

Technische Universität München  
Fakultät für Medizin

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

**Übertragung des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays an CD8<sup>+</sup>  
zytotoxischen T-Zellen vom murinen auf das  
humane System**

**Lydia Frimmer**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

**Doktors der Medizin**

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Ernst J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Dirk H. Busch  
2. Prof. Dr. Percy A. Knolle

Die Dissertation wurde am 03.09.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 31.01.2018 angenommen.



---

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	<b>5</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>9</b>
1.1 Zytotoxische T-Zellen	9
1.1.1 T-Zell-Physiologie	10
1.1.2 Der TCR und sein Ligand	13
1.2 T-Zell-Avidität	18
1.2.1 Definition	19
1.2.2 TCR-pMHC Bindungsparameter und T-Zell-Aktivierung	20
1.2.3 Avidität und Protektivität	21
1.2.4 Verfahren zur Bestimmung von Avidität	22
1.3 T-Zell-Therapie	27
1.3.1 Die Ursprünge	27
1.3.2 Anwendungsfelder	27
1.3.3 T-Zell-Therapie: ein Name — viele Therapieprodukte	29
1.4 Ziel dieser Doktorarbeit	32
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>35</b>
2.1 Material	35
2.1.1 Chemikalien und Reagenzien	35
2.1.2 Puffer und Medien	36
2.1.3 Antikörper	37
2.1.4 Peptide	38
2.1.5 MHC-Streptamere	38
2.1.6 Gele	39
2.1.7 Ausstattung	39
2.1.8 Software	40
2.2 Methoden	40
2.2.1 Streptamer-Herstellung	40

2.2.2	Einfügen einer Konjugationsstelle in der schweren Kette des MHC	42
2.2.3	Zellgewinnung	45
2.2.4	Durchflusszytometrie	45
2.2.5	Streptamerfärbung für Mikroskop	46
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	Streptamerfärbung humaner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	47
3.1.1	Herstellung humaner Streptamere	47
3.1.2	Insuffiziente Streptamerfärbung humaner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	48
3.2	Analyse der verwendeten Reagenzien	52
3.2.1	Alexa488-Konjugation	52
3.2.2	Optimierung des Streptameransatzes	53
3.2.3	Alexa488-Vorkonjugation des $\beta_2m$	57
3.3	Analyse der TCR-pMHC-Interaktion	61
3.3.1	Herstellung chimärer pMHC-Moleküle	61
3.3.2	Gestörte Interaktion der humanen schweren Kette mit dem TCR	62
3.4	Neue Konjugationsstelle für Alexa488	63
3.4.1	Idee	63
3.4.2	Herstellung der neuen pMHC-Moleküle	66
3.4.3	Test an Streptactin-Beads	67
3.4.4	Zellfärbung	67
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>71</b>
4.1	Besonderheiten bei der Übertragung des $k_{off}$ -rate-Assays auf das humane System	71
4.1.1	Stabile Streptamerbindung an die T-Zelle	71
4.1.2	Fluophorauswahl	73
4.2	Messung der $k_{off}$ -rate	74
4.3	$k_{off}$ -rate und T-Zell-Avidität	76
4.4	$k_{off}$ -rate und T-Zell-Therapie	79
4.5	Ausblick	80
	<b>Literatur</b>	<b>83</b>
	<b>Zusammenfassung</b>	<b>93</b>
	<b>Dankwort</b>	<b>95</b>

---

## Abkürzungen

ACT	Ammoniumchlorid-Tris
Ag	Antigen
$\alpha$ -MM	$\alpha$ -Methylmannopyranoside
APC	antigen presenting cell (Antigen-präsentierende Zelle)
APL	altered peptide ligand (in einzelnen Aminosäuren veränderte Epitope)
APS	Ammoniumpersulfat
$\beta_2$ m	$\beta_2$ -Mikroglobulin
BSA	bovines Serumalbumin
CD	cluster of differentiation (Unterscheidungsgruppen immunphänotypischer Oberflächenmoleküle)
CDR	complementarity determining regions (Antigen-Bindungsregionen des TCR)
CMV	Zytomegalievirus
$^{51}\text{Cr}$	Chrom-51
dH <sub>2</sub> O	destilliertes, deionisiertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EC <sub>50</sub>	notwendige Peptidmenge, um im $^{51}\text{Cr}$ Chromium release Assay bei 50% der reaktiven T-Zellen eine spezifische Lyse zu induzieren
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMA	Ethidiummonazidbromid
Fab	Antigen-bindendes Fragment
FACS	fluorescence activated cell sorting
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiozyanat
FPLC	fast protein liquid chromatography (eine Form der Flüssigkeitschromatographie)
h	human

## Abkürzungen

---

HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
IC <sub>50</sub>	notwendige Peptidmenge, um bei intrazellulärer Zytokinfärbung bei 50% der reaktiven T-Zellen eine Zytokinproduktion zu induzieren
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertoni Medium
Lck	Leukozyten-spezifische Proteintyrosinkinase
LFA	Leukozytenfunktionsassoziiertes Antigen
m	murin
M	molar
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pMHC	Peptid-MHC-Komplex
LPD	lymphoproliferative Erkrankung
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SPR	surface plasmon resonance (Oberflächenresonanzspektroskopie)
TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TdT	terminale Deoxynukleotidtransferase
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>reg</sub>	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
V $\alpha$ /V $\beta$	V alpha/ V beta-Region des TCR
ZAP-70	$\zeta$ -assoziiertes Adapterprotein

---

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Die immunologische Synapse	12
1.2	Struktur des T-Zell-Rezeptors	14
1.3	Struktur des pMHC I	15
1.4	Der pMHC-TCR-Komplex	18
1.5	Prinzip des $k_{\text{off}}$ -rate-Assays im murinen Modell	26
3.1	Streptamerfärbung MelanA/MART1-spezifischer humaner CD8 <sup>+</sup> T-Zellen	49
3.2	Schematische Darstellung der zur Streptamerherstellung verwendeten pMHC-Moleküle	50
3.3	Vergleich humaner und muriner Streptamerfärbungen	51
3.4	Test der Alexa488-Konjugation der pMHC-Moleküle	53
3.5	pMHC-Titration im Streptameransatz	55
3.6	Abfiltration des überschüssigen pMHC im Streptameransatz	56
3.7	Zusätzliches Peptid im Streptameransatz	58
3.8	Alexa488-Vorkonjugation des $\beta_2m$	59
3.9	Test der vorkonjugierten Streptamere an T-Zellen	60
3.10	Chimäre pMHC-Moleküle	61
3.11	Färbung muriner T-Zellen mit chimären Streptameren	63
3.12	Färbung humaner T-Zellen mit chimären Streptameren	64
3.13	Darstellung der neuen Alexa488-Konjugationsstellen in der schweren Kette des pMHC-Moleküls	65
3.14	Erfolgreiche Insertion der neuen Konjugationsstellen	66
3.15	Test der neuen pMHC-Moleküle an Streptactin-Beads	67
3.16	Test der neuen Streptamere an T-Zellen	68
3.17	Dissoziation der neuen Streptamere durch Biotin	69





# 1

---

## Einleitung

Im täglichen Leben ist der Körper unzähligen Kontakten mit den verschiedensten Pathogenen ausgesetzt. Beim immunkompetenten Individuum verlaufen diese Konfrontationen dank effektiver Abwehrmechanismen meist unbemerkt und ohne bleibende Schäden. Dies ist eine Leistung des Immunsystems, eines hoch komplexen Ensembles verschiedener Organsysteme und -funktionen. Ein wichtiges Element des Immunsystems sind T-Zellen, eine Untergruppe der Lymphozyten. T-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Bekämpfung von viralen Infektionen und Tumorerkrankungen. Seit Jahrzehnten versuchen Wissenschaftler, sich T-Zell-Funktionen zu therapeutischen Zwecken zu Nutze zu machen. Die Definition eines messbaren Parameters, mit dem sich T-Zell-Eigenschaften wie rasche Aktivierbarkeit und Qualität der Effektorfunktionen vorhersagen lassen, ist dabei von größtem Interesse. In diesem Kapitel gehen wir zunächst grundlegend auf zytotoxische T-Zellen und ihre Funktionsweise ein. Anschließend definieren wir T-Zell-Avidität und stellen verschiedene Messmethoden vor. Wir geben einen Überblick über bestehende T-Zell-Therapieansätze. Schlussendlich definieren wir das Ziel dieser Arbeit.

### 1.1 Zytotoxische T-Zellen

Das Immunsystem lässt sich grob in das angeborene und das adaptive Immunsystem unterteilen. Das angeborene Immunsystem bildet eine Grundabwehr. Es erkennt mit seinen schon in der Keimbahn kodierten Rezeptoren vor allem hoch-konservierte Erregerstrukturen. Das adaptive Immunsystem hingegen ist höchst anpassungsfähig in der Erkennung und Bekämpfung immer neuer und verschiedener Pathogene. Die Flexibilität des adaptiven Immunsystems wird durch die Abwehrfunktionen der Lymphozyten erreicht, insbesondere durch zwei Zellgruppen, die B- und T-Lymphozyten [1, 2].

B-Zellen bilden Antikörper, die an Antigen binden, zum Beispiel an extrazelluläre Erreger oder Toxine. Die durch Antikörper markierten Antigene werden von spezialisierten Zellen wie Makrophagen erkannt und vernichtet.

T-Zellen erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene, die an Zelloberflächen über bestimmte Oberflächenmoleküle, die MHC-Moleküle, präsentiert werden [3]. Auf die MHC-Moleküle wird im Kapitel 1.1.2.2 näher eingegangen. Die Unterscheidung der T-Zellen erfolgt anhand ihrer Oberflächenantigene CD4 und CD8 in zwei Hauptgruppen. CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen erkennen Antigene, die von spezialisierten Antigen-präsentierenden Zellen (APC) präsentiert werden und beeinflussen das Infektionsgeschehen durch die Aktivierung weiterer Zellgruppen. CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen bekämpfen intrazelluläre Pathogene und Tumorzellen direkt. Eiweiße, die im Rahmen der Stoffwechsel- oder Replikationstätigkeit der Pathogene im Zytoplasma der erkrankten Zelle anfallen, werden, wie auch zelleigene Proteine, über Proteasomen zu kurzen Peptiden abgebaut. Die Peptide werden auf MHC-Moleküle geladen und auf der Zelloberfläche der erkrankten Zelle präsentiert. Erkennt eine CD8<sup>+</sup> T-Zelle mit ihrem TCR einen solchen MHC-Peptid-Komplex (pMHC), kann sie aktiviert werden und zu Effektorzellen, den zytotoxischen T-Zellen, differenzieren, die die erkrankten Zellen eliminieren.

### 1.1.1 T-Zell-Physiologie

Bevor T-Zellen aktiviert werden und ihre Funktionen ausüben können, durchlaufen sie eine komplexe Entwicklung. In den nächsten Kapiteln soll zunächst auf die wichtigsten Prozesse der T-Zell-Reifung und auf die Phasen einer Immunantwort eingegangen werden, um anschließend die Mechanismen der Zytotoxizität näher zu beleuchten.

#### 1.1.1.1 Lebenszyklus

**T-Zell-Reifung.** T-Zellen entstehen aus Vorläuferzellen, die beim erwachsenen Menschen ihren Ursprung im Knochenmark haben. Vom Knochenmark wandern die Vorläuferzellen in den Thymus, wo sie zu naiven T-Zellen reifen. Die notwendigen Reifungsstimuli erhalten die unreifen T-Zellen aus dem besonderen Mikromilieu des Thymus, insbesondere von Epithelzellen des Thymus, Makrophagen und dendritischen Zellen, die mit den unreifen Zellen interagieren und durch Zytokinproduktion Überleben und Reifung beeinflussen [1, 2]. Das unreife T-Zell-Repertoire besteht aus einer Vielzahl von Zellen, die für Selbst- oder Fremdartigene, präsentiert auf Selbst- oder Fremd-MHC-Molekülen, spezifisch sind. Für effektive Immunantworten ohne Autoreaktivität werden jedoch nur die T-Zellen benötigt, die in der Peripherie Fremd-Antigene erkennen, die von Selbst-MHC-Molekülen präsentiert werden. Im Reifungsschritt der Selektion werden über zwei Mechanismen die Zellen rekrutiert, die diese Eigenschaft besitzen. Alle T-Zellen, die schwache Interaktionen mit den Selbst-MHC-Molekülen der Thymus-Epithelzellen und der dendritischen Zellen

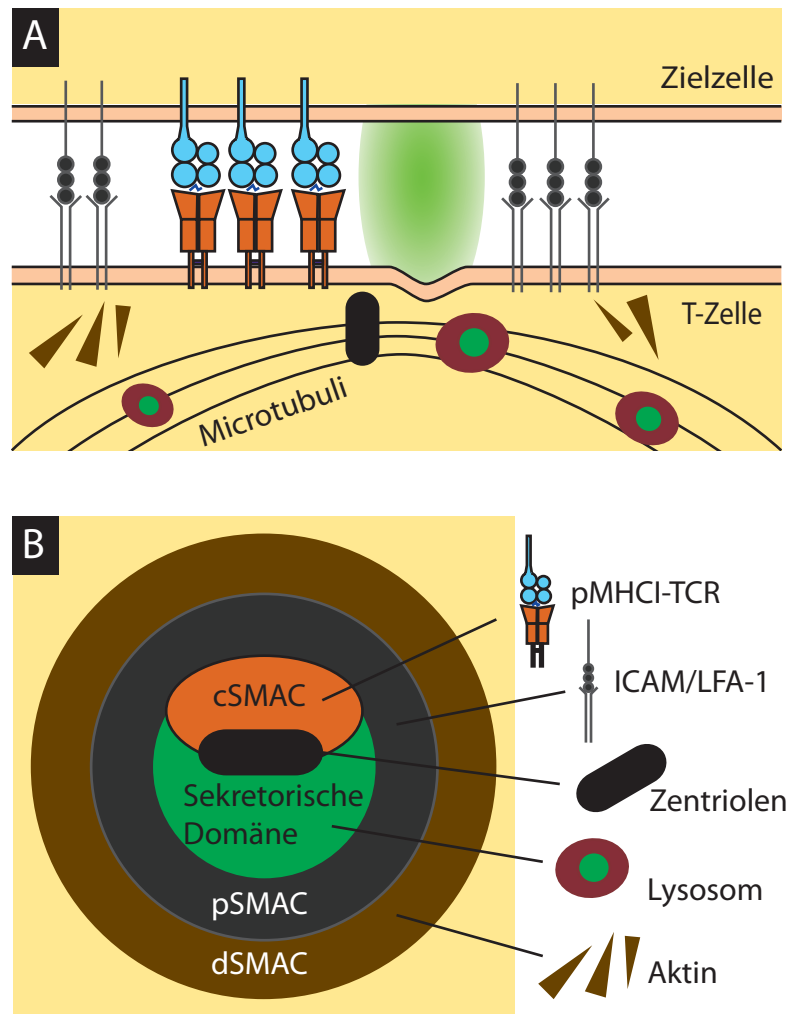
eingehen können, erhalten von den Thymuszellen Überlebenssignale, die obligat sind. T-Zellen, die die Selbst-MHC-Moleküle nicht erkennen und daher keine Überlebenssignale erhalten, gehen in der Folge an Apoptose zugrunde. Dieser Prozess nennt sich positive Selektion. Außerdem gehen all diejenigen T-Zellen durch Apoptose zugrunde, die mit zu hoher Affinität an die Selbst-MHC-Moleküle binden. Dieser Prozess ist als negative Selektion definiert und gewährleistet, dass keine autoreaktiven T-Zellen heranreifen. Mit Abschluss der Reifungsprozesse besteht ein Repertoire vielfältigster naiver T-Zellen, die Selbst-MHC-gebundene Fremdantigene erkennen und dabei gegen Eigenantigene nicht reaktiv sind.

**Phasen der Immunantwort.** Die nach abgeschlossener Reifung im Blut und den peripheren lymphatischen Organen zirkulierenden naiven T-Zellen werden durch Antigen-Kontakt aktiviert. Sie proliferieren klonal, differenzieren zu Effektorzellen und eliminieren das Antigen durch ihre zytotoxischen Effektorfunktionen. Nach erfolgreicher Bekämpfung des Pathogens stirbt der Großteil der Effektorzellen ab. Einige Zellen differenzieren zu Gedächtniszellen, die bei einer erneuten Infektion reaktiviert werden [4]. Man unterscheidet Effektor-Gedächtniszellen, die bei einer Reinfektion unmittelbar wieder Effektorfunktionen ausüben und Schutz bieten, und zentrale Gedächtniszellen, die große Plastizität besitzen, bei einer Reinfektion ähnlich einer naiven T-Zelle proliferieren, zu Effektorzellen differenzieren, und nach Infektkontrolle erneut zu Gedächtniszellen differenzieren können [5, 6]. Die verschiedenen Effektor- und Gedächtniszell-Subpopulationen können dabei aus einer einzigen naiven T-Zelle entstehen [7].

### 1.1.1.2 Zytotoxizität

**Die immunologische Synapse.** Die Interaktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit ihren Zielzellen findet an einer hochorganisierten Kontaktregion, der immunologischen Synapse, statt. Die immunologische Synapse besteht aus einem Funktionsensemble von Oberflächen- und intrazellulären Molekülen von T-Zelle und Zielzelle. Diese Moleküle gewährleisten die Antigen-Erkennung, die stabile Bindung der T- an die Zielzelle und die Signaltransduktion in der T-Zelle zur Aktivierung und Auslösung von Effektorfunktionen.

Die immunologische Synapse lässt sich in drei konzentrische Untereinheiten einteilen, den zentralen, den peripheren und den distalen supramolekularen Adhäsionskomplex (engl. supramolecular activation cluster, SMAC), wie in Abb. 1.1 dargestellt. Jedem SMAC sind bestimmte Molekülkomplexe und Funktionen zugeordnet. Im zentralen SMAC befinden sich der TCR, Korezeptoren wie CD8, sowie assoziierte Signalproteine wie CD3, TCR $\zeta$ , Lck oder ZAP-70. Dort finden die initialen Signalprozesse zur T-Zell-Aktivierung statt. Im peripheren SMAC liegen nicht-Antigen-spezifische Adhäsionsmoleküle, wie z.B. LFA-1 auf der T-Zelle, sowie sein Ligand ICAM-1 auf der Zielzelle. Im distalen SMAC kommt es zur Aktinakkumulation. Das Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett richtet sich nach gewissen Signalprozessen zur



**Abbildung 1.1: Die immunologische Synapse:** Die schematische Darstellung der immunologischen Synapse in seitlicher Ansicht (A) und von oben (B) zeigt die nahezu konzentrische Anordnung der beteiligten Strukturen. Im zentralen SMAC befindet sich der pMHC-TCR-Komplex mit Signalketten. An ihn lagert sich das Zentrosom an, zu dem die Lysegranula migrieren und so direkt an der Kontaktregion mit der Zielzelle ausgeschüttet werden. Im peripheren SMAC befinden sich stabilisierende Adhäsionsmoleküle (LFA-1 mit seinem Bindungspartner ICAM), im distalen SMAC akkumuliert Aktin (modifiziert nach [8]).

immunologischen Synapse hin aus. Das Zentrosom oder MTOC (engl. microtubule organizing center) lagert sich immer an derselben Stelle im zentralen SMAC an. Im Golgiapparat produzierte Vesikel wandern entlang der Mikrotubuli zum MTOC im zentralen SMAC. Die in den Vesikeln enthaltenen Effektormoleküle werden so gezielt an der Kontaktregion mit der Zielzelle freigesetzt, um mit größtmöglicher Effektivität einen "lethal hit" gegen die Zielzelle zu erreichen [9, 10].

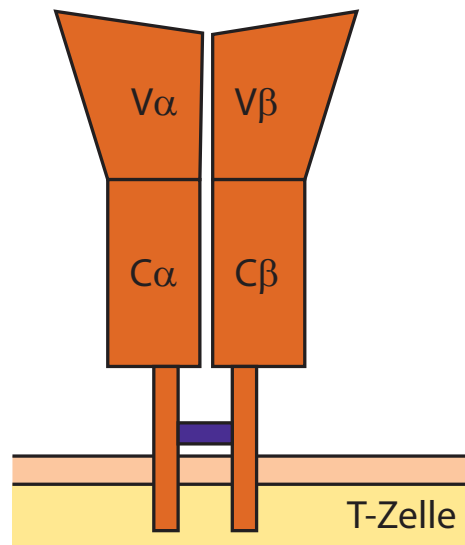
**Mechanismen der Zytotoxizität.** Zwei Hauptwirkmechanismen zytotoxischer Wirkung von  $CD8^+$  T-Zellen sind bekannt [11, 12]. Die Vesikel enthalten unter anderem Perforin und Granzyme. Durch Einlagerung von Perforin in die Zellmembran der Zielzellen bilden sich Poren. Dies löst primär eine osmotische Lyse durch freien Fluss von Wasser und Elektrolyten aus, andererseits bilden die Poren die Eintrittspforte für die Granzyme, eine Serin-Proteasegruppe, die die Apoptose der Zielzelle induzieren. Über einen zweiten, Perforin-unabhängigen Hauptmechanismus wird die Apoptose der Zielzellen durch Bindung des Fas-Liganden an Fas induziert. Der Fas-Ligand, ein Transmembranrezeptor, liegt sowohl gebunden auf der Zelloberfläche der T-Zellen, als auch in gelöster Form in den Vesikeln vor. Nach Bindung des Fas-Liganden an den Fas-Rezeptor auf der Zielzelle wird deren Apoptose induziert. Neben den oben genannten direkt zytotoxisch wirksamen Effektormolekülen sezernieren zytotoxische T-Zellen auch Zytokine wie Interferon  $\gamma$  ( $IFN\gamma$ ) und die Tumornekrosefaktoren  $\alpha$  und  $\beta$  ( $TNF\alpha$  und  $TNF\beta$ ), die unter anderem Makrophagen aktivieren und so die Abwehrfunktionen des angeborenen und des erworbenen Immunsystems vernetzen.

### 1.1.2 Der TCR und sein Ligand

Wie in Kapitel 1.1.1 angesprochen, liegt einer T-Zell-Aktivierung und der Ausübung von zytotoxischen Effektorfunktionen eine Interaktion von TCR und pMHC zugrunde. Die Struktur von TCR und pMHC, Details ihrer Interaktion und das Molekülensemble des TCR-Komplexes werden in den folgenden Kapiteln näher erläutert.

#### 1.1.2.1 Der T-Zell-Rezeptor

Jede T-Zelle exprimiert auf ihrer Oberfläche etwa 100.000 Exemplare desselben TCR. TCR sind heterodimere Moleküle. Sie bestehen aus zwei Transmembran-Peptidketten, der  $TCR\alpha$ - und der  $TCR\beta$ -Kette, die durch eine Disulfidbrücke verbunden sind, wie in Abb. 1.2 gezeigt. Jede Kette besteht aus einer N-terminalen variablen Region ( $V\alpha$ ,  $V\beta$ ) und einer C-terminalen konstanten Region ( $C\alpha$ ,  $C\beta$ ), sowie einer hydrophoben Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Schwanz. Die variablen Regionen der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette fügen sich zu einer Kontaktfläche zusammen, über die der TCR den MHC-Peptid-Komplex erkennt, für den er spezifisch ist. Die variable Region jeder Kette beinhaltet drei kurze hypervariable Aminosäuresequenzen, die complementary-determining regions (CDRs), die



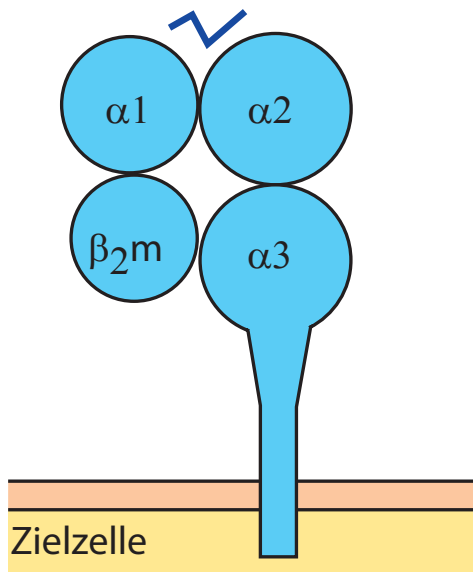
**Abbildung 1.2: Struktur des T-Zell-Rezeptors:** Der  $\alpha\beta$  TCR besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Kette, die über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Die variablen Domänen ( $V\alpha$  und  $V\beta$ ) der extrazellulären Anteile bilden gemeinsam die Antigen-Bindungsstelle.

hochvariabel sind und maßgeblich die Vielfalt der TCR-Spezifität ausmachen. Die unterschiedlichen TCR entstehen durch die somatische Rekombination verschiedener Gensegmente für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Kette. CDR1 und CDR2 der  $\alpha$ - und der  $\beta$ -Kette werden beispielsweise von 42  $V\alpha$  und 46  $V\beta$  Genen kodiert. Die größte Vielfalt entsteht an den CDR3-Abschnitten der Ketten. In der  $\alpha$ -Kette werden sogenannte V- und J-Gensegmente kombiniert, in der  $\beta$ -Kette V-, D- und J-Segmente. Zusätzliche, nicht Genom-kodierte Unterschiede entstehen durch Nukleotidinsertionen und -deletionen während der Verbindungsreaktionen der einzelnen Gensegmente [13]. Durch die Analyse von Kristallstrukturen von TCR-pMHC-Komplexen konnte gezeigt werden, dass die TCR vor allem mit den CDR3, den variabelsten Regionen, das präsentierte Peptid erkennen [14, 15].

### 1.1.2.2 Der MHC I-Peptid-Komplex

Die Genloci des Haupthistokompatibilitätskomplexes (engl. major histocompatibility complex, MHC) bilden eine Gruppe von mehreren hochpolymorphen Genen, die für MHC-Moleküle kodieren. MHC-Moleküle werden auf der Oberfläche fast aller Körperzellen als körpereigene Antigene exprimiert [1, 2]. Entdeckt wurden sie im Rahmen von Transplantationsstudien an Mäusen. Man fand heraus, dass schon ein Unterschied in einem einzigen dieser Genloci zu einer Abstoßungsreaktion eines Hauttransplantats führt. Daher rührt die Bezeichnung Histokompatibilität.

Es gibt zwei MHC-Hauptgruppen. Die MHC-Klasse II-Moleküle finden sich nur auf besonderen Zellpopulationen mit speziellen Funktionen der erworbenen Immunabwehr, insbesondere auf den APC. APC nehmen extrazelluläre Pathogene auf, bauen sie ab und präsentieren Peptide aus diesen Abbauprodukten auf ihren



**Abbildung 1.3: Struktur des pMHC I:** Das pMHC I-Molekül besteht aus einer in der Plasmamembran verankerten schweren Kette, die sich in die Domänen  $\alpha 1$  bis  $\alpha 3$  unterteilt, sowie der leichten Kette, dem  $\beta_2$ -Mikroglobulin, das sich nicht kovalent an die schwere Kette anlagert. Das präsentierte Peptid liegt in einer Mulde zwischen den  $\alpha$ -Helices der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domäne der schweren Kette.

MHC II-Molekülen.  $CD4^+$  T-Helferzellen erkennen diese Peptide und aktivieren daraufhin B-Zellen und Makrophagen [16].

MHC-Klasse I-Moleküle werden auf fast allen Körperzellen exprimiert und weisen die Zellen als körpereigen aus. Fehlen MHC I-Moleküle auf der Zelloberfläche, was z.B. bei Tumorzellen auftreten kann, so kann dies zu einer Aktivierung von natürlichen Killerzellen und zur Elimination der betroffenen Zelle führen (Missing-self-Hypothese) [17]. Werden körperfremde MHC-Komplexe wie bei einer Transplantation mit nicht-MHC-identem Spender erkannt, so führt dies ebenfalls zu einer Elimination der Zellen und zur Abstoßung des Transplantats. MHC I-Moleküle sind außerdem für die Abwehr intrazellulärer Pathogene und entarteter Zellen bedeutsam. Sie präsentieren den  $CD8^+$  T-Zellen Peptide von Proteinen, die im Zytosol der Zelle verstoffwechselt werden. Handelt es sich um Produkte eines Virus, von dem die Zelle befallen ist, oder um mutierte Peptide, die im Rahmen einer malignen Entartung auftreten, so kommt es nach der Erkennung dieser pMHC-Komplexe durch den TCR zur T-Zell-Aktivierung und zur Elimination der Zielzelle.

Der MHC I-Peptid-Komplex besteht, wie in Abb. 1.3 dargestellt, aus drei Komponenten: der schweren Kette, der leichten Kette, auch  $\beta_2$ -Mikroglobulin genannt, und dem Peptid. Die schwere Kette ist mit ca. 44 kD die größere Untereinheit, die auch in der Zellmembran verankert ist. Sie unterteilt sich in die  $\alpha 1$ -,  $\alpha 2$ - und  $\alpha 3$ -Domänen, wobei die  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen die Peptidbindungsstelle bilden und in der  $\alpha 3$ -Domäne die Transmembranregion liegt. Die kleinere Untereinheit ist das 16 kD schwere, lösliche  $\beta_2$ -Mikroglobulin ( $\beta_2m$ ), das sich durch nicht-kovalente Bindung an die schwere Kette anlagert [18]. Das Peptid, das vom Proteasom aus Proteinen im Zytosol synthetisiert wird, besteht aus acht bis zehn Aminosäuren,

lagert sich in die Peptidbindungsstelle der  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen der schweren Kette ein und ist für die Stabilität der MHC-Molekülstruktur unverzichtbar [19].

### 1.1.2.3 Interaktion von TCR und pMHC

Der Entwicklung und den Effektorfunktionen der T-Zellen liegt eine Interaktion des TCR mit dem pMHC-Komplex zugrunde. Verschiedenste Untersuchungen versuchten bisher, diese Interaktion näher zu charakterisieren. TCR-pMHC-Komplexe können seit 1996 durch Röntgen-Kristallographie dargestellt werden. Analysen der Kristallstrukturen zeigen, dass es sich um ein hoch komplexes Kontaktgeschehen handelt, das bisher nur in einigen Details Regelmäßigkeiten erkennen lässt [20].

Die beteiligten Kontaktflächen bestehen aus den V-Domänen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten des TCR mit ihren hypervariablen Regionen CDR1-3, den  $\alpha 1$ - und  $\alpha 2$ -Domänen des pMHC, sowie dem Peptid. Die CDR2 der TCR-Ketten berühren ausschließlich das MHC, während CDR1 und CDR3 mit MHC und Peptid in Kontakt kommen. Ebenfalls zeigte sich, dass der TCR immer diagonal über die pMHC-Oberfläche ausgerichtet ist. Da die MHC-Oberfläche muldenförmig ist, ergibt sich so eine größtmögliche Kontaktfläche [21]. Interessanterweise ist den Kontaktflächen des TCR maximal ein Drittel des Peptids zugänglich [16]. Dabei liegt die  $V\alpha$ -Domäne des TCR grundsätzlich näher am N-Terminus des Peptids, die  $V\beta$ -Domäne näher am C-Terminus. Die Winkel der TCR-pMHC-Orientierung zueinander sind variabel. Sie liegen zwischen  $45^\circ$  und  $80^\circ$  und sind abhängig von Faktoren, die die Ausrichtung des TCR zum pMHC-Komplex beeinflussen, wie der Konformation und Länge der CDR oder dem Winkel der TCR-V-Domänen zueinander [22, 23].

Nicht bekannt und vorhersagbar sind bisher tiefere Bindungsdetails. Zwar wurden verschiedene Aminosäuren als potenzielle Bindungspartner identifiziert, welche und wie viele in welcher Kombination an einer Interaktion beteiligt sind, lässt sich nicht vorhersagen [15, 24]. Dies ist insofern erstaunlich, da zumindest die MHC-Moleküle konservierte Strukturanteile besitzen, sodass man auch konservierte Regelmäßigkeiten im Bindungsverhalten erwarten würde. Besonders deutlich wurde dieses Fehlen von Regelmäßigkeiten in Studien, in denen Unterschiede der Peptide mit daraus resultierenden Unterschieden in der Auswirkung von Signalprozessen korreliert wurden. Einerseits kann es zu Kreuzreaktivitäten kommen, also zu vergleichbarem Ergebnis von intrazellulären Signalprozessen bei Vorliegen desselben TCR und MHC mit jedoch jeweils völlig unterschiedlichem Peptid. Andererseits zeigen APL-Studien (engl. altered peptide ligands), bei denen alle Parameter identisch beibehalten werden bis auf den Austausch einzelner Aminosäuren des Peptids, dass trotz dieser minimalen Veränderung ein TCR-Agonist zum Antagonisten werden kann [25]. Die Kristallstrukturanalysen zeigen zusätzlich minimale lokale Konformationsveränderungen an den CDR beim Einsatz unterschiedlicher Peptide. Dieser sogenannte "induced fit" scheint keine globale Konformationsänderung zur Folge zu haben. Insbesondere korrelieren das Vorliegen dieser Konformationsveränderungen und ihr Ausmaß nicht mit dem Ergebnis der intrazellulären Signalprozesse [26]. Die



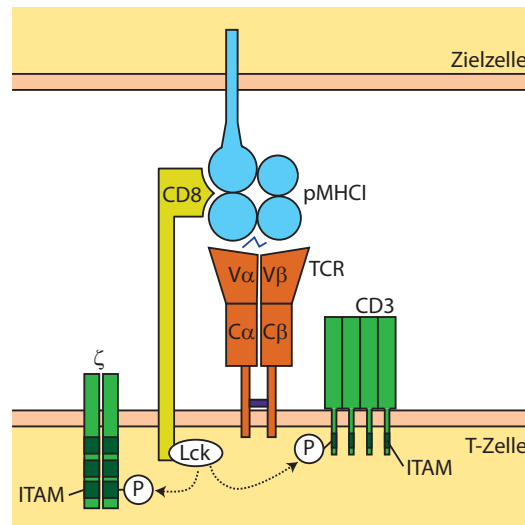
Auslösung effektiver Signalprozesse scheint somit nicht primär Struktur-abhängig zu sein, sondern vielmehr von dynamischen Parametern wie Interaktionsdauer und -stärke des TCR-pMHC-Komplexes.

