

Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München

Institut für Klinische Neuroimmunologie

Direktor: Prof. Dr. Martin Kerschensteiner

Analyse von Antigenen von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren bei Autoimmunkrankheiten

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

David Gebert

aus Oettingen in Bay.

2022

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

Betreuer: PD Dr. Klaus Dornmair

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ludger Klein

Dekan: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 28. März 2023

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Brändle S. M., Cerina M., Weber S., Held K., Menke A. F., Alcalá C., **Gebert D.**, Herrmann A. M., Pellkofer H., Gerdes L. A., Bittner S., Leyboldt F., Teegen B., Komorowski L., Kümpfel T., Hohlfeld R., Meuth S.G., Casanova B., Melzer N., Beltrán E. and Dornmair K. (2021): Cross-reactivity of a pathogenic autoantibody to a tumor antigen in GABA_A receptor encephalitis, *PNAS*, 118, DOI: 10.1073/pnas.1916337118

Beltrán E., Paunovic M., **Gebert D.**, Cesur E., Jeitler M., Höftberger R., Malotka J., Mader S., Kawakami N., Meinl E., Bradl M., Dornmair K. and Lassmann H. (2021): Archeological neuroimmunology: resurrection of a pathogenic immune response from a historical case sheds light on human autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Acta Neuropathologica*, 141, 67-83

Danksagung

Während meiner Zeit als Doktorand haben mich viele Personen begleitet und unterstützt, denen ich an dieser Stelle danken möchte.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater PD Dr. Klaus Dornmair für die Bereitstellung der Projekte und für die hervorragende Betreuung. Man konnte sich immer auf ihn verlassen, wenn man Fragen hatte und er hatte immer einen guten Ratschlag parat.

Zudem möchte ich mich bei Prof. Dr. Martin Kerschensteiner und Prof. Dr. Reinhard Hohlfeld bedanken, dass ich meine Dissertation an Ihrem Institut anfertigen durfte.

Ein weiterer Dank gebührt meinen Kolleginnen und Kollegen in der Arbeitsgruppe, Joachim, Reini, Alina, Edu, Julia, Susanne, Ingrid, Markus, Pauline, Sonja und Katharina für die gegenseitige Unterstützung und die tolle Arbeitsatmosphäre. Bei Simone, Geraldine, Marga, Matea und Katherina möchte ich mich zudem für die Betreuung und Unterstützung während meiner Zeit als Masterstudent bedanken.

Auch bei meinen Kolleginnen und Kollegen aus anderen Arbeitsgruppen, Bella, Stephan, Arek, Heike, Simone, Michelle und alle anderen am BMC möchte ich mich für die tolle Zeit bedanken.

Ein weiterer besonderer Dank gilt meinen Eltern. Durch ihre Unterstützung haben sie mir dies alles erst ermöglicht.

Genauso möchte ich mich bei meinen Brüdern, Benny und Manuel, und meinen Freunden bedanken. Sie waren außerhalb des Labors immer eine große Unterstützung und ein großer Rückhalt.

Abstract

Inflammatory diseases of the nervous system can be triggered by viruses as well as by autoreactive B and T cells. Also, immune responses against tumors can lead to brain inflammation through cross-reactivity against neural proteins, which is termed as paraneoplastic encephalitis.

GABA_A receptor encephalitis is also assumed to be paraneoplastic. For a patient termed as IP2 (Index patient 2), autoantibodies were detected, which, in addition to reactivity towards subunits of the GABA_A receptor (GABA_A-R), also showed a high affinity towards the cancer-associated protein CSRP2. It is assumed that the zinc-binding sites of both proteins serve as epitopes of the recombinant antibody rAb-IP2. In this thesis, it could be proven that the affinity of rAb-IP2 towards GABA_A-R is dependent from the composition of α_1/β_3 -subunits as well as from the concentration of Zn²⁺ ions. With these results, it could be shown that the zinc-binding site of GABA_A-R is probably part of the epitope which is recognized by rAb-IP2. Furthermore, brain samples of the patient showed a clonal expanded CD8+ T cell clone. Since an involvement of cytotoxic T cells was assumed, the identification of the T cell antigen was another aim of this thesis. For this, optimization of the technique of antigen identification, which is based on the activation of T cell hybridoma by plasmid-encoded peptide libraries, was also part of this thesis.

Human autoimmune encephalitides (hAEs) describe rare diseases which are caused by sensitization with brain tissue and show high similarity to multiple sclerosis in terms of both symptoms and pathophysiology. In this thesis, it could be shown that the recombinant antibody rAb-hAE of a patient, which was diagnosed with hAE, not only recognizes myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG), which is involved in many autoimmune diseases, but also binds a similar epitope as the well characterized antibody r8-18C5.

Zusammenfassung

Entzündliche Erkrankungen des Nervensystems können sowohl durch Viren, als auch durch autoreaktive B- und T-Zellen ausgelöst werden. Auch Immunreaktionen gegen Tumoren können durch Kreuzreaktionen gegenüber neuronalen Proteinen zu einer Entzündung des Gehirns führen, welche als paraneoplastische Enzephalitis bezeichnet wird.

Es wird vermutet, dass die GABA_A-Rezeptor-Enzephalitis ebenfalls ein paraneoplastisches Syndrom darstellt. Für einen als IP2 (Index patient 2) bezeichneten Patienten konnten Autoantikörper nachgewiesen werden, welche neben einer Reaktivität gegenüber Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors (GABA_A-R) ebenfalls eine hohe Affinität gegenüber dem mit Krebs assoziierten Protein CSRP2 aufweisen. Die Zn²⁺-Bindestellen der beiden Proteine werden hierbei als die von dem rekombinanten Antikörper rAb-IP2 erkannten Epitope vermutet. In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Affinität von rAb-IP2 an GABA_A-R sowohl von der Zusammensetzung der α_1/β_3 -Untereinheiten des Rezeptors, als auch von der Zn²⁺-Konzentration abhängig ist. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Zn²⁺-Bindestelle des Rezeptors wahrscheinlich Teil des von rAb-IP2 erkannten Epitops ist. Des Weiteren wurde in Hirnproben des Patienten ein klonal expandierter CD8+ T-Zell-Klon nachgewiesen. Da eine Beteiligung von zytotoxischen T-Zellen an der Autoimmunität vermutet wurde, bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Identifikation des T-Zell-Antigens. Die Technik der Antigen-Identifizierung, welche auf einer Aktivierung von T-Zell-Hybridomen mithilfe von plasmid-codierten Peptid-Libraries beruht, sollte hierbei zudem optimiert werden.

Als humane autoimmune Enzephalitiden (hAEs) werden sehr seltene Erkrankungen bezeichnet, welche durch Sensibilisierung mit Hirngewebe verursacht werden und sowohl hinsichtlich der Symptomatik, als auch der Pathophysiologie große Ähnlichkeit gegenüber der Multiplen Sklerose aufweisen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der rekombinante Antikörper rAb-hAE eines Patienten mit hAE nicht nur das an vielen Autoimmunerkrankungen beteiligte Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) erkennt, sondern auch ein ähnliches Epitop wie der bereits erforschte Antikörper r8-18C5 bindet.

Inhaltsverzeichnis

Danksagung

Abstract

Zusammenfassung

1. Einleitung	13
1.1 Das Immunsystem	13
1.2 Antikörper	14
1.2.1 Struktur und Funktion von Antikörpern	14
1.2.2 B-Zell-Entwicklung und Generierung der Antikörper-Diversität	17
1.3 T-Zellen	18
1.3.1 Funktion von T-Zellen im adaptiven Immunsystem	18
1.3.2 Struktur des T-Zell-Rezeptors	20
1.3.3 Generierung der TCR-Diversität	22
1.3.4 Reifung und Selektion von T-Zellen im Thymus	23
1.4 Antigenerkennung durch CD8+ Zellen.....	24
1.4.1 Antigenpräsentation durch den Major Histocompatibility Complex (MHC).....	24
1.4.2 Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptid-Komplex.....	26
1.4.3 Identifizierung von T-Zell-Antigenen.....	27
1.5 Autoimmunerkrankungen	29
1.5.1 GABA _A -Rezeptor-Enzephalitis.....	30
1.5.1.1 Index Patient 2.....	32
1.5.2 Humane autoimmune Enzephalitis (hAE).....	34
1.6 Ziele der Dissertation	36

1.6.1 Charakterisierung der rAb-IP2-Bindung an GABA _A -R	36
1.6.2 Identifizierung des IP2-T-Zell-Antigens	36
1.6.3 Identifizierung und Charakterisierung des von rAb-hAE erkannten Antigens	36
2. Material und Methoden	37
2.1 Material	37
2.1.1 Allgemeine Puffer	37
2.1.2 Chemikalien und weitere Materialien	37
2.1.3 Längen-und Größenstandards	38
2.1.4 Medien zur Zellkultivierung	38
2.1.5 Antibiotika	40
2.1.6 Eukaryotische Zelllinien	40
2.1.7 Bakterienstämme	41
2.1.8 Plasmide	41
2.1.9 Primer	43
2.1.10 Kits	44
2.1.11 Restriktionsenzyme	44
2.1.12 Antikörper	45
2.1.13 Geräte	45
2.1.14 Programme	47
2.2 Mikrobiologische Methoden	48
2.2.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien	48
2.2.1.1 Transformation durch Heatshock	48
2.2.1.2 Transformation durch Elektroporation	48
2.2.2 Anfertigung von Glycerol-Stocks	49
2.2.3 Herstellen bakterieller Subpools	49
2.2.3.1 Subpools im 96-well Block	49

2.2.3.2 „Straßen“-Subpools	50
2.2.3.3 Kultivierung einzelner Bakterienklone	51
2.3 Zellbiologische Methoden	52
2.3.1 COS-7-Zellen	52
2.3.1.1 Kultivierung	52
2.3.1.2 Transfektion durch Fugene®	52
2.3.1.3 Transfektion durch Nukleofektion	53
2.3.2 T-Zell-Hybridome	54
2.3.2.1 Kultivierung	54
2.3.3 HeLa-Zellen	55
2.3.3.1 Kultivierung	55
2.3.3.2 Transfektion durch Nukleofektion	55
2.3.4 Expi293F™-Zellen	55
2.3.4.1 Kultivierung	55
2.3.4.2 Transfektion	56
2.3.5 Bestimmung der Lebendzellzahl	56
2.3.6 Einfrieren von Zellen	57
2.4 Durchflusszytometrie	57
2.4.1 Allgemeines Protokoll der Durchflusszytometrie	57
2.4.2 Analyse der CD3- und CD8-Expression von T-Zell-Hybridomen	58
2.4.3 Untersuchungen der rAb-IP2-Bindung an GABA _A -R	58
2.4.3.1 Quantifizierung der GABA _A -R-Expression in Expi293F™ Zellen	58
2.4.3.2 Untersuchung der rAb-IP2-Bindung in Abhängigkeit der Zusammensetzung der GABA _A -R-Untereinheiten	59
2.4.3.3 Untersuchung des Einflusses der Zn ²⁺ -Konzentration an der rAb-IP2-Bindung	60
2.4.4 Untersuchungen der rAb-hAE-Bindung an hMOG	60
2.4.4.1 Analyse der hMOG-Erkennung durch rAb-hAE-Bindung	60
2.4.4.2 Untersuchung der rAb-hAE-Bindung an hMOG-Mutanten	61

2.4.5 Präparative Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)	62
2.5 T-Zell-Aktivierungsassay	63
2.5.1 CD3-Aktivierung.....	63
2.5.2 Co-Kultivierung mit transfizierten COS-7-Zellen	63
2.5.3 Mikroskopie und Entnahme von T-Zell-aktivierenden COS-7-Zellen	64
2.5.4 Subpool-Screening.....	65
2.6 Molekularbiologische Methoden.....	65
2.6.1 DNA-Präparation	65
2.6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	65
2.6.1.2 Ethanol-Präzipitation von DNA.....	65
2.6.1.3 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion	66
2.6.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung	66
2.6.2 Klonierung	67
2.6.2.1 Klonierung HLA-BFP-codierender Vektoren.....	67
2.6.2.2 Klonierungsstrategie zur Anreicherung antigencodierender DNA-Sequenzen.....	67
2.6.2.3 Polymerase-Kettenreaktion	69
2.6.2.3.1 PCR zur Klonierung HLA-BFP-codierender Vektoren	69
2.6.2.3.2 Nested-PCR	71
2.6.2.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen.....	73
2.6.2.5 Dephosphorylierung und Ligation von Plasmiden	73
2.6.2.6 Zero-Blunt-Klonierung	74
2.6.2.7 DNA-Sequenzierung	74
3. Ergebnisse	75
3.1 Untersuchungen der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R.....	75
3.1.1 Die rAb-IP2-Bindung an GABA _A -R ist abhängig von der Zusammensetzung der α_1/β_3 -Untereinheiten	75

3.1.2 Untersuchung der Zn^{2+} -Abhängigkeit für die rAb-IP2-Bindung.....	77
3.2 Untersuchung der rAb-hAE-Bindung an hMOG	81
3.2.1 Der Antikörper rAb-hAE erkennt hMOG	81
3.2.2 Identifizierung des rAb-hAE-Epitops von hMOG.....	82
3.3 Mimotop-Suche durch Screening von Peptid-Libraries.....	86
3.3.1 Nachweis der CD3/CD8-Expression und CD3-Aktivierung von IP2-T-Zell-Hybridomen	86
3.3.2 HLA-Restriktion und Entnahme positiver Zellen	88
3.3.3 Nested-PCR und Ligation der peptid-codierenden Sequenzen in pcDNArc-spacer	93
3.3.4 Untersuchung der angereicherten Peptid-Libraries auf eine IP2-T-Zell-Aktivierung.....	97
3.3.5 Analyse der Subpools aus dem Ausgangspool 8L-NEUI	97
4. Diskussion	101
4.1 Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R	101
4.1.1 Die Zusammensetzung der α_1/β_3 -Untereinheiten beeinflusst die rAb-IP2-Bindung an GABA _A -R.....	101
4.1.2 Die rAb-IP2-Bindung an GABA _A -R ist abhängig von der Zn^{2+} -Konzentration.....	102
4.2 Analyse der rAb-hAE-Bindung an hMOG.....	105
4.2.1 Das Autoantigen hMOG wird durch rAb-hAE erkannt	105
4.2.2 Der Antikörper rAb-hAE erkennt ein ähnliches Epitop wie der Antikörper r8-18C5	106
4.3 Mimotop-Suche des IP2-TCRs durch Library-Screening	110
4.3.1 Optimierung des T-Zell-Aktivierungsassays	110
4.3.2 Einflüsse auf die Anreicherung antigen-codierender Plasmide und Ausblick.....	113
5. Literaturverzeichnis	117

6. Anhang.....	131
6.1 Vektorkarten	131
6.2 Insertsequenzen	136
6.3 Aminosäuresequenzen (Antikörper)	145
6.4 Abbildungen.....	147
6.5 Bandenanalyse	149
Eidesstaatliche Versicherung	152

1. Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist permanent Pathogenen wie Bakterien, Viren oder auch Parasiten und Toxinen konfrontiert. Auch entartete Zellen, welche zur Entstehung eines Tumors führen können, müssen durch das Immunsystem bekämpft werden. Die Immunantwort gliedert sich hierbei in die Mechanismen der angeborenen Immunität und der adaptiven Immunität. Erstere zeichnet sich durch das Komplementsystem, Granulozyten, Makrophagen und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aus (Nicholson, 2016) und erkennt mithilfe von *pattern recognition receptors* (PRRs) die von Krankheitserregern exprimierten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs, Paludan et al., 2021), wie z. B. Lipopolysaccharide (Kumar et al., 2011). Die angeborene Immunität zeichnet sich durch eine schnelle Immunantwort aus, besitzt jedoch nur eine geringe Spezifität und ist nicht in der Lage, sich an neue Antigene anzupassen. Diese Anpassung an neue oder beispielsweise durch Antigendrift veränderte Antigene wird durch das adaptive Immunsystem gewährleistet. Das adaptive Immunsystem gliedert sich hierbei in die humorale Immunantwort, welche durch die Antigenerkennung von B-Zellen und die Antikörper-Produktion durch Plasmazellen gekennzeichnet ist, und in die zelluläre Immunantwort, welche durch Interaktionen von antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) mit zytotoxischen T-Zellen ausgelöst wird. Sowohl B-Zellen, als auch T-Zellen besitzen antigen-spezifische Rezeptoren, welche als B-Zell-Rezeptor (BCR) bzw. T-Zell-Rezeptor (TCR) bezeichnet werden. Nach erfolgter Erkennung eines spezifischen Antigens wird sowohl für B-, als auch für T-Zellen eine Signalkaskade ausgelöst, welche unter anderem zu einer klonalen Expansion der Zelle führt. Beide Zelltypen sind zudem in der Lage, sich nach ihrer Aktivierung zu Gedächtniszellen zu differenzieren, wodurch eine schnellere und effektivere Immunantwort auf bereits bekannte Antigene gewährleistet werden kann.

1.2 Antikörper

1.2.1 Struktur und Funktion von Antikörpern

Antikörper stellen das zentrale Element der humoralen Immunantwort dar und werden von ausdifferenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, sekretiert. Sie sind in der Lage, Antigene von Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten spezifisch zu binden und Effektorfunktionen der zellulären Immunantwort auszulösen. Die auch als Immunglobuline (Ig) bezeichneten Proteine werden in verschiedene Isotypen eingeteilt, wobei IgG den am häufigsten im Blut zirkulierenden Antikörper darstellt (Vidarsson et al., 2014). Die Antikörper-Struktur leitet sich von jener des B-Zell-Rezeptors ab, wobei im Gegensatz zu sezernierten Antikörpern dieser membrangebunden vorliegt (Treanor, 2012). Antikörper setzen sich aus jeweils zwei identischen schweren Ketten (*heavy chain* bzw. *H-chain*) und zwei identischen leichten Ketten (*light chain* bzw. *L-chain*) zusammen (Abbildung 1). Die schweren Ketten, welche ein Molekulargewicht von jeweils ca. 50 kDa aufweisen, sind über zwei Disulfidbrücken kovalent verbunden und sind aus drei konstanten Domänen (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) und einer variablen Domäne (V_H) aufgebaut (Schroeder and Cavacini, 2010). Die beiden C_{H2} - und C_{H3} -Domänen der beiden schweren Ketten werden als F_C -Fragment (*fragment crystallizable*) bezeichnet und sind an der Vermittlung verschiedener Effektorfunktionen beteiligt (Forthal, 2014). Die leichten Ketten, welche jeweils ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa besitzen, besitzen ebenfalls eine variable Domäne (V_L), jedoch nur eine konstante Domäne C_L , über welche diese über eine Disulfidbrücke mit der C_{H1} -Domäne der schweren Kette verknüpft sind. Durch Papain-Verdau kann der Antikörper oberhalb der „Scharnierregion“, welche die beiden schweren Ketten über Disulfidbrücken miteinander verknüpft, geschnitten werden, wodurch das F_C -Fragment abgespalten wird. Als weitere Produkte werden durch diesen Verdau zwei weitere Fragmente erhalten, welche jeweils aus einer leichten Kette bestehen, welche über eine Disulfidbrücke mit der V_H - und der C_{H1} -Domäne der schweren Kette verknüpft ist (Schroeder and Cavacini, 2010). Dieses als F_{ab} -Fragment (*fragment antibody-binding*) bezeichnete Heterodimer ist für eine Antigenbindung ausreichend, da die Epitoperkennung ausschließlich über die beiden varianten Domänen V_H und V_L stattfindet.

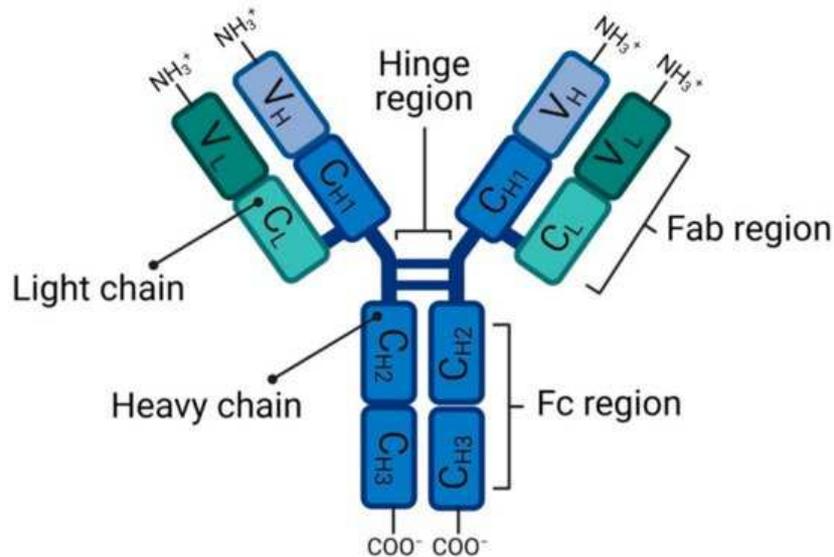


Abbildung 1: Schematischer Aufbau eines IgG-Antikörpers. Der Antikörper ist aus jeweils zwei identischen schweren Ketten (*heavy chain* bzw. *H-chain*, blau) und zwei identischen leichten Ketten (*light chain* bzw. *L-chain*, grün) aufgebaut, wobei die schweren Ketten durch zwei Disulfidbrücken miteinander verknüpft sind (*hinge region*). Die schweren Ketten bestehen jeweils aus drei konstanten (C_{H1} , C_{H2} und C_{H3}) und einer variablen Domäne (V_H), wobei die C_{H2} - und C_{H3} -Domänen der beiden Ketten als F_C -Fragment (*fragment crystallizable*) bezeichnet werden. Die leichten Ketten verfügen ebenfalls über eine variante Domäne (V_L), besitzen jedoch nur eine konstante Domäne (C_L). Letztere ist ebenfalls über eine Disulfidbrücke mit der C_{H1} -Domäne der schweren Kette verknüpft. Die leichte Kette bildet zusammen mit der V_H - und der C_{H1} -Domäne das Fab-Fragment (*fragment antibody-binding*). Die Antigenbindung erfolgt über die beiden variablen Domänen V_H und V_L der beiden Ketten (aus Hussain et al., 2021).

Die variablen Domänen zeichnen sich durch je drei hypervariable Regionen aus, welche als *complementary-determining regions* (CDRs) bezeichnet werden. Diese liegen als Loops zwischen den β -Faltblättern der konservierten Regionen, wodurch diese direkt an der Bindung eines Antigens bzw. dessen Epitops beteiligt sind und die Spezifität des Antikörpers vorgeben (Wong et al., 2019). Je drei CDRs pro V_H - und V_L -Domäne bilden hierbei die Antigenbindestelle, wodurch jeder Antikörper in der Lage ist, über nicht-kovalente Bindungen zwei Antigene zu erkennen.

Neben IgG-Antikörpern existieren noch vier weitere Isotypen von Antikörpern. IgMs sind hierbei die ersten Antikörper, welche nach einer B-Zell-Aktivierung exprimiert werden, wodurch ein diagnostischer Nachweis akuter Infektionen durch eine Bestimmung des IgM-Titers ermöglicht wird (Schroeder and Cavacini, 2010). Sie besitzen noch keine hohe Affinität gegenüber ihrem Antigen, sind jedoch in der Lage, Pentamere zu bilden, wodurch diese durch das Vorhandensein von zehn Antigenbindestellen eine hohe Avidität besitzen. Monomere IgMs werden hingegen wie IgDs vor allem auf B-Zellen exprimiert, da diese Bestandteil der BCRs sind (Gong and Ruprecht, 2020). IgA wird vor allem auf Schleimhäute, in die Atemwege und in Sekrete wie Muttermilch, Tränen und Speichel abgegeben, wohingegen IgE an der Immunabwehr von parasitären Würmern beteiligt ist und zudem eine bedeutende Rolle bei allergischen Reaktionen einnimmt (Schroeder and Cavacini, 2010).

Das F_c-Fragment eines Antikörpers ist entscheidend für die durch den Antikörper ausgelöste Effektorfunktion. Diese werden eingeteilt in die Neutralisation des Antigens, sodass beispielsweise Viren nicht in der Lage sind, in Wirtszellen einzutreten, die Aktivierung des Komplementsystems und die Markierung des Pathogens für Makrophagen und Dendritische Zellen. Dieser als Opsonisierung bezeichnete Mechanismus führt zu einer Aufnahme des Pathogens durch Phagozytose, welche nicht nur zur Abtötung des Pathogens führt, sondern durch die Präsentation der vom Pathogen stammenden Antigenpeptide auf MHC II-Molekülen auch zur Aktivierung der zellulären Immunantwort (Lu et al., 2018). Die Rekrutierung der Effektorzellen erfolgt hierbei wie bei der antikörperabhängigen zellvermittelten Zytotoxizität (*antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*, ADCC) über das F_c-Fragment des Antikörpers. Die ADCC bewirkt hierbei eine Aktivierung von NK-Zellen, welche zu einer Abtötung der virusinfizierten oder transformierten Zelle durch Auslösung der Apoptose oder Zelllyse führt (Forthal, 2014).

1.2.2 B-Zell-Entwicklung und Generierung der Antikörper-Diversität

Die Reifung der B-Zellen beginnt im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen, welche zu pro-B-Zellen reifen. In diesem Stadium der B-Zell-Entwicklung wird die Umlagerung der Gene der schweren Kette initiiert, welche über eine Rekombination von V- (*variable*), D- (*diversifying*) und J- (*joining*) Gensegmenten erfolgt (Pieper et al., 2013). Der Genlocus der schweren Kette des BCRs enthält hierbei 44 V-, 25 D- und 6 J-Segmente (Li et al., 2004), wobei zuerst ein D-Segment mit einem J-Segment verknüpft wird, welche anschließend mit einem V-Segment verbunden werden (Abbildung 2). Die Verknüpfung des VDJ-Exons, welches nach der Translation die variante Domäne (V_H) des BCRs bildet, an das Exon, welches für die konstanten Domänen C_{H1} , C_{H2} und C_{H3} codiert, erfolgt schließlich durch Spleißen der mRNA (Jung and Alt, 2004). Nachdem die pro-B-Zellen zu prä-B-Zellen gereift sind, beginnt die Rekombination der Gensegmente der leichten Kette, welche ähnlich zu jener des Genlocus der schweren Kette erfolgt. Da es sich bei der leichten Kette entweder um eine κ - oder λ -Kette handelt, wird diese durch zwei Genloci codiert. Diese beinhalten für die κ -Kette ca. 40 V- und 5 J-Gensegmente bzw. für die λ -Kette ca. 30 V- und 4 J-Gensegmente (Janeway et al., 2014) und weisen im Gegensatz zu jenen der schweren Kette keine D-Gensegmente auf (Schatz et al., 1992).

Eine zusätzliche Diversität wird in reifen B-Zellen durch die somatische Hypermutation erreicht, welche zudem zu einer Affinitätsreifung des Antikörpers gegenüber einem spezifischen Antigen führt (Peled et al., 2008). Das in der somatischen Hypermutation involvierte Enzym AID (Aktivierungsinduzierte Cytidin-Desaminase) spielt zudem eine entscheidende Rolle für den Klassenwechsel von Immunglobulinen, welcher zu einer Expression der verschiedenen Isotypen führt (Okazaki et al., 2002).

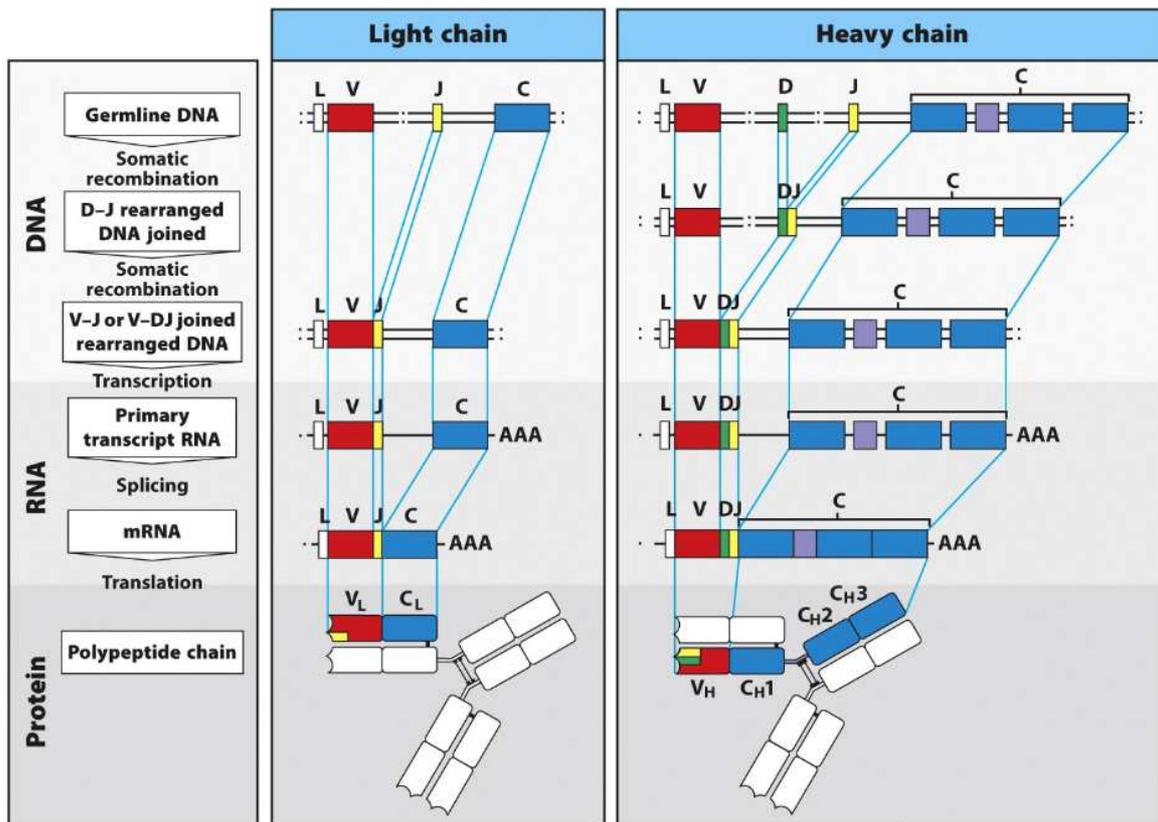


Abbildung 2: Rearrangement der Genloci der leichten bzw. schweren Kette eines Antikörpers während der B-Zell-Entwicklung. Durch somatische Rekombination werden V(D)-Gensegmente mit J-Gensegmenten verbunden und nach der Transkription durch Spleißen an Exons verknüpft, welche für die konstanten Domänen des Antikörpers codieren. Nach der Translation werden die einzelnen Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden (aus Janeway et al., 2014).

1.3 T-Zellen

1.3.1 Funktion von T-Zellen im adaptiven Immunsystem

Neben den B-Zellen sind T-Zellen Teil der adaptiven Immunantwort. Über ihren TCR sind T-Zellen in der Lage, MHC (*major histocompatibility complex*)-gebundene Antigenpeptide zu erkennen. T-Zellen werden anhand ihres Corezeptors in CD4+ bzw. CD8+ Zellen (*cluster of differentiation*) unterteilt. CD4+ Zellen erkennen exogene Antigen-Peptide, welche von MHC II-Proteinen präsentiert werden (Neefjes et al., 2011). Diese Antigene werden von

professionellen APCs, zu welchen neben den B-Zellen auch Makrophagen und dendritische Zellen gehören, durch Endozytose aufgenommen und durch proteolytischen Verdau in Peptide gespalten. T-Helferzellen, welche ebenfalls zur Gruppe der CD4+ Zellen gehören, können hierbei nach Bindung ihres spezifischen Antigenpeptids auf dem MHC II einer B-Zelle durch Cytokin-Freisetzung die Aktivierung der B-Zelle auslösen, wodurch diese zur Proliferation und Differenzierung in antikörper-produzierende Plasmazellen angeregt wird (Parker, 1993). CD4+ Zellen haben zudem einen großen Einfluss auf die Regulation der Immunantwort und die Aktivierung weiterer Leukozyten, wie beispielsweise eosinophile Granulozyten (Nakayamada et al., 2012).

Zytotoxische T-Zellen, welche den CD8-Corezeptor exprimieren, binden an Antigenpeptide, welche von MHC I-Proteinen präsentiert werden. Die Antigenpräsentation über MHC I erfolgt über den Verdau cytosolischer Proteine durch das Proteasom und die Beladung der dadurch entstandenen Peptide auf den MHC I im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Yewdell et al., 2003). Der MHC-Peptid-Komplex wird anschließend an die Zelloberfläche transportiert, wodurch die Zelle in der Lage ist, CD8+ Zellen das Peptid zu präsentieren. Die Antigenpräsentation über MHC I-Peptid-Komplexe erfolgt im Gegensatz zu jener über MHC II in beinahe jeder Körperzelle, eine Ausnahme bilden z. B. Erythrozyten (Giles et al., 1987). Stammt das präsentierte Peptid von einem körperfremden Protein, welches durch eine Infektion der Zelle mit Bakterien oder Viren im Cytoplasma vorliegen kann, so wird dies durch eine CD8+ Zelle über ihren TCR erkannt. Tumorantigene, welche durch Mutationen entstanden sind, werden hierbei ebenfalls als fremdartig erkannt. Über eine Signalkaskade wird dadurch die T-Zelle aktiviert, welche zu einer Freisetzung von Granzymen und Perforin führt (Harty et al., 2000). Über die durch Perforin gebildete Pore in der Zellmembran können die Granzyme anschließend in die infizierte bzw. transformierte Zelle eintreten und dort die Apoptose auslösen. Einen weiteren Mechanismus, welcher zur Auslösung der Apoptose führt, stellt die Bindung des von aktivierten zytotoxischen T-Zellen freigesetzten Fas-Liganden an Fas-Rezeptoren der Zielzelle dar (Kägi et al., 1994).

1.3.2 Struktur des T-Zell-Rezeptors

Der T-Zell-Rezeptor (TCR) setzt sich aus einer α - und β -Kette zusammen, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verknüpft sind (Abbildung 3). Zwar sind der Großteil der bekannten TCRs aus je einer α - und einer β -Kette aufgebaut, jedoch sind auch γ : δ -TCRs bekannt, welche eine Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunität darstellen (Holtmeier and Kabelitz, 2005) und zudem an Autoimmunerkrankungen beteiligt sein können (Bruder et al., 2012). Jede der beiden Ketten besteht hierbei aus einer konstanten (C_α bzw. C_β) und einer variablen Domäne (V_α bzw. V_β), wobei über letztere die Antigenbindung erfolgt. Der TCR gehört zur Superfamilie der Immunglobuline (Buck, 1992) und ähnelt in seiner Struktur dem F_{ab} -Fragment von Antikörpern (vgl. Abbildung 1). So verfügt jede variante Domäne des TCRs ebenfalls über drei CDRs, über welche die Antigenbindung erfolgt. Im Gegensatz zu Antikörpern verfügen TCRs jedoch nur über eine Antigenbindestelle, welche zudem nicht das Antigen alleine erkennt, sondern nur durch den MHC präsentierte Antigenpeptide. Über ihre Transmembrandomänen interagieren die beiden TCR-Ketten durch elektrostatische Wechselwirkungen mit den ϵ - und δ -Ketten bzw. den γ - und ϵ -Ketten des CD3-Corezeptors (Clevers et al., 1988), welcher für die Aktivierung der T-Zelle ebenfalls von zentraler Bedeutung ist. Nach erfolgter Bindung des TCRs an den MHC-Peptid-Komplex findet eine Phosphorylierung von Tyrosin-Resten statt, welche sich intrazellulär an den CD3-Domänen befinden (Straus and Weiss, 1993). Diese auch als ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*) bezeichneten Sequenzen (Love and Hayes, 2010) lösen durch ihre Phosphorylierung eine Signalkaskade aus, welche zu einer Dephosphorylierung von NFATs (*nuclear factor of activated T-cells*) führt (Shaw et al., 1988; Macian, 2005). Die dadurch aktivierten NFATs, bei welchen es sich um Transkriptionsfaktoren handelt, werden dadurch in den Zellkern transportiert und initiieren dort unter anderem die Expression von IL-2.

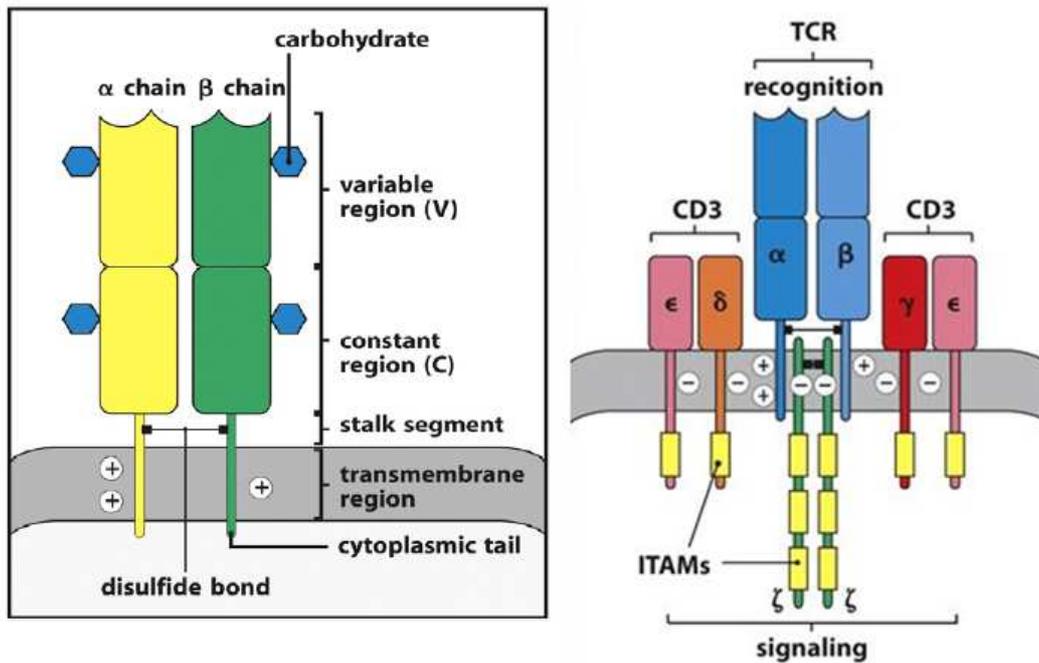


Abbildung 3: Links: Struktureller Aufbau des T-Zellrezeptors (TCR). Über die variablen Domänen (V) der α - und β -Kette erfolgt die Bindung des MHC I-Peptid-Komplexes. Die α - und β -Kette des TCRs sind über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden. Rechts: TCR im Komplex mit dem CD3-Corezeptor. Der CD3-Corezeptor ist an der Auslösung der Signalkaskade beteiligt, welche zur Aktivierung der T-Zelle führt. Er ist aus γ -, δ -, ϵ - und ζ -Ketten zusammengesetzt und besitzt an seinen intrazellulären Domänen ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activation motifs*), welche durch Phosphorylierung die Signalkaskade zur T-Zell-Aktivierung auslösen (verändert nach Janeway et al., 2014).

Wie bereits erläutert, werden T-Zellen in CD4+ und CD8+ Zellen unterteilt. CD4+ Zellen exprimieren den CD4-Corezeptor, welcher wie auch der CD8-Corezeptor Teil der Immunglobulin-Superfamilie ist. Bei CD4 handelt es sich um ein monomeres Transmembranprotein, welches sich aus vier Domänen (D1-D4) zusammensetzt (Li et al., 2013). Der CD8-Corezeptor von zytotoxischen T-Zellen kann hingegen als CD8 α / α -Homodimer oder CD8 α / β -Heterodimer vorliegen (Leahy et al., 1992) und bindet ebenfalls wie der CD4-Corezeptor an den MHC der APC. Dies führt zum einen zur Stabilisierung des TCR:MHC-Peptid-Komplexes (Miceli and Parnes, 1993), zum anderen zur Rekrutierung der Tyrosinkinase Lck, welche die Phosphorylierung der ITAMs katalysiert (Barber et al., 1989).

1.3.3 Generierung der TCR-Diversität

T-Zellen weisen eine hohe TCR-Diversität auf, welche pro Individuum zwischen 10^7 und 10^9 verschiedenen TCRs liegt (Arstila et al., 2000). Diese hohe Diversität ist notwendig, um eine Immunantwort auf eine Vielzahl verschiedenster Antigenpeptide zu gewährleisten. T-Zellen unterlaufen hierfür ähnlich zu B-Zellen während ihrer Entwicklung im Thymus einer somatischen Rekombination ihrer Gensegmente. Sie exprimieren jedoch im Gegensatz zu B-Zellen keine AID und verfügen daher nicht über zusätzliche Mechanismen zur Erhöhung der TCR-Diversität, z. B. durch somatische Hypermutation. Die variablen Domänen der beiden TCR-Ketten werden ebenfalls durch V- und J-Gensegmente codiert (Schatz and Ji, 2011). Der TCR α -Genlocus enthält 70-80 V- und 61 J-Segmente, wohingegen der TCR β -Genlocus aus 52 V- und 13 J-Segmenten besteht, welche in Cluster aus sechs bzw. sieben Gensegmenten unterteilt sind. Upstream der J-Segmente befindet sich auf dem TCR β -Genlocus zudem jeweils ein einzelnes D-Gensegment (Arden et al., 1995). Die Gensegmente der konstanten TCR-Domänen sind verglichen mit jenen der variablen Domänen einfacher aufgebaut, sie setzen sich aus einem (TCR α) bzw. zwei (TCR β) C-Segmenten zusammen und liegen downstream der J-Segmente. Die einzelnen V(D)J-Gensegmente werden während der T-Zell-Entwicklung anschließend miteinander verknüpft (Abbildung 4), wobei die TCR-Diversität ebenso wie die BCR-Diversität zusätzlich durch den Einbau von P- (*palindromic*) und N- (*non-templated*) Nukleotiden zwischen den V- und J- bzw. VD- und J-Segmenten erhöht wird (Davis and Bjorkman, 1988; Srivastava and Robins, 2012). Das C-Segment wird schließlich durch Spleißen der mRNA posttranskriptional an die V(D)J-mRNA angefügt.

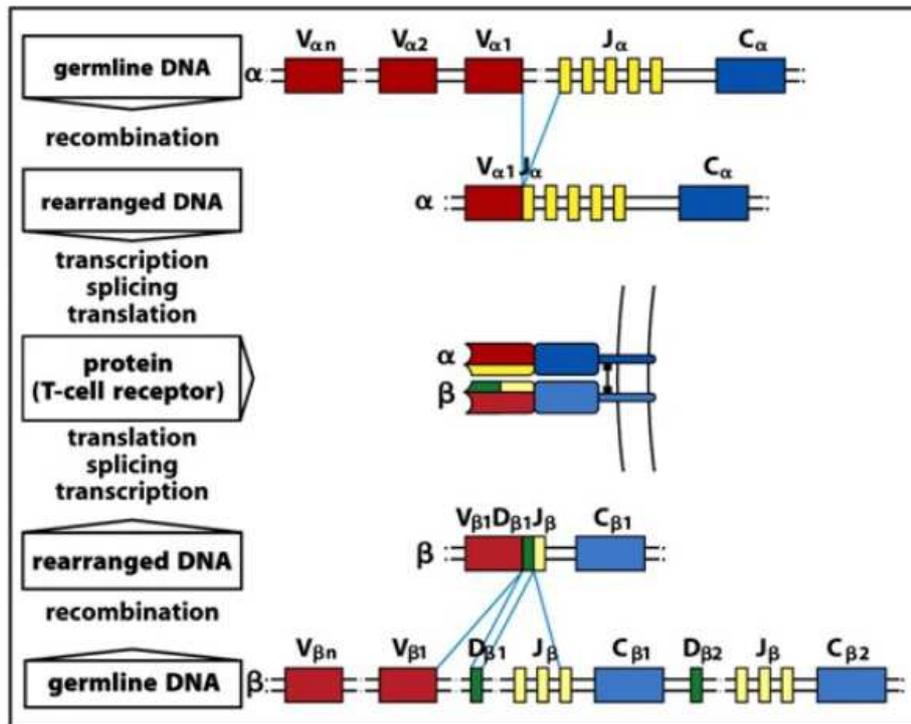


Figure 4-10 Immunobiology, 7ed. (© Garland Science 2008)

Abbildung 4: Rearrangement der TCR α - bzw. TCR β -Genloci während der T-Zell-Entwicklung. Durch somatische Rekombination werden V(D)-Gensegmente mit J-Gensegmenten verbunden und zusätzliche P- (*palindromic*) bzw. N- (*non-templated*) Nukleotide zwischen den Segmenten eingefügt. Das C-Segment wird posttranskriptional durch Spleißen an das V(D)J-Exon angefügt. Die α - und β -Ketten des TCRs werden nach der Translation anschließend über eine Disulfidbrücke posttranslational miteinander verbunden (aus Janeway et al., 2014).

1.3.4 Reifung und Selektion von T-Zellen im Thymus

T-Zellen werden ebenso wie B-Zellen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen gebildet, ihre Reifung und Selektion erfolgt jedoch im Thymus. Hier exprimieren sie anfangs weder den TCR, noch den CD4- bzw. CD8-Corezeptor (Germain, 2002). Durch Umlagerung ihrer TCR-Genloci durch somatische Rekombination wird zuerst die β -Kette des TCRs an der Zelloberfläche exprimiert. Anschließend erfolgt die Expression von CD4 bzw. CD8 und zuletzt die Expression der TCR α -Kette.

Die ausgereiften T-Zellen werden anschließend einer positiven und negativen Selektion unterzogen. Durch die positive Selektion überleben nur T-Zellen, welche über ihren TCR schwach an ihren spezifischen MHC:Self-Peptid-Komplex binden. Zur Vermeidung von Autoimmunreaktionen werden außerdem durch negative Selektion jene T-Zellen zur Apoptose angeregt, welche eine starke Bindung an das körpereigene Peptid aufweisen. T-Zellen, welche keinen TCR exprimieren oder keinerlei Bindung an den MHC:Self-Peptid-Komplex aufweisen, sterben ebenfalls durch Apoptose, da eine schwache Interaktion mit körpereigenen Peptiden eine Voraussetzung für das Überleben der T-Zelle ist (*'death-by-neglect'*; Klein et al., 2014). Durch diese Selektion, welche zum Absterben von mehr als 95 % aller Vorläuferzellen führt (Nossal, 1994), wird einerseits eine effektive Immunantwort gegen ein breites Spektrum von Antigenen gewährleistet, andererseits aber auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens von Autoimmunerkrankungen stark verringert.

