-markierter PECPL-Sequenzen

In dem darauffolgenden Schritt wurden Produkte aus der vorangegangenen PCR spezifisch mit dem Primer-Satz Nextera-for/-rev amplifiziert. Dieser Primersatz enthielt an den 3'-Enden Sequenzen, die komplementär zu den in der ersten PCR eingeführten *tags* waren. Die 5'-Enden enthielten zudem die Nextera® *transposase sequences*, die zur Einführung von Einzelzell-spezifischen Indices im nachfolgenden Schritt benötigt wurden. Zur Unterscheidung der PCR-Produkte der drei verschiedenen Transfektionsansätze (10 ng/µl, 1 ng/µl und 0,1 ng/µl PECPL-DNA) erfolgte die Amplifizierung der

PCR-Produkte einer jeden Bedingung zudem jeweils mit unterschiedlichen *reverse*-Primern, die einen definierten Barcode enthielten (Nextera-rev1: 10 ng/μl; -rev2: 1 ng/μl und -rev3: 0,1 ng/μl PECPL-DNA). Für die Amplifizierung wurden jeweils 35 μl gereinigtes PCR-Produkt der ersten PCR mit einem PCR-Mix versetzt, sodass der finale Ansatz 1 x PCR Puffer, 200 μM dNTPs, 5 U Taq Polymerase, 0,5 μM Nextera-for sowie 0,5 μM Nextera-rev Primer enthielt (finales Volumen: 100 μl). Die PCR erfolgte unter den nachfolgenden Bedingungen: 3 min bei 94 °C für einen Zyklus; 1 min bei 94 °C, 1 min bei 60 °C und 30 sec bei 72 °C für 20 Zyklen; 7 min bei 72 °C für einen Zyklus. Jeweils 50 μl der einzelnen PCR-Ansätze wurden mit Agencourt® AMPure® XP *beads* gereinigt (2.2.4). Die Elution erfolgte in 30 μl H₂O.

2.7.4 Einbau von Einzelzell-spezifischen Indices und Illumina Plattform kompatiblen Adaptoren

Um die PCR-Produkte einzelner Zellen eines Transfektionsansatzes unterscheiden zu können, wurden die PCR-Produkte einer jeweiligen Zelle mit Einzelzell-spezifischen Indices versehen. Hierfür wurde das Nextera® Index Kit verwendet. Dieses Kit enthält 8 *forward*- und 12 *reverse*-Primer, die jeweils eine acht Nukleotide lange Index-Sequenz enthalten und aus deren Kombination sich 96 verschiedene Indices ergeben. Die Primer enthalten darüber hinaus Illumina Plattform kompatible Adaptoren, die für die Sequenzierung notwendig sind. Jeweils 6 μl der gereinigten PCR-Produkte der zweiten Amplifizierung wurden hierbei mit einem PCR-Mix versetzt, sodass final jeweils 1 x KAPA HiFi HotStart ReadyMix sowie 3 μl *forward*- (5'-AATGATACGGC GACCACCGAGATCTACAC [i5] TCGTCGGCAGCGTC-3') und 3 μl *reverse*- (5'-CAAGCAGAAGACGGCATAACGAGAT [i7] GTCTCGTGGGCTCGG-3') Primer der entsprechenden Kombination der Primer des Nextera® Index Kit vorlagen. Die Amplifizierung erfolgte unter den nachfolgenden Bedingungen: 3 min bei 95 °C für einen Zyklus; 30 sec bei 95 °C, 30 sec bei 55 °C und 30 sec bei 72 °C für acht Zyklen; 5 min bei 72 °C für einen Zyklus. Je Transfektionsbedingung wurden 5 μl der 96 verschiedenen PCR-Ansätze vereinigt (finales Volumen pro Bedingung: 480 μl). Die vereinigten Ansätze der drei verschiedenen Transfektionsbedingungen wurden mit Agencourt® AMPure® XP *beads* gereinigt (2.2.4). Die Elution der PCR-Produkte erfolgte hierbei in 160 μl EB Puffer.

Jeweils 45 μl Probe pro Transfektionsbedingung wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese verwendet (2.2.1). Die Banden, die der Größe des finalen PCR-Produktes entsprachen, wurden ausgeschnitten und die DNA-Fragmente extrahiert (2.2.3). Die Se-

quenz der drei Amplifikate wurde mittels Sanger-Sequenzierung unter Verwendung der P5 und P7 Primer bestätigt, bevor die NGS durch IMG M Laboratories GmbH erfolgte (2.2.12).

2.7.5 Analyse von NGS-Daten

Die Sequenzen der NGS wurden von IMG M in Form von 96 FastQ-Dateien erhalten und waren entsprechend ihrer Einzelzell-spezifischen Indices (i5/i7) sortiert, sodass jede Datei die Sequenzen der PCR-Produkte der Einzelzellen aus drei verschiedenen Transfektionsansätzen enthielt. Die weitere Analyse der Daten erfolgte in Kooperation mit Eduardo Beltrán unter Vorgabe der nachfolgenden Kriterien: 1) Sequenzen, die kein UID und/oder nicht über einen der drei Transfektionsansatz-spezifischen Barcodes verfügen, werden verworfen. 2) Die verbliebenen Sequenzen werden dann zunächst über ihren Transfektionsansatz-spezifischen Barcode klassifiziert. 3) Duplikate, d. h. Sequenzen mit identischer UID und Peptid-kodierender Sequenz, werden zusammengefasst. Fehler in Sequenzen, die während der drei PCR oder bei der Sequenzierung entstanden waren, werden berücksichtigt, indem Sequenzen zudem als Duplikate angesehen werden, wenn sich ihre Sequenzen lediglich in ≤ 2 Nukleotiden unterscheiden. 4) Für die Quantifizierung von Plasmiden, die für unterschiedliche Peptide kodieren, werden nur solche Sequenzen mit einbezogen, die das Startcodon ATG sowie das Stopcodon TGA aufweisen.

3 Ergebnisse

3.1 Identifizierung und Validierung von Antigenen des TZR 2D1 im Kontext von HLA-A2

Der ursprünglich aus dem Blut eines MS-Patienten isolierte, autoreaktive TZR 2D1 wurde von Friese et al. extensiv in einem Mausmodell untersucht (1.7.1.2). Versuche der Studie ließen vermuten, dass die dreifach transgenen Mäuse nicht an MS-ähnlichen Symptomen erkrankten, da der TZR 2D1 durch den Kontakt mit bisher unbekanntem autologen Peptiden im Komplex mit HLA-A2 im Thymus deletiert wurde. Die vier Kandidaten EML5(997-1004), DMXL2(813-820), NCAN(257-264) und GPCPD1(15-22) wurden innerhalb unserer Arbeitsgruppe als potentielle Antigene beschrieben (Niedl, 2014). Grundlage hierfür waren die drei Mimotope Mimo1-3, die von Anna Niedl anhand der PECPL-Technologie identifiziert wurden (Tabelle 8).

Tabelle 8: Aminosäuresequenzen der von Anna Niedl identifizierten HLA-A2-restringierten Mimotope und Kandidatenantigene des TZR 2D1

	Mimo1	Mimo2	Mimo3	GPCPD1(15-22)	DMXL2(813-820)	EML5(997-1004)	NCAN(257-264)
1	L	L	L	L	L	M	L
2	I	V	L	P	I	E	G
3	G	G	G	G	G	G	G
4	E	E	E	E	E	E	E
5	V	V	V	V	V	V	V
6	F	W	F	F	F	W	F
7	V	G	E	A	N	G	Y
8	L	L	L	I	I	L	V

Ausgehend von den Ergebnissen der Tabelle 8 erfolgten in der vorliegenden Arbeit Experimente zur Validierung der zuvor genannten HLA-A2-restringierten Antigene des TZR 2D1. Dazu wurde zunächst getestet, ob der TZR die Mimotope und Kandidaten in Form von synthetischen Peptiden erkennt, wenn diese von COS-7-A2 Zellen präsentiert werden. Zudem wurden Antigen:HLA-A2-Komplexe *in vitro* in einem zellunabhängigen System rückgefaltet und ihr Aktivierungspotential gegenüber dem TZR 2D1 untersucht. Darüber hinaus wurde analysiert, ob HLA-A2⁺-Makrophagen fähig sind das natürlich vorkommende antigene Protein *in vitro* so zu prozessieren, dass dabei das antigene Peptid entsteht.

3.1.1 TZR 2D1 erkennt Mimotope als synthetische Okta- und Nonamere

Die drei Mimotope des TZR 2D1 (Mimo1-3) wurden mit der PECPL 8X^{8L} von Anna Niedl identifiziert (Niedl, 2014). Diese PECPL enthält acht Aminosäuren lange Peptide, bei denen die ersten sieben Positionen für zufällige Aminosäuren und Position 8 für den HLA-A2-Anker Leucin kodieren. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob 58-2D1-CD8-sGFP Zellen die drei Mimotope nicht nur in Form von Plasmid-kodierten Peptiden, sondern zudem als synthetische Peptide erkennen. Dazu wurden COS-7-A2 Zellen mit den synthetischen acht Aminosäuren langen Mimotopen inkubiert und mit 58-2D1-CD8-sGFP Zellen in Kokultur genommen. Als Negativkontrolle erfolgte der Aktivierungstest in einem Parallelansatz ohne Peptid sowie mit dem für den TZR 2D1 irrelevanten Peptid TAX(11-19), das an HLA-A2 bindet (Utz and Biddison, 1992). Die Aktivierung des TZR 2D1 wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop und die Sekretion von IL-2 in den Zellkulturüberstand mittels ELISA analysiert. Mimo1 und Mimo2 aktivierten die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen schwach, Mimo3 hingegen aktivierte die Zellen nicht (Abbildung 8 B, C).

Die Unterschiede bezüglich der Aktivierung von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen zwischen den Plasmid-kodierten und den synthetischen Mimotopen könnten darauf zurückgeführt werden, dass Peptide der PECPL zunächst mit dem Startcodon Methionin (Met, M) synthetisiert werden und die Abspaltung durch die Met-Aminopeptidase (Met-AP) im Zytosol nicht vollständig erfolgt (Wiltschi et al., 2009). Demzufolge könnten in der APC zwei Peptidvarianten vorliegen: das ursprüngliche Peptid mit N-terminalen Met sowie das prozessierte Peptid. Aufgrund dessen wurden zusätzlich synthetische Peptide getestet, die N-terminal mit einem Met-Rest verlängert wurden (M-Mimo1-3). Alle drei synthetischen M-Mimo aktivierten die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen (Abbildung 8 B, C).

Der TZR 2D1 erkennt demzufolge sowohl acht als auch neun Aminosäuren lange synthetische Peptide (Sequenzen siehe Abbildung 8 A). Die höheren IL-2 Konzentrationen bei den Aktivierungsversuchen mit neun Aminosäuren langen Peptiden im Vergleich zu denen mit acht Aminosäuren langen Mimotope weisen darauf hin, dass der TZR 2D1 von diesen stärker aktiviert wird.

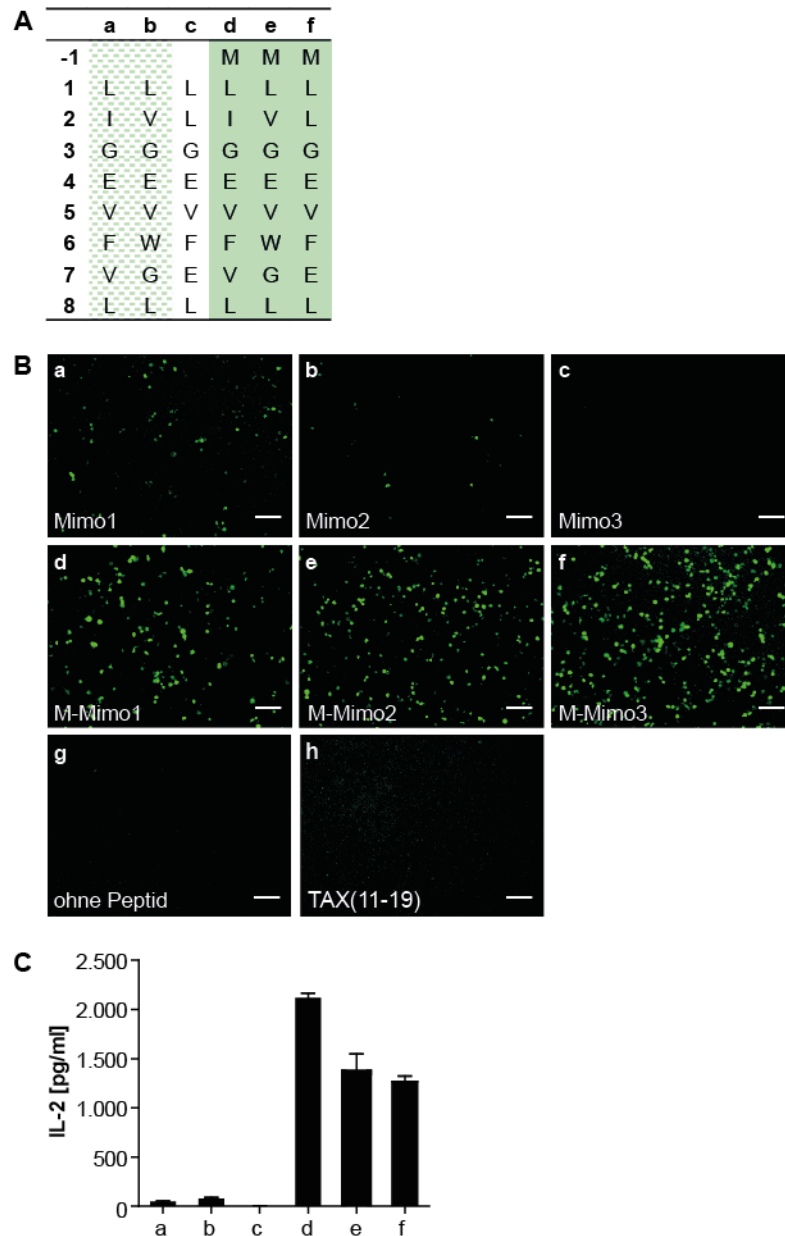


Abbildung 8: Aktivierungstest von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen mit synthetischen Mimotopen im Kontext von HLA-A2.

(A) Aminosäuresequenzen der verwendeten synthetischen Mimotope (a-f) an den jeweiligen Positionen -1 bis 8. Synthetische Mimotope, die den TZR 2D1 aktivierten, wurden grün hinterlegt (bei schwächerer Aktivierung grün schraffiert). (B) Fluoreszenzbilder der Kokultur von 58-2D1-CD8-sGFP und COS-7-A2 Zellen, die zuvor mit synthetischen Peptiden inkubiert wurden. Grüne Zellen stellen aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen dar. Maßstabskala: 100 μm . (C) IL-2 Konzentration [pg/ml] der Kokulturüberstände aus (B), die mittels ELISA bestimmt wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. 58-2D1-CD8-sGFP Zellen exprimieren IL-2, nachdem sie aktiviert wurden. Von den acht Aminosäuren langen synthetischen Mimotopen aktivierten nur MIMO1 und MIMO2 die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen (a und b). MIMO3 hingegen aktivierte sie nicht (c). Alle drei neun Aminosäuren langen synthetischen Mimotope (d-f), die an ihrem N-Terminus mit einem Met verlängert wurden, aktivierten die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen stark. Wurde kein Peptid (g) bzw. ein irrelevantes Peptid (hier TAX(11-19)) (h) verwendet, so konnte keine Aktivierung der 58-2D1-CD8-sGFP Zellen beobachtet werden.

3.1.2 Identifizierung natürlich vorkommender HLA-A2-restringierter Antigene des TZR 2D1

Die vier Kandidaten GPCPD1(15-22), DMXL2(813-820), EML5(997-1004) und NCAN(257-264), die sowohl in der Maus als auch im Menschen vorkommen, wurden von Anna Niedl als mögliche Antigene des TZR 2D1 identifiziert. Sie wurden bisher als Plasmid-kodierte Peptide in COS-7-A2 Zellen transfiziert und aktivierten die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen (Niedl, 2014). In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob diese vier Kandidaten zudem den TZR 2D1 in Form von synthetischen Peptiden aktivieren. Dazu wurden COS-7-A2 Zellen mit den synthetischen Peptiden inkubiert und 58-2D1-CD8-sGFP Zellen wurden anschließend mit diesen Zellen in Kokultur genommen. Da nach den Ergebnissen aus 3.1.1 anzunehmen war, dass die Met-Abspaltung bei Plasmid-kodierten Peptiden nicht immer vollständig erfolgt, wurden darüber hinaus identische synthetische Peptidsätze getestet, die am N-Terminus mit einem Met-Rest bzw. mit der in Maus und Mensch natürlich vorkommenden Aminosäure verlängert wurden. Als Negativkontrolle erfolgte der Aktivierungstest in einem Parallelansatz ohne Peptid sowie mit dem für den TZR 2D1 irrelevanten Peptid TAX(11-19), das an HLA-A2 bindet (Utz and Biddison, 1992). Die Aktivierung des TZR 2D1 wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop und die Sekretion von IL-2 in den Zellkulturüberstand analysiert. Bei den acht Aminosäuren langen synthetischen Peptiden konnten nur bei GPCPD1(15-22) unter dem Fluoreszenzmikroskop schwach aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen beobachtet sowie signifikante IL-2 Konzentrationen gemessen werden. Alle anderen synthetischen acht Aminosäuren langen Peptide aktivierten den TZR 2D1 nicht (Abbildung 9). Die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen wurden von allen vier synthetischen Peptiden aktiviert, die N-terminal mit einem Met verlängert wurden. Von den natürlich vorkommenden neun Aminosäuren langen synthetischen Peptiden aktivierte nur GPCPD1(14-22), das Leu an Position -1 enthält, den TZR 2D1 (Abbildung 9). Die höheren IL-2 Konzentrationen der neun Aminosäuren langen Peptide im Vergleich zu denen der acht Aminosäuren langen Peptide zeigen, dass der TZR 2D1 von diesen stärker aktiviert wird.

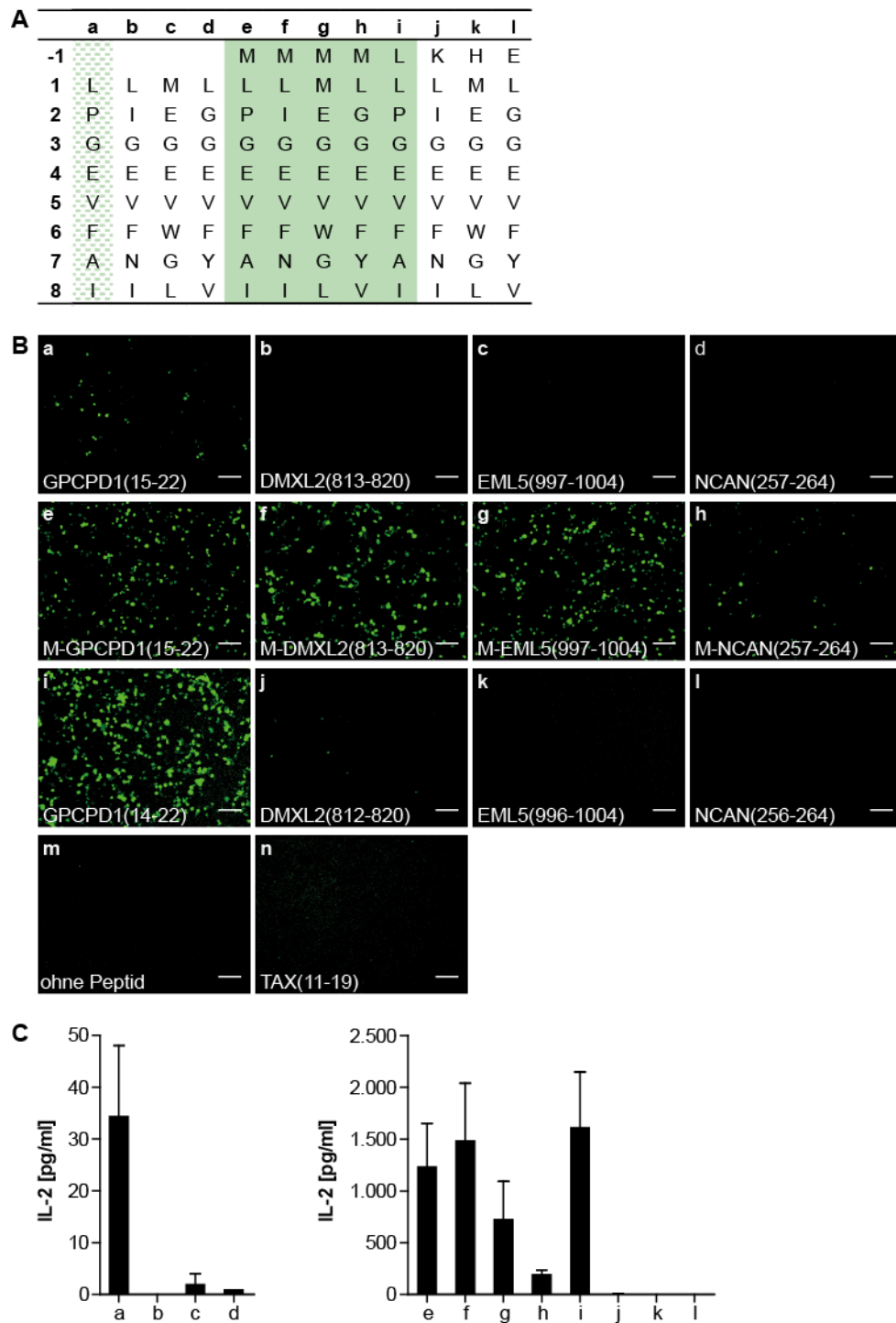


Abbildung 9: Aktivierungstest von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen mit synthetischen Peptiden im Kontext von HLA-A2.

(A) Aminosäuresequenzen der verwendeten synthetischen Peptide (a-l) an den Positionen -1 bis 8. Synthetische Peptide, die den TZR 2D1 aktivierten, wurden grün hinterlegt (bei schwächerer Aktivierung grün schraffiert). (B) Fluoreszenzbilder der Kokultur von 58-2D1-CD8-sGFP und COS-7-A2 Zellen, die zuvor mit synthetischen Peptiden inkubiert wurden. Grüne Zellen stellen aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP dar. Maßstabskala: 100 μ m. (C) IL-2 Konzentration [pg/ml] der Kokulturüberstände aus (B), die mittels ELISA bestimmt wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. 58-2D1-CD8-sGFP Zellen exprimieren IL-2, nachdem sie aktiviert wurden. Bei a-d wurden oktamere Peptide verwendet. Nur GPCPD1(15-22) aktivierte die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen. Bei e-h handelt es sich um die gleichen oktameren Peptide, jedoch wurden sie am N-Terminus mit einem Met verlängert. Alle vier Peptide aktivierten die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen stark. Bei i-l wurden die gleichen oktameren Peptide verwendet, jedoch enthalten sie zusätzlich am N-Terminus ihre natürlich vorkommende Aminosäure. Aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen konnten nur bei GPCPD1(14-22) detektiert werden. Wurde kein Peptid (m) bzw. ein irrelevantes Peptid (hier TAX(11-19)) (n) verwendet, so konnte keine Aktivierung der 58-2D1-CD8-sGFP Zellen festgestellt werden.

3.1.3 Rückfaltung von funktionalen Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen

Die schwache Aktivierung von TZR 2D1 durch einige Peptide (3.1.2) kann zwei Gründe haben: Erstens könnten die Peptide nicht gut an HLA-A2 binden, somit ständen nur wenige Peptid:HLA-Komplexe zur Verfügung. Zweitens könnten Peptid:HLA-Komplexe sehr wohl entstehen, diese wären aber nicht in der Lage, den TZR zu aktivieren. Um diese Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden die Peptide *in vitro* in einem zellunabhängigen System auf HLA-A2 zurückgefaltet, da bekannt ist, dass HLA-Moleküle nur mit gut bindenden Peptiden rückfalten (Garboczi et al., 1992). Dafür wurde die extrazelluläre Domäne der schweren Kette des HLA-A2-Moleküls sowie β_2m aus *E. coli* gereinigt und in Gegenwart der nachfolgenden oktameren und nonameren Peptide rückgefaltet: GPCPD1(15-22), DMXL2(813-820), EML5(997-1004), NCAN(257-264), M-GPCPD1(15-22), M-DMXL2(813-820), M-EML5(997-1004) sowie M-NCAN(257-264). Als Positivkontrolle wurden die Peptide Flu(58-66) und TAX(11-19) verwendet. Abbildung 10 zeigt eine SDS-PAGE der Rückfaltungsprodukte, wenn oktameres GPCPD1(15-22) (Spuren 3 und 5) und nonamerer M-GPCPD1(15-22) (Spuren 2 und 4) eingesetzt wurde. Sie stellen ein repräsentatives Beispiel für alle oben beschriebenen rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexe dar.

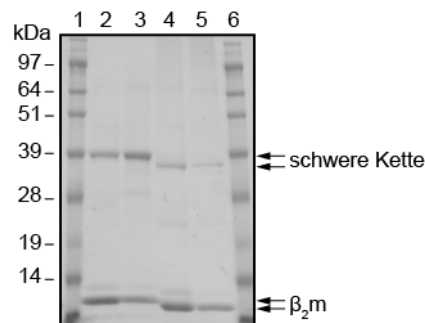


Abbildung 10: SDS-PAGE der rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexe.

Die schwere Kette und β_2m wurden in Gegenwart des oktameren Peptids GPCPD1(15-22) (Spuren 3 und 5) und des nonameren Peptids M-GPCPD1(15-22) (Spuren 2 und 4) rückgefaltet und auf einem Polyacrylamidgel unter reduzierenden (Spuren 2-3) und nicht-reduzierenden (Spuren 4-5) Bedingungen nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Proteinstandards zur Größenabschätzung wurden mitgeführt (Spuren 1 und 6). Die reduzierten schweren Ketten zeigen ein apparentes Molekulargewicht von 39 kDa, während die nicht-reduzierten schweren Ketten ein apparentes Molekulargewicht von 36 kDa aufweisen. Unter reduzierenden bzw. nicht-reduzierenden Bedingungen hat β_2m ein Molekulargewicht von 13 bzw. 10 kDa. Die Abbildung stellt ein repräsentatives Beispiel aller Rückfaltungen mit oktameren und nonameren Peptiden dar.

Unter reduzierenden Bedingungen (Spuren 2 und 3) laufen die denaturierten schweren Ketten bei einem Molekulargewicht von 39 kDa. Die Spuren 4 und 5 zeigen die gefalteten Komplexe unter nicht-reduzierenden Bedingungen. Die schweren Ketten laufen mit apparenten Molekulargewichten von 36 kDa. Wichtig ist, dass sich die Intensitäten deutlich unterscheiden: Die Bande bei 36 kDa der Spur 4 ist intensiver im Vergleich zur Spur 5. Dies zeigt, dass die Ausbeute an rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplex für nonamerer M-GPCPD1(15-22) höher ist als für oktameres GPCPD1(15-22). Das oktamere Peptid stabilisiert die HLA-Kette weniger gut.