### 1.1.2.4 Der TCR-Komplex

Durch die Interaktion von TCR und pMHC-Komplex wird noch keine T-Zell-Aktivierung ausgelöst. Effektive intrazelluläre Signalprozesse, die die Bildung der immunologischen Synapse, Zellproliferation und zytotoxische Effektorfunktionen zur Folge haben, bedürfen weiterer Moleküle [20]. Nachfolgend werden die Bedeutung des CD3-Signalmoduls und des Korezeptors CD8 erläutert.

**Das CD3-Signalmodul.** Der TCR besitzt selbst keine Signaldomänen. Ihm angelagert ist das CD3-Signalmodul, das nach Interaktion des TCR mit einem pMHC-Komplex eine Signalkaskade initiiert. CD3 wird fast ausschließlich von T-Zellen exprimiert. Es setzt sich aus Molekülen der Immunglobulinfamilie, nämlich den Ketten CD3 $\gamma$ , CD3 $\delta$ , und zwei CD3 $\epsilon$ -Ketten, sowie zwei zusätzlichen  $\zeta$ -Ketten, die nicht kovalent miteinander verbunden sind, zusammen. Über ihre negativ geladenen Transmembranregionen binden die einzelnen Ketten an die positiv geladenen Transmembranregionen der TCR-Ketten und bilden gemeinsam mit dem TCR den TCR-Komplex, wie in Abb. 1.4 dargestellt [20, 27]. Die intrazellulären Anteile der CD3-Moleküle enthalten sogenannte ITAMs (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs), die für die intrazelluläre Signaltransduktion verantwortlich sind. Eine Konformationsänderung in der CD3 $\epsilon$ -Kette mit Rekrutierung des Adapterproteins Lck scheint der initial auslösende Schritt zu sein für nachfolgende Ereignisse wie die Organisation der immunologischen Synapse und die Rekrutierung von Tyrosinkinase und weiteren Adapterproteinen, die verschiedene Signalkaskaden in Gang setzen [28]. Auch während der T-Zell-Reifung spielt CD3 eine wichtige Rolle im Rahmen der Entwicklung der TCR und ihrer stabilen Expression auf der Zelloberfläche [29].

**Der CD8-Korezeptor.** Der CD8-Korezeptor, ein Transmembran-Glykoprotein, stabilisiert und verstärkt die TCR-pMHC-Interaktion [30]. Er liegt als das Homodimer CD8 $\alpha\alpha$  und als das Heterodimer CD8 $\alpha\beta$  vor [31]. Die Analysen von Kristallstrukturen haben ergeben, dass CD8 $\alpha\alpha$  ähnlich wie ein Antikörper an die  $\alpha 3$ -Domäne des MHC I bindet [32]. Zum CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer-TCR-Komplex gelangen bisher keine Darstellungen der Kristallstruktur. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der Immunglobulin-artigen Domänen wird vermutet, dass CD8 $\alpha\beta$  auf vergleichbare Weise mit dem MHC interagiert wie CD8 $\alpha\alpha$  [33]. Allerdings unterscheiden sich die beiden CD8-Unterformen deutlich bezüglich der Gewebeverteilung und in funktionalen Parametern [34]. CD8 $\alpha\alpha$  wird von verschiedenen Zellpopulationen wie natürlichen Killerzellen und dendritischen Zellen exprimiert, CD8 $\alpha\beta$  fast ausschließlich auf der Oberfläche von  $\alpha\beta$  TCR<sup>+</sup> T-Zellen, und scheint



**Abbildung 1.4: Der pMHC-TCR-Komplex:** Bei Antigenerkennung binden TCR und CD8 ans pMHC. Die von CD8 rekrutierte Lck phosphoryliert die ITAMs der CD3-Signalketten, wodurch eine Vielzahl von Signalkaskaden in Gang gesetzt wird (modifiziert nach [2])

somit der für die Untersuchung von T-Zellen bedeutsame Korezeptor zu sein. CD8 $\alpha\beta$  fungiert in der frühen Phase der T-Zell-Aktivierung als Verstärker, indem er den TCR räumlich in Membranregionen rekrutiert, die eine effektive Signaltransduktion begünstigen, indem er Signalmoleküle zur intrazellulären Seite des TCR/CD3/ $\zeta$ -Komplexes rekrutiert, und indem er die TCR-pMHC-Interaktion stabilisiert [35].

## 1.2 T-Zell-Avidität

Im vorangegangenen Kapitel wurden Aufbau und Funktionsweise von T-Zellen auf zellulärer und molekularer Ebene erläutert. Ziel einer T-Zell-Immunantwort ist, ein Pathogen möglichst schnell und möglichst vollständig zu eliminieren. Hierbei spielen qualitative Faktoren der T-Zell-Funktionalität, wie eine schnelle erfolgreiche Detektion von Pathogenen, die wichtigste Rolle. Das nächste Kapitel beschäftigt sich mit der T-Zell-Avidität, einer Größe, mit der die Qualität von T-Zellen beschrieben wird. Zunächst wird der Begriff „Avidität“ definiert. Es wird der Zusammenhang von TCR-pMHC-Bindungsparametern und der T-Zell-Aktivierung untersucht und der Frage nachgegangen, ob Avidität und Protektivität einer T-Zelle korrelieren. Schlussendlich werden verschiedene Methoden zur Messung von Avidität vorgestellt.

### 1.2.1 Definition

Der Begriff T-Zell-Avidität wird zur Beschreibung zweier unterschiedlicher T-Zell-Eigenschaften verwendet.

#### 1.2.1.1 Funktionelle Avidität

Die funktionelle Avidität beschreibt die Sensitivität oder Effizienz, mit der eine T-Zelle auf Antigen-Kontakt mit einer Aktivierung, Proliferation und Ausübung von Effektorfunktionen reagiert. Eine T-Zelle, die schon bei Kontakt mit geringen Antigenmengen aktiviert wird, Zytokine produziert und Zielzellen lysiert, wird als funktionell hoch-avide T-Zelle definiert. Solche Zellen hingegen, die erst bei Kontakt mit größeren Antigenmengen Effektorfunktionen zeigen, heißen niedrig-avide [36, 37]. Ob eine T-Zelle funktionell hoch- oder niedrig-avide ist, hängt von vielfältigen Faktoren ab. Einerseits sind dies quantitative Faktoren, wie das Expressionslevel von TCR, Korezeptoren und Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche. Ebenso spielen qualitative Faktoren eine Rolle. Hierzu gehören die Zusammensetzung der Korezeptoren, die optimale Positionierung der einzelnen Elemente der immunologischen Synapse auf der Zellmembran durch Organisation in lipid rafts, sowie die Qualität der TCR-pMHC-Interaktion und die Effizienz der TCR-Signal-Kaskade [38, 39].

#### 1.2.1.2 Strukturelle Avidität

Zusätzlich wird der Begriff Avidität zur Beschreibung der Bindungsstärke zwischen den Komponenten des TCR- und des pMHC-Komplexes verwendet. Hier spricht man von der strukturellen Avidität einer T-Zelle. Sie wird bestimmt durch elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen zwischen Aminosäuren in den Bindungsregionen. Bei der strukturellen Avidität handelt es sich um eine Struktur-immanente Eigenschaft des TCR.

Im biochemischen Sinn beschreibt eine Avidität die Summe aus einzelnen Affinitäten zwischen polyvalenten Molekülen und ihren Liganden. Unter physiologischen Bedingungen tragen zur TCR-pMHC-Bindung nicht nur TCR und pMHC-Komplex bei, sondern auch die Bindung des CD8-Korezeptors an den pMHC-Komplex. Das komplexe Bindungsgeschehen wird daher durch den Begriff Avidität korrekter beschrieben als durch den Begriff Affinität, wobei in der Literatur der Begriff Affinität häufig synonym zur strukturellen Avidität verwendet wird. Um in der Praxis die strukturelle Avidität bestimmen zu können, wendet man zur Vereinfachung die mathematische Beschreibung einer Affinität an, die Dissoziationskonstante  $K_D$ , die sich aus dem Massenwirkungsgesetz herleitet. Zugrunde liegt eine dynamische Reaktion  $A + B \leftrightarrow AB$ , bei der die Moleküle A und B zu einem Komplex AB assoziieren, der wieder in die Einzelmoleküle dissoziiert. Befindet sich die Reaktion im Gleichgewicht, das heißt, wenn Hin- und Rückreaktion gleich schnell ablaufen, ändern sich die Konzentrationen von Einzelmolekülen und Komplexen nicht, und

es gilt  $\frac{[AB]}{[A][B]} = \frac{k_{\text{on}}}{k_{\text{off}}} = K_D$ .  $[A]$ ,  $[B]$ ,  $[AB]$  sind hierbei die Konzentrationen von A, B und AB.  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten der Assoziations- und Dissoziationsreaktion. Vereinfacht lässt sich die strukturelle Avidität so durch die Bestimmung der Einzelkomponenten der Gleichung bestimmen [40].

### 1.2.2 TCR-pMHC Bindungsparameter und T-Zell-Aktivierung

TCR erkennen ihre Liganden, die pMHC-Moleküle, mit hoher Spezifität. Als man begann, Parameter der TCR-pMHC-Interaktion wie  $K_D$ ,  $k_{\text{on}}$  und  $k_{\text{off}}$  zu messen, erwartete man daher eine hohe Affinität der Bindungspartner zueinander, wie man es von Antigen-Antikörper-Interaktionen kannte. Unerwarteter Weise zeigte sich jedoch, dass die Dissoziationskonstanten  $K_D$  von TCR-pMHC-Interaktionen extrem niedrig sind und sich im mikromolaren Bereich zwischen 1 und 100  $\mu\text{M}$  bewegen [41, 42].

Um die hohe Spezifität der Liganden-Erkennung und eine T-Zell-Aktivierung trotz einer solch niedrigen Affinität zu erklären, wurden APL-Studien durchgeführt. Es wurden einzelne Aminosäuren der Peptide verändert, alle anderen Parameter unverändert beibehalten. T-Zell-Klone wurden mit den minimal unterschiedlichen pMHC-Komplexen stimuliert und anschließend der T-Zell-Aktivierungsstatus anhand intrazellulärer Signalprozesse untersucht. Die T-Zellen reagierten extrem sensibel auf die Veränderungen, sodass derselbe T-Zell-Klon durch manche pMHC-Komplexe aktiviert wurde und durch andere nicht. Es zeigte sich darüber hinaus, dass eine T-Zell-Aktivierung kein reines Positiv- oder Negativ-Ereignis ist, das nur Zellaktivierung oder keine Zellaktivierung kennt. Vielmehr war eine Graduation des Aktivierungsstatus zu beobachten von einer fehlenden Aktivierung über eine Teil- oder inkomplette Aktivierung bis hin zur einer vollen Aktivierung und sogar einer Deaktivierung [25, 43]. Verschiedene theoretische Modelle versuchen das vermeintliche Paradoxon von niedriger Affinität versus hohe Spezifität und die unterschiedlichen T-Zell-Aktivierungszustände zu erklären.

Das TCR-Besetzungsmodell („occupancy modell“) postuliert, dass der Grad biochemischer Aktivierungsprozesse in der T-Zelle eine Funktion der Anzahl durch pMHC gebundener TCR auf der Zelloberfläche ist. Die Potenz eines Liganden wird in diesem Modell bestimmt durch seine Konzentration und Affinität ( $K_D$ ) [44]. Gegen diese Hypothese sprechen die Ergebnisse von Valitutti et al. Die Gruppe konnte zeigen, dass eine T-Zelle auch durch eine geringe Anzahl von Liganden aktiviert werden kann, indem ein pMHC-Molekül nacheinander an viele TCR bindet („serial triggering“) [45].

Kinetische Modelle wie das der kinetischen Diskriminierung („kinetic discrimination“) postulieren, dass eine T-Zell-Aktivierung hauptsächlich von der Dissoziationsrate des Liganden vom TCR abhängt [46–48]. Die Induktion der T-Zell-Aktivierung wird nicht direkt und komplett durch einen kurzzeitigen, vorübergehenden TCR-pMHC-Kontakt ausgelöst. Zwischen der spezifischen Bindung der Bindungspartner und der T-Zell-Aktivierung liegt eine zeitliche Latenz. Während der TCR-pMHC-Interaktion werden auf der intrazellulären Seite des TCR sequenziell Signalproteine

rekrutiert, die sich zu einem Signalkomplex formieren. Erst durch den kompletten Aufbau des Signalkomplexes wird eine vollständige T-Zell-Aktivierung ausgelöst. Die T-Zelle wird also nur voll aktiviert, wenn die Interaktion zwischen TCR und pMHC ausreichend lange dauert, um den Signalkomplex vollständig aufzubauen. Die zahlreichen notwendigen Intermediärschritte erklären die hohe Spezifität der Antigen-Erkennung durch TCR. Die kinetischen Modelle erlauben auch eine Erklärung für das Vorliegen von partiellen Agonisten und Antagonisten [49]. Ist die Interaktion von TCR und pMHC nur kurzandauernd, so kann der Signalkomplex nicht vollständig aufgebaut werden, und es kommt nur zu einer inkompletten T-Zell-Aktivierung oder sogar zu negativen Signalprozessen.

Bindungsparameter der TCR-pMHC-Interaktion wie Affinität ( $K_D$ ) und Dissoziationsrate ( $k_{\text{off}}$ ) stehen folglich mit Art und Ausmaß einer T-Zell-Aktivierung in Zusammenhang. Affinität und Dissoziationsrate konnten außerdem nicht nur mit intrazellulären Signal- und Aktivierungsprozessen korreliert werden, sondern auch mit biologischen Effektorfunktionen dieser T-Zellen, wie mit Interleukin-Produktion und spezifischer Lyse von Zielzellen *in vitro* [50, 51]. Dies ist ein starker Hinweis dafür, dass die funktionelle Avidität der T-Zellen von deren struktureller Avidität abhängt. Welcher der Bindungsparameter der für die T-Zellaktivierung ausschlaggebende ist, konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt werden.

### 1.2.3 Avidität und Protektivität

Nachdem man Hinweise dafür gefunden hatte, dass die strukturelle Avidität mit der funktionellen Avidität korreliert, interessierte noch mehr die Frage, ob auch Avidität und protektive Eigenschaften einer T-Zelle in Zusammenhang stehen und die Avidität einer T-Zelle Rückschlüsse auf ihre Protektivität zulässt.

Verschiedene Arbeiten zeigten, dass funktionell hoch-avide T-Zellen bei Virus- und Tumorerkrankungen bessere protektive Kapazitäten besitzen als funktionell niedrig-avide [36, 52]. Beispielsweise ist die Reduktion der Viruslast nach Transfer funktionell hoch-avider T-Zellen signifikant höher, als bei Transfer niedrig-avider T-Zellen. Beide T-Zell-Gruppen einer Studie waren in der Lage, die infizierten Zielzellen zu erkennen und zu lysieren. Die hoch-aviden T-Zellen zeigten jedoch bessere Ergebnisse, selbst wenn die Zahl der transferierten niedrig-aviden Zellen erhöht oder die Entwicklung über einen längeren Zeitraum beobachtet wurde [36]. Auch gegen Tumorzellen waren funktionell hoch-avide T-Zellen *in vivo* den niedrig-aviden T-Zellen überlegen und erreichten einen signifikant deutlicheren Rückgang der Tumormasse [52]. Es gibt also deutliche Hinweise für eine Korrelation von funktioneller Avidität und Protektivität.

Derby et al. beschrieben zwei Mechanismen, die bei funktionell hoch-aviden T-Zellen der Protektivität zugrunde liegen und zu einer verbesserten Reduktion und Elimination der Viruslast beitragen [53]. Erstens erkennen hoch-avide T-Zellen Virus-infizierte Zellen nach Infektion früher als niedrig-avide. Dies könnte dadurch erklärt werden, dass hoch-avide T-Zellen schon auf geringe präsentierte Antigen-Mengen

reagieren und nicht erst, wenn die Virusreplikation sich schon in einem fortgeschrittenen Stadium befindet, viele Virus-spezifische Peptide präsentiert werden und eine neue Generation von Virusreplikaten kurz vor der Freisetzung steht. Zweitens setzt bei hoch-aviden  $CD8^+$  T-Zellen die Lysefunktion schneller ein [54]. Auch niedrig-avide T-Zellen lysieren infizierte Zellen, allerdings tritt diese Effektorfunktion im Vergleich zu hoch-aviden T-Zellen verspätet ein [55]. Durch hoch-avide T-Zellen wird eine Infektion effizient bekämpft, nämlich zu einem frühen Zeitpunkt, wenn noch wenige Zellen infiziert sind, und radikal, sodass eine Ausdehnung der Infektion im Idealfall schon in einem sehr frühen Stadium unterbunden wird. Weiterhin trägt zu den protektiven Eigenschaften der funktionell hoch aviden T-Zellen bei, dass sie eine komplette Proliferationsphase durchlaufen. Bei niedrig-aviden T-Zellen kommt es zu einem frühzeitigen Abbruch der Proliferationsphase [56], wodurch diese T-Zell-Populationen vorzeitig eliminiert werden. Durch die frühzeitige Kontraktion der niedrig-aviden Zellpopulationen und einer normalen Proliferation mit Gedächtniszellbildung der hoch-aviden Populationen kommt es insgesamt während einer Immunantwort zu einer Verschiebung des initial hoch diversen (naiven) T-Zell-Repertoires hin zu hoch-aviden Klonen [57]. Diese gewährleisten schnellen und effektiven Schutz bei Reinfektionen.

Eine Möglichkeit, die höhere Effizienz der funktionell hoch-aviden T-Zellen in Bezug auf Proliferation und Effektorfunktionen zu erklären, sind die in Kapitel 1.2.2 genannten kinetischen Zell-Aktivierungsmodelle [46–48]. Man vermutet, dass die TCR funktionell hoch-avider T-Zellen aufgrund langsamer Dissoziationsraten eine vergleichsweise hohe Affinität zu ihren Liganden haben. Dadurch werden die hoch-aviden Zellen im Gegensatz zu niedrig-aviden voll aktiviert, proliferieren ausgedehnt und üben zügig Effektorfunktionen aus. Die Ergebnisse von T-Zell-Transfer-Experimenten unterstützen diese Hypothese. Die funktionellen Eigenschaften von T-Zellen scheinen zu einem großen Teil durch die Qualität ihres T-Zell-Rezeptors bestimmt zu werden [58].

Vielfältige Hinweise deuten somit darauf hin, dass die protektiven Eigenschaften einer T-Zelle abhängig sind von ihrer strukturellen und funktionellen Avidität und dass TCR-pMHC-Bindungsparameter wie  $K_D$  oder  $k_{\text{off}}$ -rate Rückschlüsse auf die protektiven Eigenschaften eines T-Zell-Klons zulassen.

### 1.2.4 Verfahren zur Bestimmung von Avidität

Zur Bestimmung von funktioneller und struktureller Avidität stehen verschiedene Methoden zur Verfügung, die nachfolgend vorgestellt werden.

#### 1.2.4.1 Messung funktioneller Avidität

Zur Bestimmung der funktionellen Avidität werden T-Zellen *in vitro* mit Antigen-präsentierenden Zellen stimuliert, die mit unterschiedlichen Antigen-Mengen beladen sind. Die Effektorfunktionen der stimulierten T-Zellen, wie Zytokinproduktion

oder spezifische Lyse, werden gemessen [36]. Um die Ergebnisse vergleichbar zu machen, wird die Peptidmenge berechnet, die notwendig ist, um 50% der reaktiven T-Zellen zu aktivieren und Zytokinproduktion oder Lyse zu induzieren. Dieser Parameter wird  $IC_{50}$  (Zytokinproduktion) bzw.  $EC_{50}$  (Lyse) genannt. Die verwendeten Methoden erlauben reproduzierbare Ergebnisse weltweit, haben aber den entscheidenden Nachteil, dass es sich immer um gemittelte Messungen von T-Zell-Gruppen handelt und Messungen auf Einzelzellebene nicht möglich sind.

**Intrazelluläre Zytokinfärbung.** Zur Bestimmung der Zytokinproduktion von T-Zellen gibt es mehrere Methoden. Exemplarisch soll hier eine der am häufigsten angewendeten, die intrazelluläre Zytokinfärbung, erstmalig beschrieben durch Metcalfe et al. [59], erläutert werden.

T-Zellen werden zunächst für zwei Stunden stimuliert, meist durch Inkubation mit APC, die mit unterschiedlichen Peptidmengen beladen sind. Durch die Interaktion mit den APC wird die Zytokinproduktion von  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$  oder IL-2 in den T-Zellen induziert. Durch die Zugabe von Brefeldin A wird in den T-Zellen der Transport der Zytokine vom Golgiapparat in das endoplasmatische Retikulum beeinflusst, sodass es zu einer intrazellulären Anreicherung der Zytokine kommt. Nach weiteren drei Stunden werden die T-Zellen mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen Oberflächenmarker gefärbt, dann fixiert und permeabilisiert. Die T-Zellen werden anschließend mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern gegen die intrazellulär angereicherten Zytokine gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Zur Bestimmung der funktionellen Avidität wird die zur Stimulation verwendete Peptidmenge mit der Zytokinproduktion korreliert.

**$^{51}Cr$  Chromium release Assay.** Der  $^{51}Cr$  Chromium release Assay misst eine direkte Effektorfunktion der T-Zellen, nämlich die Fähigkeit Zielzellen zu lysieren [60]. Die Zielzellen werden mit unterschiedlichen Peptidmengen beladen und mit dem  $\gamma$ -strahlenden Isotop  $^{51}Cr$  markiert. T-Zellen und Peptid-beladene Zielzellen werden in einem definierten Verhältnis für vier bis fünf Stunden zusammen inkubiert. Werden die Zielzellen lysiert, so wird  $^{51}Cr$  in den Überstand freigesetzt. Die vom  $^{51}Cr$  emittierte Strahlung wird von Detektoren gemessen und verhält sich proportional zur Zahl der lysierten Zielzellen. Indem man die Peptidmenge, mit der die Zielzellen beladen wurden, mit der gemessenen Strahlung korreliert, erhält man eine Messgröße für die funktionelle Avidität der T-Zellen.

#### 1.2.4.2 Messung struktureller Avidität

**Biacore Assay.** Das Biacore-System ermöglicht die Charakterisierung molekularer Interaktionen von Proteinen im Hinblick auf Spezifität, Bindungsstärke oder  $k_{on}$ - und  $k_{off}$ -rate. Zugrunde liegt die auf Lichtbrechung basierende Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (engl. surface plasmon resonance, SPR) [61, 62]. Das Biacore-System besteht aus drei Hauptkomponenten: auf einem

Sensorchip wird einer der beiden Bindungspartner über eine Hydrogenmatrix fixiert. Der andere Bindungspartner wird in Lösung darübergelitet. Ein optisches Detektorsystem registriert die Veränderungen des SPR-Signals bei Interaktion der Bindungspartner.

Da Molekülinteraktionen mit hoher Sensitivität registriert werden, eignet sich das Biacore-System zur Untersuchung von TCR-pMHC-Interaktionen und ist hierfür die aktuelle Standardmethode [63]. Es erwies sich jedoch als ausgesprochen aufwändig, da sowohl TCR als auch pMHC Moleküle rekombinant exprimiert werden müssen. Insbesondere die Herstellung von gelösten TCR ist komplex und nicht uniform für alle TCR möglich. Außerdem erlauben die durch Biacore erlangten Ergebnisse ausschließlich eine Aussage über die isolierte Interaktion von TCR und pMHC. Wie in den Kapiteln 1.1.2.3 und 1.1.2.4 beschrieben, ist die TCR-pMHC-Interaktion an der immunologischen Synapse ein unter physiologischen Bedingungen hoch komplexes Geschehen, in dem Korezeptoren, die räumliche Anordnung der Bindungskomponenten zueinander und auf der Zelloberfläche eine wichtige Rolle spielen. Das Biacore-System erlaubt somit die Untersuchung der Affinität von einzelnen TCR zu ihren Liganden, ist jedoch zur Bewertung der strukturellen Avidität eines TCR zu seinem Liganden unter physiologischen Bedingungen ungeeignet.

**MHC-Multimer-basierte Methoden.** Multimere Komplexe von pMHC-Molekülen, sogenannte MHC-Multimere, können im Gegensatz zu MHC-Monomeren stabil an T-Zellen binden [64]. Zur Aviditätsmessung werden MHC-Multimere auf zwei Arten eingesetzt [65].

In der ersten Art von Experiment wird versucht, eine Korrelation zwischen Avidität und Färbeintensität herzustellen [66], in der zweiten zwischen Avidität und Dissoziationskinetiken [57, 67].

Erstere ist einfach durchzuführen und wenig störungsanfällig. Allerdings sprechen die Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen dafür, dass nicht notwendigerweise eine Korrelation zwischen Färbeintensität und Avidität besteht [68, 69].

Versuche, die die Dissoziationskinetiken der MHC-Tetramere untersuchen, sind ausgesprochen heterogen in der Versuchsgestaltung, was die Verwendung von blockierenden Reagenzien angeht. Ohne Zugabe von blockierenden Molekülen binden die Multimere sehr stabil an T-Zellen und eine Dissoziation ist fast nicht messbar. Durch Zugabe von blockierenden Reagenzien wird eine Dissoziation in einem nahen Zeitrahmen begünstigt, wobei man die Annahme zugrunde legt, dass T-Zellen mit hoch-aviden TCR langsamere Dissoziationskinetiken zeigen, als solche mit niedrig-aviden. Als blockierende Reagenzien werden unterschiedliche Substanzen verwendet, wie anti-MHC-Antikörper, nicht Fluoreszenz-markierte MHC-Multimere oder Fab-Fragmente. Die unterschiedlichen Reagenzien haben unterschiedliche Eigenschaften, die eine Vergleichbarkeit der gewonnenen Daten einschränken [65]. Beispielsweise werden die durch die Multimere ohnehin komplexen Dissoziationskinetiken über Crosslinking der Multimere durch manche blockierenden Reagenzien verkompliziert. Auch schwer beeinflussbare, T-Zell-



abhängige Faktoren wie das Expressionslevel der TCR oder die Verteilung der TCR auf der Zelloberfläche erschweren eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse und damit eine Standardisierung der Methode [37, 70].

Im Gegensatz zum Biacore Assay hat die MHC-Multimer-Methode den Vorteil, dass die Messungen an lebenden T-Zellen, also unter weitgehend physiologischen Bedingungen, stattfinden können. Von Nachteil ist, dass nicht einzelne pMHC-TCR-Interaktionen untersucht werden können.

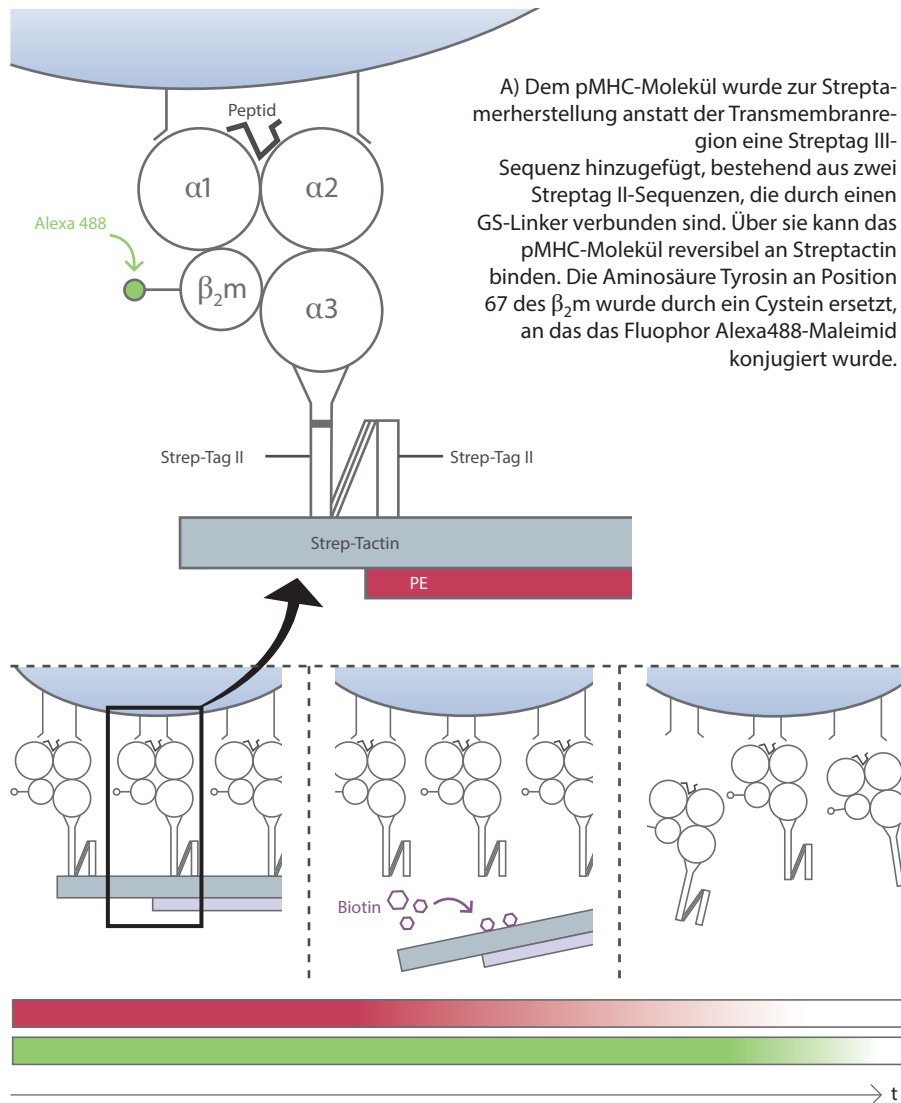
**$k_{\text{off}}$ -rate Assay an murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen.** Um akkuratere Dissoziationskinetiken messen zu können, entwickelte Robert Knall in seiner Doktorarbeit im Labor von Professor Busch eine neue Methode an murinen T-Zellen. Der  $k_{\text{off}}$ -rate Assay nutzt reversible MHC-Multimere, sogenannte Streptamere, um Dissoziationskinetiken monomerer pMHC Moleküle von TCR an lebenden T-Zellen zu messen [71].

Streptamere bestehen aus pMHC-Molekülen, deren Transmembranregion durch einen GS-Linker mit nachfolgender Streptag III Sequenz ersetzt wurde, wie in Abb. 1.5 A dargestellt. Das Tyrosin an Position 67 im  $\beta_2$ -Mikroglobulin wurde durch ein Cystein ersetzt. Dies ermöglicht die Konjugation des Fluoreszenzfarbstoffs Alexa488-Maleimid an die SH-Gruppe des Cystein. Die Alexa488-fluoreszenzmarkierten pMHC-Moleküle werden über ein Streptactin-Rückgrat, das wiederum selbst mit PE (Phycoerythrin) fluoreszenzmarkiert ist, multimerisiert.

Diese zweifach fluoreszenzmarkierten Streptamere binden stabil an T-Zellen. Unter dem Fluoreszenzmikroskop kann sowohl die PE- als auch die Alexa488-Färbung detektiert werden. Wie in Abb. 1.5 B dargestellt, führt die Zugabe von d-Biotin zur Ablösung des Streptactin von den pMHC-Molekülen, da Biotin eine höhere Affinität zu Streptactin besitzt als die Streptag III Sequenz. Die pMHC-Moleküle werden durch die Ablösung des Streptactin-Rückgrats monomerisiert, können nicht mehr stabil an die TCR binden und diffundieren von der T-Zelle ab. Mittels Echtzeitaufnahmen wird die Abnahme der Fluoreszenzintensität am Mikroskop gemessen.

Der Beurteilung der Avidität liegt bei dieser neuen Methode die Annahme zugrunde, dass die Dissoziationsgeschwindigkeit der monomeren pMHC-Moleküle von der T-Zelle mit der Bindungsstärke von TCR und pMHC korreliert. Es wird angenommen, dass die pMHC-Moleküle umso langsamer abdiffundieren, je höher die Bindungsstärke ist. Zur Auswertung wird ein annähernd exponentieller Abfall der Fluoreszenzintensität angenommen nach der Formel  $N = N_0 \exp[-k_{\text{off}} t]$ .  $N$  ist die Fluoreszenzintensität, auf die die Ausgangsintensität  $N_0$  nach der Zeit  $t$  abgefallen ist.  $k_{\text{off}}$  ist die Geschwindigkeitskonstante der Abdiffusion. Aus dieser Formel ergibt sich die Halbwertszeit  $t_{1/2} = \ln 2 / k_{\text{off}}$ , die mit einer eigens entwickelten Software berechnet wird. Die Halbwertszeit verhält sich direkt proportional zur Bindungsstärke von TCR und pMHC-Komplex: je größer die Bindungsstärke, desto höher die Halbwertszeit. Diese neue Methode erlaubt erstmalig, Dissoziationskinetiken monomerer TCR-pMHC-Interaktionen unter physiologischen Bedingungen zu quantifizieren.