1.4 Antigenerkennung durch CD8+ Zellen

1.4.1 Antigenpräsentation durch den Major Histocompatibility Complex (MHC)

Im Gegensatz zu Antikörpern oder den BCR von B-Zellen, erkennt der TCR von CD8+ Zellen keine nativen Antigene, sondern nur Antigenpeptide, welche von einem MHC I präsentiert werden (1.3.1). Der MHC I, welcher ebenfalls Teil der Immunglobulin-Superfamilie ist (Buck, 1992), ist ein Heterodimer bestehend aus einer α -Kette und einem β_2 -Mikroglobulin, welche über eine nicht-kovalente Bindung miteinander interagieren (Abbildung 5). Die α -Kette besteht hierbei aus drei Domänen: Durch die α_1 - und α_2 -Domäne wird ein Spalt gebildet, in welchem das präsentierte Peptid gebunden wird. Die Verankerung der Kette in der Zellmembran erfolgt über die Transmembranhelix der α_3 -Domäne, welche zudem an der Wechselwirkung mit dem β_2 -Mikroglobulin beteiligt ist (Wieczorek et al., 2017).

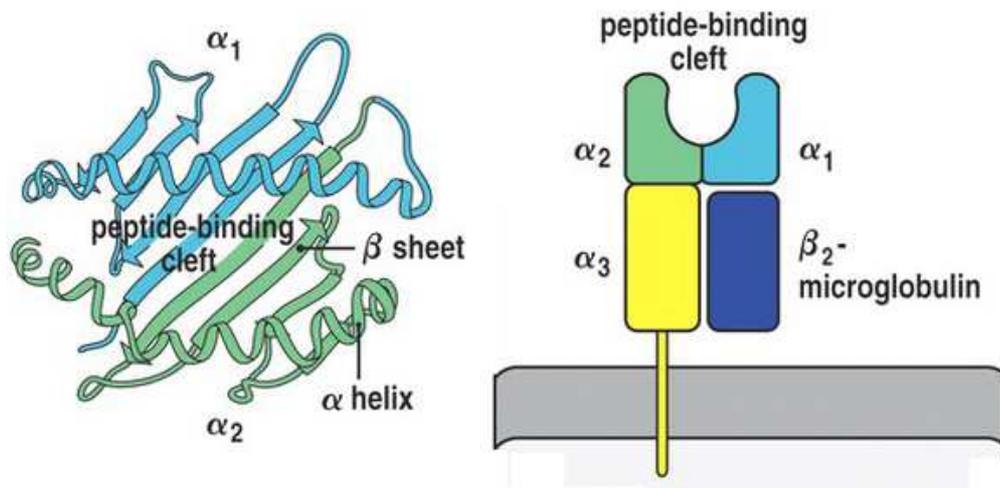


Abbildung 5: Links: Struktur des peptidbindenden Spalts eines MHC I-Moleküls. Zwei α -Helices der α_1 - und α_2 -Domänen bilden eine Furche, in welcher das präsentierte Peptid gebunden wird. Rechts: Struktureller Aufbau eines MHC I-Moleküls. Die α -Kette des MHC I, welche sich aus drei Domänen zusammensetzt, ist über eine Transmembranhelix in der Zellmembran verankert. Das β_2 -Mikroglobulin verfügt über keine Transmembrandomäne und wird über nicht-kovalente Wechselwirkungen von der α -Kette gebunden (aus Janeway et al., 2014).

Die α -Kette des MHC I weist aufgrund des hohen Selektionsdrucks durch Pathogene innerhalb einer Population einen hohen Polymorphismus für DNA-Sequenzen auf, welche für Aminosäuren des peptidbindenden Spalts codieren. Das β_2 -Mikroglobulin ist hingegen stark konserviert (Li et al., 2016), da es nicht an der Peptidbindung beteiligt ist. Um zu gewährleisten, dass eine möglichst hohe Anzahl fremder Peptide durch das Immunsystem erkannt werden kann, sind Menschen in der Lage, drei verschiedene MHC-I-Moleküle zu exprimieren, welche auch als *human leukocyte antigen I* (HLA I) bezeichnet werden. Diese werden durch die Gene HLA-A, HLA-B und HLA-C codiert (Perreault, 1981), wodurch es heterozygoten Individuen möglich ist, sechs verschiedene HLA I- α -Ketten zu exprimieren.

1.4.2 Interaktion des TCR mit dem MHC-Peptid-Komplex

Die Bindung des TCRs an den MHC-Peptid-Komplex erfolgt über die CDRs der variablen Domänen (Abbildung 6). Hierbei interagieren die CDR1 und die CDR2 vor allem mit den α_1 - und α_2 -Domänen des HLAs, die CDR3 bindet hingegen nur das präsentierte Antigenpeptid (Rudolph et al., 2006).

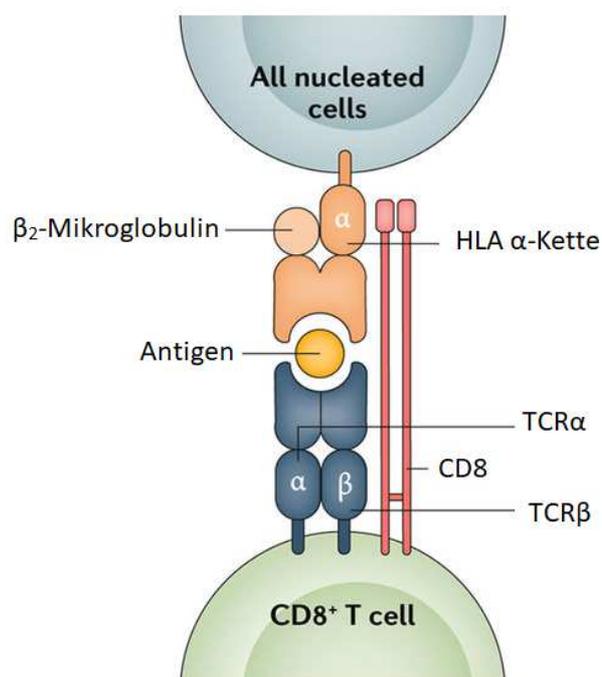


Abbildung 6: Interaktion des TCRs einer CD8⁺ T Zelle mit dem HLA-Peptid-Komplex einer kernhaltigen Körperzelle. Sowohl das präsentierte Peptid, als auch die α_1 - und α_2 -Domänen des HLAs werden von den variablen Domänen des TCRs erkannt. Die Bindung des CD8-Corezeptors an das HLA stabilisiert die immunologische Synapse und ist Voraussetzung für die Aktivierung der T-Zelle (verändert nach Kornum et al., 2017).

Zwar ist die Bindung sowohl für das präsentierte Antigenpeptid, als auch für das HLA für jeden TCR spezifisch, jedoch kann in Ausnahmefällen auch ein fremdes HLA zu einer T-Zell-Aktivierung führen (Wucherpfennig et al., 2007). Dieses Phänomen ist beispielsweise für

Abstoßungsreaktionen von transplantiertem Gewebe verantwortlich und wird als Alloreaktivität bezeichnet (Zhang et al., 2005). Dennoch ist ein einzelner TCR durch seine Polyspezifität in der Lage, mehr als eine Million verschiedener Antigenpeptide zu erkennen (Wooldridge et al., 2012). Die Bindung dieser hohen Anzahl an Peptiden wird einerseits durch eine gewisse Toleranz chemisch ähnlicher Aminosäuren, als auch durch Peptide, welche über den peptidbindenden Spalt herausragen, ermöglicht (Wilson et al., 1988). Hierdurch wird das Spektrum von Antigenen, welche durch das Immunsystem erkannt werden können, nochmals erweitert, da dadurch pro Individuum trotz einer Anzahl von 10^7 - 10^9 verschiedenen TCRs (Arstila et al., 2000) auf mehr als 10^{15} verschiedene Peptide eine effektive Immunantwort erfolgen kann (Davis and Bjorkman, 1988; Wooldridge et al., 2012).

Die Dissoziationskonstante der Peptidbindung liegt zwischen 10^{-6} und 10^{-4} M (Rudolph et al., 2006), womit diese im Vergleich zur Antigenbindung durch Antikörper sehr schwach ist. Diese durch die Selektion der T-Zellen im Thymus begründete geringe Affinität (1.3.4) stellt die Identifizierung von T-Zell-Antigenen als eine herausfordernde Aufgabe dar, da klassische biochemische Methoden, z. B. ELISAs oder durchflusszytometrische Analysen, nicht angewandt werden können, da diese hohe Affinitäten gegenüber einem Antigen voraussetzen (Siewert et al., 2012).

1.4.3 Identifizierung von T-Zell-Antigenen

Aufgrund der vergleichsweise schwachen Bindung des TCRs an den HLA-Peptid-Komplex stellt die Identifizierung von T-Zell-Antigenen eine besondere Herausforderung dar (Dornmair et al., 2003). Da zudem TCRs nicht das native Antigen, sondern nur Antigenpeptide erkennen, sind biochemische Standardmethoden wie die Immunpräzipitation nicht für eine Antigenbestimmung durchführbar (Siewert et al., 2012). Methoden, wie die Verwendung von cDNA-Libraries in Tumorzellen (van der Bruggen et al., 1991), können hierbei zur Antigen-Identifizierung von T-Zellen angewandt werden, jedoch sind diese oft abhängig von bestimmten Voraussetzungen, wie der Verfügbarkeit und Kultivierbarkeit von Tumorzellen des Patienten (Siewert, 2011). Die Verwendung von

synthetischen Peptid-Libraries stellt eine weitere Möglichkeit dar, diese ist jedoch aufgrund der vorherigen Synthese einer Vielzahl von Peptiden sehr aufwendig (Gundlach et al., 1996).

Siewert et al. etablierten 2012 eine Methode, welche auf der Aktivierung von T-Zellen mithilfe einer rekombinanten Peptid-Bibliothek (plasmid-encoded combinatorial peptide library, PECPL) beruht (Abbildung 7, Siewert et al., 2012) und bereits die Identifizierung mehrerer T-Zell-Antigene ermöglichte (Siewert et al., 2012; Arakawa et al., 2015; Rühl et al., 2016). COS-7-Zellen, welche das TCR-spezifische HLA I exprimieren, präsentieren hierbei PECPLs an $58\alpha^{-}\beta^{-}$ Maus-T-Zell-Hybridome, die mit dem gewünschten TCR transfiziert sind und selbst keine endogenen TCR-Ketten exprimieren (Blank et al., 1993). Hierdurch wird eine Expression chimärer TCRs verhindert. Erkennt eine T-Zelle, welche den TCR des Patienten exprimiert, das präsentierte Peptid, so wird infolge der T-Zell-Aktivierung über eine Signalkaskade NFAT in den Zellkern transportiert, wodurch eine Expression des Reporterproteins sGFP stattfindet. Beide Zelltypen werden für den Assay kokultiviert, wobei die T-Zell-Hybridome oberhalb der adhären wachsenden COS-7-Zellen vorliegen. Die aktivierte T-Zelle lässt sich so durch die Expression von sGFP detektieren, wodurch eine Entnahme der antigenpräsentierenden COS-7-Zelle mittels einer Glaskapillare ermöglicht wird. Die antigencodierenden Sequenzen positiver Plasmide können anschließend mittels PCR amplifiziert und durch Klonierungen in neue Plasmide angereichert werden. Durch die Verwendung von Subpools positiver Plasmide kann schließlich nach mehreren Anreicherungs-schritten das als Mimotop bezeichnete Peptid identifiziert werden.

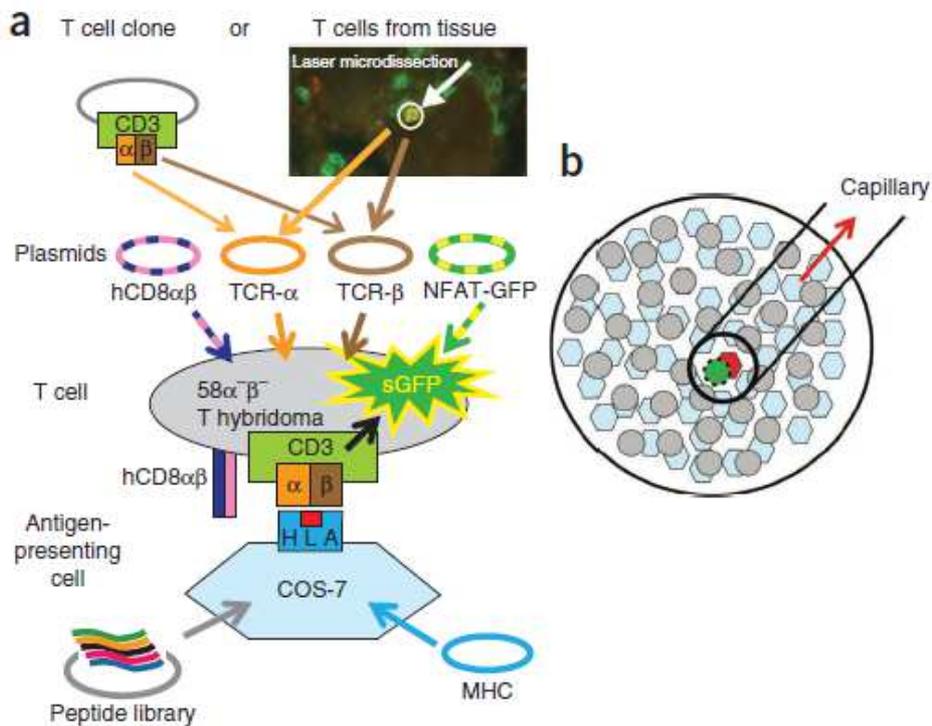


Abbildung 7: A: Schematische Darstellung der T-Zell-Aktivierung durch antigenpräsentierende COS-7-Zellen. COS-7 Zellen, welche sowohl mit einer PECPL (plasmid-encoded combinatorial peptide library), als auch mit einem HLA I-codierenden Plasmid transfiziert wurden, präsentieren T-Zell-Hybridomen ein Library-codiertes Peptid. Die T-Zell-Hybridome exprimieren hierbei sowohl den TCR des Patienten, sowie den CD8-Corezeptor. Eine Bindung des präsentierten Peptids bzw. Mimotops führt zur Aktivierung der T-Zelle, wodurch eine Expression des Reporterproteins sGFP erfolgt. B: Schematische Darstellung der Entnahme einer COS-7-Zelle (rot dargestellt) mithilfe einer Glaskapillare. Die aktivierte T-Zelle ist grün dargestellt (aus Siewert et al., 2012).

1.5 Autoimmunerkrankungen

Das humane Immunsystem verfügt über viele Mechanismen, um autoimmune Reaktionen zu verhindern. Bereits während der negativen Selektion im Thymus werden autoreaktive T-Zellen abgetötet, da diese eine starke Bindung an körpereigene Peptide aufweisen (1.3.4). Die Regulierung von CD8+ Zellen durch regulatorische CD4+ Zellen (Wraith et al., 2004) stellt einen weiteren Mechanismus dar, welcher zur Suppression autoreaktiver T-Zellen führt. Der Ausbruch einer Autoimmunerkrankung kann dennoch nicht immer verhindert werden, da beispielsweise einige autoreaktive CD8+ Zellen die negative Selektion im Thymus überleben

können. Ist das Selbstantigen anschließend für die autoreaktiven Zellen zugänglich und gelingt es diesen, weitere Mechanismen wie die klonale Anergie (Wekerle, 1992) zu überwinden, so können diese zur Schädigung körpereigener Zellen führen. Autoimmunerkrankungen können zudem durch Immunreaktionen ausgelöst werden, welche durch molekulare Mimikry verursacht werden. Bei dieser weisen Antigene, welche von Pathogenen stammen, eine Sequenzhomologie gegenüber körpereigenen Proteinen auf, wodurch Kreuzreaktionen gegen Selbstantigene auftreten können (Cusick et al., 2012).

1.5.1 GABA_A-Rezeptor-Enzephalitis

Kreuzreaktionen gegenüber körpereigenen Strukturen können nicht nur im Rahmen einer Infektion auftreten, sondern auch durch eine Krebserkrankung verursacht werden. Als mögliche Folge der Immunreaktion gegen den Tumor kann hierbei unter anderem eine Entzündung des Gehirns ausgelöst werden. Diese als paraneoplastische Enzephalitis bezeichnete Krankheit zeichnet sich durch das Auftreten von Autoantikörpern und autoreaktiven T-Zell-Klonen aus, welche gegen neuronale Strukturen wie Oberflächenrezeptoren gerichtet sind (Dalmau, et al. 2007; Dalmau and Rosenfeld, 2008). Neuronale Rezeptoren, welche als Antigen von Autoantikörpern erkannt werden, stellen neben NMDA- und AMPA-Rezeptoren unter anderem GABA_A-Rezeptoren (*γ-aminobutyric acid type A receptor*, GABA_A-R) dar (Prüss, 2021). In einer von Petit-Pedrol et al. veröffentlichten Publikation konnten für 18 Patienten sowohl im Blutserum, als auch im CSF (*cerebrospinal fluid*) Autoantikörper nachgewiesen werden, welche die α₁- bzw. die β₃-Untereinheit des GABA_A-Rezeptors als Antigen erkannten. Zu den Symptomen, unter welchen die Patienten litten, zählten neben neurologischen Symptomen wie epileptischen Anfällen auch psychische Symptome wie Verhaltensänderungen, Psychosen und Angststörungen (Petit-Pedrol et al., 2014). Zudem konnten insbesondere für Patienten mit hohen Antikörper-Titern durch eine MRT auffällige Veränderungen im Gehirn nachgewiesen werden. Ein Patient litt z. B. ca. 10 Monate vor Symptombeginn unter einem Hodgkin-Lymphom, für einen weiteren Patienten konnte zusätzlich ein Thymom diagnostiziert werden. Weitere Tumorerkrankungen konnten für die untersuchte Patientengruppe nicht

identifiziert werden, wenngleich auch weitere Studien auf eine Assoziation von GABA_A-R-Enzephalitiden mit Thymomen hinweisen (Ohkawa et al., 2014; Simabukuro et al., 2015; Spatola et al., 2017).

GABA_A-Rezeptoren sind aus fünf Untereinheiten zusammengesetzt, welche 19 verschiedene Isoformen (α_{1-3} , β_{1-3} , γ_{1-3} , δ , ϵ , θ , π und ρ_{1-3}) beinhalten (Barnard et al., 1998). Bei diesen Untereinheiten handelt es sich um Transmembranproteine, welche einen Cl⁻-selektiven Ionenkanal bilden (Abbildung 8). Die vier Transmembrandomänen, welche jeweils eine GABA_A-R-Untereinheit bilden, weisen zwischen der dritten und vierten Domäne einen Cys-Loop auf, sowie eine hydrophile N-terminale Domäne, welche extrazellulär vorliegt (Schofield et al., 1987; Sigel and Steinmann, 2012). Der Rezeptor verfügt zudem über drei Zn²⁺-Bindestellen, von welchen eine sich innerhalb des Ionenkanals befindet, während die beiden anderen Bindestellen extrazellulär zwischen den beiden Untereinheiten α_1 und β_3 lokalisiert sind (Hosie et al., 2003). Die Bindung von Zn²⁺-Ionen führt hierbei zu einer Inhibition der Rezeptorfunktion.

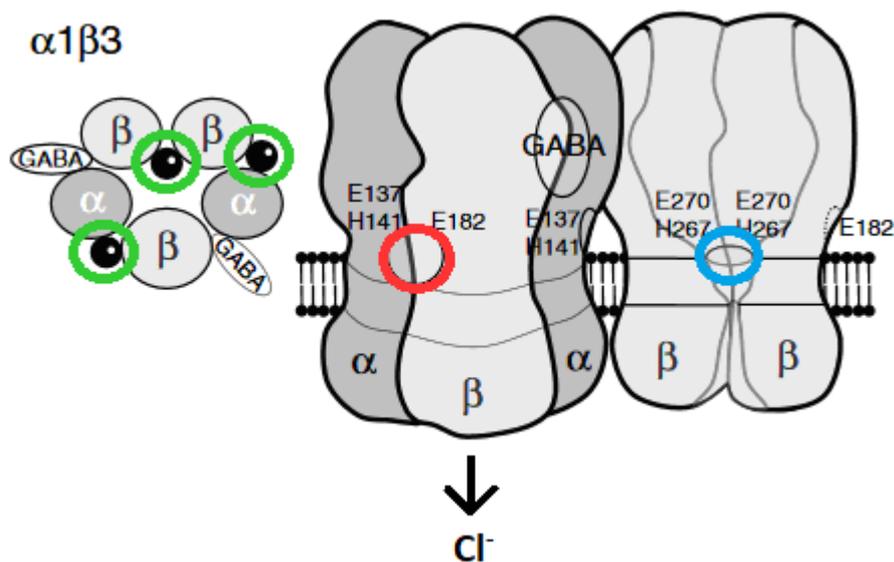


Abbildung 8: Schematischer Aufbau eines GABA_A-Rezeptors, welcher aus zwei α_1 -Untereinheiten, sowie drei β_3 -Untereinheiten zusammengesetzt ist. Die fünf Untereinheiten des Rezeptors bilden einen selektiven Ionenkanal, welcher durch Bindung von GABA zu einem Einstrom von Cl⁻-Ionen in die Nervenzelle führt. Der Rezeptor verfügt zudem über drei Zn²⁺-Bindestellen (grün markiert), von welchen sich zwei extrazellulär zwischen den beiden Untereinheiten α_1 und β_3 befinden (rot markiert). Die dritte Zn²⁺-Bindestelle (blau markiert) befindet sich innerhalb des Ionenkanals (verändert nach Hosie et al., 2003).

GABA_A-Rezeptoren gehören zu den inhibitorischen Rezeptoren im Gehirn und sind vor allem an Synapsen lokalisiert (Somogyi et al., 1989). Das Öffnen des Kanals, welches zu einem Cl⁻-Einstrom in die Zelle führt, wird durch Bindung des Neurotransmitters GABA und einer anschließenden Konformationsänderung ausgelöst. Dieser Einstrom führt zu einer Hyperpolarisierung der Zellmembran (Inhibitorisches postsynaptisches Potential, IPSP), wodurch die Bildung eines Aktionspotentials erschwert wird (Sigel and Steinmann, 2012; Smart and Stephenson, 2019). Da eine Reihe von GABA-Agonisten und -Antagonisten, wie beispielsweise Benzodiazepine und Barbiturate, ebenfalls in der Lage sind, an GABA_A-Rezeptoren zu binden, werden diese häufig zur Behandlung psychischer und neurologischer Erkrankungen wie Schizophrenie, Epilepsie und Depressionen eingesetzt (Möhler, 2006).

Die Symptomatik der paraneoplastischen GABA_A-R-Enzephalitis wird durch eine Internalisierung der Antikörper-Rezeptor-Komplexe verursacht, welche zu einer selektiven Reduzierung von postsynaptischen GABA_A-R-Clustern führt (Petit-Pedrol et al., 2014; Brändle et al., 2021). Dieser Mechanismus ist ebenfalls für NMDAR-Enzephalitiden bekannt (Masdeu et al., 2016) und erschwert eine Behandlung mit Medikamenten, welche an GABA_A-R binden. Die Therapie der Erkrankung beruht daher vor allem auf der Entfernung des Tumors, der Immunsuppression und der Einleitung eines künstlichen Komas (Leypoldt and Wandinger, 2013; Petit-Pedrol et al., 2014).

1.5.1.1 Index patient 2

Als Index patient 2 (IP2) wird ein 51-jähriger männlicher Patient bezeichnet, welcher ebenfalls an einer GABA_A-R-Enzephalitis litt und dessen Erkrankung von Petit-Pedrol et al. beschrieben wurde (2014). Die anfängliche Symptomatik des Patienten beschränkte sich zunächst auf psychische Symptome wie Depressionen, Verhaltensänderungen und Psychosen, erweiterte sich anschließend jedoch durch einen sechswöchigen Mutismus und einem Auftreten von epileptischen Anfällen. Der Patient wurde zunächst mit Antikonvulsiva und Immunsuppressiva behandelt und musste schließlich in ein künstliches Koma versetzt werden, wobei er nach zehn Wochen aufgrund einer Sepsis verstarb (Petit-Pedrol et al., 2014).

Im Serum und im CSF des Patienten konnten Autoantikörper gegen die α_1 - bzw. β_3 -Untereinheit des GABA_A-Rezeptors nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde im CSF ein expandierter B-Zell-Klon aufgefunden, wodurch mittels NGS (next-generation sequencing, durchgeführt von Eduardo Beltrán) und Klonierungen (durchgeführt von Simone Brändle) der rekombinante Antikörper rAb-IP2 hergestellt werden konnte (Brändle et al., 2021), welcher in der vorliegenden Arbeit weiter charakterisiert wurde. Durch elektrophysiologische Messungen wurde zudem gezeigt, dass rAb-IP2 funktionell ist (Manuela Cerina). Weitere Untersuchungen von Simone Brändle ergaben, dass rAb-IP2 nicht nur die α_1 -Untereinheit von GABA_A-R, sondern auch CSRP2 (*cysteine and glycine-rich protein 2*) als Antigen erkennt und bindet (Brändle, 2016; Brändle et al. 2021). Als Teil der LIM-domain-only-(LMO) Proteinfamilie ist CSRP2, welches auch als LMO5 bezeichnet wird, durch zwei LIM-Domänen in der Lage, Zn²⁺-Ionen zu binden (Weiskirchen and Günther, 2003). CSRP2 nimmt hierbei wie weitere LMO-Proteine (Matthews et al., 2013) eine entscheidende Rolle bei Tumorerkrankungen wie akuten lymphatischen B-Zell-Leukämien (Wang et al., 2017) und Brustkrebs (Hoffmann et al., 2016) ein. Da zudem bereits Autoantikörper gegen CSRP2 im Zusammenhang mit Krebserkrankungen nachgewiesen wurden (Schlick et al., 2016), besteht die Annahme, dass die Erkrankung des Patienten ebenfalls durch einen paraneoplastischen Effekt ausgelöst wurde. Als mögliche Epitope, welche von rAb-IP2 erkannt werden und daher zu der Kreuzreaktivität des Antikörpers gegenüber GABA_A-R- α_1 führen, werden hierbei die Zn²⁺-Bindestellen der beiden Proteine vermutet (Brändle, 2016; Brändle et al. 2021). Zwar konnte für den Patienten keine Krebserkrankung diagnostiziert werden, jedoch kann eine Symptomatik von PNDs (*paraneoplastic neurological disorders*) bereits in Frühstadien von Tumorerkrankungen auftreten, wodurch die Diagnose erschwert wird (Dalmau and Rosenfeld, 2008).

Sowohl aus dem CSF, als auch aus Hirnproben des Patienten konnte ein klonal expandierter CD8+ T-Zell-Klon isoliert werden (Plappert, 2016; Bracher et al., 2020). Hierdurch war die Generierung von T-Zell-Hybridomen möglich, welche den als IP2-TCR bezeichneten T-Zell-Rezeptor exprimieren. Da zytotoxische T-Zellen sowohl für die Bekämpfung von Tumorzellen, als auch bei der Pathogenese von GABA_B-Rezeptor-Enzephalitiden (Golombeck et al., 2016) eine entscheidende Rolle spielen, deutet das Vorkommen dieses expandierten T-Zell-Klons ebenfalls auf einen paraneoplastischen Effekt der Erkrankung hin. Das spezifische Antigen des T-Zell-Klons ist hierbei noch nicht bekannt. Zwar konnte für einige

PNDs bereits nachgewiesen werden, dass die von B- und T-Zellen erkannten Epitope vom gleichen Antigen stammen können (Albert et al., 2000; Benyahia et al., 1999), jedoch führten Aktivierungsassays, welche mit vorhergesagten GABA_A-R- bzw. CSRP2-Kandidatenpeptiden durchgeführt wurden, zu keiner Aktivierung von IP2-T-Zell-Hybridomen (Plappert, 2016; Gebert, 2018).

1.5.2 Humane autoimmune Enzephalitis (hAE)

Die experimentelle autoimmune Enzephalitis (EAE) stellt ein weit verbreitetes Modellsystem zur Erforschung der Multiplen Sklerose (MS) dar. Hierbei werden Mäuse, Ratten oder Primaten mit Hirngewebe, Myelin oder im Gehirn exprimierten Proteinen immunisiert, wodurch eine demyelinisierende Enzephalitis ausgelöst wird (Höftberger et al., 2015; Lassmann and Bradl, 2017). Sensibilisierungen von Menschen mit Hirngewebe, welche zu einer Entzündung des Gehirns und einer Demyelinisierung führen, sind im Zusammenhang mit Tollwut-Impfungen schon seit Ende des 19. Jahrhunderts bekannt (Balaguer, 1888; Lassmann and Bradl, 2017). Für die vor allem in der ersten Hälfte des 20. Jahrhunderts angewandten alternativmedizinischen Injektionen von gefriergetrockneten Hirnzellen konnten ebenfalls Fälle mit einer ähnlichen Symptomatik nachgewiesen werden (Höftberger et al., 2015). Einer dieser als humane autoimmune Enzephalitis (hAE) bezeichneten Fälle wurde von Jellinger und Seitelberger 1958 beschrieben. Hierbei handelte es sich um einen 51-jährigen Patienten, welcher vier Jahre vor seinem Tod 1958 mit einem progressiven Hemi-Parkinson-Syndrom diagnostiziert wurde. Der Patient erhielt hierbei zur Behandlung in einem Zeitraum von 17 Monaten sieben Injektionen mit gefriergetrockneten Kälberhirn- und Plazentazellen (Jellinger and Seitelberger, 1958). Nach der letzten Injektion trat bei dem Patienten eine rechtsseitige Hemiparese, gefolgt von weiteren neurologischen Symptomen auf. Der Patient verstarb anschließend sieben Wochen nach Symptombeginn an kardiorespiratorischem Versagen. Eine histologische Untersuchung des Gehirns ergab zahlreiche Läsionen und aktive Demyelinisierungen in der weißen Substanz, sowie weitere Kriterien der Marburg-Variante der MS (Höftberger et al., 2015; Beltrán et al., 2021). Aus FFPE-(formalin-fixed paraffin-embedded) Blöcken von Hirnproben des Patienten war es

Manuela Paunovic und Emine Cesur möglich, RNA eines klonal expandierten B-Zell-Klons zu isolieren. Hierdurch konnte nach reverser Transkription der RNA, einer Transkriptom-Analyse per NGS (durchgeführt von Manuela Paunovic und Markus Jeitler) und Rekonstruktion des dominanten Antikörpers Ab-hAE durch Eduardo Beltrán der rekombinante Antikörper rAb-hAE von Manuela Paunovic kloniert und hergestellt werden (Beltrán et al., 2021). Dies stellte den Ausgangspunkt eines Teils der vorliegenden Dissertation dar. Der Antikörper wurde anschließend von Simone Mader immunhistochemisch auf eine Bindung an Hirnschnitten von sowohl Primaten und Lewis-Ratten, als auch an Hirnschnitten des Patienten und eines gesunden Verstorbenen getestet, wobei für alle Proben eine Bindung an Myelin nachgewiesen werden konnte (Beltrán et al., 2021). Es erscheint daher sehr wahrscheinlich, dass durch die Injektionen mit tierischem Hirngewebe eine Immunisierung des Patienten gegen ein in der Myelinschicht lokalisiertes Protein erzeugt wurde, welche zu einer Kreuzreaktion gegenüber dem homologen humanen Protein führte (Beltrán et al., 2021). Das Antigen, welches durch den Autoantikörper erkannt wird, ist hierbei noch nicht bekannt. Da das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) das häufigste von demyelinisierenden Autoantikörpern erkannte Antigen darstellt (Breithaupt et al., 2008; Berger and Reindl, 2015), wird auch hier MOG als das rAb-hAE-spezifische Antigen vermutet. Ein weiterer Hinweis ergibt sich dadurch, dass anti-MOG-Antikörper für eine Vielzahl an Patienten mit autoimmunen Enzephalitiden wie der Akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM) oder der MS nachgewiesen werden können (Mayer et al. 2013). Die Tatsache, dass die Symptomatik der hAE jener der Marburg-Variante der MS ähnelt (Beltrán et al., 2021), deutet ebenfalls eine Affinität des Antikörpers gegenüber MOG an.

1.6 Ziele der Dissertation

1.6.1 Charakterisierung der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R

Ein Ziel der Dissertation war die Charakterisierung der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R. Hierbei lag der Fokus auf der Analyse der Abhängigkeit der rAb-IP2-Bindung an der Zusammensetzung der Rezeptor-Untereinheiten, sowie der Zn²⁺-Konzentration. Hierdurch sollte überprüft werden, ob die Zn²⁺-Bindestelle des GABA_A-Rezeptors das von rAb-IP2 erkannte Epitop darstellt. Da der Antikörper eine Kreuzreaktivität gegenüber dem ebenfalls Zn²⁺-bindenden Protein CSRP2 besitzt, könnte somit ein besseres Verständnis der Krankheitsentstehung erzielt werden.

1.6.2 Identifizierung des IP2-T-Zell-Antigens

Für ein erweitertes Verständnis der Krankheitsentstehung sollte in dieser Arbeit das T-Zell-Antigen des klonal expandierten CD8+ Klons identifiziert werden. Hierfür sollte die von Siewert et al. (2012) etablierte Methode angewendet und optimiert werden (1.4.3). Die Identifizierung des IP2-T-Zell-Antigens baut hierbei auf den Ergebnissen einer früheren Masterarbeit auf (Gebert, 2018).

1.6.3 Identifizierung und Charakterisierung des von rAb-hAE erkannten Antigens

Zwar konnte für den Antikörper rAb-hAE eine Bindung an Myelin nachgewiesen werden, das vom Antikörper erkannte Antigen war hierbei jedoch unbekannt. Aufgrund der Häufigkeit von anti-MOG-Antikörpern bei weiteren demyelinisierenden Krankheiten wie der ADEM oder der MS (Breithaupt et al., 2008; Mayer et al. 2013; Berger and Reindl, 2015), könnte MOG ebenfalls jenes Antigen darstellen, welches durch rAb-hAE erkannt wird. Eine Aufgabe dieser vorliegenden Arbeit lag daher in der Analyse einer möglichen Bindung des Antikörpers an MOG, sowie die Bestimmung des von rAb-hAE erkannten Epitops.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeine Puffer

Cutsmart® Puffer	(New England Biolabs)
DNA-Probenpuffer	50 % (v/v) Glycerin; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 0,02 % (w/v) Xylencyanol; 10 mM TRIS-HCl pH 7,5
Einfriermedium	Fetal Calf Serum (FCS); 10 % DMSO
FACS-Puffer	1 % (v/v) FCS in 1x PBS
1x PBS	pH 7,4 (Thermo Fisher)
Propidiumiodid-FACS-Puffer	Propidiumiodid (Sigma-Aldrich), 1:6000 verdünnt in FACS-Puffer
1x TBE-Puffer	89 mM TRIS; 89 mM Borsäure; 2 mM EDTA, pH 8
TOPRO-FACS-Puffer	TO-PRO™ Iodid (Thermo Fisher), 1:6000 verdünnt in FACS-Puffer

2.1.2 Chemikalien und weitere Materialien

Agarosegele	0,8 bzw. 1,5 % (w/v) Agarose (Biozym) in TBE-Puffer + 2,5 µl PeqGREEN
DEPC-Wasser	(Invitrogen)
DMSO	(Sigma-Aldrich)
Ethanol	(Sigma-Aldrich)
Fugene® HD Transfection Reagent	(Promega)
Glykogen	20 mg/ml (Roche)
Natriumacetat	3 M (Novagen)
Pellet Paint® Co-Precipitant	(Novagen)

Propidiumiodid	(Sigma-Aldrich)
peqGREEN DNA/RNA-Farbstoff	(Peqlab)
Streptavidin-Alexa-Fluor647	(Jackson Immuno Research)
TO-PRO™ Iodid	(Thermo Fisher)
Trypanblau (0,1 %)	0,4 % Trypanblau-Lösung (Invitrogen), 1:4 verdünnt in 1x PBS
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % (Sigma)
Zinkchlorid	≥98% (Sigma)

2.1.3 Längen- und Größenstandards

peqGOLD DNA-Leiter 50-1000 bp (Peqlab)

1 kB DNA-Ladder 500-10000 bp (New England Biolabs)

2.1.4 Medien zur Zellkultivierung

E. coli:

LB-Medium mit Ampicillin (LB-Amp)	1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Trypton; 100 µg/ml Ampicillin in H ₂ O, pH 7
LB-Medium mit Kanamycin (LB-Kan)	1 % (w/v) NaCl; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 1 % (w/v) Trypton; 50 µg/ml Kanamycin in H ₂ O, pH 7
LB-Amp-Platten	LB-Amp + 1,5 % Bacto Agar (BD Biosciences)
LB-Kan-Platten	LB-Kan + 1,5 % Bacto Agar (BD Biosciences)
S.O.C. -Medium	(Sigma-Aldrich)

COS-7:

RPMI complete (RPMI-co)	RPMI 1640 (Thermo Fisher) 10 % FCS (Biochrom) 100 U/ml Penicillin (Thermo Fisher) 100 µg/ml Streptomycin (Thermo Fisher) 1x MEM Non-Essential Amino Acid Solution (Thermo Fisher) 1 mM Natriumpyruvat (Thermo Fisher) 2 mM L-Glutamin (Sigma-Aldrich)
RPMI-G	RPMI-co 1,5 mg/ml G-418

T-Zell-Hybridome:

RPMI-GHPB	RPMI-co 1 µg/ml Puromycin 1,5 mg/ml G-418 3 µg/ml Blasticidin 0,33 mg/ml Hygromycin
-----------	---

HeLa:

DMEM-co	DMEM (Sigma) 10 % FCS (Biochrom) 100 U/ml Penicillin (Thermo Fisher) 100 µg/ml Streptomycin (Thermo Fisher)
---------	--

Expi293F™

Expi293F™ (Thermo Fisher)
Expression Medium

Opti-MEM™ Serumreduziertes Medium für Transfektionen
(Thermo Fisher)

2.1.5 Antibiotika

Ampicillin	100 mg/ml (Sigma-Aldrich)
Blasticidin	10 mg/ml (Invitrogen)
G-418	100 mg/ml (Santa Cruz Biotechnologies)
Hygromycin	50 mg/ml (Invitrogen)
Kanamycin	50 mg/ml (Invitrogen)
Puromycin	1 mg/ml (Invitrogen)

2.1.6 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Herkunft	Referenz
COS-7	Nierenzelllinie afrikanischer Grünmeerkatzen; exprimiert das SV40 T Antigen (Gluzman, 1981)	ATCC
COS-7-A2	COS-7 Zellen, welche stabil das HLA-A*02:01 exprimieren	K. Dornmair
58 $\alpha^- \beta^-$ IP2-T-Zell-Hybridome	Ursprünglich TCR-defiziente Maus-T-Zell-Hybridomlinie; exprimieren den IP2-TCR, humanes CD8 $\alpha\beta$ und NFAT-GFP	A. Plappert

Expi293F™	Abgeleitete Zelllinie von HEK-293; humane embryonale Nierenzelllinie; transformiert mit Adenovirus Typ-5 DNA-Fragmenten (Graham et al., 1977)	Thermo Fisher
HeLa	Humane Epithelzelllinie eines Zervixkarzinoms (Henrietta Lacks)	ATCC

2.1.7 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Firma
<i>E. coli</i> MAX Efficiency® DH10B™ Competent Cells	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 endA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL nupG</i> λ-	Invitrogen
<i>E. coli</i> One Shot® TOP 10 Chemically Competent Cells	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>ara leu</i>) 7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

2.1.8 Plasmide

Plasmid	Größe	Resistenzgene	Referenz
pcDNArc-Spacer	7,6 kb	<i>amp</i> ^R , <i>bls</i> ^R	K. Siewert, G. Rühl
pcDNArc-N24	5,1 kb	<i>amp</i> ^R , <i>bls</i> ^R	K. Siewert
pcDNArc-N27	5,1 kb	<i>amp</i> ^R , <i>bls</i> ^R	K. Siewert
pcDNArc-N30	5,1 kb	<i>amp</i> ^R , <i>bls</i> ^R	K. Siewert
pcDNA™3.1/V5-His TOPO	5,5 kb	<i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	Invitrogen
pHSE3'-HLA-A*02:01	10,2 kb	<i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	A. Plappert
pHSE3'-HLA-A*23:01	10,2 kb	<i>amp</i> ^R , <i>neo</i> ^R	A. Plappert

pHSE3'-HLA-B*35:01	10,2 kb	amp ^R , neo ^R	A. Plappert
pHSE3'-HLA-B*44:03	10,2 kb	amp ^R , neo ^R	A. Plappert
pHSE3'-HLA-C*04:01	10,2 kb	amp ^R , neo ^R	A. Plappert
pHSE3'-HLA-C*16:01	10,2 kb	amp ^R , neo ^R	A. Plappert
pHSE3'-HLA-C*07:02-BFP	10,9 kb	amp ^R , neo ^R	J. Hansen
pHSE3'-HLA-A*23:01-BFP	10,9 kb	amp ^R , neo ^R	2.6.2.1
pHSE3'-HLA-B*35:01-BFP	10,9 kb	amp ^R , neo ^R	2.6.2.1
pHSE3'-HLA-B*44:03-BFP	10,9 kb	amp ^R , neo ^R	2.6.2.1
pHSE3'-HLA-C*04:01-BFP	10,9 kb	amp ^R , neo ^R	2.6.2.1
pHSE3'-HLA-C*16:01-BFP	10,9 kb	amp ^R , neo ^R	2.6.2.1
pcDNA-sGFP	5,1 kb	amp ^R , neo ^R	K. Siewert
			K. Dornmair
pTriEx-1-GABA _A R-A1	6,6 kb	amp ^R	K. Dornmair
pTriEx-1-GABA _A R-B3	6,7 kb	amp ^R	K. Dornmair
pEGFP-N1	4,7 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-mMOG	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-rMOG	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-hMOG	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-hMOG-N31D	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-hMOG-R9G/H10Y	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-hMOG-P42S	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-hMOG-R86Q	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-hMOG-S104E	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl
pEGFP-N1-hMOG-H103A/S104E	5,4 kb	kan ^R , neo ^R	E. Meintl

2.1.9 Primer

Alle verwendeten Primer stammen von der Firma Metabion (Planegg, Deutschland) und wurden als 100 µM-Lösungen erstellt.

Primer	Sequenz
pcDNA-for-1	5' -CACTGCTTACTGGCTTATCG-3'
pcDNA-2 nd -for	5' -TCCGGCGCGCCACCATG-3'
pcDNA-2 nd -for-TOPO	5' -CACCTCCGGCGCGCCACCATG-3'
pcDNA-rev-1	5' -ACTAGAAGGCACAGTCGAGG-3'
pcDNA-2 nd -rev-10	5' -CTAGACTCGAGCGGCCGC-3'
pcDNA-rev-3	5' -TGGTGATGGTGATGATGACC-3'
amp-for	5' -TCAATACGGGATAATACCGC-3'
ori-rev	5' -CGGATACCTGTCCGCCTTT-3'
pHSE3-HLA-A010-lead	5' -CTCGTCGACATGGCCGTCATGGCGCC-3
pHSE3-HLA-A23-NotI-rev	5' -TGCGGCCGCCACTTTACAAGCTGTGAGAGAC-3'
pHSE3-HLA-B3501-lead	5' -CTCGTCGACATGCGGGTCACGGCGCC-3'
pHSE3-B27-not-rev	5' -AAGCGGCCGCAGCTGTGAGAGACACATCAG-3
pHSE3-HLA-C0602Sal-for	5' -TAGTCGACATGCGGGTCATGGCGCC-3'
pHSE3-C0602NotI_rev	5' -AAGCGGCCCGCGGCTTTACAAGCGATGAGAGA-3'
pHsEfor2038-2056	5' -CACAGTTTCACTTCTGCAC-3'
pHSE3-3-rev	5' -AAAACATCAAGGGTCCCATA-3'

2.1.10 Kits

Kit	Verwendung	Firma
ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit	Transfektion von Expi293F™-Zellen	Thermo Fisher
iProof™ High-fidelity PCR Kit	Polymerase-Kettenreaktion	Bio-Rad
Phusion® High-Fidelity PCR Kit	Polymerase-Kettenreaktion	New England Biolabs
QIAquick® Gel Extraction Kit	Extraktion von DNA aus Agarosegelen	Qiagen
QIAquick® Nucleotide Removal Kit	Entfernung von Nukleotiden nach Restriktionsverdau	Qiagen
QIAquick® PCR Purification Kit	PCR-Produkt Reinigung	Qiagen
QIAGEN® Plasmid Maxi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen
QIAGEN® Plasmid Midi Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Plasmid-Isolierung	Qiagen
Rapid DNA Dephos & Ligation Kit	Dephosphorylierung bzw. Ligation von pcDNArc-Spacer	Roche
SE Cell Line 4D-Nucleofector® X Kit L	Nukleofektion	Lonza
Zero Blunt™ TOPO™ PCR Klonierungskit	Ligation von PCR-Produkten in pCR™-Blunt II-TOPO™	Invitrogen

2.1.11 Restriktionsenzyme

Ascl (10.000 U/ml; New England Biolabs)

NotI-HF (20.000 U/ml; New England Biolabs)

Sall-HF (20.000 U/ml; New England Biolabs)

2.1.12 Antikörper

Spezifität	Klon	Fluorophor	c [mg/ml]	Firma
mCD3 ϵ	145-2C11 (Hamster IgG)	FITC	0,5	BD Biosciences
mCD3 ϵ	145-2C11 (Hamster IgG)	-	0,5	eBiosciences
hCD8 β	2ST8.5H7 (Mouse IgG)	PE	6	BD Biosciences
hGABA $_A$ - α_1	BD24 (Mouse IgG)	-	1 mg/ml	Merck Millipore
hGABA $_A$ - β_2/β_3	62-3G1 (Mouse IgG)	-	1 mg/ml	Merck Millipore
human IgG (H+L)	Polyklonal (Goat IgG)	Alexa Fluor 488	2 mg/ml	Invitrogen
human IgG (H+L)	Polyklonal (Goat IgG)	Alexa Fluor 647	2 mg/ml	Invitrogen
human IgG (H+L)	Polyklonal (Goat IgG F(ab') $_2$ - Fragment); konjugiert mit Biotin-SP (long spacer)	-	1,2 mg/ml	Jackson Immuno Research
mouse IgG (H+L)	Polyklonal (Goat IgG)	Alexa Fluor 488	2 mg/ml	Invitrogen

2.1.13 Geräte

Agarosegelelektrophorese	Power Supply LKB 3000/150 (Pharmacia)
Mikroinjektor	CellTram Vario Mikroinjektor (Eppendorf)
Durchflusszytometrie	BD FACSVerse TM (BD Biosciences)
Elektroporator	Gene Pulser (Bio-Rad)

Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 200 M (Zeiss)
Geldokumentation Agarosegele	Quantum ST5 (Vilber)
Heizblock	Eppendorf Thermomixer Comfort
Inkubatoren	APT.Line™ BD (E2) (Binder)
	Galaxy 14S, 170S und 170R (New Brunswick™)
Inkubationsschüttler für Bakterien	Innova 44 (New Brunswick™)
Inkubationsschüttler für eukaryotische Zellen	Multitron Pro (Infors HT)
Keypad für Mikroinjektor	SM-6 (Luigs und Neumann)
Magnetrührer	KM02 (Janke & Kunkel)
Mikromanipulator	Mini 25 Micromanipulator (Luigs & Neumann)
Mikroskop	Wilovert Standard HF 20 (Hund Wetzlar)
Milli-Q-Wasser	Milli-Q® Advantage A10 (Merck)
Nanodrop	Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)
Nukleofektion	4D-Nucleofector™ Core Unit
	4D-Nucleofector™ X Unit (Lonza)
pH-Meter	pH521 (WTW)
Sicherheitswerkbank	FlowSafe® B-[MaxPro]2-160 (Berner)
Spektrophotometer	UV-1600 PC Photospectrometer (VWR International)
Stage Control	MAC 6000 System (Ludl Electronic Products Ltd.)
Thermozykler	GeneTouch Thermal Cycler (Bioer)
	Thermocycler TPersonal (Biometra)
UV-Transilluminator	UVT-14 SE (Roth)
Vortex-Mischer	Vortex Genie 2 (Bender & Hobein)
Waage	Entris® (Sartorius)
Wasserbad	GFL 1002 (GFL)
Zählkammer	Neubauer-Zählkammer (Neubauer)
Zellsorter	BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences)

Zentrifugen

Eppendorf 5417R; Rotor: FA45-30-11
(Eppendorf)

Heraeus™ Megafuge™ 16 (Thermo Fisher)

Sprout Minicentrifuge (Heathrow Scientific LLC)

2.1.14 Programme

Auswertung Durchflusszytometrie

BD FACSuite™ (BD Biosciences)

FlowJo™ (TreeStar)

Auswertung Sequenzierung

Chromas 2.6.2 (Technelysium Pty. Ltd.)