Die Funktionalität der rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexe wurde in einem Aktivierungsversuch bestätigt. Dazu wurden die trimeren Komplexe enzymatisch durch die Ligase BirA C-terminal biotinyliert und an Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatten immobilisiert. 58-2D1-CD8-sGFP Zellen wurden hinzugefügt und die Aktivierung des TZR 2D1 wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop und die Sekretion von IL-2 in den Zellkulturüberstand mittels ELISA analysiert. Abbildung 11 A und B stellen repräsentative Beispiele erhaltener Ergebnisse dar.

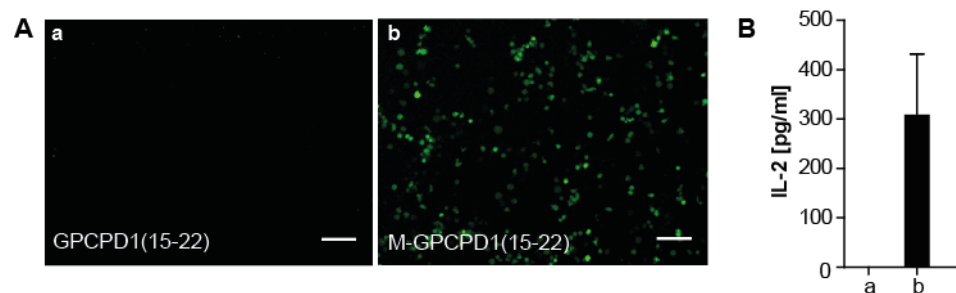


Abbildung 11: Aktivierungstest von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen mit *in vitro* rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen.

(A) Fluoreszenzbilder von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen, die mit rückgefalteten und biotinylierten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexen inkubiert wurden. Die rückgefalteten trimeren Komplexe wurden hierzu an eine Streptavidin-gekoppelte Mikrotiterplatte immobilisiert. GPCPD1(15-22):HLA-A2: β_2m (a) stellt ein repräsentatives Beispiel für alle Rückfaltungen dar, die in Gegenwart eines oktameren Peptids erfolgten; und M-GPCPD1(15-22):HLA-A2: β_2m (b) eines für Rückfaltungen in Gegenwart eines Nonamers. Grüne Zellen stellen aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen dar. Maßstabskala: 100 μ m. (B) IL-2 Konzentration [pg/ml] der Zellkulturüberstände aus (A), die mittels ELISA bestimmt wurden. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. Aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen konnten nur bei Rückfaltungen detektiert werden, die in Gegenwart eines Nonamers erfolgten.

Aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen konnten bei den vier trimeren Komplexen beobachtet werden, bei denen die nonameren Peptide M-GPCPD1(15-22), M-DMXL2(813-820), M-EML5(997-1004) und M-NCAN(257-264) verwendet wurden. Die rückgefalteten Peptid:HLA-A2: β_2m -Komplexe, bei denen die oktameren Peptide GPCPD1(15-22), DMXL2(813-820), EML5(997-1004) und NCAN(257-264) eingesetzt

wurden, aktivierten den TZR 2D1 nicht. Die beiden Flu(58-66):HLA-A2:β₂m- bzw. TAX(11-19):HLA-A2:β₂m-Komplexe, die als Positivkontrolle parallel zu den zuvor beschriebenen trimeren Komplexen hergestellt wurden, aktivierten spezifisch die 58-JM22-CD8-sGFP bzw. die 58-B7-CD8-sGFP Zellen. Dies zeigt, dass bei diesen Komplexen die Rückfaltungsreaktion erfolgreich stattfand.

Mit den biotinylierten, rückgefalteten M-GPCPD1(15-22):HLA-A2:β₂m-Molekülen wurden zusätzlich PE-markierte Tetramere synthetisiert. Dazu wurden diese Komplexe mit PE-markiertem Streptavidin umgesetzt. 58-2D1-CD8-sGFP Zellen wurden mit den daraus resultierenden M-GPCPD1(15-22)-PE Tetrameren (kurz M-GPCPD1(15-22)-PE) inkubiert. Mittels Durchflusszytometrie wurde analysiert, ob das Tetramer den TZR 2D1 spezifisch erkennt. Der Verschiebung der Fluoreszenzintensität ist zu entnehmen, dass das M-GPCPD1(15-22)-PE an die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen bindet (Abbildung 12). Zellen, die den TZR B7 exprimierten (58-B7-CD8-sGFP Zellen), dienten als Negativkontrolle. Sie wiesen kein Fluoreszenzsignal auf. Dies zeigt, dass das Tetramer funktional und spezifisch für den TZR 2D1 ist.

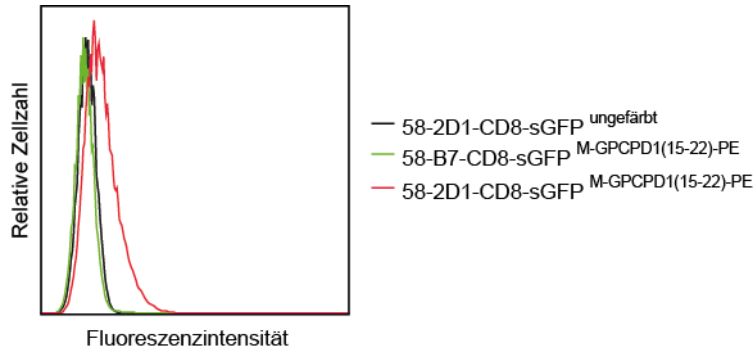


Abbildung 12: Funktionalitäts- und Spezifitätstest von M-GPCPD1(15-22)-PE mit 58-2D1-CD8-sGFP Zellen.

Die Funktionalität und Spezifität des M-GPCPD1(15-22)-PE für den TZR 2D1 wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. 58-2D1-CD8-sGFP Zellen (rotes Histogramm) wurden dazu mit PE-gekoppeltem Tetramer inkubiert. Als Negativkontrolle wurden 58-B7-CD8-sGFP Zellen (grünes Histogramm) in einem Parallelansatz mit dem Tetramer inkubiert. Zudem wurden 58-2D1-CD8-sGFP Zellen, die nicht mit dem Tetramer inkubiert wurden, als Kontrolle mitgeführt (schwarzes Histogramm). Die Abszisse zeigt die Fluoreszenzintensität und die Ordinate die relative Zellzahl.

3.1.4 Proteinprozessierung in Makrophagen

Das Programm NetCTLpan von IEDB (Stranzl et al., 2010), das zur Berechnung möglicher Epitope die Vorhersagen der proteasomalen Spaltung, die TAP Transporteffizienz sowie die Bindungsaffinität eines Epitopes kombiniert, sagt die Bildung des Epitop GPCPD1(14-22) aus der Proteindomäne GPCPD1(1-118) vorher. Um diese Vorhersage experimentell zu verifizieren, wurde untersucht, ob Makrophagen dazu fähig sind, das antigene Protein so zu prozessieren, dass dabei das antigene Peptid entsteht. Dazu wurden humane CD14⁺-Monozyten aus PBMC aus dem Blut eines HLA-A*02:01 homozygoten und eines HLA-A2 negativen Individuums isoliert und zu Makrophagen differenziert. Die HLA-A2⁺-Makrophagen wurden mit der Proteindomäne GPCPD1(1-118) versetzt, die in harnstoffhaltigen Vehikel gelöst wurde. Es wurde gezeigt, dass so Kreuzpräsentation stattfinden kann (Barabas et al., 2008). Zudem wurden die Makrophagen parallel mit synthetischem Peptid GPCPD1(14-22) als Positivkontrolle und mit dem Vehikel als Negativkontrolle inkubiert. Als zusätzliche Negativkontrollen wurden HLA-A2⁻-Makrophagen in einem Parallelansatz mitgeführt. Die Makrophagen wurden anschließend mit 58-2D1-CD8-sGFP Zellen in Kokultur genommen. Die Aktivierung des TZR 2D1 wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop und die Sekretion von IL-2 in den Zellkulturüberstand mittels ELISA analysiert. Es wurden keine aktivierten Zellen in der Kokultur mit HLA-A2⁺-Makrophagen nachgewiesen, die mit der Proteindomäne GPCPD1(1-118) versetzt wurden (Abbildung 13). Aufgrund dessen ist davon auszugehen, dass Makrophagen nicht in der Lage sind GPCPD1(1-118) so zu prozessieren, dass dabei das antigene Peptid entsteht. Aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen und die Expression von IL-2 konnten nur bei HLA-A2⁺-Makrophagen detektiert werden, die mit synthetischem GPCPD1(14-22) inkubiert wurden. Dies zeigt, dass Makrophagen im Allgemeinen fähig sind das Peptid auf ihren membranständigen HLA-A2-Molekülen zu präsentieren und den TZR 2D1 zu aktivieren.

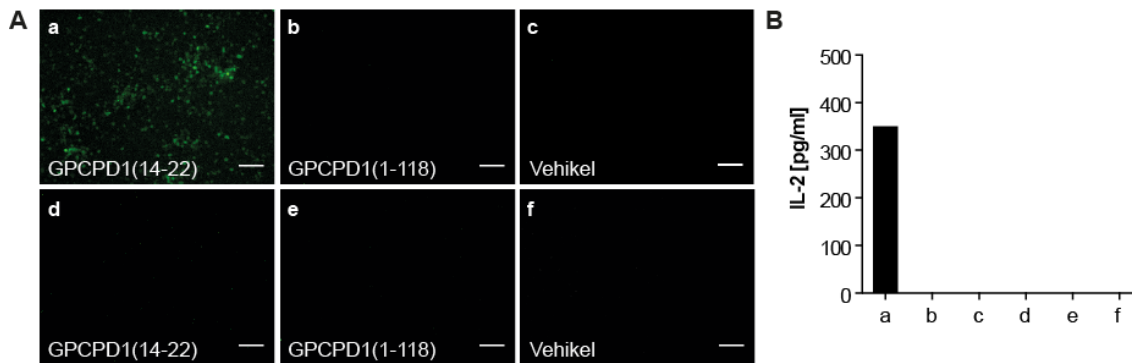


Abbildung 13: Aktivierungstest von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen mit humanen Makrophagen von HLA-A*02:01 homozygoten und HLA-A2 negativen Spendern.

(A) Fluoreszenzbilder der Kokultur von 58-2D1-CD8-sGFP Zellen mit HLA-A2⁺- und HLA-A2⁻-Makrophagen. HLA-A2⁺-Makrophagen (a bis c) sowie HLA-A2⁻-Makrophagen (d bis f) wurden mit dem synthetischen Peptid GPCPD1(14-22) (a, d), mit der Proteindomäne GPCPD1(1-118), die in harnstoffhaltigen Vehikel gelöst wurde (b, e), sowie mit dem Vehikel (c, f) inkubiert. Grüne Zellen stellen aktivierte 58-2D1-CD8-sGFP Zellen dar. Maßstabskala: 100 μ m. (B) IL-2 Konzentration [pg/ml] der Zellkulturüberstände aus (A), die in Duplikaten mittels ELISA bestimmt wurden. Aktivierte Zellen konnten lediglich bei HLA-A2⁺-Makrophagen nachgewiesen werden, die mit synthetischem Peptid versetzt wurden (a).

3.1.5 Analyse der beiden α -Ketten des „dual alpha“ TZR 2D1

Der ursprüngliche T-Zell-Klon 2D1 exprimiert eine α - und zwei β -Ketten (Honma et al., 1997). Auch bei den 58-2D1-CD8-sGFP Zellen handelt es sich um T-Hybridomzellen, die neben der V α 15.1J α 2.7-Kette, die beiden β -Ketten V β 2J β 21 und V β 7J β 11 exprimieren (Friese et al., 2008). In Experimenten mit 58-CD8 Zellen, die neben der V α 15.1J α 2.7-Kette eine der beiden β -Ketten exprimieren, erwies sich der TZR V α 2J α 21-V α 15.1J α 2.7 als pathogener TZR, da er spezifisch den PLP(45-53):HLA-A3-Komplex erkennt. Der TZR V α 7J α 11-V α 15.1J α 2.7 hingegen bindet diesen Komplex nicht (Friese et al., 2008). Um herauszufinden, welcher dieser beiden TZR von den zuvor identifizierten Peptid:HLA-A2-Komplexen aktiviert wird (3.1.1-3.1.3), erfolgten Aktivierungsversuche mit den zuvor beschriebenen T-Hybridomzellen, die neben der α -Kette eine der beiden β -Ketten exprimieren. COS-7-A2 und -A3 Zellen wurden hierfür mit Plasmiden transfiziert, die für das Peptid GPCPD1(15-22) und das Peptid PLP(45-53) kodieren. Als Negativkontrolle wurden die Zellen mit pcDNARc-spacer Plasmid-DNA transfiziert. Die transfizierten COS-7 Zellen wurden anschließend in Kokultur mit den 58-V α 2J α 21-V α 15.1J α 2.7-CD8 und 58-V α 7J α 11-V α 15.1J α 2.7-CD8 Zellen genommen. Als Positivkontrolle wurden 58-2D1-CD8-sGFP Zellen mitgeführt, die sowohl den PLP(45-53):HLA-A3- als auch den GPCPD1(15-22):HLA-A2-Komplex

erkennen. Die Aktivierung der T-Hybridomzellen wurde untersucht, indem die Zellkulturüberstände mittels ELISA auf IL-2 analysiert wurden. Abbildung 14 zeigt, dass aktivierte Zellen lediglich bei 58-V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7-CD8 und 58-2D1-CD8-sGFP Zellen detektiert wurden.

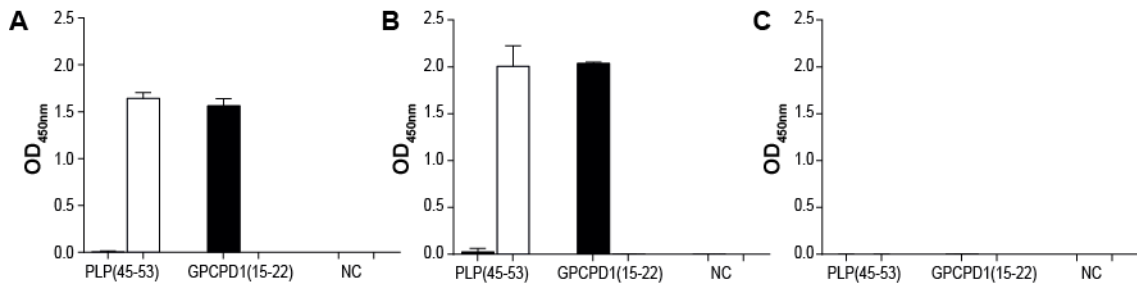


Abbildung 14: Aktivierungstest verschiedener T-Hybridomzellen gegenüber COS-7-A2 und -A3 Zellen, die mit Plasmid-kodierten Peptiden transfiziert wurden.

COS-7-A2 (schwarze Balken) und COS-7-A3 (weiße Balken) Zellen wurden mit Plasmiden transfiziert, die für die Peptide PLP(45-53) und GPCPD1(15-22) kodieren. Als Negativkontrolle (NC) wurden die Zellen mit pcDNArc-spacer Plasmid-DNA transfiziert. Die transfizierten COS-7 Zellen wurden in Kokultur mit (A) 58-2D1-CD8-sGFP, (B) 58-V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7-CD8 und (C) 58-V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7-CD8 Zellen genommen. T-Hybridomzellen exprimieren IL-2, nachdem sie aktiviert wurden. Die Kokulturüberstände wurden mittels ELISA auf IL-2 überprüft und die gemessene OD_{450 nm} der jeweiligen Probe wurde angegeben. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts der Duplikate dar.

Beide T-Hybridomzelllinien weisen das gleiche IL-2 Expressionsmuster auf und werden demzufolge spezifisch von PLP(45-53):HLA-A3- und GPCPD1(15-22):HLA-A2-Komplexen aktiviert. Bei Versuchen mit 58-V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7-CD8 Zellen konnte keine Aktivierung beobachtet werden. Dies belegt, dass der pathogene TZR V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7 mit beiden zuvor genannten Peptid:HLA-Komplexen kreuzreagiert und alloreaktiv gegenüber HLA-A2 ist.

3.2 Versuche zur Identifizierung von Antigenen des MAIT-verwandten TZR V α 7.2J α 58-V β 1J β 2.3

Eine vermutliche Beteiligung von MAIT-Zellen an der Pathogenese von MS wurde in unterschiedlichen Studien beschrieben (1.7.1.3). Innerhalb unserer Arbeitsgruppe wurde die klassische MAIT V α 7.2-J α 33-Kette sowie drei verschiedene MAIT-verwandte α -Ketten aus Läsionen im Gehirn eines MS-Patienten identifiziert, die mit der V β 1J β 2.3-Kette paaren (Bhonsle, 2011). Die Antigene dieser vier verschiedenen TZR sind unbekannt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit erfolgten daher Versuche zur Identifizierung der Antigene einer dieser TZR, dem TZR V α 7.2J α 58-V β 1J β 2.3.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war die Beobachtung von Kjer-Nielsen et al., dass MAIT-Zellen durch bakterielle Vitamin B Derivate im Kontext von MR1 aktiviert werden, noch nicht veröffentlicht (Kjer-Nielsen et al., 2012). Zu dieser Zeit war das MAIT Antigen sowie die Natur des MR1 Liganden unbekannt. Es wurde kontrovers diskutiert, ob MAIT-Zellen Peptide oder Lipide auf MR1 erkennen (Huang et al., 2005; Shimamura et al., 2007). Die vorherrschende Meinung war jedoch, dass die Antigene Peptide sind. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die PECPL-Technologie zur Identifizierung antigener Peptide angewendet. Hierzu wurden COS-7 Zellen transient mit MR1-pHSE Plasmid-DNA sowie der PECPL 9X transfiziert. PECPL 9X kodiert für neun Aminosäuren lange Peptide mit zufälliger Zusammensetzung. Die transfizierten COS-7 Zellen wurden in Kokultur mit den 58-J α 58-CD8-sGFP Zellen genommen, die den TZR V α 7.2J α 58-V β 1J β 2.3 stabil exprimieren. Die Aktivierung des TZR wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Auf einer analysierten Fläche von rund 50 cm² konnten keine *cluster* an aktivierten Zellen, d. h. mehrere aktivierte Zellen in unmittelbarer Nähe zueinander, beobachtet werden, die auf eine Aktivierung des TZR hinweisen.

3.3 Identifizierung von Mimotopen des TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 im Kontext von HLA-C6

Der humane TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 wurde aus einer Läsion eines Psoriasis-Patienten isoliert und wird spezifisch von HLA-C6⁺-Melanozyten aktiviert (1.7.2). Zur Identifikation potentieller Selbstantigene aus Melanozyten wurden in unserer Arbeitsgruppe von Katherina Siewert PECPL verwendet, die zur Identifizierung von sechs HLA-C6-restringierten Epitopen führten (Tabelle 9; Arakawa et al., 2015). Die dabei eingesetzten PECPL enthielten neun Aminosäuren lange Peptide, die an definierten Positionen für die bekannten HLA-C6-Anker-Aminosäuren kodierten.

Tabelle 9: Identifizierte HLA-C6-restringierte Mimotope des TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1

Angegeben sind die Aminosäuresequenzen der sechs Mimotope Mimo1-6, die in Vorexperimenten von Katherina Siewert identifiziert wurden. Zudem sind die Sequenzmotive der beiden verwendeten PECPL dargestellt, aus denen die Mimotope isoliert wurden. Aus PECPL1 bzw. PECPL2 isolierte Mimotope sind mit „*“ bzw. „**“ markiert.

	PECPL1*	PECPL2**	Mimo1*	Mimo2*	Mimo3*	Mimo4**	Mimo5**	Mimo6**
1	F/I	X	F	F	F	F	R	G
2	R	X	R	R	R	R	R	R
3	X	X	S	H	C	W	N	A
4	X	X	Y	R	R	Y	W	S
5	X	X	R	R	Q	R	N	R
6	X	X	T	T	Y	V	Y	T
7	X	X	R	L	R	R	R	R
8	X	X	R	R	R	R	R	R
9	L/I	L	L	L	L	L	L	L

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere HLA-C6-restringierte Mimotope identifiziert, um die Datenbanksuche zur Entdeckung natürlich vorkommender Antigene zu verfeinern. Hierzu wurden COS-7-C6 Zellen mit der PECPL 9X transfiziert. Im Gegensatz zu früheren Arbeiten, bei denen feste Anker-Positionen in den Bibliotheken vorgegeben waren (Tabelle 9), kodiert diese PECPL für neun Aminosäuren lange Peptide, die an allen Positionen zufällig angeordnete Aminosäuren enthalten. Diese reduzierte Einschränkung ermöglicht bessere Datenbanksuchen, da mehr Möglichkeiten zugelassen werden. Die transfizierten COS-7-C6 Zellen wurden mit 58-V \square 3S1-V \square 13S1-CD8-sGFP Zellen in Kokultur genommen. Mittels Fluoreszenzmikroskopie wurde die Kokultur auf aktivierte T-Hybridomzellen untersucht. Insgesamt konnten acht sogenannte

cluster (3.2) auf einer Fläche von ca. 71 cm² beobachtet werden. Unter einem *cluster* lokalisierte COS-7-C6 Zellen wurden mit einer Kapillare isoliert. Mittels Einzelzell-PCR wurden die Sequenzen der enthaltenen Plasmid-kodierten Mimotope amplifiziert, kloniert und durch *subpools* (2.5.9.4.5) angereichert. Aus den acht Ansätzen konnten schließlich durch Sequenzierung die drei nachfolgenden Mimotope identifiziert werden: MRSHRYLRL (Mimo7), RRYFRCLRM (Mimo8) sowie VRCWRGRRL (Mimo9) (Abbildung 15). Mimo7 bis Mimo9 sind die ersten Plasmid-kodierten Epitope, die aus einer vollständig zufällig angeordneten PECPL ohne HLA-C6-Anker isoliert wurden.

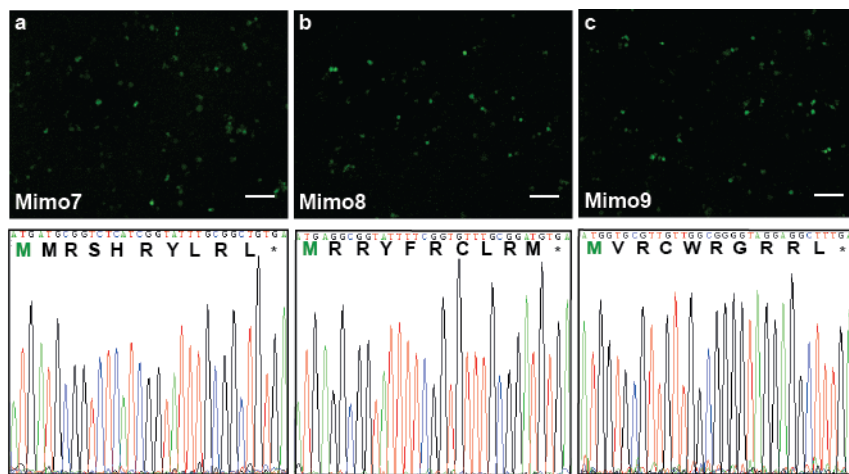


Abbildung 15: Mimotope 7-9 aktivieren TZR V β 3S1J β 45.1-V β 13S1J β 1.1.

Fluoreszenzbilder (oben) der Kokultur von 58-V β 3S1-V β 13S1-CD8-sGFP und COS-7-C6 Zellen, die mit den Plasmiden transfiziert wurden, die für Mimo7 (a), Mimo8 (b) und Mimo9 (c) kodieren. Grüne Zellen stellen aktivierte 58-V β 3S1-V β 13S1-CD8-sGFP dar. Maßstabskala: 100 μ m. Darunter sind Ausschnitte der Elektropherogramme der Sequenzierung der Mimo7-9-kodierenden Plasmide dargestellt, die aus PECPL 9X isoliert wurden. Dabei wurde die Nukleotid- sowie die übersetzte Aminosäuresequenz der jeweiligen Mimotope zwischen Startcodon (grünes M) und Stoppcodon (*) gezeigt.

3.4 Optimierung der Technologie zur Identifizierung von CD8⁺-T-Zell Antigenen

Die PECPL-Technologie ermöglicht es Antigene von CD8⁺-T-Zellen zu identifizieren (Arakawa et al., 2015; Siewert et al., 2012, 3.1 und 3.3). Eine bedeutende Verbesserung der Technologie zur Identifizierung von Antigenen wäre die Anzahl der Plasmide pro Zelle genau steuern zu können. Wenn das Antigen-kodierende Plasmid in der APC zu sehr durch andere Plasmide verdünnt ist, wird das antigene Peptid auf der Zelloberfläche nicht in einer für die Aktivierung der T-Hybridomzellen benötigten Dichte präsentiert (Abbildung 6). Andererseits könnten APC nur mit einer geringen Anzahl an PECPL-Plasmiden transfiziert werden, sodass das Antigen nicht zu verdünnt wäre. Bei einer verringerten Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle müssten zahlreiche APC analysiert werden, da im Allgemeinen tausende von PECPL-Plasmiden untersucht werden müssen, um ein Antigen zu identifizieren. Dies ist jedoch mit einem großen Zeitaufwand verbunden. Zur Entwicklung dieser innovativen Technologie zur Hochdurchsatzanwendung muss daher ein Optimum zwischen der Anzahl der zu transfizierenden PECPL-Plasmide und der Anzahl der zu untersuchenden APC gefunden werden.

In den nachfolgenden Abschnitten der vorliegenden Arbeit wurde zunächst eine qPCR-Methode zur Quantifizierung von PECPL-Plasmiden etabliert. Anschließend wurde die durchschnittliche Anzahl der PECPL-Plasmide pro APC zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektionen mit variierenden Bedingungen bestimmt. Das PECPL-Repertoire einzelner APC 48 h nach der Transfektion wurde mit der UID-Strategie durch NGS bestimmt. Dadurch konnte die Amplifikationsrate einzelner PECPL-Plasmide untersucht werden. Die Experimente der Abschnitte 3.4.1.2 bis 3.4.3 erfolgten in Zusammenarbeit mit Margarete Schönwetter.

3.4.1 Quantifizierung von PECPL-Plasmiden durch qPCR

In den nachfolgenden Abschnitten wurde eine qPCR-Methode etabliert, die eine Quantifizierung von PECPL-Plasmiden ermöglicht.

3.4.1.1 Überprüfung der Spezifität der Primer

Für die qPCR wurden Primer generiert, die ein 81 bp langes Amplikon des Plasmid-Rückgrats der PECPL erzeugen (Abbildung 7). Die Spezifität der verwendeten Primer wurde überprüft, indem eine PCR mit Plasmid-DNA der PECPL 8X erfolgte. Als Negativkontrollen wurden die Plasmid-DNA eines HLA-Klasse-I-Moleküls (hier HLA-A2-pHSE) sowie genomische COS-7 DNA mitgeführt. Die drei PCR-Produkte wurden durch Agarose-Gelelektrophorese analysiert. DNA-Fragmente mit einer Größe von ca. 80 bp konnten nur in dem Ansatz mit PECPL detektiert werden.

Die Identität des Amplikons wurde zusätzlich durch Sequenzieren des gereinigten PCR-Produkts bestätigt.