# 1 Einleitung



**Abbildung 1.5:** Prinzip des  $k_{off}$ -rate-Assays im murinen Modell.

## 1.3 T-Zell-Therapie

Wie in den vorangegangenen Kapiteln geschildert, sind zytotoxische T-Zellen ein zentrales Element des Immunsystems. Sie erfüllen vor allem bei der Bekämpfung von viralen Infektionen und Tumorerkrankungen wichtige Funktionen. Daher ist es ein großes Ziel aktueller medizinischer Forschung, sich die Eigenschaften der zytotoxischen T-Zellen für therapeutische Zwecke zu Nutzen zu machen. Das folgende Kapitel bietet eine Einleitung in die Entstehung der T-Zell-Therapie, die aktuellen Formen und Anwendungsfelder, sowie die Probleme und Limitierungen von T-Zell-Therapien.

### 1.3.1 Die Ursprünge

Die Anfänge der T-Zell-Therapie reichen zurück in die 50er Jahre des vergangenen Jahrhunderts. Damals hatten amerikanische Wissenschaftler Mäuse mit einer tödlichen Dosis Radioaktivität bestrahlt. Die Mäuse, die unbehandelt an der Zerstörung ihres Knochenmarks gestorben wären, überlebten, wenn sie gesundes Knochenmark einer Spendermaus übertragen bekamen [72].

Es folgten Versuche am Menschen mit dem Ziel, durch Bestrahlung und anschließende Knochenmarktransplantation eine kurative Therapie für Leukämien zu entwickeln. Bei allogenen Knochenmarktransplantationen mit einem dem Empfänger genetisch nicht identen Spender fielen zwei Phänomene auf. Georges Mathé, ein französischer Mediziner, beschrieb als erster die Graft-versus-Host-Disease, die er damals "secondary syndrome" nannte, sowie den Graft-versus-Leukemia-Effekt, damals "antileukemic effect" genannt [73, 74]. Beiden liegt eine zytotoxische Reaktion nach allogener Knochenmark- oder Blutstammzelltransplantation zugrunde, die durch im Transplantat enthaltene T-Zellen des Spenders gegen Alloantigene des Empfängers ausgelöst wird. Diese Reaktion wirkt sich negativ als Graft-versus-Host-Disease aus, wenn Spender-T-Zellen gesundes Gewebe des Empfängers angreifen, wodurch es zu Hautausschlägen, Leberversagen und Kolitiden kommt. Ein positiv-protektiver Effekt, der Graft-versus-Leukemia-Effekt, entsteht, wenn die Spender-T-Zellen die Leukämiezellen des Empfängers erkennen und eliminieren. Seit Mitte der 60er Jahre prägte Georges Mathé im Zusammenhang mit dem Graft-versus-Leukemia-Effekt den Begriff der "adoptive immunotherapy" [75]. Bis heute ist der Graft-versus-Leukemia-Effekt im Rahmen einer Stammzelltransplantation bei Leukämien die etablierteste Form einer adoptiven T-Zell-Therapie.

### 1.3.2 Anwendungsfelder

Die adoptive T-Zell-Therapie ist heute definiert als die Behandlung oder Prävention einer Erkrankung durch Gabe von spezifischen T-Zellen [76]. Verschiedene Arbeitsgruppen versuchen seit den späten 80er und frühen 90er Jahren analog zum Graft-versus-Leukemia-Effekt gezielte T-Zell-Therapien bei verschiedenen Erkrankungen

zu entwickeln, wobei sich die Arbeiten auf der Grundlage der T-Zell-Physiologie auf zwei große Bereiche konzentrieren: die antivirale Therapie und die Tumortherapie.

Das Anwendungsfeld der Viruserkrankungen eröffnete sich primär im Rahmen der Knochenmarktransplantationen. Um die zugrundeliegende maligne Erkrankung in Remission zu bringen, erhalten die Patienten in der Konditionierungsphase vor der Transplantation eine myeloablative Chemo- und/oder Radiotherapie. Es kommt zu einer über Wochen und Monate anhaltenden Aplasie, einer Reduktion der Leukozyten, während der die Patienten in besonderem Maße durch akute und durch die Reaktivierung latenter Infektionen gefährdet sind.

Eine wichtige Rolle spielt die Reaktivierung latenter Cytomegalievirus-(CMV)-Infektionen. Nach der meist unbemerkten Erstinfektion verbleibt das Virus lebenslang im Körper, ebenso wie eine relativ große Population CMV-spezifischer CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen, die im Falle einer Reaktivierung schützt. CMV-Reaktivierungen bei immundefizienten Individuen sind trotz antiviraler Medikation mit hoher Morbidität und Mortalität verbunden. Da man seit Anfang der 80er Jahre die Bedeutung der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen bei der Kontrolle einer CMV-Infektion erkannt hatte, wurden immunsupprimierten Patienten mit gutem Ergebnis CMV-spezifische T-Zellen substituiert, die aus dem peripheren Blut des jeweiligen Knochenmark- oder Stammzellspenders gewonnen worden waren. Bei minimaler Toxizität waren die transfundierten Zellen über längere Zeit nachweisbar, zeigten Effektorfunktionen und beherrschten die Infektion [77]. Seither befassten sich eine Vielzahl von Arbeitsgruppen mit der Entwicklung von Therapieansätzen gegen CMV-Infektionen [78].

Ausgesprochen effektiv gelang die Anwendung einer adoptiven T-Zell-Therapie zur Prävention und Therapie des Epstein-Barr-Virus-assoziierten lymphoproliferativen Syndroms (EBV-LPD). Das Epstein-Barr-Virus kann B-Lymphozyten persistent infizieren. Insbesondere bei Individuen mit gestörter T-Zell-Immunität kann es zu einer unkontrollierten EBV-Replikation kommen, die mit dem Auftreten einer polyklonalen Proliferation der B-Zellen bis zur Entstehung eines lymphoproliferativen Syndroms in der Folge korreliert. Rooney et al. isolierten als erste polyklonale EBV-spezifische T-Zellen aus dem Blut der jeweiligen Stammzellspender und infundierten diese den EBV-LPD gefährdeten Patienten [79]. Die Menge der EBV-DNA sank und die Patienten entwickelten keine EBV-LPD. Bei einigen Patienten gelang es, ein manifestes lymphoblastisches Lymphom durch T-Zell-Transfer zu heilen [80].

Für andere opportunistische Infektionen, wie zum Beispiel Adenovirus-Infektionen, liegen noch wenige Ergebnisse vor. Feuchtinger et al. gelang es, spezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus dem Blut der Stammzellspender zu isolieren und diese nach kurzer Antigenstimulation den Empfängern zu infundieren [81]. Wurde eine in vivo Expansion der Zellen beobachtet, so korrelierte diese mit einer Reduktion der Viruslast oder sogar mit einem Absinken der Viruslast unter die Nachweisgrenze.

Versuche, T-Zell-Therapieansätze bei chronisch-persistenten Virusinfektionen wie zum Beispiel Hepatitis B und C und HIV anzuwenden, erbrachten nur Teilerfolge.

Hier konnte jeweils nur ein vorübergehendes Ansprechen erreicht werden, im Falle der HIV-spezifischen T-Zellen in Form eines Rückgangs der im Blut nachweisbaren HIV-infizierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen [82].

Auch zur Behandlung solider Tumoren bei immunkompetenten Patienten existieren Therapieansätze. Rosenberg gelang es seit 1986 zunächst bei Mäusen, dann bei Melanompatienten, tumorspezifische T-Zellen in Form von tumorinfiltrierenden Lymphozyten zu gewinnen, in Kultur anzureichern und in die Patienten zurückzutransferieren [83, 84]. Ein objektives Ansprechen auf die Therapie wurde beobachtet, allerdings nur bei einem Teil der Patienten und nur vorübergehend. Weitere Versuche erstrecken sich auf andere maligne Tumorarten. Jedoch existieren nach unserem Wissen trotz langjähriger Forschung bis heute keine kurativen T-Zell-Therapien bei soliden Tumoren.

### 1.3.3 T-Zell-Therapie: ein Name — viele Therapieprodukte

Der Begriff T-Zell-Therapie steht für eine Vielzahl äußerst heterogener Therapieprodukte und -schemata im Rahmen von klinischen Studien. Auf die wichtigsten Faktoren, die bei der Gestaltung effektiver T-Zell-Therapien von Bedeutung sind, soll im Folgenden eingegangen werden.

#### 1.3.3.1 Zellauswahl

An erster Stelle steht die Gewinnung Therapie-geeigneter T-Zellen. Die ideale Therapiezelle lässt sich in ausreichenden Mengen gewinnen, richtet sich gegen das zu bekämpfende Pathogen und eliminiert es, bietet langanhaltenden Schutz und hat keine Nebenwirkungen.

Allen bestehenden Therapieansätzen ist gemein, dass Pathogen- oder Tumorspezifische T-Zellen transfundiert werden. Die Zusammensetzung der selektierten T-Zellen ist jedoch in Abhängigkeit von der Grunderkrankung und der Methode der Zellgewinnung ausgesprochen heterogen.

Es werden fremde Spenderzellen, wie bei CMV-Reaktivierungen nach Knochenmarktransplantationen, im Gegensatz zu eigenen Zellen, wie Tumor-infiltrierende Lymphozyten, transfundiert.

Im Hinblick auf die Zellgewinnung steht komplexen T-Zell-Kulturansätzen eine direkte Gewinnung spezifischer T-Zellen gegenüber. Zellkulturen sind oft notwendig, um ausreichende T-Zell-Zahlen zum Transfer zu generieren. Kulturen sind jedoch sehr pflegeintensiv, und es dauert Wochen bis ausreichende Zellzahlen zur Verfügung stehen. Die gängigsten Methoden der direkten Gewinnung Antigen-spezifischer T-Zellen sind der Gamma-Catch und die Streptamer-Technologie. Beim Gamma-Catch werden die Zellen nach kurzer in vitro Stimulation in Abhängigkeit ihrer Zytokinsekretion (meist IFN- $\gamma$ ) gewonnen [85]. Mit reversiblen MHC-Multimeren, den Streptameren, können Epitop-spezifische Zellen direkt ex vivo gewonnen werden [86].

Die gewonnenen Zellen können CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> T-Zellen oder beide Fraktionen enthalten [87, 88]. Zellkulturen können mono- oder polyklonale Kulturlinien enthalten.

Weitere wichtige Auswahlkriterien werden noch definiert und werden in der Zukunft bei der Zellauswahl mit berücksichtigt werden. Beispielsweise wurde erkannt, dass die Fähigkeit einer T-Zelle zur Persistenz ihre protektiven Eigenschaften maßgeblich mitbestimmt. Die Fähigkeit zur Persistenz hängt unter anderem von der Plastizität einer T-Zelle ab, die sich durch den Differenzierungsgrad bestimmen lässt. Verschiedene Studien postulieren, dass nur aus naiven T-Zellen oder zentralen Gedächtniszellen Effektorzellen und gleichzeitig langlebige Gedächtnis-T-Zellen entstehen, die in der Lage sind, im Verlauf wieder Gedächtniszell-Phänotyp anzunehmen, zu persistieren und bei erneutem Antigenkontakt Schutz zu bieten [89–91]. Gattinoni et al identifizierten einen weiteren Gedächtnis-T-Zell Subtyp, der Stammzell-ähnliche Eigenschaften besitzt und nach adoptivem T-Zell-Transfer in Mäusen anti-Tumor Reaktivität zeigt [92].

### 1.3.3.2 Genetische Zellmodifikationen

Wie im Kapitel 1.3.3.1 geschildert, ist die Gewinnung von Therapie-geeigneten T-Zellen ein aufwändiger und komplizierter Prozess. Die neuesten Entwicklungen setzen darauf „Designer-T-Zellen“ mit den gewünschten Eigenschaften selbst herzustellen.

**TCR-Transfer.** Die Sequenzen von TCR, die die gewünschten pMHC-Komplexe erkennen, wurden analysiert und über retro- oder lentivirale Vektoren in beliebige T-Zellen transferiert [88, 93]. Ein TCR-Transfer gelang für verschiedenste Antigene. Klinische Anwendung fand dieser Ansatz erstmalig 2006, als Morgan et al. Patienten mit metastasiertem malignem Melanom genetisch modifizierte MART-1- spezifische T-Zellen verabreichten. Die Zellen waren zum Teil nach einem Jahr noch nachweisbar und führten zu einer objektiven Reduktion der Metastasen [94]. Beim TCR-Transfer besteht jedoch ein spezielles Risiko. Fusionieren nicht wie gewünscht  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette des transduzierten TCR, sondern eine Kette des transduzierten TCR mit einer Kette des ursprünglich vorhandenen TCR, so hat der neue hybride TCR eine unbekannt Spezifität, mit möglicher autoreaktiver Wirkung [95]. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt um die Bildung hybrider TCR zu verhindern, darunter beispielsweise die Einführung einer zusätzlichen Disulfidbrücke in die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten der TCR [96], die Entwicklung hybrider TCR bestehend aus humanen variablen und murinen konstanten Regionen [97], oder die Unterdrückung der Expression der endogenen TCR durch Einbringen von Vektoren, die siRNA kodieren [98].

**Chimäre Antigenrezeptoren (CAR).** Es folgte die Entwicklung und Transduktion chimärer Antigenrezeptoren. Diese bestehen aus einem Fc (scFv) Molekül,

einer Verbindung der variablen Regionen der leichten und schweren Kette eines monoklonalen Antikörpers gekoppelt mit den Hinge-, Transmembran- und mehreren fusionierten zytoplasmatischen Signaldomänen, z.B. von CD3 $\zeta$ , der Fc Rezeptorkette oder CD28. CAR erkennen Oberflächenantigene direkt und sind in ihrer Spezifität unabhängig von Antigen-Prozessierung und MHC-Restriktion der Antigen-Präsentation [99, 100].

**Resistenz gegen äußere Einflussfaktoren.** Weitere Formen der genetischen Modifikation beinhalten die Transduktion von Molekülen, die die T-Zellen resistent machen gegen Apoptose induzierende Einflüsse [101, 102] oder gegen das immun-suppressive Tumor-Mikromilieu [103].

**Suizid-Gene.** Darüber hinaus werden genetische Modifikationen genutzt, um die Therapiesicherheit zu erhöhen. Toxizität durch autoimmune Reaktionen der Therapiezellen kann tödlich enden. Durch die Transduktion sogenannter Suizid-Gene können die T-Zellen nach adoptivem Transfer gezielt eliminiert werden. Beispiele sind die induzierbare humane Caspase 9 [104], oder das humane FAS-Gen [105], durch deren Aktivierung Apoptose induziert wird.

### 1.3.3.3 Beeinflussung der T-Zell-Funktionalität durch Stimulation

Um größere Zellmengen zu generieren bzw. um die Persistenz der transfundierten Zellen zu verbessern, können die Therapiezellen sowohl vor als auch nach Transfer stimuliert werden, zum Beispiel mit Zytokinen wie IL-2, IL-7, IL-15 und IL-21 [106]. Eine andere Stimulationsmöglichkeit ist die Vakzinierung des Patienten mit Peptid-, Virus- oder Antigen-präsentierenden Zellen [107, 108].

### 1.3.3.4 Beeinflussung exogener Faktoren

Es zeigte sich, dass nicht nur die Therapiezellen selbst optimal ausgewählt und vorbereitet sein müssen für ein gutes Therapieergebnis. Auch das Milieu, in dem die transfundierten T-Zellen ihre Wirkung entfalten sollen, kann vorbereitet und positiv beeinflusst werden.

Bei Melanompatienten zeigten sich bessere Therapieresultate im Sinne einer verlängerten Persistenz der transfundierten T-Zellen, wenn die Patienten vor dem T-Zell Transfer mit einer nicht-myeloablativen Chemotherapie oder einer Ganzkörperbestrahlung behandelt worden waren [109]. Der Tumor wird geschwächt, aufgrund der resultierenden Leukopenie erfahren die transferierten Zellen weniger Konkurrenz um Zytokine und Kompartimente und nicht zuletzt induzieren Radio- und Chemotherapien ein inflammatorisches Milieu, das einen stimulierenden Effekt auf T-Zellen hat.

Das immunsupprimierende Tumor-Mikromilieu hemmt zytotoxische T-Zell-Effektorfunktionen vor allem durch regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $T_{reg}$ ). Daher

wurden Antikörper gegen die Oberflächenmarker CTLA-4 und PD1 bzw. gegen inhibitorische Zytokine wie TGF- $\beta$  entwickelt, durch die  $T_{reg}$  gehemmt werden [110].

### 1.3.3.5 Erfolge und Limitierungen

Trotz vielfältiger Entwicklungen bestehen weiterhin ungelöste Probleme. Zwei bedeutsame sollen nachfolgend kurz genannt werden.

**Escape-Mechanismen und Toleranz-Entwicklung.** Ein führendes Problem sind Escape-Mechanismen der Pathogene und Tumorzellen, sowie die Toleranzentwicklung. Die besten und nachhaltigsten Ergebnisse werden bisher im Rahmen von akuten Infektionen erzielt. Persistiert das Antigen jedoch wie bei Tumorerkrankungen oder chronischen Infektionen, treten Escape- und Toleranzmechanismen in Kraft, die eine langfristige effektive Therapie verhindern. Insbesondere die Tumorthherapie steht hier vor einer besonderen Herausforderung, der Erforschung und Bekämpfung des immunsuppressiven Tumor-Mikromilieus.

**Kothesapien.** Auch die Verträglichkeit mit Kothesapien ist optimierungsbedürftig. Beispielsweise fiel im Rahmen von CMV-spezifischen T-Zell-Therapien auf, dass die Effektorfunktionen der transfundierten T-Zellen maßgeblich eingeschränkt sind, wenn der Empfänger aufgrund einer Graft-versus-Host-Disease hohe Glukokortikoiddosen benötigt. Glukokortikoide beeinträchtigen TCR-Signaltransduktion, die Zytokinproduktion und induzieren Apoptose [111].

T-Zell-Therapien gestalten sich zusammengefasst gesagt hoch komplex und müssen je nach zugrunde liegender Erkrankung unterschiedliche Anforderungen erfüllen. Die Identifikation eines einfach zu bestimmenden Parameters, der T-Zell-Populationen als potente Therapiezellen identifiziert und eine zügige Gewinnung ausreichender Zellmengen möglich macht, ist eine große Herausforderung im Rahmen der T-Zell-Therapieforschung. Diese Doktorarbeit leistet einen Beitrag, um diesem Ziel näher zu kommen.

## 1.4 Ziel dieser Doktorarbeit

CD8<sup>+</sup> T-Zellen spielen eine bedeutende Rolle bei der Abwehr von viralen Infektionen und Tumorerkrankungen. Sie erkennen mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TCR) Peptidsequenzen, die auf den Zelloberflächen der Zielzellen durch MHC I-Moleküle präsentiert werden. Verschiedene Untersuchungen legen nahe, dass eine Korrelation zwischen der Bindungsstärke der TCR zu ihren Liganden, der sogenannten strukturellen Avidität, den Effektorfunktionen der T-Zellen und ihren protektiven Eigenschaften besteht. Die Entwicklung einer Messgröße für die strukturelle Avidität ist daher von größtem Interesse. Die bisher zur Verfügung stehenden Messmethoden der



strukturellen Avidität erlauben aus verschiedenen Gründen keine zufriedenstellenden Messungen, insbesondere da die Beobachtung der Interaktion der Bindungspartner nicht unter physiologischen Bedingungen stattfindet.

Daher war in unserem Labor am murinen Modell eine neue Methode unter Einsatz der Streptamer-Technologie entwickelt worden. Die Streptamere, über ein Streptactin-Rückgrat reversibel multimerisierte pMHC-Moleküle, können im Gegensatz zu monomeren pMHC-Molekülen stabil über die TCR an die T-Zellen binden. Nach schlagartig induzierter Monomerisierung durch Ablösung des Streptactin-Rückgrats diffundieren die fluoreszenzmarkierten pMHC-Moleküle von der T-Zelloberfläche ab. Durch die Messung der Dissoziationskinetiken lassen sich Halbwertszeiten berechnen, die die Bindungsstärke der pMHC-TCR-Interaktion widerspiegeln.

Ziel dieser Arbeit war, den im murinen Modell etablierten  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay auf das humane System zu übertragen. Da sich überraschenderweise zeigte, dass eine zum murinen System analoge Übertragung nicht möglich war, wurde zunächst die Ursache dafür identifiziert. In einem zweiten Schritt wurde erfolgreich ein Lösungsansatz entwickelt, um den  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay auf das humane System zu übertragen.



## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Reagenz	Vertrieb
Alexa-488-Maleimid	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
$\alpha$ -Methylmannopyranosid ( $\alpha$ -MM)	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ampicillin	Sigma, Taufkirchen Deutschland
BCA-Reagenzien	Interchim, Montlucon, Frankreich
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Biocoll Ficoll solution	Biochrom, Berlin, Deutschland
BSA (bovines Serumalbumin)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Carbenicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cytofix/ Cytoperm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
d-Biotin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Ethidium Monazide Bromide (EMA)	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland

Gentamicin	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
Glutathion (oxidiert)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Glutathion (reduziert)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Guanidin-HCl	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
Humanes Serum	Eigenproduktion, Institut für medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
IPTG	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
L-Arginin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
Leupeptin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Lysozym	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumacetat	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natrium-EDTA (Na-EDTA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Penicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Pepstatin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
pET3a Expressionsvektoren	Novagen, Darmstadt, Deutschland
Phosphatpuffersalzlösung (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Propidiumjodid (PI)	Molecular Probes, Invitrogen, Großbritannien
RPMI 1640	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
Streptomycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Streptactin-PE	IBA, Göttingen, Deutschland
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblaulösung	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
T-STIM Culture Supplement	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

### 2.1.2 Puffer und Medien

Puffer	Zusammensetzung
FACS Puffer	1x PBS 0,5% (w/v) BSA pH 7,45

RP10+ Zellkulturmedium	1x RPMI 1640 10% (w/v) FCS 0,025% (w/v) L-Glutamin 0,1% (w/v) HEPES 0,001% (w/v) Gentamicin 0,002% (w/v) Streptomycin 0,002% (w/v) Penicillin
Ammoniumchlorid-Tris	0,17 M NH <sub>4</sub> Cl 0,17 M Tris-HCl NH <sub>4</sub> Cl : Tris-HCl= 9:1
Rückfaltungspuffer	100 mM Tris-HCl 400 mM L-Arginin 2 mM NaEDTA 0,5 mM ox. Glutathion 5 mM red. Glutathion ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 8,0
Guanidin Lösung	3 M Guanidin-HCl 10 mM NaAcetat 10 mM NaEDTA ad 100 ml H <sub>2</sub> O, pH 4,2
FPLC Puffer	20 mM Tris-HCl 50 mM NaCl ad 1 L H <sub>2</sub> O, pH 8,0 oder pH 7,3
d-Biotin	10 M Bestandslösung 244,31 g d-Biotin ad 100 ml H <sub>2</sub> O; um das d-Biotin in Lösung zu bringen wurde der pH auf ca. pH 11 erhöht und dann wieder auf pH 7 abgesenkt
Gefriermedium (CFM)	FCS 10% DMSO

### 2.1.3 Antikörper

Antikörper	Klon	Vertrieb
Fcblock (Ratte Anti-Maus CD16/CD)	2.4 G2	BD Bioscience , Heidelberg, Deutschland
Ratte Anti-Maus CD3 APC	145-2C11	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Ratte Anti-Maus CD8 $\alpha$ Alexa488	CT-CD8 $\alpha$	Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland

Ratte Anti-Maus CD8 $\alpha$ FITC	CT-CD8 $\alpha$	Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland
Ratte Anti-Maus CD8 $\alpha$ PE	CT-CD8 $\alpha$	Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland
Maus Anti-Human CD3 APC	UCHT1	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Maus Anti-Human CD3 PE	UCHT1	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Maus Anti-Human CD8 PB	B 9.11	Beckman Coulter, Marseille, Frankreich
Maus Anti-Human CD8 FITC	DK25	Dako, Glostrup, Dänemark
Maus Anti-Human CD8 PE	DK25	Dako, Glostrup, Dänemark

### 2.1.4 Peptide

Alle verwendeten Peptide wurden bei IBA, Göttingen, Deutschland erworben.

MelanA/MART-1<sub>26-35</sub> (EAAGIGILTV)  
 MelanA/MART-1<sub>26-35L</sub> (ELAGIGILTV)  
 IE1<sub>199-207K</sub> (ELRRKMMYK)  
 Ova<sub>257-264</sub> (SIINFEKL)  
 SIY (SIYRYYGL)

### 2.1.5 MHC-Streptamere

HLA A2 StreptagIII/h $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 Alexa488 / MelanA/MART-1<sub>26-35</sub> Streptactin-PE  
 HLA A2 StreptagIII/h $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 Alexa488 / MelanA/MART-1<sub>26-35L</sub> Streptactin-PE  
 HLA B8 StreptagIII/h $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 Alexa488 / IE1<sub>199-207K</sub> Streptactin-PE  
 HLA B8 StreptagIII/[h $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 Alexa488] / IE1<sub>199-207K</sub> Streptactin-PE  
 HLA B8 StreptagIII/h $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 / IE1<sub>199-207K</sub> Streptactin-PE  
 HLA B8 StreptagIII/h $\beta$ <sub>2</sub>m / IE1<sub>199-207K</sub> Streptactin-PE  
 HLA B8 StreptagIII/m $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 Alexa488 / IE1<sub>199-207K</sub> Streptactin-PE  
 HLA B8 StreptagIII MutationI Alexa488 / h $\beta$ <sub>2</sub>m / IE1<sub>199-207K</sub> Streptactin-PE  
 HLA B8 StreptagIII MutationIII Alexa488 / h $\beta$ <sub>2</sub>m / IE1<sub>199-207K</sub> Streptactin-PE  
 H2-k<sup>b</sup> StreptagIII/m $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 Alexa488 / Ova<sub>257-264</sub> Streptactin-PE  
 H2-k<sup>b</sup> StreptagIII/m $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 / Ova<sub>257-264</sub> Streptactin-PE

H2-k<sup>b</sup> StreptagIII/m $\beta$ <sub>2</sub>m / Ova<sub>257-264</sub> Streptactin-PE  
 H2-k<sup>b</sup> StreptagIII/h $\beta$ <sub>2</sub>m-Cys67 Alexa488 / Ova<sub>257-264</sub> Streptactin-PE

### 2.1.6 Gele

SDS-PAGE Trenngel	7 ml dH <sub>2</sub> O 4.38 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8 5,8 ml 30% Acrylamid 1% Bisacrylamid 170 $\mu$ l 10% SDS 8,8 $\mu$ l TEMED 170 $\mu$ l 10% APS
SDS-PAGE Sammelgel	6,2 ml dH <sub>2</sub> O 2,5 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8 1,2 ml 30% Acrylamid 1% Bisacrylamid 100 $\mu$ l 10% SDS 5 $\mu$ l TEMED 100 $\mu$ l 10% APS
Agarose Gel	0,45 g Agarose 40 ml TBE Puffer 1 $\mu$ l Ethidiumbromid

### 2.1.7 Ausstattung

Leica SP5	Konfokales Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland)
Zeiss temperierbarer Einsatz	Kühlungseinheit (Zeiss, Jena, Deutschland)
Huber Minikühler	(Huber Kältemaschinenbau, Offenburg, Deutschland)
Metalleinsatz für Kühlungseinheit	(Schlosserei Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland)
Polycarbonatmembranen, Porengröße 5 $\mu$ m	(Millipore, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
Beilagscheiben	(Schneider + Klein, Landscheid, Deutschland)

FACSCalibur Durchflusszytometer	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FPLC System	Amersham, München, Deutschland
Varifuge 3.0RS Zentrifuge	Thermo, Schwerte, Deutschland
Multifuge 3S-R Zentrifuge	Thermo, Schwerte, Deutschland
Biofuge fresco Tischzentrifuge	Thermo, Schwerte, Deutschland
Biofuge 15 Tischzentrifuge	Thermo, Schwerte, Deutschland
RC26 Plus Ultrazentrifuge	Sorvall, Langenselbold, Deutschland
HE33 Agarosegel Gießsystem	Hoefer, San Francisco, USA
Mighty Small SE245	Hoefer, San Francisco, USA
Gelgießsystem	
NanoDrop Spectrophotometer	NanoDrop, Baltimore, USA
Gel Imaging System	Biorad, München, Deutschland

### 2.1.8 Software

FlowJo	Treestar, Ashland, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Streptamer-Herstellung

Streptamere bestehen aus fluoreszenzmarkierten pMHC-Molekülen, die über ein Streptactin-Rückgrat multimerisiert sind. Zur Herstellung müssen somit zunächst pMHC-Moleküle aus schwerer Kette,  $\beta_2m$  und Peptid rückgefaltet, dann fluoreszenzkonjugiert und im letzten Schritt multimerisiert werden.

#### 2.2.1.1 Rückfaltung von MHC I-Molekülen

Zur Rückfaltung wurden 200 ml Rückfaltungspuffer mit 100  $\mu$ l Leupeptin, 100  $\mu$ l Pepstatin und 2 ml PMSF in einen Erlmeyerkolben gegeben. Um eine optimale Ausbildung von Disulfidbrücken bei der Rückfaltung zu unterstützen, enthielt der Rückfaltungspuffer ein Glutathion-Redoxsystem. Das gewünschte Peptid wurde in Faltungspuffer gelöst und dem Ansatz in hoher Konzentration (60  $\mu$ g/ml) zugegeben. Je drei Aliquots von schwerer und leichter Kette wurden in 8 M Urea dissoziiert und in 3 M Guanidinpuffer verdünnt. Auf dem Magnetrührer wurden dem Epitop-haltigen Puffer unter ständigem Rühren drei Proteininjektionen im Abstand von jeweils 8 Stunden hinzugefügt, wobei zunächst bei niedriger Drehzahl tropfenweise das  $\beta_2m$ , dann bei hoher Drehzahl tropfenweise die schwere Kette hinzugegeben wurde. Der



Ansatz wurde unter ständigem Rühren für 48 Stunden im Kühlraum bei 10°C im Dunkeln inkubiert und dann in 400 ml Behältern bei 4000 rpm bei 4°C für 15 Minuten abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die Aufkonzentration des Überstandes in zwei Schritten, zunächst auf ca. 5 bis 10 ml über Amicon Konzentratoren über eine 10 kDa Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland), im zweiten Schritt auf etwa 1 ml in 10 kDa Amicon Konzentratortubes (Millipore, Eschborn, Deutschland) bei 3000 rpm bei 4°C. Da der Durchlauf des ersten Konzentrationsschrittes noch eine hohe Peptidkonzentration enthielt, wurde er für eine zweite Rückfaltung verwendet. Am Folgetag erfolgte die Aufreinigung der rückgefalteten Moleküle über eine FPLC-Anlage. Die gewünschten Fraktionen wurden vom FPLC-Profil abgelesen und gepoolt. Die weiteren Schritte unterschieden sich, je nachdem, ob die MHC-Moleküle fluoreszenzmarkiert werden sollten oder nicht.

Nicht fluoreszenzmarkierte Moleküle wurden über 10 kDa Amicon Konzentratortubes auf 250 µl aufkonzentriert, unter Zugabe von 4 µl NaAzid und den Proteaseinhibitoren NaEDTA (2 µl, 1 mM), 0,5 µl Leupeptin und 0,5 µl Pepstatin, in 4 ml PBS verdünnt, erneut aufkonzentriert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration durch einen Standard-BCA-Assay in 250 µl Aliquots bei -80°C gelagert.

### 2.2.1.2 Alexa-488-Konjugation

Zur Alexa-488-Konjugation wurde den Proben aus Kapitel 2.2.1.1 pro ml FPLC Pool ebenfalls 1 µl NaAzid, 2 µl NaEDTA, 0,5 µl Leupeptin und 0,5 µl Pepstatin, sowie zusätzlich 1 µl 100 mM DTT hinzugefügt, um die Konjugationsstelle, die Sulfhydrylgruppe des Cystein, in reduzierter Form zu halten. Am Folgetag erfolgte ein Pufferaustausch auf FPLC-Puffer mit pH 7,3, die Aufkonzentration auf 520 µl über Amicon Spintubes und die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay. Die Proteine wurden mit dem aktivierten Fluorophor Alexa-488-Maleimid in einem molaren Verhältnis von 1:10 für 2 Stunden bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und die Konjugation dann durch Zugabe von 1 µl 50 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol gestoppt. Die Aufreinigung zur Trennung von fluoreszenzmarkierten MHC-Molekülen von freiem Farbstoff erfolgte durch erneute Gelfiltration. Die gewünschten Fraktionen wurden gepoolt, und es erfolgte ein Pufferaustausch auf PBS pH 8,0. Nach Zugabe von NaAzid, NaEDTA, Leupeptin und Pepstatin wurden die Proben wieder aufkonzentriert und das Peptid nach der Konzentrationsbestimmung mittels BCA-Assay bei -80°C in 250 µl Aliquots gelagert.