Automatisches Scansystem und
Fluoreszenzmikroskopie

ZEN 2.5 Pro (Zeiss)

Bildbearbeitung

ImageJ V1.43m (Rasband, W.)

Inkscape (Inkscape Community)

BLAST-Algorithmus

BLAST (Altschul S. F., Gish W., Miller W.,
Myers E. W., Lipman D. J.)

Geldokumentation

Vision Capt (Vilber)

Plasmid Editor

ApE (Davis W. A.)

SnapGene (GSL Biotech LLC)

Tabellenkalkulation

Excel 2010 (Microsoft)

Textverarbeitung

Word 2010 (Microsoft)

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Transformation und Kultivierung von Bakterien

2.2.1.1 Transformation durch Heatshock

Die Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli* TOP10 erfolgte durch Heatshock. Hierzu wurde 1 µl DNA zu 20 µl Bakterien gegeben und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Heatshock für 30 s bei 42 °C im Wasserbad und einer nachfolgenden zweiminütigen Inkubation auf Eis wurden der Bakteriensuspension 100 µl SOC-Medium hinzugegeben. Anschließend wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C bei 180 rpm geschüttelt und 50 µl des Ansatzes mithilfe eines Drigalski-Spatels auf LB-Amp-Platten (100 µg/ml) ausplattiert. Am nächsten Tag wurden 2-3 Klone mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte gepickt, in ein 15 ml-Falcon mit 3 ml LB-Amp (100 µg/ml) überführt und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte durch den Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen). Zur Kontrolle wurden die Plasmide anschließend sequenziert.

2.2.1.2 Transformation durch Elektroporation

Für die Transformation elektrokompetenter *E. coli* durch Elektroporation wurden 2 µl Plasmid-DNA zu 20 µl *E. coli* DH10B in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Durch die Elektroporation bei 2 kV, 200 Ω und 25 µF im Micropulser (Bio-Rad) wurden in die Zellmembran der Bakterien kleine Poren verursacht, welche zu einer Aufnahme der zu transformierenden DNA in die Zelle führten. Direkt nach dem Puls wurde 1 ml SOC-Medium zu dem Transformationsansatz gegeben, in ein Falcon Tube überführt und für 1 h bei 37 °C im Schüttler inkubiert. Für die genaue Bestimmung der Gesamtklonzahl nach der Transformation wurden 10 µl der Bakteriensuspension zu 490 µl LB-Amp (100 µg/ml) pipettiert, wovon 50 µl auf eine LB-Amp-Agarplatte ausplattiert und für 24 h bei 37 °C inkubiert wurden. Am nächsten Tag wurde die Anzahl der Bakterienklone auf der Platte bestimmt, wodurch die Gesamtklonzahl im Transformationsansatz ermittelt werden konnte. Die restliche Bakteriensuspension wurde zu 20 ml LB-Amp gegeben und für 24 h bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert.

2.2.2 Anfertigung von Glycerol-Stocks

Eine längerfristige Aufbewahrung transformierter Bakterien und angereicherter Bakterien-Subpools wurde durch die Anfertigung von Glycerol-Stocks gewährleistet. Hierfür wurden 500 µl der *E. coli*-Suspension zu 500 µl Glycerol (100 %) gegeben und in ein Kryotube überführt. Daraufhin wurden die Bakterien-Stocks bei -80 °C eingefroren und gelagert. Für die Anzucht von Bakterienkulturen aus Glycerolstocks wurden 200-500 µl *E. coli* entnommen und zu 50 ml LB-Amp in einen Erlenmeyerkolben gegeben. Anschließend wurde die Vorkultur für 2-4 Stunden bei 37 °C geschüttelt und die OD₆₀₀ photometrisch bestimmt.

2.2.3 Herstellen bakterieller Subpools

2.2.3.1 Subpools im 96-well Block

Für die Anreicherung positiver Plasmide wurden Bakterien-Subpools hergestellt. Hierfür wurden 100-1000 µl der positiven Bakterienpools in ein Falcon Tube mit 4 ml LB-Amp gegeben und für mindestens 1 h bei 37 °C geschüttelt. Die Bakteriendichte wurde anschließend durch Bestimmung der OD₆₀₀ photometrisch bestimmt (UV-1600 PC Photospectrometer, VWR International), wobei 1 ml LB-Amp als Referenz verwendet wurden. Lag der gemessene Wert hierbei nicht zwischen 0,1 und 0,5, so wurden die Bakterien mit LB-Amp verdünnt. Ein OD₆₀₀-Wert von 1 entsprach hierbei einer Bakteriendichte von ca. 1×10^6 c/µl.

Die Klonzahl (Anzahl unabhängiger *E. coli*-Klone) der neu herzustellenden Subpools wurde durch die Formel

$$\text{Neue Klonzahl} = \frac{\text{alte Klonzahl}}{10} \quad (1)$$

bestimmt. Pro Subpool-Runde wurden jeweils drei Ansätze hergestellt. Hierfür wurden 3 × 40 ml LB-Medium in 50 ml-Falcons vorbereitet, in welche die folgenden Mengen an Bakterien pro 40 ml Kultur hinzugegeben wurden:

1× Ansatz	32 × Neue Klonzahl
2× Ansatz	32 × Neue Klonzahl × 2
3× Ansatz	32 × Neue Klonzahl × 3

In einen 96-well Block wurden pro Ansatz 30x 1,25 ml Bakterien pipettiert, wodurch pro Runde 30 Subpools abgedeckt wurden. Der Block wurde anschließend mit einer luftdurchlässigen Folie abgeklebt und über Nacht bei 37 °C im Bakterenschüttler inkubiert (180 rpm). Für jeden Ansatz wurden zusätzlich zur Bestimmung der tatsächlichen Klonzahl pro Subpool 50-100 Klone auf eine LB-Amp-Platte ausplattiert und ebenfalls über Nacht bei 37° C inkubiert. Die auf den Platten gewachsenen Klone wurden am nächsten Tag ausgezählt, wodurch die tatsächliche Klonzahl pro Subpool berechnet werden konnte. Nur der Ansatz, dessen tatsächliche Klonzahl der vorher berechneten Klonzahl am nächsten lag, wurde für die weitere Antigensuche verwendet, wobei darauf geachtet wurde, dass nur Subpools weiterverwendet wurden, dessen tatsächliche Klonzahl über der durch Formel (1) berechneten Klonzahl lag. Anschließend wurde aus den 30 Subpools jeweils 1 ml Bakterien entnommen und die Plasmid-DNA wurde mittels Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) isoliert. Der verwendete 96-well Block wurde schlussendlich luftdicht verpackt und bei 4 °C aufbewahrt.

2.2.3.2 „Straßen“-Subpools

Die Herstellung bakterieller Subpools in 96-well Blöcken wurde solange durchgeführt, bis die Poolgröße bei weniger als 300 unabhängigen Bakterienklonen lag. Für die weitere Antigensuche wurden anschließend Straßen-Subpools angefertigt. Wie in 2.2.3.1 beschrieben, wurde hierfür der positive Bakterienpool entnommen und für 1h auf dem Bakterenschüttler inkubiert. Nach erfolgter photometrischer Bestimmung der OD₆₀₀ wurden die Bakterien so auf LB-Amp-Platten ausplattiert, dass ca. 300 Klone/Platte erwartet wurden. Am darauffolgenden Tag wurden die tatsächlichen Klone auf den Platten gezählt und 30 Linien („Straßen“) zu je 30 Klonen mit einem Stift auf die Platten gezeichnet (Abbildung 9), wodurch eine Gesamtzahl von 900 Klonen abgedeckt wurde. Die gemeinsamen Klone jeder Straße wurden einzeln mit sterilen Zahnstochern von der Platte entnommen, in ein 50 ml-

Falcon mit 15 ml LB-Amp überführt und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler (180 rpm) inkubiert. Die verwendeten Platten wurden anschließend mit Parafilm luftdicht verschlossen und bei 4 °C gelagert. Aus jeweils 2 ml/Ansatz wurde mithilfe des Qiaprep® Spin Miniprep Kits (Qiagen) am nächsten Tag die Plasmid-DNA der Straßen-Subpools isoliert und für einen weiteren T-Zell-Aktivierungsassay verwendet.



Abbildung 9: Vorgezeichnete „Straße“ auf einer LB-Amp-Platte. Es wurden 30 Einzelklone pro Straße markiert, welche anschließend separat gepickt und in ein gemeinsames Falcon-Tube überführt wurden.

2.2.3.3 Kultivierung einzelner Bakterienklone

Wurde bei einem Straßen-Subpool eine Reaktivierung nachgewiesen, so wurden die Einzelklone der positiven Straße separat mit sterilen Zahnstochern von der Agarplatte gepickt und zu je 3 ml LB-Amp in ein 15 ml-Falcon überführt. Nach einer Inkubation der Kulturen über Nacht (37 °C, 180 rpm) erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA mittels Qiaprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen).

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 COS-7-Zellen

2.3.1.1 Kultivierung

COS-7-Zellen wurden in verschiedenen Zellkulturflaschen mit RPMI-co Medium bei 37° C und 5% CO₂ kultiviert. Stabil transfizierte COS-7 wurden nach dem Auftauen zunächst für 2 Tage ebenfalls in RPMI-co kultiviert, anschließend wurde für die Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks das Medium auf RPMI-G (1,5 mg/ml G-418) gewechselt. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 % erreichten, wurden diese gesplittet. Hierfür wurden die adhärent wachsenden Zellen nach vorheriger Abnahme des Mediums mit 20 ml 1x PBS gewaschen und es wurde für einen Trypsinverdau der Oberflächenproteine 7 ml Trypsin-EDTA (0,05 %) zu den Zellen gegeben. Nach einer achtminütigen Inkubation bei 37° C waren die Zellen abgelöst und der Proteinverdau wurde durch Zugabe von 13 ml frischem RPMI-co gestoppt. Die nun in Suspension vorliegenden Zellen wurden für 5 min bei 300 g und 4 °C zentrifugiert (HeraeusTM MegafugeTM 16, Thermo Fisher) und das Pellet in 10 ml frischem Medium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zelldichte wurde eine bestimmte Anzahl Zellen zurück in eine Flasche mit konditioniertem Medium gegeben. Nach ca. 4 Wochen in Kultur wurden die Zellen entsorgt und durch frisch aufgetaute Zellen ersetzt.

2.3.1.2 Transfektion durch Fugene®

Die Entnahme von COS-7-Zellen, welche nach Durchführung des Assays direkt unterhalb der aktivierten T-Zell-Hybridome lagen, erfolgte in 3,5 cm-Schalen mit 3 ml RPMI-co. Wurde die Co-Kultivierung mit T-Zell-Hybridomen 24 h nach der Transfektion durchgeführt, so wurden 200.000 Zellen ausgesät. Erfolgte die Co-Kultivierung 48 h nach der Transfektion, wurden nur 150.000 Zellen/Schale vorgelegt. Einen Tag später konnten die Zellen mit dem Transfektionsreagenz Fugene® (Promega) transfiziert werden. COS-7, welche ein stabil transfiziertes HLA exprimierten, wurden mit 2 µg Library- bzw. Subpool-DNA transfiziert, COS-7 ohne HLA hingegen mit 1 µg Library-/Subpool-DNA und 1 µg HLA-Plasmid. Die DNA wurde hierfür in 100 µl RPMI vorgelegt und dem Ansatz wurden nach einer zehnminütigen

Inkubation und anschließendem Vortexen 7 µl Fugene® hinzugegeben. Sofort nach der Zugabe wurde der Transfektionsansatz gevortext und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde schlussendlich durch gleichmäßiges Tropfen über die Zellen verteilt und die Schalen wurden bis zur Zugabe der Hybridome bei 37° C und 5 % CO₂ im Inkubator aufbewahrt.

Für das Subpool-Screening wurden nur COS-7-Zellen verwendet, welche stabil ein HLA exprimierten. Hierfür wurden 75.000 (Co-Kultivierung 24 h nach Transfektion) bzw. 50.000 (Co-Kultivierung 48 h nach Transfektion) Zellen pro Ansatz in einer 24-well Platte in je 1 ml RPMI-co/Well ausgesät. 500 ng Subpool-DNA wurden in 25 µl RPMI vorgelegt und mit 1,75 µl bei Raumtemperatur vorgewärmten Fugene® versetzt. Die Zellen wurden anschließend entsprechend den oben beschriebenen Bedingungen transfiziert.

Als Negativkontrolle wurde in eine 3,5 cm-Schale bzw. in ein Well der 24-well Platte ein Transfektionsansatz ohne Plasmid-DNA hinzugegeben. Für das Screening der angereicherten Subpools wurde zudem zusätzlich der jeweilige Ausgangspool als Positivkontrolle mittransfiziert und analysiert.

2.3.1.3 Transfektion durch Nukleofektion

Für die Untersuchung der Bindung von rAb-hAE an MOG und Varianten von MOG wurden COS-7-Zellen mittels Nukleofektion transfiziert. Hierfür wurden jeweils 200.000 Zellen nach erfolgtem Trypsinverdau für 10 min bei 90 g zentrifugiert (Eppendorf 5417R; Rotor: FA45-30-11), in 20 µl SE/Supplement Solution (16,4 µl Nucleofector™ Solution + 3,6 µl Supplement; Lonza) resuspendiert und in ein Well eines 16-Well-Strips (Lonza) überführt. Nach Zugabe von je 400 ng Plasmid-DNA wurde der 16-Well-Strip in die 4D-Nucleofector™ X Unit (Lonza) gegeben und die Nukleofektion mit dem Programm CM-130 durchgeführt. Nach einer 10-minütigen Inkubation wurden die Zellen in 80 µl von bei 37 °C vorgewärmtem RPMI-co aufgenommen und nochmals für 10 min inkubiert. Anschließend wurde der gesamte Ansatz in ein Well einer 24-well Platte mit 2 ml vorgewärmtem RPMI-co überführt.

Für die Nukleofektion von höheren Zellzahlen wurden pro Ansatz 1×10^6 Zellen mit 1 μg Plasmid-DNA transfiziert. Hierfür wurden die Zellen in 100 μl SE/Supplement Solution (82 μl Nucleofector™ Solution + 18 μl Supplement) aufgenommen und in eine Lonza-Küvette überführt. Nach der erfolgten Nukleofektion mit anschließender Inkubation wurden die Zellen in 400 μl vorgewärmtem RPMI-co aufgenommen und nochmals für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zuletzt wurden die transfizierten COS-7 in ein Well einer 6-well Platte mit 2 ml vorgewärmten RPMI-co ausgesät und bis zur Analyse bei 37 °C im Inkubator kultiviert.

2.3.2 T-Zell-Hybridome

2.3.2.1 Kultivierung

Die Antigen suche wurde mithilfe von TCR-transfizierten $58\alpha^{-}\beta^{-}$ Maus-T-Zell-Hybridomen durchgeführt. Diese exprimierten neben dem humanen CD8-Corezeptor den IP2-TCR (Aline Plappert), jedoch keine endogenen TCR-Ketten (Blank et al., 1993). Zusätzlich enthielten die Zellen das NFAT-GFP-Plasmid, welches nach erfolgter T-Zell-Aktivierung zu einer NFAT-abhängigen sGFP-Expression führt (Siewert et al., 2012).

Die in Suspension wachsenden Hybridome wurden in verschiedenen Zellkulturflaschen mit RPMI-GHPB bei 37 °C und einer CO_2 -Konzentration von 5 % im Inkubator kultiviert. Erreichten die Zellen eine bestimmte Zelldichte, so wurden diese für 5 min bei 300 g zentrifugiert, in 10 ml RPMI-GHPB resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden die Zellen in einer geeigneten Verdünnung wieder in die Flasche zurückgegeben, wobei gegebenenfalls frisches RPMI-GHPB hinzugegeben wurde.

$58\alpha^{-}\beta^{-}$ T-Zell-Hybridome, welche bereits 3-4 Wochen in Kultur waren, wurden entsorgt und durch frisch aufgetaute und bereits auf Antibiotika gesetzte Zellen ersetzt. Die Zugabe von Antibiotika erfolgte hierbei schrittweise, nach jeweils 2 Tagen wurde dem RPMI-co Medium ein weiteres Antibiotikum hinzugegeben, sodass nach ca. einer Woche die Zellen in RPMI-GHPB Medium überführt werden konnten.

2.3.3 HeLa-Zellen

2.3.3.1 Kultivierung

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in unterschiedlichen Zellkulturflaschen bei 37° C und 5% CO₂ in DMEM-co Medium. Die adhärent wachsenden Zellen wurden ab einer Konfluenz von 90 % gesplittet. Die Subkultivierung wurde hierbei analog zu COS-7-Zellen über einen Trypsinverdau durchgeführt und ist in Abschnitt 2.3.1.1 beschrieben.

2.3.3.2 Transfektion durch Nukleofektion

Neben COS-7-Zellen wurden auch HeLa-Zellen mit MOG-Varianten mittels Nukleofektion transfiziert und auf eine Bindung durch rAb-hAE untersucht. Die Transfektion erfolgte hierbei mit dem Programm CN-114 und die Zellen wurden anschließend in vorgewärmtem DMEM aufgenommen. Die weitere Vorgehensweise der Nukleofektion erfolgte analog zu COS-7-Zellen und ist in Abschnitt 2.3.1.3 beschrieben.

2.3.4 Expi293F™-Zellen

2.3.4.1 Kultivierung

Expi293F™-Zellen wurden in verschiedenen Polycarbonat-Erlenmeyerkolben mit belüfteten Verschlüssen bei 37° C und 8 % CO₂ im Schüttelinkubator kultiviert. Die Zellen wurden so aufgetaut, dass noch etwas Eis im Kryotube vorhanden war und anschließend direkt in einen 125 ml-Kolben mit 30 ml auf 37 °C vorgewärmtem Expi293™ Expression Medium überführt und über Nacht im Schüttler bei 110 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte der Kultur bestimmt, wobei die Zellviabilität nicht unter 70 % liegen sollte. Erreichten die Suspensionszellen eine Dichte von $3-5 \times 10^6$ /ml, so wurden diese auf eine Zelldichte von $0,3-0,5 \times 10^6$ /ml in einen neuen 125 ml-Kolben mit frischem, vorgewärmtem Medium subkultiviert.

2.3.4.2 Transfektion

Die Transfektion von Expi293F™-Zellen erfolgte mithilfe des ExpiFectamine™ 293 Transfection Kits der Firma Thermo Fisher. Einen Tag vor der Transfektion wurde die Kultur auf eine Zelldichte von 2×10^6 /ml eingestellt, wodurch eine ausreichende Zellzahl gewährleistet wurde. Am darauffolgenden Tag wurde die Zelldichte erneut bestimmt, wobei die Zelldichte höher als 3×10^6 /ml und der Anteil lebender Zellen höher als 95 % betragen sollte. Für die Transfektion wurden pro Ansatz 90×10^6 Zellen in einen neuen 125 ml-Kolben mit 30 ml frischem, vorgewärmtem Medium überführt, wodurch sich eine Zelldichte von 3×10^6 /ml ergab. Die Zellen wurden anschließend bis zur Transfektion im Schüttelinkubator kultiviert.

Pro Transfektionsansatz wurden 80 µl ExpiFectamine™ 293 Reagent in ein 15 ml-Falcon mit 1,42 ml Opti-MEM™ gegeben und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert, wobei das ExpiFectamine™ 293 Reagent-Tube vor der Entnahme vier- fünfmal invertiert wurde. In ein zweites Falcon Tube wurden 30 µg Plasmid-DNA mit Opti-MEM™-Medium auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml vermischt und nach der Inkubation dem ExpiFectamine™- Ansatz hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubation für 20 min wurde die Mischung anschließend unter leichtem Schütteln der Zellkultur zugegeben und die Zellen wurden weiter im Schüttelinkubator kultiviert. Für Expi293F™-Zellen, welche mit den Plasmiden pTriEx-1-GABA_AR-A1 und pTriEx-1-GABA_AR-B3 transfiziert wurden, wurde zusätzlich 5 µM ZnCl₂ in das Medium gegeben. 18-22 h nach der Transfektion wurden der Zellkultur 150 µl ExpiFectamine™ Transfection Enhancer 1-Lösung und 1,5 ml ExpiFectamine™ Transfection Enhancer 2-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen bis zur Analyse im Schüttelinkubator weiterkultiviert.

2.3.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Bestimmung der Lebendzellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau (0,1 %) vermischt und in eine Neubauer-Zählkammer überführt. Das Trypanblau gelangt hierbei durch die beschädigte Zellmembran in die toten Zellen, wodurch diese blau

angefärbt werden und eine Unterscheidung von lebenden Zellen ermöglicht wird. Nur ungefärbte, lebende Zellen wurden pro Quadrant ausgezählt und der Mittelwert der Quadranten aufgrund der Verdünnung mit dem Faktor 2 multipliziert. Die Zellzahl/ml wurde anschließend durch Multiplikation des berechneten Wertes mit dem Faktor 10^4 ermittelt.

2.3.6 Einfrieren von Zellen

Eine längere Aufbewahrung von Zellen erfolgte durch die Lagerung in flüssigem Stickstoff. Hierfür wurden die Zellen für 5 min bei 300 g zentrifugiert, in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO in FCS) aufgenommen und in ein Kryoröhrchen überführt. Die Kryotubes wurden daraufhin in Gefrierboxen mit Isopropanol gestellt und langsam bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Nach zwei Tagen wurden die Tubes in eine Kryobox gestellt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Auftauen von Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Anschließend wurden diese in ein 15 ml-Falcon Tube mit 7 ml RPMI-co gegeben, zentrifugiert und in frischem Medium resuspendiert.

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Allgemeines Protokoll der Durchflusszytometrie

Die Expression von Proteinen an der Zelloberfläche wurde über eine Durchflusszytometrie quantitativ analysiert. Hierfür wurden jeweils $0,2-1 \times 10^6$ Zellen in einzelne Wells einer 96-well Spitzbodenplatte überführt und zweimal mit 200 μl FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 200 μl FACS-Puffer, welcher den verdünnten primären Antikörper enthielt, aufgenommen und für 30 min auf Eiswasser inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen wurden die Zellen in FACS-Puffer mit dem verdünnten sekundären Antikörper aufgenommen und erneut für 30 min auf Eiswasser inkubiert. Während der Inkubation und zwischen den Waschsritten wurden die Zellen abgedeckt im Dunkeln aufbewahrt, um ein Photobleaching der Fluorophore des sekundären Antikörpers zu vermeiden. Die Zellen

wurden daraufhin nochmals zweimal mit FACS-Puffer gewaschen und schließlich in 150 µl FACS-Puffer mit 1:6000 verdünntem Totfarbstoff aufgenommen. Je nach eingesetztem Fluorophor wurde hierbei als Totfarbstoff TO-PROTM Iodid oder Propidiumiodid verwendet. Die Analyse der Proben erfolgte mit einem BD FACSVerserTM (BD Biosciences) und die Rohdaten wurden anschließend mit dem Programm FlowJoTM (TreeStar) ausgewertet.

2.4.2 Analyse der CD3- und CD8-Expression von T-Zell-Hybridomen

Die CD3- bzw. CD8-Expression von T-Zell-Hybridomen wurde durch einen anti-mCD3ε-Antikörper (0,5 mg/ml, Klon 145-2C11, Hamster IgG, FITC-gelabelt, BD Biosciences) bzw. einen anti-hCD8β-Antikörper (0,5 mg/ml, Klon 2ST8.5H7, Mouse IgG, PE-gelabelt, BD Biosciences) nachgewiesen. Beide Antikörper wurden in einer 1:50-Verdünnung zu den Zellen gegeben und waren durch ein Fluorophor gelabelt. Dadurch war für die Analyse der Rezeptorexpression keine Zugabe sekundärer Antikörper notwendig.

Die CD3-Aktivierung der Hybridome konnte ebenfalls per Durchflusszytometrie analysiert werden. Die genaue Vorgehensweise der CD3-Aktivierung von T-Zell-Hybridomen wird in Abschnitt 2.5.1 genauer erläutert. Die Zellen wurden 16 h nach ihrer Aktivierung zweimal mit 200 µl FACS-Puffer gewaschen, in 150 µl TO-PROTM FACS-Puffer aufgenommen und konnten anschließend im Durchflusszytometer untersucht werden.

2.4.3 Untersuchungen der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R

2.4.3.1 Quantifizierung der GABA_A-R-Expression in Expi293FTM Zellen

Um den Einfluss der Zusammensetzung der Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors (GABA_A-R) auf die Affinität des Antikörpers rAb-IP2 zu untersuchen, wurde in einem Vorversuch per Durchflusszytometrie die Bindung des Antikörpers an Zellen untersucht, welche nur die α₁- oder die β₃- Untereinheit des Rezeptors exprimierten. Hierfür wurden Expi293FTM Zellen entweder mit dem Plasmid pTriEx-1-GABA_AR-A1, mit dem Plasmid pTriEx-1-GABA_AR-B3 oder mit beiden Plasmiden transfiziert (2.3.4.2). Als Transfektionskontrolle wurden Zellen mit

dem Plasmid pcDNA-GFP transfiziert, welche zudem eine Negativkontrolle während der Durchflusszytometrie darstellten. Die Untersuchung der Antikörper-Bindung erfolgte hierbei 48 h, 72 h und 96 h nach der Transfektion, wodurch zusätzlich der Zeitpunkt des höchsten Expressionslevels ermittelt werden konnte. Für die Durchflusszytometrie wurden 3 ml Zellsuspension aus dem entsprechenden 125 ml-Kolben entnommen und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Da der GABA_A-Rezeptor in der Lage ist, Zn²⁺-Ionen zu binden (Hosie et al., 2003), wurde für alle Wasch- und Inkubationsschritte FACS-Puffer mit 5 µM ZnCl₂ verwendet. Nachdem die Zellen in 8 ml FACS-Puffer aufgenommen und mithilfe eines 35 µm-Zellsiebs (Falcon) gefiltert wurden, wurden in eine 96-well Spitzbodenplatte je 200 µl Zellsuspension pro Well pipettiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in 5 µg/µl rAb-IP2 aufgenommen und für 30 min auf Eiswasser inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in 4 µg/µl anti-human-Antikörper (polyklonal, Goat IgG, Alexa Fluor 647-gelabelt, Invitrogen) aufgenommen und erneut für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen, in 150 µl FACS-Puffer mit Propidiumiodid (1:2000 verdünnt, Sigma-Aldrich) aufgenommen und mit einem BD FACSVerser™ (BD Biosciences) analysiert.

2.4.3.2 Untersuchung der rAb-IP2-Bindung in Abhängigkeit der Zusammensetzung der GABA_A-R-Untereinheiten

Für eine weitere Untersuchung des Einflusses der Zusammensetzung der GABA_A-R-Untereinheiten an der rAb-IP2-Bindung wurden Expi293F™ Zellen mit den für α₁- (pTriEx-1-GABA_AR-A1) und β₃- (pTriEx-1-GABA_AR-B3) codierenden Plasmiden in verschiedenen molaren Verhältnissen transfiziert (2.3.4.2). Die untersuchten Verhältnisse von α₁:β₃ lagen hierbei bei 1:0, 0,8:0,2, 0,6:0,4, 0,2:0,8 und 0:1. Nach 48 bzw. 72 h wurden jeweils 3 ml der transfizierten Expi293F™ entnommen, gewaschen und in 5 ml FACS-Puffer mit 5 µM ZnCl₂ resuspendiert. Anschließend wurden je 200 µl der gefilterten Zellsuspension in ein Well einer 96-well Spitzbodenplatte überführt und die Zellen wurden erneut zweimal gewaschen. Als primäre Antikörper wurden neben rAb-IP2 auch die kommerziellen Antikörper anti-GABA_A-α₁ (Klon BD24, Mouse IgG, Merck Millipore) bzw. anti-GABA_A-β₂/β₃ (Klon 62-3G1, Mouse IgG, Merck Millipore) in einer Konzentration von 5 µg/ml verwendet. Als

Negativkontrolle wurden zusätzlich Zellen mit dem Antikörper rOCB-MS3-s1 (Brändle et al., 2016) inkubiert. Nach einer 30-minütigen Inkubation und zweimaligem Waschen wurden die Zellen in FACS-Puffer mit 4 µg/ml anti-human- (polyklonal, Goat IgG, Alexa Fluor 488-gelabelt, Invitrogen) bzw. anti-mouse-Antikörper (polyklonal, Goat IgG, Alexa Fluor 488-gelabelt, Invitrogen) aufgenommen und erneut für 30 min inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen anschließend in 200 µl TO-PRO™ FACS-Puffer aufgenommen und per Durchflusszytometrie analysiert.

2.4.3.3 Untersuchung des Einflusses der Zn²⁺-Konzentration an der rAb-IP2-Bindung

Da der GABA_A-Rezeptor eine Bindestelle für Zn²⁺-Ionen besitzt (Hosie et al., 2003), wurde auch der Einfluss der Zn²⁺-Konzentration auf die Affinität von rAb-IP2 untersucht. Expi293F™ Zellen wurden hierfür in einem molaren Verhältnis von 1:1 mit den Plasmiden pTriEx-1-GABA_AR-A1 und pTriEx-1-GABA_AR-B3 transfiziert (2.3.4.2) und 48 h später per Durchflusszytometrie analysiert. Vor der Durchflusszytometrie wurden die Zellen in FACS-Puffer mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen (0/2,5/5/10/25/50 µM) aufgenommen und 30 min bzw. 4 h auf Eiswasser inkubiert. Die weitere Probenvorbereitung mitsamt den verwendeten Antikörpern erfolgte analog zur beschriebenen Vorgehensweise in 2.4.3.2.

2.4.4 Untersuchungen der rAb-hAE-Bindung an hMOG

2.4.4.1 Analyse der hMOG-Erkennung durch rAb-hAE-Bindung

Da durch immunhistologische Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass rAb-hAE an Myelin bindet (Beltrán et al., 2021), wurde der Antikörper auf eine Bindung an das Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) getestet. COS-7-Zellen wurden hierfür mit dem Plasmid pEGFP-N1-hMOG mittels Nukleofektion transfiziert (2.3.1.3) und 48 bzw. 72 h später per Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich COS-7 mit dem Plasmid pEGFP-N1 transfiziert und ebenfalls untersucht. Nachdem die Zellen durch Trypsinverdau von der 6-well Platte abgelöst und mithilfe eines 35 µm-Zellsiebs gefiltert wurden, wurden je 200 µl Zellsuspension/Well in eine 96-well Spitzbodenplatte pipettiert.

Nach zweimaligem Waschen wurde der Antikörper rAb-hAE in Konzentrationen von 100/30/10/3,33/1/0,33/0,1/0,033 µg/ml zu den Zellen gegeben und für 30 min auf Eiswasser inkubiert. Zusätzlich wurden COS-7 Zellen in gleichen Konzentrationen mit dem Antikörper r8-18C5 inkubiert. Da der rekombinante Antikörper r8-18C5 humanes MOG erkennt (Breithaupt et al., 2003), diente dieser in den nachfolgenden Untersuchungen als Positivkontrolle. Nach der Inkubation und der Durchführung von zwei weiteren Waschschritten wurden die Zellen in FACS-Puffer mit 2,4 µg/ml anti-human-Biotin-SP-Antikörper (polyklonal, Goat IgG F(ab')₂-Fragment; konjugiert mit Biotin-SP, Jackson Immuno Research) aufgenommen und erneut für 30 min auf Eiswasser inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin wieder zweimal gewaschen, für 30 min mit 0,5 µg/ml Streptavidin-Alexa-Fluor 647 (Jackson Immuno Research) in FACS-Puffer auf Eiswasser inkubiert und anschließend in 200 µl Propidiumiodid-FACS-Puffer aufgenommen und mit einem BD FACSVerser™ (BD Biosciences) untersucht.

2.4.4.2 Untersuchung der rAb-hAE-Bindung an hMOG-Mutanten

Um das von rAb-hAE erkannte Epitop zu identifizieren, wurden ebenfalls hMOG-Mutanten auf eine rAb-hAE-Bindung untersucht. Hierbei wurden neben den Mutanten N31D, R9G/H10Y, P42S, R86Q, S104E, H103A/S104E auch mouse MOG (mMOG) und rat MOG (rMOG) in COS-7- und HeLa-Zellen exprimiert und das Bindungsverhalten von rAb-hAE mit jenem an Full Length hMOG verglichen. Die verwendeten Plasmide für die Expression der als EGFP-Fusionsprotein vorliegenden MOG-Mutanten sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Nukleofektion der Zellen und die Vorbereitung und Analyse der Proben erfolgte hierbei analog zur beschriebenen Vorgehensweise in 2.4.4.1, wobei die Konzentration der primären Antikörper für alle Proben bei 30 µg/ml lag. Als Negativkontrolle wurden zusätzlich COS-7- bzw. HeLa-Zellen von jeder MOG-Variante mit 30 µg/ml rOCB-MS3-s1-Antikörper inkubiert und per Durchflusszytometrie untersucht.

Tabelle 1: Verwendete Plasmide zur Untersuchung der rAb-hAE-Bindung an verschiedene Varianten von MOG. Jede MOG-Variante wurde hierbei als EGFP-Fusionsprotein auf COS-7- und HeLa- Zellen exprimiert, wobei EGFP intrazellulär vorlag.

Transfiziertes Plasmid	Verwendung
pEGFP-N1	Expression von EGFP; Negativkontrolle
pEGFP-N1-mMOG	Expression von mMOG
pEGFP-N1-rMOG	Expression von rMOG
pEGFP-N1-hMOG	Expression von hMOG (Full Length)
pEGFP-N1-hMOG-N31D	Expression von hMOG-N31D
pEGFP-N1-hMOG-R9G/H10Y	Expression von hMOG-R9G/H10Y
pEGFP-N1-hMOG-P42S	Expression von hMOG-P42S
pEGFP-N1-hMOG-R86Q	Expression von hMOG-R86Q
pEGFP-N1-hMOG-S104E	Expression von hMOG-S104E
pEGFP-N1-hMOG-H103A/S104E	Expression von hMOG-H103A/S104E

Für die Mutanten hMOG-R86Q, hMOG-S104E und hMOG-H103A/S104E wurde anschließend eine Titration von rAb-hAE in den Konzentrationen 100/30/10/3,33/1/0,33/0,1/0,033 µg/ml durchgeführt. Die Nukleofektion der COS-7-Zellen und die Vorbereitung der Proben erfolgten hierbei nach der in 2.3.1.3 bzw. 2.4.4.1 beschriebenen Vorgehensweise.

2.4.5 Präparative Durchflusszytometrie (Fluorescence-activated cell sorting, FACS)

Um eine höhere Expression der HLA-BFP-Fusionsproteine zu gewährleisten, wurden stabil transfizierte COS-7-Zellen mittels fluorescence-activated cell sorting (FACS) sortiert. $4-5 \times 10^6$ COS-7-Zellen wurden hierfür durch Trypsin-Verdau abgelöst, einmal in FACS-Puffer gewaschen, mithilfe eines 35 µm-Zellsiebs gefiltert und schließlich in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die besten 10 % derjenigen Zellen, für welche eine BFP-Expression und damit indirekt eine HLA-BFP-Expression nachweisbar war, wurden anschließend in 6-well Platten mit je 3 ml vorgewärmtem RPMI-G/Well sortiert. Das Sortieren der Zellen wurde von Markus Utzt (Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, AG

Dornmair) mit einem BD FACSAria™ Fusion (BD Biosciences) an der Core Facility-Durchflusszytometrie (Biomedizinisches Centrum, Ludwig-Maximilians-Universität München) durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend bis zu einer gewissen Zelldichte weiterkultiviert, sodass Aliquots eingefroren werden konnten (2.3.6).

2.5 T-Zell-Aktivierungsassay

2.5.1 CD3-Aktivierung

Die Aktivierbarkeit der TCR-transfizierten $58\alpha^{-}\beta^{-}$ T-Zell-Hybridome wurde durch eine CD3-Aktivierung getestet. Hierfür wurden 1 μ l anti-mCD3 ϵ Antikörper (0,5 mg/ μ l; Klon 145-2C11, Hamster IgG, eBiosciences) in ein Well einer 96-well Platte mit 150 μ l PBS vorgelegt und für 3 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Entfernen der Lösung wurden 200 μ l T-Zellsuspension in das gecoatete Well überführt und für 16 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die Bindung des Antikörpers an die ϵ -Domäne des CD3-Rezeptors löst hierbei eine Signalkaskade aus, welche zu einer Aktivierung der $58\alpha^{-}\beta^{-}$ T-Zell-Hybridome und einer anschließenden Expression von sGFP führt. In ein weiteres leeres Well wurden zusätzlich 200 μ l Zellsuspension als Negativkontrolle überführt, wodurch die Hybridome auch auf eine Autoaktivierung überprüft werden konnten. Nach der Inkubation wurden die Zellen durch Detektion der sGFP-Expression mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 M, Zeiss, EGFP-Kanal, 5x-fache Vergrößerung) auf eine T-Zell-Aktivierung untersucht.

2.5.2 Co-Kultivierung mit transfizierten COS-7-Zellen

24 bzw. 48 h nach der Transfektion der antigenpräsentierenden COS-7-Zellen wurden die Zellen mit den IP2-T-Zell-Hybridomen co-kultiviert. Hierfür wurde aus den 3,5 cm-Schalen das Medium abgenommen und die adhärennten Zellen wurden zweimal mit frischem, vorgewärmtem RPMI-co gewaschen. Um ein zu starkes Hintergrundsignal während des Screenings mit dem Fluoreszenzmikroskop durch Autofluoreszenz des Mediums (Stadtfeld et al., 2005) zu vermeiden, wurden in die Schalen daraufhin je 2 ml frisches, vorgewärmtes

RPMI-co ohne Phenolrot hinzugegeben. Nach einer fünfminütigen Zentrifugation bei 300 g und 4 °C wurden die Hybridome in RPMI-co ohne Phenolrot resuspendiert, gezählt und auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ c/ml eingestellt. Pro Schale wurde anschließend 1 ml Zellsuspension durch gleichmäßiges Tropfen über die COS-7-Zellen verteilt.

Die Co-Kultivierung der Subpools in 24-well Platten erfolgte analog zur jener in 3,5 cm-Schalen. Nach zweimaligem Waschen der COS-7-Zellen wurde 1 ml frisches RPMI-co ohne Phenolrot in jedes Well hinzugegeben und die Zellen wurden mit jeweils 240.000 T-Zell-Hybridomen in 500 µl Medium co-kultiviert.

Die Schalen bzw. Platten wurden anschließend bis zum Screening bei 37 °C und 5 % CO₂ im Inkubator kultiviert.

2.5.3 Mikroskopie und Entnahme von T-Zell-aktivierenden COS-7-Zellen

16 h nach der Co-Kultivierung mit COS-7-Zellen wurden die T-Zell-Hybridome mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops (Axiovert 200 M, Zeiss) und dem Programm ZEN 2.5 Pro (Zeiss) auf eine Aktivierung untersucht. Das Hauptaugenmerk lag hierbei auf Cluster von mindestens drei grün-fluoreszierenden Hybridomen, da hierdurch die versehentliche Entnahme von COS-7-Zellen, welche nicht das gesuchte Antigen exprimieren, verhindert werden konnte. Mit einer an einem Mini 25 Mikromanipulator (Luigs & Neumann) befestigten Glaskapillare (Durchmesser 15 µm, Eppendorf) wurde die unter dem T-Zell-Cluster liegende COS-7-Zelle vorsichtig vom Boden der Schale abgelöst und mithilfe eines CellTram Vario Microinjektors (Eppendorf) in die Kapillare gesaugt. Durch sehr leichtes Antippen der Schale wurde hierbei überprüft, ob die Hybridome an die antigenpräsentierende Zelle gebunden haben oder sich nur zufällig über ihr befanden. Zusätzlich wurde darauf geachtet, nur eine einzelne COS-7-Zelle abzusaugen, da bei einem versehentlichen Einsaugen weiterer Zellen das antigencodierende Plasmid verdünnt werden würde. Unmittelbar nach der Entnahme wurde die Zelle in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 7 µl DEPC-Wasser überführt und für 5 min bei 80 °C inkubiert, um durch eine Denaturierung der zellulären DNase den Verdau von Library-DNA zu verhindern. Anschließend wurde das Tube bis zur nachfolgenden PCR auf Eis gestellt.

2.5.4 Subpool-Screening

Die in 24-well Platten co-kultivierten T-Zell-Hybridome wurden automatisch mithilfe des Programms ZEN Pro (Zeiss) auf eine Aktivierung mit dem Fluoreszenzmikroskop gescannt.

2.6 Molekularbiologische Methoden

2.6.1 DNA-Präparation

2.6.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Isolation von DNA erfolgte mit dem Qiaprep® Spin Miniprep Kit, dem QIAGEN® Plasmid Midi Kit und dem QIAGEN® Plasmid Maxi Kit (Qiagen) anhand der Firmenprotokolle. Die Plasmid-DNA wurde jeweils in 35 µl EB-Puffer (Qiagen) eluiert und anschließend bei -20 °C aufbewahrt.

2.6.1.2 Ethanol-Präzipitation von DNA

Die Aufreinigung und Aufkonzentration von DNA wurde über eine Ethanol-Präzipitation durchgeführt. Hierfür wurden der DNA 1 µl Glykogen (20 mg/ml, Roche) zugegeben, welches als DNA-Carrier verwendet wurde und für eine höhere Ausbeute während der Präzipitation sorgte. Nach der Zugabe von 2 µl Pellet Paint® (Novagen) wurden der DNA 10 % (v/v) Natriumacetat (Novagen) und 250 % (v/v) Ethanol hinzupipettiert und der Ansatz wurde für mindestens 30 min bei -80 °C inkubiert. Nachdem die Mischung anschließend für 1 h bei 14.000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde, wurde das nun vorhandene und gefärbte Pellet zweimal mit 200 µl 80 %-igem (v/v) Ethanol gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Wurde die präzipitierte DNA für eine Transformation in *E. coli* verwendet, so wurde das Pellet in 2 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Plasmid-DNA, welche für die Transfektion von eukaryotischen Zellen benötigt wurde, wurde hingegen in 35 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.6.1.3 Agarose-Gelelektrophorese und Gelextraktion

Die Größe von Plasmiden und kleineren DNA-Fragmenten wurde mittels Agarosegelelektrophorese bestimmt. Es wurden abhängig von der Größe der zu untersuchenden DNA 2%-ige bzw. 0,8%-ige Gele in 1x TBE-Puffer hergestellt. Für die Detektion der DNA wurden für kleine Gele (in 50 ml TBE-Puffer) 3 µl, für große Gele (in 250 ml TBE-Puffer) 12 µl peqGREEN (Peqlab) hinzugegeben. Nachdem die DNA-Proben vor dem Beladen des Gels mit einer entsprechenden Menge an 6x DNA-Probenpuffer vermischt wurden, erfolgte die Elektrophorese für 30 min bei 120 V (Power Supply LKB 3000/150, Pharmacia). Zusätzlich wurden je nach DNA-Größe 10 µl peqGOLD DNA-Leiter (50-1000 bp, Peqlab) bzw. 1 kb DNA-Ladder (500-10000 bp, New England Biolabs) als Marker verwendet. Die Dokumentation und Auswertung erfolgte mit einem Quantum ST5 Imager (Vilber) und mit dem Programm Vision Capt (Vilber). Wurde eine Gelextraktion eines aufgetrennten DNA-Fragmentes durchgeführt, so wurde hierfür die entsprechende Bande über einem UV-Transilluminator (UVT-14 SE, Roth) mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die DNA wurde anschließend mithilfe des QIAquick® Gel Extraction Kits (Qiagen) aus dem Gel isoliert und in 30 µl EB-Puffer eluiert.

2.6.1.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte dem Herstellerprotokoll entsprechend über Nanodrop (Nanodrop 2000, Thermo Scientific).