3.4.1.2 Etablierung der Standardkurve

Für die Etablierung der Standardkurve erfolgten qPCR mit PECPL-Standards mit definierter Anzahl an PECPL-Plasmiden im Bereich von 10^4 - 10^8 unter den folgenden Bedingungen: 15 min bei 95 °C für einen Zyklus; 1 min bei 94 °C und 1 min bei 60 °C für 40 Zyklen. Zudem wurden die Verdünnungen mit extrahierter, genomischer DNA von 1×10^3 COS-7 Zellen versetzt, da die zu analysierenden Proben nachfolgender Versuche ebenfalls genomische COS-7 DNA enthalten. Die Ct-Werte jeder Verdünnung wurden in Triplikaten bestimmt und gegen den \log_{10} ihrer ursprünglichen Anzahl an PECPL-Plasmiden aufgetragen. Abbildung 16 zeigt ein repräsentatives Beispiel einer erhaltenen Standardkurve. Die Standardkurve ist im Bereich von 10^4 bis 10^8 PECPL-Plasmiden linear.

Die Effizienz (E) der qPCR, anhand der die Standardkurve der Abbildung 16 erstellt wurde, liegt bei 0,93 und wurde wie beschrieben gemäß der nachfolgenden Gleichung berechnet (Rasmussen, 2001):

$$E = 10^{(-1/\text{Steigung})} - 1.$$

Das Detektionsminium der qPCR liegt bei 10^4 PECPL-Plasmiden. Wird die extrahierte DNA von 1×10^3 COS-7 Zellen, die mit PECPL transfiziert wurden, in einer Messung eingesetzt, liegt das Detektionslimit bei 10 Plasmiden pro Zelle.

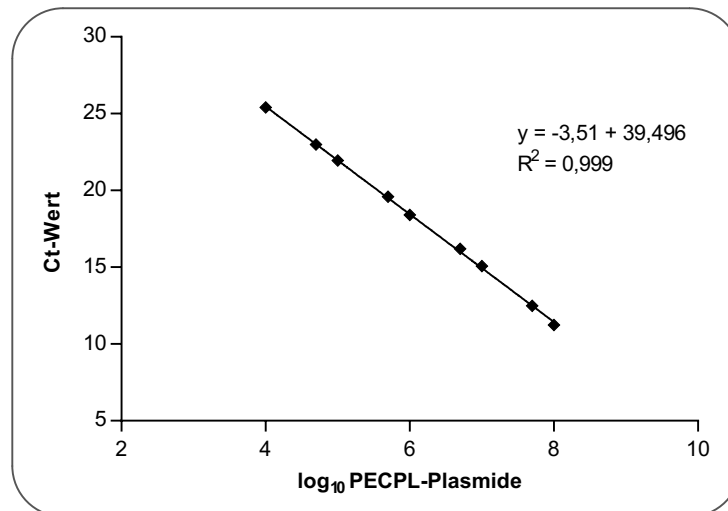


Abbildung 16: Standardkurve zur Quantifizierung von PECPL-Plasmiden.

Die PECPL-Standards mit definierter Anzahl an PECPL-Plasmiden im Bereich von 10^4 bis 10^8 wurden mit genomischer DNA von 10^3 COS-7 Zellen versetzt. Jede Verdünnung wurde mittels qPCR in Triplikaten gemessen. Die dabei erhaltenen Ct-Werte wurden gegen den \log_{10} der anfänglichen Anzahl an PECPL-Plasmiden aufgetragen. Die Standardkurve, die durch lineare Regression erstellt wurde, weist eine Steigung von -3,51 und ein Bestimmtheitsmaß (R^2) von 0,999 auf. Die Negativkontrollen mit bzw. ohne genomische COS-7 DNA weisen Ct-Werte > 30 bzw. > 34 auf.

3.4.2 Quantifizierung der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle nach Transfektion mit verschiedenen Methoden

Die Transfektionen der APC gemäß der PECPL-Technologie erfolgten bisher mittels Elektroporation oder FuGENE[®] HD. FuGENE[®] HD wurde innerhalb der letzten Jahre aufgrund seiner einfachen und schnellen Handhabung in dieser Arbeitsgruppe überwiegend verwendet. Eine neuere Transfektionsmethode, die Nukleofektion, ist zudem seit Kurzem in dieser Arbeitsgruppe verfügbar.

Die Ausgangszahl an PECPL-Plasmiden, die unmittelbar nach Transfektion mit FuGENE[®] HD oder nach der Nukleofektion innerhalb der APC vorliegen, ist bisher nicht bekannt. Dasselbe gilt für die Plasmidanzahl zum Zeitpunkt der Isolation der APC mittels einer Kapillare. Die PECPL enthalten den SV40 Replikationsursprung, anhand dessen sie von COS-7 Zellen amplifiziert werden können. Die Amplifikationsrate der PECPL-Plasmide durch COS-7 Zellen ist jedoch unbekannt.

In den nachfolgenden Abschnitten wurde mittels der etablierten qPCR-Methode (3.4.1) die durchschnittliche Anzahl an PECPL-Plasmiden in einzelnen COS-7 Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der FuGENE[®] HD Transfektion sowie der Nukleofektion analysiert. Darüber hinaus wurden Reaktionsbedingungen variiert, um COS-7

Zellen mit verschiedenen, definierten Ausgangszahlen an PECPL-Plasmiden in einer Zelle zu erhalten.

3.4.2.1 Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion mit dem FuGENE® HD-Standardprotokoll

Für die Quantifizierung von PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle wurden COS-7 Zellen zunächst mit dem FuGENE® HD-Standardprotokoll der PECPL-Methode transfiziert. Dazu wurden jeweils 10 ng/µl PECPL und HLA-A2-pHSE Plasmid-DNA mit FuGENE® HD Reagenz versetzt und zu den COS-7 Zellen hinzugegeben. Als Transfektionskontrolle wurden COS-7 Zellen in einem Parallelansatz mit 10 ng/µl pcDNA-sGFP transfiziert und grüne Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Zu definierten Zeitpunkten (0, 2, 4, 6, 24, 48, 72 h) nach der Transfektion wurden jeweils 5×10^5 Zellen geerntet und ihre DNA extrahiert. Die Zellen wurden zuvor viermal mit 1 x PBS gewaschen, um Plasmide zu entfernen, die unspezifisch an die Zelle gebunden haben. qPCR erfolgten jeweils in Triplikaten mit DNA, die 1×10^3 Zellen repräsentiert. Die Anzahl der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle wurde bestimmt, indem die erhaltenen Ct-Werte in Relation zu denen der mitgeführten Standards gesetzt wurden. In Abbildung 17 wurde die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle zum jeweiligen Zeitpunkt aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt. Innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Transfektion nimmt die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle ausgehend von ≈ 430 zum Zeitpunkt 0 h, über ≈ 12.000 nach 2 h auf ≈ 30.000 nach 6 h zu. Im Zeitraum von 6 bis 72 h nach Transfektion hingegen bleibt die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle relativ konstant (24 h: ≈ 28.000 ; 48 h: ≈ 27.000 und 72 h: ≈ 34.000). COS-7 Zellen, die mit pcDNA-sGFP transfiziert wurden, exprimierten in allen drei unabhängigen Versuchen gleichermaßen sGFP.

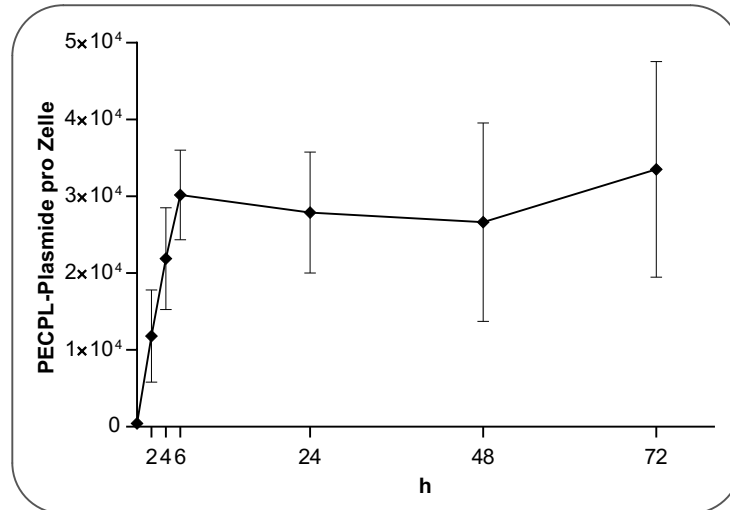


Abbildung 17: Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach Transfektion mit dem FuGENE® HD-Standardprotokoll.

Die Quantifizierung der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle erfolgte durch qPCR. Die dabei erhaltenen Ct-Werte aus drei unabhängigen Experimenten wurden in Relation zu den mitgeführten Standardkurven gesetzt (Steigungen: $-3,55 \pm 0,07$, $R^2 = 0,995 \pm 0,005$). Die Mittelwerte der Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle wurden zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 24, 48 und 72 h nach der Transfektion mit jeweils 10 ng/ μ l PECPL und HLA-A2-pHSE Plasmid-DNA angegeben. Die Effizienz der qPCR beträgt $0,92 \pm 0,03$. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Mittelwerte dar.

3.4.2.2 Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle nach FuGENE® HD Transfektionen mit verschiedenen PECPL-Konzentrationen

Üblicherweise werden die COS-7 Zellen in einem Aktivierungsversuch 48 und 72 h nach der Transfektion mit einer Kapillare isoliert. Um die Anzahl der PECPL-Plasmide pro Zelle zu diesen Zeitpunkten zu reduzieren, wurden die Bedingungen des Standardprotokolls der FuGENE® HD Transfektion bezüglich der PECPL-Konzentration modifiziert. COS-7 Zellen wurden deshalb mit vier verschiedenen PECPL-Konzentrationen (3,3 ng/ μ l, 1,0 ng/ μ l, 0,33 ng/ μ l sowie 0,10 ng/ μ l) transfiziert. Für den direkten Vergleich wurden COS-7 Zellen in einem Parallelansatz gemäß Standardprotokoll transfiziert (10 ng/ μ l). Die eingesetzte Konzentration an HLA-A2-pHSE hingegen blieb mit 10 ng/ μ l bei allen fünf Transfektionsansätzen konstant. Für die Abschätzung der Transfektionseffizienz wurden COS-7 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an pcDNA-sGFP transfiziert. Als Negativkontrollen wurden COS-7 Zellen zudem mit Ansätzen versetzt, die die fünf verschiedenen Plasmid-DNA Konzentrationen, jedoch nicht das FuGENE® HD Transfektionsreagenz enthielten.

Zu den Zeitpunkten 48 h und 72 h nach der Transfektion wurden jeweils 5×10^5 COS-7 Zellen nach viermaligem Waschen mit 1 x PBS gerntet und ihre DNA extrahiert. Die

Quantifizierung der PECPL-Plasmide pro Zelle erfolgte mittels qPCR wie in 3.4.2.1 beschrieben.

Die Anzahl der PECPL-Plasmide pro Zelle zu den jeweiligen Zeitpunkten nach der Transfektion mit fünf verschiedenen PECPL-Konzentrationen wurde in Abbildung 18 dargestellt. Sie zeigt die gemittelten Werte aus drei unabhängigen Versuchen.

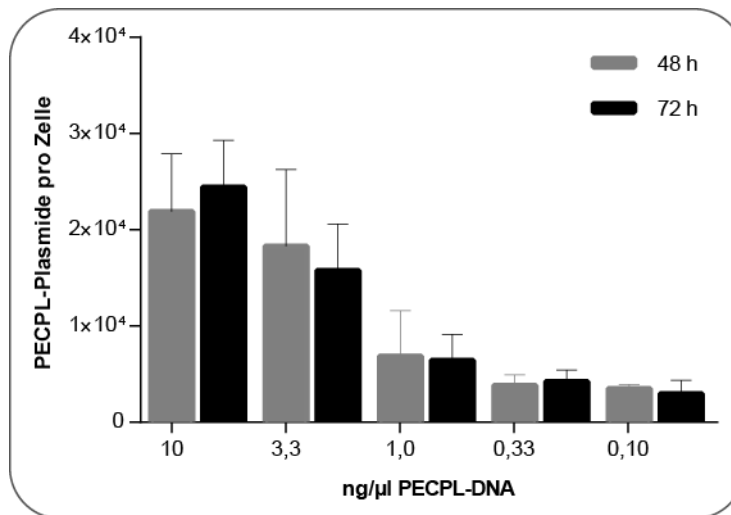


Abbildung 18: Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle 48 h und 72 h nach FuGENE® HD Transfektionen mit verschiedenen PECPL-Konzentrationen.

Die Zellen wurden hierfür gemäß dem Standardprotokoll mit 10 ng/μl PECPL sowie mit 3,3; 1,0; 0,33 und 0,10 ng/μl PECPL transfiziert. Die Quantifizierung der PECPL-Plasmide erfolgte durch qPCR in drei unabhängigen Experimenten. Die dabei erhaltenen Ct-Werte der zu analysierenden Proben wurden in Relation zu den mitgeführten Standardkurven gesetzt (Steigungen: $-3,55 \pm 0,05$; $R^2 = 0,998 \pm 0,001$). Die gemittelte Anzahl der PECPL-Plasmide pro Zelle wurde für die Zeitpunkte 48 h (grau) und 72 h (schwarz) nach der Transfektion angegeben. Die Effizienz der drei qPCR beträgt $0,91 \pm 0,02$. Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar.

Je weniger PECPL-DNA transfiziert wird, desto niedriger ist die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle zu den jeweiligen Zeitpunkten. Die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle der beiden Zeitpunkte 48 und 72 h unterscheidet sich dabei, wie erwartet, nur wenig (Abbildung 17). Durch die Transfektion von 0,10 ng/μl bis 10 ng/μl können einzelne COS-7 Zellen generiert werden, die PECPL-Plasmide im Bereich von \square 3.000 bis 24.000 aufweisen. Werden 0,33 ng/μl, 1,0 ng/μl bzw. 3,3 ng/μl PECPL transfiziert, so enthält eine Zelle nach 48/72 h \square 4.000, \square 6.500 bzw. \square 17.000 PECPL-Plasmide.

Um auszuschließen, dass die verminderte Anzahl der PECPL-Plasmide pro Zelle bei Transfektionen auf die Adsorption der geringen PECPL-DNA an Transfektionsgefäße

zurückzuführen ist, erfolgte ein Kontrollversuch, bei dem zwei verschiedene Ansätze parallel transfiziert wurden: Der eine Ansatz enthielt 0,10 ng/μl PECPL-DNA, während der zweite zusätzlich mit 9,9 ng/μl Träger-DNA aus Heringsperma versetzt wurde. Die Konzentration an Träger-DNA entspricht der Differenz der eingesetzten Konzentration an PECPL-DNA im Vergleich zum Standardprotokoll. qPCR erfolgten mit DNA von 1×10^3 transfizierten Zellen, die zu den Zeitpunkten 0, 2, 4, 6, 24, 48 und 72 h geerntet wurden. Bei der Quantifizierung konnten keine signifikanten Unterschiede detektiert werden. Artefakte durch Adsorption der Plasmide können daher ausgeschlossen werden. Die mitgeführten Negativkontrollen zeigen, dass die Anzahl der PECPL-Plasmide, die unspezifisch an die Zellmembran von COS-7 Zellen gebundenen haben, vernachlässigbar ist. Nach 48/72 h wurden lediglich bei den drei höchsten Konzentrationen an Plasmid-DNA durchschnittlich 5/2 (10 ng/μl), 2/1 (3,3 ng/μl) und 1/0 (1,0 ng/μl) PECPL-Plasmide pro Zelle nachgewiesen. Demzufolge werden durch das viermalige Waschen mit PBS unspezifisch gebundene PECPL-Plasmide nahezu vollständig entfernt.

COS-7 Zellen, die parallel mit unterschiedlichen Konzentrationen an pcDNA-sGFP transfiziert wurden, exprimieren in allen drei unabhängigen Versuchen gleichermaßen sGFP. Mit abnehmender Konzentration an Plasmid-DNA sinkt der Anteil sGFP exprimierender Zellen.

3.4.2.3 Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach Nukleofektionen mit verschiedenen PECPL-Konzentrationen

Für die Bestimmung der Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zellen wurden COS-7 Zellen gemäß dem hier etablierten Nukleofektionsprotokoll (2.5.5.2) transfiziert. Um verschiedene Ausgangszahlen an transfizierten PECPL-Plasmiden pro Zelle zu erzielen, erfolgten Nukleofektionen mit variierenden Konzentrationen an PECPL-DNA (10 ng/μl, 1 ng/μl und 0,1 ng/μl) und 10 ng/μl HLA-A2-pHSE. Um auszuschließen, dass eine Reduzierung der Anzahl der PECPL-Plasmide pro Zelle durch die Adsorption der geringen PECPL-DNA an Transfektionsgefäße erfolgt, wurden auch hier zusätzliche Kontrollen mitgeführt. Bei den Kontrollen wurde zu den Transfektionsansätzen Träger-DNA hinzugefügt, sodass vergleichbar zum Standardprotokoll (10 ng/μl PECPL) jeweils final 10 ng/μl DNA vorlagen. Als Negativkontrolle wurden COS-7 Zellen ohne Plasmid-DNA transfiziert.

Die Effizienz der Nukleofektion wurde abgeschätzt, indem COS-7 Zellen mit 0,1 ng/μl, 1 ng/μl und 10 ng/μl pcDNA-sGFP transfiziert und 48 h nach der Nukleofektion mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. Nach der Transfektion von 0,1 ng/μl, 1 ng/μl bzw. 10 ng/μl PECPL exprimierten demzufolge durchschnittlich $3 \pm 0 \%$, $24 \pm 1 \%$ bzw. $72 \pm 2 \%$ der COS-7 Zellen sGFP.

Zu den Zeitpunkten 2, 6, 24, 48 und 72 h nach der Nukleofektion wurden 2×10^5 Zellen der verschiedenen Nukleofektionsansätze geerntet und viermal mit 1 x PBS gewaschen, um Plasmide zu entfernen, die unspezifisch an die Zellmembran gebunden waren. Die DNA der Zellen wurde extrahiert und die Quantifizierung der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle erfolgte, wie in 3.4.2.1 beschrieben, durch qPCR. Die Anzahl der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle der verschiedenen Nukleofektionsansätze ist in Abbildung 19 dargestellt und zeigt die gemittelten Werte aus drei unabhängigen Experimenten.

Die drei Kurven der verschiedenen Nukleofektionsansätze in Abbildung 19 A weisen einen ähnlichen Verlauf auf. Innerhalb der ersten sechs Stunden nach der Nukleofektion bleibt die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle konstant, während sie im Zeitintervall von 6 bis 48 h nach der Nukleofektion stark ansteigt und zwischen 48 und 72 h abnimmt. Die Transfektion mit geringeren PECPL-Konzentrationen führt zu einer reduzierten Anzahl aufgenommener PECPL-Plasmide pro Zelle. Zwei Stunden nach der Nukleofektion enthält eine Zelle durchschnittlich ≈ 20 , ≈ 200 bzw. ≈ 1.000 PECPL-Plasmide, wenn COS-7 Zellen mit 0,1 ng/μl, 1 ng/μl bzw. 10 ng/μl PECPL transfiziert wurden. Die Anzahl an PECPL-Plasmiden erreicht 48 h nach der Nukleofektion mit ≈ 2.000 (0,1 ng/μl), ≈ 14.000 (1 ng/μl) bzw. ≈ 30.000 (10 ng/μl) PECPL-Plasmiden pro Zelle ihr Maximum. Der Anstieg der PECPL-Plasmide pro Zelle im Zeitintervall von 6 bis 48 h ist in der Amplifikation der PECPL-Plasmide durch die Zelle begründet.

Zwischen den Transfektionsansätzen mit und ohne Zusatz an Träger-DNA konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden (Abbildung 19 B). Die reduzierte Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle ist demzufolge nicht auf den Verlust der PECPL-DNA durch unspezifische Adsorption an Transfektionsgefäße zurückzuführen. Die Ct-Werte der Negativkontrolle liegen im Bereich von $34,7 \pm 1,6$. PCR Kontaminationen können demzufolge ausgeschlossen werden.

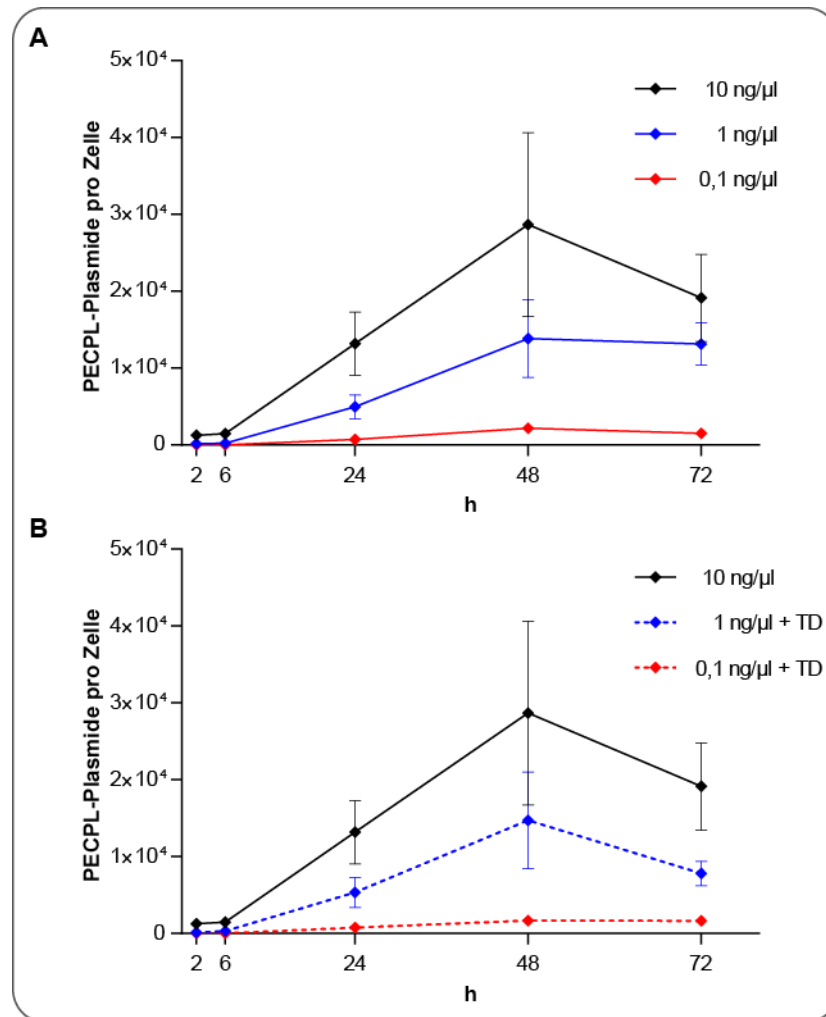


Abbildung 19: Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten nach Nukleofektionen mit unterschiedlichen PECPL-Konzentrationen.

COS-7 Zellen wurden hierfür mit (A) 10 ng/µl (schwarz), 1 ng/µl (blau) und 0,1 ng/µl PECPL (rot) sowie (B) 10 ng/µl PECPL (schwarz), 1 ng/µl PECPL+ 9 ng/µl Träger-DNA (TD) (blau gestrichelt) und 0,1 ng/µl PECPL + 9,9 ng/µl TD (rot gestrichelt) transfiziert. Die Quantifizierung der PECPL-Plasmide pro Zelle erfolgte zu den Zeitpunkten 2, 6, 24, 48 und 72 h nach der Nukleofektion durch qPCR. Die dabei erhaltenen Ct-Werte der zu analysierenden Proben wurden in Relation zu den mitgeführten Standards gesetzt (Standardkurven: Steigungen: $-3,54 \pm 0,02$; $R^2 = 0,998 \pm 0$). Die Mittelwerte der Anzahl an PECPL-Plasmiden pro Zelle aus drei unabhängigen Experimenten wurden zu den jeweiligen Zeitpunkten angegeben. Die Effizienz der qPCR beträgt $0,92 \pm 0,01$. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung der Triplikate dar.

3.4.3 Charakterisierung des PECPL-Repertoires einzelner COS-7 Zellen durch NGS

Zur Charakterisierung des PECPL-Repertoires einzelner COS-7 Zellen wurde die Gesamtanzahl an Plasmiden, die für Peptide kodieren ($\text{PECPL}_{\text{total}}$) sowie die Anzahl der Plasmide, die für verschiedene Peptide kodieren ($\text{PECPL}_{\text{diff}}$) pro COS-7 Zelle ermittelt. Die Quantifizierung von $\text{PECPL}_{\text{total}}$ und $\text{PECPL}_{\text{diff}}$ erfolgte hierbei durch NGS unter Verwendung der UID-Strategie (Abbildung 20). Hier wird in den allerersten Schritten eine Zufallssequenz („UID“) eingebaut, sodass idealerweise jedes initiale PCR-Produkt, das aus einem Plasmid entsteht, eine einzigartige Signatur erhält. Auf diese Weise kann man Plasmide „zählen“, und unterschiedliche Amplifikationseffizienzen in späteren Schritten korrigieren.

COS-7 Zellen wurden hierzu in drei parallelen Nukleofektionsansätzen mit 10 ng/ μl HLA-A2-pHSE sowie mit 0,1 ng/ μl , 1 ng/ μl bzw. 10 ng/ μl PECPL transfiziert. Zur Ermittlung der Effizienz der Nukleofektion wurden COS-7 Zellen in Parallelansätzen mit der gleichen Konzentration an pcDNA-sGFP transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach der Nukleofektion mittels Durchflusszytometrie analysiert. Nach der Transfektion von 0,1 ng/ μl , 1 ng/ μl bzw. 10 ng/ μl pcDNA-sGFP exprimierten demnach 4 %, 25 % bzw. 73 % der COS-7 Zellen sGFP. Die Effizienzen der Nukleofektionen liegen im erwarteten Bereich (3.4.2.3).

48 h nach der Nukleofektion wurde die Peptid-kodierende Sequenz aller PECPL-Plasmide einzelner COS-7 Zellen der drei verschiedenen Transfektionsansätze in einer ersten PCR mit einem UID verlängert (Abbildung 20). In der zweiten PCR wurden die UID-markierten Sequenzen amplifiziert und dabei parallel mit den Barcodes verlängert, die spezifisch für die jeweiligen Transfektionsansätze waren. In der dritten PCR wurden die Amplifikate mit Einzelzell-spezifischen Indices und Illumina Plattform kompatiblen Adaptoren verlängert. Hierfür wurde die Nextera-Technologie verwendet. Die Sequenzen der resultierenden Produkte wurden mit NGS bestimmt.