### 2.2.1.3 Multimerisierung

Ein Streptameransatz zur Färbung von maximal  $5 \times 10^6$  Zellen setzt sich aus 1 µg MHC I und 5 µg Streptactin-PE, aufgefüllt mit FACS-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 50 µl, zusammen. Die Reagenzien werden für mindestens eine Stunde auf Eis im Dunkeln inkubiert.

## 2.2.2 Einfügen einer Konjugationsstelle in der schweren Kette des MHC

Das Einbringen einer Konjugationsstelle für einen Fluoreszenzfarbstoff in der schweren Kette der MHC-Moleküle erfolgte durch Insertion eines Cystein am C-Terminus in der Aminosäurekette. Die Sulfhydrylgruppe des Cystein ermöglicht eine kovalente Fluophor-Bindung durch eine Maleimidreaktion. Hierzu mussten zunächst passende Primer entworfen werden, um dann nach der Mutagenese-PCR der Vektoren die neuen Proteine zu exprimieren.

### 2.2.2.1 Primerdesign

Primer wurden mit Hilfe der freien Software PrimerX von Bioinformatics.org entworfen. Die DNA-Basenfolge der Aminosäure Cystein, sowie ggf. eine GS-Linker-Sequenz wurde an den ausgewählten Stellen eingefügt. Um die Erfolgswahrscheinlichkeit zu erhöhen, wählten wir Primer mit einer Länge von mindestens 10 Basen vor und im Anschluss an die Mutationsstelle, um eine stabile Bindung der Primer an die Template-DNA zu gewährleisten, sowie Primer mit einer hohen Schmelztemperatur und möglichst niedrigem GC-Gehalt. Nachfolgend sind die jeweils zur Verwendung gekommenen Primer für die drei Mutationsstellen im HLA B8 StreptagIII aufgeführt. Die Basen der neu inserierten Aminosäuren sind fett markiert und unterstrichen.

HLA B8 I vorwärts:

5' CTCCTCCgTCTggATTgCTCCAgCgCTTggTCTCAC 3'

HLA B8 I rückwärts:

5' gTgAgACCAAgCgCTggAgCATCCAgACggAggAg 3'

HLA B8 II vorwärts:

5' CggAggTggATCgTgCggAggTggATCgTg 3'

HLA B8 II rückwärts:

5' CACgATCCACCTCCgCACgATCCACCTCCg 3'

HLA B8 III vorwärts:

5' CCCgCAGTTCgAAAAggAggTTCCTgCTAATAAgCTTgATCCgg 3'

HLA B8 III rückwärts:

5' CCggATCAAgCTTATTgCAggAACCTCCTTTTTCgAACTgCggg 3'

### 2.2.2.2 Mutagenese-PCR

Für die Mutagenese-PCR verwendeten wir das QuikChange Lightning Site-directed Mutagenese Kit von Stratagene. Die Durchführung erfolgte unter Verwendung der Kit-Reagenzien und unter genauer Einhaltung der Gebrauchsanweisung. Der Ansatz

setzte sich dementsprechend aus Plasmid-DNA, Primern, sowie den Reagenzien des Kits inklusive freier Basen und Pfu Fusion DNA Polymerase zusammen. Die Mutagenese erfolgte unter den unten angeführten Bedingungen.

	Temperatur	Zeit	←	#
1	95°C	1 Min. 30 Sek.		
2	95°C	45 Sek.		
3	55°C	1 Min.		
4	68°C	5 Min. 30 Sek.	2	18
5	68°C	20 Min.		
6	4°C			

Im Anschluss wurden die nicht mutierten methylierten Ausgangsplasmide durch Zugabe des für methylierte DNA spezifischen Restriktionsenzym DpnI zerstört. Zum Nachweis von PCR-Produkten der korrekten Größe wurden auf ein Agarose-Gel 10 µl PCR-Probe mit 2µl 6x DNA loading dye, sowie eine 1 kB DNA ladder als Marker aufgetragen.

### 2.2.2.3 Transformation und Plasmidpräparation

Die Transformation in DH5 $\alpha$ -Bakterien erfolgte durch Hitzeschock. 10 µl der PCR-Lösung wurden mit 100µl DH5 $\alpha$ -Bakterien für 30 Minuten auf Eis inkubiert, dann für 30 Sekunden bei 42°C ins Wasserbad gesetzt, erneut für 2 Minuten auf Eis gekühlt und nach Zugabe von 150 µl SOC-Medium 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurden Aliquots von 10, 50 und 2x 100µl auf Ampicillin-haltigen Nährböden ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Selektion der gewünschten Vektoren wurde durch eine Ampicillinresistenz gewährleistet. Jeweils 6 ml LB-Medium mit 6 µl Ampicillin wurden mit jeweils einer Kolonie der Transformation angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. 1 ml-Aliquots der Proben wurde jeweils 1 ml Glycerol hinzugefügt und die Proben bei -20°C eingefroren. Die Isolierung der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Plasmid Miniprep Kit. Nach der Isolation wurden die Proben mit 50 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und die DNA-Konzentration mit NanoDrop bestimmt. Die Sequenzierung der mutierten DNA wurde von GATC Biotechnologies Ltd. durchgeführt.

### 2.2.2.4 Proteinexpression und Aufreinigung

Analog zur Transformation im Rahmen der Plasmidpräparation wurde nun 1 µl des Plasmids in 10 µl des E. coli Expressionsstamms BL21 (DE3) transformiert.

Vor der Proteinexpression in größeren Mengen erfolgte ein Test im kleinen Maßstab (Miniexpression). Hierzu wurden Zellkulturflaschen mit 20 ml LB-Medium, 200 µl 40% Glukose und 20 µl Ampicillin mit vier bis fünf Kolonien einer Agarplatte angeimpft, bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD<sub>600</sub>) von 0,3 geschüttelt und dann zu diesem Zeitpunkt (0h) 1 ml Glycerolproben gewonnen. Bei Erreichen einer

optischen Dichte von 0,7 wurde eine Präexpressionsprobe gewonnen und dann durch Zugabe von 1 µl IPTG pro ml Kultur die Expression induziert. Nach drei Stunden Schütteln bei 37°C wurde eine erneute Probe gewonnen. Zur Erfolgskontrolle wurden die 0- und 3-Stunden-Proben zum Nachweis einer ausreichenden Proteinmenge der richtigen Größe mittels Gelelektrophorese analysiert. Hierzu wurden die Proben bei 9000 rpm für 3 Minuten abzentrifugiert, die Pellets in PBS gewaschen und in 100 µl Wasser resuspendiert. 13 µl wurden mit 2x SB gemischt, und nach Aufkochen auf 96°C für 5 Minuten wurden 10 µl auf 15% SDS-PAGE-Gel aufgetragen.

Bei erfolgreicher Miniexpression wurde anschließend ein großer Expressionsansatz angesetzt. 1 ml Bakterienlösung aus 20 µl BL21 (DE3) Bakterien in 7 ml LB-Medium wurde jeweils zu 1 L LB-Medium, 50 ml DMEM und 1 ml Carbenicillin in 2 Liter fassende Kulturbedälter gegeben. Nach ca. 8 Stunden Schütteln bei 180 rpm und 37°C wurden auch hier bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,7 zunächst Präexpressionsproben gewonnen. Dann wurde die Expression durch Zugabe von jeweils 1 ml IPTG induziert. Nach drei Stunden wurden erneut Proben gewonnen, die Ansätze in 500 ml fassende Zentrifugenflaschen abgefüllt und bei 5000 rpm (SLA 1500 rotor) für 10 Minuten abzentrifugiert. Die Pellets wurden bei -80°C eingefroren. Die 0- und 3-Stunden-Proben wurden analog zum kleinen Ansatz aufbereitet und quantitativer und qualitativer Erfolg der Expression durch Gelelektrophorese der Produkte analysiert.

Die Aufreinigung der unlöslichen, rekombinant exprimierten Proteine (inclusion bodies) erfolgte durch mechanische und enzymatische Lyse wie folgt. Nach dem Auftauen auf Eis wurden die Pellets in 13 ml Lösungspuffer suspendiert und in 50 ml fassenden Zentrifugenröhrchen durch Ultraschall homogenisiert. Nach Zugabe von 100 µl Lysozym (50 mg/ml Lösung), 250 µl DNase I (2 mg/ml), 50 µl MgCl<sub>2</sub> (0,5 M), 12,5 ml Lysepuffer und vorsichtigem Vermischen wurden die Proben zunächst für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, dann für 25 Minuten bei -80°C eingefroren und schließlich für 30 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Zum Herabsetzen der Viskosität wurden dem Ansatz 50 µl MgCl<sub>2</sub> hinzugefügt und die Proben erneut für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 350 µl NaEDTA (0,5 M) wurden die Proben bei 11000 rpm bei 4°C für 20 Minuten abzentrifugiert (Rotor SA 300, Sorvall) und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 10 ml Puffer mit TritonX auf Eis resuspendiert, mittels Ultraschall homogenisiert, erneut abzentrifugiert mit Verwerfen des Überstandes, in 10 ml Puffer ohne TritonX suspendiert, homogenisiert, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Resuspension der Pellets in 200 µl Urea wurden die Proben über Nacht bei 4°C geschüttelt, am Folgetag in der Ultrazentrifuge (Rotor Ti 70.1) bei 45000 rpm bei 20°C für 20 Minuten abzentrifugiert und die Überstände gepoolt.

## 2.2.3 Zellgewinnung

### 2.2.3.1 Humane Zellen

Humane MelanA/MART-1 spezifische T-Zell-Klone wurden von der AG Speiser (Lausanne, Schweiz) zur Verfügung gestellt. Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden in 50 ml RPMI Medium auf Eis aufgetaut, pelletiert, in 5 ml Medium resuspendiert und über einen Ficoll Gradienten aufgereinigt.

Zur ex vivo Gewinnung CMV spezifischer humaner T-Zellen wurde Blut eines Donors mit bekannter großer CMV spezifischer Population nach Verdünnung mit PBS ebenfalls über einen Ficoll Gradienten aufgereinigt.

Alle humanen Zellen wurden jeweils zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und vor der Färbung zum Ruhen im Dunkeln in 96-well-Platten für 1 Stunde auf Eis gestellt.

### 2.2.3.2 Murine Zellen

Murine Zellen wurden aus Mäusemilzen von BALB/c und black6 Mäusen gewonnen. Die Milz wurde unter sterilen Bedingungen exstirpiert, durch ein Stahlnetz homogenisiert und in 10 ml RP10+ Medium aufgenommen. Nach Pelletierung bei 1500rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Erythrozyten durch Zugabe von 10 ml  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Tris für 7 Minuten bei Raumtemperatur lysiert. Nach Pelletierung und zweimaligem Waschen in eiskaltem FACS-Puffer wurden auch die murinen Zellen in 96-well-Platten vor der Streptamer-Färbung für eine Stunde im Dunkeln auf Eis gestellt, um mögliche unerwünschte Auswirkungen von Zellstoffwechselfvorgängen wie Farbstoffinternalisierung auf die Streptamer-Färbung zu vermeiden.

## 2.2.4 Durchflusszytometrie

### 2.2.4.1 MHC-Konjugation von Streptactin-Beads

Um pMHC-Moleküle isoliert und unabhängig vom Streptamerkontext auf ihre erfolgreiche Rückfaltung und Farbstoffkonjugation zu untersuchen, konjugierten wir sie zur FACS-Analyse an magnetische Streptactin-überzogene Beads. 1  $\mu\text{g}$  Alexa488-konjugierte pMHC-Moleküle wurden für eine Stunde mit 7  $\mu\text{l}$  Beads inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer zur Fluoreszenzanalyse eingelesen.

### 2.2.4.2 Antikörper- und Streptamerfärbung

Für einen Färbeansatz wurden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen verwendet. Die humanen Zellen wurden in 96-well-Platten bei 460 rpm für 2 Minuten pelletiert und in 50  $\mu\text{l}$  Streptameransatz resuspendiert. Die murinen Zellen wurden zunächst für 20 Minuten unter Beleuchtung mit 50  $\mu\text{l}$  Fcblock (1:500, Bestand bei 2,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) zur Fc $\gamma$ -Rezeptor-Blockade und EMA (1:1000, Bestand bei 2  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) zur Färbung toter Zellen inkubiert,

in eiskaltem FACS-Puffer gewaschen, bei 460 rpm für 2 Minuten pelletiert und dann in 50  $\mu$ l Streptameransatz resuspendiert.

Alle Zellen wurden für 45 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert, die Antikörper in der entsprechenden Menge für die letzten 20 Minuten der Inkubationszeit der Streptamerfärbung hinzugefügt. Nach dreimaligem Waschen in FACS-Puffer wurden die Pellets in FACS-Puffer resuspendiert, die humanen Zellen in Propidiumjodidhaltigem zur Färbung der toten Zellen, und im Durchflusszytometer eingelesen.

### **2.2.4.3 FACS-Analyse**

MHC-konjugierte Streptactin-Beads wurden am FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) eingelesen, Streptamer gefärbte Zellen am Cyan Durchflusszytometer (Beckman Coulter, Californien, USA), wobei mindestens  $10^5$  lebende CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingelesen wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo Software (Treestar, Ashland, USA).

### **2.2.5 Streptamerfärbung für Mikroskop**

Für die Streptamerfärbung zur Fluoreszenzanalyse unter dem konfokalen Mikroskop wurden humane, sowie murine Zellen, nachdem sie eine Stunde auf Eis geruht hatten, mit 50  $\mu$ l Streptameransatz für 45 Minuten auf Eis im Dunkeln inkubiert, dreimalig in eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert.

# 3

---

## Ergebnisse

Nach der Entwicklung des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays konnten von mehreren Forschern reproduzierbare Daten zu murinen T-Zellen generiert werden. In dieser Arbeit sollten zum ersten Mal Messungen an humanen T-Zellen durchgeführt werden. Da die Molekülstruktur von murinem und humanem MHC I sehr ähnlich ist, sollten die notwendigen Reagenzien analog zum murinen Modell hergestellt, humane  $\text{CD8}^+$  T-Zellen mit Streptameren gefärbt und der  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay durchgeführt werden. Alle nachfolgenden Versuche wurden in enger Zusammenarbeit mit Magdalena Nauerth durchgeführt.

### 3.1 Streptamerfärbung humaner $\text{CD8}^+$ T-Zellen

#### 3.1.1 Herstellung humaner Streptamere

Zunächst wurden analog zu den murinen MHC-Molekülen humane Streptamere hergestellt. Welche pMHC-Moleküle verwendet wurden, richtete sich nach der Spezifität der TCR der verwendeten humanen T-Zellen. Zwei T-Zellgruppen standen zur Verfügung: MelanA/MART1-spezifische und CMV-spezifische.

Die Arbeitsgruppe um Daniel Speiser in Lausanne hatte mehrere MelanA/MART1-spezifische humane  $\text{CD8}^+$  T-Zell-Klone von Melanompatienten aus ihren Arbeiten zur Verfügung gestellt. MelanA/MART1 ist ein für die Melanozytenfamilie spezifisches Oberflächenantigen bestehend aus 118 Aminosäuren, das auf gesunden Zellen dieser Zellreihe, aber gehäuft auch auf Tumorzellen des Malignen Melanoms vorkommt. Ein Fragment dieses Proteins, aus den Aminosäuren 26 bis 35 bestehend, kann von den MHC I-Molekülen gebunden und den T-Zellen präsentiert werden. Es existiert die Wildtyp-Variante des Peptids mit der Aminosäuresequenz EAAGIGILTV, die wir im Folgenden MelanA nennen, sowie das synthetische Peptidanalogen

ELAGIGILTV, das MelanA27L genannt wird. Aufgrund der Leucin-Mutation anstelle des Alanins an Position 27 bindet das Peptidanalogen besonders gut an das MHC I-Molekül. Zusätzlich gibt es Hinweise dafür, dass auch TCR mit höherer Avidität an das MHC-gebundene Peptidanalogen binden als an den pMHC-Komplex mit Wildtyp-Epitop. Messungen der Dissoziationskinetiken mit dem  $k_{\text{off-rate}}$ -Assay sollten zeigen, ob sich diese Hypothese auch durch die mit dem neuen Assay generierten Daten stützen ließe. Für die MelanA/MART1-spezifischen T-Zellen wurde an das HLA A2 Molekül anstatt der Transmembranregion die StreptagIII-Sequenz fusioniert. Diese schwere Kette wurde mit dem humanen  $\beta_2m$  rückgefaltet. Wie im murinen  $\beta_2m$  war im humanen Molekül das Tyrosin an Position 67 durch ein Cystein ersetzt worden, an dessen Sulfhydrylgruppe der Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 durch eine Maleimid-Reaktion konjugiert wurde. Die pMHC-Rückfaltung erfolgte einmal unter Zugabe eines Wildtyp-Peptids des MelanA/MART1-Antigens und einmal unter Zugabe des Peptidanalogs MelanA27L.

Als zweite Zellgruppe konnten wir in der Arbeitsgruppe von Dirk Busch CMV-spezifische  $CD8^+$  T-Zellen eines Probanden mit großer Population im peripheren Blut direkt ex vivo gewinnen. Für die CMV-spezifischen Zellen wurde die StreptagIII-Sequenz an das HLA B8 Molekül fusioniert. Diese schwere Kette wurde ebenfalls mit dem humanen  $\beta_2m$  rückgefaltet, dessen Tyrosin an Position 67 zur Alexa488-Konjugation durch ein Cystein ersetzt worden war. Die pMHC-Rückfaltung erfolgte mit dem Peptid Immediate Early 1<sub>199-207K</sub> (IE1K). Nach der Rückfaltung wurden die pMHC-Moleküle mit Alexa488-Maleimid inkubiert.

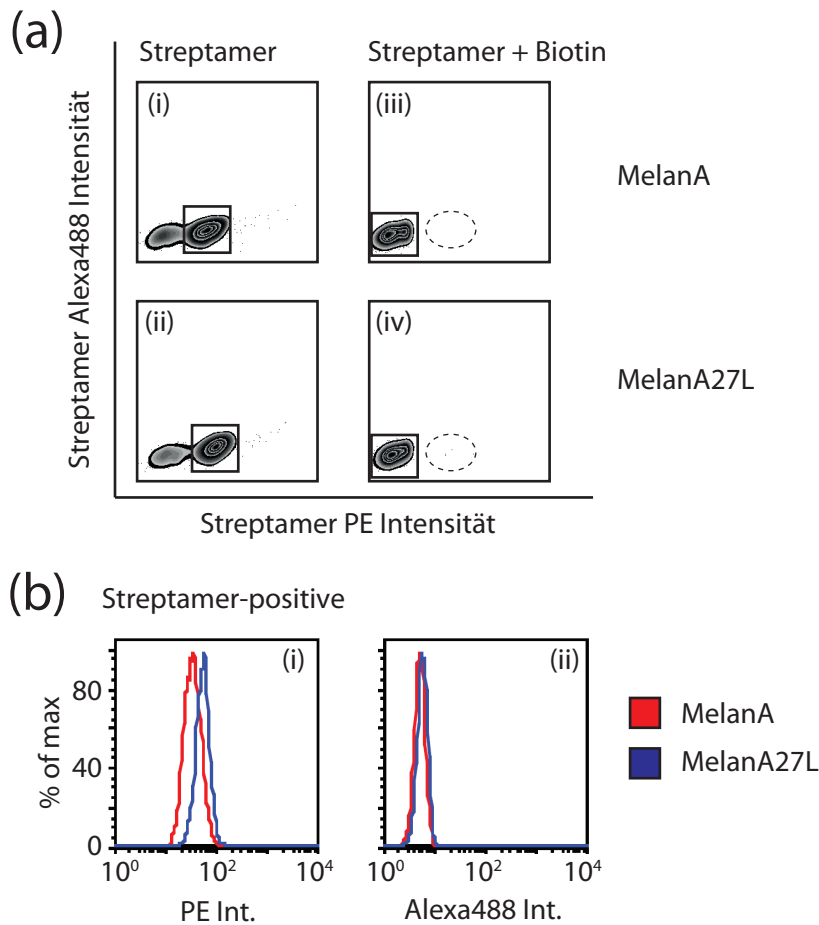
Die Alexa488-fluoreszenzmarkierten MHC I-Moleküle wurden anschließend mit PE-fluoreszenzmarkierten Streptactin-Molekülen inkubiert, sodass zweifach fluoreszenzmarkierte, monomerisierbare humane MHC I-Multimere entstanden.

#### **3.1.2 Insuffiziente Streptamerfärbung humaner $CD8^+$ T-Zellen**

Die humanen Streptamere sollten anschließend in  $k_{\text{off-rate}}$  Assays zur Anwendung kommen. Die humanen MelanA/MART1-spezifischen T-Zell-Klone wurden aufgetaut, die CMV-spezifischen T-Zellen direkt ex vivo gewonnen, über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt und die T-Zellen jeweils nach Protokoll mit Streptameren gefärbt. Die ersten Versuche,  $k_{\text{off-rate}}$ -Assays mit humanen Zellen durchzuführen, erbrachten unerwartete Ergebnisse. Die Streptamer-gefärbten T-Zellen zeigten unter dem konfokalen Mikroskop eine nur schwach detektierbare Streptamer-Färbung. Eine Biotinzugabe zur Monomerisierung und Ablösung der Streptamere hatte keine auswertbare Veränderung der Fluoreszenz zur Folge.

Da am Mikroskop kaum Streptamer-Färbung detektiert worden war, wurde im nächsten Schritt das Vorliegen und die Qualität der Streptamer-Färbung durch FACS-Analysen der T-Zellen evaluiert. Zunächst wurden MelanA/MART1-spezifische T-Zellen mit  $\alpha CD8$  Antikörpern allein als Negativkontrolle oder zusätzlich mit zweifach fluoreszenzmarkiertem Streptamer gefärbt, wobei die MHC I-Moleküle einmal mit dem Epitop MelanA und einmal mit MelanA27L beladen worden waren.

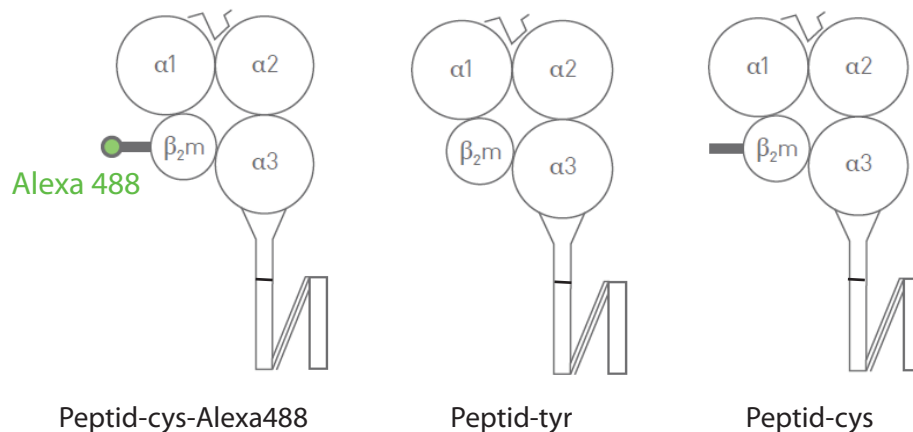




**Abbildung 3.1: Streptamerfärbung MelanA/MART1-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen:** Humane Klone MelanA/MART1-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefärbt mit MelanA-Streptamer (a, i) bzw. MelanA27L-Streptamer (a, ii). Bei beiden Proben ist eine PE-Färbung vorhanden, jedoch keine Alexa488-Färbung detektierbar. Die PE- und das Fehlen der Alexa 488-Fluoreszenzintensität der Streptamer-positiven Populationen aus (a,i) und (a,ii) ist in (b) in Histogramm-Form dargestellt. Nach Streptamerablösung durch Biotinzugabe ist bei beiden Proben keine PE-Färbung mehr detektierbar (gestrichelte Ellipsen in (a, iii) und (a, iv)).

In der FACS-Analyse zeigten beide Proben eine vergleichbare PE-Färbung, die nach Biotinzugabe nicht mehr nachweisbar war, wie in Abb. 3.1 dargestellt. Eine Alexa488-Färbung war nicht detektierbar. Das Ergebnis sprach für das Vorliegen einer Streptamerfärbung, sowie für eine Monomerisierbarkeit der Streptamere. Allerdings war ausschließlich PE, nicht aber der zweite Fluoreszenzfarbstoff, Alexa488, detektiert worden.

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden im nächsten Schritt humane versus murine Streptamerfärbungen analysiert. Aufgrund der besseren Verfügbarkeit wurden für alle folgenden Versuche humane CMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen verwendet. Es wurden



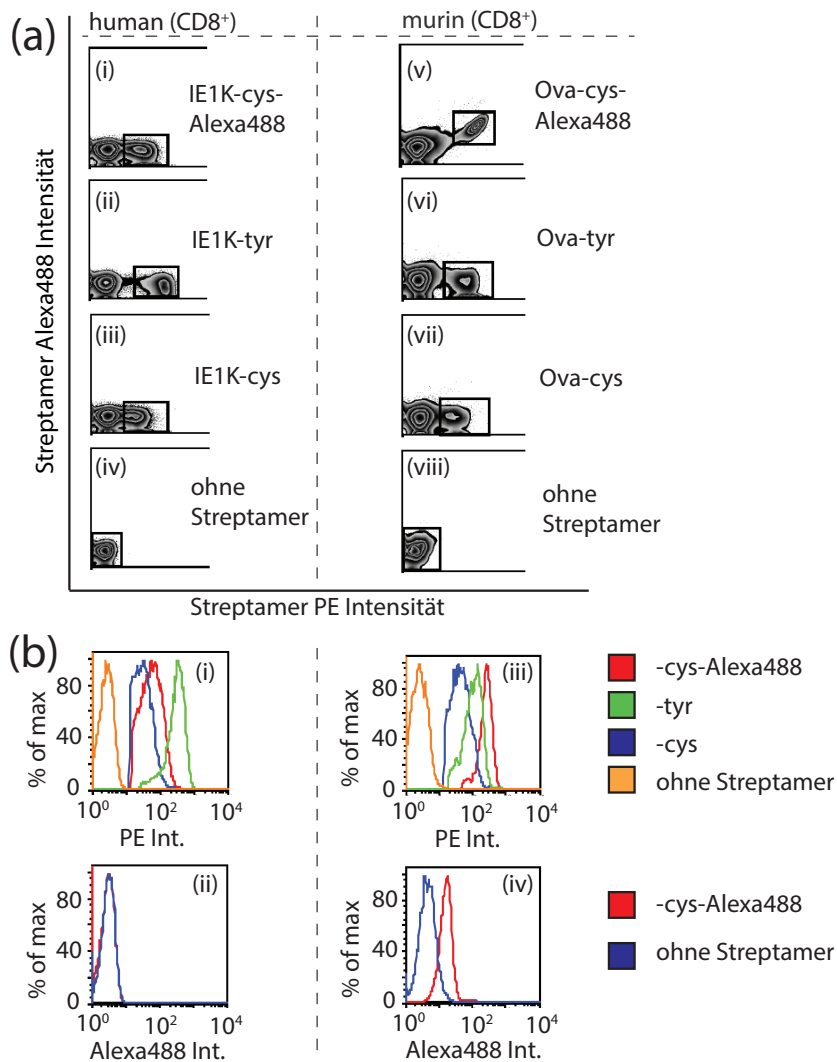
**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung der zur Streptamerherstellung verwendeten pMHC-Moleküle:** Im  $\beta_2m$  des pMHC wurde die Aminosäure Tyrosin an Position 67 durch ein Cystein ersetzt und an dieses Cystein der Fluoreszenzfarbstoff Alexa488 konjugiert (links). Am  $\beta_2m$  des pMHC wurden keine Modifikationen vorgenommen (Mitte). Im  $\beta_2m$  wurde Tyrosin an Position 67 durch Cystein ersetzt, aber keine Farbstoffkonjugation vorgenommen. Die Bezeichnung der pMHC-Moleküle richtet sich nach dem verwendeten Peptid, sowie den Modifikationen am  $\beta_2m$ , wie einer Cystein-Insertion oder einer zusätzlichen Alexa488-Konjugation.

drei unterschiedliche Streptamere verwendet, wie in Abb. 3.2 dargestellt. In einer ersten Probe wurden die zweifach fluoreszenzmarkierten Streptamere (im Folgenden IE1K-cys-Alexa488 genannt) verwendet. In einer zweiten Probe wurden einfach fluoreszenzmarkierte Streptamere mit PE am Streptactin verwendet, deren  $\beta_2m$ -Moleküle nicht verändert worden waren (im Folgenden IE1K-tyr genannt). In einer dritten Probe wurden die Zellen mit Streptameren gefärbt, in deren  $\beta_2m$ -Molekülen die Cystein-Mutation an Position 67 zwar vorlag, jedoch nicht Alexa488-konjugiert worden war (im Folgenden IE1K-cys genannt).

Humane Blutlymphozyten wurden mit  $\alpha CD8$  Antikörpern allein oder in Kombination mit den soeben genannten Streptameransätzen gefärbt. Zum Vergleich wurden analog Streptamer-gefärbte Milzzellen von OT-1 Mäusen analysiert, die zur Negativkontrolle mit B6-Milzzellen vermischt worden waren. Zur Streptamerherstellung wurden für die murinen Zellen Ova<sub>256-264</sub> beladene H2-k<sup>b</sup> MHC-Moleküle verwendet. Auch die murinen Zellen wurden mit  $\alpha CD8$  Antikörpern alleine oder in Kombination mit Streptameren gefärbt. Die Ansätze wurden analog zu den humanen Proben folgendermaßen benannt: Ova-cys-Alexa488 bezeichnete das zweifach fluoreszenzmarkierte Streptamer, Ova-tyr das einfach fluoreszenzmarkierte ohne Veränderungen am  $\beta_2m$  des pMHC I-Komplexes und Ova-cys das einfach fluoreszenzmarkierte mit Cystein an Position 67 des  $\beta_2m$ .

Wie in Abb. 3.3 dargestellt, zeigten die murinen mit zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten Zellen sowohl PE- als auch Alexa488-Färbung. Die PE-Färbung war vergleichbar mit derer der Zellen, die mit einfach fluoreszenzmarkiertem

### 3.1 Streptamerfärbung humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen



**Abbildung 3.3: Vergleich humaner und muriner Streptamerfärbungen:** (a): Humane CMV-spezifische und murine Ova-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigen eine deutliche und vergleichbare PE-Färbung nach Färbung mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren, deren  $\beta_2m$ -Moleküle keinerlei Veränderungen erfahren hatten (a, ii und a, vi). Die murinen zweifach fluoreszenzmarkierten Zellen zeigen eine vergleichbar gute PE-Färbung, sowie zusätzlich Alexa488-Färbung (a, v). Bei humanen zweifach fluoreszenzmarkierten Zellen ist die PE-Färbung reduziert. Eine Alexa488-Färbung lässt sich nicht nachweisen (a, i). Murine und humane Zellen zeigen eine reduzierte PE-Färbung nach Färbung mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren, die ein nicht Alexa488-konjugiertes Cystein 67 im  $\beta_2m$  enthalten (a, iii und a, vii). (b): Darstellung der PE- und Alexa488-Fluoreszenzintensität der in (a) schwarz eingerahmten Populationen als Histogramme, in (b, i und b, ii) die humanen und in (b, iii und b, iv) die murinen Zellen.

Streptamer mit unverändertem  $\beta_2m$  gefärbt worden waren. Die humanen mit zweifach fluoreszenzmarkiertem Streptamer gefärbten Zellen zeigten keine Alexa488-Färbung. Außerdem war ihre PE-Färbung deutlich reduziert im Vergleich zu den Zellen, die mit einfach fluoreszenzmarkiertem Streptamer mit natürlichem  $\beta_2m$  gefärbt worden waren. Bei der Streptamerfärbung humaner und muriner Zellen mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren, in deren  $\beta_2m$  das Cystein an Position 67 zwar eingefügt, aber an das keine Alexa488-Konjugation erfolgt war, war die PE-Färbeintensität ebenfalls deutlich reduziert. Zusammengefasst zeigten humane mit zweifach fluoreszenzmarkiertem Streptamer gefärbte Zellen keine Alexa488-Färbung. Die PE-Färbung war verglichen mit einfach am Streptactin-Rückgrat fluoreszenzmarkiertem Streptamer reduziert. Eine ähnlich oder noch deutlicher reduzierte PE-Färbung zeigte sich bei Verwendung von einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren, deren  $\beta_2m$ -Moleküle ein nicht Alexa488-konjugiertes Cystein 67 enthielten, sowohl im murinen als auch im humanen System.