2.6.2 Klonierung

2.6.2.1 Klonierung HLA-BFP-codierender Vektoren

Um eine höhere Effizienz bei der Antigenpräsentation von COS-7-Zellen zu erzielen, wurden diese stabil mit dem jeweiligen HLA transfiziert. Da für die meisten HLAs keine kommerziellen Antikörper verfügbar sind, wurde ein HLA-BFP-Fusionsprotein konstruiert. Durch Detektion der BFP-Expression konnte anschließend per FACS-Sorting (2.4.5) indirekt die HLA-Expression der Zellen kontrolliert werden, wodurch eine Anreicherung positiver, HLA-exprimierender Zellen gewährleistet werden konnte. Diese Methode wurde von Julia Hansen (Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, AG Dornmair) etabliert und beschrieben (Hansen, 2021). Durch eine PCR wurde hierfür die für das jeweilige HLA codierende Sequenz aus dem Ausgangsplasmid pHSE3' amplifiziert und durch eine NotI-Schnittstelle am 3'-Ende ergänzt. Der Vektor pHSE3'-HLA-C*07:02-BFP (Hansen, 2021) wurde nach einem Sall/NotI-Verdau über ein Agarosegel gereinigt und diente nach einer Gelextraktion als Expressionsvektor (pHSE3'-BFP_Sall/NotI). Nachdem die amplifizierte HLA-Sequenz ebenfalls durch Sall/NotI geschnitten und anschließend gereinigt wurde, wurde das Insert in den Vektor pHSE3'-BFP_Sall/NotI ligiert. Da bereits eine Zelllinie COS-7-A2 (K. Dornmair) zur Verfügung stand, welche das HLA-A*02:01 stabil exprimierte, wurde diese Methode nicht für das HLA-A*02:01 angewandt. Die Sequenzen der verwendeten und konstruierten Vektoren befinden sich im Anhang (Abbildung 31).

2.6.2.2 Klonierungsstrategie zur Anreicherung antigencodierender DNA-Sequenzen

Die antigencodierende Sequenz auf den Library-Plasmiden wurde über eine nested-PCR amplifiziert. Dadurch wurde die Wahrscheinlichkeit verringert, dass durch unspezifische Primer-Bindung eine Vervielfältigung ungewünschter Nukleotidsequenzen erfolgte. Anhand des Beispiels einer Library, welche für 8 Aminosäuren codierte bzw. 24 Nukleotide enthielt (N24-Library), wird nachfolgend die Klonierungsstrategie während des T-Zell-Aktivierungsassays erläutert:

Die N24-Library enthielt die Sequenz 5'-CACC ATG NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK NNK TGA-3', womit diese nicht komplett randomisiert war, da durch die Festlegung des dritten

Basentriplets auf die Nukleotide G bzw. T die Wahrscheinlichkeit eines Auftretens von Stopcodons verringert wurde. Upstream der Library befand sich mit der Basenabfolge CACC die Kozak-Sequenz, welche als Erkennungsstelle der Ribosomen dient.

1. Runde Picking:

Die Sequenz der N24-Library im Plasmid pcDNArc-N24 lautet:

Grün: pcDNA-for-1
Grün: pcDNA-rev-1
Blau: pcDNA-2nd-for
Grau: pcDNA-2nd-rev-10

```
...CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACC CACT  
GCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTAAGC  
TTGGTACCGAGCTCGGATCCGGCGCGCCACCATGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGAGCGGCCGCTCG  
AGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGTACCGGTC  
ATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG  
TTGTTTGCCCCTCCCCGTCCTTCCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTCT...
```

Nach der Entnahme antigenpräsentierender COS-7-Zellen und dem darauffolgenden 1. Schritt der nested-PCR mit den Primern pcDNA-for-1/pcDNA-rev-1 wurde das Produkt mit der Sequenz

```
CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTT  
AAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGGCGCGCCACCATGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGAGCGGCCG  
CTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGTACC  
GGTCATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCTTCTAGT
```

amplifiziert.

Nach der 2. PCR mit den Primern pcDNA-2nd-for/pcDNA-2nd-rev-10 wurde folgendes Produkt erhalten:

```
TCCGGCGCGCCACCATGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGAGCGGCCGCTCGAGTCTAG
```

Nach anschließendem Ascl/NotI-Verdau des PCR-Produkts ergibt sich die Sequenz:

```
CGCGCCACCATGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGAGC
```

Die restriktionsverdaute DNA wurde schließlich wieder in das Plasmid pcDNArc ligiert:

```

...CAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACC CACT
GCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTAACTTAAGC
TTGGTACCGAGCTCGGATCCGGCGCGCCACCATGNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKNNKTGAGCGGCCGCTCG
AGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTC
ATCATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCTCGACTGTGCTTCTAGTGCAGCCATCTG
TTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTCT...

```

Diese angereicherten antigencodierenden Plasmide wurden anschließend wieder in COS-7-Zellen transfiziert und auf eine erneute Aktivierung von IP2-T-Zell-Hybridomen getestet. Die Klonierungsstrategie für die N27-(9 aa) und N30-(10 aa) Library erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise.

2.6.2.3 Polymerase-Kettenreaktion

2.6.2.3.1 PCR zur Klonierung HLA-BFP-codierender Vektoren

Für die Klonierung der HLA-codierenden Sequenzen in den Vektor pHSE3'-BFP_Sal/NotI wurden diese mit einer PCR amplifiziert und eine NotI-Schnittstelle am 3'-Ende ergänzt. Die Template-DNA musste hierbei vor der PCR 1:10 verdünnt werden. Die verwendeten Primer der jeweiligen PCR sind in Tabelle 2 dargestellt. Aufgrund gleicher Nukleotidsequenzen konnten für HLAs des gleichen Isotyps identische Primer verwendet werden.

Tabelle 2: Verwendete Primer für die PCR zur Klonierung der HLAs in den Expressionsvektor pHSE3'-BFP_Sal/NotI. Aufgrund gleicher Basensequenzen konnten für HLAs des gleichen Isotyps identische Primer verwendet werden.

HLA	Forward-Primer	Reverse-Primer
HLA-A*23:01	pHSE3-HLA-A010-lead	pHSE3-HLA-A23-NotI-rev
HLA-B*35:01	pHSE3-HLA-B3501-lead	pHSE3-B27-not-rev
HLA-B*44:03	pHSE3-HLA-B3501-lead	pHSE3-B27-not-rev
HLA-C*04:01	pHSE3-HLA-C0602Sal-for	pHSE3-C0602Not1_rev
HLA-C*16:01	pHSE3-HLA-C0602Sal-for	pHSE3-C0602Not1_rev

Die PCRs erfolgten in 50 µl-Ansätzen:

5x Phusion® HF Puffer	10 µl
Phusion® DNA Polymerase	0,5 µl
10 mM dNTPs	1 µl
Forward-Primer (100 µM)	0,25 µl
Reverse-Primer(100 µM)	0,25 µl
Milli-Q-H ₂ O	37 µl
Template	1 µl
<hr/>	
	50 µl

Nach dem Pipettieren wurden die PCRs mit nachfolgendem Protokoll durchgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	1 min	
Denaturierung	98 °C	20 s	} 40 x
Primer-Annealing	62 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte mithilfe des QIAquick® PCR Purification Kits (Qiagen) gereinigt und ihre Größe durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.6.2.3.2 Nested-PCR

Der erste Schritt der nested-PCR, welcher direkt nach Entnahme der COS-7-Zellen erfolgte, wurde in 100 µl-Ansätzen durchgeführt. Dadurch wurde eine ausreichende Menge an Puffer und Primern gewährleistet, da einerseits die Menge an Template-DNA unbekannt war und andererseits auch etwas Öl bei der Überführung der entnommenen Zellen in das PCR-Tube gelangen konnte. Der nachfolgend beschriebene PCR-Ansatz wurde daher direkt in das PCR-Gefäß mit der gepickten Zelle pipettiert:

iProof™ HF Master Mix	50 µl
DEPC-Wasser	49 µl
pcDNA-for-1(100 µM)	0,5 µl
pcDNA-rev-1 (100 µM)	0,5 µl
<hr/>	
	100 µl

Nachdem der Ansatz kurz hochzentrifugiert wurde, erfolgte die PCR nach folgendem Schema:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	1 min	} 40 Zyklen
Primer-Annealing	53 °C	1 min	
Elongation	72 °C	1 min	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Vor der zweiten PCR wurden die Picks durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft. War eine gut sichtbare Bande auf dem Gel auffindbar, so wurde für den entsprechenden Pick die Template-DNA für den zweiten Schritt der nested-PCR 1:100 verdünnt. Die zweite PCR wurde in 50 µl-Ansätzen durchgeführt und erfolgte mit den Primern pcDNA-2nd-for/pcDNA-2nd-rev-10:

iProof™ HF Master Mix	25 µl
DEPC-Wasser	23,5 µl
pcDNA-2 nd -for (100 µM)	0,25 µl
pcDNA-2 nd -rev-10 (100 µM)	0,25 µl
Template	1 µl
<hr/>	
	50 µl

Die PCR wurde nach folgendem Protokoll ausgeführt:

Schritt	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	3 min	
Denaturierung	98 °C	20 s	} 40 Zyklen
Primer-Annealing	56 °C	20 s	
Elongation	72 °C	30 s	
Finale Elongation	72 °C	10 min	
	4 °C	∞	

Die amplifizierte DNA wurde im Anschluss an die PCR über eine Ethanol-Präzipitation gereinigt und in 50 µl EB-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde die Größe der PCR-Produkte durch eine Agarosegelelektrophorese überprüft.

2.6.2.4 Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen

Plasmide und PCR-Produkte wurden mithilfe von Restriktionsenzymen geschnitten. Der Verdau erfolgte hierbei dem Herstellerprotokoll entsprechend jeweils bei 37 °C für 1,5 h. Die durch das Schneiden von PCR-Produkten gebildeten Oligonukleotide wurden nach einer kurzen Zentrifugation auf 6000 rpm mithilfe des QIAquick® Nucleotide Removal Kits (Qiagen) entfernt. Die gereinigte DNA wurde anschließend in 50 µl EB-Puffer eluiert.

Da durch die geringe Größe der Peptid-Library das PCR-Produkt nach der nested-PCR nur 62-68 bp groß war, wurde bei diesem der Restriktionsverdau schrittweise durchgeführt. Nach dem Ascl-Verdau der DNA wurde daher das Restriktionsenzym für 30 min bei 80 °C hitzeinaktiviert bevor mit dem NotI-Verdau des PCR-Produktes begonnen wurde.

2.6.2.5 Dephosphorylierung und Ligation von Plasmiden

Das Ascl/NotI-verdaute PCR-Produkt, welches die angereicherte Peptid-Library enthielt, wurde mithilfe des Rapid DNA Dephos & Ligation Kit der Firma Roche in den Vektor pcDNARc-spacer ligiert. Hierfür wurde der zuvor ebenfalls Ascl/NotI-geschnittene Vektor dephosphoryliert und über ein Agarosegel mit anschließender Gelextraktion (2.6.1.3) gereinigt. Die Ligation erfolgte bei einem molaren Verhältnis des Vektors zur Insert-DNA von 1:5 in 20 µl-Ansätzen nach dem Herstellerprotokoll. Die Reaktion wurde nach einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur für 48 h bei 16 °C durchgeführt und das ligierte Plasmid wurde anschließend per Ethanol-Präzipitation gereinigt (2.6.1.2).

Die Ligation der HLA-codierenden Sequenzen in den Vektor pHSE3'-BFP_Sall/NotI erfolgte analog zur oben beschriebenen Vorgehensweise. Das molare Verhältnis des Vektors zum Insert betrug hierbei 1:4.

2.6.2.6 Zero-Blunt-Klonierung

Die Analyse von PCR-Produkten nach Auftragung auf Agarosegelen erfolgte über die Klonierung in den Vektor pCR™-Blunt II-TOPO™. Hierfür wurden im ersten Schritt die entsprechenden Banden aus den Gelen geschnitten und die PCR-Produkte extrahiert (2.6.1.3). Anschließend wurde die extrahierte DNA mithilfe des Zero Blunt™ TOPO™ PCR Klonierungskits (Invitrogen) dem Herstellerprotokoll entsprechend in den Vektor pCR™-Blunt II-TOPO™ ligiert, durch Heatshock in *E. coli* TOP10 transformiert (2.2.1.1), auf LB-Kan-Platten (50 µg/ml) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem am nächsten Tag pro untersuchter Bande zwei Bakterienklone von den Platten entnommen und über Nacht in 3 ml LB-Kan in 15 ml-Falcons (50 µg/ml) hochgewachsen wurden, wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert (2.6.1.1). Nach Konzentrationsbestimmung der DNA mittels Nanodrop wurden die Plasmide mit den Primern M13-for und M13-rev (Invitrogen) sequenziert.

2.6.2.7 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten durch den Sequenzierservice der Ludwig-Maximilians-Universität München. Hierfür wurden zu 200-300 ng Plasmid-DNA 1 µl des 1:30 verdünnten Primers (3,3 µM) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und auf 7 µl mit Milli-Q-H₂O aufgefüllt. Die Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm Chromas 2.6.2 (Technelysium Pty. Ltd.) ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchungen der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R

3.1.1 Die rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R ist abhängig von der Zusammensetzung der α_1/β_3 -Untereinheiten

Um zu ermitteln, unter welchen Bedingungen die höchsten Expressionslevel von GABA_A-R erreicht werden können, wurde zuerst die Zeitabhängigkeit der Expression nach der Transfektion untersucht (Abbildung 10). 72 h nach Transfektion der Expi293F™-Zellen mit den Expressionsplasmiden pTriEx-1-GABA_AR-A1 und pTriEx-1-GABA_AR-B3 konnte mit einem Anteil von 70,2 % die höchste Anzahl an positiven Zellen ermittelt werden, nach 96 h lag dieser bei 69,1 %. 48 h nach der Transfektion wurde mit einem Anteil von 60,6 % positiver Zellen die geringste Expression von GABA_A-R- α_1/β_3 nachgewiesen. Für Zellen, welche entweder nur die α_1 - oder die β_3 -Untereinheit des Rezeptors exprimierten, konnte keine rAb-IP2-Bindung nachgewiesen werden. Auch für Expi293F™, welche mit dem Kontrollplasmid pcDNA-GFP transfiziert wurden, konnte keine Bindung von rAb-IP2 gezeigt werden.

Der Einfluss der Zusammensetzung des GABA_A-Rezeptors an der rAb-IP2-Bindung wurde durchflusszytometrisch anhand von Expi293F™-Zellen untersucht, welche mit verschiedenen molaren Verhältnissen der GABA_A-R-Untereinheiten α_1/β_3 transfiziert wurden. Hierbei konnte wieder nur für jene Zellen eine Bindung durch rAb-IP2 detektiert werden, welche beide GABA_A-R-Untereinheiten exprimierten (Abbildung 11). Der Anteil positiver Zellen lag hierbei zwischen 40,7 und 57,3 %, wobei der letztere bei einem $\alpha_1:\beta_3$ -Verhältnis von 0,6:0,4 nachgewiesen wurde. Für den getesteten kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper (Klon BD24, Mouse IgG, Merck Millipore) wurde mit 47,3 % bei einem Verhältnis von 0,4:0,6 der höchste Anteil an gefärbten Zellen nachgewiesen. Für den kommerziellen anti-GABA_A- β_2/β_3 -Antikörper (Klon 62-3G1, Mouse IgG, Merck Millipore) lag dieser höchste Anteil mit 41,7 % bei einem $\alpha_1:\beta_3$ -Verhältnis von 0,6:0,4. Zudem war dieser Antikörper als einziger der getesteten in der Lage, an Zellen zu binden, welche nur die β_3 -Untereinheit exprimierten. Für Expi293F™, welche nur die α_1 -Untereinheit exprimierten, konnten von keinem der

getesteten Antikörper eine Bindung nachgewiesen werden. Für den Kontrollantikörper rOCB-MS3-s1 konnte keine Bindung an GABA_A-R-exprimierenden Zellen detektiert werden.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Zellen, welche 72 h nach der Transfektion auf eine rAb-IP2-Bindung untersucht wurden, ähneln jenen, welche nach 48 h untersucht wurden, und befinden sich im Anhang (Abbildung 34). Der höchste Anteil positiver Zellen wurde hierbei bei einem α_1 : β_3 -Verhältnis von 0,4:0,6 (59,7 %) nachgewiesen, ebenso für den kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper (45,4 %). Für anti-GABA_A- β_2 / β_3 lag dieser Anteil bei ca. 33 % und wurde bei α_1 : β_3 -Verhältnissen von 0,6:0,4, 0,2:0,8 und 0:1 detektiert.

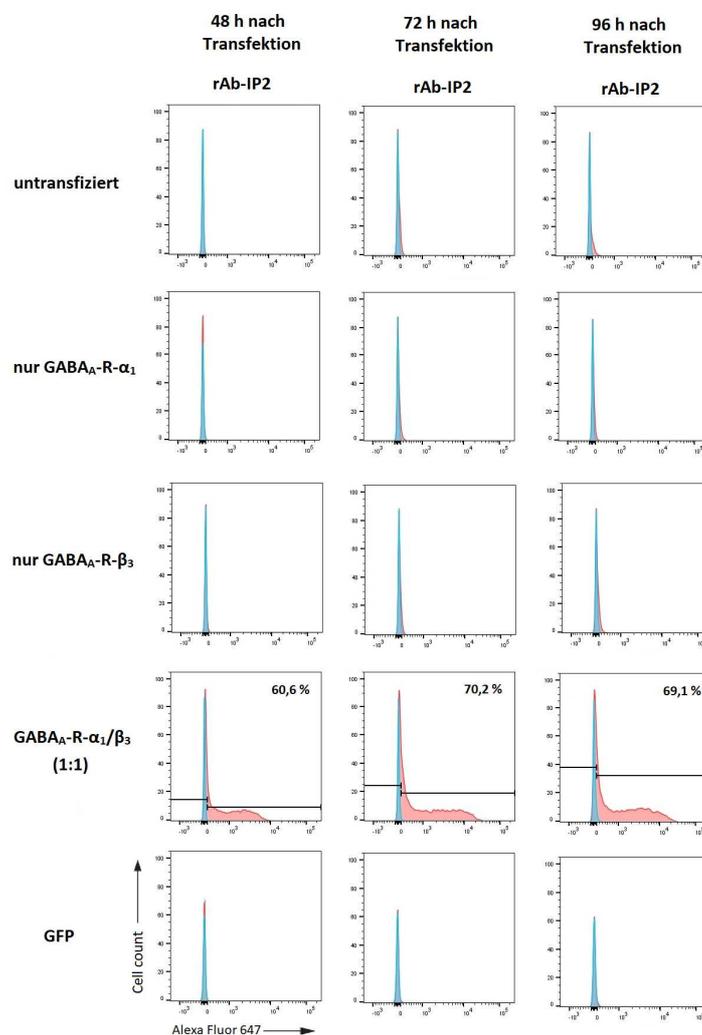


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R- α_1 , GABA_A-R- β_3 und GABA_A-R- α_1 / β_3 , welche transient in Expi293F™ Zellen exprimiert wurden. Die Bindung von rAb-IP2 wurde 48 h, 72 h und 96 h nach der Transfektion untersucht und konnte nur bei Zellen nachgewiesen werden, welche beide Untereinheiten des GABA_A-Rezeptors exprimierten. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: mit rAb-IP2 inkubierte Zellen. GFP: pcDNA-GFP-transfizierte Expi293F™ Zellen.

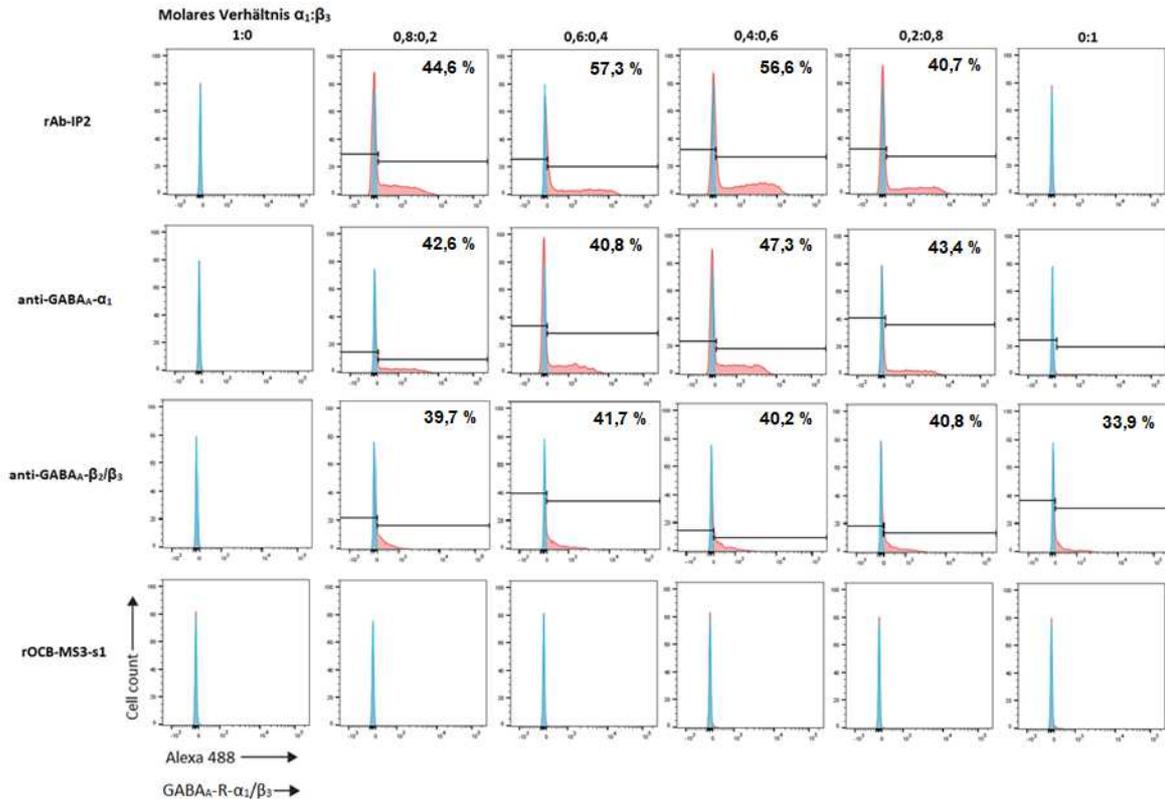


Abbildung 11: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R, 48 h nach der Transfektion. Es wurden verschiedene molare Verhältnisse der Untereinheiten α_1 und β_3 in Expi293F™ Zellen exprimiert und auf eine Bindung durch rAb-IP2 untersucht. Nur bei Zellen, welche beide Untereinheiten von GABA_A-R exprimierten, konnte eine Erkennung durch rAb-IP2 bzw. den kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper (Klon BD24, Mouse IgG, Merck Millipore) nachgewiesen werden. Zellen, welche nur die β_3 -Untereinheit exprimierten, konnten nur durch den kommerziellen anti-GABA_A- β_2/β_3 -Antikörper (Klon 62-3G1, Mouse IgG, Merck Millipore) erkannt werden. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper. Teile dieser Abbildung sind in Brändle et al. (2021) enthalten.

3.1.2 Untersuchung der Zn²⁺-Abhängigkeit für die rAb-IP2-Bindung

Die Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses der Zn²⁺-Konzentration an der rAb-IP2-Bindung sind in den Abbildungen 12 (30 min Inkubationszeit mit EDTA) und 13 (4 h Inkubationszeit mit EDTA) dargestellt. Für Expi293F™ Zellen, welche für 30 min in FACS-Puffer mit EDTA inkubiert wurden, sank der Anteil positiver Zellen von 48,2 % (0 μ M EDTA) mit steigender EDTA-Konzentration, d. h. sinkender Zn²⁺-Konzentration, auf 36,6 % (5 μ M EDTA), stieg jedoch anschließend auf 52,1 % an (50 μ M).

Für den kommerziellen anti-GABA_A-α₁-Antikörper (Klon BD24, Mouse IgG, Merck Millipore) konnte ein ähnlicher Trend ermittelt werden, auch hier sank der bei 0 μM EDTA vorliegende Anteil positiver Zellen von 47,7 % auf 34,8 % (5 μM EDTA), stieg anschließend jedoch wieder auf 46,4 % (10 μM) an. Für höhere EDTA-Konzentrationen änderte sich der Anteil positiver Expi293F™ Zellen hingegen kaum und lag zwischen 44,6 und 46,4 %.

Es konnten für den kommerziellen anti-GABA_A-β₂/β₃-Antikörper (Klon 62-3G1, Mouse IgG, Merck Millipore) sowohl für unbehandelte Zellen (6,68 % positive Zellen) als auch für Zellen, welche in FACS-Puffer mit EDTA inkubiert wurden, nur sehr geringe Anteile positiver Zellen nachgewiesen werden. Der höchste Anteil lag hierbei mit 14,2 % bei 5 μM EDTA, sank aber ebenfalls anschließend wieder ab. Ab einer Konzentration von 25 μM EDTA konnten keine GABA_A-R-exprimierenden Zellen durch den anti-GABA_A-β₂/β₃-Antikörper erkannt werden.

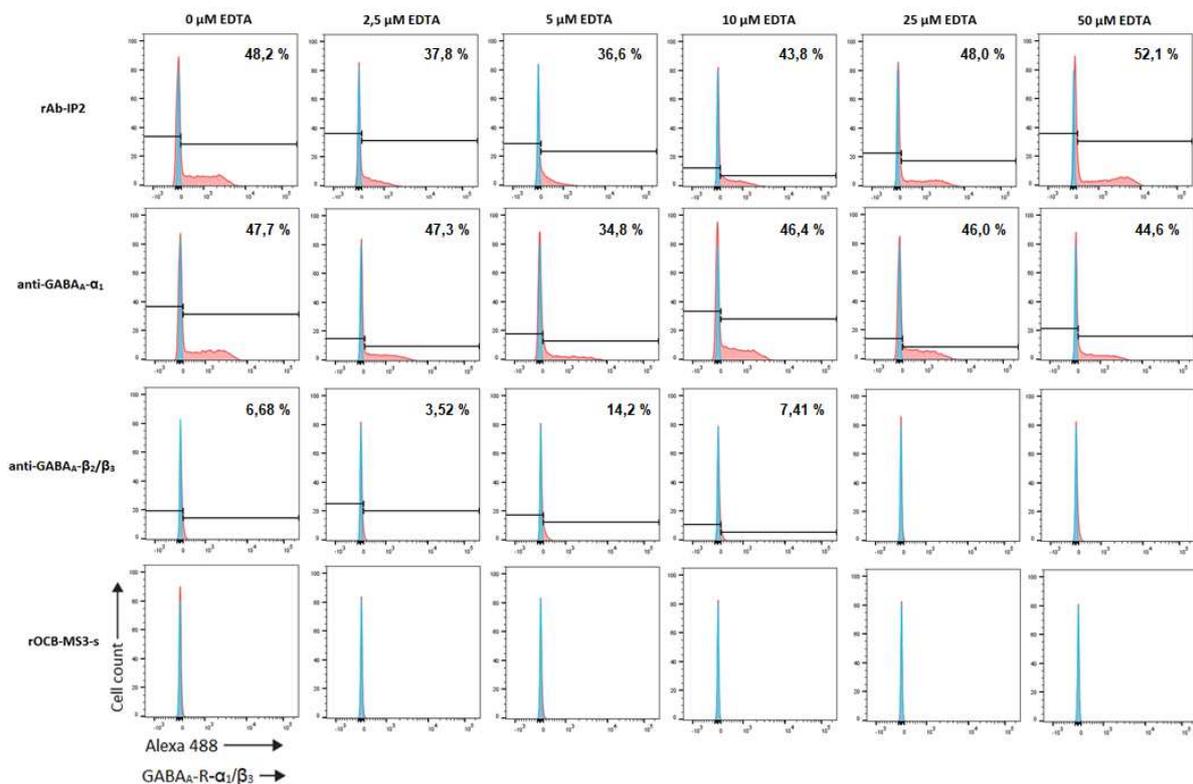


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R, 48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden vor der Analyse für 30 min in FACS-Puffer mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen inkubiert und anschließend auf eine Bindung durch rAb-IP2 untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der EDTA-Konzentration auf die Bindung der kommerziellen Antikörper anti-GABA_A-α₁ bzw. anti-GABA_A-β₂/β₃ untersucht. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper.

Für GABA_A-R-transfizierte Expi293F™-Zellen, welche für 4 h mit EDTA inkubiert wurden (Abbildung 13), stieg der anfängliche Anteil von 46,7 % positiver Zellen (0 μM EDTA) bei 2,5 μM EDTA auf 56,5 % und sank für höhere Konzentrationen wieder auf 44,1 % ab (50 μM). Für mit 5 μM EDTA inkubierte Zellen konnte aus unbekanntem Gründen keine Bindung durch rAb-IP2 nachgewiesen werden. Ebenso konnte für alle untersuchten EDTA-Konzentrationen keine Bindung durch den kommerziellen anti-GABA_A-β₂/β₃-Antikörper ermittelt werden. Die Bindung des kommerziellen anti-GABA_A-α₁-Antikörpers an GABA_A-R lag bei allen untersuchten EDTA-Konzentrationen zwischen 44,0 % (5 μM EDTA) und 47,7 % (0 μM EDTA) und änderte sich daher nur gering. Wie auch für Zellen, welche für 30 min in FACS-Puffer mit EDTA inkubiert wurden, konnte keine Bindung durch den Kontrollantikörper rOCB-MS3-s1 detektiert werden.

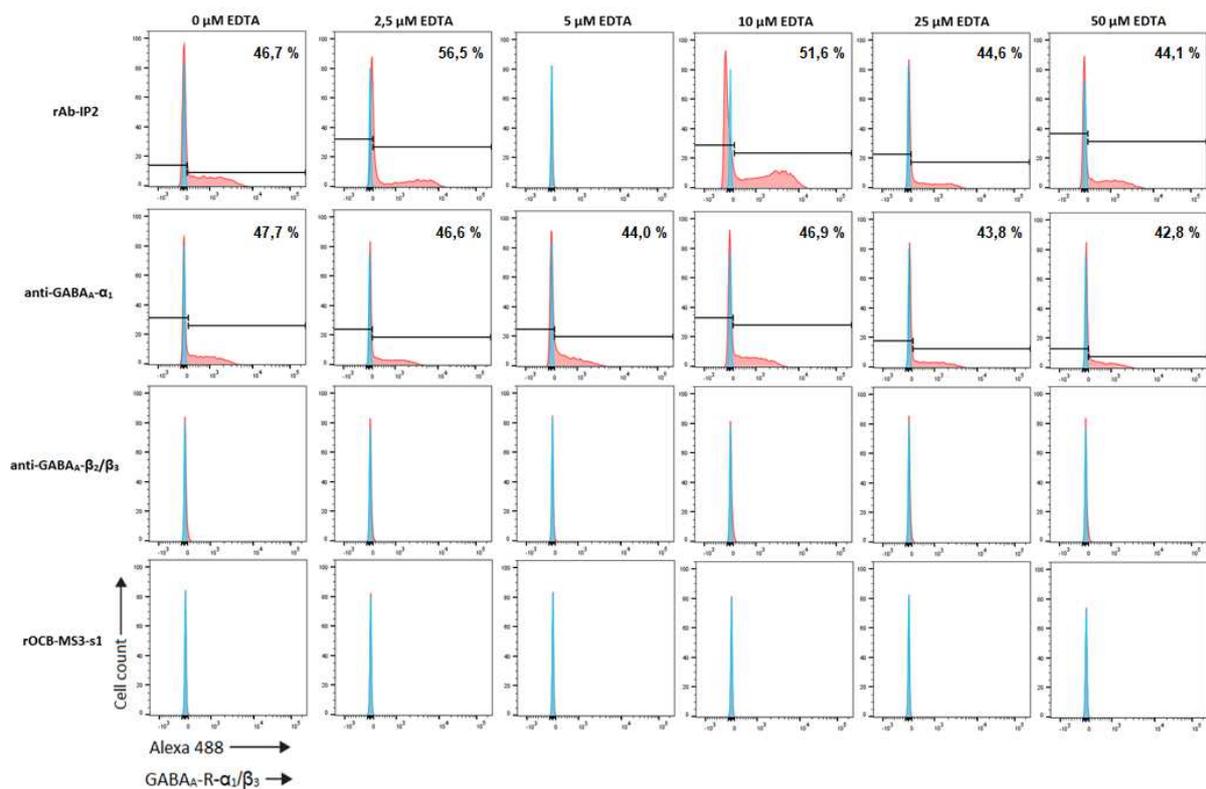


Abbildung 13: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R, 48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden vor der Analyse für 4 h in FACS-Puffer mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen inkubiert und anschließend auf eine Bindung durch rAb-IP2 untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der EDTA-Konzentration auf die Bindung der kommerziellen Antikörper anti-GABA_A-α₁ bzw. anti-GABA_A-β₂/β₃ untersucht. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper.

In einem weiteren Versuch wurde die rAb-IP2-Bindung durch die zusätzliche Analyse von mit 100 bzw. 200 μM EDTA inkubierten Zellen untersucht (Abbildung 14). Die Inkubationszeit betrug für alle Proben 30 min. Es ergab sich hierbei ein ähnlicher Trend wie schon nach der ersten Analyse der Bindung nach einer 30-minütiger EDTA-Inkubation (Abbildung 12), so wurde auch hier der geringste Anteil positiver Zellen bei 5 μM EDTA (33,4 %) nachgewiesen. Die höchsten Anteile wurden mit 86,5 bzw. 88,3 % bei Konzentrationen von 2,5 bzw. 25 μM EDTA detektiert, für die weiteren Konzentrationen lagen die Anteile positiver Zellen zwischen 49,2 % (10 μM EDTA) und 65,5 % (50 μM EDTA).

Der Anteil der durch den anti-GABA_A- α_1 -Antikörper gebundenen Zellen lag zwischen 54,2 % (25 μM EDTA) und 61,4 % (2,5 μM EDTA), wobei dieser für unbehandelte Zellen bei 73,1 % lag. Verglichen mit den vorherigen Versuchen (Abbildungen 12 und 13) wurde für alle Proben ein höherer Anteil durch anti-GABA_A- β_2/β_3 gebundener Zellen nachgewiesen, welcher zwischen 44,3 % (10 μM EDTA) und 56,6 % (200 μM EDTA) lag. Eine Bindung durch den Kontrollantikörper rOCB-MS3-s1 konnte für keine der Proben ermittelt werden.

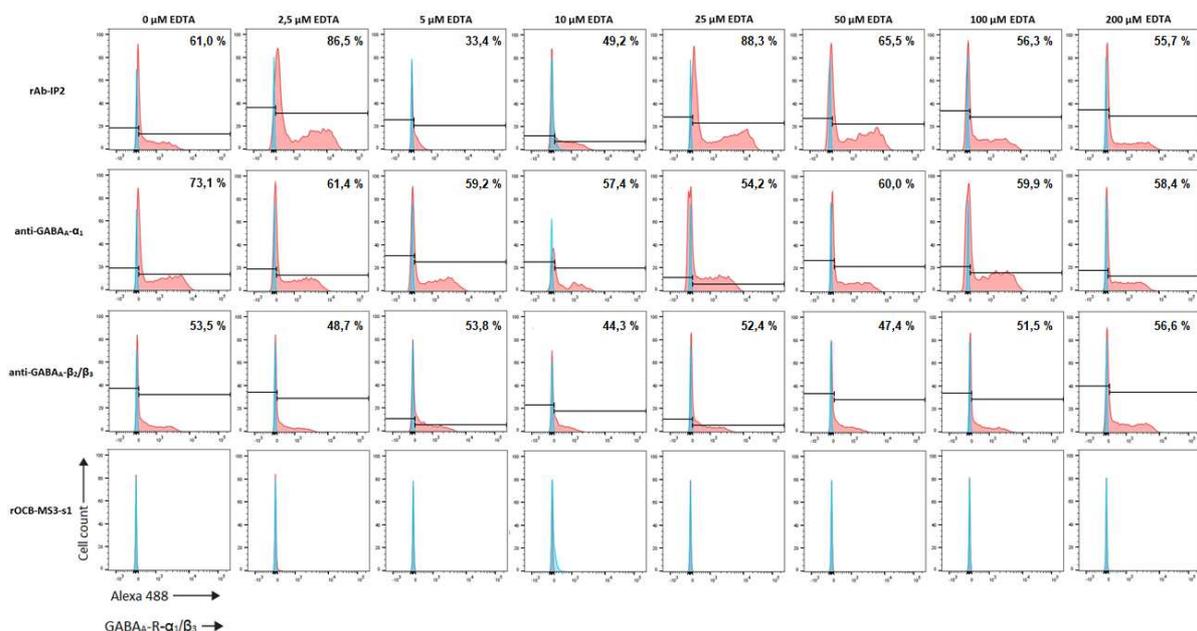


Abbildung 14: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R, 48 h nach der Transfektion. Die Zellen wurden vor der Analyse für 30 min in FACS-Puffer mit verschiedenen EDTA-Konzentrationen inkubiert und anschließend auf eine Bindung durch rAb-IP2 untersucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der EDTA-Konzentration auf die Bindung der kommerziellen Antikörper anti-GABA_A- α_1 bzw. anti-GABA_A- β_2/β_3 untersucht. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper.

3.2 Untersuchung der rAb-hAE-Bindung an hMOG

3.2.1 Der Antikörper rAb-hAE erkennt hMOG

Da für den Antikörper rAb-hAE eine Bindung an Myelin nachgewiesen werden konnte (Beltrán et al., 2021) und MOG-spezifische Antikörper für eine Vielzahl von demyelinisierenden Erkrankungen aufgefunden werden können (Mayer et al. 2013), wurde rAb-hAE auf eine mögliche Bindung an human MOG (hMOG) untersucht. Hierfür wurde der Antikörper in Konzentrationen von 100/30/10/3,33/1/0,33/0,1/0,033 µg/ml zu hMOG-exprimierenden COS-7-Zellen gegeben und anschließend per Durchflusszytometrie untersucht (2.4.4.1). Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für Zellen, welche 72 h nach der Nukleofektion analysiert wurden, sind in Abbildung 15 dargestellt. Es konnte hierbei für alle untersuchten Antikörper-Konzentrationen eine Bindung an hMOG nachgewiesen werden, welche jedoch mit absinkender rAb-hAE-Konzentration abnahm. Für Konzentrationen von 100/30/10/3,33/1/0,33 µg/ml lag der Anteil positiver Zellen bei nahezu 100 %, wobei bei einer rAb-hAE-Konzentration von 0,33 µg/ml bereits ein geringerer Shift im Histogramm nachgewiesen werden konnte. Dieser reduzierte Shift trat ebenfalls bei einer Konzentration von 0,1 µg/ml auf, wodurch der Anteil positiver Zellen bei nur noch 96,6 % lag. Eine rAb-hAE-Konzentration von 0,033 µg/ml führte nur noch zu einem Anteil von 62 % positiver Zellen, welcher sich im Histogramm durch einen noch weiter reduzierten Shift ausdrückte. Für den Kontrollantikörper r8-18C5 konnte für beinahe jede der untersuchten Konzentrationen ein Anteil von ca. 100 % positiver Zellen ermittelt werden, lediglich bei einer Antikörper-Konzentration von 100 µg/ml lag der Anteil positiver Zellen nur bei 84,4 %.

Für Zellen, welche 48 h nach der Transfektion analysiert wurden, konnte ebenfalls eine rAb-hAE-Bindung an hMOG nachgewiesen werden. Hierbei konnte ebenfalls ab einer Antikörper-Konzentration von 0,33 µg/ml ein geringerer Shift ermittelt werden, welcher sich für geringere Antikörper-Konzentrationen weiter verringerte und schließlich bei einer Konzentration von 0,033 µg/ml zu einem geringeren Anteil positiver Zellen (89,8 %) und damit zu einer schlechteren Bindung von rAb-hAE führte. Die Ergebnisse dieses Versuchs befinden sich im Anhang (Abbildung 36).

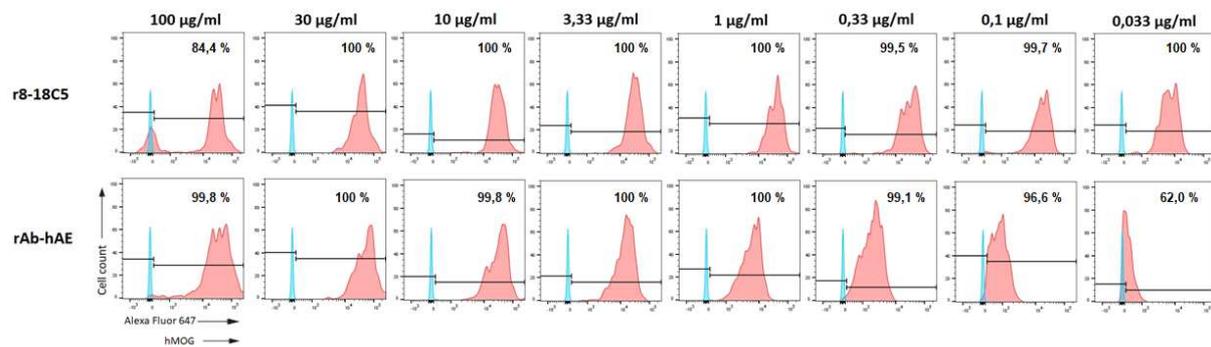


Abbildung 15: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an human MOG (hMOG), 72 h nach der Transfektion. Der Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den COS-7-Zellen gegeben und auf eine Bindung an hMOG untersucht. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle der Antikörper r8-18C5 in den entsprechenden Konzentrationen auf eine hMOG-Bindung analysiert. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. Teile dieser Abbildung sind in Beltrán et al. (2021) enthalten.

3.2.2 Identifizierung des rAb-hAE-Epitops von hMOG

Für die Identifizierung des rAb-hAE-Epitops wurden MOG-Mutanten in COS-7 exprimiert, per Durchflusszytometrie analysiert und mit der rAb-hAE-Bindung an Full Length hMOG (human MOG) verglichen. Um die rAb-hAE-Bindung an MOG mit einer weiteren Zelllinie zu untersuchen, wurden die MOG-Mutanten ebenfalls in HeLa-Zellen exprimiert und analysiert. Neben den MOG-Mutanten N31D, R9G/H10Y, P42S, R86Q, S104E und H103A/S104E wurden hierbei auch mouse MOG (mMOG) und rat MOG (rMOG) auf eine rAb-hAE-Bindung getestet. Abbildung 16 zeigt die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für COS-7-Zellen, welche 72 h nach der Nukleofektion analysiert wurden. Sowohl für rAb-hAE als auch r8-18C5 konnte im Vergleich zur hMOG-Bindung keine signifikant geringere Bindung an mMOG, rMOG und die MOG-Mutanten N31D, R9G/H10Y und P42S nachgewiesen werden, da der Anteil positiver Zellen für diese Proben jeweils zwischen 93,1 % und 98,4 % betrug. Für die MOG-Mutanten R86Q und S104E konnten jedoch nur 78,7 % bzw. 78,8 % an Zellen nachgewiesen werden, welche von rAb-hAE erkannt wurden. Noch stärker war dieser Effekt für die Doppelmutante H103A/S104E zu beobachten, da der Anteil positiver COS-7-Zellen auf 21,5 % sank und nur noch ein sehr schwacher Shift aufgefunden werden konnte. Für den Antikörper r8-18C5 konnte bei dieser Doppelmutante ein ähnlicher Effekt nachgewiesen werden, hier sank der Anteil positiver Zellen aber lediglich auf 64,3 %. Ein Austausch von Arginin 86 durch Glutamin bzw. Serin 104 durch Glutamat hatte jedoch keinen Einfluss auf die r8-18C5-Bindung an

hMOG. Für den Kontrollantikörper rOCB-MS3-s1 konnte für keine der Proben eine Bindung nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen jener Zellen, welche 48 h nach der Transfektion analysiert wurden, entsprachen größtenteils diesen Resultaten und befinden sich im Anhang (Abbildung 35). Im Gegensatz zu COS-7, welche 72 h nach der Transfektion untersucht wurden, konnte hierbei für die MOG-Mutante R86Q jedoch keine geringere Bindung durch rAb-hAE nachgewiesen werden.

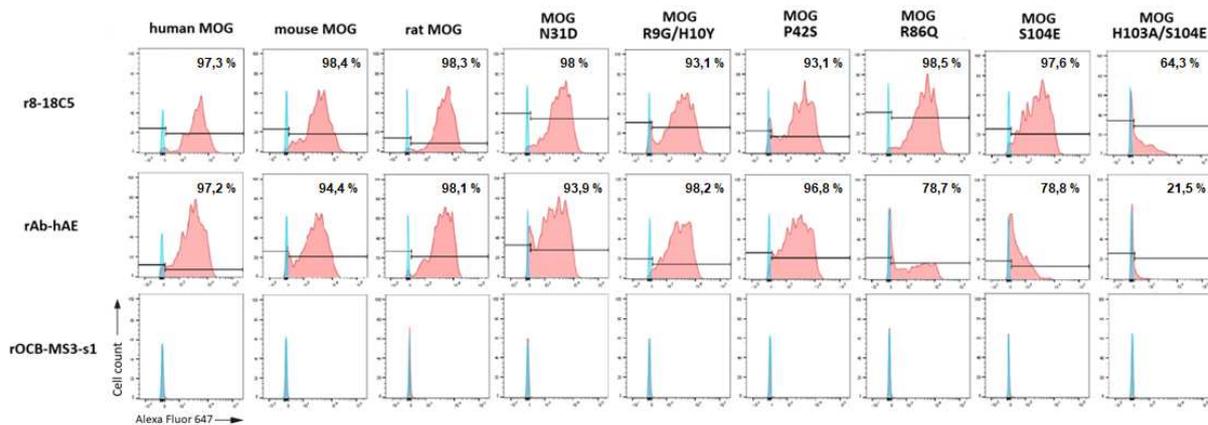


Abbildung 16: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an COS-7-Zellen, die mit humanem MOG (hMOG), mouse MOG (mMOG), rat MOG (rMOG) und MOG-Mutanten transfiziert wurden, 72 h nach der Transfektion. Zusätzlich wurde der Antikörper r8-18C5 auf eine Bindung an hMOG, mMOG, rMOG und MOG-Mutanten untersucht. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 30 µg/ml zu den Zellen gegeben. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. r8-18C5: Kontrollantikörper (Positivkontrolle). rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper. Teile dieser Abbildung sind in Beltrán et al. (2021) enthalten.