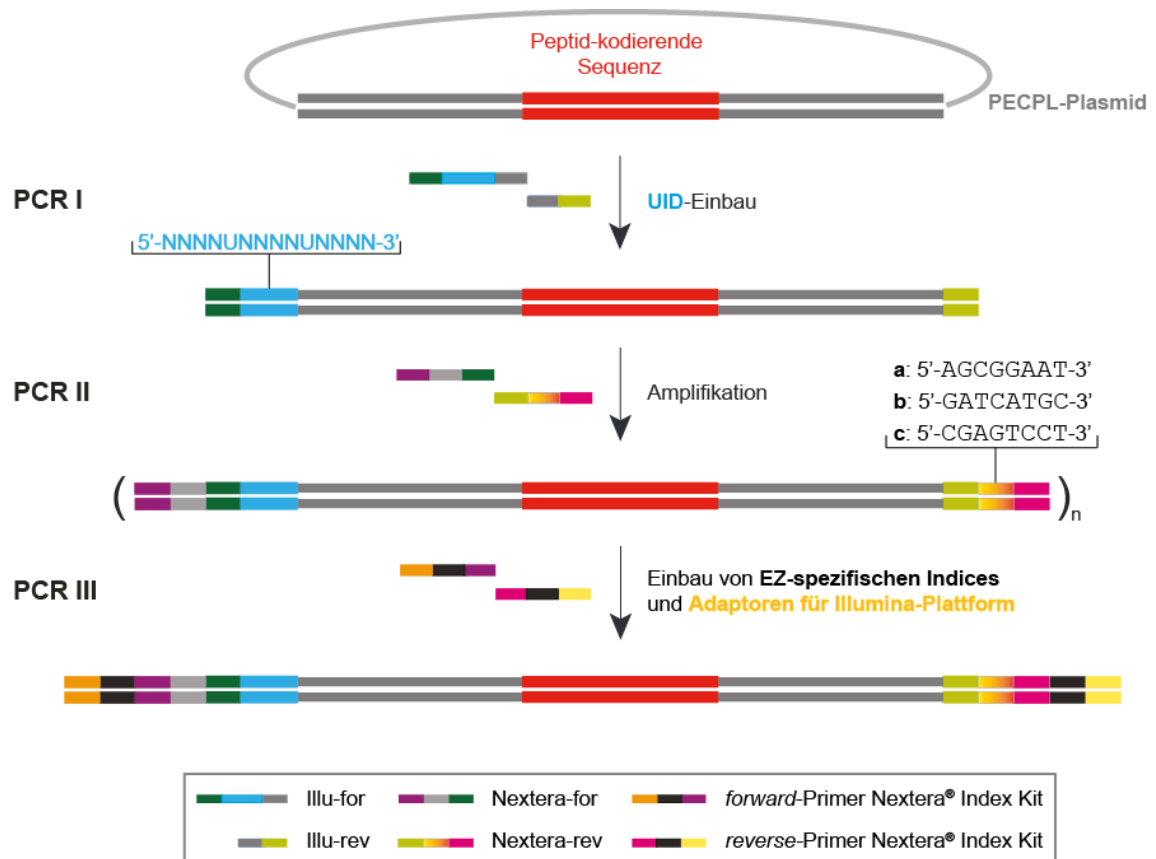


Abbildung 20: Schematischer Arbeitsablauf zur Quantifizierung von PECPL_{total} und PECPL_{diff} durch NGS.

In PCR I erfolgte der Einbau der UID-Nukleotide (blau) in die einzelnen Sequenzen aller PECPL-Plasmide (grau) von Einzelzellen der drei verschiedenen Nukleofektionsansätze (a: 10 ng/μl; b: 1 ng/μl; c: 0,1 ng/μl), die die Peptid-kodierende Sequenz enthalten (rot). Dabei wurde zudem das 5'- und 3'-Ende des templates mit Nukleotiden (grün) verlängert, die eine allgemeine Amplifizierung im nachfolgenden Schritt ermöglichen. In PCR II wurde jede einzelne UID-markierte Sequenz amplifiziert. Parallel dazu wurden die Zellen je nach Transfektionsbedingung mit spezifischen Barcodes (a: 10 ng/μl: 5'-AGCGGAAT-3'; b: 1 ng/μl: 5'-GATCATGC-3'; c: 0,1 ng/μl: 5'-CGAGTCCT-3') und mit weiteren Nukleotiden verlängert (lila/pink). In PCR III wurde den Amplifikationsprodukten Einzelzell (EZ)-spezifische Indices (schwarz) zugewiesen, anhand deren im späteren Verlauf die Sequenzen der PCR-Produkte einer definierten Einzelzelle zugeordnet werden können. Zudem wurden die Amplifikate mit Illumina Plattform kompatiblen Adaptoren (orange/gelb) ergänzt, die für die Sequenzierung notwendig sind. Unterschiedliche Farben der Primersegmente zeigen, wo der entsprechende Primer an sein template hybridisiert.

Bei der Sequenzierung wurden für jeweils 94 Einzelzellen der drei Transfektionsansätze und sechs Negativkontrollen insgesamt 2.141.615 lesbare Sequenzen erhalten. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte, wie im Detail in 2.7.5 beschrieben, nach den nachfolgenden Kriterien: Erstens, es wurden nur Sequenzen berücksichtigt, die einen UID sowie einen Transfektionsansatz-spezifischen Barcode enthielten. Dies traf auf 1.544.032 Sequenzen zu (Tabelle 10). Zweitens wurden die Sequenzen auf das Vor-

handensein von Duplikaten untersucht. Traten Duplikate auf, so wurden diese entfernt. Dabei verblieben insgesamt 1.376.903 Sequenzen. Drittens wurden nur Sequenzen in die nachfolgende Analyse mit einbezogen, die über die Peptid-kodierende Sequenz (5'-ATG-N₂₄-TGA-3') verfügten. Insgesamt erfüllten 969.778 Sequenzen dieses Kriterium. Eine detaillierte Aufschlüsselung der Anzahl der Sequenzen der einzelnen Nukleofektionsansätze mit 10 ng/μl, 1 ng/μl bzw. 0,1 ng/μl PECPL ist in Tabelle 10 dargestellt.

Tabelle 10: Übersicht der durch NGS erhaltenen Sequenzen

Für die jeweiligen drei Nukleofektionsansätze (a: 10 ng/μl; b: 1 ng/μl; c: 0,1 ng/μl) wurde die Anzahl der Sequenzen mit UID und Transfektionsansatz-spezifischen (TS) Barcode, die Anzahl der Sequenzen ohne Duplikate sowie die Anzahl der Sequenzen angegeben, die die Peptid-kodierende Sequenz (5'-ATG-N₂₄-TGA-3') enthalten. Zudem wurden die jeweiligen Gesamtanzahlen aufgelistet.

	total	a	b	c
Anzahl Sequenzen mit UID und TS-Index	1.544.032	556.795	619.681	367.556
Anzahl Sequenzen ohne Duplikate	1.376.903	510.183	548.320	318.400
Anzahl Sequenzen mit 5'-ATG-N₂₄-TGA-3'	969.778	427.250	525.370	17.158

Für die weitere Analyse zur Bestimmung der Anzahl an PECPL_{diff} und PECPL_{total} auf Einzelzellebene wurden nachfolgend ausschließlich Sequenzen von Einzelzellen berücksichtigt, die ≤ 6 PECPL_{diff} enthielten (Negativkontrollen enthielten durchschnittlich 3 ± 3 PECPL_{diff}). Bei Nukleofektionen mit 10 ng/μl, 1 ng/μl bzw. 0,1 ng/μl PECPL trifft dieses Kriterium auf 60, 31 bzw. 17 Einzelzellen zu. Die PECPL_{diff} und PECPL_{total} dieser Einzelzellen wurden in Abbildung 21 A dargestellt. Sie zeigt, dass 65 % der Einzelzellen bei Nukleofektionen mit 0,1 und 1 ng/μl PECPL mehr als 100 PECPL_{total} aufweisen (Abbildung 21 B). Bei der Nukleofektion mit 10 ng/μl PECPL ist der Anteil dieser Zellen um 20 % geringer. Während bei allen drei Nukleofektionsansätzen nahezu gleich viele Zellen mit mehr als 10^3 PECPL_{total} generiert werden, sind Unterschiede in der Anzahl an Zellen mit größer 10^4 PECPL_{total} zu beobachten. Bei Nukleofektionen mit 1 ng/μl und 10 ng/μl PECPL weisen 6 % und 12 % der Einzelzellen mehr als 10^4 PECPL_{total} auf. Bei der Nukleofektion von 0,1 ng/μl konnten keine Einzelzellen mit mehr als 10^4 PECPL_{total} nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurde der durchschnittliche Wert der $\text{PECPL}_{\text{diff}}$ der analysierten Einzelzellen bestimmt. COS-7 Zellen enthalten bei Nukleofektionen mit $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ PECPL durchschnittlich $\bar{\square} 239 \text{ PECPL}_{\text{diff}}$, mit $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ PECPL $\bar{\square} 131 \text{ PECPL}_{\text{diff}}$ und mit $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ PECPL $\bar{\square} 32 \text{ PECPL}_{\text{diff}}$ (Abbildung 21 B).

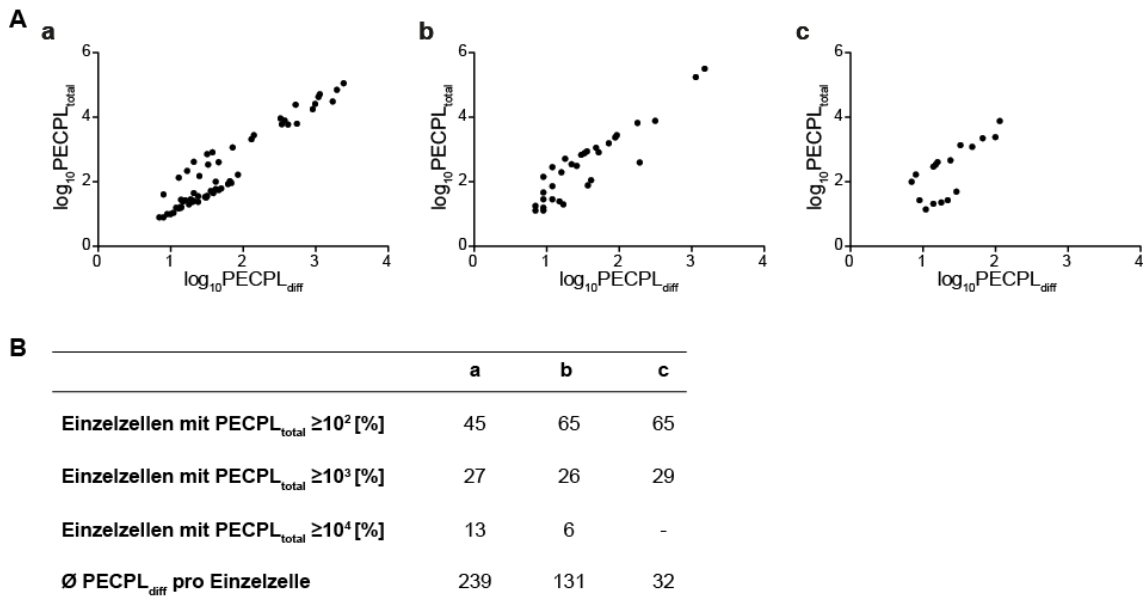


Abbildung 21: $\text{PECPL}_{\text{diff}}$ zu $\text{PECPL}_{\text{total}}$ der Einzelzellen verschiedener Nukleofektionsansätze.

(A) Aufgetragen wurde der $\log_{10} \text{ PECPL}_{\text{total}}$ gegen den $\log_{10} \text{ PECPL}_{\text{diff}}$ analysierter Einzelzellen der Nukleofektionsansätze mit $10 \text{ ng}/\mu\text{l}$ PECPL (a), $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ PECPL (b) und $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ PECPL (c). Alle dargestellten Einzelzellen weisen $\text{PECPL}_{\text{diff}}$ größer 6 auf. (B) Der Prozentsatz der analysierten Einzelzellen aus (A), die mehr als 10^2 , 10^3 und 10^4 $\text{PECPL}_{\text{total}}$ aufweisen, wurde aufgelistet. Zudem wurde der Durchschnitt ($\bar{\square}$) der $\text{PECPL}_{\text{diff}}$ pro Einzelzelle des jeweiligen Nukleofektionsansatzes angegeben.

Für die Analyse der Amplifikationsrate verschiedener PECPL-Plasmide wurde die Häufigkeit der einzelnen Peptid-kodierenden Plasmide einer jeden Zelle in Relation zur $\text{PECPL}_{\text{total}}$ der jeweiligen Zelle gesetzt. Dabei konnten bei allen Nukleofektionsansätzen die nachfolgenden drei Amplifikationsmuster beobachtet werden: alle $\text{PECPL}_{\text{diff}}$ einer Zelle wurden gleichermaßen amplifiziert (Muster I); $\bar{\square} 2$ unterschiedliche PECPL-Plasmide lagen häufiger vor (Muster II) und ein PECPL-Plasmid wurde überwiegend amplifiziert (Muster III) (Abbildung 22 A).

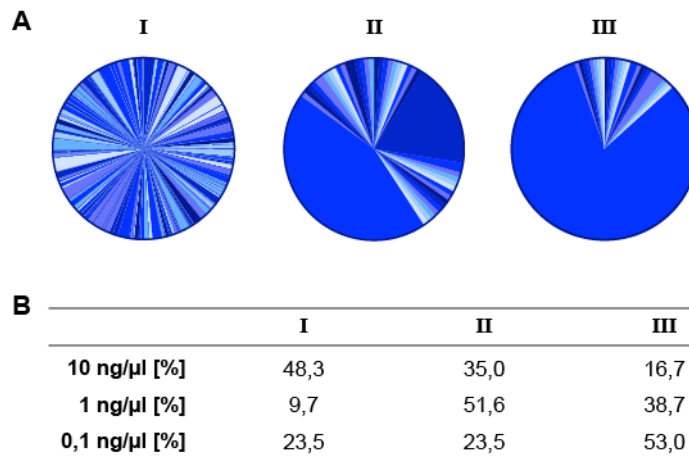


Abbildung 22: Amplifikationsmuster der Einzelzellen.

(A) Schematische Darstellung der drei verschiedenen Amplifikationsmuster. Die Kreisflächen stellen PECPL_{total} und die Segmente die Häufigkeit der einzelnen PECPL_{diff} dar. Muster I: alle PECPL-Plasmide werden von der Zelle gleichmäßig amplifiziert; Muster II: zwei oder mehrere PECPL-Plasmide (hier zwei) werden von der Zelle häufiger amplifiziert und Muster III: ein PECPL-Plasmid wird hauptsächlich von der Zelle amplifiziert. (B) Es wurde der Prozentsatz der analysierten Einzelzellen aus Nukleofektionen mit 10 ng/μl, 1 ng/μl und 0,1 ng/μl PECPL aufgelistet, die das entsprechende Amplifikationsmuster aus (A) aufweisen.

Bei den drei Transfektionsansätzen sind Unterschiede in der Häufigkeit der Amplifikationsmuster zu sehen. Während Einzelzellen bei der Nukleofektion mit 10 ng/μl PECPL überwiegend Muster I und II aufweisen, sind bei Ansätzen mit 1 ng/μl PECPL bzw. 0,1 ng/μl PECPL Muster II und III bzw. Muster III vorwiegend zu beobachten (Abbildung 22 B). Die Amplifikationsmuster der analysierten Einzelzellen aus den drei verschiedenen Transfektionsansätzen sind in Appendix II dargestellt.

4 Diskussion

Die Identifizierung der Zielstrukturen von CD8⁺-T-Zellen ist äußerst relevant, da sie Aufschlüsse über die Ätiologie und Pathogenese von verschiedenen Erkrankungen, wie beispielsweise MS und PV, ermöglichen und die Grundlage neuer Therapien darstellen. Die kürzlich innerhalb unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode zur Identifizierung von CD8⁺-T-Zell Antigenen, die mit einem bereits detailliert charakterisierten TZR verifiziert wurde, scheint dazu Erfolg versprechend zu sein.

In der vorliegenden Arbeit wurde die PECPL-Technologie validiert, ihre Bedeutsamkeit unterstrichen und zu ihrer Optimierung beigetragen: Das Peptid GPCPD1(14-22) im Komplex mit HLA-A2 konnte basierend auf zuvor mit der PECPL-Technologie erhaltenen Erkenntnissen als potentielles Antigen des autoreaktiven TZR 2D1 identifiziert werden und damit die vermutete Alloreaktivität des TZR 2D1 belegen.

Die Charakterisierung des pathogenen TZR V□3S1J□45.1-V□13S1J□1.1 mittels dieser Technologie führte zur Entdeckung von drei weiteren HLA-C6-restringierten Epitopen. Transfektionsbedingungen wurden etabliert, die APC mit definierter Anzahl an PECPL-Plasmiden generieren. Dies ist die Grundlage für zukünftig wesentlich effizientere Antigensuch-Experimente.

4.1 Validierung der PECPL-Technologie und weitere Charakterisierung des TZR 2D1

Die PECPL-Methode wurde mit dem TZR JM22 entwickelt, dessen Struktur und Spezifität bereits im Voraus detailliert charakterisiert war (Siewert et al., 2012). Um die Technologie zu validieren, sollten in der vorliegenden Arbeit potentielle HLA-A2-restringierte oktamere Antigene des TZR 2D1, die zuvor erstmals mit der PECPL-Methode identifiziert wurden (Niedl, 2014), durch PECPL unabhängige Methoden bestätigt werden. Zudem könnte die von Friese et al. aufgestellte und durch die PECPL-Versuche gestützte Hypothese der Alloreaktivität des pathogenen TZR 2D1 gegenüber endogenen Peptid:HLA-A2-Komplexen in dreifach transgenen Mäusen bestätigt werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass mit der zuvor genannten Methode Antigene eines TZR mit bisher unbekannter Spezifität und sogar Antigene auf allogenen HLA-Klasse-I-Molekülen identifiziert werden können. Dies trägt zur weiteren Charakterisierung des TZR 2D1 bei. Es konnte erstmals gezeigt werden, dass der TZR 2D1 von nonameren Peptiden aktiviert wird. Zudem konnte erstmals belegt werden, dass der TZR V[2]J[21]-V[15.1]J[2.7] des dualen TZR 2D1, wie vermutet, kreuzreaktiv ist und Alloreaktivität gegenüber Peptid:HLA-A2-Komplexen aufweist. GPCPD1(14-22) wurde als mögliches natürlich vorkommendes Antigen des TZR 2D1 identifiziert.

4.1.1 Identifizierung oktamerer und nonamerer HLA-A2-restringierter Epitope des TZR 2D1

In vorangegangenen Studien wurden die drei Mimotope LIGEVFVL, LVGEVWGL und LLGEVFEL aus der PECPL 8X^{8L} mittels der PECPL-Technologie als mögliche HLA-A2-restringierte Epitope des TZR 2D1 identifiziert und bildeten die Grundlage zur Entdeckung natürlich vorkommender, potentieller antigener Peptide in Datenbanken (Niedl, 2014). Die Analyse verschiedener Datenbanken ergab die vier Kandidatenantigene EML5(997-1004), DMXL2(813-820), NCAN(257-264) und GPCPD1(15-22). Erste Aktivierungsversuche mit Plasmid-kodierten Peptiden wiesen darauf hin, dass diese vom TZR 2D1 erkannt werden (Niedl, 2014). Hier konnten mit den beiden Mimotopen LIGEVFVL und LVGEVWGL sowie dem Peptid GPCPD1(15-22) lediglich drei der sieben potentiellen Epitope in Aktivierungsversuchen mit synthetischen Peptiden bestätigt werden. Diese Diskrepanz zu den vorherigen Beobachtungen konnte darauf zurückgeführt werden, dass in Aktivierungsversuchen mit Plasmid-kodierten Peptiden nicht nur, wie bisher angenommen, eine Variante des Peptids, sondern darüber hinaus noch eine weitere Variante in der APC vorliegt, die N-terminal mit der Aminosäure Met verlängert ist und zur Aktivierung des TZR führen kann. Diese zweite Variante resultiert dadurch, dass die Plasmid-kodierten Peptide zunächst mit dem Startcodon Met synthetisiert werden und das Enzym Met-AP, das gewöhnlich den N-terminalen Met-Rest im Zytosol der APC abspaltet, in dem vorliegenden Fall inhibiert ist. Studien haben gezeigt, dass eine Inhibition der Met-AP erfolgt, wenn die Aminosäure, die auf den Met-Rest folgt, einen großen, sterisch anspruchsvollen Aminosäurerest aufweist (Wiltschi et al., 2009). In dem vorliegenden Fall liegt bei sechs der sieben potentiellen Epitope der vorausgegangenen Studie an Position 1 die große Aminosäure Leu vor, sodass anzunehmen ist, dass die Met-Abspaltung wie beschrieben gehemmt ist. Zum

anderen kann die Effizienz der Met-AP durch einen Überschuss an Substrat erniedrigt werden. Aufgrund der Tatsache, dass bei der vorausgegangenen Studie PECPL verwendet wurden, die unter dem SV40 Promotor exprimiert werden, der von den COS-7 Zellen amplifiziert wird, kann davon ausgegangen werden, dass in der Zelle viele PECPL-Plasmide vorliegen und infolgedessen eine Vielzahl an Peptiden. Dies würde ebenfalls eine verminderte Abspaltung des N-terminalen Met implizieren. In PECPL transfizierten Zellen liegen also zwei verschiedene Peptidvarianten vor. Im Fall des TZR 2D1 können offensichtlich beide Varianten dessen Aktivierung bewirken, wobei die Nonamere besser als die Oktamere banden und aktivierten. Somit konnte das Repertoire an HLA-A2-restringierten Antigenen des TZR 2D1 innerhalb der vorliegenden Arbeit spezifiziert und um acht zusätzliche Epitope erweitert werden. Darüber hinaus konnte dadurch gezeigt werden, dass der TZR 2D1 nicht nur oktamere Peptide, sondern auch nonamere Peptide erkennt. Die Tatsache, dass die 58-2D1-CD8-sGFP Zellen in der Gegenwart von antigenen nonameren Peptid:HLA-A2-Komplexen im Vergleich zu antigenen oktameren Peptid:HLA-A2-Komplexen größere Mengen an IL-2 exprimieren, lässt vermuten, dass Nonamere den TZR stärker aktivieren. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der Annahme, dass HLA-Klasse-I-restringierte TZR eine Präferenz für antigene Peptide mit definierter Länge aufweisen (Ekeruche-Makinde et al., 2013).

Unter den in dieser Arbeit identifizierten Antigenen des TZR 2D1 befinden sich zwei in Maus und Mensch natürlich vorkommende Peptide des Proteins GPCPD1: das oktamere Peptid GPCPD1(15-22) und das nonamere Peptid GPCPD1(14-22). Die Tatsache, dass das nonamere Peptid GPCPD1(14-22) den TZR 2D1 stärker aktiviert, lässt vermuten, dass dieses wahrscheinlich das Zielantigen ist, das von HLA-A2 präsentiert wird.

4.1.2 Bindungsmotive der antigenen Peptid:HLA-A2-Komplexe des TZR 2D1

Drei HLA-A2-restringierte Epitope aus vorangegangenen Studien (Niedl, 2014) wurden in der vorliegenden Arbeit als Antigene des TZR 2D1 bestätigt. Darüber hinaus konnten acht weitere Epitope des TZR identifiziert werden. In Abbildung 23 wurden die Aminosäuren graphisch dargestellt, die an den jeweiligen Positionen der elf identifizierten HLA-A2 bindenden, antigenen Peptide auftreten. Sie zeigt, dass die Epitope an den Positionen 2 und 9 mit Met und Leu bzw. Leu und Ile die von HLA-A2 bevorzugten Anker-Aminosäuren aufweisen. Zudem enthalten alle antigenen Peptide an den Posi-

tionen 4 bis 6 das Aminosäurenmuster Gly-Glu-Val, während die Aminosäuren an den Positionen 3 und 8 eine größere Vielfalt aufweisen.



Abbildung 23: Bindungsmotiv der Aminosäuren an den Positionen 1 bis 9 der HLA-A2-restringierten antigenen Peptide des TZR 2D1.

Es wurden alle Aminosäuren angegeben, die an der jeweiligen Position der nonameren antigenen Peptide detektiert wurden.

Die zuvor beschriebenen Peptide werden trotz ihrer unterschiedlichen Aminosäurezusammensetzungen vom gleichen TZR erkannt. Dies steht im Einklang mit dem Konzept der Kreuzreaktivität, die das Phänomen beschreibt, dass ein TZR nicht nur einen, sondern mehrere Peptid:HLA-Komplexe erkennen kann (Sewell, 2012; Wooldridge et al., 2012; Wucherpfennig et al., 2007). Verschiedene Mechanismen der Kreuzreaktivität wurden bereits identifiziert (Abbildung 4). Zugrunde liegende Mechanismen könnten demzufolge u. a. Konformationsänderungen in der CDR3-Schleife (Mazza et al., 2007) oder in den V-Domänen des TZR (Yin et al., 2011) sein. Darüber hinaus wäre molekulare Mimikry, wie bereits beschrieben, über einen *induced fit*-Mechanismus denkbar, bei dem die beiden Peptide eine ähnliche Konformation infolge der Bindung des TZR einnehmen (Macdonald et al., 2009).

4.1.3 Molekulare Ursachen der unterschiedlichen Aktivierungspotentiale nonamerer und oktamerer Peptid:HLA-A2-Komplexe gegenüber TZR 2D1

Um die unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften der HLA-A2-Komplexe mit oktameren und nonameren Peptiden (3.1.2 und 3.1.3) zu illustrieren, wurden die Strukturen der GPCPD1(15-22)-, M-GPCPD1(15-22)- und GPCPD1(14-22):HLA-A2-Komplexe *in silico* simuliert. Die Simulation der Moleküldynamik (MD) erfolgte durch Atanas Patronov und Maria Kalemanov vom Department Biowissenschaftliche Grundlagen der Technischen Universität München, Freising. Die dabei erhaltenen molekularen Strukturen der Peptid:HLA-A2-Komplexe mit den drei verschiedenen GPCPD1 Peptiden tragen zum Verständnis der Ursache der stärkeren Aktivierung des TZR 2D1 durch Nonamere im Vergleich zu Oktameren bei. Die Strukturen zeigen, dass dabei die

erste Aminosäure der nonameren Peptide am N-Terminus einen entscheidenden Einfluss auf die Konformation und die Stabilität des Peptids in der Bindungsfurche ausübt (Abbildung 24).