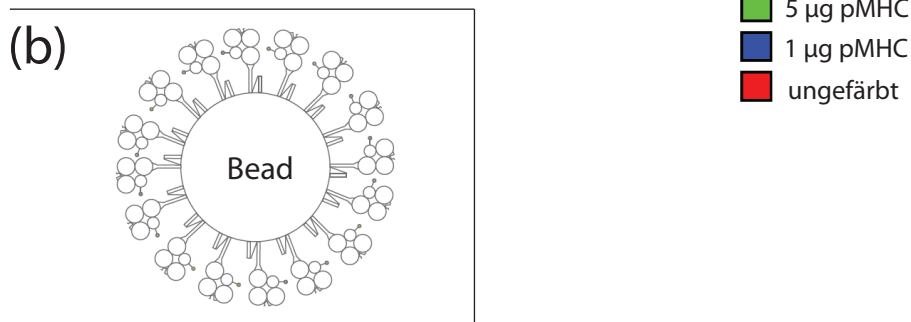
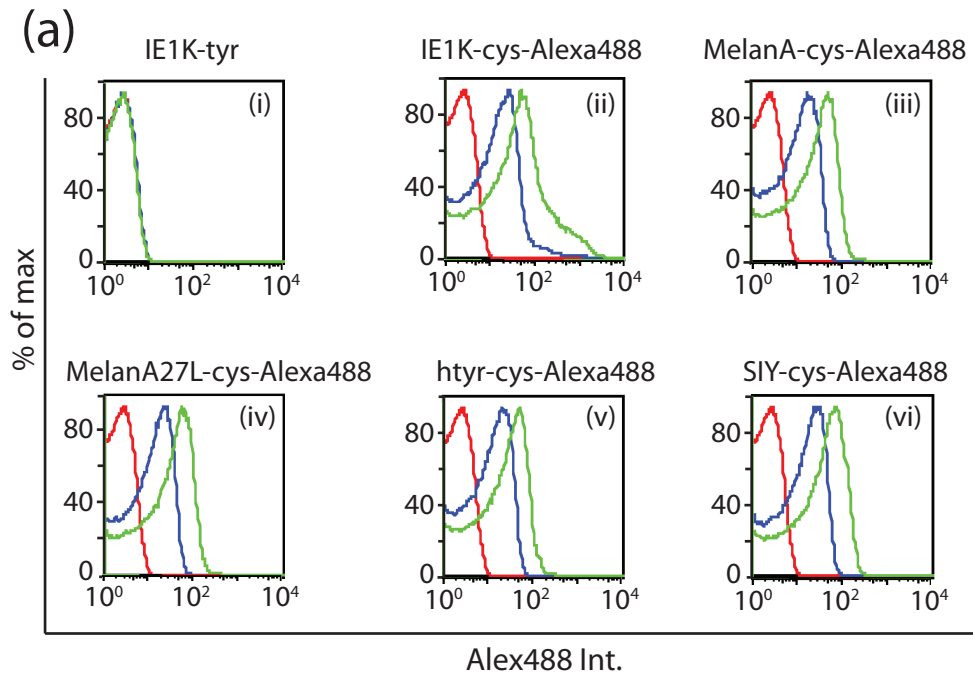
### 3.2 Analyse der verwendeten Reagenzien

Um herauszufinden, warum bei der Streptamerfärbung humaner T-Zellen die PE-Fluoreszenzintensität deutlich schwächer war als bei murinen T-Zellen und keine Alexa488-Färbung detektierbar war, wurden die humanen Streptamere, insbesondere ihre Zusammensetzung und die Alexa488-Konjugation des  $\beta_2m$  näher untersucht.

#### 3.2.1 Alexa488-Konjugation

Zunächst wurde geprüft, ob die humanen pMHC-Moleküle Alexa488-konjugiert waren. Die pMHC-Moleküle wurden mit Streptactin-Beads inkubiert. An diese mit Streptactin überzogenen Agarose-Kügelchen können die rekombinanten MHC I-Moleküle über ihre StreptagIII-Sequenz analog zum Streptactin binden. So lässt sich die Fluoreszenzmarkierung der MHC I-Moleküle unabhängig von der spezifischen TCR/pMHC-Bindung in FACS-Analysen testen.

Die Streptactin-Beads wurden mit jeweils 1  $\mu\text{g}$  bzw. mit 5  $\mu\text{g}$  Alexa488-konjugierten humanen pMHC-Molekülen, nämlich HLA A2 MelanA, HLA A2 MelanA27L, HLA B8 IE1K, sowie HLA A2 htyr und zur Kontrolle mit murinen Alexa488-konjugierten pMHC I-Molekülen H2- $k^b$  SIY inkubiert. Als Negativkontrolle wurden unbeladene Beads eingelesen. Wie in der Abb. 3.4 ersichtlich, war bei allen verwendeten pMHC-Molekülen eine Alexa488-Färbung detektierbar. Sie war vergleichbar bei allen eingelesenen Proben. Bei Inkubation der Beads mit 5  $\mu\text{g}$  pMHC war die Färbeintensität bei allen Proben höher als bei 1  $\mu\text{g}$ . Die pMHC-Moleküle der humanen Streptamere waren folglich Alexa488-konjugiert. Es war kein Unterschied in der Qualität der Färbung zwischen humanen und murinen pMHCs feststellbar. Je mehr pMHC dem Ansatz zugegeben wurde, desto besser war die Färbeintensität. Es gab keinen Unterschied in der Bindungsfähigkeit der



**Abbildung 3.4: Test der Alexa488-Konjugation der pMHC-Moleküle:**  
 (a) FACS-Analyse von pMHC-Molekülen gebunden an Streptactin-Beads: humane und murine Alexa488-konjugierte pMHC-Moleküle zeigen vergleichbare Alexa488-Fluoreszenzintensitäten. Bei Inkubation der Beads mit 5 µg pMHC ist die Fluoreszenzintensität bei allen Proben höher als bei 1 µg. (b) Schematische Darstellung eines pMHC-bedeckten Beads.

humanen und murinen pMHC-Moleküle an die Streptactin-Beads. Analog müssten die Moleküle an das Streptactin binden können. Die Ergebnisse deuteten auf eine mögliche Multimerisierung der humanen pMHC-Moleküle am Streptactin hin.

### 3.2.2 Optimierung des Streptameransatzes

Die Untersuchung an Beads hatte eine Alexa488-Konjugation der pMHC-Moleküle bewiesen und starke Hinweise für die Möglichkeit ihrer Multimerisierung am

Streptactin erbracht. Im nächsten Schritt sollte daher untersucht werden, ob durch eine veränderte Zusammensetzung des Streptameransatzes bessere Bedingungen zur Bildung funktioneller Streptamere geschaffen werden können.

### 3.2.2.1 pMHC-Titration

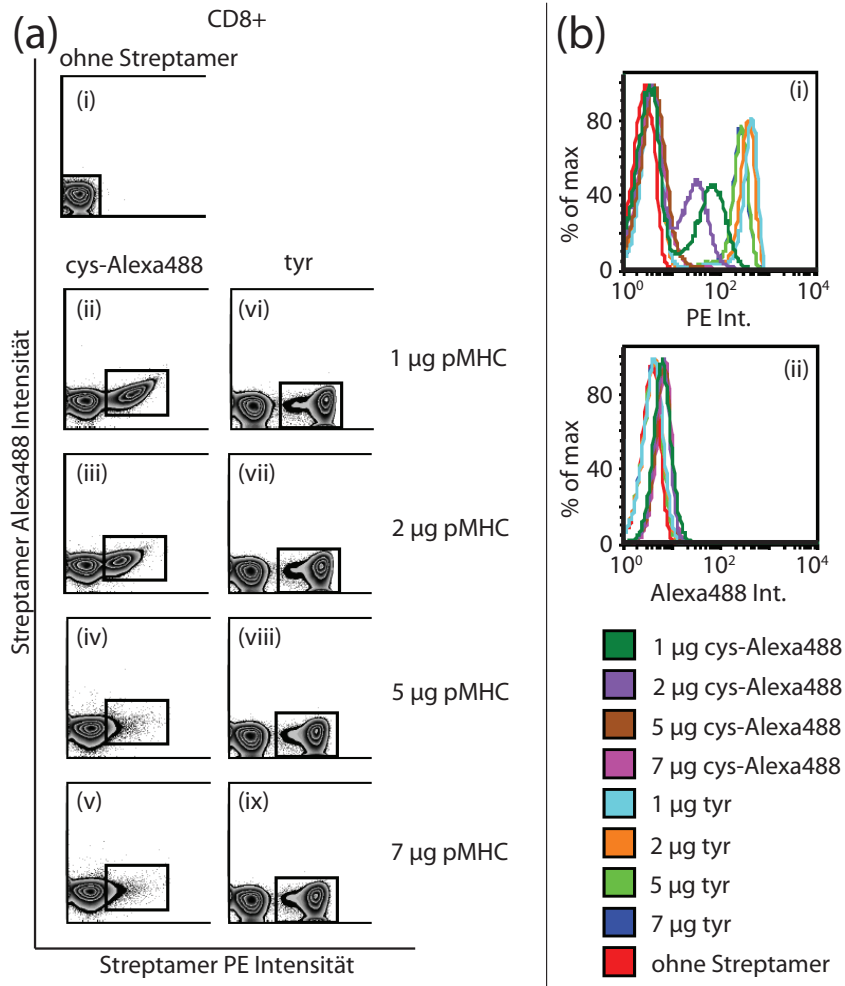
Da die Alexa488-Färbeintensität auf Beads mit zunehmender pMHC-Menge stärker wurde, sollte geprüft werden, ob die pMHC-Menge im Streptameransatz zu gering war. Wenn nur wenige pMHC-Moleküle an ein Streptactin-Rückgrat binden, wäre nur eine schwache Streptamerbindung an die T-Zellen möglich. Eine instabile Bindung mit An- und Abdiffusion der Streptamere von den Zellen würde die schwächere PE-Färbung und wenige pMHC-Moleküle im Streptamer die nicht detektierbare Alexa488-Färbung erklären.

Mit dem Ziel, die proportionale Zusammensetzung von pMHC und Streptactin im Streptameransatz zu verbessern, wurde die pMHC-Menge variiert. Neben 1 µg, der bisher verwendeten Menge, wurden 2 µg, 5 µg oder 7 µg zugegeben. Die unterschiedlichen Streptameransätze wurden an humanen CMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen getestet. Zum Vergleich wurden die Zellen nicht nur mit zweifach fluoreszenzmarkierten, sondern auch mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbt, in deren Ansatz dieselben Mengen an pMHC-Molekülen ohne Cystein-Mutation und Alexa488-Konjugation der  $\beta_2m$  verwendet wurden. Als Negativkontrolle wurden nicht Streptamer-gefärbte Zellen eingelesen. Wie in Abb. 3.5 dargestellt, zeigte der pMHC-Titrationsversuch, dass die PE-Färbung der einfach fluoreszenzmarkierten Streptamere grundsätzlich besser als die der zusätzlich Alexa488-konjugierten Streptamere war. Außerdem war die PE-Fluoreszenzintensität immer identisch, unabhängig von den im Streptameransatz verwendeten pMHC-Mengen. Wurden zweifach fluoreszenzmarkierte pMHC-Moleküle verwendet, so fiel auf, dass die PE-Färbung mit zunehmender pMHC-Menge unerwarteter Weise abnahm.

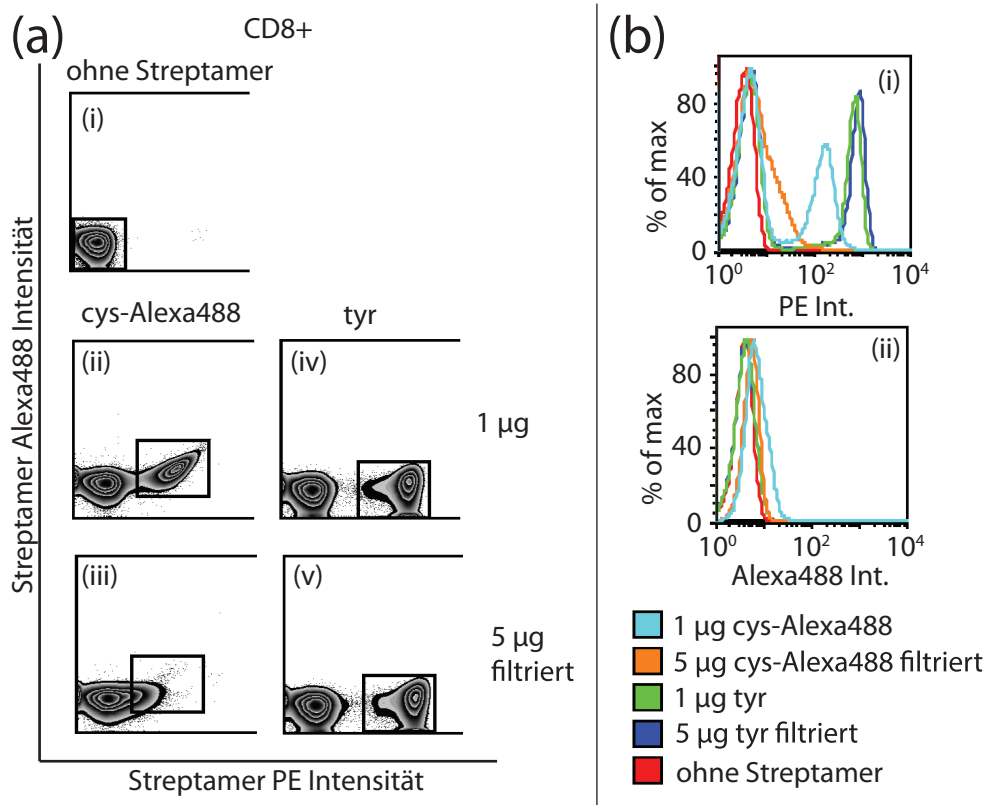
### 3.2.2.2 pMHC-Filtration

Es sollte daher als nächstes untersucht werden, ob die Verschlechterung der PE-Färbung bei Verwendung größerer pMHC-Mengen im Streptameransatz durch nicht im Streptamer polymerisierte freie pMHC-Moleküle verursacht wurde. Die erhöhte pMHC-Menge von 5 µg im Streptameransatz wurde beibehalten. Vor der Zellfärbung wurde der Streptameransatz über 100 K Spintubes filtriert, um überschüssige, nicht an den Streptactin-Molekülen multimerisierte pMHC-Moleküle von den Streptameren zu trennen. Humane Blutlymphozyten wurden mit diesen Streptameren gefärbt. Als Referenzen wurden eine nicht Streptamer-gefärbte Negativkontrolle, sowie Streptamer-gefärbte Zellen mit 1 µg ein- bzw. zweifach fluoreszenzmarkierten pMHC-Molekülen im Streptameransatz analysiert.

Wie in Abb. 3.6 dargestellt, hatte die hohe pMHC-Menge mit anschließender Filtration auf die mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten Zellen



**Abbildung 3.5: pMHC-Titration im Streptameransatz:** Färbung CMV-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit ein- (rechte Spalte in (a): tyr) oder zweifach (linke Spalte in (a): cys-Alexa488) fluoreszenzmarkierten Streptameren. Die Streptameransätze enthalten jeweils 1; 2; 5 oder 7 µg pMHC. Die Histogramme (b) zeigen, dass bei allen Proben mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren eine vergleichbare und von der pMHC-Menge unabhängige PE-Intensität vorliegt, bei zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren ist die PE-Intensität aller Proben schwächer und nimmt mit zunehmender pMHC-Menge ab. Ab 5 µg pMHC ist sie nicht mehr nachweisbar (b, i). Alexa488-Fluoreszenz wurde nicht detektiert (b, ii).



**Abbildung 3.6: Abfiltration des überschüssigen pMHC im Streptameransatz:** Färbung CMV-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit ein- ((a, iv) und (a, v)) oder zweifach fluoreszenzmarkierten ((a, ii) und (a, iii)) Streptameren. Die Streptameransätze enthielten jeweils 1 oder 5 µg pMHC, die Färbeansätze mit 5 µg wurden nach der Inkubation in 100 K Spintubes abzentrifugiert, um überschüssiges, nicht multimerisiertes pMHC zu entfernen. Die PE-Färbung der mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten Zellen ist gleichbleibend und unbeeinträchtigt durch die Filtration. Die PE-Färbung bei Verwendung zweifach fluoreszenzmarkierter Streptamere ist bei 5 µg pMHC trotz Filtration deutlich reduziert ((a, iii) und orangene Kurve im Histogramm (b, i)), aber intensiver als die der ungefilterten Probe aus Abb 3.5 und als Rechtsverschiebung der PE-Kurve im Histogramm sichtbar.

keine Auswirkungen. Bei den zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren zeigte sich nach Zugabe von 5 µg pMHC und anschließender Filtration eine im Vergleich zur ungefilterten Probe verbesserte PE-Färbung, die jedoch noch immer reduziert war im Vergleich zur Färbung mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren. Die mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten T-Zellen zeigten eine durchweg homogene PE-Färbung, die unabhängig von der pMHC-Menge im Streptameransatz war. Die pMHC-Mengen im Streptameransatz veränderten das Färbeverhalten nur dann, wenn die MHC I-Moleküle Alexa488-konjugiert waren. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die einfach fluoreszenzmarkierten Streptamere stabil an humane T-Zellen binden können und dass die zusätzliche Alexa488-



Konjugation der humanen pMHC I-Moleküle eine Instabilität der Streptamerbindung an die TCR zur Folge hat.

### 3.2.2.3 Zusätzliche Peptidzugabe

Eine solch instabile Bindung kann durch instabile pMHC-Moleküle bedingt sein. Da für die pMHC-Stabilität das präsentierte Peptid von herausragender Bedeutung ist, sollte im nächsten Schritt ein möglicher Peptidmangel im humanen Streptameransatz untersucht werden.

Zum Streptameransatz mit 1 µg pMHC wurden zusätzlich 0,5 µg IE1K-Peptid hinzugegeben. Humane CMV-spezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit diesem Streptameransatz inkubiert und durchflusszytometrisch analysiert. Zum Vergleich wurden eine ungefärbte Kontrolle, sowie nach herkömmlichem Protokoll mit ein- bzw. zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbte CMV-spezifische humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingelesen. Wie in Abb. 3.7 dargestellt, waren die Fluoreszenzintensitäten von PE und Alexa488 bei Inkubation des Streptameransatzes mit zusätzlichem Peptid identisch zu den Fluoreszenzintensitäten bei Zellfärbung mit herkömmlichen zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren. Es war keine Alexa488-Färbung nachweisbar und die PE-Färbung war reduziert. Die Ergebnisse sprachen gegen eine Instabilität der pMHC I-Moleküle bedingt durch einen Mangel an Epitop.

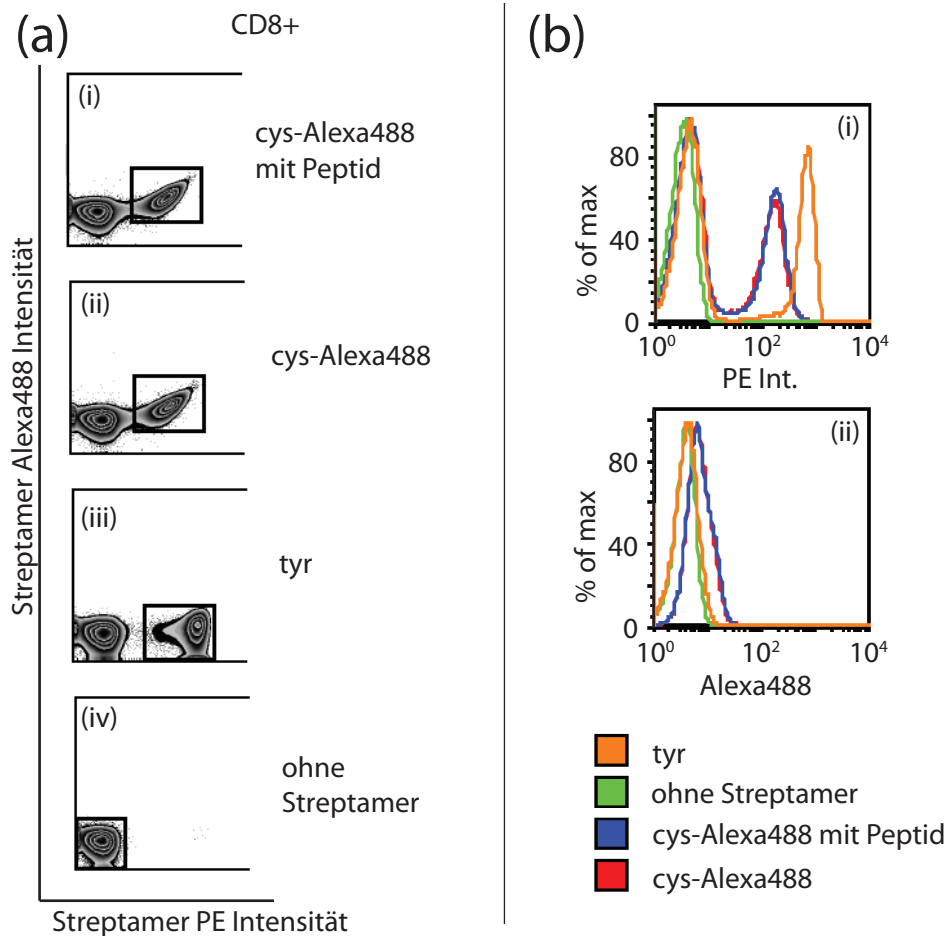
### 3.2.3 Alexa488-Vorkonjugation des $\beta_2m$

Die Ergebnisse der vorhergehenden Versuche deuteten darauf hin, dass die Alexa488-Konjugation der humanen pMHC I-Moleküle die Streptamerbindung an die TCR beeinträchtigte. Eine mögliche Ursache wäre eine unspezifische Alexa488-Bindung bei der Alexa488-Konjugation an die schwere Kette des pMHC I-Moleküls, an eine die pMHC-TCR-Interaktion störende Stelle. Um dies näher zu untersuchen, wurde die Abfolge der Einzelschritte in der Herstellung von Alexa488-konjugierten pMHC I-Molekülen verändert.

#### 3.2.3.1 Erfolgreiche Konjugation und Rückfaltung

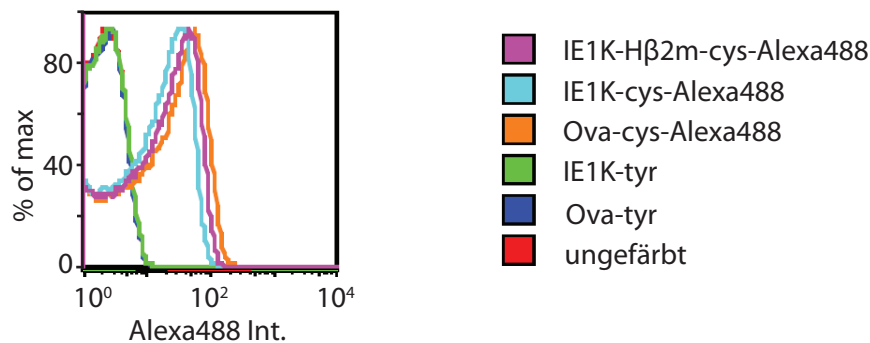
In den etablierten Protokollen für die Herstellung muriner Alexa488-konjugierter pMHC I-Moleküle erfolgt zunächst die Rückfaltung des pMHC I-Komplexes bestehend aus schwerer Kette,  $\beta_2m$  mit Cystein an Position 67 und Epitop. Nach erfolgreicher Rückfaltung wird der pMHC I-Komplex mit dem Farbstoff Alexa488 inkubiert. Nun wurde primär das humane  $\beta_2m$  mit Alexa488 inkubiert. Anschließend wurde diese schon Alexa488-konjugierte leichte Kette dem Rückfaltungsansatz mit rekombinanter schwerer Kette des HLA B8 und IE1K-Epitop hinzugefügt.

Die vorkonjugierten pMHC I-Moleküle wurden an Streptactin-Beads mit herkömmlich hergestellten murinen und humanen Proben verglichen. Als Negativkontrolle wurden ungefärbte Beads, sowie murine und humane nicht Alexa488-konjugierte pMHC I-Moleküle an Streptactin-Beads eingelesen. Wie in der Abb. 3.8



**Abbildung 3.7: Zusätzliches Peptid im Streptameransatz:** Färbung CMV-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit ein- oder zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren, in (a) als Dotplot, in (b) als Histogramm. Einem Streptameransatz mit zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren wurden 0,5 µg IE1K-Peptid zusätzlich hinzugefügt (a, i). Die Zellfärbungen mit zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren mit (a, i) und ohne (a, ii) Peptidzugabe unterscheiden sich nicht signifikant ((b, i) blaue und rote Kurve). Die PE-Färbung ist reduziert im Vergleich zur Färbung mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren ((b, i) orangene Kurve). Eine Alexa488-Färbung ist nicht detektierbar (b, ii).

ersichtlich, war die Fluoreszenzintensität aller Alexa488-konjugierten Moleküle vergleichbar. Dies sprach erstens für eine erfolgreiche Vorkonjugation. Die vergleichbaren Fluoreszenzwerte sprachen zweitens dafür, dass an den Molekülen jeweils die gleiche Menge an Fluoreszenzfarbstoff gebunden war, was auf eine spezifische Alexa488-Konjugation, auch der nicht vorkonjugierten Moleküle, hindeutete. Drittens war die Rückfaltung der vorkonjugierten leichten Kette mit der schweren Kette gelungen. Eine gestörte Interaktion der schweren mit der leichten Kette durch die Alexa488-Konjugation des  $\beta_2m$  konnte somit ausgeschlossen werden. Viertens

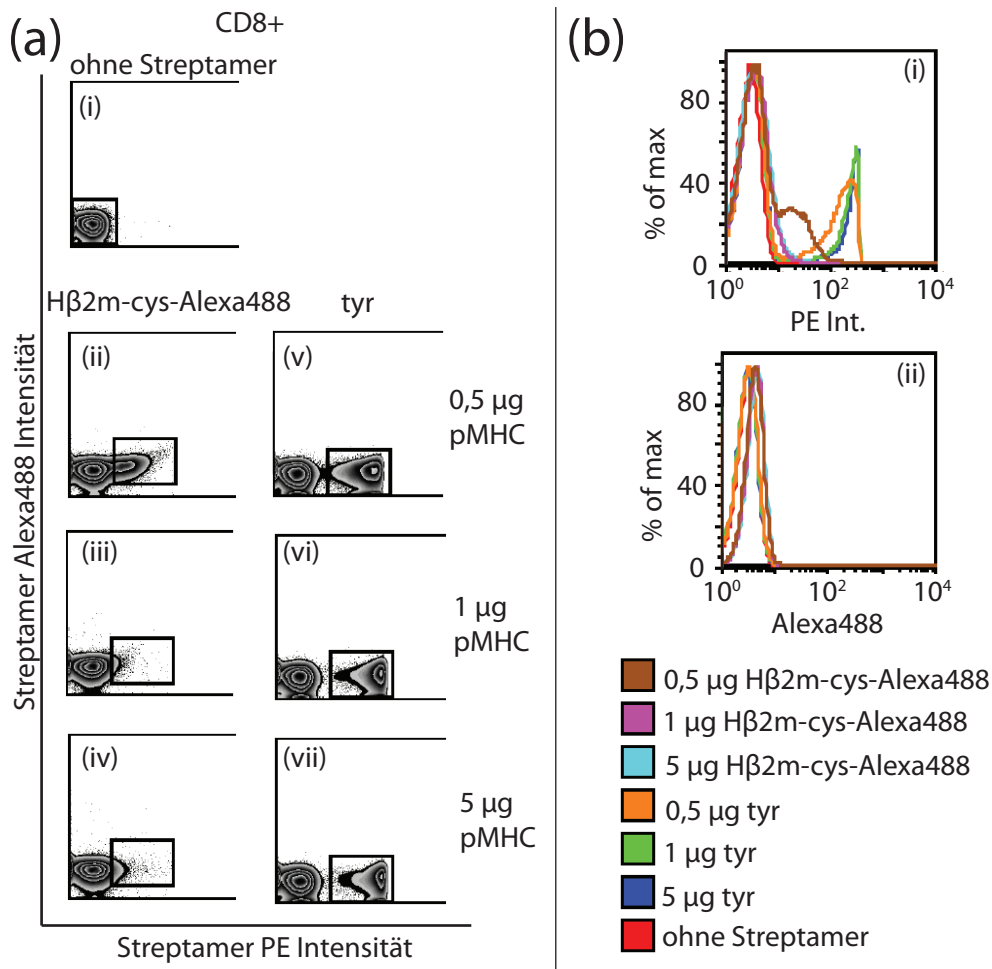


**Abbildung 3.8: Alexa488-Vorkonjugation des  $\beta_2m$ :** FACS-Analyse von pMHC-Molekülen an Streptactin-Beads: pMHC-Moleküle, deren  $\beta_2m$  vor der Rückfaltung mit der schweren Kette Alexa488-konjugiert wurde (IE1K-H $\beta_2m$ -cys-Alexa488), zeigen eine vergleichbare Alexa488-Intensität zu humanen und murinen pMHC-Molekülen, die erst nach der pMHC-Rückfaltung Alexa488-konjugiert wurden (IE1K-cys-Alexa488 bzw. Ova-cys-Alexa488). Ungefärbte Beads, sowie humane und murine unkongugierte pMHC-Moleküle als Negativkontrolle.

banden die vorkonjugierten, rückgefalteten pMHC I-Moleküle gut an Streptactin-Beads, was für die Möglichkeit einer Multimerisierung am Streptactin spricht.

### 3.2.3.2 Zellfärbung mit vorkonjugierten Streptameren

Im nächsten Schritt wurden die Streptamere mit vorkonjugierten pMHC-Molekülen an CMV-spezifischen humanen CD8<sup>+</sup> T-Zellen getestet. Den Proben wurden unterschiedliche pMHC-Mengen im Streptameransatz hinzugefügt, nämlich 0,5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g oder 5  $\mu$ g pMHC. Zum Vergleich wurden nach demselben Titrationsschema Zellen mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbt und eingelesen, wie in Abb. 3.9 dargestellt. Wie auch in Abb. 3.5 zeigten die mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten Zellen eine deutliche, konstante, von der pMHC-Menge im Streptameransatz unabhängige PE-Färbung. Die mit vorkonjugierten zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten Zellen zeigten bei Verwendung von 0,5  $\mu$ g pMHC eine reduzierte, aber noch vorhandene PE-Färbung, ab Mengen von 1  $\mu$ g pMHC keine PE-Färbung mehr. Eine Alexa488-Färbung konnte nicht nachgewiesen werden. Anders als bei nicht vorkonjugierten pMHC-Molekülen konnte schon bei 1  $\mu$ g pMHC (normaler Färbeansatz) keine PE-Färbung mehr detektiert werden. Zusammenfassend ließ sich also feststellen, dass im humanen System die PE-Färbung umso geringer ausfiel, je mehr Alexa488-(vor)konjugiertes pMHC im Streptameransatz vorhanden war. Eine signifikante Alexa488-Färbung war nicht detektierbar. Allerdings fiel bei den Zellfärbungen mit zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren eine im Diagramm diagonale, im Verlauf ausdünnende Zellverteilung nach rechts oben der Streptamer-gefärbten Populationen auf, z.B. in den Abb. 3.5, 3.6 und 3.7. Die (wenigen) deutlich PE-gefärbten Zellen waren auch



**Abbildung 3.9: Test der vorkonjugierten Streptamere an T-Zellen:** Färbung CMV-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren (a, v, vi, vii) oder mit vorkonjugierten zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren (a, ii, iii, iv). Die Streptameransätze enthalten jeweils 0,5 µg, 1 µg oder 5 µg pMHC. Einfach fluoreszenzmarkierte Streptamere zeigen eine gute und von der pMHC-Menge unabhängige PE-Färbung. Bei vorkonjugierten, zweifach fluoreszenzmarkierten pMHC-Molekülen ist die PE-Färbung bei allen Proben schwächer als bei einfach fluoreszenzmarkierten, nimmt mit zunehmender pMHC-Menge ab und ist ab 1 µg pMHC im Streptameransatz nicht mehr nachweisbar (b, i). Alexa488-Färbung wurde nicht detektiert (b, ii).

Alexa488-positiv. Je weniger PE-Färbung vorlag, desto weniger Alexa488-gefärbt waren die Zellen auch. Das Verhältnis blieb jedoch gleich (diagonale Zellverteilung). Dies deutete auf ein in sich intaktes und korrekt aufgebautes Streptamer hin. Die inhomogene und bei zunehmenden pMHC-Mengen weniger werdende PE-Färbung spricht für eine Problematik der pMHC-TCR-Interaktion, eine durch die Alexa488-Konjugation bedingte instabile Streptamer-Bindung an die TCR.

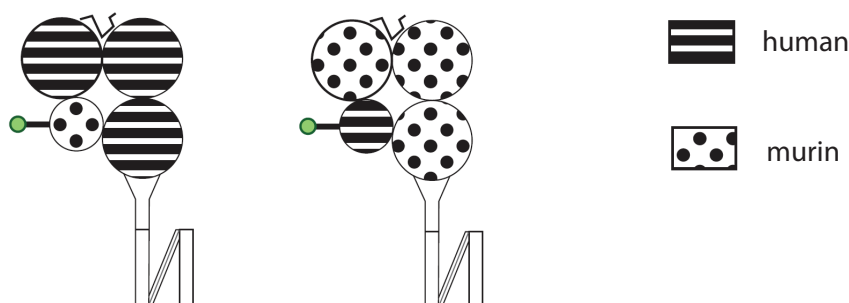
### 3.3 Analyse der TCR-pMHC-Interaktion

Die vorhergehenden Versuche hatten gezeigt, dass eine zum murinen System analoge Übertragung des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays auf das humane System nicht möglich war. Einfach fluoreszenzmarkierte humane Streptamere ohne Alexa488-Konjugation der pMHC-Moleküle waren funktional und zeigten eine gute PE-Färbung. Gestört wurde die Funktionalität, wenn die pMHC-Moleküle Alexa488-konjugiert waren. Eine Alexa488-Konjugation der pMHC-Moleküle an der leichten Kette schien im humanen System die TCR-pMHC-Interaktion zu beeinflussen. Dies war eine unerwartete Erkenntnis, da es sich bei den pMHC-Molekülen um hochkonservierte Strukturen handelt, die sich zwischen unterschiedlichen Spezies nur wenig unterscheiden. Daher wurde im nächsten Schritt die TCR-pMHC-Interaktion näher untersucht.