Die durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an HeLa-Zellen, welche hMOG bzw. MOG-Mutanten exprimierten, führte verglichen mit den Untersuchungen an COS-7-Zellen zu ähnlichen Ergebnissen. So konnte für Zellen, welche 72 h nach der Transfektion untersucht wurden (Abbildung 17), für die MOG-Mutante S104E eine Abnahme des Shifts ermittelt werden, wodurch nur 92,2 % der Zellen durch rAb-hAE erkannt werden konnten. Die Doppelmutante H103A/S104E führte wie bei den untersuchten COS-7-Zellen ebenfalls zu einer sehr starken Abnahme der rAb-hAE-Bindung, wodurch nur ein sehr geringer Shift und nur ein sehr geringer Anteil an positiven Zellen (1,72 %) nachgewiesen werden konnte. Für

die restlichen untersuchten MOG-Varianten bzw. Mutanten lag der Anteil positiver Zellen bei nahezu 100 %. Dies war auch für den Antikörper r8-18C5 der Fall, hier konnte nur für die Doppelmutante H103A/S104E eine Abnahme des Shifts bzw. der Antikörper-Bindung detektiert werden, wodurch nur noch 89 % der Zellen durch den Antikörper erkannt werden konnten.

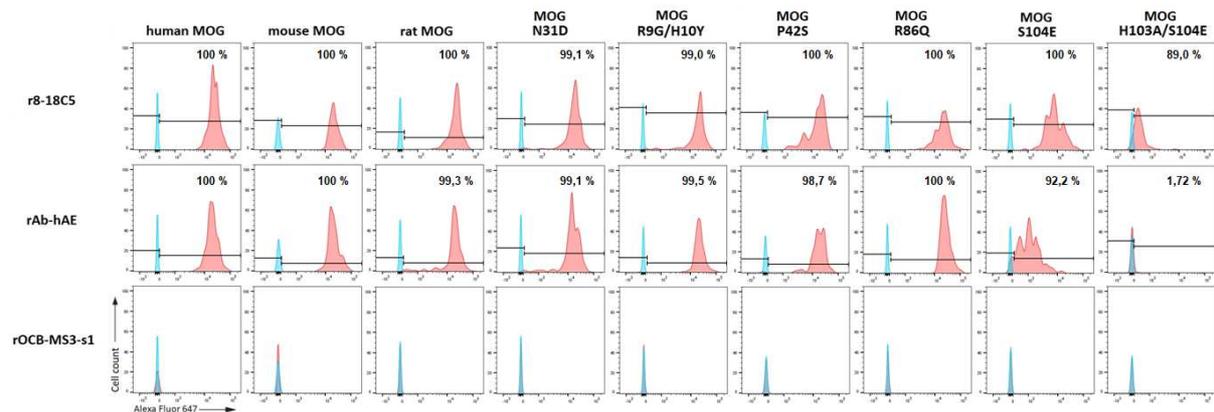


Abbildung 17: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an HeLa-Zellen, die mit humanem MOG (hMOG), mouse MOG (mMOG), rat MOG (rMOG) und MOG-Mutanten transfiziert wurden, 72 h nach der Transfektion. Zusätzlich wurde der Antikörper r8-18C5 auf eine Bindung an hMOG, mMOG, rMOG und MOG-Mutanten untersucht. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 30 µg/ml zu den Zellen gegeben. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. r8-18C5: Kontrollantikörper (Positivkontrolle). rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper.

Für HeLa-Zellen, welche 48 h nach der Transfektion auf eine Antikörper-Bindung getestet wurden (Anhang, Abbildung 37), konnte ein ähnlicher Trend nachgewiesen werden. Die Doppelmutante H103A/S104E führte auch hier für beide getesteten Antikörper zu einer starken Abnahme der MOG-Affinität (rAb-hAE: 22,4 %; r8-18C5: 92 %), während dieser Effekt für die MOG-Mutante S104E weniger stark ausgeprägt war. Der Austausch von Arginin 86 durch Glutamin führte auch hier nur zu einer leichten Abnahme der rAb-hAE-Bindung.

Um den Einfluss der einzelnen Aminosäure-Substitutionen an der hMOG-Bindung genauer zu untersuchen, wurde der Antikörper rAb-hAE in Konzentrationen von 100/30/10/3,33/1/0,33/0,1/0,033 µg/ml zu COS-7-Zellen, welche die MOG-Mutanten R86Q, S104E und H103A/S104E exprimierten, titriert und per Durchflusszytometrie auf eine Bindung analysiert (2.4.4.2). 72 h nach der Transfektion konnte für die MOG-Mutante R86Q

eine ab einer Konzentration von 0,33 $\mu\text{g/ml}$ einsetzende Abnahme der rAb-hAE-Bindung nachgewiesen werden, welche vergleichbar mit jener von hMOG war (Abbildung 18). Der Anteil positiver Zellen sank hierbei von nahezu 100 % (0,33 $\mu\text{g/ml}$) auf 59,6 % (0,033 $\mu\text{g/ml}$) bzw. für hMOG auf 62 %. Diese Abnahme konnte im Histogramm für die MOG-Mutante S104E bereits ab einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ detektiert werden, wobei der Shift der positiven Population im Vergleich zu hMOG bereits bei einer Antikörper-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ geringer war. Ab einer Konzentration von 3,33 $\mu\text{g/ml}$ war auch eine prozentuale Abnahme der positiven Population auffindbar (85,3 %). Diese Abnahme setzte sich für geringere Konzentrationen weiter fort, bis schließlich nur ein sehr geringer Anteil positiver Zellen nachweisbar war (0,033 $\mu\text{g/ml}$: 2,17 %). Eine doppelte Substitution von Histidin 103 durch Alanin und Serin 104 durch Glutamat führte zu einer starken Abnahme der rAb-hAE-Bindung an hMOG. Bereits bei einer Antikörper-Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$ konnte nur ein schwacher Shift mit einem geringeren Anteil positiver Zellen (91,8 %) nachgewiesen werden. Für geringere Konzentrationen nahm die positive Population weiter stark ab, wodurch bereits ab einer Konzentration von 0,33 $\mu\text{g/ml}$ keine Bindung von rAb-hAE mehr nachgewiesen werden konnte.

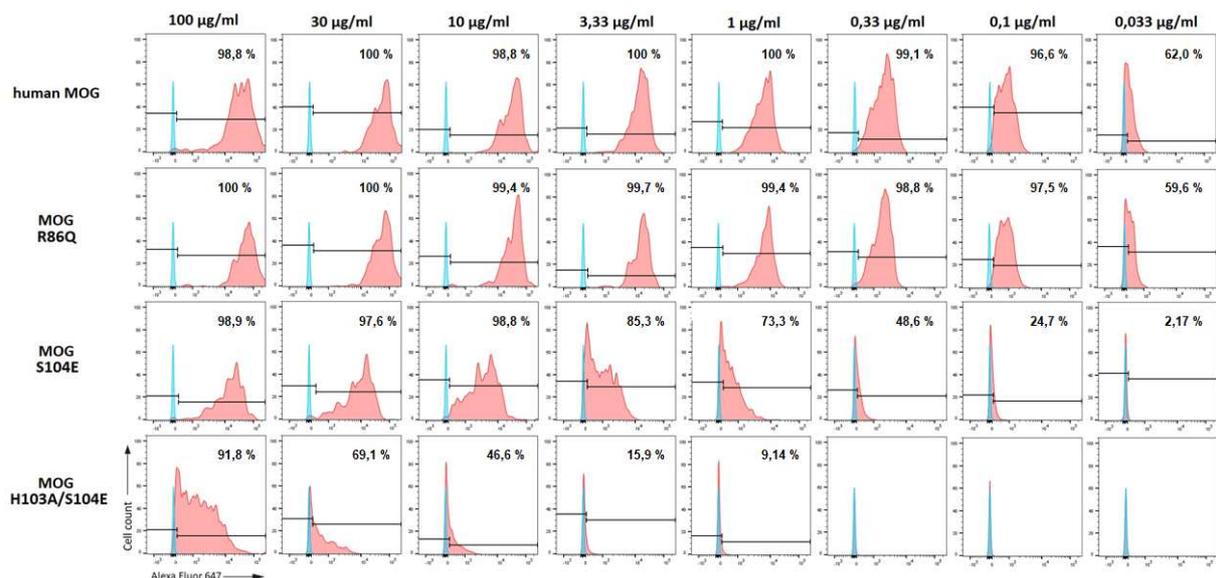


Abbildung 18: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an MOG, 72 h nach der Transfektion. Der Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den COS-7-Zellen gegeben und auf eine Bindung an hMOG bzw. die Mutanten R86Q, S104E und H103A/S104E untersucht. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. Teile dieser Abbildung sind in Beltrán et al. (2021) enthalten.

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie für COS-7-Zellen, welche 48 h nach der Transfektion analysiert wurden, ähnelten diesen Resultaten und befinden sich im Anhang (Abbildung 36). Die untersuchten Proben zeigten auch hier, dass ein doppelter Austausch der Aminosäuren Histidin 103 durch Alanin und Serin 104 durch Glutamat zu einer starken Reduktion der Affinität von rAb-hAE an hMOG führen. Die Substitution von Arginin 86 durch Glutamin bzw. Serin 104 durch Glutamat führte ebenfalls zu einer geringeren Affinität, wenngleich diese Effekte im Vergleich zur Doppelmutante H103A/S104E weniger stark ausgeprägt waren.

3.3 Mimotop-Suche durch Screening von Peptid-Libraries

3.3.1 Nachweis der CD3/CD8-Expression und CD3-Aktivierung von IP2-T-Zell-Hybridomen

Für eine erfolgreiche Mimotop-Identifizierung mithilfe von $58\alpha^{-}\beta^{-}$ Maus-T-Zell-Hybridomen, welche mit dem IP2-TCR transfiziert wurden, war ein hohes Expressionslevel des TCRs sowie des ebenfalls transfizierten humanem CD8-Corezeptors entscheidend. Um die Expression des CD3-Rezeptors bzw. des CD8-Corezeptors von IP2-T-Zell-Hybridomen quantitativ zu bestimmen, wurden diese mithilfe eines anti-mCD3 ϵ - bzw. anti-hCD8 β - Antikörpers gefärbt und per Durchflusszytometrie analysiert (2.4.2). Da eine sehr hohe Expression des CD3-Rezeptors (95,1 % positive Zellen, Abbildung 19) detektiert werden konnte, konnte dadurch indirekt auch ein hohes Expressionslevel des TCRs nachgewiesen werden. Das Expressionslevel des CD8-Corezeptors war mit einem Anteil von 99,3 % positiver Zellen ebenfalls sehr hoch.

Durch eine CD3-Aktivierung konnte die NFAT-abhängige Expression des ebenfalls transfizierten sGFP-Reporterproteins für 84,9 % der untersuchten Zellen nachgewiesen werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass ein Großteil der T-Zell-Hybridome aktivierbar war.

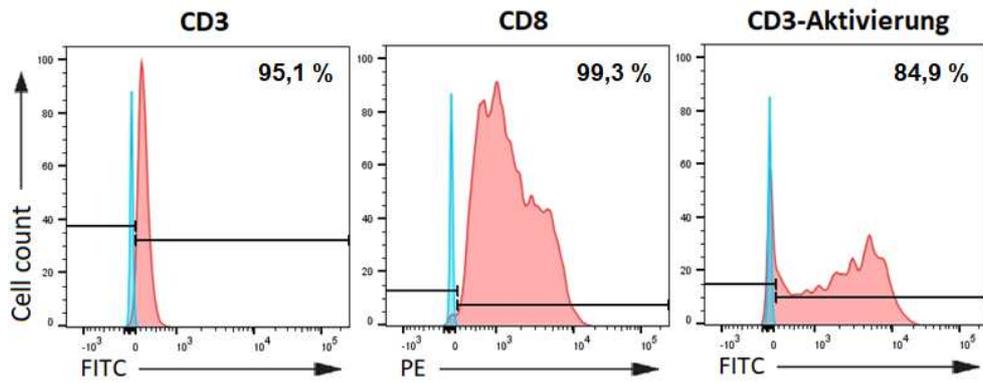


Abbildung 19: Durchflusszytometrische Analyse der CD3- und CD8-Expression von IP2-T-Zell-Hybridomen. Neben der Expression der beiden Oberflächenproteine konnte auch eine Aktivierbarkeit der Zellen nachgewiesen und quantitativ bestimmt werden. CD3: Anti-mCD3 ϵ -gefärbte Zellen. CD8: Anti-hCD8 β -gefärbte Zellen. CD3-Aktivierung: Anti-mCD3 ϵ -aktivierte Zellen. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen.

Die Aktivierbarkeit der Hybridome wurde auch durch mikroskopische Aufnahmen untersucht und ist in Abbildung 20 dargestellt. Hierbei konnte die sGFP-Expression der aktivierten Zellen ebenfalls nachgewiesen werden. Für unbehandelte Hybridome, welche nicht mit einem anti-mCD3 ϵ -Antikörper gefärbt wurden, konnten keine aktivierten Zellen nachgewiesen werden.

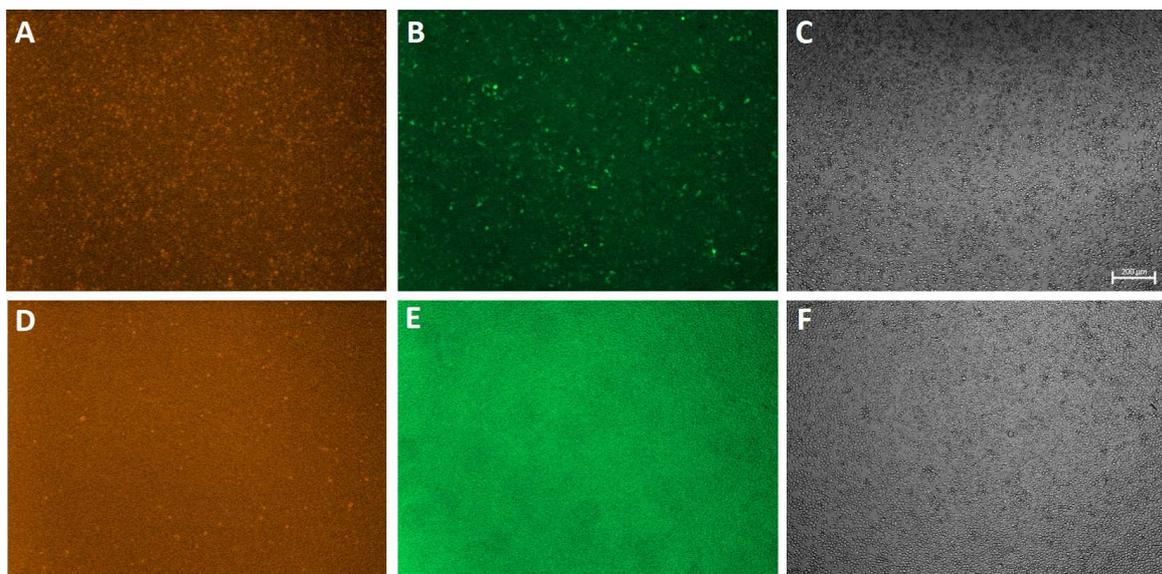


Abbildung 20: Mikroskopaufnahmen der CD3-Aktivierung. Obere Reihe: CD3-Aktivierung im DsRed-Kanal (A), im EGFP-Kanal (B) und im Hellfeld (C). Untere Reihe: Ungefärbte IP2-T-Zell-Hybridome im DsRed-Kanal (D), im EGFP-Kanal (E) und im Hellfeld (F). Maßstabsskala: 200 μ m.

3.3.2 HLA-Restriktion und Entnahme positiver Zellen

Da das krankheitsrelevante HLA, welches das gesuchte Antigenpeptid präsentierte, nicht bekannt war, musste dieses vor der eigentlichen Mimotop-Suche identifiziert werden. Hierfür wurden in einer ersten Runde HLAs gleichen Isotyps zusammen in COS-7 transfiziert und auf eine T-Zell-Aktivierung getestet. Zusätzlich wurden die Peptid-Libraries N24 und N27 zusammen in die antigenpräsentierenden COS-7 transfiziert, da zudem nicht bekannt war, ob das präsentierte Peptid eine Länge von 8 oder 9 aa aufwies. Da die präsentierten Peptide der untersuchten HLAs nur selten eine Länge von 10 aa besitzen (Rasmussen et al., 2014; Gfeller and Bassani-Sternberg, 2018), wurde in dieser Runde keine zusätzliche Untersuchung von N30-Librarys durchgeführt. Es wurde hierbei vor allem auf Zell-Cluster geachtet, welche mindestens drei aktivierte IP2-T-Zell-Hybridome enthielten, um eine Anreicherung falsch positiver peptid-codierender Plasmide zu verhindern (siehe Abschnitt 2.5.3). Die Ergebnisse dieser ersten Runde der HLA-Bestimmung sind in Tabelle 3 zusammengefasst:

Tabelle 3: Anzahl aufgefundener IP2-T-Zell-Cluster nach Screening von 3,5 cm-Schalen, welche antigenpräsentierende COS-7 und co-kultivierte IP2-Hybridome enthielten. Aufgelistet sind die verwendeten Peptid-Libraries, die transfizierten HLAs gleichen Isotyps, die Anzahl und Größe der Hybridom-Cluster und die gescannte Fläche in cm².

Library	HLA	4er-Cluster	3er-Cluster	Zusätzliche Cluster	Fläche [cm ²]
N24/N27	A*02:01 / A*23:01	2	19	-	76,8 cm ²
N24/N27	B*35:01 / B*44:03	10	22	-	76,8 cm ²
N24/N27	C*04:01 / C*16:01	5	2	-	76,8 cm ²

Mit einer Gesamtzahl von 32 aufgefundenen IP2-T-Zell-Cluster wurden für COS-7-Zellen, welche mit den HLAs B*35:01/B*44:03 transfiziert wurden, im Vergleich zu den HLA-Kombinationen A*02:01/A*23:01 (21 Cluster) und C*04:01/C*16:01 (7 Cluster) die meisten aktivierten T-Zell-Cluster detektiert.

In der nächsten Runde wurden anschließend HLAs des gleichen Isotyps nur mit einer N24-, N27- oder N30-Library in COS-7-Zellen transfiziert und auf eine T-Zell-Aktivierung untersucht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

Tabelle 4: Anzahl aufgefundener IP2-T-Zell-Cluster nach Screening von 3,5 cm-Schalen, welche antigenpräsentierende COS-7 und co-kultivierte IP2-Hybridome enthielten. Aufgelistet sind die einzelnen verwendeten Peptid-Libraries, die transfizierten HLAs gleichen Isotyps, die Anzahl und Größe der Hybridom-Cluster und die gescaante Fläche in cm².

Library	HLA	4er-Cluster	3er-Cluster	Zusätzliche Cluster	Fläche [cm ²]
N24	A*02:01 / A*23:01	-	-	-	-
N24	B*35:01 / B*44:03	-	-	-	28,8 cm ²
N24	C*04:01 / C*16:01	-	-	-	28,8 cm ²
N27	A*02:01 / A*23:01	2	3	-	19,2 cm ²
N27	B*35:01 / B*44:03	5	2	-	48 cm ²
N27	C*04:01 / C*16:01	1	15	1x 6er	48 cm ²
N30	A*02:01 / A*23:01	-	-	-	-
N30	B*35:01 / B*44:03	-	-	-	28,8 cm ²
N30	C*04:01 / C*16:01	-	-	-	28,8 cm ²

Im Gegensatz zum vorherigen Versuch, welcher die meisten aktivierten T-Zell-Cluster für die HLAs B*35:01/B*44:03 aufzeigte, wurden für die Untersuchung einzelner Peptid-Libraries mit einer Anzahl von 17 Clustern die meisten aktivierten IP2-Hybridome für die HLA-Kombination C*04:01/C*16:01 mit einer N27-Library aufgefunden. Für die HLA-Kombinationen B*35:01/B*44:03 bzw. A*02:01/A*23:01 konnten für mit einer N27-Library transfizierte COS-7-Zellen hingegen nur 5 (B*35:01/B*44:03) bzw. 7 (A*02:01/A*23:01) T-Zell-Cluster aufgefunden werden. Für die weiteren untersuchten HLA-Kombinationen und Peptid-Libraries konnten keine aktivierten IP2-Cluster nachgewiesen werden.

In einer weiteren Runde wurden anschließend die HLAs durch die Verwendung stabil transfizierter HLA-BFP-COS-7-Zellen einzeln auf eine T-Zell-Aktivierung untersucht. Die N24-, N27- und N30-Libraries wurden wie bereits in der vorherigen Runde einzeln in die COS-7-Zellen transfiziert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst:

Tabelle 5: Anzahl aufgefundener IP2-T-Zell-Cluster nach Screening von 3,5 cm-Schalen, welche antigenpräsentierende COS-7 und co-kultivierte IP2-Hybridome enthielten. Aufgelistet sind die einzelnen verwendeten Peptid-Libraries, die verwendeten HLA-BFP-COS-7, die Anzahl und Größe der Hybridom-Cluster und die gescannte Fläche in cm².

Library	HLA	4er-Cluster	3er-Cluster	Zusätzliche Cluster	Fläche [cm²]
N24	A*02:01	2	17	1x 5er	96 cm ²
N24	A*23:01	3	18	-	115,2 cm ²
N24	B*35:01	4	36	1x 5er	96 cm ²
N24	B*44:03	6	23	-	76,8 cm ²
N24	C*04:01	1	15	-	28,8 cm ²
N24	C*16:01	1	9	-	28,8 cm ²
N27	A*02:01	-	1	-	67,2 cm ²
N27	A*23:01	-	-	-	67,2 cm ²
N27	B*35:01	5	36	-	441,6 cm ²
N27	B*44:03	6	14	-	57,6 cm ²
N27	C*04:01	-	-	-	9,6 cm ²
N27	C*16:01	-	-	-	9,6 cm ²
N30	A*02:01	-	-	-	38,4 cm ²
N30	A*23:01	-	-	-	57,6 cm ²
N30	B*35:01	-	-	-	19,2 cm ²
N30	B*44:03	-	-	-	19,2 cm ²
N30	C*04:01	-	-	-	-
N30	C*16:01	-	-	-	-

Die höchste Anzahl aktivierter T-Zellen wurde mit je 41 aufgefundenen Clustern für das HLA-B*35:01 in Kombination mit einer N24- bzw. N27-Library nachgewiesen. Die zweit- bzw. dritthöchste Anzahl wurde für die HLAs A*23:01 (21 Cluster) bzw. A*02:01 (20 Cluster) in Kombination mit einer N24-Library aufgefunden. Für die HLAs C*04:01 und C*16:01 konnten in Kombination mit einer N24-Library lediglich 16 (C*04:01) bzw. 10 (C*16:01) aktivierte Cluster nachgewiesen werden. Die weiteren untersuchten HLA-Peptid-Library-Kombinationen führten zu keiner T-Zell-Aktivierung.

Für die Entnahme antigenpräsentierender COS-7-Zellen zur Anreicherung antigen-codierender Plasmide wurden sowohl HLAs gleichen Isotyps transfiziert, als auch stabil transfizierte HLA-BFP-COS-7 verwendet. Dies hatte den Grund, dass ein Teil der entnommenen Zellen bereits während der zweiten Runde der HLA-Bestimmung isoliert wurde, da diese durch ihre Lage und ihre Bindung an IP2-Hybridomen eine hohe Wahrscheinlichkeit aufwiesen, das Antigenpeptid zu exprimieren, da sich einzelne Hybridome auch nur zufällig über den COS-7 befinden konnten. Aufgrund der vorherigen Versuche zur Bestimmung des krankheitsrelevanten HLAs wurden zudem nur Zellen entnommen, welche eine N27-Library enthielten. Zwar wurden für das HLA-B*35:01 sowohl für die N27-, als auch für die N24-Library eine Anzahl von 41 Clustern nachgewiesen, jedoch wurde eine Antigen suche mit Zellen, welche eine N24-Library enthielten, bereits in einer vorherigen Arbeit untersucht (Gebert, 2018), weshalb die Entnahme von Zellen, welche eine N27-Library enthielten, priorisiert wurde. Eine Übersicht über die entnommenen COS-7 ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Auflistung entnommener COS-7-Zellen, welche zu einer Aktivierung von IP2-T-Zellen führten. Dargestellt sind die transfizierten HLAs bzw. die verwendeten HLA-BFP-COS-7, die Größe der Hybridom-Cluster und die Bezeichnung der entnommenen Zelle. Alle entnommenen Zellen wurden mit einer N27-Library transfiziert und exprimierten Peptide mit einer Länge von 9 aa.

Bezeichnung	HLA	Clustergröße
1	A*02:01/ A*23:01	4
2	A*02:01/ A*23:01	3
3	A*02:01/ A*23:01	3
4	A*02:01/ A*23:01	4
5	A*02:01/ A*23:01	3
6	B*35:01/ B*44:03	4
7	B*35:01/ B*44:03	3
8	B*35:01/ B*44:03	3
9	B*35:01/ B*44:03	3
10	B*35:01/ B*44:03	3
11	B*35:01/ B*44:03	3
12	B*35:01/ B*44:03	3
13	B*35:01	3
14	B*35:01	4

Die Entnahme einer antigenpräsentierenden Zelle ist in Abbildung 21 beispielhaft für eine COS-7-Zelle, welche stabil das HLA-B*35:01 exprimierte und mit einer N27-Library transfiziert wurde, dargestellt.

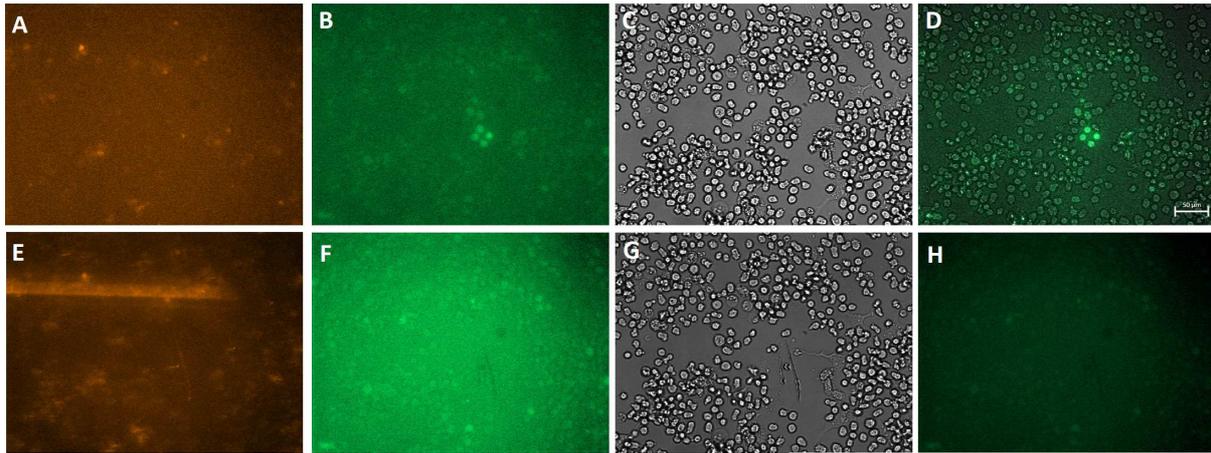


Abbildung 21: Mikroskopaufnahmen vor (obere Reihe) und nach (untere Reihe) der Entnahme einer antigenpräsentierenden COS-7-Zelle. A und E: Aufnahme im DsRed-Kanal. B und F: Aufnahme im EGFP-Kanal. C und G: Aufnahme im Hellfeld. D und H: Hellfeld- und EGFP-Kanal (merged). Gezeigt wird ein Cluster von vier aktivierten IP2-T-Zell-Hybridomen. Die hier gescreenten COS-7 Zellen exprimierten stabil das HLA-B*35:01 und wurden mit einer N27-Library transfiziert. Maßstabsskala: 50 µm.

3.3.3 Nested-PCR und Ligation der peptid-codierenden Sequenzen in pcDNArc-spacer

Nachdem die COS-7-Zellen entnommen und für 5 min bei 80 °C inkubiert wurden (2.5.3), wurden die auf den Library-Plasmiden enthaltenen peptid-codierenden Sequenzen im ersten Schritt der nested-PCR vervielfältigt (2.6.2.2.2). Die nach der PCR mit den Primern pcDNA-for-1/pcDNA-rev-1 auf einem Agarosegel aufgetragenen Proben sind in Abbildung 22 dargestellt. Nur für die Picks 1, 2, 5, 7, 8 und 10 konnten Banden mit der erwarteten Größe von 282 bp aufgefunden werden (rote Pfeile, Abbildung 22), weshalb die PCR-Produkte dieser Picks vor dem zweiten Schritt der nested-PCR 1:100 verdünnt wurden. Da die einzeln entnommenen Zellen während der Entnahme aufplatzen und dadurch einen Teil der Library-DNA verlieren konnten, ist es wahrscheinlich, dass aus diesem Grund für die restlichen Picks keine Bande mit der amplifizierten DNA-Sequenz auf dem Gel sichtbar war. Daher wurde die template-DNA für diese Picks im zweiten Schritt der nested-PCR unverdünnt eingesetzt.

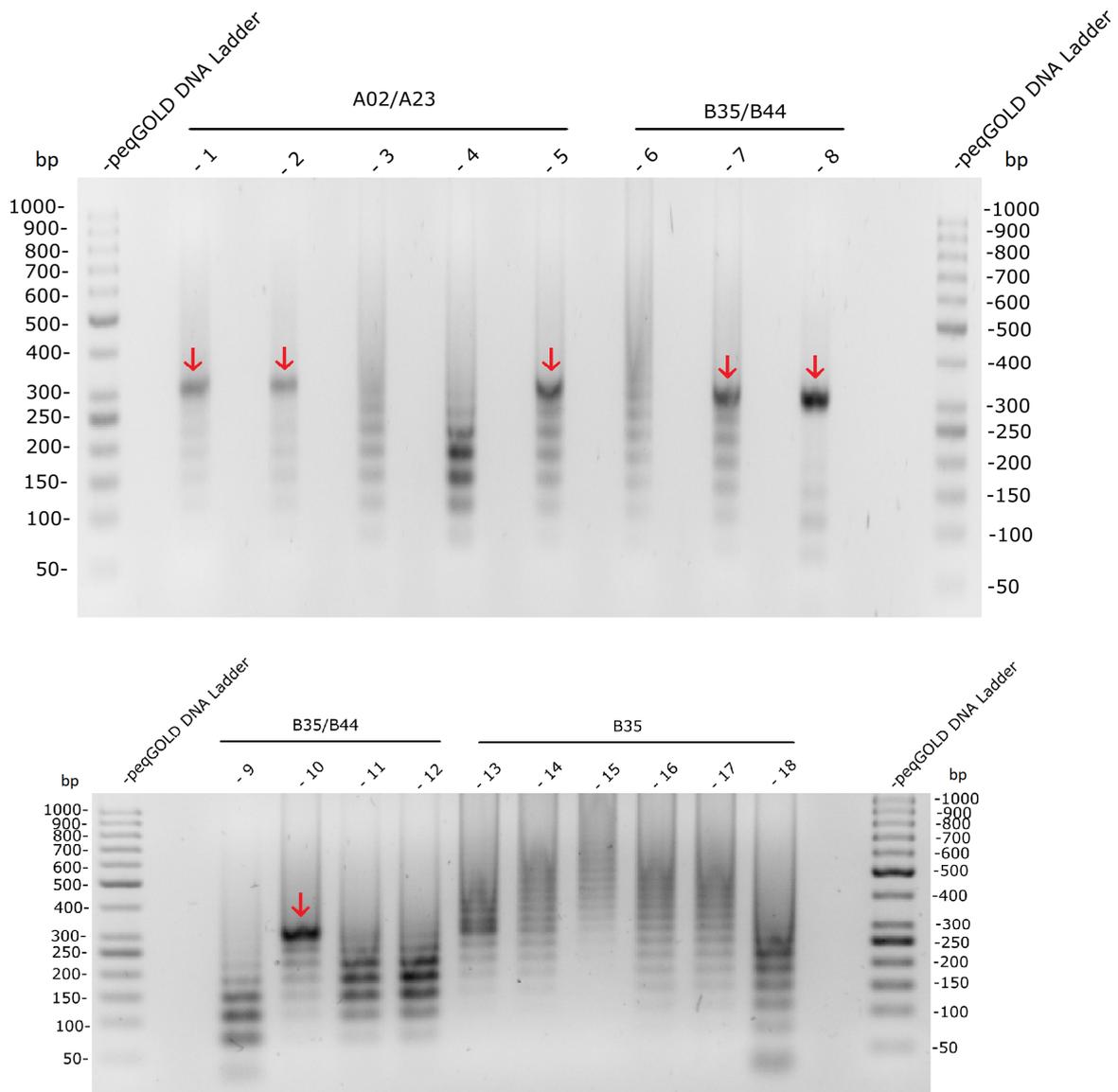


Abbildung 22: Agarosegele der PCR-Produkte mit den Primern pcDNA-for-1/pcDNA-rev-1 direkt nach Entnahme der antigenpräsentierenden COS-7-Zellen. Die template-DNA stammte aus entnommenen COS-7-Zellen nach Assays mit der N27-Library. Die erwartete Bandengröße der PCR-Produkte lag bei 282 bp. Banden dieser Größe konnten in 6 der 18 Proben nachgewiesen werden (rote Pfeile). Von links nach rechts: Basenpaare (bp), pEqGOLD DNA Ladder (Marker), Aufgetragene Proben, pEqGOLD DNA Ladder (Marker).

Nach dem zweiten Schritt der nested-PCR, welche mit den Primern pcDNA-2nd-for/pcDNA-2nd-rev-10 durchgeführt wurde, wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 23). Für alle Proben konnten Banden mit der erwarteten Größe von 65 bp nachgewiesen werden (grüne Markierung, Abbildung 23).

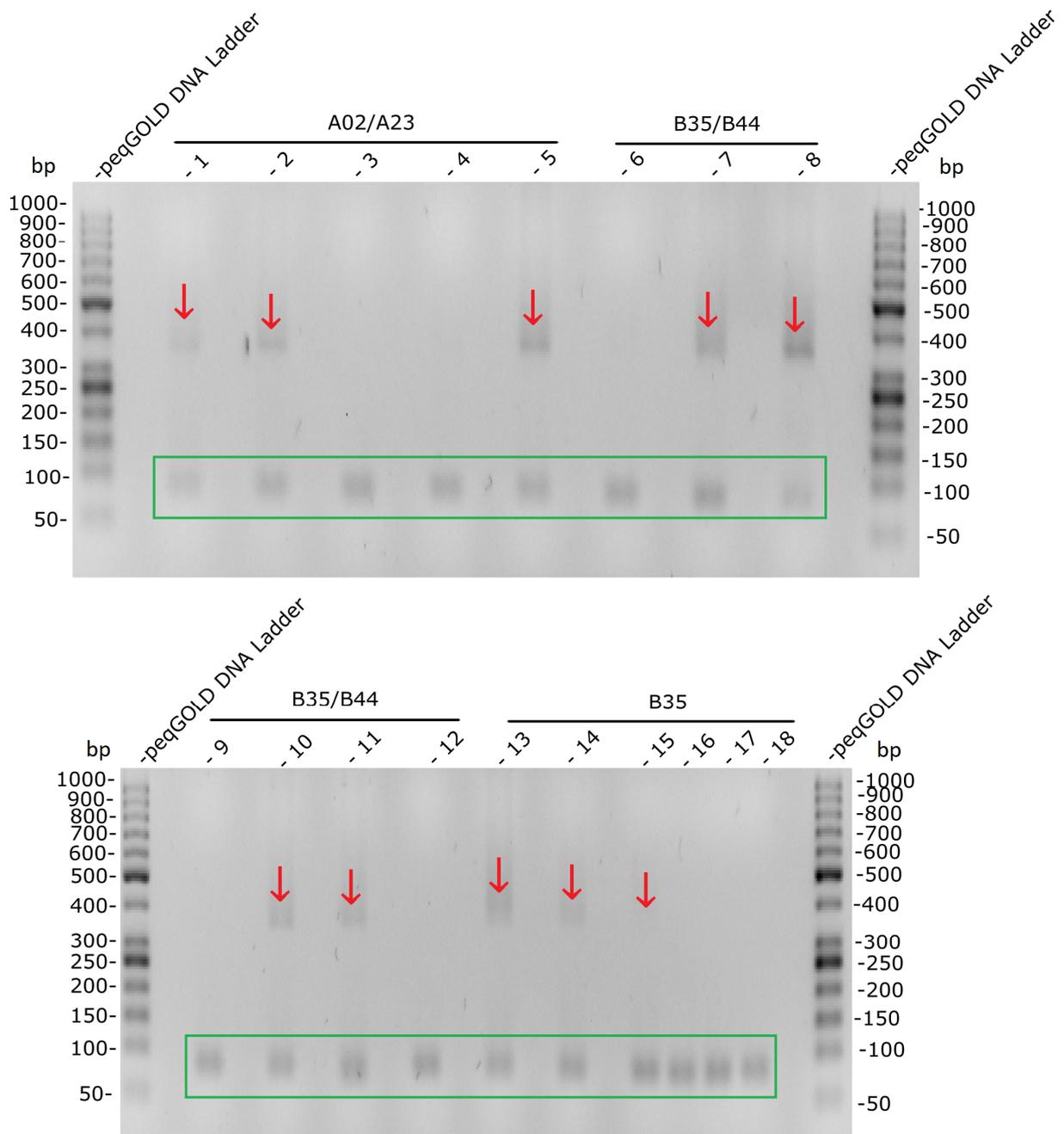


Abbildung 23: Agarosegele der PCR-Produkte mit den Primern pcDNA-2nd-for/pcDNA-2nd-rev-10. Die erwartete Bandengröße der PCR-Produkte lag bei 65 bp. Banden dieser Größe konnten für alle Proben nachgewiesen werden (grün markiert). Für 10 der 18 Proben konnten zudem Banden einer Größe von ca. 350 bp aufgefunden werden (rote Pfeile). Von links nach rechts: Basenpaare (bp), peqGOLD DNA Ladder (Marker), Aufgetragene Proben, peqGOLD DNA Ladder (Marker).

Da sowohl nach der ersten (für alle Proben, Abbildung 22), als auch der zweiten PCR (rote Pfeile, Abbildung 23) mehrere weitere Banden auf dem Agarosegel aufgefunden wurden, wurden beispielhaft die zusätzlichen Banden für Pick 4 bei ca. 150 bp und für Pick 8 bei ca. 300 bp und 150 bp nach der ersten PCR analysiert. Zusätzlich wurden für Pick 4 die 70 bp-Bande und für Pick 8 die 350 bp- und 70 bp-Bande nach der zweiten PCR untersucht. Die Analyse der entsprechenden Banden erfolgte nach der beschriebenen Vorgehensweise aus Abschnitt 2.6.2.5.

Die Sequenzen der PCR-Produkte (Anhang, 6.5) zeigten für die 150 bp-Banden von Pick 4 und 8 nach der ersten PCR hintereinander vorliegende Wiederholungen der verwendeten Primer pcDNA-for-1/pcDNA-rev-1. Diese Primer-Repeats können als Nebenprodukte der PCR auftreten, wenn nur eine geringe Menge template-DNA vorhanden ist. Da wie bereits erläutert die Menge an template-DNA nach der Entnahme der Zellen stark variieren kann, führt dies höchstwahrscheinlich zu einem Auftreten der verschiedenen Banden nach der ersten PCR. Für diese Ursache spricht auch, dass die starke 300 bp-Bande von Pick 8 das erwartete PCR-Produkt enthielt (Anhang, 6.5) und für diesen Pick weniger zusätzliche Banden mit einer geringeren Menge an Nebenprodukt aufgefunden wurden.

Nach der zweiten PCR konnte sowohl für die 70 bp-Bande von Pick 4, als auch für die 350 bp-Bande von Pick 8 eine definierte peptid-codierende Sequenz nachgewiesen werden, wengleich für letztere die Sequenz doppelt vorlag (Anhang, 6.5). Für die 70 bp-Bande konnte statt des Inserts nur der leere Vektor pCR™-Blunt II-TOPO™ vorgefunden werden, wofür für diese Probe ein Problem während des Zero-Blunt-Klonierung (2.6.2.5) die wahrscheinlichste Ursache ist.

Da für alle Proben das erwartete PCR-Produkt mit einer Länge von 65 bp vorhanden war, wurden die Proben präzipitiert (2.6.1.2), mit den Restriktionsenzymen Ascl und NotI verdaut (2.6.2.3) und in den Ascl/NotI-geschnittenen Vektor pcDNArc-spacer ligiert (2.6.2.4). Nach Transformation der ligierten Plasmide in *E. coli* DH10B (2.2.1.2) und anschließender Plasmid-Isolation (2.6.1.1) wurden die nun angereicherten Peptid-Libraries erneut in COS-7 transfiziert und auf eine Reaktivierung von IP2-T-Zell-Hybridomen getestet.

3.3.4 Untersuchung der angereicherten Peptid-Libraries auf eine IP2-T-Zell-Aktivierung

Eine Reaktivierung von IP2-T-Zell-Hybridomen durch die angereicherten Peptid-Libraries konnte für keinen der untersuchten Picks nachgewiesen werden. Aus diesem Grund wurden angereicherte Subpools, welche aus Picks einer vorherigen Arbeit (Gebert, 2018) stammen, auf eine Reaktivierung untersucht.

3.3.5 Analyse der Subpools aus dem Ausgangspool 8L-NEUI

Für die damalige Antigensuche wurden in einer ersten Runde der Zellentnahme jeweils 7 Picks zu je 2 Pools (8L I und 8L III) zusammengefasst. Die COS-7-Zellen wurden hierbei mit dem HLA-A*23:01 und der HLA-spezifischen Peptid-Library pcDNA-8L transfiziert und auf eine T-Zell-Aktivierung untersucht. Diese Library codierte an der achten Position für die Aminosäure Leucin, welche als Peptidanker bevorzugt in der Peptidbindefurche von HLA-A*23:01 gebunden wird (Bouvier and Wiley, 1994; Gebert, 2018). Die ligierten Pools wurden erneut in COS-7-Zellen transfiziert, welche während der Mikroskopie ein zweites Mal entnommen wurden. Die insgesamt 8 Picks der ursprünglichen zwei Pools wurden anschließend zu einem neuen Pool, 8L-NEUI, zusammengefasst, welcher als Ausgangspool für die nachfolgende Subpool-Analyse diente. Die Picks dieses Pools wurden zuvor durch TOPO-Klonierung in den Vektor pcDNATM3.1/V5-His TOPO kloniert (siehe Gebert, 2018). Eine Übersicht über die Entstehung des Ausgangspools 8L-NEUI ist in Abbildung 24 dargestellt.

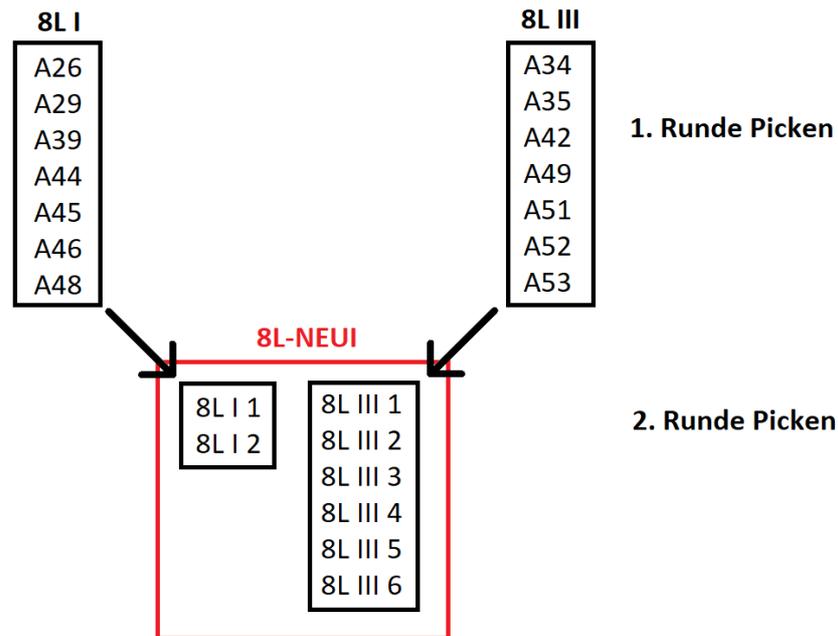


Abbildung 24: Übersicht über die Entstehung des Ausgangspools 8L-NEUI. Je 7 isolierte Zellen aus einer ersten Entnahme antigenpräsentierender Zellen einer früheren Arbeit (Gebert, 2018) wurden zu den beiden Pools 8L I und 8L III zusammengefasst. Diese Pools wurden erneut in COS-7 zusammen mit dem HLA-A*23:01 transfiziert, welche in einer zweiten Runde der Antigen-Suche erneut entnommen wurden. Die insgesamt 8 Picks aus den beiden ursprünglichen Pools wurden anschließend zum Ausgangspool 8L-NEUI zusammengefasst und in den Vektor pcDNATM3.1/V5-His TOPO ligiert. Die Entnahme der für die Pools verwendeten Zellen, die Durchführung der PCRs, die Klonierungen in die Vektoren pcDNARC-spacer bzw. pcDNATM3.1/V5-His TOPO und das Pooling fanden bereits in einer früheren Arbeit statt (Gebert, 2018).

Ausgehend von Pool 8L-NEUI konnte eine Aktivierung der IP2-Hybridome bis zur Analyse von Einzelklonen nachgewiesen werden. Für jede Subpool-Runde wurde jener Subpool für eine weitere Analyse verwendet, welcher die höchste Anzahl aktivierter T-Zell-Cluster enthielt, und mit einer neuen Bezeichnung versehen. So wurde beispielsweise für den positiven 24. Subpool von 8L-NEUI die Bezeichnung 8L-NEUI-24 eingeführt, von welchem ausgehend weitere Subpools angefertigt und analysiert wurden. Die Mikroskopaufnahmen der positiven Cluster der einzelnen Subpools sind in Abbildung 25 dargestellt. Die Anzahl positiver Cluster erhöhte sich für jede weitere Subpool-Runde jedoch kaum, was dazu führte, dass nach Analyse der Einzelklone für alle 30 untersuchten Proben eine ähnliche Anzahl positiver IP2-Hybridome aufgefunden wurde. Da zudem für keinen der Klone ein aktivierter T-Zell-Cluster aufgefunden wurde, war eine Mimotop-Identifizierung nicht möglich.