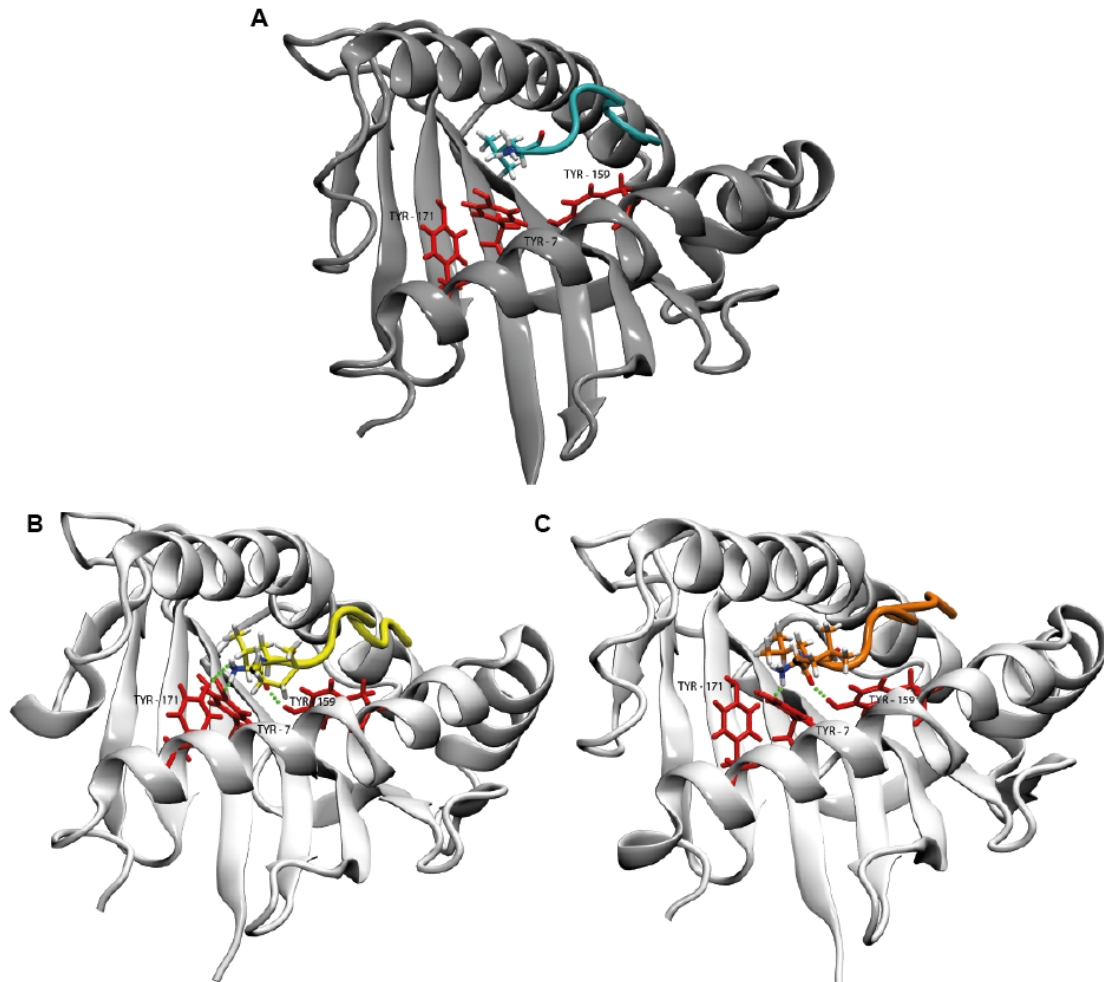


Abbildung 24: Struktur-Modelle der GPCPD1(15-22):HLA-A2-, M-GPCPD1(15-22):HLA-A2- und GPCPD1(14-22):HLA-A2-Komplexe.

(A) Aufsicht auf den N-Terminus des HLA-A2-Moleküls (dunkelgrau), an das Oktamer GPCPD1(15-22) (türkis) gebunden hat. Die freie Aminogruppe des oktameren Peptids interagiert nicht mit den Tyrosinresten Y7, Y159 und Y171 des HLA-A2-Moleküls, die in rot abgebildet wurden. (B) Aufsicht auf den N-Terminus des HLA-A2-Moleküls (hellgrau), an das Nonamer M-GPCPD1(15-22) (gelb) gebunden hat. Die freie Aminogruppe des Methionins des Nonamers bildet Wasserstoffbrücken (grün) mit der Tyrosintriade (rot) aus und stabilisiert auf diese Weise das gebundene Peptid. (C) Aufsicht auf den N-Terminus des HLA-A2-Moleküls (hellgrau), an das Nonamer GPCPD1(14-22) (orange) gebunden hat. Die drei Tyrosinreste (rot) haben einen stabilisierenden Effekt auf das gebundene Peptid. Sie formen Wasserstoffbrücken (grün) mit der freien Aminogruppe des L14 des Nonamers (aus Rühl et al., 2016).

Die Aminosäuren an Position 1 beider nonamerer Peptide M-GPCPD1(15-22) und GPCPD1(14-22) können Wasserstoffbrücken zu drei verschiedenen Tyrosinresten aus-

bilden, die innerhalb der HLA-A2-Bindungsfurche lokalisiert sind. Bei dem oktameren Peptid hingegen entspricht die erste Aminosäure der Position 2 der nonameren Peptide und die Tyrosintriade ist räumlich zu weit von der ersten Aminosäure des Oktamers entfernt. Dadurch können sich keine stabilisierenden Wechselwirkungen ausbilden. Letzteres steht im Einklang mit dem höheren *root mean square deviation*-Wert des oktameren Peptids (2,130 Å) gegenüber den beiden nonameren Peptiden (M-GPCPD1(15-22): 1,272 Å; GPCPD1(14-22): 1,474 Å), der darauf hinweist, dass das Oktamer schwächer gebunden ist. Die fehlende Stabilisierung durch die Wechselwirkung mit der Tyrosintriade wirkt sich auf die Peptidrückgrate der nachfolgenden Aminosäuren aus und führt dazu, dass sich die Konformation des oktameren Peptidrückgrats erheblich von denen der beiden nahezu identischen nonameren Peptidrückgrate unterscheidet. Lediglich die beiden Peptidrückgrate der als Anker-Positionen geltenden Aminosäuren L15 und I22 weisen bei allen drei Peptiden die gleiche Bindungskonformation in den Bindungstaschen B und F auf (Falk et al., 1991).

Dies ist im Einklang mit experimentellen Daten aus HLA-Rückfaltungen, die zeigen, dass Oktamere die Rückfaltung von Peptid:HLA-A2-Komplexen im Vergleich zu Nonameren mit geringerer Effizienz katalysieren (3.1.3). HLA-A2 bevorzugt in diesem Fall demzufolge die Bindung nonamerer Peptide. Dies stimmt zudem mit Beobachtungen aus Studien des HLA-Bindungsrepertoires überein, die beschreiben, dass überwiegend nonamere Peptide an HLA-A2 binden (Scull et al., 2012). Die fehlende Stabilisierung beim Oktamer bewirkt eine höhere Beweglichkeit des Peptids innerhalb der Bindungsfurche und führt zu einer schwächeren Aktivierung des TZR 2D1 gegenüber Nonameren (3.1.2). Die Aktivierungs- und Rückfaltungsexperimente validieren somit die simulierten Moleküldynamiken, die zeigen, dass die strukturellen Unterschiede des oktameren Peptids gegenüber den nonameren Peptide mutmaßlich die Ursache für die unterschiedlichen biologischen Eigenschaften der drei Peptid:HLA-A2-Komplexe sind.

4.1.3.1 Zwei strukturell unterschiedliche Peptid:HLA-Komplexe aktivieren den TZR 2D1

Während die Kristallstruktur des HLA-Klasse-I-Moleküls HLA-A2 bereits seit zwei Jahrzehnten bekannt ist (Bjorkman et al., 1987; Saper et al., 1991), wurde die des HLA-A3-Moleküls erst vor Kurzem bestimmt (McMahon et al., 2011). McMahon et al. konnten erstmals durch die Kristallisation des PLP(45-53):HLA-A3-Komplexes zeigen, dass die zum TZR gerichteten Strukturflächen des HLA-A3- und HLA-A2-Mole-

küls identisch sind. Sämtliche Aminosäurereste, die sich zwischen den beiden Molekülen innerhalb der α_1 - und α_2 -Domäne unterscheiden (AS 62, 66, 70, 74, 152), richten sich zur Bindungsfurche, sodass sie keinen Einfluss auf die Bindung des TZR haben. Diese Beobachtung ließ sie vermuten, dass strukturelle Mimikry zwischen Peptid:HLA-A3- und Peptid:HLA-A2-Komplexen auftreten kann, die zur Kreuzreaktivität des TZR führen und die Selektion des TZR im Thymus beeinflussen könnte (McMahon et al., 2011). Die Peptide, die dabei von den beiden HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, können sich dabei durchaus unterscheiden. Zwar binden beide Moleküle innerhalb ihrer Bindungstasche B bevorzugt Peptide, die an der Ankerposition 2 die Aminosäuren Leu oder Met aufweisen, jedoch führen strukturelle Unterschiede im mittleren Bereich der Bindungsfurche (AS 70, 97, 114 und 116) zu unterschiedlichen Aminosäurebindungsmotiven (Falk et al., 1991; McMahon et al., 2011). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit den zuvor beschriebenen Beobachtungen. Die von Atanas Patronov und Maria Kalemánov durch MD-Simulation erhaltene Struktur des GPCPD1(14-22):HLA-A2-Komplexes (Abbildung 25 A), der von dem TZR V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7 des dualen TZR 2D1 erkannt wird (3.1.5), weist eine ähnliche Oberfläche im Vergleich zum PLP(45-53):HLA-A3-Komplex (Abbildung 25 B) auf, der ebenfalls von diesem TZR erkannt wird.

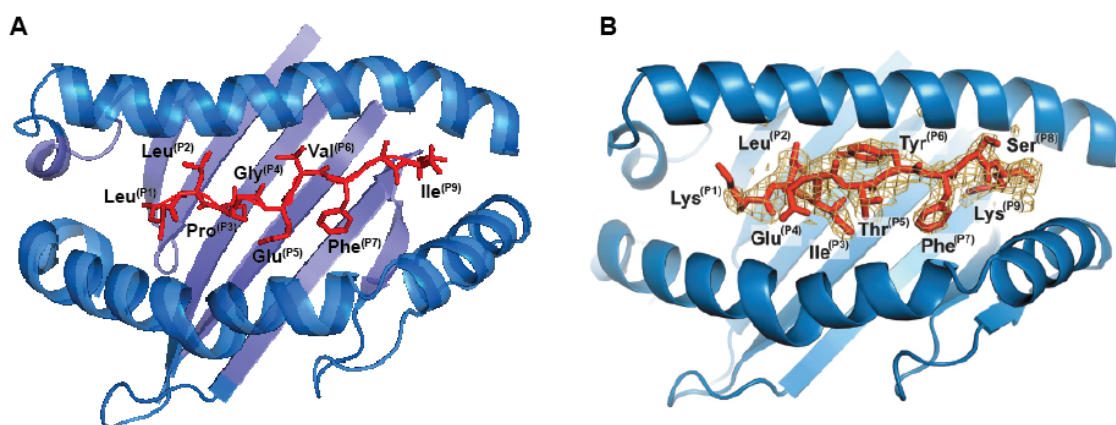


Abbildung 25: MD-simulierte Struktur des GPCPD1(14-22):HLA-A2-Komplexes und Kristallstruktur des PLP(45-53):HLA-A3-Komplexes.

(A) Aufsicht auf die HLA-A2-Bindungsfurche des GPCPD1(14-22):HLA-A2-Komplexes. Die Struktur wurde mit 10 ns simuliert. (B) Aufsicht auf die HLA-A3-Bindungsfurche des PLP(45-53):HLA-A3-Komplexes (adaptiert aus McMahon et al., 2011). Die schweren HLA-Ketten aus (A) und (B) wurden in blau, die Peptide in rot dargestellt. Zudem wurden die jeweiligen Aminosäuren an den entsprechenden Positionen (P) angegeben.

Bei beiden Peptid:HLA-Komplexen wird die Bindungstasche B von der bevorzugten Aminosäure Leu an der Anker-Position 2 besetzt und an Position 7 binden beide Molekülkomplexe die Aminosäure Phe. Deutlich unterschiedliche Aminosäurebindungsmotive können bei beiden Peptiden innerhalb der Positionen 4 bis 6 beobachtet werden. Während das Peptid PLP(45-53) an Position 4 die Aminosäure Glu mit ihrer negativ-geladenen Seitenkette aufweist, enthält GPCPD1(14-22) die neutrale Aminosäure Gly. An Position 6 wird der aromatische Seitenkettenrest des Tyr mit der Aminosäure Val durch einen aliphatischen ausgetauscht.

Diese Ergebnisse sind ein Beispiel dafür, dass zwei Peptid:HLA-Komplexe, die trotz unterschiedlicher Strukturen innerhalb ihrer jeweiligen Bindungsfurchen von demselben TZR erkannt werden. Bisher ist nur ein Beispiel eines allogenen TZR bekannt, der zwei unterschiedliche HLA-Klasse-II-Moleküle mit verschiedenen Peptiden erkennt (Lang et al., 2002). In diesem besonderen Fall wiesen hingegen beide Komplexe nahezu identische Strukturen auf und stellen ein Beispiel dafür dar, dass molekulare Mimikry auch mit HLA-Molekülen korrelieren kann. Derzeit ist nicht bekannt, wie es dem TZR 2D1 gelingt, diese beiden strukturell unterschiedlichen Komplexe gleichermaßen zu erkennen. Mögliche molekulare Mechanismen, die diese Kreuzreaktivität erklären könnten, wurden bereits detailliert in 4.1.2 beschrieben. Diese Frage wird allerdings nur durch Ko-Kristallisation beider Peptid:HLA-Komplexe mit TZR 2D1 beantwortet werden können.

4.1.4 *In vitro* Prozessierung von GPCPD1

Die von Friese et al. aufgestellte Hypothese, dass die Deletion des autoreaktiven TZR 2D1 im Thymus von dreifach transgenen Mäusen auf die Kreuzreaktion dieses TZR mit autologen Peptiden im Komplex mit HLA-A2 erfolgte (Friese et al., 2008), wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützt. Es konnte gezeigt werden, dass der TZR 2D1, der ursprünglich gegen den PLP(45-53):HLA-A3-Komplex generiert wurde, zudem durch das Peptid GPCPD1(14-22) auf HLA-A2 aktiviert wird. Wie im Fall des Peptids PLP(45-53) kommt das Peptid GPCPD1(14-22) in Maus und Mensch in identischer Form vor und stammt ebenfalls von einem körpereigenen Protein ab. Beide Proteine werden im Thymus exprimiert (Bastian et al., 2008). Gemäß dem Prinzip der negativen Selektion hätte der TZR 2D1 demzufolge bereits in der zweifach transgenen Maus aufgrund seiner Affinität gegenüber dem Selbstantigen PLP(45-53) durch Apoptose deletiert werden müssen (Klein et al., 2014). Gegenwärtig ist nicht bekannt

wie der autoreaktive TZR 2D1 in der zweifach transgenen Maus den Toleranzmechanismus umgangen hat. Im Fall der dreifach transgenen Maus hingegen ist anzunehmen, dass die Deletion des TZR 2D1 im Thymus vermutlich durch das Selbstantigen GPCPD1(14-22) ausgelöst wurde und so die Maus vor MS-ähnlichen Symptomen schützte. Unter dieser Annahme bleibt zudem zu erforschen, wie sich der TZR 2D1, der ursprünglich aus dem Blut eines MS-Patienten mit dem Genotyp HLA-A3 und HLA-A2 isoliert wurde, der negativen Selektion im Patienten entzogen hat. Wie zuvor beschrieben ist die Präsentation von Peptiden nahezu aller körpereigenen Proteine durch mTEC maßgeblich für die negative Selektion (Klein et al., 2014). Unterschiede in der Prozessierung von Antigenen zwischen murinen und humanen mTEC könnten möglicherweise eine Erklärung für die unterschiedliche Selektion des TZR 2D1 bei Maus und Mensch sein.

Da humane mTEC in der vorliegenden Arbeit nicht zugänglich waren, erfolgten Versuche zur Prozessierung des Proteins GPCPD1 mit humanen Makrophagen. Die Experimente deuten darauf hin, dass HLA-A2⁺-Makrophagen, die aus CD14⁺-Monozyten eines gesunden Spenders differenziert wurden, nicht in der Lage sind, die Protein-domäne GPCPD1(1-118) so zu prozessieren, dass dabei das antigene Peptid GPCPD1(14-22) entsteht. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass der hier eingesetzte Aktivierungsassay mit T-Hybridomzellen nicht sensitiv genug war, um geringe Oberflächendichten an antigenen GPCPD1(14-22):HLA-A2-Komplexen zu detektieren. Auch wenn Makrophagen das Protein nicht unter Bildung von GPCPD1(14-22) prozessieren können, schließt dies nicht aus, dass mTEC im Thymus dies könnten, insbesondere weil die genauen Prozessierungspräferenzen nicht im Detail bekannt sind.

4.2 Charakterisierung des TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1

Der autoreaktive TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 wurde aus einer epidermalen Läsion eines HLA-C6⁺-PV-Patienten isoliert (Kim et al., 2012a). Die Beobachtungen, dass epidermale CD8⁺-T-Zellen für das Auslösen von PV verantwortlich sind und bevorzugt die V \square 13S1-Kette verwenden, ließen eine pathologische Relevanz dieses TZR vermuten (Chang et al., 1995; Conrad et al., 2007). Vorexperimente zeigten eine spezifische Aktivierung des TZR durch HLA-C6⁺-Melanozyten und HLA-C6-restringierte Epitope des TZR konnten unter Verwendung von PECPL mit Anker-Positionen des HLA-C6 identifiziert werden (Tabelle 9).

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Identifizierung weiterer HLA-C6-restringierter Epitope aus einer PECPL ohne fixierte HLA-Anker die PECPL 9X verwendet. Dabei konnten drei weitere Mimotope MRSHRYLRL (Mimo7), RRYFRCLRM (Mimo8) und VRCWRGRRL (Mimo9) identifiziert werden. Die drei Mimotope weisen ähnliche Bindungsmotive wie die sechs Mimotope auf, die von Katherina Siewert aus PECPL mit HLA-C6-Anker-Positionen isoliert wurden (Tabelle 9). Alle Mimotope weisen an den Positionen 2 und 8 die positiv geladene Aminosäure Arg auf (Abbildung 26).

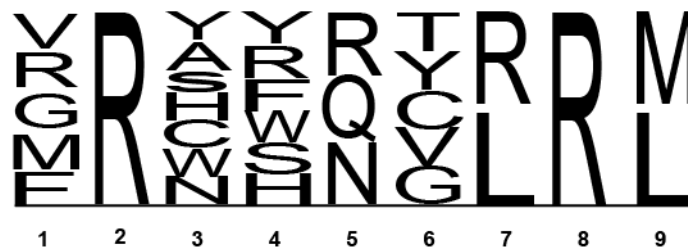


Abbildung 26: Bindungsmotiv der Aminosäuren an den Positionen 1 bis 9 der HLA-C6-restringierten Mimotope des TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1.

Es wurden alle Aminosäuren angegeben, die an der jeweiligen Position der Mimotope aus vorangegangenen Studien und aus der vorliegenden Arbeit detektiert wurden.

Die Aminosäure Arg tritt zudem überwiegend an den Positionen 5 und 7 auf, während an Position 9 überwiegend der HLA-C6-Anker Leu vorliegt. Die verbleibenden Positionen hingegen weisen ein größeres Spektrum möglicher Aminosäuren auf. Bereits bei TZR 2D1 und TZR JM22 wurde beobachtet, dass Epitope mit verschiedenen Aminosäuren an definierten Positionen zur Aktivierung des TZR führten und ist mit dem Prinzip der Kreuzreaktivität vereinbar (Sewell, 2012; Siewert et al., 2012; Wooldridge et al., 2012; Wucherpfennig et al., 2007; 3.1.1 und 3.1.2). Der Mechanismus, mit dem

der TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 fähig ist, die verschiedenen Peptid:HLA-C6-Komplexe zu erkennen, ist zur Zeit nicht bekannt. Verschiedene Mechanismen der Kreuzreaktivität, die bereits detailliert in 4.1.2 beschrieben wurden, könnten eine mögliche Erklärung auf molekularer Ebene sein.

Basierend auf den Bindungsmotiven der sechs Mimotope aus Vorexperimenten (Tabelle 9) und Mimo7 erfolgten verschiedene Datenbankenanalysen zur Identifizierung natürlich vorkommender Antigene. Dabei wurden die Aminosäuren 57-65 des *ADAMTS-like protein 5* (ADAMTSL5(57-65)) als spezifisches HLA-C6-restringiertes Autoantigen des TZR V \square 3S1J \square 45.1-V \square 13S1J \square 1.1 entdeckt (Arakawa et al., 2015). Dieses Ergebnis bildete die Grundlage für die weiteren Beobachtungen der Studie, in der gezeigt wurde, dass Melanozyten in psoriatischen Läsionen die Zielzellen der epidermalen CD8⁺-T-Zellen sind und dass das in der Epidermis ausschließlich von Melanozyten exprimierte Protein ADAMTSL5 ein Autoantigen ist, das von vielen Patienten mit PV erkannt wird.

Diese Ergebnisse sind zudem ein weiterer Beleg dafür, dass mit der PECPL-Methode Antigene mit biologischer Relevanz identifiziert werden können, die zum Verständnis der Pathogenese der Erkrankung beitragen.

4.3 Versuche zur Identifizierung von Antigenen des MAIT-verwandten TZR V α 7.2J α 58-V β 1J β 2.3 durch PECPL

Die Studie von Held et al. weist auf eine Antigen-spezifische Rekrutierung des MAIT-verwandten TZR V α 7.2J α 58-V β 1J β 2.3 in eine MS-Läsion hin und lässt vermuten, dass dieser TZR möglicherweise eine Rolle in der Pathogenese spielt. Die Identifizierung der Antigene dieses TZR könnte demzufolge zum Verständnis der MS-Pathogenese beitragen.

Aus diesem Grund erfolgten in der vorliegenden Arbeit Versuche zur Identifizierung von Antigenen des MAIT-verwandten TZR. Mit der PECPL-Technologie unter Verwendung von MR1 konnten keine Antigene identifiziert werden. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, dass MR1 Vitamin B Derivate und keine Peptide präsentiert (Kjer-Nielsen et al., 2012). Der Ligand des MR1 war zum Zeitpunkt der PECPL-Versuche nicht bekannt und in der Literatur wurden Lipide oder Peptide als vermutliche Kandidaten kontrovers diskutiert (Huang et al., 2005; Shimamura et al., 2007).

Mit der Erkenntnis von Kjer-Nielsen et al. wurden in unserer Arbeitsgruppe von Kathrin Held Vitamin B Derivate auf ihr Aktivierungspotential gegenüber den drei MAIT-verwandten TZR getestet. Dabei konnte jedoch ebenfalls keine Aktivierung beobachtet werden. Dies kann darin begründet sein, dass die TZR nicht das konservierte Tyr95 β in der CDR3 β -Schleife aufweisen, das für die Vitamin B Metabolit-induzierte Aktivierung benötigt wird (Reantragoon et al., 2013).

Die Tatsache, dass weder Peptid:MR1- noch Vitamin B Derivat:MR1-Komplexe den TZR V α 7.2J α 58-V β 1J β 2.3 aktivieren, lässt zwei weitere Möglichkeiten offen: Zum einen könnte der TZR wie klassische CD8⁺-T-Zellen Peptide im Kontext von HLA-Klasse-I-Molekülen erkennen. Dies könnte durch Versuche mit den HLA-Klasse-I-Molekülen des Patienten, aus dem der TZR isoliert wurde, und PECPL belegt werden. Zum anderen könnte die Aktivierung dieses TZR durch bisher unbekannte MR1-restringierte niedermolekulare Liganden ausgelöst werden. Dies wäre mit Beobachtungen aus Studien vereinbar, die vermuten lassen, dass MAIT-Zellen neben den bisherigen drei identifizierten Vitamin B Derivaten durch weitere, bisher unbekannte MR1-restringierte Liganden aktiviert werden (Gold et al., 2014; López-Sagaseta et al., 2013).

4.4 Optimierung und Standardisierung der Antigensuchtechnologie

Das hohe Potential der PECPL-basierten Methode zur Identifizierung von CD8⁺-T-Zell Antigenen (Siewert et al., 2012) wurde in vorherigen Abschnitten der vorliegenden Arbeit bestätigt (3.1 und 3.3). Die Effizienz der Methode könnte jedoch noch gesteigert werden. Um möglichst effiziente APC zu generieren, wurde deshalb die Anzahl von PECPL-Plasmiden pro APC im Zeitverlauf bestimmt. Zudem sollte der Prozess somit standardisiert werden. Dies ist entscheidend, damit in Zukunft die Identifikation des antigenen Peptids aus einer Myriade von potentiellen Peptiden in kürzerer Zeit erfolgen kann. Darüber hinaus werden weitere Optimierungsmöglichkeiten der Methode vorgeschlagen, die auf Ergebnissen und Beobachtungen aus Versuchen im Rahmen dieser Arbeit basieren.

4.4.1 Anzahl der PECPL-Plasmide in APC

Für eine erfolgreiche Identifizierung von Antigenen mit der PECPL-Methode muss auf der Oberfläche der APC eine ausreichende Dichte antigener Peptide im Komplex mit HLA-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden. Dabei ist die Anzahl transfizierter PECPL-Plasmide pro APC sowie ihre Amplifizierung über den SV40 Replikationsursprung ausschlaggebend (1.4). Bislang gibt es keine genauen Angaben darüber, wie viele PECPL-Plasmide eine APC während der Transfektion aufnimmt und wie sich das PECPL-Repertoire der APC bis zum Zeitpunkt ihrer Isolierung verändert. Welchen Einfluss verschiedene Transfektionsmethoden auf die Anzahl der PECPL-Plasmide haben, ist nicht detailliert charakterisiert.

Manche T-Zellen benötigen nur sehr niedrige Oberflächendichten an Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen, um aktiviert zu werden (Huang et al., 2013; Irvine et al., 2002; Sykulev et al., 1995; Valitutti et al., 1995). Es ist jedoch zu vermuten, dass die optimale Oberflächendichte an Peptid:HLA-Komplexen zwischen verschiedenen TZR variiert und abhängig von deren jeweiligen Affinitäten gegenüber diesen Komplexen ist. Daher wären Transfektionsmethoden vorteilhaft, die APC mit unterschiedlicher Anzahl an PECPL-Plasmiden generieren. Die Charakterisierung des PECPL-Repertoires von APC nach Transfektion mit verschiedenen Bedingungen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten würde demzufolge zur Verbesserung der Effizienz und dadurch zu einer schnelleren Identifizierung von Antigenen führen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit tragen zur Charakterisierung des PECPL-Repertoires transfizierter COS-7 Zellen bei. Es wurde eine qPCR-Methode etabliert, anhand derer die Quantifizierung von PECPL-Plasmiden erfolgen kann. Die durchschnittliche Gesamtanzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle konnte dadurch bei verschiedenen Transfektionsbedingungen analysiert werden. Dabei stellte sich die Nukleofektion als vielversprechendste Transfektionsmethode für die PECPL-Technologie dar und wurde im weiteren Verlauf detaillierter charakterisiert. Dabei konnte unter der Anwendung der UID-Strategie erstmals das PECPL-Repertoire auf Einzelzellebene bestimmt werden.

4.4.1.1 FuGENE® HD vs. Nukleofektion

Bislang waren keine Informationen über die Transfektionsmethoden FuGENE® HD und Nukleofektion bezüglich der Anzahl transfizierter Plasmide pro COS-7 Zelle vorhanden. In der Literatur sind Angaben zur Anzahl an Plasmiden pro COS-7 Zelle 48 h nach Transfektionen von Plasmiden mit SV40 Replikationsursprung durch Diethylaminoethyl-dextran oder Ca^{2+} -Phosphat zu finden. Die Anzahl variiert dabei sehr stark von 5×10^3 Plasmiden pro Zelle (Gerard and Gluzman, 1985), $2-4 \times 10^5$ Plasmiden pro Zelle (Mellon et al., 1981) bis hin zu 2×10^6 Plasmiden pro Zelle (Lusky and Botchan, 1981). Die unterschiedlichen Anzahlen an Plasmiden pro COS-7 Zelle sind eventuell auf Unterschiede in den experimentellen Details zurückzuführen.