#### 3.3.1 Herstellung chimärer pMHC-Moleküle

Um der Hypothese einer gestörten TCR-pMHC-Interaktion weiter nachzugehen und ein strukturelles Korrelat hierfür zu finden, sollten chimäre pMHC-Moleküle hergestellt werden. Die humane schwere Kette sollte mit einem murinen  $\beta_2\text{m}$  und die murine schwere Kette mit einem humanen  $\beta_2\text{m}$  kombiniert werden, wie in Abb. 3.10 dargestellt. Da insbesondere die leichten Ketten hochkonservierte Strukturen sind, die sich bei Mensch und Maus nur geringfügig unterscheiden, wurde vermutet, dass eine Rückfaltung möglich sei.

Die Rückfaltung der chimären pMHC-Moleküle, nämlich  $\text{H2k}^b \text{ III/Ova}_{257-264}/\text{humanes } \beta_2\text{mAlexa488}$  und  $\text{HLA B8 III/IE1}_{(199-207)K}/\text{murines } \beta_2\text{m-tyr}$  (unmutiertes  $\beta_2\text{m}$ ) bzw.  $\text{HLA B8 III/IE1}_{(199-207)K}/\text{murines } \beta_2\text{mAlexa488}$  erfolgte nach dem etablierten Rückfaltungsprotokoll unter Verwendung der leichten Kette der jeweils anderen Spezies mit ggf. anschließender Alexa488-Konjugation. Die FPLC-Profile der chimären Moleküle zeigten Absorptionsmaxima in den erwarteten Fraktionen analog zu den rein murinen und rein humanen pMHC-Molekülen. Dies sprach für



**Abbildung 3.10: Chimäre pMHC-Moleküle:** Zur Herstellung chimärer pMHC-Moleküle werden die humanen und murinen schweren Ketten mit den  $\beta_2$ -Mikroglobulinen der jeweils anderen Spezies rückgefaltet.

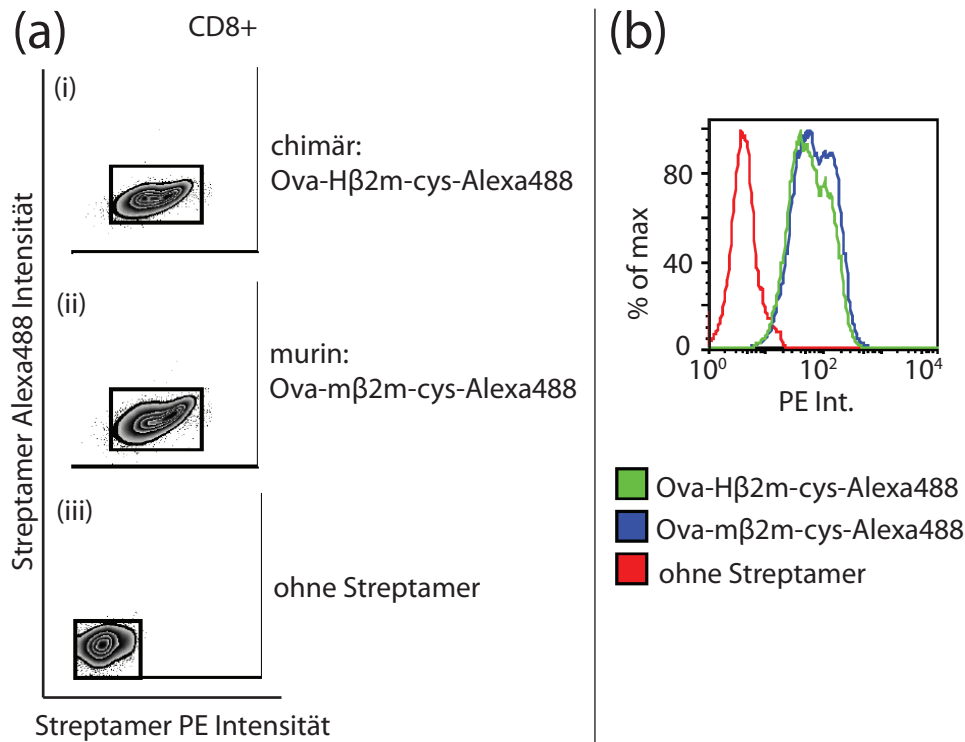
eine gelungene Rückfaltung.

#### 3.3.2 Gestörte Interaktion der humanen schweren Kette mit dem TCR

Die erfolgreich rückgefalteten chimären pMHC-Moleküle wurden anschließend an T-Zellen getestet. Splenozyten von OT1-Mäusen wurden mit  $\alpha$ CD8 Antikörpern alleine als Negativkontrolle oder in Kombination mit dem rein murinen Streptamer H2k<sup>b</sup> III/Ova<sub>257-264</sub>/murines $\beta_2$ m-Alexa488 oder dem chimären Streptamer H2k<sup>b</sup> III/Ova<sub>257-264</sub>/humanes $\beta_2$ m-Alexa488 gefärbt. Wie in Abb. 3.11 gezeigt, waren die Ergebnisse der murinen Zellen bei Verwendung des rein murinen Streptamers im Vergleich mit dem chimären Streptamer identisch. PE- und Alexa488-Färbung waren nachweisbar und vergleichbar stark.

Aufgereinigte humane Blutlymphozyten wurden mit  $\alpha$ CD8 Antikörpern alleine als Negativkontrolle oder in Kombination mit rein humanem Streptamer HLA B8 III/IE1<sub>(199-207)K</sub>/humanes $\beta_2$ m-Alexa488 bzw. mit dem chimären Streptamer HLA B8 III/IE1<sub>(199-207)K</sub>/murines $\beta_2$ m-Alexa488 gefärbt. Zusätzlich wurden die humanen Zellen mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren HLA B8 III/IE1<sub>(199-207)K</sub>/humanes $\beta_2$ m-tyr bzw. HLA B8 III/IE1<sub>(199-207)K</sub>/murines $\beta_2$ m-tyr gefärbt. Wie in Abb. 3.12 dargestellt, imponierte bei den humanen Zellen eine gute und vergleichbare PE-Färbung bei Verwendung von rein humanen bzw chimären einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren. Bei der Zellfärbung mit Alexa488-konjugierten Streptameren, egal ob rein human oder chimär, war keine Alexa488-Färbung nachweisbar und die PE-Färbung deutlich reduziert, beim chimären pMHC noch ausgeprägter als beim rein humanen. Bei murinen Zellen und Verwendung der murinen schweren Kette im Streptameransatz hatte weder ein Austausch der leichten Ketten, noch die Alexa488-Konjugation negative Auswirkungen auf die Bindungsfähigkeit der Streptamere an die T-Zellen, also auf die pMHC-TCR-Interaktion.

Bei humanen Zellen gelang eine stabile Bindung der rein humanen und der chimären Streptamere an die TCR, wenn die Streptamere nicht Alexa488-konjugiert waren. Der pMHC-Komplex band stabil an die TCR, unabhängig davon, ob die humane oder murine leichte Kette verwendet worden war. Sobald im Streptameransatz Alexa488-konjugierte pMHC-Moleküle verwendet wurden, war sowohl bei Zellfärbungen mit rein humanen als auch mit chimären Streptameren die PE-Intensität reduziert. Dies sprach dafür, dass ausschließlich die humane schwere Kette durch die Alexa488-Konjugation- egal welcher leichten Kette- in ihrer Bindungsfähigkeit an den TCR so beeinträchtigt wird, dass keine stabile Streptamerbindung mehr möglich ist. Zusammenfassend ließ sich hieraus schlussfolgern, dass erfolgreiche k<sub>off</sub>-rate-Assays im humanen Modell mit den bisher verwendeten Streptameren, deren pMHC-Moleküle an Position 67 des  $\beta_2$ m mit Alexa488 fluoreszenzmarkiert sind, nicht möglich sind, da diese Streptamere nicht stabil an TCR binden.



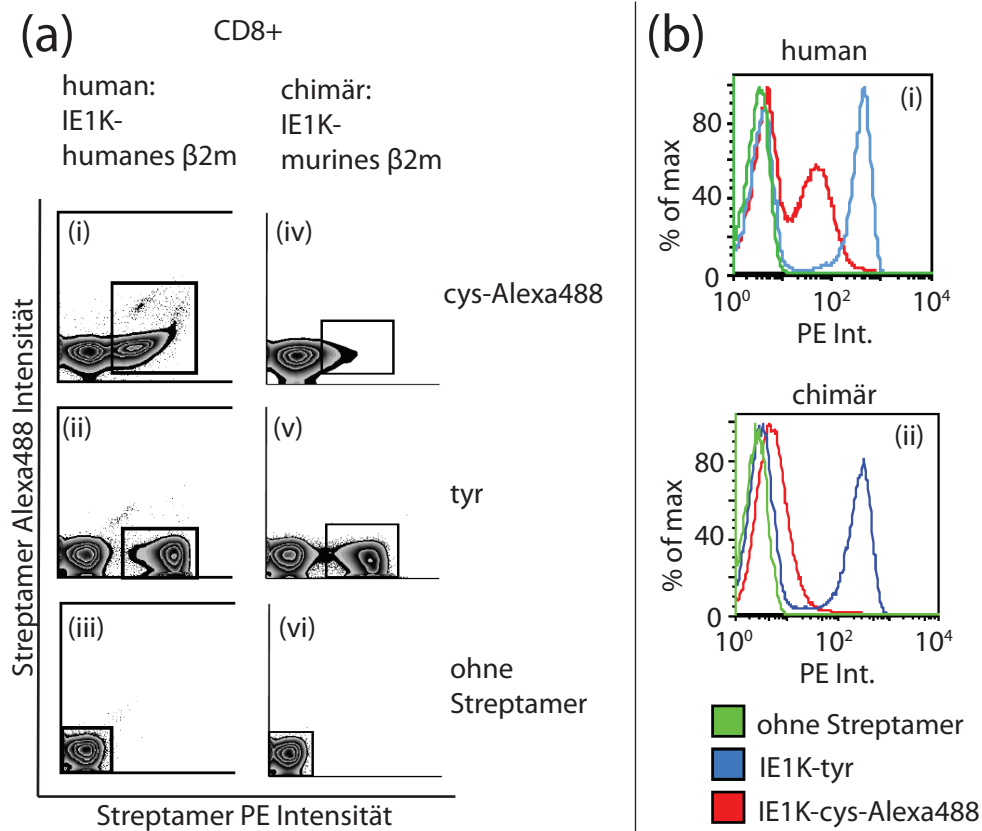
**Abbildung 3.11: Färbung muriner T-Zellen mit chimären Streptameren:** Färbung von Splenozyten von OT1-Mäusen mit  $\alpha$ CD8 PB Antikörpern alleine als Negativkontrolle (a, iii) oder in Kombination mit dem rein murinen Streptamer H2k<sup>b</sup> III/Ova<sub>257-264</sub>/murines $\beta_2$ m-Alexa488 (a, ii) oder dem chimären Streptamer H2k<sup>b</sup> III/Ova<sub>257-264</sub>/humanes $\beta_2$ m-Alexa488 (a, i). Beide Streptamer-gefärbte Proben zeigen eine vergleichbare PE-Färbung (b).

## 3.4 Neue Konjugationsstelle für Alexa488

Die vorhergehenden Versuche hatten gezeigt, dass eine Alexa488-Konjugation der pMHC-Moleküle an Position 67 des  $\beta_2$ m im humanen System eine stabile Streptamerbindung an die TCR behindert. Daher sollte die Konjugationsstelle für Alexa488 im humanen pMHC-Molekül an einer anderen Stelle eingefügt werden, an der störende Effekte auf die TCR-pMHC-Interaktion nicht zu erwarten waren.

### 3.4.1 Idee

Zur Insertion einer neuen Konjugationsstelle bot sich der Teil des pMHC-Moleküls an, der räumlich am weitesten von der TCR-pMHC-Bindungsregion entfernt liegt, nämlich der C-Terminus der schweren Kette. Bei den zur Streptamerherstellung verwendeten, rekombinant hergestellten pMHC-Molekülen befindet sich am C-Terminus anstelle der Transmembranregion eine StreptagIII-Sequenz. Sie besteht aus zwei StreptagII-Sequenzen, verbunden über eine sogenannte GS-Linkerregion, eine



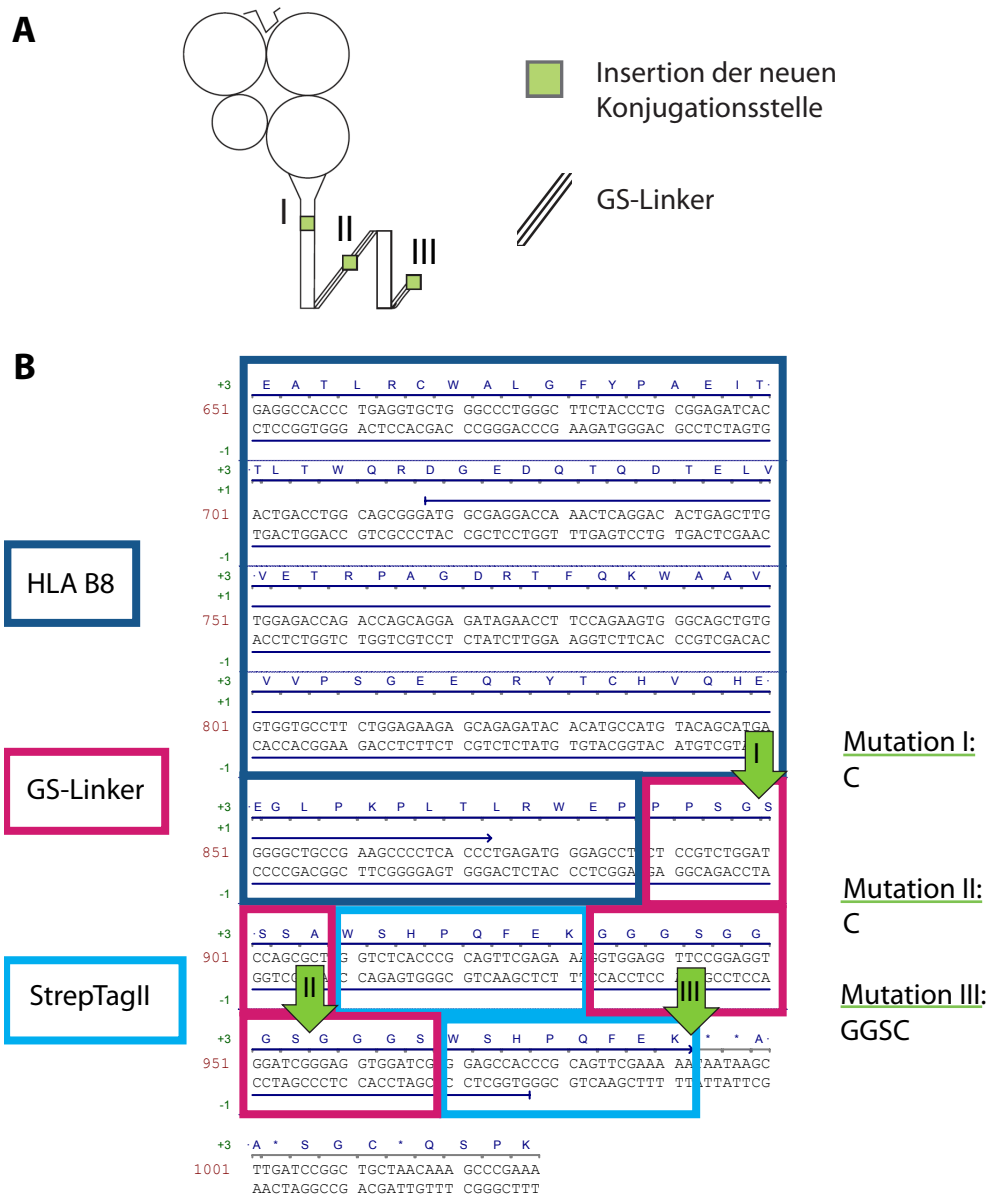
**Abbildung 3.12: Färbung humaner T-Zellen mit chimären Streptameren:**

Färbung CMV-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit rein humanen Streptameren (a: i, ii, iii) und chimären Streptameren (a: iv, v, vi). Die mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren (tyr)- rein human (a, ii) und chimär (a, v)- gefärbten Zellen sind deutlich und vergleichbar gut PE-gefärbt (blaue Kurven in (b,i) und (b,ii)). Die mit zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten Proben (cys-Alexa488: (a, i und a, iv)) zeigen eine deutlich reduzierte PE-Färbung, bei Verwendung chimärer Streptamere noch ausgeprägter als bei rein humanen (rote Kurven in (b,i) und (b,ii)).

flexible Peptidkette aus den Aminosäuren Glycin und Serin. Mit den zwei StreptagII-Sequenzen binden die pMHC-Moleküle beim Multimerisierungsprozesses an das Streptactin-Rückgrat.

Es wurden drei mögliche Insertionsstellen für ein Cystein zur Alexa488-Konjugation ausgewählt, wie in Abb. 3.13 dargestellt. Die erste, im Folgenden Mutation I genannt, sollte sich im GS-Linker zwischen dem C-Terminus der schweren Kette und der ersten StreptagII-Sequenz befinden, also zwischen dem C-Terminus des pMHC-Moleküls und der StreptagIII-Sequenz. Die zweite, im Folgenden Mutation II genannt, sollte in den GS-Linker zwischen den beiden StreptagII-Sequenzen, also innerhalb des StreptagIII eingebracht werden. Die dritte, Mutation III genannt, sollte nach der zweiten StreptagII-Sequenz, also am Ende des Gesamt-moleküls, eingeführt werden.

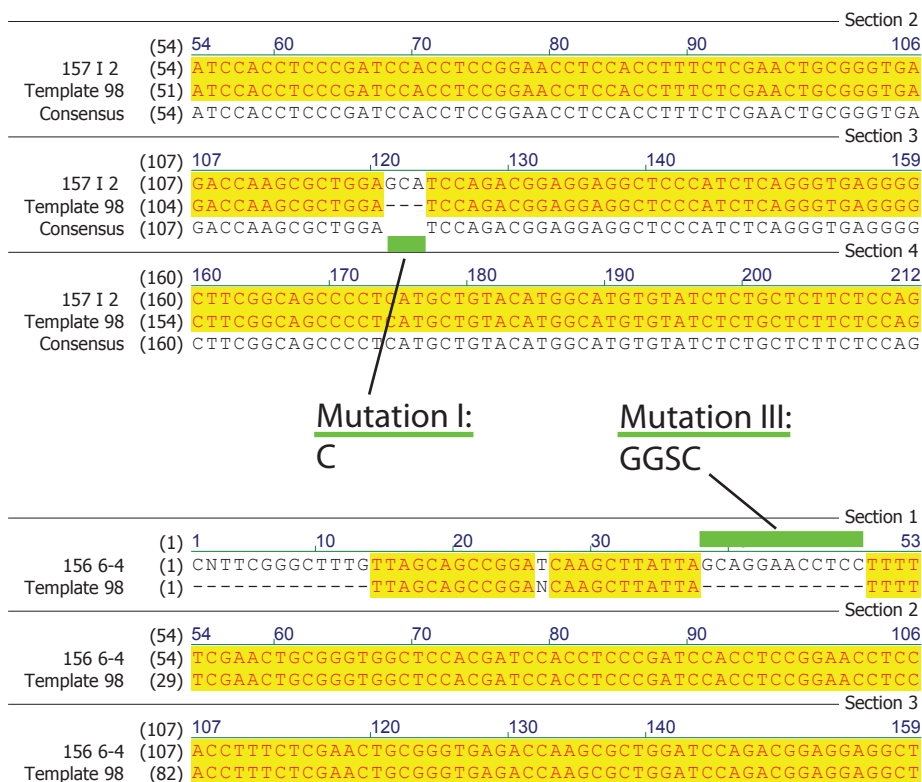




**Abbildung 3.13: Darstellung der neuen Alexa488-Konjugationsstellen in der schweren Kette des pMHC Moleküls:** A. Schematische Darstellung: Mutation I liegt zwischen dem C-Terminus der schweren Kette und der ersten StreptagII-Sequenz, Mutation II im GS-Linker zwischen den beiden StreptagII-Sequenzen, Mutation III nach der zweiten StreptagII-Sequenz, von dieser abgegrenzt durch einen kurzen GS-Linker. B. Sequenz des C-Terminus der schweren Kette des pMHC-Moleküls HLA B8 (dunkelblau) mit StreptagIII, bestehend aus zwei StreptagII-Sequenzen (hellblau) und GS-Linkern (pink). Die grünen Pfeile markieren die Insertionsstellen der Mutationen.

### 3.4.2 Herstellung der neuen pMHC-Moleküle

Zur Herstellung der neuen Moleküle mussten zunächst die entsprechenden, für die Aminosäure Cystein kodierenden Basenpaare mittels Mutagenese-PCR an den gewünschten Stellen in die DNA-Sequenz der pMHC-Moleküle eingebracht werden. Mithilfe der Software PrimerX wurden die Mutation enthaltende Primer entworfen. Um störende Effekte der neuen Alexa488-Konjugationsstelle auf die Bindungsregion des zweiten StreptagII mit seinem Liganden zu vermeiden, wurde bei Mutation III zwischen dem StreptagII und dem Cystein zusätzlich ein GS-Linker eingefügt. Die Mutagenese-PCR gelang für die Mutationen I und III, wie die Sequenzierungen in Abb. 3.14 zeigen. Trotz mehrfacher Versuche mit unterschiedlichen Primern und unter unterschiedlichen PCR-Bedingungen war keine erfolgreiche Mutagenese-PCR für Mutation II möglich. Die modifizierten Ketten mit den Mutationen I und III konnten anschließend erfolgreich exprimiert, mit leichter Kette und Peptid rückgefaltet und Alexa488-konjugiert werden.



**Abbildung 3.14: Erfolgreiche Insertion der neuen Konjugationsstellen:** Ausschnitte der Sequenzen der PCR-Mutageneseprodukte mit korrekt eingebrachten Insertionen für Mutation I oben und Mutation III unten.

### 3.4.3 Test an Streptactin-Beads

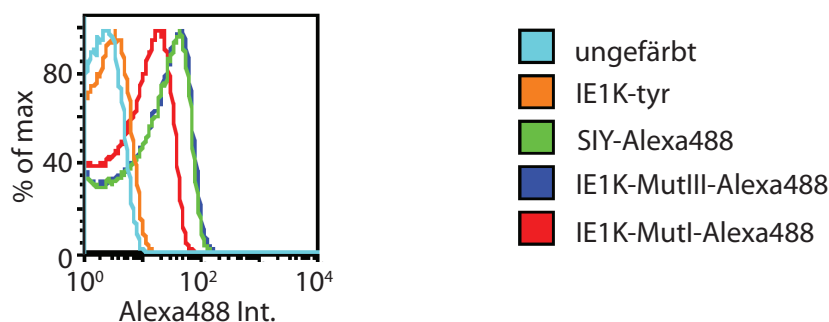
Bei der Testfärbung der neuen pMHC-Moleküle an Streptactin-Beads zeigten beide Mutationen im Vergleich zur Negativkontrolle eine deutliche Alexa488-Färbung, wie in Abb. 3.15 dargestellt. Die Fluoreszenzintensität der Mutation III war vergleichbar mit der murinen Kontrolle des herkömmlichen Streptamers und stärker als die der Mutation I. Die Rückfaltung und Alexa488-Konjugation der neuen pMHC-Moleküle war gelungen.

### 3.4.4 Zellfärbung

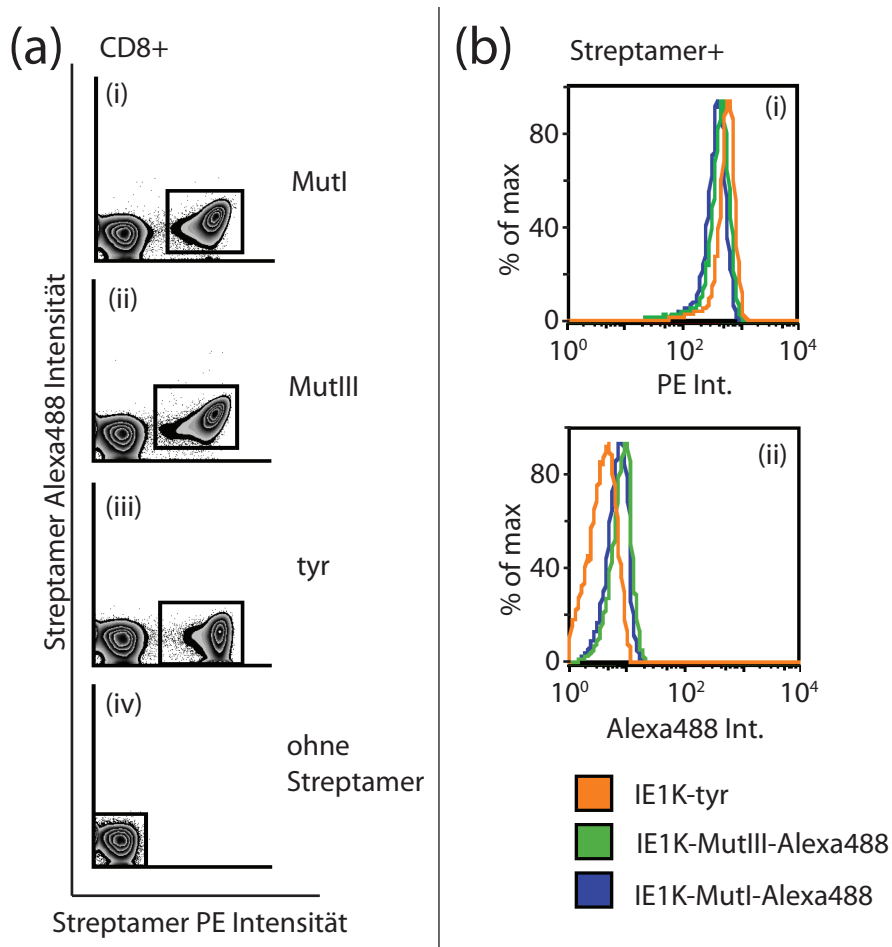
Es war gelungen, pMHC-Moleküle mit den neuen Konjugationsstellen herzustellen. An Streptactin-Beads zeigten die neuen pMHC-Moleküle die gewünschten Eigenschaften. Nun sollten diese pMHC-Moleküle in Streptameren bei Zellfärbungen getestet werden. Aufgereinigte humane Blutlymphozyten wurden entweder ausschließlich mit  $\alpha$ CD8 Antikörpern als Negativkontrolle oder zusätzlich mit Streptameren gefärbt, nämlich HLA B8 III/IE1K-tyr, HLA B8 III/IE1K-Mutation I, oder HLA B8 III/IE1K-Mutation III.

Wie in Abb. 3.16 dargestellt, war die PE-Fluoreszenzintensität der Zellen, die mit den neuen, zweifach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbt worden waren, vergleichbar mit der PE-Intensität der mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbten Zellen. Es war jedoch auch mit den neuen Streptameren nur eine minimale Alexa488-Färbung messbar. Nach Biotinzugabe war keine PE-Färbung mehr nachweisbar, wie in Abb. 3.17 gezeigt.

Die gute PE-Färbung spricht dafür, dass die Streptamere mit den neuen Alexa488-Konjugationsstellen im Gegensatz zu ihren Vorgängern stabil an T-Zellen binden können. Die Ablösung des Streptactin-Rückgrats gelingt, die pMHC-Moleküle sind monomerisierbar und diffundieren von den T-Zellen ab. Zusammenfassend gelang es uns also, funktionelle, monomerisierbare, zweifach fluoreszenzmarkierte Streptamere

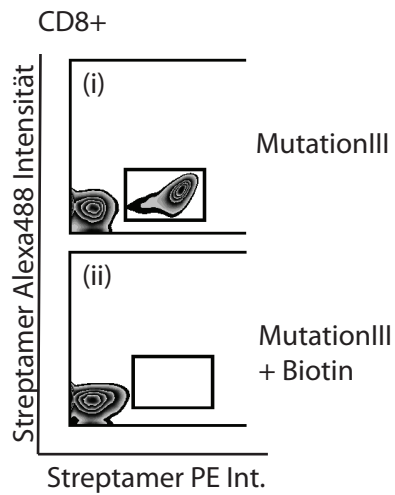


**Abbildung 3.15: Test der neuen pMHC-Moleküle an Streptactin-Beads:** Deutliche Alexa488-Intensität bei beiden Mutationen im Vergleich zu den Negativkontrollen. Intensivere Färbeintensität der Mutation III (dunkelblau), die vergleichbar mit der murinen Kontrolle des herkömmlichen pMHC (grün) ist.



**Abbildung 3.16: Test der neuen Streptamere an T-Zellen:** Färbung CMV-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit mit den neuen Streptameren HLA B8 III/IE1K-MutationI (a,i) oder HLA B8 III/IE1K-MutationIII (a,ii), als Kontrolle Färbung mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren HLA B8 III/ IE1K-tyr (a, iii) und nicht Streptamer-gefärbte Zellen (a, iv). Bei Färbung mit Streptameren beider Mutationen liegt eine deutliche PE-Intensität vor, die genauso intensiv ist, wie die einfach fluoreszenzmarkierter Streptamere (b,i). Eine Alexa488-Färbung ist nicht detektierbar (b,ii).

herzustellen, die stabil an humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen binden. In weiteren Versuchen muss untersucht werden, warum trotz nachgewiesener Alexa488-Konjugation der pMHC-Moleküle keine Alexa488-Emission detektierbar ist .



**Abbildung 3.17: Dissoziation der neuen Streptamere durch Biotin:** Färbung CMV-spezifischer humaner CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit dem neuen Streptamer HLA B8 III/IE1K-MutationIII (i), Einlesen der Probe vor und nach Biotinzugabe. Nach Biotinzugabe ist keine PE-Färbung mehr nachweisbar (ii).



---

## Diskussion

### 4.1 Besonderheiten bei der Übertragung des $k_{\text{off}}$ -rate-Assays auf das humane System

Mit der Entwicklung des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays wurde unter Verwendung der Streptamer-Technologie eine Möglichkeit geschaffen, Dissoziationskinetiken von monomeren pMHC-Molekülen vom TCR muriner T-Zellen zu messen. Da sich die Komponenten des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays wie pMHC-Moleküle und TCR im murinen und humanen System ähneln, versuchten wir, den Assay analog auf humane Zellen zu übertragen. Die Streptamere wurden nach demselben Protokoll hergestellt: in die hochkonservierte Struktur des  $\beta_2m$  wurde exakt wie im murinen Molekül die Aminosäure Tyrosin an Position 67 durch Cystein ersetzt, um eine geeignete Konjugationsstelle für den Farbstoff Alexa488 zu generieren. Trotz gelungener Farbstoffkonjugation an das humane pMHC waren keine erfolgreichen Streptamerfärbungen humaner T-Zellen und keine  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays möglich. Unsere Ergebnisse wiesen darauf hin, dass zwei Faktoren eine erfolgreiche Streptamerfärbung humaner T-Zellen verhinderten. Sie werden nachfolgend diskutiert.

#### 4.1.1 Stabile Streptamerbindung an die T-Zelle

Bei Verwendung zweifach fluoreszenzmarkierter Streptamere war die detektierbare PE-Fluoreszenzintensität der humanen T-Zellen deutlich schwächer als die der murinen T-Zellen. Humane und murine T-Zellen, die nur mit einfach fluoreszenzmarkierten Streptameren gefärbt worden waren, zeigten jedoch immer eine deutliche und vergleichbare PE-Fluoreszenzintensität. Durch die Analyse chimärer pMHC-Moleküle ergaben sich starke Hinweise dafür, dass eine Kombination der humanen

schweren Kette mit humanem oder murinem Alexa488-konjugiertem  $\beta_2m$  dazu führt, dass die Streptamere nicht mehr stabil an die T-Zellen binden können. Im Gegensatz zu den murinen Molekülen scheint eine Alexa488-Konjugation am  $\beta_2m$  im humanen System die Streptamer-Bindung an die TCR zu behindern.