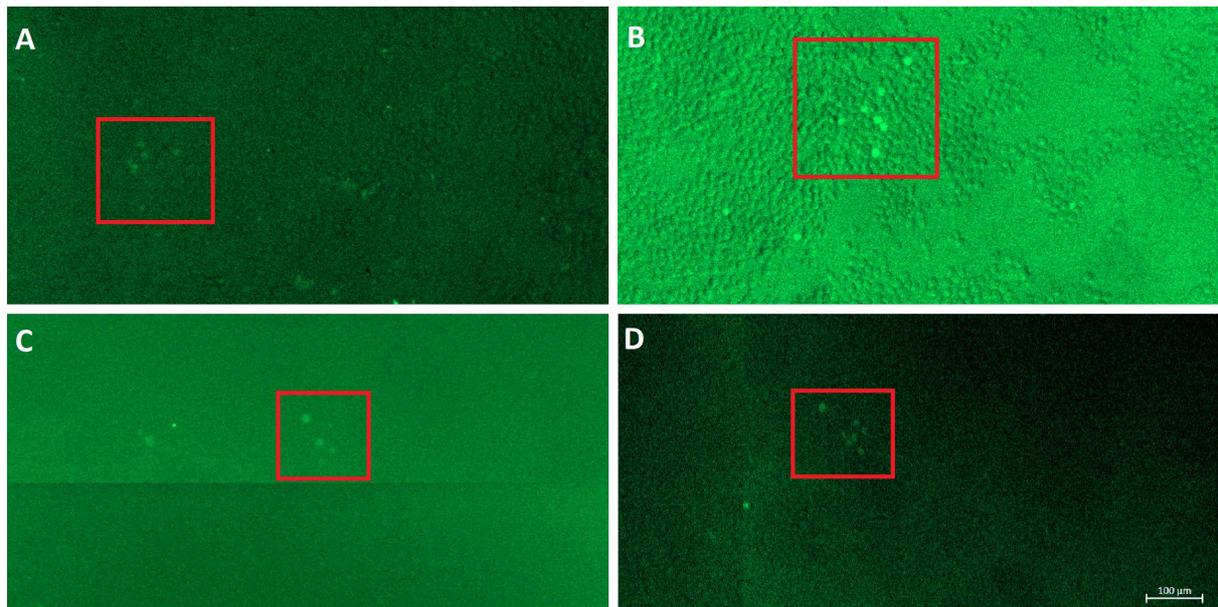
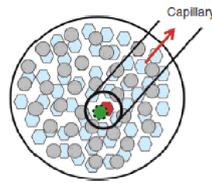


Abbildung 25: Mikroskopaufnahmen aktivierter IP2-T-Zell-Hybridome während der Subpool-Analyse. Die gescreenten COS-7 Zellen exprimierten stabil das HLA-A*23:01 und wurden mit angereicherten 8L-Libraries der einzelnen Subpools transfiziert. Die Bilder A-D zeigen Aufnahmen der aktivierten IP2-T-Zell-Hybridome (rot eingerahmt) durch die entsprechenden Subpools. A: 8L-NEUI-24. B: 8L-NEUI-24-26. C: 8L-NEUI-24-26-4. D: 8L-NEUI-24-26-4-9. Maßstabsskala: 100 µm.

Eine schematische Darstellung der aus dem Ausgangspool 8L-NEUI angefertigten Subpools ist in Abbildung 26 dargestellt. Eine Anfertigung und Analyse weiterer Subpools, welche aus Ausgangspools der vorherigen Arbeit (Gebert, 2018) stammen, führte ebenfalls zu keiner Zunahme aktivierter IP2-T-Zell-Hybridome und daher zu keiner Mimotop-Identifizierung.

1. Runde Picking

C	B	A	A	A23	A23	A23	A23	A23	A23
		Mix I	Mix II	N24 I	N24 II	8L I	8L II	8L III	8L IV



2. Runde Picking

A Mix NEU	A Mix NEU	8L-NEU I	8L-NEU II
-----------	-----------	----------	-----------

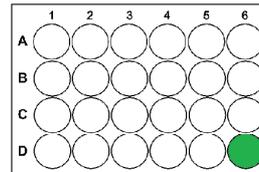
Ursprüngliche Klonzahl: 104.000

1. Runde Subpools

Ursprünglicher Pool: 8L-NEUI

→ 30 Subpools

Reaktivierung in 8L-NEUI-24



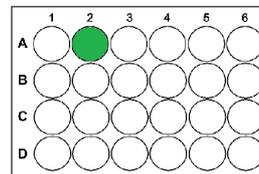
Klonzahl: 12.324

2. Runde Subpools

Ursprünglicher Pool: 8L-NEUI-24

→ 30 Subpools

Reaktivierung in 8L-NEUI-24-26



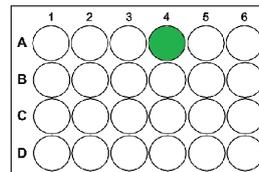
Klonzahl: 1380

3. Runde Subpools

Ursprünglicher Pool: 8L-NEUI-24-26

→ 30 Subpools

Reaktivierung in 8L-NEUI-24-26-4



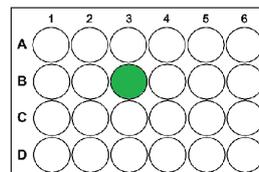
Klonzahl: 193

Straßen- Subpools

Ursprünglicher Pool: 8L-NEUI-24-26-4

→ 30 Straßen mit je 30 Klonen

Reaktivierung in 8L-NEUI-24-26-4-9



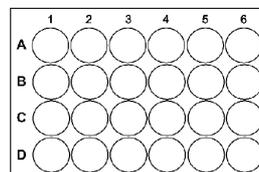
Klonzahl: 30

Einzelklone

Ursprünglicher Pool: 8L-NEUI-24-26-4-9

→ 30 Einzelklone

KEINE REAKTIVIERUNG NACHWEISBAR



Einzelklone

Abbildung 26: Übersicht der Antigen-Suche von IP2. Dargestellt sind alle Schritte von der Entnahme der antigenpräsentierenden COS-7 bis zur Analyse von Einzelklonen. Angegeben sind zudem die entsprechenden Klonzahlen der Bakterien-Subpools. Die Antigen-suche dieser Arbeit begann für den dargestellten Ausgangspool 8L-NEUI ab der 1. Runde der Subpool-Anfertigung. Die Entnahme der COS-7-Zellen und die Aufteilung in den Ausgangspool 8L-NEUI wurde in einer früheren Arbeit durchgeführt (Gebert, 2018). Für das dargestellte Schema wurde Abbildung 21 aus jener Arbeit als Vorlage verwendet.

4. Diskussion

4.1 Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R

4.1.1 Die Zusammensetzung der α_1/β_3 -Untereinheiten beeinflusst die rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R

Für die Untersuchung der Zeitabhängigkeit der GABA_A-R-Expression wurden Expi293F™-Zellen transfiziert und nach 48 h, 72 h und 96 h auf eine rAb-IP2-Bindung untersucht. Die höchste Anzahl positiver Zellen wurde hierbei 72 h nach der Transfektion mit einem Anteil von 70,2 % ermittelt, die Anteile der Untersuchungen nach 48 h bzw. 96 h lagen mit 60,6 % bzw. 69,1 % jedoch in einer ähnlichen Größenordnung (3.1.1). Eine Bindung durch den Antikörper rAb-IP2 konnte hierbei nur für Zellen nachgewiesen werden, welche sowohl die α_1 - als auch die β_3 -Untereinheit des Rezeptors in einem Verhältnis von 1:1 exprimierten, eine Antikörper-Bindung an Zellen, welche nur mit einer Untereinheit von GABA_A-R transfiziert wurden, konnte nicht nachgewiesen werden. Frühere Studien zeigten hingegen, dass eine rAb-IP2-Bindung an die extrazelluläre Domäne der α_1 -Untereinheit sowohl durch einen ELISA, als auch immunhistochemisch in Ratten-Hirnschnitten nachweisbar ist (Brändle, 2016; Brändle et al., 2021). Zudem konnte für Antikörper aus dem CSF des Patienten IP2 eine Bindung an HEK293-Zellen nachgewiesen werden, welche nur die α_1 -Untereinheit von GABA_A-R exprimierten (Petit-Pedrol et al., 2014). Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass eine alleinige Expression von GABA_A-R- α_1 zu einer veränderten Faltung des Rezeptors in der Zellmembran führt, wodurch das Epitop nicht mehr für den Antikörper rAb-IP2 zugänglich ist. Zudem wäre es möglich, dass weitere bisher nicht aus dem CSF isolierte Antikörper eine Reaktivität gegenüber der α_1 -Untereinheit aufweisen.

Um diesen Einfluss der Zusammensetzung von GABA_A-R an der rAb-IP2-Bindung genauer zu untersuchen, wurden daher verschiedene molare Verhältnisse der GABA_A-R-Untereinheiten α_1/β_3 in Expi293F™ exprimiert. Hierbei wurde sowohl nach einer Untersuchung nach 48 h (3.3.1), als auch nach 72 h (Abbildung 34, Anhang) keine rAb-IP2-Bindung an Zellen beobachtet, welche nur mit einer der beiden Untereinheiten transfiziert wurden. Auch für den kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper konnte keine Bindung an Zellen nachgewiesen

werden, welche lediglich die α_1 -Untereinheit exprimierten, wodurch es wahrscheinlich ist, dass die vermutete veränderte Faltung des GABA_A-Rezeptors zu einer schlechteren Zugänglichkeit der Epitope für die getesteten Antikörper führt. Nur für den kommerziellen anti-GABA_A- β_2/β_3 -Antikörper konnte eine Bindung an Zellen nachgewiesen werden, welche nur die β_3 -Untereinheit exprimierten. Daraus lässt sich schließen, dass die alleinige Expression der β_3 -Untereinheit zu keiner Beeinflussung der Bindung des kommerziellen Antikörpers führt, rAb-IP2 hingegen nicht an die β_3 -Untereinheit des Rezeptors bindet. Für die Bindung von rAb-IP2 an GABA_A-R-exprimierenden Zellen scheint daher eine Expression beider Untereinheiten eine Voraussetzung zu sein, wohingegen die gereinigte extrazelluläre Domäne der GABA_A-R- α_1 -Untereinheit für eine Bindung im ELISA ausreichend ist (Brändle, 2016; Brändle et al., 2021). Der höchste Anteil positiver Zellen konnte hierbei mit 57,3 % für jene Expi293F™ nachgewiesen werden, welche ein $\alpha_1:\beta_3$ -Verhältnis von 0,6:0,4 aufwiesen. Für die kommerziellen anti-GABA_A- α_1 - bzw. anti-GABA_A- β_2/β_3 -Antikörper lag der höchste Anteil positiver Zellen von 47,3 bzw. 41,7 % bei einem $\alpha_1:\beta_3$ -Verhältnis von 0,4:0,6 bzw. 0,6:0,4. Da die Anteile positiver Zellen für die getesteten Antikörper nur schwach für andere molare $\alpha_1:\beta_3$ -Verhältnisse abwichen, verdeutlicht dies die Abhängigkeit der Bindung von rAb-IP2 und dem kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper von dem Vorhandensein beider GABA_A-R-Untereinheiten. Solange beide Untereinheiten an der Zelloberfläche vorhanden sind, scheint das molare Verhältnis der Untereinheiten zueinander nur einen geringen Einfluss auf die Antikörper-Bindung zu haben, wenngleich die höchste Anzahl positiver Zellen bei einem $\alpha_1:\beta_3$ -Verhältnis von ca. 1:1 detektiert werden kann.

4.1.2 Die rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R ist abhängig von der Zn²⁺-Konzentration

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluss der Zn²⁺-Konzentration auf die Affinität von rAb-IP2 zu GABA_A-R untersucht. GABA_A-R wird durch Zn²⁺-Ionen inhibitorisch reguliert (Hosie et al., 2003) und sowohl GABA_A-R, als auch CSRP2, welches ebenfalls von rAb-IP2 gebunden wird, verfügen über Zn²⁺-Bindestellen (Weiskirchen and Günther, 2003). Daher wurde vermutet, dass es sich entweder bei beiden von rAb-IP2 erkannten Epitope um jene Zn²⁺-Bindestellen handelt oder diese indirekt durch eine Konformationsänderung einen Einfluss auf die Affinität des Antikörpers haben.

Da die Expi293F™-Zellen in Medium mit 5 μM ZnCl_2 kultiviert wurden, wurden die Zellen in FACS-Puffer mit EDTA aufgenommen und für 30 min bzw. 4 h auf Eiswasser inkubiert. Um einen möglichen Einfluss der rAb-IP2-Bindung durch Komplexbildung der Zn^{2+} -Ionen durch EDTA zu untersuchen, wurden EDTA-Konzentrationen von 0/2,5/5/10/25/50 μM eingesetzt. Hierbei konnte für beide Inkubationszeiten die niedrigste rAb-IP2-Affinität bei einer EDTA-Konzentration von 5 μM nachgewiesen werden (Abbildungen 12 und 13, 3.1.2). Diese Konzentration entsprach jener ZnCl_2 -Konzentration, welche sich im Medium der Zellen während der Kultivierung befand. Der Anteil positiver Zellen sank zudem anfangs mit steigender EDTA-Konzentration, stieg jedoch für Zellen, welche für 30 min inkubiert wurden, anschließend wieder für steigende EDTA-Konzentrationen, wohingegen für Zellen, welche für 4 h inkubiert wurden, der Anteil positiver Zellen stetig abnahm. Für den kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper wurde ebenfalls die niedrigste Affinität an GABA_A-R bei einer EDTA-Konzentration von 5 μM nachgewiesen, diese änderte sich für die übrigen eingesetzten Konzentrationen jedoch kaum. Eine Bindung des kommerziellen anti-GABA_A- β_2/β_3 -Antikörpers konnte für keine der beiden untersuchten Inkubationszeiten ermittelt werden.

Da aufgrund der im Vergleich zum kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper starken Unterschiede in der Affinität an GABA_A-R eine Abhängigkeit der rAb-IP2-Bindung von der eingesetzten EDTA-Konzentration vermutet wurde, wurden in einem weiteren Versuch die Zellen zusätzlich mit 100 bzw. 200 μM EDTA inkubiert. Da für beide untersuchten Inkubationszeiten die geringste Affinität bei einer EDTA-Konzentration von 5 μM nachgewiesen wurde, wurden die Zellen nur für 30 min inkubiert. Der geringste Anteil positiver Zellen wurde hierbei wieder bei 5 μM EDTA nachgewiesen, für den kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper lag dieser bei 25 μM EDTA, änderte sich wie in den vorherigen Untersuchungen jedoch kaum für andere Konzentrationen (Abbildung 14, 3.1.2). Eine Bindung durch den kommerziellen anti-GABA_A- β_2/β_3 -Antikörper konnte im Gegensatz zu den beiden früheren Versuchen für alle Proben nachgewiesen werden, welche sich ebenfalls kaum zwischen den verschiedenen EDTA-Konzentrationen unterschieden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die EDTA- bzw. die Zn^{2+} -Konzentration einen starken Einfluss auf die rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R hat, da eine starke Abnahme der rAb-IP2-Affinität für

eine EDTA-Konzentration von 5 μM nachgewiesen wurde. Diese Konzentration entspricht jener Zn^{2+} -Konzentration, welche für die Kultivierung der Expi293F™-Zellen im Medium verwendet wurde. Es erscheint wahrscheinlich, dass daher sämtliche durch den GABA_A -Rezeptor gebundenen Zn^{2+} -Ionen durch das EDTA komplexiert wurden, wodurch das Epitop von rAb-IP2 aufgrund der darauffolgenden Konformationsänderung von GABA_A -R schlechter von dem Antikörper erkannt werden kann. Da sowohl für diese Konzentration, als auch für höhere EDTA-Konzentrationen ebenfalls eine rAb-IP2-Bindung nachgewiesen werden kann, ist es ebenfalls wahrscheinlich, dass das rAb-IP2-Epitop zwar in unmittelbarer Nähe der Zn^{2+} -Bindestelle liegt, jedoch aber auch benachbarte Proteinstrukturen Teil des Epitops sind. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, dass sich zwei der drei Zn^{2+} -Bindestellen von GABA_A -R zwischen den beiden Untereinheiten α_1 und β_3 befinden (Hosie et al., 2003) und die extrazelluläre Domäne der α_1 -Untereinheit für eine Bindung durch rAb-IP2 ausreichend ist (Brändle, 2016; Brändle et al., 2021). Aufgrund früherer Studien, welche einen Verlust zweier Zn^{2+} -Bindestellen durch den Austausch einer β_3 -Untereinheit durch eine γ_2 -Untereinheit nachwies (Hosie et al., 2003), könnte diese verringerte Fähigkeit, Zn^{2+} -Ionen zu binden, auch eine Erklärung für die Abhängigkeit der rAb-IP2-Bindung von der Zusammensetzung des GABA_A -Rezeptors sein (4.1.1). Diese Hypothese müsste jedoch durch weitere Versuche, z. B. Mutationsstudien der Zn^{2+} -Bindestellen, verifiziert werden.

Das vermutete Antigen, welches durch die erfolgte Immunreaktion zu einer Bildung des Antikörpers Ab-IP2 führte, ist CSRP2 (Brändle, 2016; Brändle et al., 2021), welches als Teil der LMO-Protein-Familie ebenfalls durch das Vorhandensein zweier LIM-Domänen in der Lage ist, Zn^{2+} -Ionen zu binden (Sánchez-García and Rabbitts, 1994; Louis et al., 1997; Weiskirchen and Günther, 2003). Zwar unterscheiden sich die LIM-Domäne, welche über eine Konsensussequenz verfügt, und die Zn^{2+} -Bindestelle hinsichtlich ihrer Aminosäurereste in ihren chemischen Eigenschaften, jedoch zeichnet beide Bindemotive ein Vorhandensein mehrerer Cystein-Reste aus (Sánchez-García and Rabbitts, 1994; Brändle, 2016). In früheren Studien erkannte der Antikörper rAb-IP2 mit einer geringeren Affinität fünf weitere Proteine, welche in der Lage sind, Zn^{2+} -Ionen zu binden, darunter mit CSRP1 ein weiteres, welches über eine LIM-Domäne verfügt (Brändle, 2016; Brändle et al., 2021). Dadurch erscheint es äußerst wahrscheinlich, dass diese Bindemotive das Epitop von rAb-IP2 darstellen, wodurch die Kreuzreaktivität des Antikörpers gegenüber GABA_A -R erklärt werden könnte. Um diese

Hypothese zu bestätigen, müssten jedoch weitere Untersuchungen, wie Strukturanalysen und Mutationsstudien, durchgeführt werden. Auch die CSF-Analyse von weiteren GABA_A-Rezeptor-Enzephalitis-Patienten könnte hierbei zu einem besseren Verständnis der Krankheitsentstehung und zu einer genauen Identifizierung des Epitops führen.

4.2 Analyse der rAb-hAE-Bindung an hMOG

4.2.1 Das Autoantigen hMOG wird durch rAb-hAE erkannt

Aufgrund der nachgewiesenen rAb-hAE-Bindung an Myelin (Beltrán et al., 2021) und der Häufigkeit MOG-spezifischer Antikörper bei demyelinisierenden Erkrankungen (Mayer et al., 2013) wurde untersucht, ob hMOG ein Antigen für den Antikörper rAb-hAE darstellt. In einem ersten Versuch wurde daher der Antikörper in Konzentrationen von 100/30/10/3,33/1/0,33/0,1/0,033 µg/ml auf eine Bindung an hMOG-exprimierenden COS-7-Zellen analysiert. Hierbei konnte sowohl für Zellen, welche nach 48 h untersucht wurden (Anhang, Abbildung 36), als auch für Zellen, welche nach 72 h untersucht wurden (Abbildung 15), eine starke Bindung durch rAb-hAE nachgewiesen werden, da für fast alle untersuchten Antikörper-Konzentrationen ein Anteil positiver Zellen von beinahe 100 % ermittelt werden konnte. Der Kontrollantikörper r8-18C5 zeigte ebenfalls eine starke Bindung an hMOG, auch hier lag der Anteil positiver Zellen in fast allen Proben bei ca. 100 %. Lediglich für eine eingesetzte Konzentration von 100 µg/ml Antikörper lag der positive Anteil bei 84,4 %, verbunden mit dem Vorhandensein einer vergleichsweise starken negativen Population. Dies resultierte wahrscheinlich ebenso wie für die entsprechende rAb-hAE-Probe nach 48 h aus einer zu hohen Menge an eingesetztem Antikörper. Die Fluoreszenzintensität und der Anteil positiver Zellen nimmt für mit rAb-hAE titrierte Zellen ab einer Konzentration von 0,33 µg/ml kontinuierlich ab, sodass für COS-7-Zellen, welche nach 72 h untersucht wurden, für eine Antikörper-Konzentration von 0,033 µg/ml nur noch 62 % der Zellen durch den Antikörper erkannt wurden. Da der Antikörper r8-18C5 selbst für diese Konzentration einen starken Shift aufweist und an allen untersuchten Zellen eine Bindung nachweisbar war, kann daraus geschlossen werden, dass sowohl r8-18C5, als auch rAb-hAE hMOG erkennen, r8-18C5 jedoch eine höhere Affinität für das Antigen aufweist.

4.2.2 Der Antikörper rAb-hAE erkennt ein ähnliches Epitop wie der Antikörper r8-18C5

Durch eine Analyse der Antikörper-Bindung an Mutanten von hMOG sollte im nächsten Schritt das von rAb-hAE erkannte Epitop identifiziert und mit dem bereits bekannten Epitop von r8-18C5 (Breithaupt et al., 2003) verglichen werden. Die hierbei verwendeten MOG-Mutanten enthielten Substitutionen von jenen Aminosäuren, welche sich an freiliegenden extrazellulären Loops befinden (Beltrán et al., 2021; Mayer et al. 2013; Abbildung 27), da hier eine Bindung des Antikörpers am wahrscheinlichsten war. Während für mMOG, rMOG und die MOG-Mutanten N31D, R9G/H10Y und P42S die Bindung durch rAb-hAE mit jener von hMOG vergleichbar war, konnte sowohl für COS-7- (Abbildung 16), als auch HeLa-Zellen (Abbildung 17) 72 h nach der Transfektion für die Mutante S104E ein geringerer Anteil positiver Zellen nachgewiesen werden. Diese Reduzierung der Affinität setzte sich hierbei für beide Zelltypen für die Doppelmutante H103A/S104E so stark fort, dass kaum noch ein positiver Shift auffindbar war. Für Zellen, welche 48 h nach der Transfektion untersucht wurden, konnte sowohl für COS-7- (Anhang, Abbildung 35), als auch HeLa-Zellen (Anhang, Abbildung 37) eine ähnlich verringerte rAb-hAE-Affinität für beide MOG-Mutanten nachgewiesen werden. Ein Austausch von Serin 104 durch Glutamat hatte für den Antikörper r8-18C5 im Vergleich zu rAb-hAE einen geringeren Einfluss auf die Bindung an hMOG. Eine zusätzliche Substitution von Histidin 103 durch Alanin führte auch hier zu einer starken Abnahme der Affinität an hMOG, wenngleich diese geringer ausfiel als für rAb-hAE. Dieses Ergebnis deckt sich hierbei mit früheren Studien, die nachwiesen, dass die Aminosäuren Histidin 103 und Serin 104 Teil des Epitops von r8-18C5 sind (Breithaupt et al., 2003; Breithaupt et al., 2008).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden untersuchten Antikörper ein ähnliches Epitop von hMOG erkennen, welches sich auf dem FG-Loop befindet und die Aminosäuren Histidin 103 und Serin 104 beinhaltet (Breithaupt et al., 2003). Eine Substitution dieser Aminosäuren führte hierbei für rAb-hAE im Vergleich zu r8-18C5 zu einer stärkeren Abnahme der Bindung. Eine Ursache hierfür könnte einerseits die bereits beschriebene geringere Affinität gegenüber hMOG sein, jedoch auch durch geringe Unterschiede der beiden Epitope erklärbar sein (Beltrán et al., 2021). Der FG-Loop mit dem von rAb-hAE erkannten Epitop ist in Abbildung 28 dargestellt.

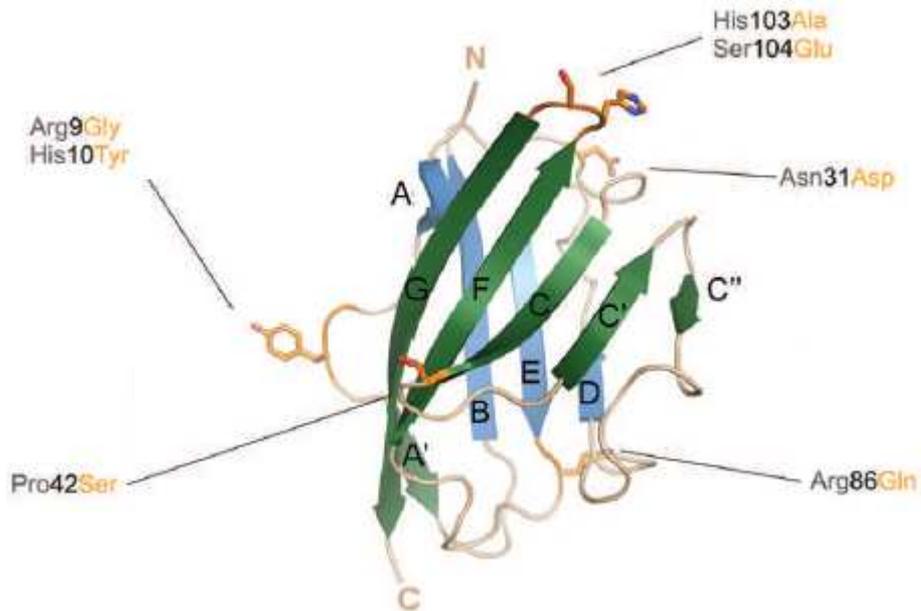


Abbildung 27: Bändermodell der extrazellulären Domäne von hMOG. Die verwendeten MOG-Mutanten enthielten Substitutionen jener Aminosäuren, welche sich an freiliegenden Loops von hMOG befinden (verändert nach Mayer et al. 2013).

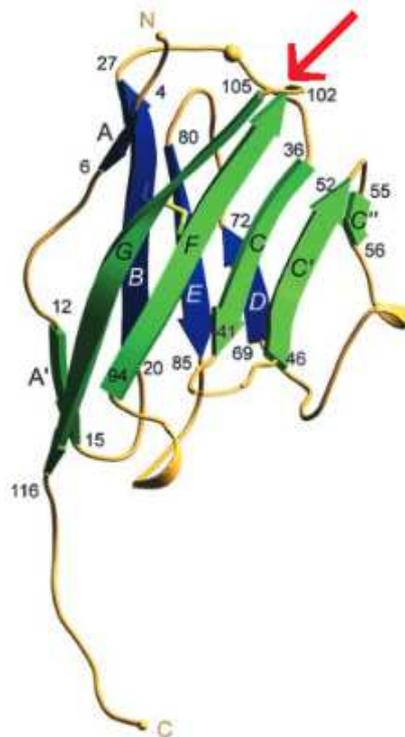


Abbildung 28: Bändermodell der extrazellulären Domäne von hMOG. Das von rAb-hAE erkannte Epitop beinhaltet den FG-Loop (roter Pfeil) und die Aminosäuren Histidin 103 und Serin 104 (verändert nach Breithaupt et al., 2003).

Da eine Substitution von Serin 104 einen größeren Einfluss auf die Affinität von rAb-hAE als auf die Affinität von r8-18C5 hat, wurde der Antikörper rAb-hAE für die MOG-Mutanten R86Q, S104E und H103A/S104E in verschiedenen Konzentrationen auf eine Bindung untersucht. Für hMOG und die Mutante R86Q konnte hierbei sowohl nach 72 h (Abbildung 18), als auch nach 48 h (Anhang, Abbildung 36) eine vergleichbare Abnahme der Fluoreszenzintensität ab einer Konzentration von 0,33 µg/ml nachgewiesen werden. Dies verdeutlicht zusammen mit den vorherigen Ergebnissen, dass Arginin 86 kein Teil des von rAb-hAE erkannten Epitops ist. Da sich zudem das Epitop mit den beiden Aminosäuren Histidin 103 und Serin 104 auf der gegenüberliegenden Seite der extrazellulären Domäne von hMOG befindet, wäre eine Bindung durch rAb-hAE aus sterischen Gründen sehr unwahrscheinlich. Die abgeschwächte Bindung an die MOG-Mutante S104E konnte im Vergleich zu hMOG bereits für die höchste eingesetzte Antikörper-Konzentration von 100 µg/ml nachgewiesen werden, sodass ab einer Konzentration von 0,33 µg/ml für diese Mutante nur noch ein geringer Shift ermittelt werden konnte. Dieser Effekt war für die Doppelmutante H103A/S104E noch deutlicher, sodass ab einer Konzentration von 3,33 µg/ml nur noch eine sehr kleine Population positiver Zellen detektiert werden konnte. Diese Ergebnisse verdeutlichen nochmals, dass die Aminosäuren Histidin 103 und Serin 104 Teil des von rAb-hAE erkannten Epitops sind. Die Bindung an den FG-Loop von hMOG wird hierbei durch eine Substitution von Serin 104 durch Glutamat weniger herabgesetzt als durch einen zusätzlichen Austausch von Histidin 103 durch Alanin. Dieser Effekt konnte für den Antikörper r8-18C5 ebenfalls gezeigt werden, wenngleich dieser weniger stark ausgeprägt war. Die Bedeutung dieser Aminosäuren für die rAb-hAE-Bindung zeigt sich zudem durch die Tatsache, dass sowohl die Affinität an rMOG, als auch an mMOG mit jener an hMOG vergleichbar war (Abbildung 16), obwohl diese MOG-Varianten im Vergleich zu hMOG 12 bzw. 13 Aminosäure-Substitutionen aufweisen (Breithaupt et al., 2008). Der FG-Loop enthält für mMOG ebenfalls eine, für rMOG zwei Aminosäure-Substitutionen, die beiden Aminosäuren Histidin 103 und Serin 104 sind jedoch für alle drei Spezies konserviert (Breithaupt et al., 2008; Beltrán et al., 2021), wodurch auch für diese MOG-Varianten eine Bindung an das Epitop gewährleistet werden kann.

Die Tatsache, dass sowohl der Antikörper Ab-hAE, als auch 8-18C5 ein ähnliches Epitop erkennen, kann durch den Vergleich der Entstehung beider Antikörper nachvollzogen werden. Der Antikörper Ab-hAE, welcher aus einem 51-jährigen Patienten isoliert wurde (Beltrán et al., 2021), entstand hierbei durch eine Immunantwort, welche durch Injektionen mit gefriergetrockneten Kälberhirn- und Plazentazellen ausgelöst wurde (Jellinger and Seitelberger, 1958; Seitelberger et al., 1958; Höftberger et al., 2015). Der Antikörper 8-18C5 hingegen wurde durch Immunisierung einer Maus mit cerebralen Ratten-Glycoproteinen generiert, welche zusätzlich die Injektion mit Freund-Adjuvans beinhaltete (Linnington et al., 1984; Beltrán et al., 2021). Zwar wurden beide untersuchten Antikörper durch eine Immunisierung mit verschiedenen Fremd-Antigenen gebildet, die Aminosäuresequenzen der verschiedenen MOG-Varianten sind jedoch stark konserviert (Clements et al., 2003). Beide Antikörper sind gegen ein ähnliches Epitop gerichtet, obwohl auch andere Strukturen, beispielsweise der AA'-Loop (Abbildung 28), aufgrund einer guten Antikörper-Zugänglichkeit eine Zielstruktur darstellen könnten. Frühere Studien zeigten hierbei, dass anti-MOG-Antikörper ein breites Spektrum an MOG-Epitopen erkennen können (Mayer et al. 2013; Spadaro et al., 2018; Tea et al., 2019). Da diese Antikörper aus Patienten isoliert wurden, für welche die Ursache der Krankheitsentstehung nicht bekannt ist, kann die Ursache dieser unterschiedlichen Epitope nicht ermittelt werden (Beltrán et al., 2021). Eine mögliche Ursache könnten Konformationsänderungen von hMOG aufgrund weiterer Immunantworten oder vorheriger Erkrankungen sein, wodurch der FG-Loop im Vergleich zu anderen extrazellulären Sekundärstrukturen zugänglicher für eine Antikörper-Antwort ist.

Durch die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse kann eine mögliche Krankheitsentstehung des Patienten rekonstruiert werden. So wurde durch mehrere Injektionen von gefriergetrockneten Kälberhirn- und Plazentazellen im Patienten eine Immunantwort ausgelöst, welche sich gegen hMOG richtete (Jellinger and Seitelberger, 1958; Seitelberger et al., 1958; Höftberger et al., 2015). Dies konnte durch die starke Homologie, die die verschiedenen MOG-Varianten unterschiedlicher Spezies zueinander aufweisen, ermöglicht werden. Dies könnte zudem eine mögliche Ursache für die Ähnlichkeit des rAb-hAE-Epitops zu jenem von r8-18C5 sein, da in beiden Fällen eine Immunisierung durch Fremd-Antigene stattfand (Beltrán et al., 2021).

In weiteren Untersuchungen konnte durch Manuela Paunovic und Naoto Kawakami gezeigt werden, dass der Antikörper rhAE-hAE in vivo zu einer Demyelinisierung im Rückenmark führt, wenngleich diese weniger stark ausgeprägt ist als nach Injektion des Antikörpers r8-18C5 (Beltrán et al., 2021). Da auch für den Patienten Demyelinisierungen im Gehirn nachgewiesen wurden, welche jenen der Multiplen Sklerose ähneln (Höftberger et al., 2015; Beltrán et al., 2021), ist eine Pathogenität des Antikörpers sehr wahrscheinlich. Aus Hirnschnitten des Patienten konnte zudem eine hohe Anzahl von CD8+ Zellen nachgewiesen werden (Höftberger et al., 2015), welche ebenfalls bei der MS in einer hohen Anzahl vorhanden sind (Van Nierop et al., 2017; Machado-Santos et al., 2018). Die Krankheit weist jedoch auch Kennzeichen der Akuten disseminierten Enzephalomyelitis (ADEM) auf, da das Bindungsmuster von rAb-hAE ähnlich zu jenem eines Antikörpers ist, welcher aus einem ADEM-Patienten isoliert wurde (Beltrán et al., 2021; Mayer et al. 2013). Es konnte dadurch gezeigt werden, dass der beschriebene hAE-Fall sowohl Merkmale der MS, der ADEM, der experimentellen autoimmunen Enzephalitis (EAE; Höftberger et al., 2015) und weiterer MOG-Antikörper assoziierter Erkrankungen (MOGAD; Beltrán et al., 2021) aufweist. Zukünftige Untersuchungen könnten hierbei zu einem besseren Verständnis dieser Krankheiten und ihrer Entstehung beitragen, insbesondere durch Vergleich der T-Zellpopulationen aus Gehirnproben, der Identifikation des Antigens bzw. dessen Epitops und der Analyse weiterer immunhistologischer Marker. Die Analyse weiterer hAE-Fälle gestaltet sich hierbei jedoch schwierig, da nur sehr wenige Krankheitsfälle bekannt sind, welche durch Injektionen mit gefriergetrocknetem Hirngewebe ausgelöst wurden (Beltrán et al., 2021).

4.3 Mimotop-Suche des IP2-TCRs durch Library-Screening

4.3.1 Optimierung des T-Zell-Aktivierungsassays

Für die vorliegende Arbeit wurde das Vorgehen bei der Antigensuche verglichen mit der von K. Siewert et al. (2012) etablierten Methode und jener, welche in meiner Masterarbeit (Gebert, 2018) verwendet wurde, weiter modifiziert. Hierfür wurden einige Schritte an mehreren Stellen abgeändert. So wurden die angereicherten peptid-codierenden Sequenzen

nach der nested-PCR nicht in den Vektor pcDNA™3.1/V5-His TOPO kloniert, sondern nach Restriktionsverdau in den Vektor pcDNArc ligiert. Der Grund hierfür lag an dem Auftreten von Deletionen des CMV-Promotors aus einer früheren Antigen suche, welche zudem kurz vor der TOPO-recognition site 1 lagen (Gebert, 2018). Durch Verlust des CMV-Promotors war eine Expression der potentiellen Antigen-Peptide nicht mehr möglich, wodurch eine T-Zell-Aktivierung und eine Anreicherung positiver Plasmide ausgeschlossen war. Da diese Deletionen bereits in einer früheren Arbeit an der identischen Position auftraten (Schönwetter-Steer, 2014), wurde in dieser Arbeit auf eine TOPO-Klonierung verzichtet. Zwar wurde der in dieser Arbeit ebenfalls verwendete Ausgangspool 8L-NEUI ebenfalls durch Klonierung in den Vektor pcDNA™3.1/V5-His TOPO generiert, jedoch waren zu diesem Zeitpunkt noch keine Deletionen in den Sequenzen der verwendeten Plasmide vorhanden (Abbildung 23 in Gebert, 2018).

Des Weiteren wurde auf ein Pooling der einzelnen PCR-Produkte verzichtet und die Klonierung und Analyse der einzelnen angereicherten Plasmide pro Pick wurde separat durchgeführt. Zwar wurde durch ein Poolen von einzelnen Picks die Wahrscheinlichkeit höher, dass das gesuchte antigen-codierende Plasmid vorhanden ist und nach Expression des Mimotops zu einer T-Zell-Aktivierung führt, jedoch werden positive Plasmide durch dieses Vorgehen zusätzlich verdünnt, wodurch ein Auftreten von aktivierten T-Zell-Clustern unwahrscheinlicher wird. Da sich in COS-7-Zellen bis zu 5000 verschiedene Plasmide befinden können (Gerard and Gluzman 1985; Siewert, 2011), können positive Plasmide in einer sehr hohen Verdünnung vorliegen, weshalb eine zusätzliche Verdünnung antigen-codierender Plasmide verhindert werden sollte.

Aus diesem Grund wurde auch keine zweite Entnahme von antigenpräsentierenden COS-7-Zellen durchgeführt, da während der Zellentnahme eine Aufnahme von nicht-transfizierten Plasmiden durch die Glaskapillare möglich war. Die Aufnahme dieser zusätzlichen Plasmide konnte zwar durch das zweimalige Waschen der Zellen mit vorgewärmtem RPMI-co verringert, jedoch nicht ganz verhindert werden. Eine zweite Zellentnahme hätte zudem ein zusätzliches Risiko durch den potentiellen Verlust positiver Plasmide darstellen können, da während der COS-7-Entnahme durch Einwirkung von Scherkräften durch die Glaskapillare

ein Platzen der Zellen verursacht werden kann, wodurch Plasmide aus der Zelle gelangen und dadurch nicht angereichert werden können (Abbildung 27 in Rühl, 2016).

Ab der Co-Kultivierung wurden die Zellen in RPMI-co ohne Phenolrot kultiviert. Der Grund hierfür war die Verringerung des Hintergrundsignals durch den pH-Indikator, da die GFP-Expression der IP2-T-Zell-Hybridome nach Aktivierung durch Bindung des TCRs mit dem HLA-Peptid-Komplex vergleichsweise geringer war als jene Aktivierung durch einen anti-mCD3ε-Antikörper. Da Phenolrot zu einem starken Anstieg des Hintergrundsignals während der Mikroskopie führen kann (Stadtfeld et al., 2005), konnte durch die Verwendung von RPMI-co ohne Phenolrot eine bessere Detektion aktivierter IP2-Hybridome herbeigeführt werden.

Einen großen Vorteil stellte die Verwendung von COS-7-Zellen dar, welche stabil mit HLA-codierenden Plasmiden transfiziert wurden. Durch diese Methode, welche von Julia Hansen (Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München, AG Dornmair) etabliert und beschrieben wurde (Hansen, 2021), war es möglich, dass die doppelte Menge an Library-DNA transfiziert werden konnte, wodurch eine höhere Transfektionseffizienz und daraus folgend eine höhere Expression der codierten Peptide ermöglicht wurde. Zudem konnte durch die homogene Expression ein höherer Anteil an Zellen erreicht werden, welche tatsächlich Library-codierte Peptide auf ihrem HLA präsentierten (Siewert, 2011). Ein weiterer Vorteil bestand in der Sortierung der COS-7-Zellen, da durch die Verwendung eines HLA-BFP-Fusionsproteins nur Zellen weiterkultiviert wurden, für welche eine hohe HLA-Expression nachgewiesen wurde (Daten nicht gezeigt). Da nur für wenige der humanen HLAs monoklonale Antikörper erhältlich sind, ist die stabile Transfektion von HLA-BFP-codierenden Vektoren mit nachfolgendem FACS-sorting eine vorteilhafte Methode, um eine Präsentation der Library-codierten Peptide auf den zu untersuchenden HLAs zu gewährleisten.

4.3.2 Einflüsse auf die Anreicherung antigen-codierender Plasmide und Ausblick

Die Identifizierung eines Mimotops des IP2-TCRs war in dieser Arbeit nicht möglich. Da eine Reaktivierung positiver Picks nicht erfolgreich war (3.3.5), wurde der aus einer früheren Arbeit stammende Pool 8L-NEUI (Gebert, 2018) für die weitere Antigensuche als Ausgangspool verwendet. Zwar konnten für jede weitere Runde der Subpool-Analyse aktivierte IP2-T-Zell-Hybridome aufgefunden werden, sodass eine Analyse von Einzelklonen durchgeführt werden konnte, jedoch konnte für letztere keine T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden (3.3.6). Zudem konnte keine signifikante Zunahme der Anzahl an aktivierten T-Zell-Clustern aufgefunden werden, welche jedoch mit fortschreitender Anreicherung antigen-codierender Plasmide erwartet wurde (Siewert, 2011). Eine Untersuchung von weiteren Subpools, welche ebenfalls aus dem Ausgangspool 8L-NEUI stammen, führte ebenfalls zu keiner Reaktivierung, wodurch diese nicht für eine weitere Anfertigung von neuen Subpools verwendet wurden (Daten nicht gezeigt).

Eine erste Herausforderung der Antigen-Suche stellte die Identifizierung des IP2-TCR-spezifischen HLAs dar. Da das für die GABA_A-Rezeptor-Enzephalitis krankheitsrelevante HLA nicht bekannt war, musste dieses für IP2 vorher bestimmt werden. HLAs gleichen Isotyps wurden daher in einer ersten Runde der Antigen-Suche gleichzeitig untersucht und zusätzlich, da die Länge des gebundenen Antigen-Peptids ebenfalls unbekannt war, mit einer Mischung der beiden Peptid-Libraries N24 und N27 auf eine T-Zell-Aktivierung analysiert (Tabelle 3, 3.3.3). In einer zweiten Runde wurden HLAs gleichen Isotyps einzeln mit der Peptid-Library N24, N27 oder N30 untersucht (Tabelle 4, 3.3.3). Erst anschließend fand eine Analyse einzelner HLAs statt, welche ebenfalls mit den einzelnen Peptid-Libraries untersucht wurden (Tabelle 5, 3.3.3). Diese Vorgehensweise hatte den Vorteil, dass einerseits eine mögliche HLA-Restriktion während der Untersuchungen ersichtlich werden konnte und andererseits während der ersten beiden Runden ein Zeitersparnis durch die Analyse von mehreren Ansätzen gleichzeitig ermöglicht wurde. Durch diese Vorgehensweise konnte die Länge des präsentierten Peptids auf eine Länge von 8-9 aa eingegrenzt werden, da keine T-Zell-Aktivierung nach Transfektion der N30-Library nachweisbar war. Die HLA-Kombination C*04:01/C*16:01 mit einer N27-Library wies mit insgesamt 17 aufgefundenen T-Zell-Clustern die höchste Anzahl aktivierter IP2-T-Zell-Hybridome auf, jedoch konnte nach Analyse der

einzelnen HLA-Isotypen mit dieser Library keine T-Zell-Aktivierung nachgewiesen werden, weshalb anschließend die übrigen HLAs ebenfalls einzeln mit den zugehörigen Libraries analysiert wurden. Auch hier konnte das krankheitsrelevante HLA nicht eindeutig bestimmt werden, da zwar für das HLA-B*35:01 in Kombination mit einer N24- bzw. N27-Library je 41 Cluster nachgewiesen wurden, für die HLAs A*23:01 und A*02:01 hingegen auch 21 bzw. 20 Cluster. Zwar wurde die Entnahme von COS-7-Zellen für jene Zellen priorisiert, welche das HLA-B*35:01 exprimierten und mit einer N27-Library transfiziert wurden, jedoch wurden auch Zellen entnommen, welche eine HLA-Kombination exprimierten (Tabelle 6, 3.3.3). Dadurch, dass die HLA-Restriktion nicht eindeutig bestimmt werden konnte, wurde die Antigen-Suche stark erschwert, da es sich bei dem Auftreten von T-Zell-Clustern lediglich um autoaktivierte Zellen handeln könnte, wodurch das Risiko bestand, dass falsch positive Picks für das weitere Vorgehen verwendet wurden. Diese autoreaktiven Zellen wurden in allen Ansätzen vorgefunden, jedoch handelte es sich meistens um einzelne oder zwei in unmittelbarer Nähe zueinander vorliegende Hybridome. Diese autoreaktiven Zellen wurden selbst für COS-7-Zellen aufgefunden, welche nicht mit einer Library transfiziert wurden (Daten nicht gezeigt). Um dieses Risiko zu verringern, wurden für die Analyse der T-Zell-Aktivierungsassays nur T-Zell-Cluster berücksichtigt, welche eine Mindestanzahl von drei aktivierten Hybridomen hatten. Das für den IP2-TCR spezifische HLA konnte bereits in früheren Arbeiten (Plappert, 2016; Gebert, 2018) nicht eindeutig identifiziert werden, wodurch nochmals verdeutlicht wird, dass die Bestimmung der HLA-Restriktion eine herausfordernde Aufgabe ist.