Mit den Ergebnissen dieser Arbeit können nun Aussagen über die Anzahl an Plasmiden pro COS-7 Zelle zu verschiedenen Zeitpunkten und Bedingungen nach der Transfektion mit FuGENE® HD und Nukleofektion erfolgen. Mit Hilfe der in dieser vorliegenden Arbeit etablierten qPCR-Methode, deren Detektionsbereich 10 bis 1×10^6 PECPL-Plasmide pro APC umfasst, wurde ausgehend von der DNA von 1×10^3 COS-7 Zellen die durchschnittliche Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle bestimmt.

Bei Transfektionen mit FuGENE® HD ist die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle abhängig von der Konzentration an PECPL-DNA. Je weniger PECPL-DNA transfiziert wird, desto weniger PECPL-Plasmide liegen pro COS-7 Zelle 48 h und 72 h nach der Transfektion vor. Die Quantifizierung zeigte, dass bei Transfektionen mit FuGENE® HD mit dem Standardprotokoll COS-7 Zellen initial ≈ 12.000 PECPL-Plasmide (2 h) aufnehmen, diese bis zum Zeitpunkt 6 h auf ≈ 30.000 PECPL-Plasmide amplifizieren und bis 48 h nach der Transfektion konstant aufrechterhalten (3.4.2.1).

Bei Nukleofektionen konnte wie zuvor bei Transfektionen mit FuGENE[®] HD beobachtet werden, dass die Anzahl der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle abhängig von der Konzentration an transfizierter PECPL-DNA ist. Darüber hinaus konnten im Rahmen dieser vorliegenden Arbeit drei Transfektionsprotokolle erstmals etabliert werden, die zur Aufnahme von durchschnittlich $\square 20$, $\square 200$ bzw. $\square 1.000$ PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle führen. Die Quantifizierung mittels qPCR zeigte, dass die Amplifizierung der PECPL-Plasmide in COS-7 Zellen sechs Stunden nach der Nukleofektion beginnt und ihr Maximum 48 h nach der Nukleofektion erreicht. Je nach Transfektionsprotokoll werden die PECPL-Plasmide um das 30-fache ($10 \text{ ng}/\mu\text{l}$), 70-fache ($1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) oder 100-fache ($0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) amplifiziert. Die höheren Amplifikationsraten der PECPL-Plasmide pro APC bei Nukleofektionen im Vergleich zu Transfektionen mit FuGENE[®] HD lassen vermuten, dass die Nukleofektion als Transfektionsmethode für die PECPL-Technologie besser geeignet ist. Möglicherweise liegt das an der chemischen Struktur von FuGENE[®] HD, die zwar nicht genau bekannt ist, jedoch auf kationischen Lipiden basiert, die mit den negativ geladenen Lipidkopfgruppen interagieren. Diese könnten eventuell den Stoffwechsel der Zellen negativ beeinflussen.

4.4.1.2 Charakterisierung des PECPL-Repertoires auf Einzelzellebene

Es ist bisher nicht bekannt wie viele Peptide der PECPL-Plasmide eine Zelle im Einzelnen exprimiert, wie viele an das jeweilige HLA-Klasse-I-Molekül binden und wie viele dann auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Wie zuvor beschrieben, zeigten Studien, dass bei T-Zellen einige wenige oder gar nur ein Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexe an der Zelloberfläche benötigt wird, um einen TZR zu aktivieren (Huang et al., 2013; Irvine et al., 2002; Sykulev et al., 1995; Valitutti et al., 1995). Dies ist vermutlich abhängig vom jeweiligen TZR und dessen Affinität gegenüber den Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen. Ob diese geringe Anzahl an Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen zur Aktivierung der T-Hybridomzellen ausreicht, ist zudem nicht bekannt. Es ist jedoch davon auszugehen, dass eine ausreichende Oberflächendichte an Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen vorliegt, wenn viele Plasmide einer geringen Anzahl unterschiedlicher PECPL-Plasmide ($\text{PECPL}_{\text{diff}}$) pro APC vorhanden sind. Die Quantifizierungen der PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle mittels qPCR lassen vermuten, dass COS-7 Zellen nach Nukleofektionen mit den drei etablierten Protokollen diese Anforderungen erfüllen.

Die Charakterisierung des PECPL-Repertoires durch die UID-Strategie bestätigt diese Annahme. Eine COS-7 Zelle enthält 48 h nach der Nukleofektion mit 0,1 ng/ μ l, 1 ng/ μ l bzw. 10 ng/ μ l PECPL-DNA durchschnittlich 32, 131 bzw. 239 PECPL_{diff}. Somit konnte erstmals auf Einzelzellebene gezeigt werden, dass PECPL_{diff} pro Zelle zum Zeitpunkt der Aktivierungsversuche abhängig von der Konzentration an PECPL-DNA ist, die bei der Nukleofektion eingesetzt wurde. Mit zunehmender Konzentration an transfizierter PECPL-DNA erhöht sich PECPL_{diff} pro Zelle. Für Aktivierungsversuche kann demnach zukünftig die Anzahl an PECPL-Plasmiden pro COS-7 Zelle über die Konzentration der zu analysierenden PECPL gezielt gesteuert werden.

Mit der UID-Strategie konnte erstmals bestimmt werden, in welchem Verhältnis die unterschiedlichen PECPL-Plasmide zueinander in einer einzelnen Zelle vorliegen. Dabei stellte sich heraus, dass die einzelnen PECPL-Plasmide einer Einzelzelle entweder gleichmäßig amplifiziert werden (Muster I) oder mehrere bzw. ein PECPL-Plasmid(e) höhere Amplifikationsraten aufweisen (Muster II bzw. III) (Abbildung 22 A). Ein Zusammenhang zwischen dem häufigeren Auftreten einzelner Muster und der transfizierten Konzentration an PECPL-DNA konnte festgestellt werden. Mit abnehmender Konzentration an transfizierter PECPL-DNA treten häufiger Einzelzellen auf, die ein einzelnes Plasmid überwiegend amplifizieren. Die genauen Ursachen für die Unterschiede in der Anzahl der PECPL-Plasmide zwischen Einzelzellen einer Nukleofektionsbedingung und den beobachteten unterschiedlichen Amplifikationsraten einzelner PECPL-Plasmide einer Zelle sind derzeit nicht bekannt.

Bei Bakterien sind solche Fluktuationen in der Anzahl der Plasmide auf Einzellzebene bekannt und detaillierter untersucht (Tal and Paulsson, 2012). Als mögliche Ursachen wurden Schwankungen in den Konzentrationen an Chaperonen, Polymerasen und Ribosomen, die indirekt die Initiation der Replikation beeinflussen sowie die zufällige Expression von Kontrollmolekülen und die zufällige Verteilung der Plasmide bei der Zellteilung („*random segregation*“) beschrieben. Ob vergleichbare Mechanismen bei den hier verwendeten eukaryotischen COS-7 Zellen zutreffen, ist bisher nicht geklärt, aber zu vermuten. Unterschiedliche Konzentrationen an Proteinen in einzelnen COS-7 Zellen, die für die Replikation notwendig sind (z. B. *SV40 large T antigen* (Fanning and Zhao, 2009)), sind auch hier durchaus als Erklärung für die Fluktuationen der Plasmidanzahl denkbar. Bei *Saccharomyces cerevisiae* Stämmen wurde bei der Zellteilung eine Verteilung des 2- μ m Plasmids im Verhältnis von 1:1 auf die resul-

tierenden Tochterzellen beobachtet (Ghosh et al., 2007). Ob diese gleichmäßige Verteilung der replizierten PECPL-Plasmide auch bei COS-7 Zellen stattfindet oder diese zufällig verteilt werden, ist ungewiss.

Darüber hinaus könnten die Unterschiede dadurch erklärt werden, dass sich die Zellen in unterschiedlichen Zellzyklusphasen befinden. Die verwendeten COS-7 Zellen wurden vor der Transfektion nicht auf eine Zellzyklusphase synchronisiert. Zellen, deren Plasmide gerade repliziert wurden, verfügen vermutlich über eine höhere Anzahl an Plasmiden als Zellen, die gerade eine Zellteilung durchlaufen haben. Zudem ist nicht auszuschließen, dass ein Teil der von der Zelle aufgenommenen PECPL-Plasmide nicht in den Nukleus transportiert wurde, sondern im Zytosol verblieben ist und infolgedessen nicht amplifiziert wurde.

Falls einzelne PECPL-Plasmide für toxische oder antimikrobielle Peptide kodieren, so könnten diese einen Einfluss auf die Anzahl der PECPL-Plasmide haben, indem diese u. a. die Replikation der DNA verhindern oder zu einem Stillstand des Zellzyklus führen (Mulder et al., 2013).

DNA-Sekundärstrukturen einzelner PECPL-Plasmide, die das Voranschreiten der Replikationsgabel verzögern oder blockieren und dadurch die Replikation beeinflussen (Mazouzi et al., 2014), sind zwar vermutlich vernachlässigbar, da sich die Plasmide lediglich in der 24 bp langen Peptid-kodierenden Sequenz unterscheiden, jedoch können sie nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Da bei Bakterien bereits unterschiedliche Faktoren zu Fluktuationen in der Anzahl an Plasmiden führten, kann bei eukaryotischen COS-7 Zellen durchaus ein noch komplexeres Zusammenspiel an Ursachen erwartet werden.

4.4.2 Mögliche zukünftige Optimierungen der PECPL-Technologie

Basierend auf den Beobachtungen, die im Verlauf der vorliegenden Arbeit bei der Anwendung der PECPL-Technologie erfolgten, sowie den Ergebnissen der Analyse des PECPL-Repertoires von APC sind weitere Verbesserungen zur Steigerung der Effizienz denkbar.

Die drei Nukleofektionsbedingungen, die mit dieser Arbeit etabliert wurden, eröffnen die Möglichkeit für eine neue Herangehensweise zur Isolierung des Antigen-kodierenden Plasmids. Dabei würde man vor allem den Vorteil ausnutzen, dass bei der Nukleofektion mit 0,1 ng/ μ l PECPL-DNA eine geringe Anzahl an PECPL_{diff} pro COS-7 Zelle zum Zeitpunkt der Aktivierungsversuche vorliegt (3.4.3). Der erste Aktivie-

rungsversuch zur Detektion aktivierender COS-7 Zellen würde dabei mit COS-7 Zellen erfolgen, die durch Nukleofektion von 1 ng/ μ l oder 10 ng/ μ l PECPL-DNA generiert wurden. Peptid-kodierende Sequenzen der PECPL-Plasmide aktivierender COS-7 Zellen würden wie bisher durch Amplifizierung und Klonierung erhalten werden (2.5.9.4.3). Anstelle der Generierung eines ersten *subpools* (2.5.9.4.5), wie ursprünglich bei der PECPL-Methode vorgesehen, würde ein zweiter Aktivierungsversuch erfolgen. Im Gegensatz zum ersten Aktivierungsversuch würden hier COS-7 Zellen eingesetzt werden, die durch Nukleofektion mit 0,1 ng/ μ l der isolierten PECPL-Plasmide aktivierender Zellen erhalten wurden. PECPL-Plasmide aktivierender COS-7 Zellen des zweiten Aktivierungsversuchs würden dann erneut isoliert werden. Da bei der Nukleofektion mit 0,1 ng/ μ l PECPL-DNA durchschnittlich lediglich 32 verschiedene PECPL-Plasmide pro COS-7 Zelle vorliegen, würde höchst wahrscheinlich ein einzelner *subpool* ausreichen, um das Antigen-kodierende Plasmid zu erhalten. Dadurch reduziert sich die Anzahl der *subpools* im Vergleich zur bisherigen Vorgehensweise und würde damit zu einer wesentlichen Zeitersparnis führen.

Des Weiteren umfasst die Optimierung die Isolierung aktivierender APC. Für das präzise Isolieren einzelner Zellen aus einem Zellverband bedarf es Kapillaren mit möglichst kleinem Durchmesser. Handelsübliche Pipettenspitzen eignen sich nicht, da diese aufgrund ihres großen Durchmessers dabei zu viele benachbarte Zellen isolieren würden (Siewert, 2011). Die Isolierung mit der Glaskapillare erfordert jedoch Übung und Feingefühl, da die Kapillare sehr zerbrechlich ist und eignet sich daher nicht für automatisierte Hochdurchsatzapplikationen. Ein weiterer Nachteil ist, dass sich aufgrund des kleinen Durchmessers der Kapillare (14 μ m) große Scherkräfte beim Isolierprozess auf die APC wirken. Dies kann eine Beschädigung der Zelle während des Isoliervorgangs zur Folge haben (Abbildung 27). Entscheidend für den Erfolg der Antigensuche ist jedoch, dass die APC in einem intakten Zustand isoliert wird. Wird die Zelle während der Isolierung beschädigt, so ist es möglich, dass das Antigen-kodierende Plasmid verloren wird, indem es in der Kultivierungsschale oder an der Gefäßwand der Kapillare zurückbleibt. Infolgedessen kann im weiteren Verlauf der PECPL-Methode das Antigen nicht identifiziert werden.

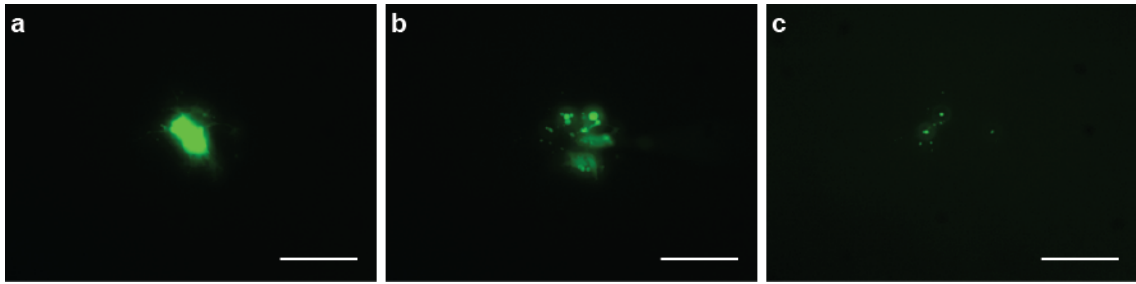


Abbildung 27: sGFP exprimierende COS-7 Zelle während des Isoliervorgangs mit einer Glaskapillare.

Fluoreszenzbilder einer sGFP exprimierenden COS-7 Zelle (a) vor, (b) während und (c) nach ihrer Isolierung mit Hilfe einer Kapillare. Die COS-7 Zelle ist vor der Isolierung intakt. Während die Zelle von der Kapillare aufgesogen wird, führen die großen Scherkräfte zum Platzen der COS-7 Zelle. Zellbestandteile diffundieren in den Überstand der Kokultur und bleiben in der Kultivierungsschale zurück. Maßstabskala: 100 μm .

Diese Herausforderungen könnten mit nachfolgend beschriebenem Versuchsaufbau umgangen werden. Eine geringe Anzahl transfizierter APC würde zusammen mit T-Hybridomzellen pro Well einer 384-Well-Platte (oder kleiner) kokultiviert werden. Nach Detektion aktivierter T-Hybridomzellen würden die adhärenenten APC durch Inkubation auf Eis schonend von der Kultivierungsschale abgelöst werden und mit einer handelsüblichen Pipettenspitze (10 μl) manuell oder mit einem Pipettierroboter isoliert werden, die im Vergleich zur Glaskapillare deutlich geringere Scherkräfte verursacht. Optional könnten die APC vor ihrer Ablösung vom Kultivierungsboden mit PBS gewaschen werden, um unspezifisch gebundene PECPL-Plasmide zu entfernen. Nach der Isolierung der APC könnte das Well zudem mit PCR-Mix ausgespült werden, um eine vollständige Isolierung der PECPL-Plasmide zu ermöglichen. Die isolierten Zellen könnten für die nachfolgende PCR auf verschiedene Reaktionsgefäße aufgeteilt werden, sodass Einzelzellen vorliegen. Dadurch würde vermieden werden, dass das Antigenkodierende Plasmid der APC mit PECPL-Plasmiden irrelevanter Nachbarzellen verdünnt wird.

Ein weiterer Vorteil des zuvor beschriebenen Versuchsaufbaus wäre, dass ein Wegrollen der T-Hybridomzellen von der aktivierenden APC, wie es bereits im Rahmen der Versuche mit der PECPL-Methode beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt), vernachlässigbar wäre.

4.5 Ausblick

CD8⁺-T-Zellen sind sehr wichtig für die Abwehr von infektiösen Erregern und Tumoren, jedoch können sie auch zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen. Um die zugrunde liegenden Mechanismen dieser T-Zellen dabei im Einzelnen zu verstehen, müssen zunächst die Zielstrukturen dieser T-Zellen identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die PECPL-Technologie, die kürzlich als potentielle Methode zur Identifizierung von Antigenen der CD8⁺-T-Zellen entwickelt wurde, erstmals validiert werden. Im Rahmen dessen konnte das Peptid GPCPD1(14-22) als HLA-A2-restringiertes, vermutlich protektives Antigen im Tiermodell der MS mit dreifach transgenen Mäusen identifiziert werden. Ob dieses Antigen tatsächlich bewirkt hat, dass die Mäuse vor MS-ähnlichen Symptomen geschützt wurden, muss in weiterführenden Untersuchungen belegt werden. Hierzu sollte zunächst überprüft werden, ob die mTEC der dreifach transgenen Mäuse in der Lage sind, das Protein GPCPD1 so zu prozessieren, dass dabei das antigene Peptid generiert wird. Der eindeutige Beweis wäre erbracht, wenn die dreifach transgenen Mäuse in Folge eines Knock-out des GPCPD1-kodierenden Gens an MS-ähnlichen Symptomen erkranken würden.

In einem anderen Teilprojekt wurde die PECPL-Methode zur Antigen suche eines klonal expandierten TZR verwendet, der direkt aus einer PV-Läsion stammte. Die ursprüngliche Zielzelle war also vermutlich am Krankheitsprozess beteiligt. Basierend auf Vorexperimenten mit PECPL-Plasmiden, die definierte Anker-Aminosäuren enthielten, wurden in der vorliegenden Arbeit Mimotope identifiziert, die auf vollständig randomisierten Bibliotheken beruhten. Diese Mimotope sind damit besonders aussagekräftig und trugen wesentlich dazu bei, ein PV-relevantes Antigen zu identifizieren. Die PECPL-Technologie ermöglichte damit einen neuen Pathomechanismus der PV zu entdecken und bildet möglicherweise die Grundlage für zukünftige Therapien und Biomarker der PV (Arakawa et al., 2015).

Darüber hinaus wurde ein bestehender Prozessschritt der Methode detaillierter charakterisiert und verbessert, sodass zukünftige Versuche zur Identifizierung von T-Zell Antigenen vermutlich mit einem deutlich geringeren Zeitaufwand erfolgen. In weiterführenden Untersuchungen sollten die vorgeschlagenen weiteren Optimierungen auf ihre Anwendbarkeit überprüft werden, da diese entscheidend für einen zukünftigen Einsatz der Technologie als Industrie-Applikation wären. Die Gültigkeit der vorgeschlagenen Verbesserungen könnte beispielsweise mit dem Modellsystem JM22 untermauert werden.

Basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit scheint die verbesserte PECPL-Technologie ein bedeutsames Werkzeug für die Identifizierung von krankheitsrelevanten Antigenen von TZR aus verschiedenen Krankheiten zu sein. Die Erkenntnisse, die mit dieser Methode erzielt werden, könnten zur Entdeckung der Ätiologie, der Pathogenese sowie neuer Diagnostika und Therapien vieler Erkrankungen beitragen.

Literaturverzeichnis

- Adams, J.J., Narayanan, S., Liu, B., Birnbaum, M.E., Kruse, A.C., Bowerman, N.A., Chen, W., Levin, A.M., Connolly, J.M., Zhu, C., et al. (2011). T cell receptor signaling is limited by docking geometry to peptide-major histocompatibility complex. *Immunity* 35, 681–693.
- Altman, J.D., and Davis, M.M. (2003). MHC-peptide tetramers to visualize antigen-specific T cells. *Curr. Protoc. Immunol. Chapter 17*, Unit 17.3.
- Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., and Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94–96.
- Annibaldi, V., Ristori, G., Angelini, D.F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., et al. (2011). CD161 high CD8⁺ T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* 134, 542–554.
- Arakawa, A., Siewert, K., Stöhr, J., Besgen, P., Kim, S.-M., Rühl, G., Nickel, J., Vollmer, S., Thomas, P., Krebs, S., et al. (2015). Melanocyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis. *J. Exp. Med.* 212, 2203–2212.
- Arstila, T.P., Casrouge, A., Baron, V., Even, J., Kanellopoulos, J., and Kourilsky, P. (2000). Diversity of human alpha beta T cell receptors. *Science* 288, 1135.
- Attaf, M., Huseby, E., and Sewell, A.K. (2015). $\alpha\beta$ T cell receptors as predictors of health and disease. *Cell. Mol. Immunol.* 1–9.
- Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schröder, R., Deckert, M., Schmidt, S., et al. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 192, 393–404.
- Banki, K., Colombo, E., Sia, F., Halladay, D., Mattson, D.H., Tatum, A.H., Massa, P.T., Phillips, P.E., and Perl, A. (1994). Oligodendrocyte-specific expression and autoantigenicity of transaldolase in multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 180, 1649–1663.
- Barabas, S., Gary, R., Bauer, T., Lindner, J., Lindner, P., Weinberger, B., Jilg, W., Wolf, H., and Deml, L. (2008). Urea-mediated cross-presentation of soluble Epstein-Barr virus BZLF1 protein. *PLoS Pathog.* 4, e1000198.
- Bastian, F., Parmentier, G., Roux, J., Moretti, S., Laudet, V., and Robinson-Rechavi, M. (2008). Bgee: Integrating and Comparing Heterogeneous Transcriptome Data Among Species.
- Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., et al. (2013). Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 45, 1353–1360.
- Bhonsle, L. (2011). Characterization of potentially autoaggressive brain infiltrating CD8⁺ T cells in Multiple Sclerosis patients.

- Biddison, W.E., Taub, D.D., Cruikshank, W.W., Center, D.M., Connor, E.W., and Honma, K. (1997). Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8⁺ T cells: potential roles in inflammation. *J. Immunol.* *158*, 3046–3053.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., and Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* *329*, 506–512.
- Blank, U., Boitel, B., Mège, D., Ermonval, M., and Acuto, O. (1993). Analysis of tetanus toxin peptide/DR recognition by human T cell receptors reconstituted into a murine T cell hybridoma. *Eur. J. Immunol.* *23*, 3057–3065.
- Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). Pathways of antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* *31*, 443–473.
- Bø, L., Vedeler, C.A., Nyland, H.I., Trapp, B.D., and Mørk, S.J. (2003). Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *62*, 723–732.
- Booss, J., Esiri, M.M., Tourtellotte, W.W., and Mason, D.Y. (1983). Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *62*, 219–232.
- Brynedal, B., Duvefelt, K., Jonasdottir, G., Roos, I.M., Åkesson, E., Palmgren, J., and Hillert, J. (2007). HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* *2*, 1–5.
- Burrows, S.R., Rossjohn, J., and McCluskey, J. (2006). Have we cut ourselves too short in mapping CTL epitopes? *Trends Immunol.* *27*, 11–16.
- Calis, J.J.A., and Rosenberg, B.R. (2014). Characterizing immune repertoires by high throughput sequencing: strategies and applications. *Trends Immunol.* *35*, 581–590.
- Cepok, S., Zhou, D., Srivastava, R., Nessler, S., Stei, S., Büssow, K., Sommer, N., and Hemmer, B. (2005). Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *115*, 1352–1360.
- Chang, J.C., Smith, L.R., Froning, K.J., Schwabe, B.J., Laxer, J.A., Caralli, L.L., Kurkland, H.H., Karasek, M.A., Wilkinson, D.I., Carlo, D.J., et al. (1995). CD8⁺ T-cells in psoriatic lesions preferentially use T-cell receptors V beta 3 and/or V beta 13.1 genes. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* *756:370-81*, 370–381.
- Chastain, E.M.L., and Miller, S.D. (2012). Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol. Rev.* *245*, 227–238.
- Compston, A., and Coles, A. (2008). Multiple sclerosis. *Lancet* *372*, 1502–1517.
- Conrad, C., Boyman, O., Tonel, G., Tun-Kyi, A., Laggner, U., de Fougères, A., Kotelianski, V., Gardner, H., and Nestle, F.O. (2007). Alpha1beta1 integrin is crucial for accumulation of epidermal T cells and the development of psoriasis. *Nat. Med.* *13*, 836–842.
- Davis, M.M., and Bjorkman, P.J. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* *334*, 395–402.

- Davis, M.M., Altman, J.D., and Newell, E.W. (2011). Interrogating the repertoire: broadening the scope of peptide-MHC multimer analysis. *Nat. Rev. Immunol.* *11*, 551–558.
- Derbinski, J., Schulte, A., Kyewski, B., and Klein, L. (2001). Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat. Immunol.* *2*, 1032–1039.
- Derfuss, T., Gürkov, R., Then Bergh, F., Goebels, N., Hartmann, M., Barz, C., Wilske, B., Autenrieth, I., Wick, M., Hohlfeld, R., et al. (2001). Intrathecal antibody production against *Chlamydia pneumoniae* in multiple sclerosis is part of a polyspecific immune response. *Brain* *124*, 1325–1335.
- Ekeruche-Makinde, J., Miles, J.J., van den Berg, H.A., Skowera, A., Cole, D.K., Dolton, G., Schauenburg, A.J.A., Tan, M.P., Pentier, J.M., Llewellyn-Lacey, S., et al. (2013). Peptide length determines the outcome of TCR/peptide-MHCI engagement. *Blood* *121*, 1112–1123.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G., and Rammensee, H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* *351*, 290–296.
- Fanning, E., and Zhao, K. (2009). SV40 DNA replication: from the A gene to a nanomachine. *Virology* *384*, 352–359.
- Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Grønning, M., Hillert, J., and Olerup, O. (2000). Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* *55*, 140–148.
- Friese, M.A., and Fugger, L. (2009). Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* *66*, 132–141.
- Friese, M.A., Jakobsen, K.B., Friis, L., Etzensperger, R., Craner, M.J., McMahon, R.M., Jensen, L.T., Huygelen, V., Jones, E.Y., Bell, J.I., et al. (2008). Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis. *Nat. Med.* *14*, 1227–1235.
- Fugger, L., Friese, M.A., and Bell, J.I. (2009). From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 408–417.
- Garboczi, D.N., Hung, D.T., and Wiley, D.C. (1992). HLA-A2-peptide complexes: refolding and crystallization of molecules expressed in *Escherichia coli* and complexed with single antigenic peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 3429–3433.
- Gerard, R.D., and Gluzman, Y. (1985). New host cell system for regulated simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 3231–3240.
- Ghosh, S.K., Hajra, S., and Jayaram, M. (2007). Faithful segregation of the multicopy yeast plasmid through cohesin-mediated recognition of sisters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 13034–13039.
- Goebels, N., Michaelis, D., Engelhardt, M., Huber, S., Bender, A., Pongratz, D., Johnson, M.A., Wekerle, H., Tschopp, J., Jenne, D., et al. (1996). Differential expression of perforin in muscle-infiltrating T cells in polymyositis and dermatomyositis. *J. Clin. Invest.* *97*, 2905–2910.