Das war eine unerwartete Erkenntnis, da die Alexa488-Konjugation im humanen System zu Veränderungen führt, die im murinen System nicht auftreten. Es bestehen zwar Unterschiede in den Aminosäuresequenzen der murinen und humanen MHC I-Moleküle, allerdings handelt es sich bei der MHC-Tertiärstruktur, ähnlich wie beim  $\beta_2m$ , um eine konservierte Struktur [18, 112]. In beiden Fällen setzt sich das MHC I aus drei Domänen zusammen, deren Größe, räumliche Anordnung und Funktion sich gleichen. Auch die Tatsache, dass die Rückfaltung chimärer Moleküle gelang, spricht für große Ähnlichkeit und hochkonservierte Strukturen. Trotzdem scheint es kleine, aber signifikante Unterschiede zu geben. Genauere Analysen der Molekülstrukturen wiesen darauf hin, dass Unterschiede in der Lage des  $\beta_2m$  zur schweren Kette für die beobachteten Phänomene verantwortlich sein könnten [113]. Vergleiche der Tertiärstrukturen erbrachten Hinweise dafür, dass schwere und leichte Kette im humanen Molekül näher beieinander liegen als im murinen. Möglicherweise wirkt sich die zusätzliche Konjugation des Alexa488 auf die Tertiärstruktur des pMHC aus. Einerseits ist denkbar, dass es so zu Konformationsänderungen an  $\alpha_1$ - und  $\alpha_2$ -Domäne kommt und die Interaktionsfläche des pMHC mit dem TCR so verändert wird, dass der TCR nicht mehr an das pMHC binden kann. Eine zweite Möglichkeit wäre eine Veränderung an der  $\alpha_3$ -Domäne. Hier bindet der Korezeptor CD8, der, wie im Kapitel 1.1.2.4 erwähnt, die Bindung des TCR an das pMHC stabilisiert. Selbst wenn eine Interaktion zwischen TCR und pMHC noch ungestört möglich ist, würde eine fehlende CD8-Bindung ein instabileres Bindungsverhalten erklären. Eine instabile Streptamerbindung an T-Zellen würde erklären, warum PE-Fluoreszenzintensität auf den T-Zellen detektierbar ist, jedoch in abgeschwächter Intensität.

Mehrere interessante Ergebnisse fielen bei den Versuchen auf, die durchgeführt wurden, um die Ursache für die reduzierte PE-Fluoreszenzintensität im humanen System herauszufinden.

Wurden im Streptameransatz nicht fluoreszenzmarkierte pMHC-Moleküle mit der natürlich vorkommenden Aminosäure Tyrosin an Position 67 im  $\beta_2m$  verwendet, so war die an humanen T-Zellen gemessene PE-Fluoreszenzintensität gut und mit der Fluoreszenzintensität muriner T-Zellen vergleichbar. Wurden einfach fluoreszenzmarkierte Streptamere verwendet, die zwar nicht Alexa488-konjugiert waren, aber an Position 67 im  $\beta_2m$  ein Cystein besaßen, war die detektierbare PE-Fluoreszenzintensität noch schwächer als bei Verwendung zweifach fluoreszenzmarkierter Streptamere, wie in Abb. 3.3 gezeigt. Da die humane schwere Kette durch eine Alexa488-Konjugation an Position 67 des  $\beta_2m$  nicht mehr stabil an TCR binden kann, wäre denkbar, allerdings sehr unwahrscheinlich, dass alleine schon das Ersetzen der Aminosäure Tyrosin durch Cystein zu einer Konformationsänderung im pMHC führt. Wahrscheinlicher ist eine erhöhte Reaktivität der pMHC-Moleküle untereinander.



## 4.1 Besonderheiten bei der Übertragung des $k_{\text{off}}$ -rate-Assays auf das humane System

Wird die hoch reaktive SH-Gruppe des Cystein nicht mit einem Farbstoff konjugiert, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie anderweitig Bindungen eingeht, zum Beispiel indem sich zwei pMHC-Moleküle über die außen liegenden, gut zugänglichen neuen SH-Gruppen zu Dimeren verbinden. Möglicherweise können pMHC-Dimere nicht an das Streptactin-Rückgrat binden, sodass sich im Streptameransatz nur wenige funktionsfähige Streptamere befinden, oder eine Bindung an den TCR ist nicht mehr möglich, sodass sich in der Zellfärbung nur eine schwache PE-Intensität zeigt. Die Hypothese, dass die reaktiven Gruppen der Cysteine andere Bindungen eingehen, lässt sich dadurch stützen, dass auch bei Streptamerfärbungen muriner Zellen bei Verwendung dieser pMHC-Moleküle die PE-Fluoreszenzintensität deutlich schwächer ist.

Eine immer schwächere PE-Intensität trat auf, je größer die im Streptameransatz verwendeten Mengen Alexa488-konjugiertes pMHC waren, wie in Abb. 3.5 gezeigt. Die Titrationsversuche mit Erhöhung der pMHC-Menge im Streptameransatz beruhten auf der Hypothese, dass eine schwache PE-Fluoreszenzintensität im humanen System durch zu geringe Mengen pMHC im Streptameransatz und dadurch eine ungenügende pMHC-Beladung der Streptactin-Moleküle bedingt sein könnte. Interessanterweise fiel bei zunehmender pMHC-Menge im Streptameransatz eine Abnahme der PE-Intensität in den Zellfärbungen auf. Störungen der Interaktion von Streptamer und T-Zelle durch überschüssiges freies pMHC konnten durch Filtration der Streptamere ausgeschlossen werden. Eine mögliche Ursache für die abnehmende PE-Intensität bei zunehmender pMHC-Menge im Streptameransatz wäre, dass immer weniger Streptamere an die T-Zellen binden können, je gesättigter sie mit Alexa488-konjugierten pMHC-Molekülen sind, da die Interaktion dieser pMHC-Moleküle mit den TCR gestört ist.

Die Hypothese einer instabilen Streptamerbindung an die humanen T-Zellen durch eine erschwerte TCR-pMHC-Interaktion bot eine plausible Erklärung für die abgeschwächte PE-Fluoreszenzintensität.

### 4.1.2 Fluophorauswahl

Nachdem dieses erste Problem identifiziert worden war, konnte ein erfolgreicher Lösungsansatz entwickelt werden. Es wurde eine neue Konjugationsstelle für den Farbstoff Alexa488 am C-Terminus der schweren Kette eingeführt. Wurden humane T-Zellen mit diesen neuen Streptameren gefärbt, so wurde eine deutliche, nicht abgeschwächte PE-Fluoreszenzintensität detektiert, vergleichbar mit der muriner Zellfärbungen. Trotzdem war noch immer keine Alexa488-Fluoreszenz detektierbar.

Eine fehlgeschlagene Alexa488-Konjugation der humanen pMHC-Moleküle war durch FACS-Analyse von pMHC-gebundenen Streptactin-Beads ausgeschlossen worden. Da also nachweislich eine Alexa488-Konjugation vorhanden ist, muss es sich um ein Problem der (Detektion der) emittierten Strahlung handeln. Eine fehlende Anregung scheint unwahrscheinlich, da dieselben Laser wie im murinen System verwendet wurden, und die Ergebnisse auch an zwei verschiedenen Mikro-

skopen gleich ausfielen. Eine Möglichkeit wäre eine Absorption der Alexa488-Emission durch PE. Da das Anregungsspektrum von PE sich mit dem Emissionsspektrum von Alexa488 überschneidet, ist das Auftreten eines FRET-Effektes (Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer) denkbar. Dieser könnte durch die neue Position der Alexa488-Konjugationsstelle am Ende des C-Terminus der schweren Kette noch begünstigt werden, da die räumliche Nähe zum PE am Streptactin an dieser Stelle größer ist als am  $\beta_2m$ . Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte die neue Konjugationsstelle auch im murinen System eingeführt werden, um zu testen, ob auch dort die Alexa488-Strahlung nicht mehr oder nur noch abgeschwächt detektierbar ist.

Mittlerweile ist die Übertragung des  $k_{\text{off}}$ -rate Assays auf das humane System gelungen [113, 114]. Versuche von Magdalena Nauerth erbrachten Hinweise dafür, dass die fehlende Fluoreszenzdetektion des Alexa488 zum Teil tatsächlich durch einen FRET-Effekt zwischen den beiden Fluorophoren bedingt ist. Rückblickend lässt sich dieser auch im murinen System bei Verwendung von Alexa488-konjugiertem  $\beta_2m$  feststellen. Durch die Auswahl umgekehrter FRET-Partner an Streptactin und pMHC gelangen reproduzierbare  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays an humanen Zellen.

## 4.2 Messung der $k_{\text{off}}$ -rate

Kinetische Parameter spielen bei der näheren Charakterisierung der TCR-pMHC-Interaktion eine wichtige Rolle. Die Messung solcher Parameter gestaltet sich jedoch kompliziert, sodass verschiedene Methoden entwickelt wurden, die alle spezifische Vor- und Nachteile haben, auf die im Folgenden eingegangen werden soll.

Die im Kapitel 1.2.2 genannten Hypothesen der Affinität und kinetischen Diskriminierung wurden fast ausschließlich auf der Grundlage von Daten aufgestellt, die durch Versuche mit SPR und Tetramer-/Multimer-Techniken generiert wurden. Beide Methoden erlauben wichtige Untersuchungen, haben aber auch Einschränkungen.

Multimer-basierte Untersuchungen erlauben ausschließlich Messungen von Dissoziationskinetiken. Inwiefern die Ergebnisse Werte ermitteln, die Werten unter physiologischen Bedingungen entsprechen, ist schwer zu beurteilen. Durch ihre multimeren Natur zeigen pMHC-Multimere andere Dissoziationskinetiken als pMHC-Monomere. Um überhaupt Dissoziationskinetiken von Multimeren messen zu können, werden blockierende Reagenzien benötigt, deren Vorhandensein und Konzentration die Dissoziationskinetiken in unterschiedlichem Maße beeinflussen. Aufgrund der multimeren Natur der Reagenzien hängt die Dissoziation nicht nur von der Bindungsstärke von TCR und pMHC ab, sondern von zusätzlichen Faktoren, wie der Organisation der TCR auf der Zellmembran. Außerdem ist der Grad der Multimerisierung schwer kontrollierbar.

Im Gegensatz dazu lassen sich mit der Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie präzise Werte wie Affinität, Assoziations- und Dissoziationsraten von TCR-pMHC-Interaktionen messen. Verkompliziert wird das Verfahren, da beide

Moleküle rekombinant exprimiert werden müssen, was beispielsweise nicht für alle TCR standardmäßig möglich ist. Die Aussagekraft der durch SPR gemessenen Werte ist ebenfalls kritisch zu beurteilen, da es sich um Messungen zwischen isolierten Einzelmolekülen handelt, die zusätzliche beeinflussende Faktoren der physiologischen Umgebung, wie die Rolle des CD8-Korezeptors, unbeachtet lassen.

Ein weiterer Kritikpunkt an beiden Methoden ist, dass es sich um Modelle handelt, in denen Dissoziationskinetiken im dreidimensionalen Raum beobachtet werden, da sich einer der Bindungspartner in Lösung befindet. Dies spiegelt jedoch nicht physiologische Bedingungen wider, in denen beide Moleküle in Zellmembranen verankert sind.

Diesen möglichen Störfaktor versuchten mehrere Arbeitsgruppen zu adressieren, indem sie sogenannte zweidimensionale Modelle entwickelten [115, 116]. Für den Mikropipetten-Adhäsionsfrequenz-Assay werden auf der Zellmembran eines humanen Erythrozyten pMHC-Komplexe fixiert. Der Erythrozyt wird durch Aspiration an einer unbeweglichen Mikropipette gehalten und dient als Adhäsionssensor. Eine T-Zelle, die an einer beweglichen Mikropipette fixiert ist, wird für eine definierte Zeitspanne mit dem Erythrozyten in Kontakt gebracht. Wenn es zu einer Adhäsion kommt, wird die Zellmembran des fixierten Erythrozyten bei Entfernung der T-Zelle gedehnt. Anhand des Dehnungsausmaßes werden Parameter wie Assoziations- und Dissoziationsraten berechnet. Huang et al. gelangten mit ihrer Methode zu Ergebnissen, die sich deutlich von SPR-Messungen unterschieden. Sie beobachteten deutlich schnellere Assoziationsraten, die hauptsächlich für hohe Affinitäten verantwortlich waren und schnellere Dissoziationsraten. Außerdem beschrieben sie eine größere dynamische Bandbreite von Affinitäten und Assoziationsraten als dreidimensionale Methoden [115]. Dieser Versuchsaufbau kommt durch die Verankerung der an der Interaktion beteiligten Moleküle in einer Zellmembran den physiologischen kinetischen Eigenschaften sicher näher als dreidimensionale Modelle. Die Versuchsdurchführung mit künstlich induziertem Zellkontakt über eine definierte Zeitspanne orientiert sich jedoch nicht an physiologischen Gegebenheiten. Weiterhin ist es schwierig zu beurteilen, ob die den Ergebnissen zugrunde liegenden Berechnungen einer visuell beobachteten Zelldehnung Affinitäten und Assoziations- und Dissoziationsraten im mikromolaren Bereich ausreichend präzise wiedergeben können.

Huppa et al. entwickelten eine weitere Methode um TCR-pMHC-Interaktionen im zweidimensionalen Raum zu beobachten, den FRET (fluorescence resonance energy transfer)-basierten 2D Bindungsassay. T-Zellen, die mit einem anti-TCR-Antikörper fluoreszenzmarkiert wurden, gehen Interaktionen mit einer Membranfläche ein, in die neben fluoreszenzmarkierten pMHC-Molekülen auch ICAM1 und CD80 integriert sind. Kommt es zu einer TCR-pMHC-Bindung, so gelangen die Fluoreszenzmoleküle auf TCR und pMHC, die als FRET-Partner gewählt werden, nahe genug aneinander, sodass ein FRET-Signal abgegeben wird. Anhand des FRET-Signals werden Affinität, Assoziations- und Dissoziationsraten berechnet [116]. Huppa et al. gelangten zu ähnlichen Ergebnissen wie Huang et al. Sie beobachteten

deutlich höhere Affinitäten der TCR für ihre Liganden, bedingt durch etwa 100fach höhere Assoziationsraten, sowie höhere Dissoziationsraten. Diese elegante Methode erlaubt interessante Untersuchungen, allerdings sind einzelne Komponenten im Versuchsaufbau kritisch zu bewerten. Um ein FRET-Signal zu erzeugen, müssen die FRET-Partner nahe zueinander gebracht werden, weshalb sie nahe an der Interaktionsregion von TCR und pMHC angebracht werden müssen. Ob und inwiefern dies die Interaktion der Bindungspartner beeinflusst, ist unbekannt. Huppa et al. postulieren außerdem, dass sie synaptische Bindungskinetiken untersuchen, indem in die Membranfläche Moleküle der immunologischen Synapse wie ICAM1 und CD80 integriert sind. Inwieweit die gemessenen Parameter davon beeinflusst werden, ist unbekannt. Die Gruppe selbst beobachtete jedoch Veränderungen der Dissoziationsraten, die durch Vorgänge im Zytoskelettaufbau hervorgerufen wurden. Der Versuchsaufbau ist vielversprechend, implementiert in der vorliegenden Form allerdings zu viele zusätzliche Einflussfaktoren, sodass er präzise Aussagen über die Bindungskinetiken des TCR-pMHC-Komplexes nur bedingt ermöglicht.

Die Arbeiten von Huang und Huppa ergänzen die bisher gängigen Hypothesen des Affinitätsmodells und des kinetischen Modells um einen Faktor: ihre Ergebnisse sprechen für eine bedeutende Rolle der Assoziationsraten bei der T-Zell-Aktivierung.

Der im Labor von Professor Busch entwickelte  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay erlaubt ausschließlich die Messung von Dissoziationskinetiken an lebenden Zellen. Die physiologische T-Zell-Oberfläche mit TCR und Korezeptoren bleibt erhalten. Die pMHC-Moleküle liegen bei der Abdiffusion von den TCR in Form von Monomeren vor. Es werden keine zusätzlichen, blockierenden Reagenzien benötigt. Auch wenn keine Messungen von anderen Parametern wie Affinität oder Assoziationskinetiken möglich sind, so bietet der  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay bezüglich der Messung der Dissoziationskinetiken deutliche Verbesserungen und erlaubt validere Messungen als bisherige Methoden.

### 4.3 $k_{\text{off}}$ -rate und T-Zell-Avidität

Wie in der Einleitung beschrieben, können TCR-Ligand-Interaktionen unterschiedliche Auswirkungen haben. Beispielsweise entscheiden sie über Überleben oder Apoptose im Rahmen der Selektionsmechanismen im Thymus bei der T-Zell-Reifung, sie können T-Zell-Aktivierung und Proliferation oder eine Anergie induzieren. Je nach Ergebnis der Interaktion unterscheidet man die Liganden in mehr oder weniger potente Agonisten und Antagonisten. Es besteht ein Konsens darüber, dass die Bindungsstärke der pMHC-Komplexe an den TCR entscheidend für die Reaktivität ist. Die Stärke biochemischer Molekülinteraktionen wird normalerweise über die Affinität definiert, die in einem mathematischen Zusammenhang mit den kinetischen Parametern der Interaktion, nämlich Halbwertszeit bzw. Dissoziationskinetiken und Assoziationskinetiken, steht. Was sich hinter dem Begriff Bindungsstärke im Rahmen der TCR-pMHC-Interaktion verbirgt, ist nicht eindeutig geklärt aufgrund der Besonderheit der Interaktion. Bei anderen Molekülinteraktionen, wie zum

Beispiel Antigen-Antikörper-Interaktionen, wird eine hohe Spezifität durch eine hohe Affinität der Bindungspartner erreicht, weshalb die Messung der Affinität sinnvolle Rückschlüsse auf die Funktionalität erlaubt. Bei einer TCR-pMHC-Bindung tritt das Paradoxon von hoher Spezifität bei sehr niedriger Affinität im mikromolaren Bereich auf. Welche(r) Parameter bei der Definition der Bindungsstärke zwischen TCR und pMHC letztendlich ausschlaggebend ist/sind, wird kontrovers diskutiert [42]. Zwei theoretische Hauptmodelle stehen einander gegenüber.

Die Affinitätshypothese (occupational model) postuliert, dass die T-Zell-Reaktion mit der Affinität von TCR und pMHC korreliert und abhängig ist von der Zahl der TCR-pMHC-Komplexe [117, 118]. Je höher die Zahl der TCR ist, die in einer TCR-pMHC-Interaktion gebunden sind, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer T-Zell-Aktivierung. Die zweite, weiter verbreitete Hypothese sagt aus, dass eine T-Zell-Aktivierung vor allem von der Halbwertszeit der TCR-pMHC-Interaktion abhängt [119, 120]. Nach dem Modell der kinetischen Diskriminierung müssen Rezeptor und Ligand für eine ausreichend lange Zeitspanne gebunden vorliegen, damit eine T-Zell-Aktivierung initiiert werden kann. Eine T-Zell-Aktivierung ist nach dieser Hypothese also abhängig von der Halbwertszeit und damit von der Dissoziationsrate der TCR-pMHC-Interaktion. Für beide Hypothesen ließen sich Daten generieren, die die jeweilige Theorie stützen.

In verschiedenen Studien wurden jedoch auch Diskrepanzen beobachtet, die darauf hindeuten, dass ein Einzelparameter zur Beschreibung der Bindungsstärke nicht ausreichend ist. Zum Beispiel wurden TCR mit besonders geringer Affinität oder sehr kurzer Halbwertszeit beobachtet, die trotzdem eine gute funktionelle Avidität zeigten.

Al-Ramadi et al. untersuchten mit SPR die Interaktionen zwischen APL-H-2Ld-Liganden und 2C-TCR [68]. In den meisten Fällen korrelierten funktionelle Parameter wie spezifische Lyse mit der gemessenen Affinität der TCR-pMHC-Interaktion. Ein APL bildete eine Ausnahme: trotz nicht messbarer TCR-pMHC-Affinität zeigten die mit diesem pMHC stimulierten Zellen gute Lyseergebnisse. Weiterführende Untersuchungen wiesen darauf hin, dass eine Zellaktivierung nicht ausschließlich von der intrinsischen TCR-pMHC-Affinität abhängig ist, sondern dass weitere Einflussfaktoren, wie z.B. die CD8-Korezeptorfunktion, eine wichtige Rolle spielen.

Krogsgaard et al. identifizierten einen weiteren Parameter, der die Bindungsstärke beeinflusst [121]. Mittels SPR wurden Halbwertszeiten der TCR-pMHC-Interaktion bestimmt und mit funktionellen Parametern (IL-2-Produktion) korreliert. Außerdem wurden thermodynamische Parameter der Interaktionen bestimmt. Bei drei APL-Liganden fiel auf, dass die Funktionalität deutlich besser war, als die Halbwertszeit erwarten ließ. Die thermodynamischen Analysen zeigten große Veränderungen in der Wärmekapazität dieser pMHC-Moleküle, was für eine Konformationsänderung oder eine Flexibilität in der Bindungsregion spricht. Halbwertszeit und Veränderungen in der Wärmekapazität gemeinsam betrachtet korrelierten mit den funktionellen Parametern. Eine Flexibilität an der TCR-pMHC-Interaktionsfläche, die sowohl den

TCR (induced fit), als auch das pMHC-Molekül betrifft, scheint sich positiv auf die Bindungsstärke auszuwirken.

Zuletzt wurde die Stabilität des pMHC-Moleküls als wichtiger Einflussfaktor erkannt. Degano et al. hatten gezeigt, dass im 2C-TCR-System der SIYR-H-2Kb-Komplex ein deutlich potenterer Agonist am 2C-TCR ist als die dEV8- oder p2Ca-H-2Kb-Komplexe trotz ähnlicher Affinitäten und Dissoziationskinetiken [122]. Auch thermodynamische Analysen im 2C-System konnten bei fehlenden Hinweisen für Konformationsänderungen den Unterschied nicht erklären. Tallquist et al. erkannten, dass das SIYR-Peptid mit dem MHC-Molekül H-2Kb einen deutlich stabileren Komplex mit längerer Halbwertszeit eingeht als die anderen beiden Peptide [123].

Es gibt also vielfältige Hinweise dafür, dass die Bindungsstärke einer TCR-pMHC-Interaktion nicht ausreichend durch einen Parameter bestimmbar ist, sondern dass mehrere wie Affinität, Halbwertszeit der TCR-pMHC-Interaktion, Halbwertszeit des Peptid-MHC-Komplexes, Flexibilität der Moleküle an der Interaktionsregion und Einflüsse durch Korezeptoren eine Rolle spielen.

Tatsächlich publizierten Aleksic et al. und Govern et al. eine neue Hypothese, mit der sie die bisherigen, sich scheinbar gegenseitig ausschließenden Hypothesen in einem mathematischen Modell vereinen [124, 125].

Aleksic et al. führten die neue Größe der confinement time ein, einer Gesamtbindungszeit eines TCR mit einem pMHC-Molekül, die sich aus den einzelnen Bindungszeiten zwischen Dissoziation und mehrfacher schneller Wiederbindung summiert. Wurde die Dauer der confinement time bestimmter TCR-pMHC-Komplexe, die anhand von SPR-Daten berechnet wurde, mit den Ergebnissen der Tests zur funktionellen Avidität (INF $\gamma$ -Sekretion und Zytotoxizität) in Bezug gesetzt, so korrelierten sie statistisch signifikant häufiger als funktionelle Avidität und Affinität oder funktionelle Avidität und Dissoziationsrate [124].

Govern et al. entwickelten ein ähnliches mathematisches Modell und berechneten eine Gesamthalbwertszeit (aggregate  $t_{1/2}$ ), die die Dauer der Erst- und jeder Folgebindung summiert und ein Quasi-Gleichgewicht beschreibt. Die Dauer der Erstbindung wird durch die Dissoziationsrate beschrieben. Die Wahrscheinlichkeit einer Wiederbindung nach chemischer Diffusion ist abhängig von der Assoziationsrate. Es wird eine Schwellenassoziationsrate berechnet, über deren Wert mindestens eine Wiederbindung wahrscheinlich ist. Die Zahl der Wiederbindungen und damit die Gesamthalbwertszeit hängt somit von der Assoziationsrate ab [125].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sowohl die Assoziations- als auch die Dissoziationsraten der pMHC-Moleküle von ihrem TCR die Avidität beeinflussen und man nicht grundsätzlich von einem einzelnen ausschlaggebenden Bindungsparameter ausgehen kann. Aus dieser Erkenntnis ergibt sich die Frage, ob die Dissoziationsrate des TCR-pMHC-Komplexes geeignet ist, um von ihr Rückschlüsse auf die funktionelle Avidität von T-Zellen zu ziehen. Hierfür sprechen Daten, die Robert Knall und Magdalena Nauwerth in ihren Doktorarbeiten generierten. Sie analysierten die  $k_{\text{off}}$ -rate und die funktionelle Avidität von zwei murinen T-Zell-Linien, die spezifisch für das *Listeria monocytogenes* Epitop LLO<sub>91-99</sub> sind,

und konnten eine Korrelation nachweisen. Die T-Zell-Linie mit niedriger  $k_{\text{off}}$ -rate zeigte die höhere funktionelle Avidität [71, 113, 114]. Diese Daten sprechen dafür, dass der  $k_{\text{off}}$ -rate Assay eine wertvolle Methode ist, um funktionell hoch-avide T-Zellen zu identifizieren. Er wird aus einem Zellpool allerdings nur einen Teil hoch-avider Zellen selektieren, nämlich die, deren Gesamtavidität hauptsächlich auf einer langsamen Dissoziationsrate beruht. Die T-Zellen mit hoher Avidität durch hohe Assoziationsraten werden nicht identifiziert.

## 4.4 $k_{\text{off}}$ -rate und T-Zell-Therapie

Der neue  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay ermöglicht die Untersuchung von pMHC-Dissoziationskinetiken von TCR an lebenden Zellen im murinen System. Dies war bisher nicht möglich. Eine Übertragung auf das humane System bietet die Möglichkeit, vielfältige interessante Fragestellungen zu adressieren. Von besonderer Bedeutung wäre eine konkrete klinische Anwendbarkeit. In der Einleitung wurde ein kurzer Überblick über die bisher angewandten Formen von T-Zell-Therapien gegeben. Es stellt sich die Frage, ob die durch den Assay bestimmbare  $k_{\text{off}}$ -rate ein geeigneter Parameter ist, anhand dessen T-Zellen zum therapeutischen Transfer ausgewählt werden können. Lassen sich Zellen mit den für einen Therapieerfolg notwendigen Eigenschaften anhand der  $k_{\text{off}}$ -rate identifizieren?

Einige Eigenschaften, die für die protektive Kapazität einer T-Zelle eine Rolle spielen, wurden in den letzten Jahren und Jahrzehnten definiert. Für einen Therapieerfolg mit möglichst geringem Risiko toxischer Nebenwirkungen werden Pathogenspezifische T-Zellen transferiert. Der  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay ermöglicht die Identifikation Epitop-spezifischer T-Zell-Populationen. Zu therapeutischen Zwecken verwendete Zellen müssen in der Lage sein, nach Antigenkontakt ihre spezifischen Effektorfunktionen auszuüben, also die Zielzellen zu eliminieren. Verschiedene Arbeitsgruppen hatten in ihren Arbeiten gezeigt, dass funktional hoch-avide T-Zellen diesbezüglich qualitativ bessere Ergebnisse erzielen als niedrig-avide [36, 52, 58]. Im Mausmodell konnte Robert Knall in seiner Doktorarbeit nicht nur eine Korrelation zwischen  $k_{\text{off}}$ -rate und funktioneller Avidität, sondern zusätzlich zur Protektivität herstellen [71]. Er verglich zwei *Listeria monocytogenes* spezifische T-Zell-Populationen. Die Population, die in Tests der Zytokinsekretion und der spezifischen Lyse als funktional hoch-avide identifiziert wurde, zeigte im  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay längere Halbwertszeiten. Außerdem waren nur Zellen dieser strukturell und funktionell hoch aviden Population in der Lage, Mäuse vor einer Infektion zu schützen, wenn die T-Zellen vor der Injektion von *Listerien* transferiert wurden. Der  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay ermöglicht somit die Identifikation von T-Zellen mit protektivem Potenzial.

Weiterhin müssen T-Zellen zum Transfer innerhalb kurzer Zeit in ausreichender Menge verfügbar sein. Je nach zugrundeliegender Erkrankung und Größe der vorliegenden Population ist mit dem  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay die Gewinnung einer Population zur direkten Übertragung oder Aufbewahrung in einer Zellbank möglich, zum

Beispiel bei CMV-Infektionen. Im Vergleich zur Zellgewinnung durch wochenlange Kulturmethode bietet der  $k_{\text{off-rate}}$ -Assay zwei Vorteile: die Zellen stehen sehr schnell zur Verfügung und haben keine Veränderungen ihrer Eigenschaften durch Langzeitkultur erfahren. Im Falle von Tumorerkrankungen oder anderen Erkrankungen, bei denen nur wenige Pathogen-spezifische hoch-avide Zellen vorliegen, kann der  $k_{\text{off-rate}}$  Assay um weitere Methoden ergänzt werden. Nach der Identifikation von strukturell hoch-aviden TCR ist beispielsweise eine TCR-Sequenzanalyse mit T-Zell-Rezeptor-Transfer möglich. Der  $k_{\text{off-rate}}$ -Assay ermöglicht so die Verfügbarkeit einer ausreichenden Zellzahl innerhalb relativ kurzer Zeit.

Ein wichtiges Kriterium, das die Fähigkeit der T-Zellen zur Persistenz in vivo mit Ausbildung von Gedächtniszellen bestimmt, ist der Differenzierungsgrad. Der  $k_{\text{off-rate}}$ -Assay ermöglicht hierzu keine Aussagen. Um die Plastizität der T-Zellen und damit ihre Fähigkeit zur Persistenz zu bestimmen, müsste er mit anderen Methoden zur Analyse der entsprechenden Oberflächenmarker kombiniert werden. Allerdings eignet er sich zur Durchführung von Verlaufsuntersuchungen bezüglich der Persistenz transferierter Zellpopulationen.

Idealerweise sollen zu therapeutischen Zwecken verwendete T-Zellen zusätzlich resistent sein gegen immunsupprimierende Einflüsse wie sie z.B. im Tumor-Mikromilieu vorkommen ( $\text{TGF-}\beta$ ,  $\text{CD4}^+$   $\text{T}_{\text{reg}}$ ) und nicht in ihrer Funktion eingeschränkt durch Kotherapie wie Kortison. Außerdem sollte ihre Wirksamkeit nicht beeinträchtigt werden durch Escape-Mechanismen der Pathogene oder Toleranzentwicklung. Dies sind Themen umfassender aktueller Forschung, für die noch keine Standardlösungen entwickelt wurden. Man weiß jedoch beispielsweise, dass hoch-avide T-Zellen durch das Tumor-Mikromilieu stärker gehemmt werden als niedriger avide [126]. Dies wirft die Frage auf, ob es bezüglich der protektiven Eigenschaften eine optimale Avidität der T-Zellen gibt. Möglicherweise ist die optimale Avidität unterschiedlich, je nach Pathomechanismus der jeweiligen Erkrankung. Denkbar wäre ebenfalls, dass eine Kombination von T-Zellpopulationen mit unterschiedlichen Aviditäten für einen bestmöglichen Therapieerfolg notwendig ist.

Der  $k_{\text{off-rate}}$ -Assay eröffnet neue Möglichkeiten, einige wichtige der oben genannten Punkte weiter zu erforschen. In Kombination mit weiteren Verfahren ist er eine wertvolle und geeignete Methode, um T-Zell-Therapien durchzuführen und deren Wirksamkeit weiter zu entwickeln und zu verbessern.