Neben dem Auftreten von autoaktivierten Zellen, konnten Hybridome, welche sich nach ihrer Aktivierung von der antigenpräsentierenden COS-7-Zelle wegbewegten, zu einer Entnahme von falsch positiven APCs führen. Dieses Verhalten von aktivierten T-Zell-Hybridomen wurde bereits in früheren Arbeiten beobachtet (Plappert, 2016; Rühl, 2016) und könnte eventuell mit einem veränderten Versuchsaufbau eingeschränkt werden. Hierfür wird die Library-DNA per Nukleofektion in COS-7-Zellen transfiziert, welche anschließend gleichmäßig in Wells einer 384-well Platte verteilt werden. Die Co-Kultivierung der T-Zell-Hybridome und das Screening positiver Zellen erfolgt anschließend analog zum Versuchsaufbau für 3,5-cm Schalen, hätte jedoch den Vorteil, dass aufgrund des geringeren Volumens pro Well ein Abwandern aktivierter Hybridome vernachlässigbar wäre. Ein weiterer Vorteil dieser Methode stellt die Entnahme positiver COS-7-Zellen dar, da alle

Zellen aus einem positiven Well per Trypsinverdau abgelöst und für eine PCR verwendet werden können. Dadurch würde ein Verlust von antigen-codierenden Plasmiden ebenfalls stark verringert werden, da die Zellentnahme durch Verwendung einer Glaskapillare nicht notwendig ist, wodurch ein Platzen positiver COS-7-Zellen so gut wie ausgeschlossen werden kann. Die Nutzung von 384-Well Platten wurde für diese Arbeit getestet, jedoch wuchsen die transfizierten COS-7-Zellen nur in den Ecken der Wells (Daten nicht gezeigt). In der Mitte der Wells konnten hingegen nur tote COS-7-Zellen aufgefunden werden, wohingegen co-kultivierte IP2-Hybridome ausschließlich in der Well-Mitte vorhanden waren. Ein T-Zell-Aktivierungsassay in 384-well Platten konnte daher nicht durchgeführt werden.

Da sich eine mögliche Zytotoxizität der exprimierten Antigen-Peptide nicht ausschließen ließ, könnte die erschwerte Antigen-Suche auch durch diesen Effekt verursacht worden sein. Spezifische Antigen-Peptide könnten hierbei mit einer Vielzahl intrazellulärer Proteine wie Enzymen interagieren und diese hemmen. Auch eine Interaktion mit DNA oder mRNA, welche zu einer Inhibierung der Transkription bzw. Translation führt, könnte zu einem Absterben positiver COS-7-Zellen führen. Daraus würde sich ableiten, dass nur falsch positive COS-7 isoliert wurden, wodurch eine Anreicherung antigen-codierender Plasmide nicht möglich wäre.

Positive antigen-codierende Sequenzen konnten auch während der Elektroporation verloren gehen. Eine Überprüfung, ob diese Sequenzen tatsächlich in *E. coli* transformiert und vervielfältigt wurden, konnte nur durch den anschließenden Reaktivierungsversuch durchgeführt werden. Zudem können positive Plasmide auch während des Subpoolings verloren gehen. Entscheidend ist hierbei vor allem die bestimmte Bakterienzahl nach der Elektroporation bzw. nach jeder Runde der Subpool-Anfertigung. Eine tatsächliche Klonzahl der Suspensionskulturen, welche kleiner ist als die durch Auszählen der Platten bestimmte Klonzahl, kann dazu führen, dass positive Plasmide nicht in den Subpools vorhanden sind, wodurch eine Mimotop-Identifizierung nicht mehr möglich ist.

Eine weitere Optimierung des T-Zell-Aktivierungsassays zur Identifizierung von T-Zell-Antigenen könnte durch die Verwendung von 96-well Platten erfolgen. Dieser Ansatz hätte die gleichen Vorteile wie der getestete Versuchsaufbau in 384-well Platten, sodass durch das parallele Screening mehrerer Wells und der anschließenden Entnahme der antigenpräsentierenden COS-7-Zellen einerseits eine Anreicherung positiver antigen-

codierender Sequenzen erfolgt und andererseits das Risiko eines Verlustes jener Sequenzen verringert werden kann. Dieses Vorgehen ist jedoch wenig effektiv, da durch die gleichzeitige Entnahme mehrerer tausend Zellen positive Plasmide stark verdünnt vorliegen. Eine Reaktivierung der positiven Plasmide könnte daher schwer detektierbar sein, wodurch sich die Anzahl der Subpool-Runden ebenfalls erhöhen würde. Die Vorgehensweise der Antigen-Suche sollte daher genau abgewägt werden, da sowohl die Zellentnahme per Glaskapillare, als auch eine Antigen-Suche über die Entnahme ganzer Wells sowohl Vor- als auch Nachteile mit sich bringt.

5. Literaturverzeichnis

Abbas A. K., Lichtman A. H. and Pillai, S. (2007): Cellular and molecular immunology, *Saunders Elsevier*, 6th edition

Albert M. L., Austin L. M. and Darnell R. B. (2000): Detection and treatment of activated T cells in the cerebrospinal fluid of patients with paraneoplastic cerebellar degeneration, *Annals of Neurology*, 47, 9-17

Arakawa A. Siewert K., Stöhr J., Besgen P., Kim S.-M., Rühl G., Nickel J., Vollmer S., Thomas P., Krebs S., Pinkert S., Spannagl M., Held K., Kammerbauer C., Besch R., Dornmair K., Prinz J. C. (2015): Melanozyte antigen triggers autoimmunity in human psoriasis, *The Journal of experimental medicine*, 212, 2203-2212

Arden B., Clark S. P., Kabelitz D. and Mak T. W. (1995): Human T-cell receptor variable gene segment families, *Immunogenetics*, 42, 455-500

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

Balaguer D. D. G. (1888): Un caso de paralitica, *Gazeta Medica Catalana*, 11, 45–57

Barber E. K., Dasgupta J. D., Schlossman S. F., Trevillyan J. M. and Rudd C.E. (1989): The CD4 and CD8 antigens are coupled to a protein-tyrosine kinase (p56lck) that phosphorylates the CD3 complex, *PNAS*, 86, 3277-3281

Barnard E. A., Skolnick P., Olsen R. W., Mohler H., Sieghart W., Biggio G., Braestrup C., Bateson A. N. and Langer S. Z. (1998): International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of γ -Aminobutyric Acid_A Receptors: Classification on the basis of subunit structure and receptor function, *Pharmacological Reviews*, 50, 291-313

Beltrán E., Paunovic M., Gebert D., Cesur E., Jeitler M., Höftberger R., Malotka J., Mader S., Kawakami N., Meinl E., Bradl M., Dornmair K. and Lassmann H. (2021): Archeological neuroimmunology: resurrection of a pathogenic immune response from a historical case sheds light on human autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis, *Acta Neuropathologica*, 141, 67-83

Benyahia B., Liblau R., Merle-Béral H., Tourani J. M., Dalmau J. and Delattre J. Y. (1999): Cell-mediated autoimmunity in paraneoplastic neurological syndromes with anti-Hu antibodies, *Annals of Neurology*, 45, 162-167

Berger T. and Reindl M. (2015): Antibody biomarkers in CNS demyelinating diseases - a long and winding road, *European Journal of Neurology*, 22, 1162-1168

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, *European Journal of Immunology*, 23, 3057-3065

Bouvier M. and Wiley D. C. (1994): Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of MHC class I molecules, *Science*, 265, 398-402

Bracher A., Alcalá C., Ferrer J., Melzer N., Hohlfeld R., Casanova B., Beltrán E. and Dornmair K. (2020): An expanded parenchymal CD8⁺ T cell clone in GABA_A receptor encephalitis, *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 7, 239-244

Brändle S. M. (2016): Analysis of oligoclonal band antibodies from patients with neurological diseases, Dissertation, Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Brändle S. M., Obermeier B., Senel M., Bruder J., Mentele R., Khademi M., Olsson T., Tumani H., Kristoferitsch W., Lottspeich F., Wekerle H., Hohlfeld R. and Dornmair K. (2016): Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins, *PNAS*, 113, 7864-7869

Brändle S. M., Cerina M., Weber S., Held K., Menke A. F., Alcalá C., Gebert D., Herrmann A. M., Pellkofer H., Gerdes L. A., Bittner S., Leyboldt F., Teegen B., Komorowski L., Kümpfel T., Hohlfeld R., Meuth S.G., Casanova B., Melzer N., Beltrán E. and Dornmair K. (2021): Cross-reactivity of a pathogenic autoantibody to a tumor antigen in GABA_A receptor encephalitis, *PNAS*, 118

Breithaupt C., Schubart A., Zander H., Skerra A., Huber R., Linington C. and Jacob U. (2003): Structural insights into the antigenicity of myelin oligodendrocyte glycoprotein, *PNAS*, 100, 9446-9451

Breithaupt C., Schäfer B., Pellkofer H., Huber R., Linington C. and Jacob U. (2008): Demyelinating myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific autoantibody response is focused on one dominant conformational epitope region in rodents, *Journal of Immunology*, 181, 1255–1263

Bruder J., Siewert K., Obermeier B., Malotka J., Scheinert P., Kellermann J., Ueda T., Hohlfeld R. and Dornmair K. (2012): Target specificity of an autoreactive pathogenic human $\gamma\delta$ -T cell receptor in myositis, *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 20986-20995

Buck C. A. (1992): Immunoglobulin superfamily: structure, function and relationship to other receptor molecules, *Seminars in Cell Biology*, 3, 179-188

Chen L., Long X., Duan S., Liu X., Chen J., Lan J., Liu X., Huang W., Geng J. and Zhou J. (2020): CSRP2 suppresses colorectal cancer progression via p130Cas/Rac1 axis-mediated ERK, PAK, and HIPPO signaling pathways, *Theranostics*, 10, 11063-11079

Clements C. S., Reid H. H., Beddoe T., Tynan F. E., Perugini M. A., Johns T. G., Bernard C. C. and Rossjohn J. (2003): The crystal structure of myelin oligodendrocyte glycoprotein, a key autoantigen in multiple sclerosis, *PNAS*, 100, 11059-11064

Clevers H., Alarcon B., Wileman T. and Terhorst C. (1988): The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble, *Annual Review of Immunology*, 6, 629–662

Cusick M. F., Libbey J. E. and Fujinami R. S. (2012): Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease, *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, 42, 102-111

Dalmau J. and Rosenfeld M. R. (2008): Paraneoplastic syndromes of the CNS, *Lancet Neurology*, 7, 327-340

Dalmau J., Tüzün E., Wu H. Y., Masjuan J., Rossi J. E., Voloschin A., Baehring J. M., Shimazaki H., Koide R., King D., Mason W., Sansing L. H., Dichter M. A., Rosenfeld M. R. and Lynch D. R. (2007): Paraneoplastic anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis associated with ovarian teratoma, *Annals of Neurology*, 61, 25-36

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

Dornmair K., Goebels N., Weltzien H.-U., Wekerle H. and Hohlfeld R. (2003): T-Cell-Mediated Autoimmunity: Novel Techniques to Characterize Autoreactive T-Cell Receptors, *The American Journal of Pathology*, 163, 1215-1226

Forthal D. N. (2014): Functions of Antibodies, *Microbiology Spectrum*, 2, 1-17

Gebert D. (2018): Charakterisierung von Antigenen bei paraneoplastischer Enzephalitis, Masterarbeit, Universität Bayreuth

Gerard R. D. and Gluzman Y. (1985): New host cell system for regulated simian virus 40 DNA replication, *Molecular and Cellular Biology*, 5, 3231-3240

Germain R. N. (2002): T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision, *Nature Reviews*, 2, 309-322

Gfeller D. and Bassani-Sternberg M. (2018): Predicting Antigen Presentation-What Could We Learn From a Million Peptides?, *Frontiers in Immunology*, 9, 1716

Giles C. M., Walport M. J., David J., Darke C. (1987): Expression of MHC class I determinants on erythrocytes of SLE patients, *Clinical and Experimental Immunology*, 69, 368-374

Gluzman Y. (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants, *Cell*, 23, 175-182

Golombeck K. S., Bönte K., Mönig C., van Loo K. M., Hartwig M., Schwindt W., Widman G., Lindenau M., Becker A. J., Glatzel M., Elger C. E., Wiendl H., Meuth S. G., Lohmann H., Gross C. C. and Melzer N. (2016): Evidence of a pathogenic role of CD8+ T cells in anti-GABA_B receptor limbic encephalitis, *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation*, 3

Gong S. and Ruprecht R. M. (2020): Immunoglobulin M: An Ancient Antiviral Weapon – Rediscovered, *Frontiers in Immunology*, 11

Graham F. L., Smiley J., Russel W. C. and Nairn R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *Journal of General Virology*, 36, 59-72

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, *Journal of Immunological Methods*, 192, 149-155

Hansen J. (2021): Immune repertoires of monozygotic twins discordant for multiple sclerosis, Dissertation, Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Harty J. T., Tinnereim A. R. and White D. W. (2000): CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection, *Annual Review of Immunology*, 18, 275-308

Höftberger R., Leisser M., Bauer J. and Lassmann H. (2015): Autoimmune encephalitis in humans: how closely does it reflect multiple sclerosis?, *Acta Neuropathologica Communications*, 3, 80

Hoffmann C., Mao X., Dieterle M., Moreau F., Al Absi A., Steinmetz A., Oudin A., Berchem G., Janji B. and Thomas C. (2016): CRP2, a new invadopodia actin bundling factor critically promotes breast cancer cell invasion and metastasis, *Oncotarget*, 7, 13688-13705

Holtmeier W. and Kabelitz D. (2005): Gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses, *Chemical immunology and allergy*, 86, 151-183

Hosie A. M., Dunne E. L., Harvey R. J. and Smart T. G. (2003): Zinc-mediated inhibition of GABA_A receptors: discrete binding sites underlie subtype specificity, *Nature Neuroscience*, 6, 362-369

Hussain A. F., Grimm A., Sheng W., Zhang C., Al-Rawe M., Bräutigam K., Abu Mraheil M., Zeppernick F. and Meinhold-Heerlein I. (2021): Toward Homogenous Antibody Drug Conjugates Using Enzyme-Based Conjugation Approaches, *Pharmaceuticals (Basel)*, 14

Jacob T. C., Moss S. M. and Jurd R. (2008): GABAA receptor trafficking and its role in the dynamic modulation of neuronal inhibition, *Nature Reviews Neuroscience*, 9, 331-343

Janeway C. A. Jr., Murphy K., Travers P. and Walport M. (2014): Immunologie, *Springer Spektrum*, 7. Edition

Jellinger K. and Seitelberger F. (1958): Akute tödliche Entmarkungs-Encephalitis nach wiederholten Hirntrockenzellen-Injektionen, *Klinische Wochenschrift*, 36, 437-441

Jung D. and Alt F. W. (2004): Unraveling V(D)J recombination; insights into gene regulation, *Cell*, 116, 299-311

Kägi D., Vignaux F., Ledermann B., Bürki K., Depraetere V., Nagata S. Hengarter H. and Golstein P. (1994): Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity, *Science*, 265, 528-530

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), *Nature Reviews Immunology*, 14, 377-391

Kornum B. R., Knudsen S., Ollila H. M., Pizza F., Jennum P. J., Dauvilliers Y. and Overeem S. (2017): Narcolepsy, *Nature Reviews Disease Primers*, 3

Kumar H., Kawai T. and Akira S. (2011): Pathogen recognition by the innate immune system, *International Reviews of Immunology*, 30, 16-34

Lassmann H. and Bradl M. (2017): Multiple sclerosis: experimental models and reality, *Acta Neuropathologica*, 133, 223-244

Leahy D. J., Axel R. and Hendrickson W. A. (1992): Crystal structure of a soluble form of the human T cell coreceptor CD8 at 2.6 Å resolution, *Cell*, 68, 1145–1162

Leyboldt F. and Wandinger K. -P. (2013): Paraneoplastic neurological syndromes, *Clinical and Experimental Immunology*, 175, 336-348

Li A., Rue M., Zhou J., Wang H., Goldwasser M. A., Neuberger D., Dalton V., Zuckerman D., Lyons C., Silverman L. B., Sallan S. E. and Gribben J. G. (2004): Utilization of Ig heavy chain variable, diversity, and joining gene segments in children with B-lineage acute lymphoblastic leukemia: implications for the mechanisms of VDJ recombination and for pathogenesis, *Blood*, 103, 4602-4609

Li L., Dong M. and Wang X. G. (2016): The Implication and Significance of Beta 2 Microglobulin: A Conservative Multifunctional Regulator, *Chinese Medical Journal (English)*, 129, 448-455

Li Y., Yin Y., Mariuzza R.A. (2013): Structural and biophysical insights into the role of CD4 and CD8 in T cell activation, *Frontiers in Immunology*, 4, 206

Linnington C., Webb M. and Woodhams P. L. (1984): A novel myelin-associated glycoprotein defined by a mouse monoclonal antibody, *Journal of Neuroimmunology*, 6, 387-396

Louis H. A., Pino J. D., Schmeichel K. L., Pomiès P. and Beckerle M. C. (1997): Comparison of three members of the cysteine-rich protein family reveals functional conservation and divergent patterns of gene expression, *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 484-491

Love P. E. and Hayes S. M. (2010): ITAM-mediated Signaling by the T-Cell Antigen Receptor, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2

Lu L. L., Suscovich T. J., Fortune S. M. and Alter G. (2018): Beyond binding: antibody effector functions in infectious diseases, *Nature Reviews Immunology*, 18, 46-61

Machado-Santos J., Saji E., Tröscher A. R., Paunovic M., Liblau R., Gabriely G., Bien C. G., Bauer J. and Lassmann H. (2018): The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells, *Brain*, 41, 2066-2082

Macian F. (2005): NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function, *Nature Reviews Immunology*, 5, 472-484

Masdeu J. C., Dalmau J. and Berman K. F. (2016): NMDA receptor internalization by autoantibodies: A reversible mechanism underlying psychosis?, *Trends in neurosciences*, 39, 300-310

Matthews J. M., Lester K. Joseph S. and Curtis D. J. (2013): LIM-domain-only proteins in cancer, *Nature Reviews Cancer*, 13, 111-122

Mayer M. C., Breithaupt C., Reindl M., Schanda K., Rostásy K., Berger T., Dale R. C., Brilot F., Olsson T., Jenne D., Pröbstel A. K., Dornmair K., Wekerle H., Hohlfeld R., Banwell B., Bar-Or A. and Meinl E. (2013): Distinction and temporal stability of conformational epitopes on myelin oligodendrocyte glycoprotein recognized by patients with different inflammatory central nervous system diseases, *Journal of Immunology*, 191, 3594-3604

Miceli M. C. and Parnes J. R. (1993): Role of CD4 and CD8 in T cell activation and differentiation, *Advances in Immunology*, 53, 59-122

Midorikawa Y., Tsutsumi S., Taniguchi H., Ishii M., Kobune Y., Kodama T., Makuuchi M. and Aburatani H. (2002): Identification of genes associated with dedifferentiation of hepatocellular carcinoma with expression profiling analysis, *Japanese Journal of Cancer Research*, 93, 636-643

Möhler H. (2006): GABA_A receptor diversity and pharmacology, *Cell and Tissue Research*, 326, 505-516

Nakayamada S., Takahashi, H., Kanno Y. and O'Shea J. J. (2012): Helper T cell diversity and plasticity, *Current opinion in immunology*, 24, 297-302

Neefjes J., Jongasma M L., Paul P. and Bakke O. (2011): Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation, *Nature Reviews Immunology*, 11, 823-836

Nicholson L. B. (2016): The immune system, *Essays in Biochemistry*, 60, 275-301

Nossal G. J. (1994): Negative selection of thymocytes, *Cell*, 76, 229-239

Ohkawa T., Satake S., Yokoi N., Miyazaki Y., Ohshita T., Sobue G., Takashima H., Watanabe O., Fukata Y. and Fukata M. (2014): Identification and characterization of GABA_A receptor autoantibodies in autoimmune encephalitis, *Journal of Neuroscience*, 34, 8151-8163

Okazaki I. M., Kinoshita K., Muramatsu M., Yoshikawa K. and Honjo T. (2002): The AID enzyme induces class switch recombination in fibroblasts, *Nature*, 416, 340-345

Paludan S. R., Pradeu T., Masters S. L. and Mogensen T. H. (2021): Constitutive immune mechanisms: mediators of host defence and immune regulation, *Nature Reviews Immunology*, 21, 137-150

Parker, D. C. (1993): T Cell-Dependent B Cell Activation, *Annual Review of Immunology*, 11, 331-360

Peled J. U., Kuang F. L., Iglesias-Ussel M. D., Roa S., Kalis S. L., Goodman M. F. and Scharff M. D. (2008): The biochemistry of somatic hypermutation, *Annual Review of Immunology*, 26, 481-511

Perreault C. (1981): Serologic properties of antigens HLA-A, B and C, *Canadian Medical Association Journal*, 124, 690-697

Petit-Pedrol M., Armangue T., Peng X., Bataller L., Celluci T., Davis R., McCracken L., Martinez-Hernandez E., Mason W. P., Kruer M. C., Ritacco D. G., Grisold W., Meaney B. F., Alcalá C., Sillevs-Smitt P., Titulaer M. J. Balice-Gordon R., Graus F. and Dalmau J. (2014): Encephalitis with refractory seizures, status epilepticus, and antibodies to the GABA_A receptor: a case series, characterisation of the antigen, and analysis of the effects of antibodies, *The Lancet Neurology*, 13, 276-286

Pieper K., Grimbacher B. and Eibel H. (2013): B-cell biology and development, *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 131, 959-971

Plappert A. (2016): Analysis of disease-related T cell receptors and their antigens in GABA_A Receptor encephalitis, Dissertation, Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Prüss H. (2021): Autoantibodies in neurological disease, *Nature Reviews Immunology*, 21, 798-813

Rasmussen M., Harndahl M., Stryhn A., Boucherma R., Nielsen L. L., Lemonnier F. A., Nielsen M. and Buus S. (2014): Uncovering the peptide-binding specificities of HLA-C: a general strategy to determine the specificity of any MHC class I molecule, *The Journal of Immunology*, 193, 4790-4802

Rudolph M. G., Stanfield R. L. and Wilson I. A. (2006): How TCRs bind MHC, and coreceptors, *Annual Review of Immunology*, 24, 419-466

Rühl G. (2016): Untersuchungen zur Antigenerkennung von T-Zellen bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen, Dissertation, Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

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

Sánchez-García I. and Rabbitts T.H. (1994): The LIM domain: a new structural motif found in zinc-finger-like proteins, *Trends in Genetics*, 10, 315-320

Schatz D. G., Oettinger M. A. and Schlessel M. S. (1992): V(D)J recombination: molecular biology and regulation, *Annual Review of Immunology*, 10, 359-383

Schatz D. G. and Ji Y. (2011): Recombination centres and the orchestration of V(D)J recombination, *Nature Reviews Immunology*, 11, 251-263

Schlick B., Massoner P., Lueking A., Charoentong P., Blattner M., Schaefer G., Marquart K., Theek C., Amersdorfer P., Zielinski D., Kirchner M., Trajanoski Z., Rubin M. A., Müllner S., Schulz-Knappe P. and Klockner H. (2016): Serum autoantibodies in chronic prostate inflammation in prostate cancer patients, *PLOS ONE*, 11

Schönwetter-Steer M. (2014): Analyse autoreaktiver T-Zellen zur Identifizierung arithrogener Peptide bei der HLA-B27-assoziierten Reaktiven Arthritis, Dissertation, Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

Schofield P. R., Darlison M. G., Fujita N., Burt D. R., Stephenson F. A., Rodriguez H., Rhee L. M., Ramachandran J., Reale V., Glencorse T. A., Seeburg P. H. and Barnard E. A. (1987): Sequence and functional expression of the GABA_A receptor shows a ligand-gated receptor super-family, *Nature*, 328, 221-227

Schroeder H. W. Jr. and Cavacini L. (2010): Structure and function of immunoglobulins, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125, S41-52

Seitelberger F., Jellinger K. and Tschabitscher H. (1958): Zur Genese der akuten Entmarkungsenzephalitis, *Wiener Klinische Wochenschrift*, 70, 453–459

Shaw J. P., Utz P. J., Durand D. B., Toole J. J., Emmel E. A., and Crabtree G. R. (1988): Identification of a putative regulator of early T cell activation genes, *Science*, 241, 202-205

Siewert K. (2011): Autoaggressive human T cell receptors and their antigen specificities, Dissertation, Institut für Klinische Neuroimmunologie, Ludwig-Maximilians-Universität München

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, *Nature Medicine*, 18, 824-828

Sigel E. and Steinmann M. E. (2012): Structure, function and modulation of GABA (A) receptors, *Journal of Biological Chemistry*, 287, 40224-40231

Simabukuro M. M., Petit-Pedrol M., Castro L. H., Nitrini R., Lucato L., Zambon A. A., Silva L. G., Fortes G. C. R., Soares Neto H. R. and Dalmau J. O. (2015): GABA_A receptor and LG1 antibody encephalitis in a patient with thymoma, *Neurology- Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 2

Smart T. G. and Stephenson F. A. (2019): A half century of γ -aminobutyric acid, *Brain and Neuroscience Advance*, 3

Somogyi P., Takagi H., Richards J. G. and Mohler H. (1989): Subcellular localization of benzodiazepine/GABA_A receptors in the cerebellum of rat, cat and monkey using monoclonal antibodies, *The Journal of Neuroscience*, 9, 2197-2209

Spadaro M., Winklmeier S., Beltrán E., Macrini C., Höftberger R., Schuh E., Thaler F. S., Gerdes L. A., Laurent S., Gerhards R., Brändle S., Dornmair K., Breithaupt C., Krumbholz M., Moser M., Krishnamoorthy G., Kamp F., Jenne D., Hohlfeld R., Kümpfel T., Lassmann H., Kawakami N. and Meinl E. (2018): Pathogenicity of human antibodies against myelin oligodendrocyte glycoprotein, *Annals of Neurology*, 84, 315-328

Spatola M., Petit-Pedrol M., Simabukuro M. M., Armangue T., Castro F. J., Barcelo Artigues M. I., Julià Benique M. R., Benson L., Gorman M., Felipe A., Caparó Oblitas R. L., Rosenfeld M. R., Graus F. and Dalmau J. (2017): Investigations in GABA_A receptor antibody-associated encephalitis, *Neurology*, 88, 1012-1020

Srivastava S. K. and Robins H.S. (2012): Palindromic nucleotide analysis in human T cell receptor rearrangements, *PLOS ONE*, 7

Stadtfeld M., Varas F. and Graf T. (2005): Fluorescent protein- cell labelling and its application in time-lapse analysis of hematopoietic differentiation, *Methods in Molecular Medicine*, 105, 395-412

Straus D. B. and Weiss A. (1993): The CD3 chains of the T cell antigen receptor associate with the ZAP-70 tyrosine kinase and are tyrosine phosphorylated after receptor stimulation, *Journal of Experimental Medicine*, 178, 1523–1530

Tea F., Lopez J. A., Ramanathan S., Merheb V., Lee F. X. Z., Zou A., Pilli D., Patrick E., van der Walt A., Monif M., Tantsis E. M., Yiu E. M., Vucic S., Henderson A. P. D., Fok A., Fraser C. L., Lechner-Scott J., Reddel S. W., Broadley S., Barnett M. H., Brown D. A., Lunemann J. D., Dale R. C., Brilot F.; Australasian and New Zealand MOG Study Group (2019): Characterization of the human myelin oligodendrocyte glycoprotein antibody response in demyelination, *Acta Neuropathologica Communications*, 7

Treanor B. (2012): B-cell receptor: from resting state to activate, *Immunology*, 136, 21-27

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 Nierop G. P., van Luijn M. M., Michels S. S., Melief M. J., Janssen M., Langerak A. W., Ouwendijk W. J. D., Hintzen R. Q. and Verjans G. M. G.M. (2017): Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients, *Acta Neuropathologica*, 134, 383-401

Vidarsson G., Dekkers G. and Rispens T. (2014): IgG subclasses and allotypes: from structure to effector functions, *Frontiers in Immunology*, 5

Wang S.-J., Wang P.-Z., Gale R. P., Qin Y.-Z., Liu Y.-R., Lai Y.-Y., Jiang H., Jiang Q., Zhang X.-H., Jiang B., Xu L.-P., Huang X.-J., Liu K.-Y. and Ruan G.-R. (2017): Cysteine and glycine-rich protein 2 (CSRP2) transcript levels correlate with leukemia relapse and leukemia-free survival in adults with B-cell acute lymphoblastic leukemia and normal cytogenetics, *Oncotarget*, 8, 35984-36000

Weiskirchen R. and Günther K. (2003): The CRP/MLP/TLP family of LIM domain proteins: acting by connecting, *Bioassays: News and Reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 25, 152-162

Wekerle H. (1992): Myelin specific, autoaggressive T cell clones in the normal immune repertoire: Their nature and their regulation, *International Reviews of Immunology*, 9, 231-241

Wieczorek M., Abualrous E. T., Sticht J., Álvaro-Benito M., Stolzenberg S., Noé F. and Freund C. (2017): Major histocompatibility complex (MHC) class I and MHC class II proteins: Conformational plasticity in antigen presentation, *Frontiers in Immunology*, 8, 1-16

Wilson R. K., Lai E., Concannon P., Barth R. K., and Hood L. E. (1988): Structure, organization and polymorphism of murine and human T cell receptor alpha and beta chain gene families, *Immunological Reviews*, 101, 149-171

Wong W. K., Leem J. and Deane C. M. (2019): Comparative Analysis of the CDR Loops of Antigen Receptors, *Frontiers in Immunology*, 10

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., Peakman M. and Sewell A. K. (2012): A single autoimmune T cell receptor recognizes more than a million different peptides, *The Journal of Biological Chemistry*, 287, 1168-1177

Wraith D. C., Nicolson K. S. and Whitley N. T. (2004): Regulatory CD4+ T cells and the control of autoimmune disease, *Current Opinion in Immunology*, 16, 695-701

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., Huseby E. S., Krakauer D. C., Nemazee D., Perelson A. S., Pinilla C., Strong R. K. and Sercarz E. E. (2007): Polyspecificity of T cell and B cell Receptor Recognition, *Seminars in Immunology*, 19, 216-224

Yewdell J. W., Reits E. and Neefjes J. (2003): Making sense of mass destruction: Quantitating MHC class I antigen presentation, *Nature Reviews*, 3, 952-961

Zhang Y., Joe G., Hexner E., Zhu J. and Emerson S. G. (2005): Alloreactive memory T cells are responsible for the persistence of graft-versus-host disease, *The Journal of Immunology*, 174, 3051-3058

6. Anhang

6.1 Vektorkarten

pTriEx-1 sequence landmarks

CMV ie enhancer region	832–1196
Chicken actin promoter region	1202–1479
Mammalian transcription start	1480
T7 promoter	1904–1920
T7 transcription start	1921
<i>lac</i> operator	1925–1945
p10 promoter region	1959–2072
p10 transcription start	2003–2004
Multiple cloning sites (<i>Nco</i> I– <i>Dra</i> III)	2085–2266
HSV•Tag [®] coding sequence	2195–2230
His•Tag [®] coding sequence	2237–2260
Rabbit globin terminator region	2440–2554
T7 terminator	2558–2605
pUC origin	4236
<i>bla</i> coding sequence	4839–5696

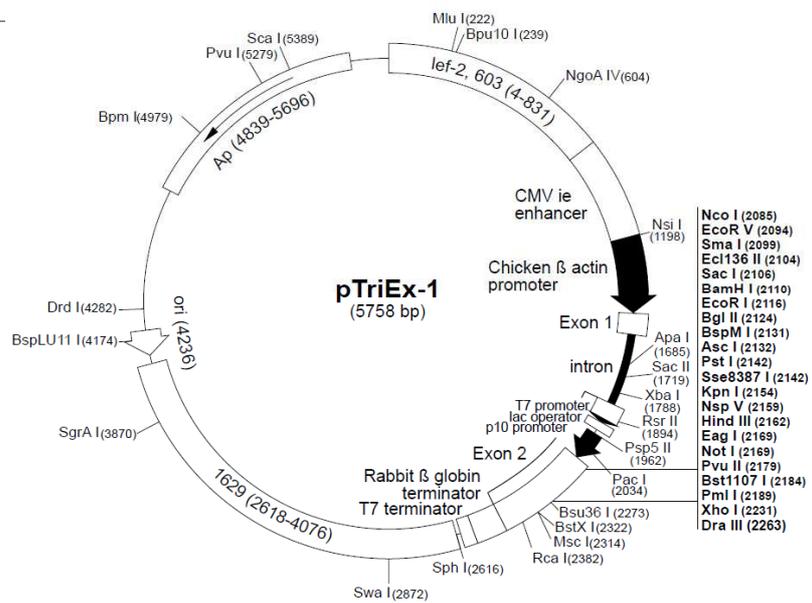


Abbildung 29: Vektorkarte von pTriEx-1 (Novagen[®]).

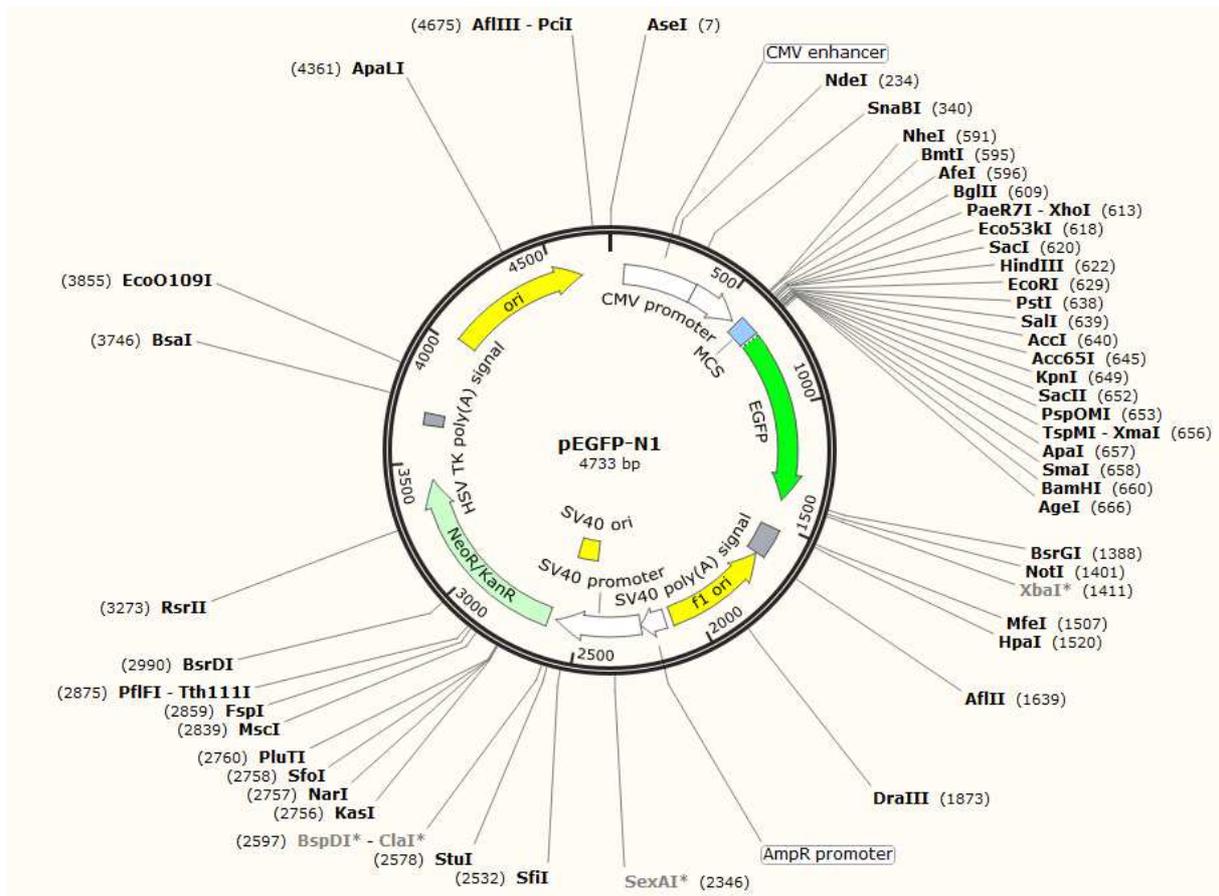


Abbildung 30: Vektorkarte von pEGFP-N1. Die Vektorkarte wurde mit dem Programm SnapGene (GSL Biotech LLC) konstruiert.

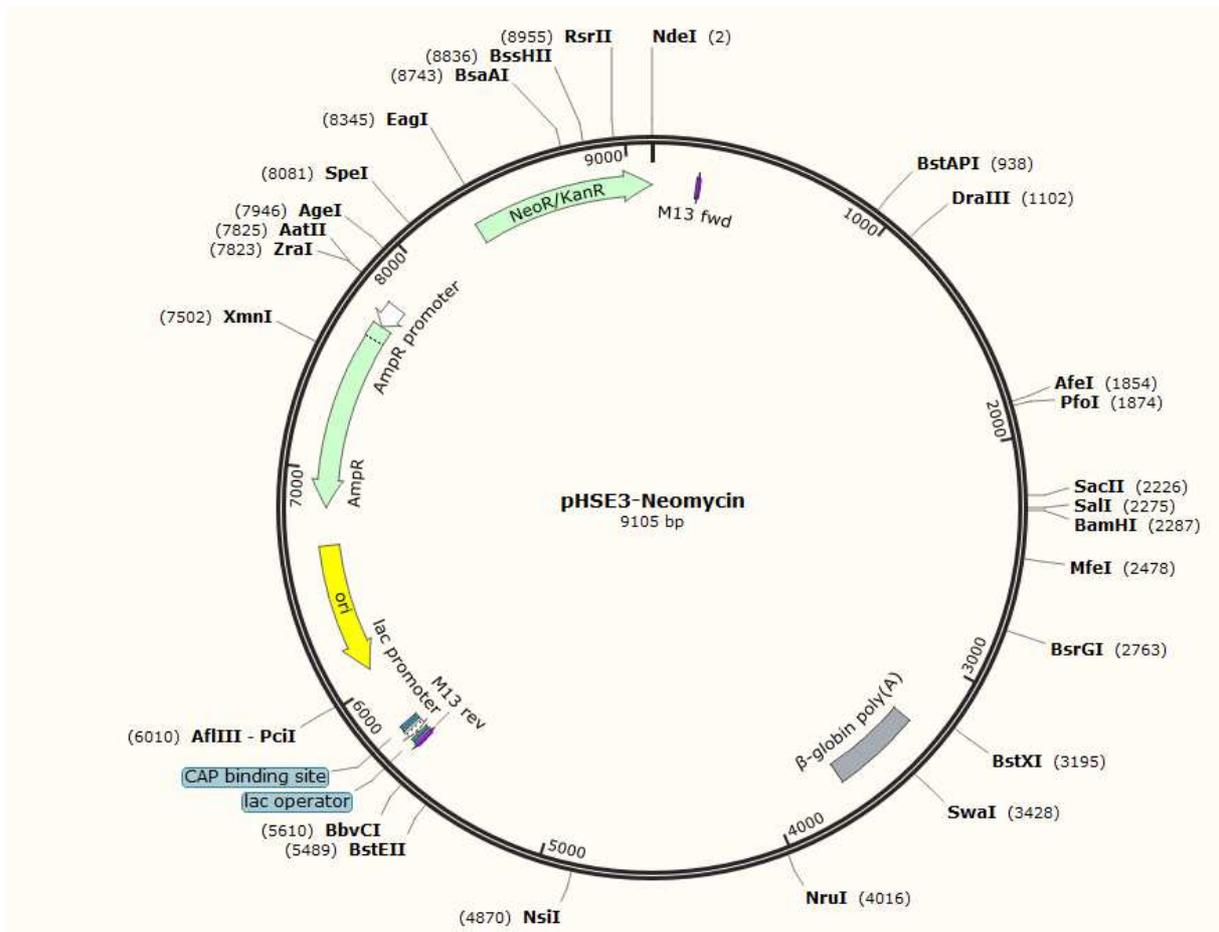
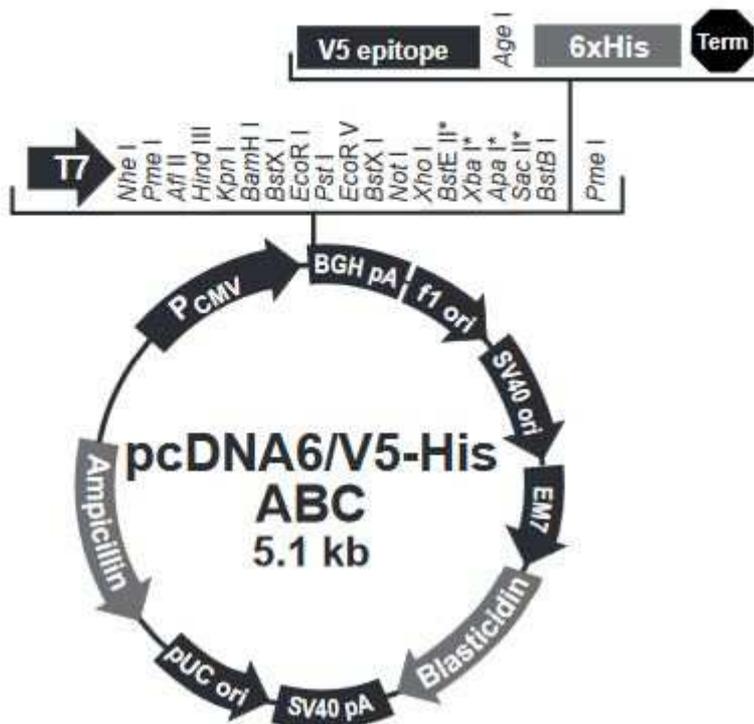


Abbildung 31: Vektorkarte von pHSE3'-neo. Die Vektorkarte wurde mit dem Programm SnapGene (GSL Biotech LLC) konstruiert.

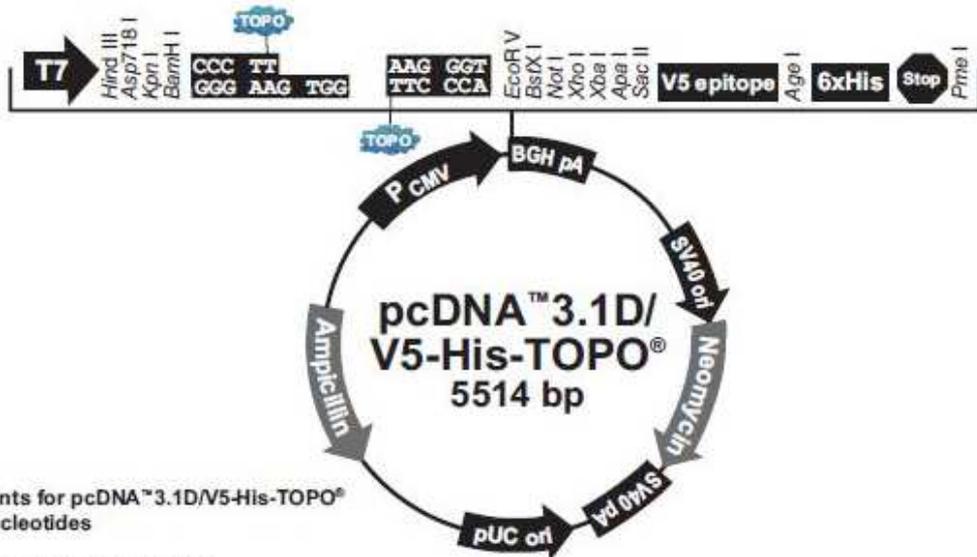


**Comments for pcDNA6/V5-His A
5144 nucleotides**

CMV promoter: bases 209-863
 T7 promoter priming site: bases 863-882
 Multiple cloning site: bases 895-1008
 V5 epitope: bases 1009-1050
 Polyhistidine tag: bases 1060-1077
 BGH reverse priming site: bases 1100-1117
 BGH polyadenylation sequence: bases 1103-1330
 f1 origin: bases 1376-1804
 SV40 promoter and origin: bases 1832-2139
 EM7 promoter: bases 2187-2242
 Blastidicin resistance gene (ORF): bases 2261-2659
 SV40 early polyadenylation sequence: bases 2817-2947
 pUC origin: bases 3330-4003
 Ampicillin resistance gene (ORF): bases 4148-5008

* Frame-dependent variations.
 Sac II is only found in version B.
 BstE II is only found in version C. In
 addition, there are no Xba I or Apa I
 sites in version C.

Abbildung 32: Vektorkarte von pcDNA6/V5-HisABC (Thermo Fisher Scientific). Nach der Ligation einer spacer-Sequenz in den Vektor wurde der neue Vektor als pcDNArc-Spacer bezeichnet. Diese spacer-Sequenz mit einer Größe von ca. 2500 bp entstammte dem Plasmid pLNCX durch *AscI/NotI*-Verdau. Durch Insertion der spacer-Sequenz konnte der Vektor anschließend gleichzeitig mit den beiden Restriktionsenzymen *AscI* und *NotI* verdaut werden und dadurch für eine Ligation von amplifizierten PCR-Produkten schnell eingesetzt werden (Siewert et al., 2012).



**Comments for pcDNA[™] 3.1D/V5-His-TOPO[®]
5514 nucleotides**

- CMV promoter: bases 232-819
- T7 promoter/priming site: bases 863-882
- TOPO[®] recognition site 1: bases 930-934
- Overhang sequence (complementary strand): bases 935-938
- TOPO[®] recognition site 2: bases 939-943
- V5 epitope: bases 1011-1052
- Polyhistidine (6xHis) tag: bases 1062-1079
- BGH reverse priming site: bases 1102-1119
- BGH polyadenylation signal: bases 1108-1332
- SV40 early promoter and origin: bases 1833-2142
- Neomycin resistance gene: bases 2217-3011
- SV40 early polyadenylation signal: bases 3189-3319
- pUC origin: bases 3700-4373 (complementary strand)
- Ampicillin (*bla*) resistance gene: bases 4518-5378 (complementary strand)
- bla* promoter: bases 5379-5477 (complementary strand)

Abbildung 33: Vektorkarte von pcDNA[™]3.1/V5-His TOPO (Thermo Fisher Scientific).