- Gold, M.C., Cerri, S., Smyk-Pearson, S., Cansler, M.E., Vogt, T.M., Delepine, J., Winata, E., Swarbrick, G.M., Chua, W.J., Yu, Y.Y.L., et al. (2010). Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. *PLoS Biol.* *8*, 1–14.
- Gold, M.C., McLaren, J.E., Reistetter, J.A., Smyk-Pearson, S., Ladell, K., Swarbrick, G.M., Yu, Y.Y.L., Hansen, T.H., Lund, O., Nielsen, M., et al. (2014). MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage. *J. Exp. Med.* *211*, 1601–1610.
- Goldrath, A.W., and Bevan, M.J. (1999). Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8⁺ T cells in lymphopenic hosts. *Immunity* *11*, 183–190.
- Goodnow, C.C., Sprent, J., Fazekas de St Groth, B., and Vinuesa, C.G. (2005). Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* *435*, 590–597.
- Gotter, J., Brors, B., Hergenahn, M., and Kyewski, B. (2004). Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J. Exp. Med.* *199*, 155–166.
- Gundlach, B.R., Wiesmüller, K.-H., Junt, T., Kienle, S., Jung, G., and Walden, P. (1996). Determination of T cell epitopes with random peptide libraries. *J. Immunol. Methods* *192*, 149–155.
- Haghikia, A., Hohlfeld, R., Gold, R., and Fugger, L. (2013). Therapies for multiple sclerosis: Translational achievements and outstanding needs. *Trends Mol. Med.* *19*, 309–319.
- Harbo, H.F., Lie, B.A., Sawcer, S., Celius, E.G., Dai, K.-Z., Oturai, A., Hillert, J., Lorentzen, A.R., Laaksonen, M., Myhr, K.-M., et al. (2004). Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens* *63*, 237–247.
- Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8⁺ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu. Rev. Immunol.* *18*, 275–308.
- Hauser, S.L., Bhan, A.K., Gilles, F., Kemp, M., Kerr, C., and Weiner, H.L. (1986). Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* *19*, 578–587.
- Held, K., Bhonsle-Deeng, L., Siewert, K., Sato, W., Beltran, E., Schmidt, S., Rühl, G., Ng, J.K.M., Engerer, P., Moser, M., et al. (2015). $\alpha\beta$ T-cell receptors from multiple sclerosis brain lesions show MAIT cell-related features. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* *2*, e107.
- Hemmer, B., Gran, B., Zhao, Y., Marques, A., Pascal, J., Tzou, A., Kondo, T., Cortese, I., Bielekova, B., Straus, S.E., et al. (1999). Identification of candidate T-cell epitopes and molecular mimics in chronic Lyme disease. *Nat. Med.* *5*, 1375–1382.
- Hemmer, B., Kerschensteiner, M., and Korn, T. (2015). Role of the innate and adaptive immune responses in the course of multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* *14*, 406–419.

- Hickman, H.D., Luis, A.D., Buchli, R., Few, S.R., Sathiamurthy, M., VanGundy, R.S., Giberson, C.F., and Hildebrand, W.H. (2004). Toward a definition of self: proteomic evaluation of the class I peptide repertoire. *J. Immunol.* *172*, 2944–2952.
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E., and Wekerle, H. (2016a). The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 2: CD8⁺ T cells, B cells, and antibodies in the focus of reverse-translational research. *Lancet Neurol.* *15*, 317–331.
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E., and Wekerle, H. (2016b). The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: autoreactive CD4⁺ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *Lancet Neurol.* *15*, 198–209.
- Honma, K., Parker, K.C., Becker, K.G., McFarland, H.F., Coligan, J.E., and Biddison, W.E. (1997). Identification of an epitope derived from human proteolipid protein that can induce autoreactive CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-A3: Evidence for cross-reactivity with an environmental microorganism. *J. Neuroimmunol.* *73*, 7–14.
- Huang, J., Brameshuber, M., Zeng, X., Xie, J., Li, Q., Chien, Y., Valitutti, S., and Davis, M.M. (2013). A single peptide-major histocompatibility complex ligand triggers digital cytokine secretion in CD4(+) T cells. *Immunity* *39*, 846–857.
- Huang, S., Gilfillan, S., Cella, M., Miley, M.J., Lantz, O., Lybarger, L., Fremont, D.H., and Hansen, T.H. (2005). Evidence for MR1 antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells. *J. Biol. Chem.* *280*, 21183–21193.
- Hubert, F.-X., Kinkel, S.A., Davey, G.M., Phipson, B., Mueller, S.N., Liston, A., Proietto, A.I., Cannon, P.Z.F., Forehan, S., Smyth, G.K., et al. (2011). Aire regulates the transfer of antigen from mTECs to dendritic cells for induction of thymic tolerance. *Blood* *118*, 2462–2472.
- Illés, Z., Shimamura, M., Newcombe, J., Oka, N., and Yamamura, T. (2004). Accumulation of Valpha7.2-Jalpha33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system. *Int. Immunol.* *16*, 223–230.
- Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsaard, M., and Davis, M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* *419*, 845–849.
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2002). Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* *125*, 538–550.
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2007). Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* *130*, 2789–2799.
- Kim, S.M., Bhonsle, L., Besgen, P., Nickel, J., Backes, A., Held, K., Vollmer, S., Dornmair, K., and Prinz, J.C. (2012a). Analysis of the paired TCR α - and β -chains of single human T cells. *PLoS One* *7*, e37338.
- Kim, Y., Ponomarenko, J., Zhu, Z., Tamang, D., Wang, P., Greenbaum, J., Lundegaard, C., Sette, A., Lund, O., Bourne, P.E., et al. (2012b). Immune epitope database analysis resource. *Nucleic Acids Res.* *40*, W525–W530.

- Kinde, I., Wu, J., Papadopoulos, N., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (2011). Detection and quantification of rare mutations with massively parallel sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 9530–9535.
- Kivioja, T., Vähärautio, A., Karlsson, K., Bonke, M., Enge, M., Linnarsson, S., and Taipale, J. (2011). Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat. Methods* *9*, 72–74.
- Kjer-Nielsen, L., Patel, O., Corbett, A.J., Le Nours, J., Meehan, B., Liu, L., Bhati, M., Chen, Z., Kostenko, L., Reantragoon, R., et al. (2012). MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. *Nature* *491*, 717–723.
- Klein, L., Kyewski, B., Allen, P.M., and Hogquist, K.A. (2014). Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat. Rev. Immunol.* *14*, 377–391.
- Kutzelnigg, A., and Lassmann, H. (2014). Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases. *Handb. Clin. Neurol.* *122*, 15–58.
- Lang, H.L.E., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpennig, K., et al. (2002). A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* *3*, 940–943.
- Laufer, T.M., DeKoning, J., Markowitz, J.S., Lo, D., and Glimcher, L.H. (1996). Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* *383*, 81–85.
- Laugel, B., Cole, D.K., Clement, M., Wooldridge, L., Price, D.A., and Sewell, A.K. (2011). The multiple roles of the CD8 coreceptor in T cell biology: opportunities for the selective modulation of self-reactive cytotoxic T cells. *J. Leukoc. Biol.* *90*, 1089–1099.
- Le Bourhis, L., Martin, E., Péguillet, I., Guihot, A., Froux, N., Coré, M., Lévy, E., Dusseaux, M., Meyssonier, V., Premel, V., et al. (2010). Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. *Nat. Immunol.* *11*, 701–708.
- Lefranc, M.-P., and Lefranc, G. (2001). *The T cell receptor FactsBook* (London, UK: Academic Press).
- López-Sagaseta, J., Dulberger, C.L., Crooks, J.E., Parks, C.D., Luoma, A.M., McFedries, A., Van Rhijn, I., Saghatelyan, A., and Adams, E.J. (2013). The molecular basis for Mucosal-Associated Invariant T cell recognition of MR1 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, E1771–E1778.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* *193*, 265–275.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* *47*, 707–717.
- Lusky, M., and Botchan, M. (1981). Inhibition of SV40 replication in simian cells by specific pBR322 DNA sequences. *Nature* *293*, 79–81.
- Macdonald, W.A., Chen, Z., Gras, S., Archbold, J.K., Tynan, F.E., Clements, C.S., Bharadwaj, M., Kjer-Nielsen, L., Saunders, P.M., Wilce, M.C.J., et al. (2009). T Cell Allorecognition via Molecular Mimicry. *Immunity* *31*, 897–908.

- Martin, J.R. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 and multiple sclerosis. *Lancet* 2, 777–781.
- Martin, E., Treiner, E., Duban, L., Guerri, L., Laude, H., Toly, C., Premel, V., Devys, A., Moura, I.C., Tilloy, F., et al. (2009). Stepwise development of mait cells in mouse and human. *PLoS Biol.* 7, 0525–0536.
- Martinez, F.O., Gordon, S., Locati, M., and Mantovani, A. (2006). Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression. *J. Immunol.* 177, 7303–7311.
- Mazouzi, A., Velimezi, G., and Loizou, J.I. (2014). DNA replication stress: causes, resolution and disease. *Exp. Cell Res.* 329, 85–93.
- Mazza, C., Auphan-Anezin, N., Gregoire, C., Guimezanes, A., Kellenberger, C., Roussel, A., Kearney, A., van der Merwe, P.A., Schmitt-Verhulst, A.-M., and Malissen, B. (2007). How much can a T-cell antigen receptor adapt to structurally distinct antigenic peptides? *EMBO J.* 26, 1972–1983.
- McMahon, R.M., Friis, L., Siebold, C., Friese, M.A., Fugger, L., and Jones, E.Y. (2011). Structure of HLA-A*0301 in complex with a peptide of proteolipid protein: insights into the role of HLA-A alleles in susceptibility to multiple sclerosis. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 67, 447–454.
- Mellon, P., Parker, V., Gluzman, Y., and Maniatis, T. (1981). Identification of DNA sequences required for transcription of the human alpha 1-globin gene in a new SV40 host-vector system. *Cell* 27, 279–288.
- Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F., and Reinherz, E.L. (1983). Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J. Exp. Med.* 157, 705–719.
- Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O., and Yamamura, T. (2011). Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int. Immunol.* 23, 529–535.
- Mulder, K.C.L., Lima, L.A., Miranda, V.J., Dias, S.C., and Franco, O.L. (2013). Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front. Microbiol.* 4, 321.
- Murata, S., Sasaki, K., Kishimoto, T., Niwa, S.-I., Hayashi, H., Takahama, Y., and Tanaka, K. (2007). Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes. *Science* 316, 1349–1353.
- Nagai, K., and Thøgersen, H.C. (1987). Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* 153, 461–481.
- Nair, R.P., Stuart, P.E., Nistor, I., Hiremagalore, R., Chia, N.V.C., Jenisch, S., Weichenthal, M., Abecasis, G.R., Lim, H.W., Christophers, E., et al. (2006). Sequence and haplotype analysis supports HLA-C as the psoriasis susceptibility 1 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 78, 827–851.
- Niedl, A. (2014). Characterization of disease-related CD8+ T cells and their antigens from patients with Multiple Sclerosis.

- Niland, B., Banki, K., Biddison, W.E., and Perl, A. (2005). CD8⁺ T cell-mediated HLA-A*0201-restricted cytotoxicity to transaldolase peptide 168-176 in patients with multiple sclerosis. *J. Immunol.* *175*, 8365–8378.
- Nino-Vasquez, J.J., Allicotti, G., Borrás, E., Wilson, D.B., Valmori, D., Simon, R., Martin, R., and Pinilla, C. (2004). A powerful combination: the use of positional scanning libraries and biometrical analysis to identify cross-reactive T cell epitopes. *Mol. Immunol.* *40*, 1063–1074.
- Nohara, L.L., Stanwood, S.R., Omilusik, K.D., and Jefferies, W.A. (2015). Tweeters, Woofers and Horns: The Complex Orchestration of Calcium Currents in T Lymphocytes. *Front. Immunol.* *6*, 234.
- Oldstone, M.B.A. (1987). Molecular mimicry and autoimmune disease. *Cell* *50*, 819–820.
- Pan, X., Huang, L.C., Dong, T., Peng, Y., Cerundolo, V., McGowan, S., and Ogg, G. (2014). Combinatorial HLA-peptide bead libraries for high throughput identification of CD8⁺ T cell specificity. *J. Immunol. Methods* *403*, 72–78.
- Patsopoulos, N.A., Barcellos, L.F., Hintzen, R.Q., Schaefer, C., van Duijn, C.M., Noble, J.A., Raj, T., IMMSGC, ANZgene, Gourraud, P.-A., et al. (2013). Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet.* *9*, e1003926.
- Perera, G.K., Di Meglio, P., and Nestle, F.O. (2012). Psoriasis. *Annu. Rev. Pathol.* *7*, 385–422.
- Peterson, G.L. (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal. Biochem.* *83*, 346–356.
- Petrova, G., Ferrante, A., and Gorski, J. (2012). Cross-reactivity of T cells and its role in the immune system. *Crit. Rev. Immunol.* *32*, 349–372.
- Pohl, D. (2009). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *286*, 62–64.
- Price, P., Witt, C., Allcock, R., Sayer, D., Garlepp, M., Kok, C.C., French, M., Mallal, S., and Christiansen, F. (1999). The genetic basis for the association of the 8.1 ancestral haplotype (A1, B8, DR3) with multiple immunopathological diseases. *Immunol. Rev.* *167*, 257–274.
- Prinz, J.C. (2003). The role of T cells in psoriasis. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* *17*, 257–270.
- Probst-Kepper, M., Stroobant, V., Kridel, R., Gaugler, B., Landry, C., Brasseur, F., Cosyns, J.P., Weynand, B., Boon, T., and Van Den Eynde, B.J. (2001). An alternative open reading frame of the human macrophage colony-stimulating factor gene is independently translated and codes for an antigenic peptide of 14 amino acids recognized by tumor-infiltrating CD8 T lymphocytes. *J. Exp. Med.* *193*, 1189–1198.
- Rasmussen, R. (2001). Quantification on the LightCycler. In *Rapid Cycle Real-Time PCR*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 21–34.
- Reantragoon, R., Corbett, A.J., Sakala, I.G., Gherardin, N.A., Furness, J.B., Chen, Z., Eckle, S.B.G., Uldrich, A.P., Birkinshaw, R.W., Patel, O., et al. (2013). Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. *J. Exp. Med.* *210*, 2305–2320.

- Rioux, J.D., and Abbas, A.K. (2005). Paths to understanding the genetic basis of autoimmune disease. *Nature* 435, 584–589.
- Robinson, J., Halliwell, J.A., Hayhurst, J.D., Flicek, P., Parham, P., and Marsh, S.G.E. (2014). The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* 43, D423–D431.
- Roomp, K., Antes, I., and Lengauer, T. (2010). Predicting MHC class I epitopes in large datasets. *BMC Bioinformatics* 11, 90.
- Rossjohn, J., Gras, S., Miles, J.J., Turner, S.J., Godfrey, D.I., and McCluskey, J. (2015). T cell antigen receptor recognition of antigen-presenting molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 33, 169–200.
- Rudolph, M.G., Stanfield, R.L., and Wilson, I.A. (2006). How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors. *Annu. Rev. Immunol.* 24, 419–466.
- Rühl, G. (2011). Antigen recognition of autoreactive T cells in human autoimmune diseases.
- Rühl, G., Niedl, A. G., Patronov, A., Siewert, K., Pinkert, S., Kalemanov, M., Friese, M. A., Attfield, K. E., Antes, I., Hohlfeld, R. und Dornmair, K. (2016). Multiple sclerosis: Molecular mimicry of an anti-myelin HLA class-I restricted T cell receptor. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* 3, e241.
- Sadasivan, B., Lehner, P.J., Ortmann, B., Spies, T., and Cresswell, P. (1996). Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5, 103–114.
- Salter, R.D., Norment, A.M., Chen, B.P., Clayberger, C., Krensky, A.M., Littman, D.R., and Parham, P. (1989). Polymorphism in the alpha 3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. *Nature* 338, 345–347.
- Saper, M.A., Bjorkman, P.J., and Wiley, D.C. (1991). Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219, 277–319.
- Saric, T., Chang, S.-C., Hattori, A., York, I.A., Markant, S., Rock, K.L., Tsujimoto, M., and Goldberg, A.L. (2002). An IFN-gamma-induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3, 1169–1176.
- Saveanu, L., Carroll, O., Lindo, V., Del Val, M., Lopez, D., Lepelletier, Y., Greer, F., Schomburg, L., Fruci, D., Niedermann, G., et al. (2005). Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 6, 689–697.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C.A., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., et al. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214–219.
- Sawcer, S., Franklin, R.J.M., and Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol.* 13, 700–709.
- Schatz, D.G., and Ji, Y. (2011). Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 251–263.

- Scull, K.E., Dudek, N.L., Corbett, A.J., Ramarathinam, S.H., Gorasia, D.G., Williamson, N.A., and Purcell, A.W. (2012). Secreted HLA recapitulates the immunopeptidome and allows in-depth coverage of HLA A*02:01 ligands. *Mol. Immunol.* *51*, 136–142.
- Seitz, S., Schneider, C.K., Malotka, J., Nong, X., Engel, A.G., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2006). Reconstitution of paired T cell receptor alpha- and beta-chains from microdissected single cells of human inflammatory tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 12057–12062.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., et al. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med.* *204*, 2899–2912.
- Sewell, A.K. (2012). Why must T cells be cross-reactive? *Nat. Publ. Gr.* *12*, 669–677.
- Sharma, G., and Holt, R.A. (2014). T-cell epitope discovery technologies. *Hum. Immunol.* *75*, 514–519.
- Shimamura, M., Huang, Y.-Y., Okamoto, N., Suzuki, N., Yasuoka, J., Morita, K., Nishiyama, A., Amano, Y., and Mishina, T. (2007). Modulation of Valpha19 NKT cell immune responses by alpha-mannosyl ceramide derivatives consisting of a series of modified sphingosines. *Eur. J. Immunol.* *37*, 1836–1844.
- Shugay, M., Britanova, O. V, Merzlyak, E.M., Turchaninova, M.A., Mamedov, I.Z., Tuganbaev, T.R., Bolotin, D.A., Staroverov, D.B., Putintseva, E. V, Plevova, K., et al. (2014). Towards error-free profiling of immune repertoires. *Nat. Methods* *11*, 653–655.
- Siewert, K. (2011). Autoaggressive Human T Cell Receptors and their Antigen Specificities.
- Siewert, K., Malotka, J., Kawakami, N., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2012). Unbiased identification of target antigens of CD8⁺ T cells with combinatorial libraries coding for short peptides. *Nat. Med.* *18*, 824–828.
- Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2428–2433.
- Sospedra, M., Pinilla, C., and Martin, R. (2003). Use of combinatorial peptide libraries for T-cell epitope mapping. *Methods* *29*, 236–247.
- Stangel, M., Fredrikson, S., Meinel, E., Petzold, A., Stüve, O., and Tumani, H. (2013). The utility of cerebrospinal fluid analysis in patients with multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* *9*, 267–276.
- Stewart-Jones, G.B.E., McMichael, A.J., Bell, J.I., Stuart, D.I., and Jones, E.Y. (2003). A structural basis for immunodominant human T cell receptor recognition. *Nat. Immunol.* *4*, 657–663.
- Stone, J.D., Chervin, A.S., and Kranz, D.M. (2009). T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* *126*, 165–176.

- Stranzl, T., Larsen, M.V., Lundegaard, C., and Nielsen, M. (2010). NetCTLpan: pan-specific MHC class I pathway epitope predictions. *Immunogenetics* 62, 357–368.
- Sykulev, Y., Cohen, R.J., and Eisen, H.N. (1995). The law of mass action governs antigen-stimulated cytolytic activity of CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 11990–11992.
- Tal, S., and Paulsson, J. (2012). Evaluating quantitative methods for measuring plasmid copy numbers in single cells. *Plasmid* 67, 167–173.
- Tilloy, F., Treiner, E., Park, S.H., Garcia, C., Lemonnier, F., de la Salle, H., Bendelac, A., Bonneville, M., and Lantz, O. (1999). An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. *J. Exp. Med.* 189, 1907–1921.
- Trowsdale, J., and Knight, J.C. (2013). Major histocompatibility complex genomics and human disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 14, 301–323.
- Tsuchida, T., Parker, K.C., Turner, R. V, McFarland, H.F., Coligan, J.E., and Biddison, W.E. (1994). Autoreactive CD8⁺ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10859–10863.
- Turner, S.J., Doherty, P.C., McCluskey, J., and Rossjohn, J. (2006). Structural determinants of T-cell receptor bias in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 883–894.
- Utz, U., and Biddison, W.E. (1992). Presentation of three different viral peptides is determined by common structural features of the human lymphocyte antigen-A2.1 molecule. *J. Immunother.* (1991). 12, 180–182.
- Valdimarsson, H., Thorleifsdottir, R.H., Sigurdardottir, S.L., Gudjonsson, J.E., and Johnston, A. (2009). Psoriasis - as an autoimmune disease caused by molecular mimicry. *Trends Immunol.* 30, 494–501.
- Valitutti, S., Müller, S., Cella, M., Padovan, E., and Lanzavecchia, A. (1995). Serial triggering of many T-cell receptors by a few peptide-MHC complexes. *Nature* 375, 148–151.
- van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643–1647.
- van der Merwe, P.A., and Dushek, O. (2011). Mechanisms for T cell receptor triggering. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 47–55.
- Walter, U., and Santamaria, P. (2005). CD8⁺ T cells in autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* 17, 624–631.
- Wang, Y., Rubtsov, A., Heiser, R., White, J., Crawford, F., Marrack, P., and Kappler, J.W. (2005). Using a baculovirus display library to identify MHC class I mimotopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 2476–2481.
- Wenzel, T. (1994). Existence of a molecular ruler in proteasomes suggested by analysis of degradation products. *FEBS Lett.* 349, 205–209.

- Willing, A., and Friese, M.A. (2012). CD8-mediated inflammatory central nervous system disorders. *Curr. Opin. Neurol.* *25*, 316–321.
- Willing, A., Leach, O.A., Ufer, F., Attfield, K.E., Steinbach, K., Kursawe, N., Piedavent, M., and Friese, M.A. (2014). CD8⁺ MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* *44*, 3119–3128.
- Wiltschi, B., Merkel, L., and Budisa, N. (2009). Fine tuning the N-terminal residue excision with methionine analogues. *Chembiochem* *10*, 217–220.
- Wooldridge, L., Ekeruche-Makinde, J., Van Den Berg, H.A., Skowera, A., Miles, J.J., Tan, M.P., Dolton, G., Clement, M., Llewellyn-Lacey, S., Price, D.A., et al. (2012). A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides. *J. Biol. Chem.* *287*, 1168–1177.
- Wucherpfennig, K.W., and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* *80*, 695–705.
- Wucherpfennig, K.W., Allen, P.M., Celada, F., Cohen, I.R., De Boer, R., Garcia, K.C., Goldstein, B., Greenspan, R., Hafler, D., Hodgkin, P., et al. (2007). Polyspecificity of T cell and B cell receptor recognition. *Semin. Immunol.* *19*, 216–224.
- Yin, Y., and Mariuzza, R.A. (2009). The multiple mechanisms of T cell receptor cross-reactivity. *Immunity* *31*, 849–851.
- Yin, L., Huseby, E., Scott-Browne, J., Rubtsova, K., Pinilla, C., Crawford, F., Marrack, P., Dai, S., and Kappler, J.W. (2011). A single T cell receptor bound to major histocompatibility complex class I and class II glycoproteins reveals switchable TCR conformers. *Immunity* *35*, 23–33.
- York, I.A., Chang, S.-C., Saric, T., Keys, J.A., Favreau, J.M., Goldberg, A.L., and Rock, K.L. (2002). The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* *3*, 1177–1184.
- Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* *179*, 973–984.
- Zhao, Y., Gran, B., Pinilla, C., Markovic-Plese, S., Hemmer, B., Tzou, A., Whitney, L.W., Biddison, W.E., Martin, R., and Simon, R. (2001). Combinatorial peptide libraries and biometric score matrices permit the quantitative analysis of specific and degenerate interactions between clonotypic TCR and MHC peptide ligands. *J. Immunol.* *167*, 2130–2141.

Abkürzungsverzeichnis

Physikalische Maßeinheiten wurden entsprechend ihrem Einheitszeichen und Nukleotide wurden gemäß des IUPAC *Ambiguity Codes* abgekürzt. Aminosäuren wurden im Ein- oder Dreibuchstabencode angegeben.

58-2D1-CD8-sGFP	58 α β ⁺ Zellen, die den TZR 2D1, CD8 und sGFP exprimieren
58-B7-CD8-sGFP	58 α β ⁺ Zellen, die den TZR B7, CD8 und sGFP exprimieren
58-Ja58-CD8-sGFP	58 α β ⁺ Zellen, die den TZR V \square 7.2J \square 58-V \square 1 \square 2.3, CD8 und sGFP exprimieren
58-JM22-CD8-sGFP	58 α β ⁺ Zellen, die den TZR JM22, CD8 und sGFP exprimieren
58-V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7-CD8	58 α β ⁺ Zellen, die den TZR V \square 2J \square 21-V \square 15.1J \square 2.7 und CD8 exprimieren
58-V \square 3.1J \square 45.1-V \square 13.1J \square 1.1-CD8-sGFP	58 α β ⁺ Zellen, die den TZR V \square 3.1J \square 45.1-V \square 13.1J \square 1.1, CD8 und sGFP exprimieren
58-V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7-CD8	58 α β ⁺ Zellen, die den TZR V \square 7J \square 11-V \square 15.1J \square 2.7 und CD8 exprimieren
Amp	Ampicillin
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
B-Zelle	B-Lymphozyt
\square_2 m	\square_2 -Mikroglobulin
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementarity determining regions</i>
COS-7-A2	COS-7 Zellen, die HLA-A*02:01 exprimieren
COS-7-A3	COS-7 Zellen, die HLA-A*03:01 exprimieren
COS-7-C6	COS-7 Zellen, die HLA-C*06:02 exprimieren
CRT	Calreticulin
CSF	<i>Cerebrospinal fluid (Liquor cerebrospinalis)</i>
Ct-Wert	<i>cycle threshold</i> -Wert
d. h.	das heißt
DMXL2	<i>DmX-like protein 2</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D \square	diverse (Gensegment der \square -TZR-Kette)
E	Effizienz
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EML5	<i>Echinoderm microtubule-associated protein-like 5</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAP1/2	ER Aminopeptidase 1 und 2
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i>
FPLC	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
GPCPD1	<i>Glycerophosphocholine phosphodiesterase 1</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HLA-A2	HLA-A*02:01
HLA-A3	HLA-A*03:01
HLA-C6	HLA-C*06:02

IB	<i>inclusion bodies</i>
IL-2	Interleukin-2
IPTG	Isopropylthio- β -Galaktosid
ITAMs	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motifs</i>
J _H /J _H	<i>joining</i> (Gensegment der \square/\square -TZR-Kette)
LB-Medium	Luria-Bertani Medium
log ₁₀	dekadische Logarithmus
M-CSF	Monozytenkolonien-stimulierender Faktor
MAIT	Mukosa-assoziierte invariante T-Zellen
MBP	Myelin-Basische Protein
MD	Moleküldynamik
Met-AP	Methionin-Aminopeptidase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
MIIC	MHC-Klasse-II-Kompartiment
Mimo	Mimotop
MPI	Max-Planck-Institut
MR1	<i>MHC-related protein 1</i>
MS	Multiple Sklerose
mTEC	Medulläre Epithelzellen des Thymus
MWCO	Molekulargewichtsausschlussgröße
N-Terminus	Amino-Terminus
NCAN	Neurocan
NFAT	<i>nuclear factor of activated T cells</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
OD	optische Dichte
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PECPL	<i>plasmid encoded combinatorial peptide libraries</i>
PECPL 8X	PECPL, die für acht Aminosäuren lange Peptide mit zufälliger Zusammensetzung kodiert
PECPL 9X	PECPL, die für neun Aminosäuren lange Peptide mit zufälliger Zusammensetzung kodiert
PECPL _{diff}	Anzahl an PECPL-Plasmiden, die für verschiedene Peptide kodieren
PECPL _{total}	Gesamtanzahl an PECPL-Plasmiden
PLC	Peptidbeladungskomplex
PLP	Proteolipid-Protein 1
PV	Psoriasis vulgaris
qPCR	quantitative PCR
R ²	Bestimmtheitsmaß
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
sGFP	super grün fluoreszierendes Protein
T-Zelle	T-Lymphozyt
TAP	Antigenpeptid-Transporter
TAX	<i>T-lymphotrophic virus-2 protein</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
u. a.	unter anderem
UID	<i>unique identifier</i>
UV	Ultraviolett
vs.	versus
V _H /V _H	<i>variable</i> (Gensegment der \square/\square -TZR-Kette)
z. B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

Appendix

I. Sequenzen

Nachfolgend wurden die Nukleotidsequenzen angegeben, die für das α_2m und die zytoplasmatische Domäne des HLA-A2-Moleküls kodieren und in den Expressionsvektor pET-21c(+) eingefügt wurden. Die Sequenz der zytoplasmatischen Domäne des HLA-A2 wurde darüber hinaus durch einen GS Linker mit der BirA Biotinylierungssequenz verbunden. Zudem wurden die Erkennungssequenzen der Restriktionsenzyme angegeben, die während der Klonierung verwendet wurden.

α_2m

CATATGATGATCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGTTTACTCACGTCATCCAGCAGAGAA
TGGAAAGTCAAATTTCTGAATTGCTATGTGTCTGGGTTTCATCCATCCGACATTGAAG
TTGACTTACTGAAGAATGGAGAGAGAATTGAAAAAGTGGAGCATTCAGACTTGTCTTTC
AGCAAGGACTGGTCTTTCTATCTCTTGTACTACACTGAATTCACCCCCACTGAAAAAGA
TGAGTATGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACTTTGTCACAGCCCAAGATAGTTAAGTGGG
ATCGAGACATGTAAC/AATTC

NdeI, *MfeI/EcoRI*

HLA-A2

CA/TAATATGGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCCCGGCCCGGCC
GCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTC
GACAGCGACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGG
TCCGGAGTATTGGGACGGGGAGACACGGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAG
TGGACCTGGGGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTTCTCACACCGTTC
CAGAGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTTCGGACTGGCGCTTCCTCCGCGGGTACCACCA
GTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGGACCG
CGGCGGACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCCATGTGGCGGAG
CAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAA
CGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCAAAACGCATATGACTCACACGCTG
TCTCTGACCATGAAGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCTGAGCTTCTACCCTGCGGAGATC
ACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGAC
CAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAC
AGGAGCAGAGATACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGCCCAAGCCCCTCACCCCTG
AGATGGGAGGGCTCTCTCGAGCGAGCTCCCGGGGGCCTGAACGACATCTTCGAGGCTCA
GAAAATCGAATGGCACGAATGAGAATTC

NdeI/AseI, *BirA Biotinylierungssequenz*, *GS Linker*, *EcoRI*

II. Ergebnisse zu Abschnitt 3.4.1.3

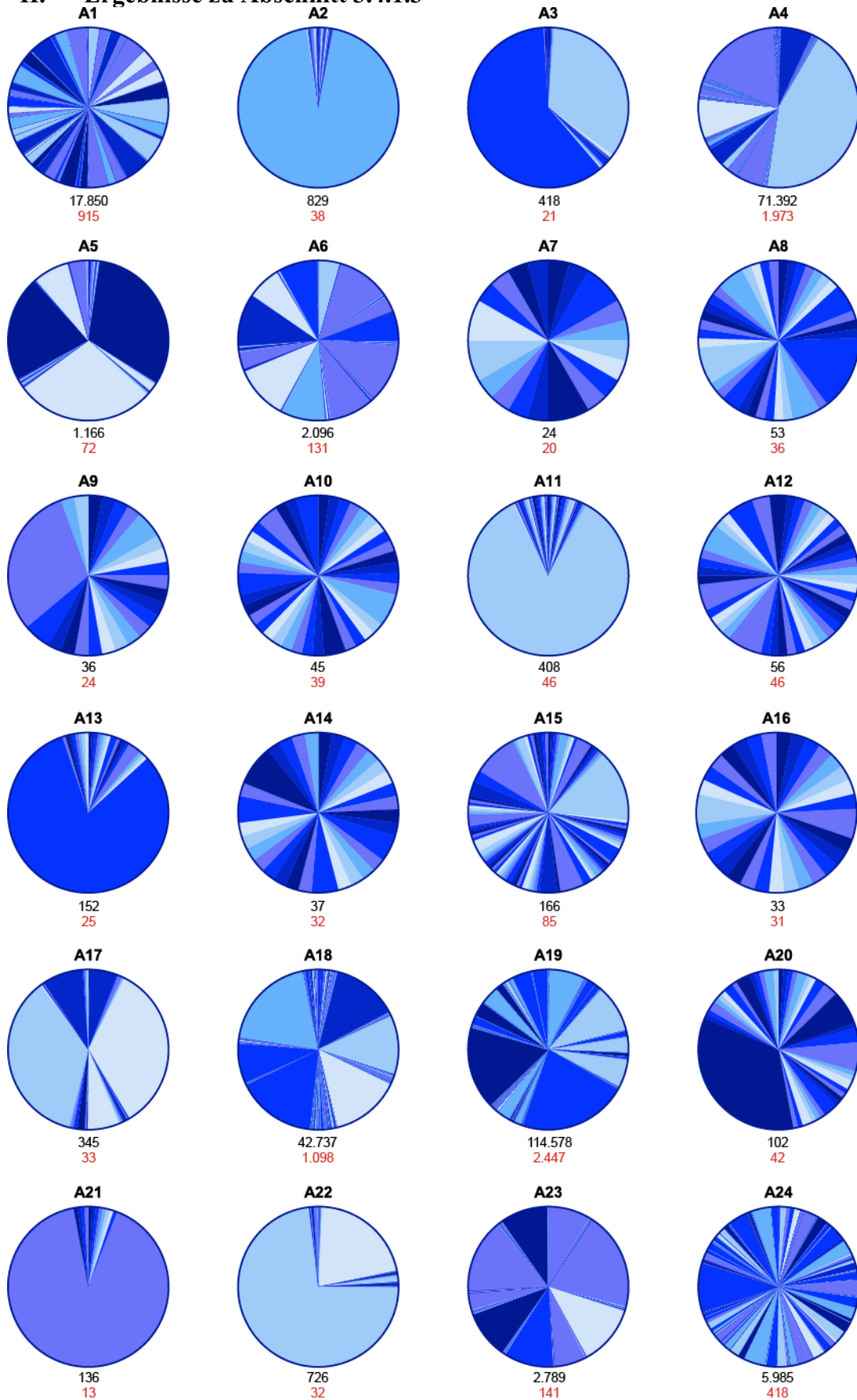


Abbildung 28: Schematische Darstellung der Amplifikationsmuster der Einzelzellen A1-A24 48 h nach Nukleofektion von 10 ng/μl PECPL unter Angabe von PECPL_{total} (schwarz) und PECPL_{diff} (rot).

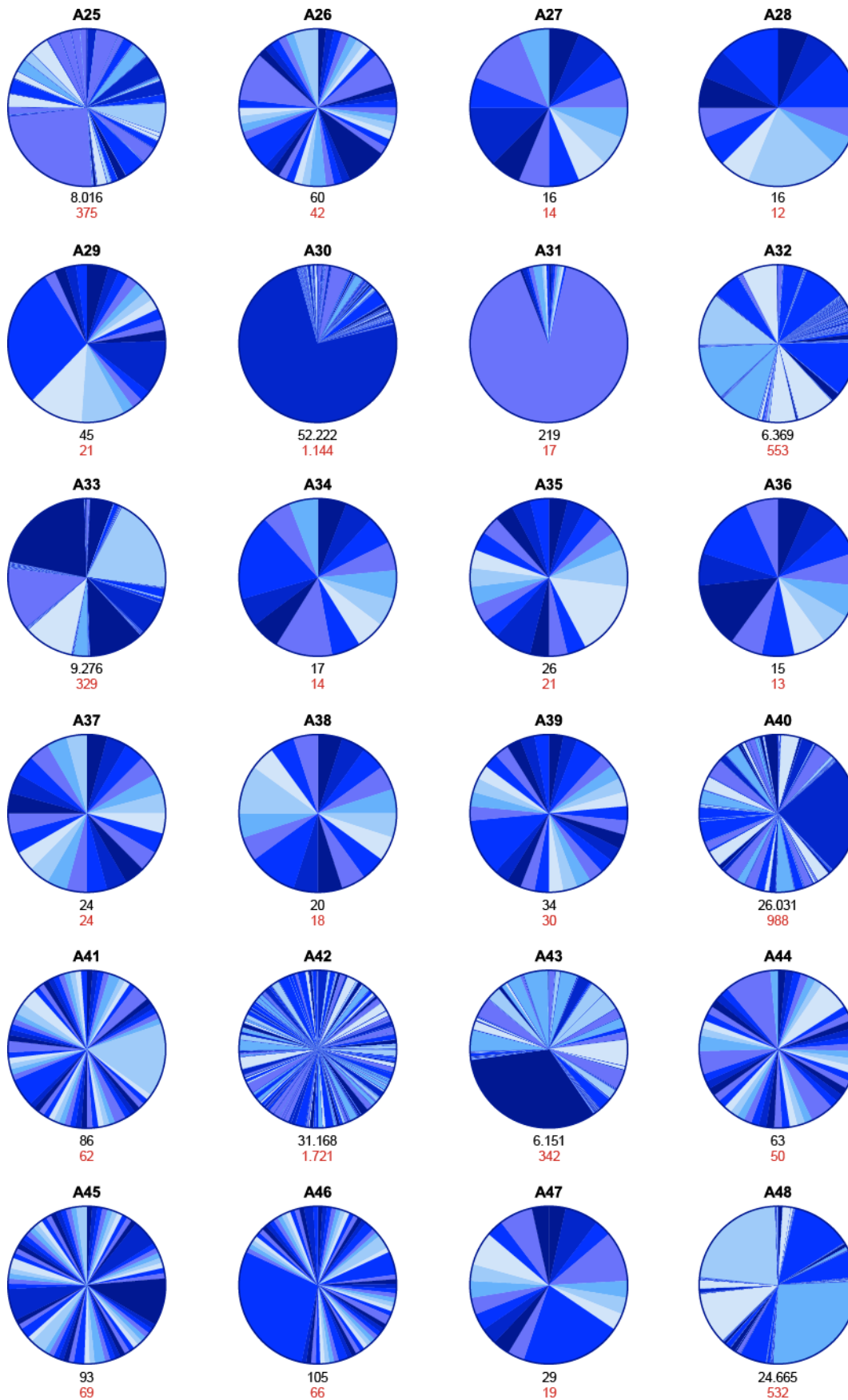


Abbildung 29: Schematische Darstellung der Amplifikationsmuster der Einzelzellen A25-A48 48 h nach Nukleofektion von 10 ng/ μ l PECPL unter Angabe von PECPL_{total} (schwarz) und PECPL_{diff} (rot).

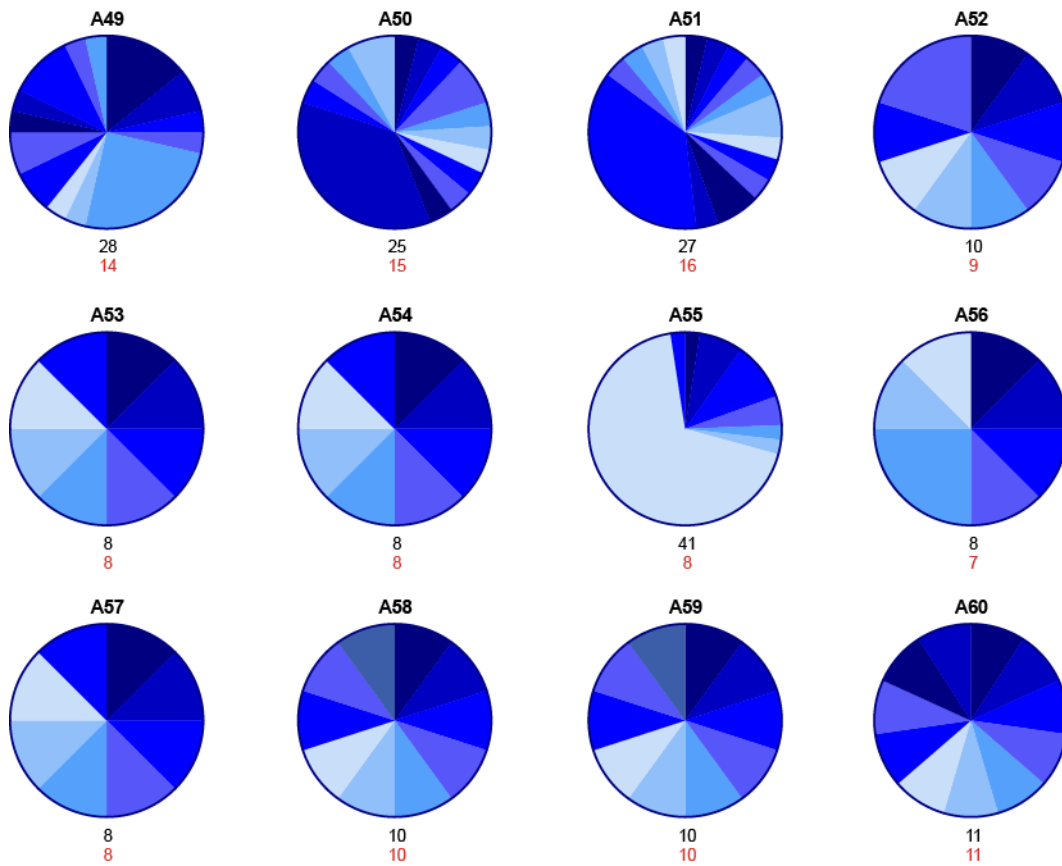


Abbildung 30: Schematische Darstellung der Amplifikationsmuster der Einzelzellen A49-A60 48 h nach Nukleofektion von 10 ng/μl PECPL unter Angabe von PECPL_{total} (schwarz) und PECPL_{diff} (rot).

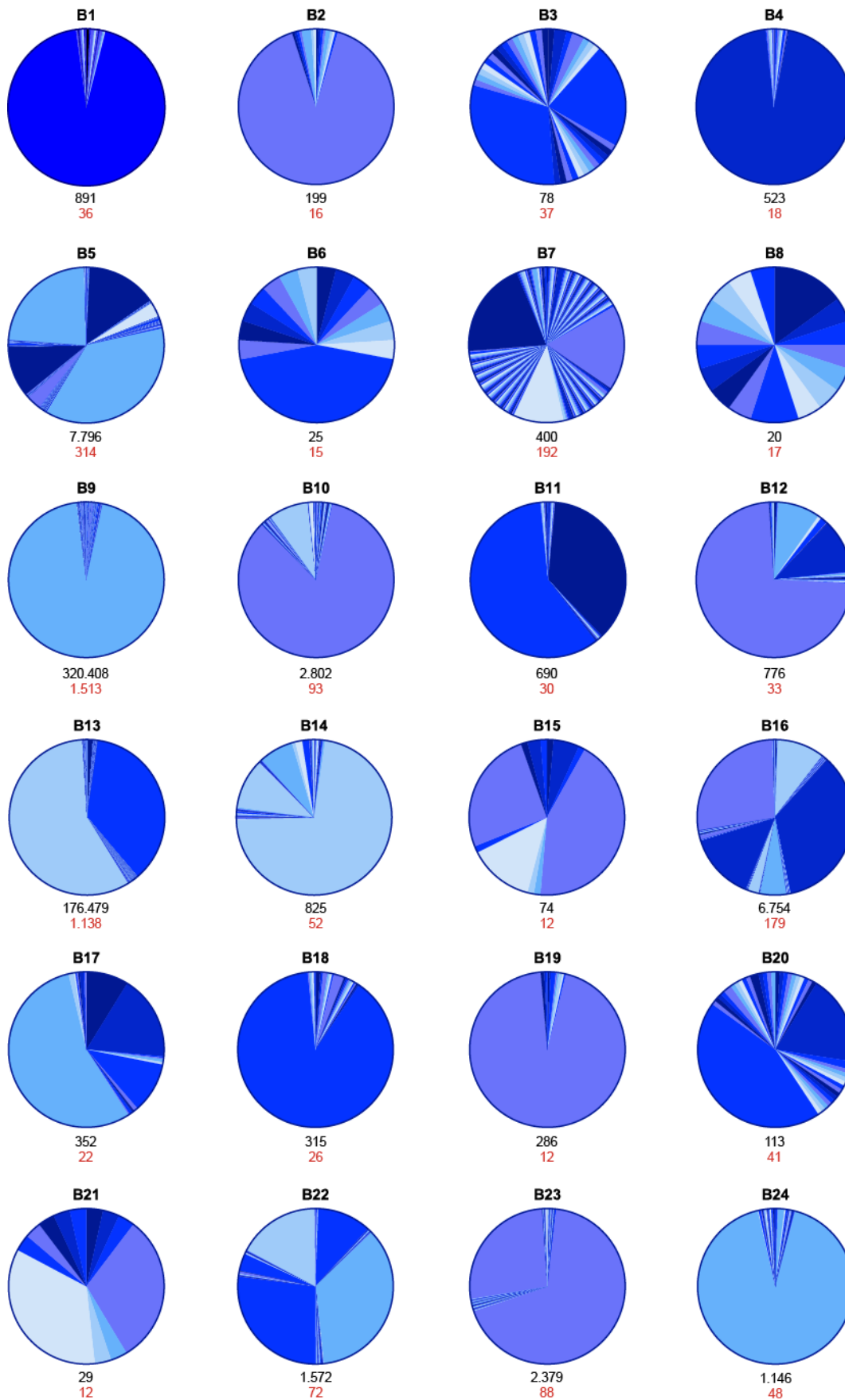


Abbildung 31: Schematische Darstellung der Amplifikationsmuster der Einzelzellen B1-B24 48 h nach Nukleofektion von 1 ng/ μ l PECPL unter Angabe von PECPL_{total} (schwarz) und PECPL_{diff} (rot).

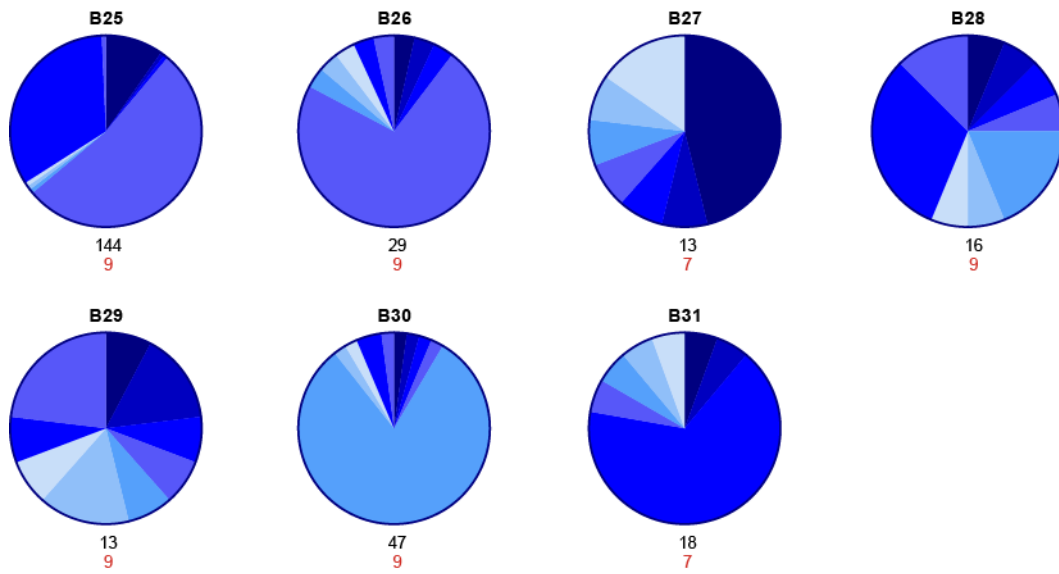


Abbildung 32: Schematische Darstellung der Amplifikationsmuster der Einzelzellen B25-B31 48 h nach Nukleofektion von 1 ng/μl PECPL unter Angabe von PECPL_{total} (schwarz) und PECPL_{diff} (rot).

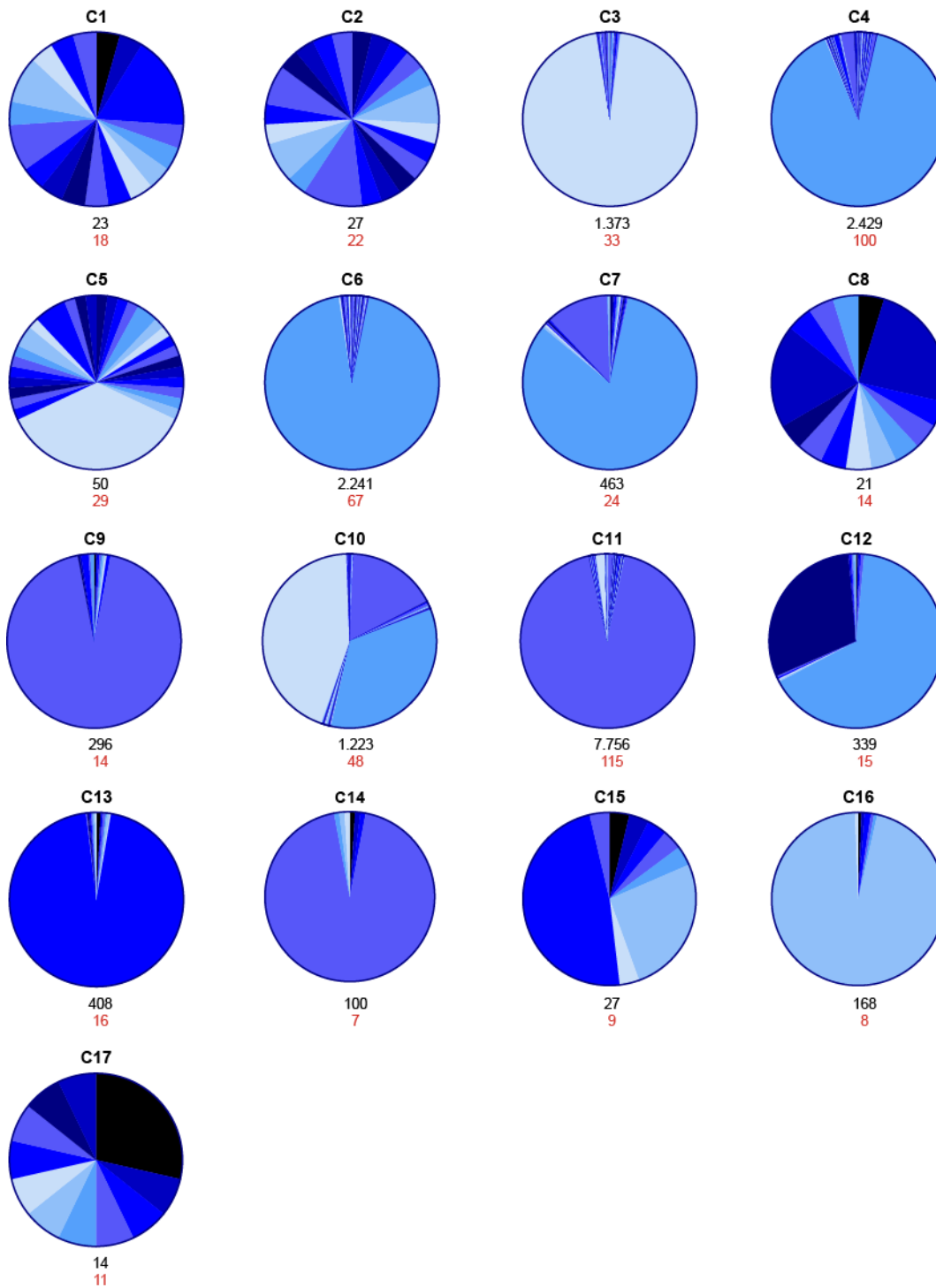


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Amplifikationsmuster der Einzelzellen C1-C17 48 h nach Nucleofektion von 0,1 ng/μl PECPL unter Angabe von PECPL_{total} (schwarz) und PECPL_{diff} (rot).

Eidesstattliche Versicherung

Rühl, Geraldine

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

„Untersuchungen zur Antigenerkennung von T-Zellen bei Patienten mit
Autoimmunkrankheiten“

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient
und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind,
als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle
einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in
ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades
eingereicht wurde.

München, 16.11.2016

Ort, Datum

Geraldine Rühl

Danksagung

Am Erfolg meiner Promotion waren viele Personen beteiligt. Ich möchte hiermit allen meinen tiefen Dank aussprechen, die mich auf meinem Weg begleitet und unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. Klaus Dornmair für die Bereitstellung der spannenden Projekte, für seine intensive Betreuung, seine Ideen und für seine ständige Bereitschaft zur Diskussion.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld dafür bedanken, dass ich an seinem Institut promovieren konnte.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Jörg Prinz von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie, dass ich die Möglichkeit hatte, an diesem spannenden Teilprojekt mitarbeiten zu können.

Für die freundliche Zusammenarbeit danke ich Prof. Dr. Ires Antes, Atanas und Maria.

Ich möchte mich bei Stefan für die hilfreiche Unterstützung bei den Datenbanksuchen bedanken.

Mein Dank gilt Simon und Ingo für den spannenden Einblick in die „Welt des Programmierens und der automatisierten Bildanalyse“, ich habe viel davon profitiert. Vor allem Ingo für Deine stete Bereitschaft trotz Mundschutz und Haube mit mir zahlreiche Stunden auf die „Fokus-Fehlersuche“ zu gehen.

Ein großer Dank gilt meinen Kollegen Jessica, Ingrid, Matea, Kathrin, Reinhard, Edu und insbesondere Joachim für die gute Arbeitsatmosphäre und die fachkundigen Ratschläge.

Ein herzlicher Dank gilt Marga und Aline für die vielen Gespräche, die gute Zusammenarbeit und die lustige gemeinsame Zeit, die mir meine Promotionszeit sehr verschönert haben.

Mein großer Dank gebührt Sabrina, meiner Familie, meiner Schwester, Ben und vor allem meinen Eltern für Eure liebevolle Unterstützung und die zahlreichen Aufmunterungen, die mir viel Kraft gegeben haben. Ohne Euch wäre das so nicht möglich gewesen!