6.2 Insertsequenzen

GABA_AR-A1

ATGAGGAAAAGTCCAGGTCTGTCTGACTGTCTTTGGGCCTGGATCCTCCTTCTGAGCACACT
GACTGGAAGAAGCTATGGACAGCCGTCATTACAAGATGAACTTAAAGACAATACCACTGTCT
TCACCAGGATTTTGGACAGACTCCTAGATGGTTATGACAATCGCCTGAGACCAGGATTGGGA
GAGCGTGTAACCGAAGTGAAGACTGATATCTTCGTCACCAGTTTCGGACCCGTTTCAGACCA
TGATATGGAATATACAATAGATGTATTTTTCCGTCAAAGCTGGAAGGATGAAAGGTTAAAAT
TTAAAGGACCTATGACAGTCCCTCCGGTTAAATAACCTAATGGCAAGTAAAATCTGGACTCCG
GACACATTTTTCCACAATGGAAAGAAGTCAGTGGCCCACAACATGACCATGCCCAACAACT
CCTGCGGATCACAGAGGATGGCACCTTGCTGTACACCATGAGGCTGACAGTGAGAGCTGAAT
GTCCGATGCATTTGGAGGACTTCCCTATGGATGCCCATGCTTGCCCACTAAAATTTGGAAGT
TATGCTTATACAAGAGCAGAAGTTGTTTATGAATGGACCAGAGAGCCAGCACGCTCAGTGGT
TGTAGCAGAAGATGGATCACGTCTAAACCAGTATGACCTTCTTGGACAAACAGTAGACTCTG
GAATTGTCCAGTCAAGTACAGGAGAATATGTTGTTATGACCACTCATTTCCACTTGAAGAGA
AAGATTGGCTACTTTGTTATTCAAACATACCTGCCATGCATAATGACAGTGATTCTCTCACA
AGTCTCCTTCTGGCTCAACAGAGAGTCTGTACCAGCAAGAACTGTCTTTGGAGTAACAACCTG
TGCTCACCATGACAACATTGAGCATCAGTGCCAGAACTCCCTCCCTAAGGTGGCTTATGCA
ACAGCTATGGATTGGTTTATTGCCGTGTGCTATGCCTTTGTGTTCTCAGCTCTGATTGAGTT
TGCCACAGTAAACTATTTCACTAAGAGAGGTATGCATGGGATGGCAAAGTGTGGTTCCAG
AAAAGCCAAAGAAAGTAAAGGATCCTCTTATTAAGAAAAACAACACTTACGCTCCAACAGCA
ACCAGCTACACCCCTAATTTGGCCAGGGGCGACCCGGGCTTAGCCACCATTGCTAAAAGTGC
AACCATAGAACCTAAAGAGGTCAAGCCCGAAACAAAACCACCAGAACCCAAGAAAACCTTTA
ACAGTGTGACGAAAATTGACCGACTGTCAAGAATAGCCTTCCCGCTGCTATTTGGAATCTTT
AACTTAGTCTACTGGGCTACGTATTTAAACAGAGAGCCTCAGCTAAAAGCCCCCACACCACA
TCAATAG

**MRKSPGLSDCLWAWILLSTLTGRSYGQPSLQDELKDNTTVFTRILDRLLDGYDNRLRPGLG
ERVTEVKTDIFVTSFGPVS DHDMEYTI DVFFRQSWKDERLKF KGPMTVLRNLNLMASKI WTP
DTFFHNGKKSVAHNMTMPNKLLRIT EDGTL LYTMRLTVRAECPMHLEDFPMDAHACPLKFGS
YAYTRAEVVYEWTR EPARSVVVAEDGSRLNQYDLLGQTVD S GIVQSSTGEYVVMTHFHLKR
KIGYFVIQTYLPCIMTVILSQVSFWLNRESVPARTVFGVTTVLTMTTLSISARNSLPKVAYA
TAMDWFIAVCYAFVFSALIEFATVNYFTKRGYAWDGKSVVPEKPKVKDPLIKKNNTYAPTA
TSYTPNLARGDPGLATIAKSATIEPKVKPETKPPKPTFNSVSKIDRLSRIAFPLLF GIF
NLVYWATYLNREPQLKAPTPHQ**

GABA_AR-B3

ATGTGGGGCCTTGC GGGAGGAAGGCTTTTCGGCATCTTCTCGGCCCCGGTGCTGGTGGCTGT
GGTGTGCTGCGCCAGAGTGTGAACGATCCCGGGAACATGTCCTTTGTGAAGGAGACGGTGG
ACAAGCTGTTGAAAGGCTACGACATTTCGCTAAGACCCGACTTCGGGGGTCCCCGGTCTGC
GTGGGGATGAACATCGACATCGCCAGCATCGACATGGTTTCCGAAGTCAACATGGATTATAC
CTTAACCATGTATTTTCAACAATATTGGAGAGATAAAAAGGCTCGCCTATTCTGGGATCCCTC
TCAACCTCACGCTTGACAATCGAGTGGCTGACCAGCTATGGGTGCCCGACACATATTTCTTA
AATGACAAAAAGTCATTTGTGCATGGAGTGACAGTGAAAAACCGCATGATCCGTCTTCACCC
TGATGGGACAGTGCTGTATGGGCTCAGAATCACCACGACAGCAGCATGCATGATGGACCTCA
GGAGATACCCCCTGGACGAGCAGAAGTGCCTCTGGAAATTGAAAGCTATGGCTACACCAG
GATGACATTGAGTTTTACTGGCGAGGCGGGGACAAGGCTGTTACCGGAGTGAAAGGATTGA
GCTCCCGCAGTTCTCCATCGTGGAGCACCGTCTGGTCTCGAGGAATGTTGTCTTCGCCACAG
GTGCCTATCCTCGACTGTCCTGAGCTTTTCGGTTGAAGAGGAACATTGGATACTTCATTCTT
CAGACTTATATGCCCTCTATACTGATAACGATTCTGTCTGGGTGTCCTTCTGGATCAATTA
TGATGCATCTGCTGCTAGAGTTGCCCTCGGGATCACAACCTGTGCTGACAATGACAACCATCA
ACACCCACCTTCGGGAGACCTTGCCCAAATCCCCTATGTCAAAGCCATTGACATGTACCTT
ATGGGCTGCTTCGTCTTTGTGTTCCCTGGCCCTTCTGGAGTATGCCTTTGTCAACTACATTTT
CTTTGGAAGAGGCCCTCAAAGGCAGAAGAAGCTTGCAGAAAAGACAGCCAAGGCAAAGAATG
ACCGTTCAAAGAGCGAAAGCAACCGGTGGATGCTCATGGAAATATTCTGTTGACATCGCTG
GAAGTTCACAATGAAATGAATGAGGTCTCAGGCGGCATTGGCGATACCAGGAATTCAGCAAT
ATCCTTTGACAACCTCAGGAATCCAGTACAGGAAACAGAGCATGCCTCGAGAAGGGCATGGGC
GATTCTTGGGGGACAGAAGCCTCCCGCACAAGAAGACCCATCTACGGAGGAGGTCTTCACAG
CTCAAAATTAATAACCTGATCTAACCGATGTGAATGCCATAGACAGATGGTCCAGGATCGT
GTTTCCATTCACTTTTTTCTCTTTTCAACTTAGTTTACTGGCTGTACTATGTTAACTGA

**MWGLAGGRLFGIF SAPVLVAVVCCAQSVNDP GNMSFVKETVDKLLKGYDIRLRPDFGGPPVC
VGMNIDIASIDMVSEVNMDYTLTMYFQQYWRDKRLAYSGIPLNLTLDNRVADQLWVPDITYFL
NDKKSFVHGVTVKNRMIRLHPDGTVLYGLRITTTAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESYGYTT
DDIEFYWRGGDKAVTGVERIELPQFSIVEHRLVSRNVFATGAYPRLSLSFRLKRNIGYFIL
QTYMPSILITILSWVSEFWINYDASAARVALGITTVLTMTTINTHLRETLPKIPYVKAIDMYL
MGCFFVVF LALLEYAFVNYIFFGRGPQRQKLAEKTA KAKNDRSKSESNRVDAHGNILLTSL
EVHNEMNEVSGGIGDTRNSAISFDNSGIQYRKQSM PREGHGRFLGDRSLPHKKTHLRRRSSQ
LKIKIPDLTDVNAIDRWSRIVEPFTFSLFNLVYWLYYVN**

hMOG

ATGGCAAGCTTATCAAGACCCTCTCTGCCAGCTGCCTCTGCTCCTTCCTCCTCCTCCTCCTCCA
AGTGTCTTCCAGCTATGCAGGGCAGTTCAGAGTGATAGGACCAAGACACCCTATCCGGGCTCTGGTCCG
GGGATGAAGTGGAATTGCCATGTGCGATATCTCCTGGGAAGAACGCTACAGGCATGGAGGTGGGGTGG
TACCGCCCCCTTCTCTAGGGTGGTTCATCTCTACAGAAATGGCAAGGACCAAGATGGAGACCAGGC
ACCTGAATATCGGGGCCGGACAGAGCTGCTGAAAGATGCTATTGGTGAGGGAAAGGTGACTCTCAGGA
TCCGGAATGTAAGGTCTCAGATGAAGGAGGTTTACCTGCTTCTTCCGAGATCATTCTTACCAAGAG
GAGGCAGCAATGGAATTGAAAGTAGAAGATCCTTTCTACTGGGTGAGCCCTGGAGTGCTGGTTCTCCT
CGCGGTGCTGCCTGTGCTCCTCCTGCAGATCACTGTTGGCCTCGTCTTCTCCTCCTGCCTGCAGTACAGAC
TGAGAGGAAAACCTTCGAGCAGAGATAGAGAATCTCCACCGGACTTTTGATCCCCACTTTCTGAGGGTG

CCCTGCTGGAAGATAACCCTGTTTGTAAATTGTGCCGGTTCTTGGACCCTTGGTTGCCTTGATCATCTG
CTACAACCTGGCTACATCGAAGACTAGCAGGGCAATTCCTTGAAGAGCTACGAAATCCCTTC

**MASLSRPSLPSC LCSFLLLLLLQVSSSYAGQFRVIGPRHP IRALVGDEVELPCRI SPGKNAT
GMEVGWYRPPFSRVVHLYRNGKDQDQDAPEYRGRTELLKDAIGEGKVTLRIRNVRF SDEGG
FTCFRDSYQEEAAMELKVEDPFYWVSPGVLVLLAVLPVLLLQITVGLIFLCLQYRLRGKL
RAEIENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALI ICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF**

mMOG

ATGAAGCAGAGCTGCCGTGCCGCATCTCTCCTGGGAAAAATGCCACGGGCATGGAGGTGGGT
TGGTACCGTTCTCCCTTCTCAAGAGTGGTTCACCTCTACCGAAATGGCAAGGACCAAGATGC
AGAGCAAGCACCTGAATACCGGGAACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGACTATCAGTGAGGGAA
AGGTTACCCTTAGGATTCAGAACGTGAGATTCTCAGATGAAGGAGGCTACACCTGCTTCTTC
AGAGACCACTCTTACCAAGAAGAGGCAGCAATGGAGTTGAAAGTGGAAGATCCCTTCTATTG
GGTCAACCCCGGTGTGCTGACTCTCATCGCACTTGTGCCTACGATCCTCCTGCAGGTCCCTG
TAGGCCTTGTATTCTTCTCCTGCAGCACAGACTGAGAGGAAAACCTCGCGCAGAAGTAGAG
AATCTCCATCGGACTTTTGTATCCTCACTTCCCTGAGGGTGCCCTGCTGGAAGATAAACTGTT
TGTTATTGTGCCTGTTCTTGGACCCCTGGTTGCCTTGATCATCTGCTACAACCTGGCTGCACC
GAAGACTGGCAGGACAGTTTCTTGAAGAGCTAAGAAACCCCTTTTGA

**MACLWSFSWPSCFLSLLLLLLQLSCSYAGQFRVIGPGYP IRALVGDEAEELPCRI SPGKNATG
MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKETISEGKVTLRIQNVRF SDEGGY
TCFRDHSYQEEAAMELKVEDPFYWNPGVLTLLIALVPTILLQVPVGLVFLFLQHRLRGKLR
AEVENLHRTFDPHFLRVPCWKITLFVIVPVLGPLVALI ICYNWLHRRLAGQFLEELRNPF**

rMOG

ATGAAGCAGAACTGCCGTGCCGTATATCTCCTGGGAAGAATGCCACGGGCATGGAGGTGGGG
TGGTACCGTTCTCCCTTTTCAAGAGTAGTTTATCTGTACCGAAATGGCAAGGACCAAGACGC
AGAGCAAGCGCCTGAATACCGGGGACGCACAGAGCTTCTGAAAGAGTCTATCGGCGAGGGAA
AGGTTGCCCTCAGGATCCAGAACGTGAGGTTCTCGGATGAAGGAGGCTACACATGCTTCTTC
AGAGACCACTCTTACCAAGAAGAAGCCGCCGTGGAGTTGAAAGTAGAAGATCCCTTCTACTG
GATCAACCCTGGCGTGCTGGCTCTCATTGCCCTTGTGCCTATGCTGCTCCTGCAGGTCTCTG
TAGGCCTTGTATTCTTCTCCTGCAGCACAGACTGAGAGGAAAACCTCCGTGCAGAAGTCGAG
AATCTCCATCGGACTTTTGTATCCTCACTTCCCTGAGAGTGCCCTGCTGGAAGATAAACTGTT
TGTTATTGTCCCTGTTCTTGGACCCCTGGTTGCTTTGATCATCTGCTACAACCTGGCTGCACC
GAAGACTGGCAGGACAGTTTCTTGAAGAGCTAAGAAACCCCTTTTGA

**MAGVWSLSLPSCLLSLLLLLQLSRSYAGQFRVIGPGHP IRALVGDEAELPCRISP GK NATGM
EVGWYRSPFSRVVHLYRNGKDQDAEQAPEYRGRTELLKESIGEGKVALRIQNVRF SDEGGYT
CFFRDHSYQEEAAVELKVEDPFYWINPGVLALIALVPM LLLQVSVGLVFLFLQHRLRGKLRA
EVENLHRTFDPHFLRVPCWKITL FVIVPVLGPLVALI ICYNWLHRRLAGQFLEELRNP F**

pcDNArc-spacer

CGGCCAGTCTTCCGATAGACTGCGTCGCCCGGGTACCCGTATTCCCAATAAAGCCTCTTGC
TGTTTGCATCCGAATCGTGGTCTCGCTGTTCCCTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTA
CCCACGACGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATTTGGAGACCCCTGCCAGGGAC
CACCGACCCACCACCGGGAGGTAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGATTGTCTA
GTGTCTATGTTTGTATGTTATGCGCCTGCGTCTGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTG
GCGGACCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCTGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCA
GGGACTTTGGGGCCGTTTTTTGTGGCCCGACCTGAGGAAGGGAGTCGATGTGGAATCCGACC
CCGTCAGGATATGTGGTTCTGGTAGGAGACGAGAACCCTAAAACAGTTCCTCCCTCCGTCTGA
ATTTTTGCTTTCGGTTTTGGAACCGAAGCCGCGCTCTTGTCTGCTGCAGCGCTGCAGCATCG
TTCGTGTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTAGGGCCAGACTGTT
ACCACTCCCTTAAGTTTTGACCTTAGGTCACTGGAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAACCA
GTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTA
ACGTCGGATGGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAG
GTCTTTTACCTGGCCCGCATGGACACCCAGACCAGGTCCCTACATCGTGACCTGGGAAGC
CTTGGCTTTTGACCCCTCCCTGGGTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTC
TTCCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTTCGACCCCGCCTCGATCCTCC
CTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCGGAATTCCGATCTGATCAAGAGACAGGAT
GAGGATCGTTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTG
GAGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTT
CCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGA
ATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCTTGGCGCA
GCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGG
GCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAA
TGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGC
ATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGA
GCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCG
AGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGC
TTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTT
GGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGCTTT
ACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTC
TGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATAT
ATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCC
CCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATT
GACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCAT
ATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCA
GTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTA
CCATGGTGTATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCACGGGGA
TTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTTGGCACAAAATCAACGGGA
CTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGT
GGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCGCTAGCGCTACCGGACT
CAGATCTCGAGCTCAAGCTTGTTTTGGCCGAGGC

pcDNA-sGFP

ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGG
CGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCA
AGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCTCGTG
ACCACCTTCACATATGGCGTGCAGTGCTTACGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGA
CTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACG
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATC
GAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAA
CTTCAACAGCCACAACGTATAACATCATGGCTGACAAGCAGAAGAACGGAATCAAGGCCAACT
TCAAGACCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGGCTGCAGCTGGCCGACCACTACCAGCAGAAC
ACCCCAATTGGCGATGGCCCTGTCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGC
CCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTG
CTGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATAACAAGGGATCCCATCACCATCACCATCACTAA

**MVSKGEELFTGVVPILEVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGKLTLLKFICTTGKLPVPWP TLV
TTF TYGVQCF SRYPDHMKQHDFFKSAMPEGYVQERTIFFKDDGNYKTRAEVKFEGDTLVNRI
ELKGI DFKEDGNILGHKLEYNFNSHNVIIMADKQKNGIKANFKTRHNIEDGGVQLADHYQQN
TPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLLLEFVTAAGITHGMDELYKGSHHHHH**

pHSE3'-HLA-A*02:01

ATGGCCGTCATGGCGCCCCGAACCCTCGTCCCTGCTACTCTCGGGGGCTCTGGCCCTGACCCA
GACCTGGGCGGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTACATCCGTGTCCCAGCCCGGCCGCG
GGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGC
GACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGTCCGGAGTA
TTGGGACGGGGAGACACGGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAGTGGACCTGGGGA
CCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGTTCTCACACCGTCCAGAGGATGTATGGC
TGCGACGTGGGGTCGGACTGGCGCTTCTCCGCGGGTACCACCAGTACGCCTACGACGGCAA
GGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGGACCGCGGCGGACATGGCAGCTCAGA
CCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCCATGTGGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGC
ACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGA
CGCCCCAAAACGCATATGACTCACACGCTGTCTCTGACCATGAAGCCACCCTGAGGTGCT
GGGCCCTGAGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAG
ACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGC
GGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAGGAGCAGAGATAACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTT
TGCCCAAGCCCCTCACCTGAGATGGGAGCCGTCTTCCCAGCCCACCATCCCATCGTGGGC
ATCATTGCTGGCCTGGTTCTCTTTGGAGCTGTGATCACTGGAGCTGTGGTTCGCTGCTGTGAT
GTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGACA
GTGCCAGGGCTCTGATGTGTCCCTCACAGCTTGTAAGTGTGA

**MAVMAPRTLVLVLLLSGALALTQTWAGSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMPEPRAPWIEQEGPEYWDGETRQVKAHSQTHRVDLGTLRGYNQSEAGSHTVQORMYG
CDVGSDWRFRLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEG
TCVEWLRRLYLENGKETLQRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFPYAEITLTWQRDGEDQ
TQDTELVE TRPAGDGTFOKWAAVVVP SGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPPSSQPTIPVIG
IIAGLVLF GAVITGAVVAAVMWRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSVDVSLTACKV**

pHSE3'-HLA-A*23:01

ATGGCCGTCATGGCGCCCCGAACCCTCGTCCTGCTACTCTCGGGGGCCCTGGCCCTGACCCA
GACCTGGGCAGGCTCCCCTCCATGAGGTATTTCTCCACATCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCG
GGGAGCCCCGCTTCATCGCCGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGC
GACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGGCCGGAGTA
TTGGGACGAGGAGACAGGGAAAGTGAAGGCCACTCACAGACTGACCGAGAGAACCTGCGGA
TCGCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGTTCTCACACCCTCCAGATGATGTTTGGC
TGCGACGTGGGGTCGGACGGGCGCTTCTCCGCGGGTACCACCAGTACGCCTACGACGGCAA
GGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGACCCGCGGCGGACATGGCGGCTCAGA
TCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGTGGCGGAGCAGTTGAGAGCCTACCTGGAGGGC
ACGTGCGTGGACGGGCTCCGCAGATACTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCACGGA
CCCCCCCCAAGACACATATGACCCACCACCCCATCTCTGACCATGAGGCCACTCTGAGATGCT
GGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAG
ACCCAGGACACGGAGCTTGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGC
AGCTGTGGTGGTACCTTCTGGAGAGGAGCAGAGATAACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTC
TGCCCAAGCCCCCTCACCTGAGATGGGAGCCATCTTCCCAGCCCACCGTCCACATCGTGGGC
ATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGAGCTGTGATCACTGGAGCTGTGGTTCGCTGCTGTGAT
GTGGAGGAGGAACAGCTCAGATAGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGACA
GTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACAGCTTGTAAGTGTGA

**MAVMAPRTLVLVLLLSGALALTQTWAGSHSMRYFSTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASQRMPEPRAPWIEQEGPEYWDEETGKVKHAHSQTDRENLRALRYNQSEAGSHTLQMMFG
CDVGSDGRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQITQRKWEAARVAEQLRAYLEG
TCVDGLRRYLENGKETLQRTDPPKTHMTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQ
TQDTELVE TRPAGDGTFOKWAAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPPSSQPTVHIVG
IIAGLVLLGAVITGAVVAAVMWRNRNSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSVDVSLTACKV**

pHSE3'-HLA-B*35:01

ATGCGGGTCACGGCGCCCCGAACCGTCCTCCTGCTGCTCTGGGGGGCAGTGGCCCTGACCGA
GACCTGGGCCGGCTCCCCTCCATGAGGTATTTCTACACCGCCATGTCCCGGCCCGGCCGCG
GGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGAGGTTTCGACAGC
GACGCCGCGAGTCCGAGGACGGAGCCCCGGGCGCCATGGATAGAGCAGGAGGGGCCGGAGTA
TTGGGACCGGAACACACAGATCTTCAAGACCAACACACAGACTTACCGAGAGAGCCTGCGGA
ACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACATCATCCAGAGGATGTATGGC
TGCGACCTGGGGCCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGCATGACCAGTCCGCCTACGACGGCAA
GGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCCGCGGCGGACACCGCGGCTCAGA

TCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGTGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGC
CTGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGGA
CCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCT
GGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGCGAGGACCAA
ACTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGACCAGCAGGAGATAGAACCTTCCAGAAGTGGGC
AGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATGTACAGCATGAGGGGC
TGCCGAAGCCCCCTCACCCCTGAGATGGGAGCCATCTTCCCAGTCCACCATCCCCATCGTGGGC
ATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTTAGCAGTTGTGGTCATCGGAGCTGTGGTTCGCTACTGTGAT
GTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTCCAGCGACA
GTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACAGCTTGA

**MRVTAPRTVLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASPRTEPRAPWIEQEGPEYWRNTQIFKTNQTYRESLRNLRGYNQSEAGSHIIQORMYG
CDLGPDRLLRGRHDQSAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQRLAYLEG
LCVEWLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQ
TQDTELVE TRPAGDRTFQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPS SQSTIP IVG
IVAGLAVLAVVVIGAVVATVMCRRKSSGGKGSYSQAASSDSAQGSVSLTA**

pHSE3'-HLA-B*44:03

ATGCGGGTCACGGCGCCCCGAACCCTCCTCCTGCTGCTCTGGGGGGCAGTGGCCCTGACCGA
GACCTGGGCCGGCTCCCCTCCATGAGGTATTTCTACACCGCCATGTCCCAGCCCCGGCCGCG
GGGAGCCCCGCTTCATCACCGTGGGCTACGTGGACGACACGCTGTTCGTGAGGTTTCGACAGC
GACGCCACGAGTCCGAGGAAGGAGCCGCGGGCGCCATGGATAGAGCAGGAGGGGGCCGGAGTA
TTGGGACCGGGAGACACAGATCTCCAAGACCAACACACAGACTTACCGAGAGAACCTGCGCA
CCGCGCTCCGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACATCATCCAGAGGATGTACGGC
TGCGACGTGGGGCCGGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGGACGCCTACGACGGCAA
GGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGAGCTCCTGGACCGCGGCGGACACCGCGGCTCAGA
TCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGGCCCGTGTGGCGGAGCAGGACAGAGCCTACCTGGAGGGC
CTGTGCGTGGAGTCGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGGA
CCCCCAAAGACACATGTGACCCACCACCCATCTCTGACCATGAGGTCACCCTGAGGTGCT
GGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGCGAGGACCAA
ACTCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGACCAGCAGGAGATAGAACCTTCCAGAAGTGGGC
AGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATACACATGCCATGTACAGCATGAGGGGC
TGCCGAAGCCCCCTCACCCCTGAGATGGGAGCCGTCTTCCCAGTCCACCGTCCCCATCGTGGGC
ATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCTTAGCAGTTGTGGTCATCGGAGCTGTGGTTCGCTGCTGTGAT
GTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCGTGCAGCGACA
GTGCCCAGGGCTCTGATGTGTCTCTCACAGCTTGA

**MRVTAPRTL LLLLLLWGAVALTETWAGSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFITVGYVDDTLFVRFDS
DATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWRNTQISKTNQTYRENLR TALRYNQSEAGSHIIQORMYG
CDVGPDRLLRGRYDQDAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQDRAYLEG
LCVESLRRYLENGKETLQRADPPKTHVTHHPISDHEVT LRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQ
TQDTELVE TRPAGDRTFQKWA AVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWEPS SQSTVP IVG
IVAGLAVLAVVVIGAVVA VMCRRKSSGGKGSYSQAACSDSAQGSVSLTA**

pHSE3'-HLA-C*04:01

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAACCCTCATCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGA
GACCTGGGCCGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCGCTGTGTCCCGGCCCGGCCGCG
GGGAGCCCCACTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGC
GACGCCGCGAGTCCGAGAGGGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTA
TTGGGACCGGGAGACACAGAAGTACAAGCGCCAGGCACAGACTGACCGAGTGAGCCTGCGGA
ACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGGTCTCACATCATCCAGAGGATGTATGGC
TGCGACGTGGGGCCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGTACGCCTACGACGGCAA
GGATTACATCGCCCTGAACGAGGATCTGCGCTCCTGGACCGCCGCGGACACGGCGGCTCAGA
TCACCCAGCGCAAGTGGGAGGCGCCCGTGAGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGC
CTGTGCGTGGAGTGGCTCCGCGAGATACTGAAGAATGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCGGA
ACACCCAAAGACACACGTGACCCACCATCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCT
GGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGTGGGATGGGGAGGACCAA
ACTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGC
AGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAGAGCAGAGATAACCGTGCCATGTGCAGCACGAGGGGC
TGCCGGAGCCCCCTCACCTGAGATGGGAGCCGTCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGC
ATCGTTGCTGGCCTGGCTGTCTGGCTGTCTTAGCTGTCTTAGGAGCTGTGGTGGCTGTTGT
GATGTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTGCTCTCAGGCTGCGTCCAGCA
ACAGTGCCCAGGGCTCTGATGAGTCTCTCATCGCTTGTAAGCCTGA

**MRVMAPRTLILLLSGALALTEWAGSHSMRYFYTAVSRPGRGEPHFIAVGYVDDTQFVRFDS
DAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQTDRVSLRNLRGYYNQSEAGSHI IQRMYG
CDVGPDPGRLLRGYDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQLRAYLEG
LCVEWLRRYLKNGKETLQRAEHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQ
TQDTELVE TRPAGDGTFOKWAAVVVP SGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWEPESSQPTIP IVG
IVAGLAVLAVLAVLGAVVAVVMCRKRKSSGGKGGSCSQAASSNSAQSDES LIACKA**

pHSE3'-HLA-C*16:01

ATGCGGGTCATGGCGCCCCGAGCCCTCCTCCTGCTGCTCTCGGGAGCCCTGGCCCTGACCGA
GACCTGGGCCCTGCTCCCACTCCATGAGGTATTTTCGACACCGCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCG
GAGAGCCCCGCTTCATCTCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTCGACAGC
GACGCCGCGAGTCCGAGAGGGGAGCCGCGGGCGCCGTGGGTGGAGCAGGAGGGGCCGGAGTA
TTGGGACCGGGAGACACAGAAGTACAAGCGCCAGGCACAGGCTGACCGAGTGAGCCTGCGGA
ACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGACGGGTCTCACACCCTCCAGAGGATGTCTGGC
TGCGACCTGGGGCCCCGACGGGCGCCTCCTCCGCGGGTATGACCAGTCCGCCTACGACGGCAA
GGATTACATCGCCCTGAACGAGGACCTGCGCTCCTGGACCGCCGCGGACACCGCGGCTCAGA
TCACCCAGCGCAAGTTGGAGGCGCCCGTGCGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGGC
ACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCGAGATACTGGAGAACGGGAAGGAGACGCTGCAGCGCGCAGA
ACCCCCAAAGACACACGTGACCCACCACCCCTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCT
GGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAG
ACCCAGGACACCGAGCTTGTGGAGACCAGGCCAGCAGGAGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGC
AGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGACAAGAGCAGAGATAACCGTGCCATATGCAGCACGAGGGGC
TGCAAGAGCCCCCTCACCTGAGCTGGGAGCCATCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCATGGGC
ATCGTTGCTGGCCTGGCTGTCTGGTGTCTTAGCTGTCTTGGAGCTGTGGTACCGCTAT
GATGTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTGAAAAGGAGGGAGCTGCTCTCAGGCTGCGTGCAGCA
ACAGTGCCCAGGGCTCTGATGAGTCTCTCATCACTTGTAAGCCTGA

**MRVMAPRALLLLLSGGLALTETWACSHSMRYFDTAVSRPGRGEPREFISVGYVDDTQFVRFDS
DAASPRGEPRAPWVEQEGPEYWDRETQKYKRQAQADRVSLRNLRGYYNQSEDGSHTLQRMMSG
CDLGPDRLLRQYDQSAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKLEAARAAEQLRAYLEG
TCVEWLRRYLENGKETLQRAEPPKTHVTHHPLSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQ
TQDTELVE TRPAGDGTFOKWAAVVVP SGQEQRYTCHMQHEGLQEP LTL SWEPSSOPTIP IMG
IVAGLAVLVVLAVLGAVVTAMMCRRKSSGGKGGSCSAACSNSAQSDES LITCKA**

pHSE3'-BFP

GGCCGCAAGCGAGCTGATTAAGGAGAACATGCACATGAAGCTGTACATGGAGGGCACCCT
GGACAACCATCACTTCAAGTGCACATCCGAGGGCGAAGGCAAGCCCTACGAGGGCACCCA
GACCATGAGAATCAAGGTGGTCGAGGGCGGCCCTCTCCCCTTCGCCTTCGACATCCTGGC
TACTAGCTTCTCTACGGCAGCAAGACCTTCATCAACCACACCCAGGGCATCCCCGACTT
CTTCAAGCAGTCCTTCCCTGAGGGCTTACATGGGAGAGAGTCACCACATACGAAGACGG
GGGCGTGCTGACCGCTACCCAGGACACCAGCCTCCAGGACGGCTGCCTCATCTACAACGT
CAAGATCAGAGGGGTGAACTTACATCCAACGGCCCTGTGATGCAGAAGAAAACACTCGG
CTGGGAGGCCTTACCGAGACGCTGTACCCCGCTGACGGCGGCCTGGAAGGCAGAAACGA
CATGGCCCTGAAGCTCGTGGGCGGGAGCCATCTGATCGCAAACGCCAAGACCACATATAG
ATCCAAGAAACCCGCTAAGAACCTCAAGATGCCTGGCGTCTACTATGTGGACTACAGACT
GGAAAGAATCAAGGAGGCCAACCAACGAGACCTACGTCGAGCAGCACGAGGTGGCAGTGGC
CAGATACTGCGACCTCCCTAGCAAACCTGGGGCACAAGCTTAATTAAGGATCC

**MHMKLYMEGTVDNHHFKCTSEGEKPYEGTQTMRIKVVVEGGPLPFAFDILATSFLYGSKTFI
NHTQGIPDFFKQSFPEGFTWERVTTYEDGGVLTATQDTSLQDGCLINVKIRGVNFTSNGPV
MQKKT LGWEAF TETLYPADGGLEGRNDMALKLVGGSHLIANAKTTYRSKKPAKNLKM PGVYY
VDYRLERIKEANNETYVEQHEVAVARYCDLP SKLGHKLN**

6.3 Aminosäuresequenzen (Antikörper)

r8-18C5

Heavy chain

QVQLQQSGAELMKPGASVEISCKATGYTFSSFWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGRGRNTYNE
KFKGKATFTAETSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCATGNTMVNMPYWGQGTTLTVSSASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
KDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
FYP SDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGKGKPIPNPLLGLDSTHHHHH

Light chain

DIVMTQSPSSLSVSAGEKVTMSCKSSQSLLN SGNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRES
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDHSYPLTFGAGTKLELKRVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

rAb-IP2

Heavy chain

EVQLVESGGGLV KPGGSLRLSCAASGFTSSFY SMNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAD
SVKGRFTISRDNKNSLYLQMS S LRADDTAVYYCARV GIM EWSDPRFVDEKYGMDVWGQGT
VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSKVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK
NQVSLTCLVKGFYP SDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGKPIPNPLLGLDSTHHHHH

Light chain

EIVLTQSPGTL S LSPGERATLSCRASQSVSSRYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR
FSGSGSGTDFILTI SRLEPEDFAVYYCQQYGS SLYTFGQGTKLEIKRVAAPSVFIFPPSDE
QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

rOCB-MS3-s1

Heavy chain

QVQLQESGPRLVKPSSEALSLTCIVSGGSINSNTYYWDWLRQPPGKGLEWIGSISYSGGTYYN
PSLKNRVTMSVDTSNNQFSLKLSVTAADTAVYYCARHTPRQAYYNILTSSQDYGGMDVW
GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPA
PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGKGPINPPLLGLDSTHHHHHH

Light chain

DIVMTQSPVLSLPLVTPGEEAASISCRSSQSLHSSGNNYLDWYLQKPGQPPQLLIYLGSNRAG
VPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCMQALETPPITFGQGRLEIKRTVAAPSVFIF
PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

rAb-hAE

Heavy chain

MKHLWFFLLLVAAPRWVLSEVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAVFGFKFEDHAMHWVRQVPGK
GLEYSIGINWNGDETIYAQSVEGRITVSRDNAKDLLYLQLNSLTPEDTAFYYCARDQSYGVL
RGLPLALNAWQGTTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN
SGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCD
KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGKGPINPPLLGLDSTHHHHHH

Light chain

MDMRVPAQLLGLLLLWLRGARCAVQLTQSPSSLSASVGDSTITISCRASLGIRNDLGWYQORA
GKAPRLLIYSASTLETGVP SRFSGRSGSHFTLTIAGLQPEDFATYYCLQDFTFPFTFGPGT
RVDLKRVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

6.4 Abbildungen

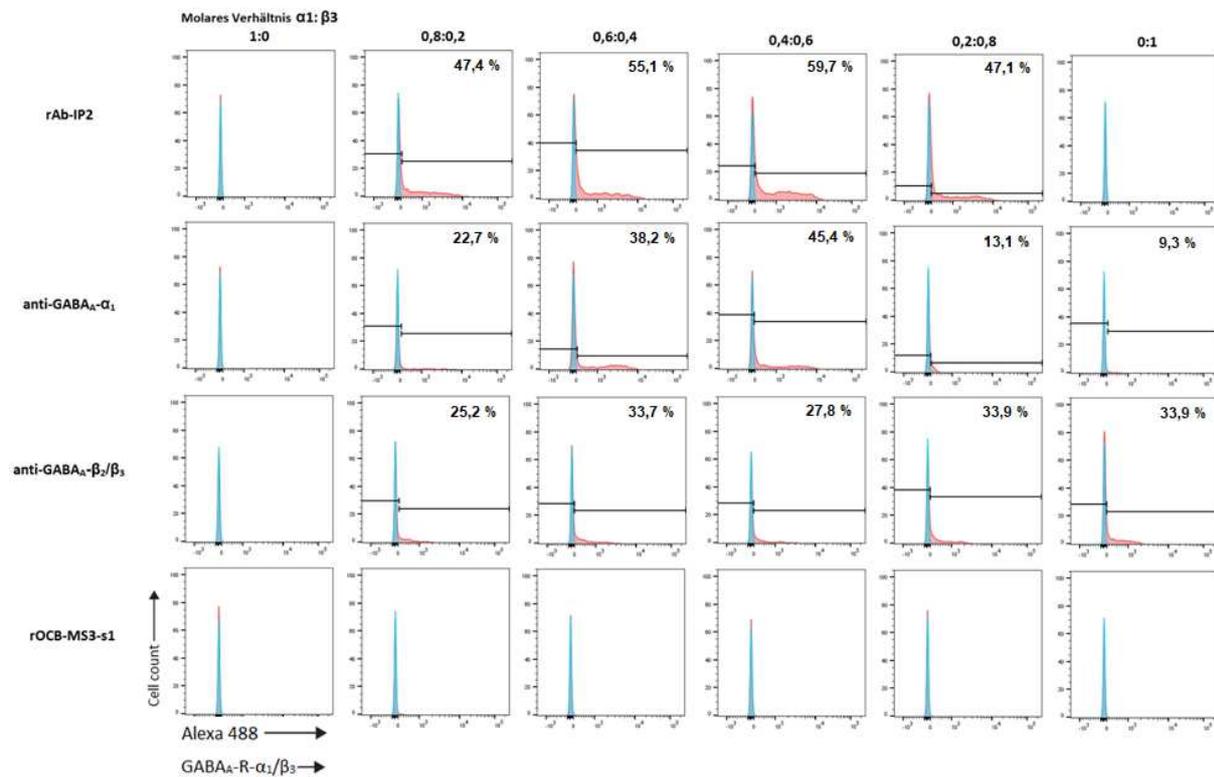


Abbildung 34: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-IP2-Bindung an GABA_A-R, 72 h nach der Transfektion. Es wurden verschiedene molare Verhältnisse der Untereinheiten α_1 und β_3 in Expi293F™ Zellen exprimiert und auf eine Bindung durch rAb-IP2 untersucht. Nur bei Zellen, welche beide Untereinheiten von GABA_A-R exprimierten, konnte eine Erkennung durch rAb-IP2 bzw. den kommerziellen anti-GABA_A- α_1 -Antikörper (Klon BD24, Mouse IgG, Merck Millipore) nachgewiesen werden. Zellen, welche nur die β_3 -Untereinheit exprimierten, konnten nur durch den kommerziellen anti-GABA_A- β_2/β_3 -Antikörper (Klon 62-3G1, Mouse IgG, Merck Millipore) erkannt werden. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper.

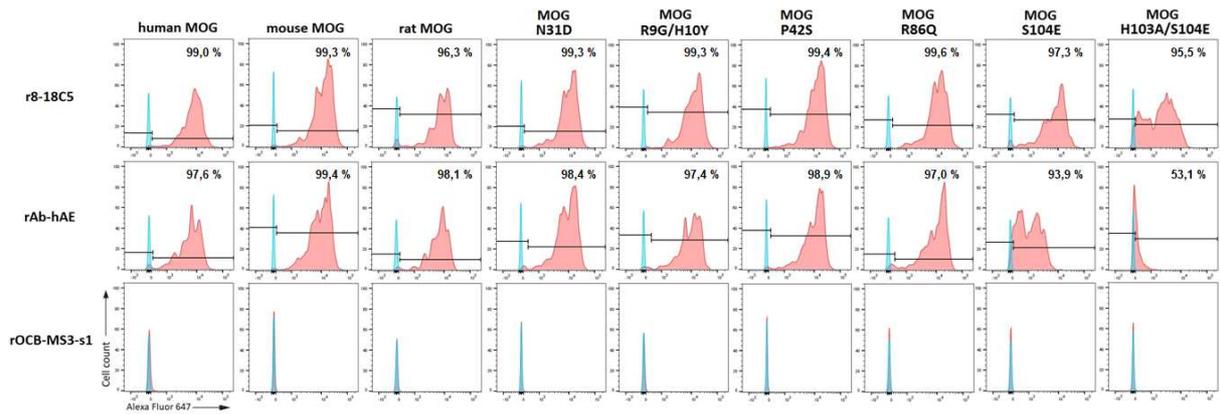


Abbildung 35: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an COS-7-Zellen, die mit humanem MOG (hMOG), mouse MOG (mMOG), rat MOG (rMOG) und MOG-Mutanten transfiziert wurden, 48 h nach der Transfektion. Zusätzlich wurde der Antikörper r8-18C5 auf eine Bindung an hMOG, mMOG, rMOG und MOG-Mutanten untersucht. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ zu den Zellen gegeben. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. r8-18C5: Kontrollantikörper (Positivkontrolle). rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper.

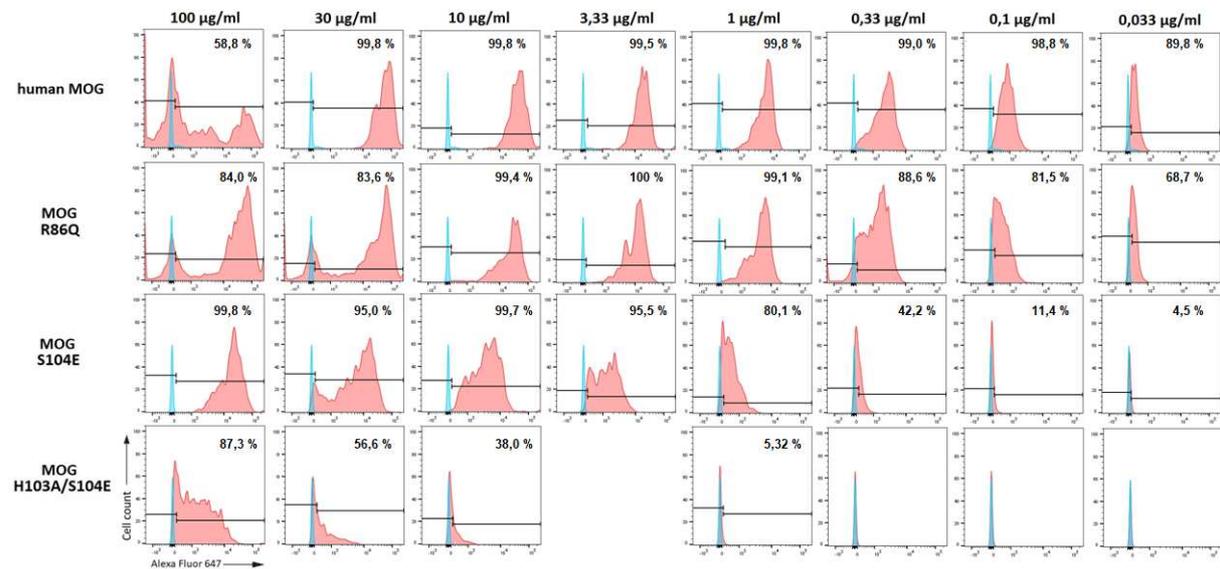


Abbildung 36: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an MOG, 48 h nach der Transfektion. Der Antikörper wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den COS-7-Zellen gegeben und auf eine Bindung an hMOG bzw. die Mutanten R86Q, S104E und H103A/S104E untersucht. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen.

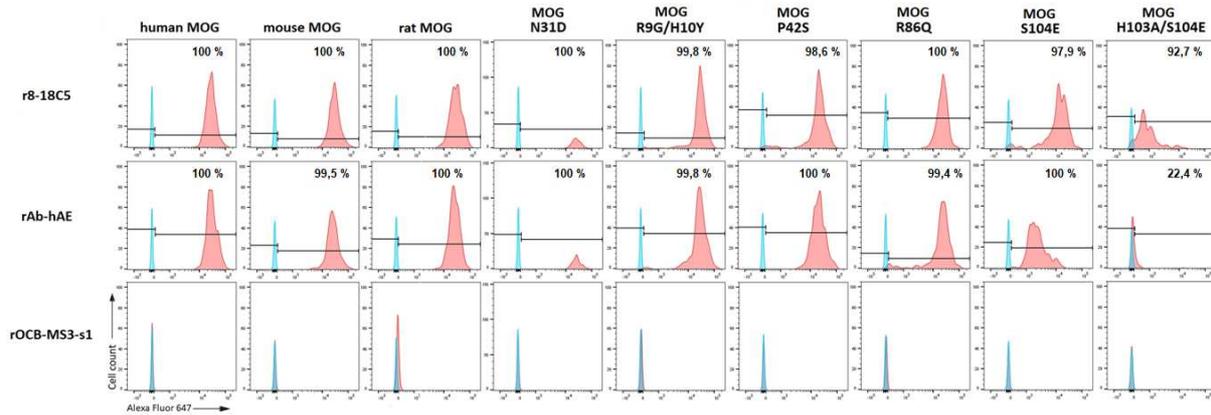


Abbildung 37: Durchflusszytometrische Analyse der rAb-hAE-Bindung an HeLa-Zellen, die mit humanem MOG (hMOG), mouse MOG (mMOG), rat MOG (rMOG) und MOG-Mutanten transfiziert wurden, 48 h nach der Transfektion. Zusätzlich wurde der Antikörper r8-18C5 auf eine Bindung an hMOG, mMOG, rMOG und MOG-Mutanten untersucht. Alle Antikörper wurden in einer Konzentration von 30 µg/ml zu den Zellen gegeben. Blau: Ungefärbte Zellen. Rot: Gefärbte Zellen. r8-18C5: Kontrollantikörper (Positivkontrolle). rOCB-MS3-s1: Kontrollantikörper.

6.5 Bandenanalyse

pcDNA-for-1

pcDNA-rev-1

pcDNA-2nd-for

pcDNA-2nd-rev-10

Peptid-codierende Sequenz

1. PCR:

Pick 4 (143 bp)

- keine peptid-codierende Sequenz vorhanden

```
CACTGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGTCCACTGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGTCCAC
TGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGTCCACTGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGT
```

Pick 8 (276 bp)

- peptid-codierende Sequenz vorhanden

```
CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAACTTAAG  
CTTGGTACCGAGCTCGGATCCGGCGCGCCACCATGCGTGTGATGTGATTGGTGAGGGGGAGTGA GCGGCCGCTC  
GAGTCTAGAGGGCCCTTCGAAGGTAAGCCTATCCCTAACCCCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGGTACCGGTCAT  
CATCACCATCACCATTGAGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCT
```

Pick 8 (143 bp)

- keine peptid-codierende Sequenz vorhanden

```
CACTGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGTCCACTGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGTCCAC  
TGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGTCCACTGCTTACTGGCTTATCGACTGTGCCTTCTAGT
```

2. PCR:

Pick 4 (65 bp)

- peptid-codierende Sequenz vorhanden

```
TCCGGCGCGCCACCATGTATTCTTGTAGTGGTCTGACGGAGGCTTGA GCGGCCGCTCGAGTCTAG
```

Pick 8 (346 bp)

- peptid-codierende Sequenz vorhanden

```
CGGCGCGCCACCATGTGTAGTGGTGATCAGGATCGTGAGCCGTGAGCGGCCGCTCGAGTCTAGAGGGCCCTTCGA  
AGGTAAGCCTATCCCTAACCTCTCCTCGGTCTCGATTCTACGCGTACCGGTCATCATCACCATCACCATTGAGT  
TTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCAC  
TATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACTTAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCGCGCGCCACCATGTA  
TAGGATGGTTGAGTGGAAGGGGGCGTGAAGCGGCCGCTCGAGTCTAG
```

Pick 8 (143 bp)

- leerer Vektor

Eidesstaatliche Versicherung

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

„Analyse von Antigenen von Antikörpern und T-Zell-Rezeptoren bei Autoimmunkrankheiten“

selbstständig 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, den 18.10.2022

David Gebert