## 4.5 Ausblick

Mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen gelang ein wichtiger Schritt in der Übertragung des  $k_{\text{off-rate}}$ -Assays vom murinen auf das humane System. Durch die neue Farbstoff-Konjugationsstelle gelingt eine stabile Streptamerbindung an humane T-Zellen. Trotz nachgewiesener Farbstoff-Konjugation ist jedoch noch immer keine Alexa488-Fluoreszenz detektierbar, sodass Weiterentwicklungen notwendig sind, um funktionale Reagenzien für zukünftige  $k_{\text{off-rate}}$ -Assays herzustellen. Als Ursache für



die fehlende Detektion wäre denkbar, dass die Fluoreszenzintensität von Alexa488 zu schwach ist. Eine Möglichkeit die Fluoreszenzintensität zu verstärken, wäre, ein neues pMHC-Molekül zu generieren, das am C-Terminus beide neuen Mutationen zur Farbstoffkonjugation gleichzeitig enthält, sodass jedes pMHC-Molekül doppelt fluoreszenzmarkiert werden könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre die Verwendung anderer Fluoreszenzfarbstoffe mit höherer Fluoreszenzintensität. Im Kapitel 4.1.2 diskutierten wir den FRET-Effekt als Ursache für die fehlende Alexa488-Detektion. Wenn die Alexa488-Emission von PE absorbiert wird, wäre zu überlegen, Alexa488 durch einen Farbstoff mit anderem Absorptions- und Emissionsspektrum zu ersetzen, oder sogar ein gänzlich neues Fluoreszenzfarbstoffpaar für die Streptamerherstellung auszuwählen, die in ihren Anregungs- und Emissionsspektren keine störenden Überschneidungen zeigen. Ein weiterer Schritt wäre, die neuen Konjugationsstellen in murine pMHC-Moleküle einzubringen und die Fluoreszenzfärbung zu testen und mit den humanen Molekülen zu vergleichen. Interessant wäre herauszufinden, ob auch im murinen System bei Verwendung der neuen Konjugationsstellen keine Alexa488-Fluoreszenz detektierbar ist. Dies würde die Hypothese des FRET-Effektes untermauern und darauf hinweisen, dass es notwendig ist, die innerhalb eines Streptamers verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe anders auszuwählen. Schlussendlich ist es notwendig, die Ergebnisse, die bisher ausschließlich für HLA B8 gewonnen wurden, auf vielfältige HLA-Molekül-Peptid-Komplexe zu übertragen, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu verifizieren und die Methode breit anwendbar zu machen, zum Beispiel zur Identifikation von geeigneten Zellen für T-Zell-Therapien. Die Übertragung des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays auf das humane System eröffnet einen Weg zu vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten. Der Assay ermöglicht die Identifikation und Gewinnung von Epitop-spezifischen T-Zell-Populationen mit definierter Avidität, die zu Therapie Zwecken im Rahmen eines T-Zell-Transfers weiterverwendet werden können, ohne dass die Patienten zusätzlichen, potenziell allergenen Reagenzien ausgesetzt werden, da die Streptamere nach Zellgewinnung durch d-Biotin monomerisiert und abgewaschen werden können. Die Methode erlaubt neben einer Zellgewinnung zusätzlich eine Therapieüberwachung. Durch T-Zell-Gewinnung aus dem peripheren Blut, Lymphknoten oder Tumorgewebe könnte beobachtet werden, ob die transferierten Zellen persistieren, proliferieren und ob sie in die Zielkompartimente (z.B. Lymphknoten, Tumor) wandern oder sich in ihrer Avidität verändern. Auch andere Einflüsse auf die Immunitätslage ließen sich untersuchen, wie zum Beispiel die Entwicklung des T-Zell-Repertoires nach Impfungen und die Qualität des Impfergebnisses. Außerdem ist das Prinzip des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays nicht auf die Untersuchung von  $\text{CD8}^+$  T-Zellen und deren TCR-pMHC-Interaktionen beschränkt. Eine Ausweitung auf die Untersuchung von  $\text{CD4}^+$  T-Zellen und ihrer Interaktion mit pMHC II-Molekülen ist eine Möglichkeit. Grundsätzlich wäre vorstellbar, die Methode auf jegliche Rezeptor-Ligand-Interaktion zu übertragen. Notwendig hierfür wäre, dass ein Bindungspartner rekombinant hergestellt werden und mit einer StreptagIII-Sequenz versehen werden kann, um ihn am Streptactin-Rückgrat zu multimerisieren. Zusammenfassend eröffnet eine Übertragung des

## 4 Diskussion

---

$k_{\text{off}}$ -rate-Assays vielfältige Anwendungsfelder.

---

## Literatur

- [1] C. A. Janeway, P. Travers, M. Walport, and M. J. Shlomchik, *Immunobiology*, Garland Science Publishing, 6th edition, 2005.
- [2] A. K. Abbas, A. H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and Molecular Immunology*, Elsevier Saunders, 7th edition, 2012.
- [3] R. M. Zinkernagel and P. C. Doherty, *Restriction of in vitro t cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.*, *Nature* **248**, 701 (1974).
- [4] O. Bannard, M. Kraman, and D. Fearon, *Pathways of memory cd8+ t-cell development*, *European Journal of Immunology* **39**, 2083 (2009).
- [5] F. Sallusto, D. Lenig, R. Forster, M. Lipp, and A. Lanzavecchia, *Two subsets of memory t lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions*, *Nature* **401**, 708 (1999).
- [6] K. Huster, M. Koffler, C. Stemmerger, M. Schiemann, H. Wagner, and D. Busch, *Unidirectional development of cd8+ central memory tcells into protective listeria-specific effector memory tcells*, *European Journal of Immunology* **36**, 1453 (2006).
- [7] C. Stemmerger, K. M. Huster, M. Koffler, F. Anderl, M. Schiemann, H. Wagner, and D. H. Busch, *A single naive cd8+ t cell precursor can develop into diverse effector and memory subsets*, *Immunity* **27**, 985 (2007).
- [8] G. Griffiths, A. Tsun, and J. Stinchcombe, *The immunological synapse: a focal point for endocytosis and exocytosis*, *J Cell Biol* **189**, 399 (2010).
- [9] J. C. Stinchcombe, E. Majorovits, G. Bossi, S. Fuller, and G. Griffiths, *Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse*, *Nature* **443**, 462 (2006).
- [10] M. R. Jenkins and G. M. Griffiths, *The synapse and cytolytic machinery of cytotoxic t cells*, *Current Opinion in Immunology* **22**, 308 (2010).
- [11] P. A. Henkart, *Lymphocyte-mediated cytotoxicity: Two pathways and multiple effector molecules*, *Immunity* **1**, 343 (1994).
- [12] G. Berke, *The ctl's kiss of death*, *Cell* **81**, 9 (1995).
- [13] M. M. Davis and P. J. Bjorkman, *T-cell antigen receptor genes and t-cell recognition*, *Nature* **334**, 395 (1988).
- [14] K. C. Garcia, M. Degano, R. Stanfield, A. Brunmark, M. Jackson, P. A. Peterson, L. Teyton, and I. A. Wilson, *An alphabeta t cell receptor structure at 2.5 and its orientation in the tcr-mhc complex*, *Science* **274**, 209 (1996).

- [15] J. L. Jorgensen, U. Esser, B. F. de St. Groth, P. Reay, and M. M. Davis, *Mapping t-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics*, Nature **355**, 224 (1992).
- [16] P. J. Bjorkman, *Mhc restriction in three dimensions: A view of t cell receptor/ligand interactions*, Cell **89**, 167 (1997).
- [17] K. Kärre, H. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling, *Selective rejection of H-2-deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy*, Nature **319**, 675 (1986).
- [18] P. J. Bjorkman, M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley, *Structure of the human class i histocompatibility antigen, hla-a2*, Nature **329**, 506 (1987).
- [19] M. Bouvier and D. Wiley, *Importance of peptide amino and carboxyl termini to the stability of mhc class i molecules*, Science **265**, 398 (1994).
- [20] M. G. Rudolph, R. L. Stanfield, and I. A. Wilson, *How tcrs bind mhcs, peptides, and coreceptors*, Annual Review of Immunology **24**, 419 (2006).
- [21] D. Garboczi, P. Ghosh, U. Utz, Q. R. Fan, W. E. Biddison, and D. C. Wiley, *Structure of the complex between human t-cell receptor, viral peptide and hla-a2*, Nature **384**, 134 (1996).
- [22] M.-K. Teng, A. Smolyar, A. Tse, J.-H. Liu, R. Hussey, S. Nathenson, H.-C. Chang, E. Reinherz, and J.-H. Wang, *Identification of a common docking topology with substantial variation among different tcrpeptidemhc complexes*, Current Biology **8**, 409 (1998).
- [23] K. C. Garcia, L. Teyton, and I. Wilson, *Structural basis of t cell recognition*, Annual Review of Immunology **17**, 369 (1999).
- [24] Y.-H. Ding, K. J. Smith, D. Garboczi, U. Utz, W. Biddison, and D. Wiley, *Two human t cell receptors bind in a similar diagonal mode to the hla-a2/tax peptide complex using different tcr amino acids*, Immunity **8**, 403 (1998).
- [25] J. Sloan-Lancaster and P. M. Allen, *Altered peptide ligand induced partial t cell activation: Molecular mechanisms and role in t cell biology*, Annual Review of Immunology **14**, 1 (1996).
- [26] Y.-H. Ding, B. M. Baker, D. N. Garboczi, W. E. Biddison, and D. C. Wiley, *Four a6-tcr/peptide/hla-a2 structures that generate very different t cell signals are nearly identical*, Immunity **11**, 45 (1999).
- [27] F. Koning, W. L. Maloy, and J. E. Coligan, *The implications of subunit interactions for the structure of the t cell receptor-cd3 complex*, European Journal of Immunology **20**, 299 (1990).
- [28] D. Gil, W. W. Schamel, M. Montoya, F. Sanchez-Madrid, and B. Alarcn, *Recruitment of nck by cd3 reveals a ligand-induced conformational change essential for t cell receptor signaling and synapse formation*, Cell **109**, 901 (2002).
- [29] D. J. Kappes, B. Alarcn, and J. Regueiro, *T lymphocyte receptor deficiencies*, Current Opinion in Immunology **7**, 441 (1995).
- [30] K. C. Garcia, C. A. Scott, A. Brunmark, F. R. Carbone, P. A. Peterson, I. A. Wilson, and L. Teyton, *Cd8 enhances formation of stable t-cell receptor/mhc class i molecule complexes*, Nature **384**, 577 (1996).
- [31] U. Moebius, G. Kober, A. L. Griscelli, T. Hercend, and S. C. Meuer, *Expression of different cd8 isoforms on distinct human lymphocyte subpopulations*, European

- Journal of Immunology **21**, 1793 (1991).
- [32] G. F. Gao, J. Tormo, U. C. Gerth, J. R. Wyer, A. J. McMichael, D. I. Stuart, J. I. Bell, E. Y. Jones, and B. K. Jakobsen, *Crystal structure of the complex between human cd8[alpha][alpha] and the hla-a2*, Nature **387**, 630 (1997).
- [33] H.-C. Chang, K. Tan, J. Ouyang, E. Parisini, J. huan Liu, Y. Le, X. Wang, E. L. Reinherz, and J. huai Wang, *Structural and mutational analysis of a cd8 heterodimer and comparison with the cd8 homodimer*, Immunity **23**, 661 (2005).
- [34] V. Renard, P. Romero, E. Vivier, B. Malissen, and I. F. Luescher, *Cd8beta increases cd8 coreceptor function and participation in tcr/ligand binding*, The Journal of Experimental Medicine **184**, 2439 (1996).
- [35] A. Arcaro, C. Grgoire, T. R. Bakker, L. Baldi, M. Jordan, L. Goffin, N. Boucheron, F. Wurm, P. A. van der Merwe, B. Malissen, and I. F. Luescher, *Cd8 endows cd8 with efficient coreceptor function by coupling t cell receptor/cd3 to raft-associated cd8/p56lck complexes*, The Journal of Experimental Medicine **194**, 1485 (2001).
- [36] M. A. Alexander-Miller, G. R. Leggatt, and J. A. Berzofsky, *Selective expansion of high- or low-avidity cytotoxic t lymphocytes and efficacy for adoptive immunotherapy*, Proceedings of the National Academy of Sciences **93**, 4102 (1996).
- [37] M. Alexander-Miller, *High-avidity cd8+ t cells*, Immunologic Research **13**, 13 (2005).
- [38] A. G. Cawthon, H. Lu, and M. A. Alexander-Miller, *Peptide requirement for ctl activation reflects the sensitivity to cd3 engagement: correlation with cd8alphabeta versus cd8alphaalpha expression*, J Immunol **167**, 2577 (2001).
- [39] A. G. Cawthon and M. A. Alexander-Miller, *Optimal colocalization of tcr and cd8 as a novel mechanism for the control of functional avidity*, J Immunol **169**, 3492 (2002).
- [40] M. M. Davis, J. J. Boniface, Z. Reich, D. Lyons, J. Hampl, B. Arden, and Y.-H. Chien, *Ligand recognition by alpha beta t cell receptors*, Annual Review of Immunology **16**, 523 (1998).
- [41] K. Matsui, J. J. Boniface, P. A. Reay, H. Schild, B. F. de St. Groth, and M. M. Davis, *Low affinity interaction of peptide-mhc complexes with t cell receptors*, Science **254**, 1788 (1991).
- [42] J. D. Stone, A. S. Chervin, and D. M. Kranz, *T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on t-cell activity and specificity*, Immunology **126**, 165 (2009).
- [43] G. J. Kersh and P. M. Allen, *Essential flexibility in the t-cell recognition of antigen*, Nature **380**, 495 (1996).
- [44] P. G. Ashton-Rickardt, A. Bandeira, J. R. Delaney, L. V. Kaer, H.-P. Pircher, R. M. Zinkernagel, and S. Tonegawa, *Evidence for a differential avidity model of t cell selection in the thymus*, Cell **76**, 651 (1994).
- [45] S. Valitutti, S. Muller, M. Cella, E. Padovan, and A. Lanzavecchia, *Serial triggering of many t-cell receptors by a few peptide-mhc complexes*, Nature **375**, 148 (1995).
- [46] T. W. McKeithan, *Kinetic proofreading in t-cell receptor signal transduction*, Proc Natl Acad Sci USA **92**, 5042 (1995).
- [47] J. D. Rabinowitz, C. Beeson, D. S. Lyons, M. M. Davis, and H. M. McConnell, *Kinetic discrimination in t-cell activation*, Proceedings of the National Academy of Sciences **93**, 1401 (1996).
- [48] G. J. Kersh, E. N. Kersh, D. H. Fremont, and P. M. Allen, *High- and low-potency ligands with similar affinities for the tcr: The importance of kinetics in tcr signaling*, Immunity **9**, 817 (1998).

- [49] D. S. Lyons, S. A. Lieberman, J. Hampl, J. J. Boniface, Y. Chien, L. J. Berg, and M. M. Davis, *A tcr binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists*, *Immunity* **5**, 53 (1996).
- [50] Y. Sykulev, A. Brunmark, M. Jackson, R. J. Cohen, P. A. Peterson, and N. H. Eisen, *Kinetics and affinity of reactions between an antigen-specific t cell receptor and peptide-mhc complexes*, *Immunity* **1**, 15 (1994).
- [51] K. Matsui, J. J. Boniface, P. Steffner, P. A. Reay, and M. M. Davis, *Kinetics of t-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with t-cell responsiveness*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 12862 (1994).
- [52] H. J. Zeh, D. Perry-Lalley, M. E. Dudley, S. A. Rosenberg, and J. C. Yang, *High avidity ctls for two self-antigens demonstrate superior in vitro and in vivo antitumor efficacy*, *The Journal of Immunology* **162**, 989 (1999).
- [53] M. A. Derby, M. A. Alexander-Miller, R. Tse, and J. A. Berzofsky, *High-avidity ctl exploit two complementary mechanisms to provide better protection against viral infection than low-avidity ctl*, *The Journal of Immunology* **166**, 1690 (2001).
- [54] R. M. Zinkernagel and A. Althage, *Antiviral protection by virus-immune cytotoxic t cells: infected target cells are lysed before infectious virus progeny is assembled*, *J Exp Med* **145**, 644 (1977).
- [55] C. Rosette, G. Werlen, M. A. Daniels, P. O. Holman, S. M. Alam, P. J. Travers, N. R. Gascoigne, E. Palmer, and S. C. Jameson, *The impact of duration versus extent of tcr occupancy on t cell activation: a revision of the kinetic proofreading model*, *Immunity* **15**, 59 (2001).
- [56] D. Zehn, S. Y. Lee, and M. J. Bevan, *Complete but curtailed t-cell response to very low-affinity antigen*, *Nature* **458**, 211 (2009).
- [57] D. H. Busch and E. G. Pamer, *T cell affinity maturation by selective expansion during infection*, *J Exp Med* **189**, 701 (1999).
- [58] L. A. Johnson, B. Heemskerk, D. J. Powell, C. J. Cohen, R. A. Morgan, M. E. Dudley, P. F. Robbins, and S. A. Rosenberg, *Gene transfer of tumor-reactive tcr confers both high avidity and tumor reactivity to nonreactive peripheral blood mononuclear cells and tumor-infiltrating lymphocytes*, *The Journal of Immunology* **117**, 6548 (2006).
- [59] C. Prussin and D. D. Metcalfe, *Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies*, *J Immunol Methods* **188**, 117 (1995).
- [60] K. T. Brunner, J. Mauel, J. C. Cerottini, and B. Chapuis, *Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs*, *Immunology* **14**, 181 (1968).
- [61] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lunström, *Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing*, *Sensors and Actuators* **4**, 299 (1983).
- [62] L. G. Fgerstam, A. Frostell-Karlsson, R. Karlsson, B. Persson, and I. Rnnberg, *Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis*, *J Chromatogr* **597**, 397 (1992).
- [63] M. Corr, A. E. Slanetz, L. F. Boyd, M. T. Jelonek, S. Khilko, B. K. al Ramadi, Y. S. Kim, S. E. Maher, A. L. Bothwell, and D. H. Margulies, *T cell receptor-mhc class i peptide interactions: affinity, kinetics, and specificity*, *Science* **265**, 946 (1994).
- [64] J. D. Altman, P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis, *Phenotypic analysis of antigen-specific*

- t lymphocytes*, *Science* **274**, 94 (1996).
- [65] X. L. Wang and J. D. Altman, *Caveats in the design of mhc class i tetramer/antigen-specific t lymphocytes dissociation assays*, *Journal of Immunological Methods* **280**, 25 (2003).
- [66] C. Yee, P. A. Savage, P. P. Lee, M. M. Davis, and P. D. Greenberg, *Isolation of high avidity melanoma-reactive ctl from heterogeneous populations using peptide-mhc tetramers*, *The Journal of Immunology* **162**, 2227 (1999).
- [67] V. Dutoit, V. Rubio-Godoy, M.-A. Doucey, P. Batard, D. Linard, D. Rimoldi, D. Speiser, P. Guillaume, J.-C. Cerottini, P. Romero, and D. Valmori, *Functional avidity of tumor antigen-specific ctl recognition directly correlates with the stability of mhc/peptide multimer binding to tcr*, *J Immunol* **168**, 1167 (2002).
- [68] B. K. Al-Ramadi, M. T. Jelonek, L. F. Boyd, D. H. Margulies, and A. L. Bothwell, *Lack of strict correlation of functional sensitization with the apparent affinity of mhc/peptide complexes for the tcr*, *J Immunol* **155**, 662 (1995).
- [69] H. Echchakir, G. Dorothe, I. Vergnon, J. Menez, S. Chouaib, and F. Mami-Chouaib, *Cytotoxic t lymphocytes directed against a tumor-specific mutated antigen display similar hla tetramer binding but distinct functional avidity and tissue distribution*, *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 9358 (2002).
- [70] D. 3rd Drake and T. J. Braciale, *Cutting edge: lipid raft integrity affects the efficiency of mhc class i tetramer binding and cell surface tcr arrangement on cd8+ t cells*, *J Immunol* **166**, 7009 (2001).
- [71] R. Knall, *Direct ex vivo identification of individual antigen-specific T cells with optimal avidity for protection*, PhD thesis, TU Muenchen, 2007.
- [72] E. Lorenz, D. Uphoff, T. R. Reid, and E. Shelton, *Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections*, *J Natl Cancer Inst* **12**, 197 (1951).
- [73] G. Mathé, J. Bernard, M. de Vries, L. Schwarzenberg, M. J. Larrieu, C. M. Lalanne, A. Dutreix, J. L. Amiel, and J. Surmont, *New trials with homologous bone marrow grafts after total irradiation in children with acute leukemia in remission. The problem of the secondary syndrome in man*, *Rev Hematol* **15**, 115 (1960).
- [74] G. Mathé, J. L. Amiel, and J. Niemetz, *Bone marrow grafts after total irradiation of leukemic mice followed by administration of an antimetabolic agent to reduce the incidence of a secondary syndrome and to enhance the antileukemic effect*, *C R Hebd Seances Acad Sci* **154**, 3603 (1962).
- [75] G. Mathé and J. L. Amiel, *Immunotherapy, new method of treatment of leukemias*, *Nouv Rev Fr Hematol* **4**, 211 (1964).
- [76] S. R. Riddell and P. D. Greenberg, *Principles for adoptive t cell therapy of human viral diseases*, *Annu Rev Immunol* **13**, 545 (1995).
- [77] S. R. Riddell, K. S. Watanabe, J. M. Goodrich, C. R. Li, M. E. Agha, and P. D. Greenberg, *Restoration of viral immunity in immunodeficient humans by the adoptive transfer of t cell clones*, *Science* **257**, 238 (1992).
- [78] K. S. Peggs, *Adoptive t cell immunotherapy for cytomegalovirus*, *Expert Opin Biol Ther* **9**, 725 (2009).
- [79] C. M. Rooney, C. A. Smith, C. Y. Ng, S. Loftin, C. Li, R. A. Crance, M. K. Brenner, and H. E. Heslop, *Use of gene-modified virus-specific t lymphocytes to control Epstein-Barr-virus-related lymphoproliferation*, *Lancet* **345**, 9 (1995).
- [80] A. Moosmann, I. Bigalke, J. Tischler, L. Schirmann, J. Kasten, S. Tippmer,

- M. Leeping, D. Prevasek, G. Jaeger, G. Ledderose, J. Mautner, W. Hammerschmidt, D. J. Schendel, and H.-J. Kolb, *Effective and long-term control of ebv-ptld after transfer of peptide-selected t cells*, *Blood* **115**, 2960 (2010).
- [81] T. Feuchtinger, S. Matthes-Martin, C. Richard, T. Lion, M. Fuhrer, K. Hamprecht, R. Handgretinger, C. Peters, F. R. Schuster, R. Beck, M. Schumm, R. Lotfi, G. Jahn, and P. Lang, *Safe adoptive transfer of virus-specific t-cell immunity for the treatment of systemic adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation*, *Br J Haematol* **134**, 64 (2006).
- [82] S. J. Brodie, D. A. Lewinsohn, B. K. Patterson, D. Jiyamapa, J. Krieger, L. Corey, P. D. Greenberg, and S. R. Riddell, *In vivo migration and function of transferred HIV-1-specific cytotoxic t cells*, *Nat Med* **5**, 34 (1999).
- [83] S. A. Rosenberg, P. Spiess, and R. Lafreniere, *A new approach to the adoptive immunotherapy of cancer with tumor-infiltrating lymphocytes*, *Science* **233**, 1318 (1986).
- [84] S. A. Rosenberg, B. S. Packard, P. M. Aebersold, D. Solomon, S. L. Topalian, S. T. Toy, P. Simon, M. T. Lotze, J. C. Yang, and C. A. S. et al, *Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report*, *N. Engl J Med* **319**, 1676 (1988).
- [85] C. Becker, H. Pohla, B. Frankenberger, T. Schüler, M. Assenmacher, D. J. Schendel, and T. Blankenstein, *Adoptive tumor therapy with t lymphocytes enriched through an ifn-gamma capture assay*, *Nat Med* **7**, 1159 (2001).
- [86] M. Knabel, T. J. Franz, M. Schiemann, A. Wulf, B. Villmow, B. Schmidt, H. Bernhard, H. Wagner, and D. H. Busch, *Reversible mhc multimer staining for functional isolation of t-cell populations and effective adoptive transfer*, *Nat Med* **8**, 631 (2002).
- [87] C. Berger, C. J. Turtle, M. C. Jensen, and S. R. Riddell, *Adoptive transfer of virus-specific and tumor-specific t cell immunity*, *Curr Opin Immunol* **21**, 224 (2009).
- [88] D. Choi, T.-G. Kim, and Y. C. Sung, *The past, present and future of adoptive t cell therapy*, *Immune Netw* **12**, 139 (2012).
- [89] C. A. Klebanoff, L. Gattinoni, P. Torabi-Parizi, K. Kerstann, A. R. Cardones, S. E. Finkelstein, D. C. Palmer, P. A. Antony, S. T. Hwang, S. A. Rosenberg, T. A. Waldmann, and N. P. Restifo, *Central memory self/tumor-reactive CD8+ t cells confer superior antitumor immunity compared with effector memory t cells*, *Proc Natl Acad Sci USA* **102**, 9571 (2005).
- [90] C. Berger, M. C. Jensen, P. M. Lansdorp, M. Gough, C. Elliott, and S. R. Riddell, *Adoptive transfer of effector cd8+ t cells derived from central memory cells establishes persistent T cell memory in primates*, *J Clin Invest* **118**, 294 (2008).
- [91] P. Graef, V. R. Buchholz, C. Stemberger, M. Flossdorf, L. Henkel, M. Schiemann, I. Drexler, T. Höfer, S. R. Riddell, and D. H. Busch, *Serial transfer of single-cell-derived immunocompetence reveals stemness of CD8+ central memory t cells*, *Immunity* **41**, 116 (2014).
- [92] L. Gattinoni, E. Lugli, Y. Ji, Z. Pos, C. M. Paulos, M. F. Quigley, J. R. Almeida, E. Gostick, Z. Yu, C. Carpenito, E. Wang, D. C. Douek, D. A. Price, C. H. June, F. M. Marincola, M. Roederer, and N. P. Restifo, *A human memory t cell subset with stem cell-like properties*, *Nat Med* **17**, 1290 (2011).
- [93] T. M. Clay, M. C. Custer, J. Sachs, P. Hwu, S. A. Rosenberg, and M. I. Nishimura, *Efficient transfer of a tumor antigen-reactive tcr to human peripheral blood*



- lymphocytes confers anti-tumor reactivity*, *The Journal of Immunology* **163**, 507 (1999).
- [94] R. A. Morgan, M. E. Dudley, J. R. Wunderlich, M. S. Hughes, J. C. Yang, R. M. Sherry, R. E. Royal, S. L. Topalian, U. S. Kammula, N. P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C. R. de Vries, L. J. Rogers-Freezer, S. A. Mavroukakis, and S. A. Rosenberg, *Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes*, *Science* **314**, 126 (2006).
- [95] G. M. Bendle, C. Linnemann, A. I. Hooijkaas, L. Bies, M. A. de Witte, A. Jorritsma, A. D. Kaiser, N. Pouw, R. Debets, E. Kieback, W. Uckert, J. Y. Song, J. B. Haanen, and T. N. Schumacher, *Lethal graft-versus-host disease in mouse models of t cell receptor gene therapy*, *Nat Med* **16**, 565 (2010).
- [96] J. Kuball, M. L. Dosset, M. Wolf, W. Y. Ho, R. H. Voss, C. Fowler, and P. D. Greenberg, *Facilitating matched pairing and expression of tcr chains introduced into human t cells*, *Blood* **109**, 2331 (2007).
- [97] C. J. Cohen, Y. Zhao, Z. Zheng, S. A. Rosenberg, and R. A. Morgan, *Enhanced antitumor activity of murine-human hybrid t-cell receptor (tcr) in human lymphocytes is associated with improved pairing and tcr/cd3 stability*, *Cancer Res* **66**, 8878 (2006).
- [98] T. Ochi, H. Fujiwara, S. Okamoto, J. An, K. Nagai, T. Shirakata, J. Mineno, K. Kuzushima, H. Shiku, and M. Yasukawa, *Novel adoptive t-cell immunotherapy using a wt1-specific tcr vector encoding silencers for endogenous tcrcs shows marked antileukemia reactivity and safety*, *Blood* **118**, 1495 (2011).
- [99] J. Maher, R. J. Brentjens, G. Gunset, I. Riviere, and M. Sadelain, *Human t-lymphocyte cytotoxicity and proliferation directed by a single chimeric tcrzeta/cd28 receptor*, *Mat Biotechnol* **20**, 70 (2002).
- [100] M. Sadelain, R. Brantjens, and I. Riviere, *The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors*, *Curr Opin Immunol* **21**, 215 (2009).
- [101] J. Charo, S. E. Finkelstein, N. Grewal, N. P. Restifo, P. F. Robbins, and S. A. Rosenberg, *Bcl-2 overexpression enhances tumor-specific t-cell survival*, *Cancer Res* **65**, 2001 (2005).
- [102] G. Dotti, B. Savoldo, M. Pule, K. C. Straathof, E. Biagi, E. Yvon, S. Vigouroux, M. K. Brenner, and C. M. Rooney, *Human cytotoxic t lymphocytes with reduced sensitivity to Fas-induced apoptosis*, *Blood* **105**, 4677 (2005).
- [103] M. T. Stephan, V. Ponomarev, R. J. Brentjens, A. H. Chang, K. V. Dobrenkov, G. Heller, and M. Sadelain, *T cell-encoded CD80 and 4-1bbl induce auto- and transcostimulation, resulting in potent tumor rejection*, *Nat Med* **13**, 1440 (2007).
- [104] A. D. Stasi, S.-K. Tey, G. Dotti, Y. Fujita, A. Kennedy-Nasser, C. Martinez, K. Straathof, E. Liu, A. G. Durett, B. Grilley, H. Liu, C. R. Cruz, B. Savoldo, A. P. Gee, J. Schindler, R. A. Krance, H. E. Heslop, D. M. Spencer, C. M. Rooney, and M. K. Brenner, *Inducible apoptosis as a safety switch for adoptive cell therapy*, *N Engl J Med* **365**, 1673 (2011).
- [105] D. C. Thomis, S. Markt, C. Bonini, C. Traversari, M. Gilman, C. Bordignon, and T. Clackson, *A fas-based suicide switch in human t cells for the treatment of graft-versus-host disease*, *Blood* **97**, 1249 (2001).
- [106] T. A. Waldmann, *The biology of interleukin-2 and interleukin-15: implications for cancer therapy and vaccine design*, *Nat Rev Immunol* **6**, 595 (2006).
- [107] S. Meijer, A. Dols, S. M. Jensen, H. M. Hu, W. Miller, E. Walker, P. Romero, B. A.

- Fox, and W. J. Urba, *Introduction of circulating tumor-reactive cd8+ t cells after vaccination of melanoma patients with the gp100 209-2m peptide*, *J Immunother* **30**, 533 (2007).
- [108] L. J. Cooper, Z. Al-Kadhimi, L. M. Serrano, T. Pfeiffer, S. Olivares, A. Castro, W. C. Chang, S. Gonzalez, D. Smith, S. J. Forman, and M. C. Jensen, *Enhanced antilymphoma efficacy of cd19-redirceted influenza mp1-specific ctls by cotransfer of t cells modified to present influenza mp1*, *Blood* **105**, 1622 (2005).
- [109] L. Gattinoni, C. A. Klebanoff, D. C. Palmer, C. Wrzesinski, K. Kerstann, Z. Yu, S. E. Finkelstein, M. R. Theoret, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo, *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred cd8+ t cells*, *J Clin Invest* **115**, 1616 (2005).
- [110] G. Q. Phan, J. C. Yang, R. M. Sherry, P. Hwu, S. L. Topalian, D. J. Schwartzentruber, N. P. Restifo, L. R. Haworth, C. A. Seipp, L. J. Freezer, K. E. Morton, S. A. Mavroukakis, P. H. Duray, S. M. Steinberg, J. P. Allison, T. A. Davis, and S. A. Rosenberg, *Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic t lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma*, *Proc Natl Acad Sci USA* **100**, 8372 (2003).
- [111] M. Lowenberg, A. P. Verhaar, G. R. van den Brink, and D. W. Hommes, *Glucocorticoid signaling: a nongenomic mechanism for t-cell immunosuppression*, *Trends Mol Med* **13**, 158 (2007).
- [112] D. H. Fremont, M. Matsumura, E. A. Stura, P. A. Peterson, and I. A. Wilson, *Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb*, *Science* **257**, 919 (1992).
- [113] M. Nauerth, *Development of a novel TCR avidity assay for human CD8+ T cells*, PhD thesis, TU Muenchen, 2012.
- [114] M. Nauerth, B. Weißbrich, R. Knall, T. Franz, G. Dössinger, J. Bet, P. J. Paszkiewicz, L. Pfeifer, M. Bunse, W. Uckert, R. Holtappels, D. Gillert-Marien, M. Neuenhahn, A. Krackhardt, M. J. Reddehase, S. R. Riddell, and D. H. Busch, *TCR-ligand koff rate correlates with the protective capacity of antigen-specific CD8+ t cells for adoptive transfer*, *Sci Transl Med* **5**, 192ra87 (2013).
- [115] J. Huang, V. I. Zarnitsyna, B. Liu, L. J. Edwards, N. Jiang, B. D. Evavold, and C. Zhu, *The kinetics of two-dimensional tcr and pmhc interactions determine t-cell responsiveness*, *Nature* **464**, 932 (2010).
- [116] J. B. Huppa, M. Axmann, M. A. Mrtelmaier, B. F. Lillemeier, E. W. Newell, M. Brameshuber, L. O. Klein, G. J. Schtz, and M. M. Davis, *Tcr-peptide-mhc interactions in situ show accelerated kinetics and increased affinity*, *Nature* **463**, 963 (2010).
- [117] S. Tian, R. Maile, E. J. Collins, and J. A. Frelinger, *CD8+ t cell activation is governed by TCR-peptide/MHC affinity, not dissociation rate*, *J Immunol* **179**, 2952 (2007).
- [118] P. S. Andersen, C. Geisler, S. Buus, R. A. Mariuzza, and K. Karjalainen, *Role of the T cell receptor ligand affinity in T cell activation by bacterial superantigens*, *J. Biol. Chem* **276**, 33452 (2001).
- [119] L. J. Carreno, S. M. Bueno, P. Bull, S. G. Nathenson, and A. M. Kalergis, *The half-life of the T-cell receptor/peptide-major histocompatibility complex interaction can modulate T-cell activation in response to bacterial challenge*, *Immunology* **121**, 227 (2007).

- 
- [120] A. M. Kalergis, N. Boucheron, M. A. Doucey, E. Palmieri, E. C. Goyarts, Z. Vegh, I. F. Luescher, and S. G. Nathenson, *Efficient T cell activation requires an optimal dwell-time of interaction between the TCR and the pMHC complex*, Nat. Immunol **2**, 229 (2001).
- [121] M. Krosgaard, N. Prado, E. J. Adams, X. L. He, D. C. Chow, D. B. Wilson, K. C. Garcia, and M. M. Davis, *Evidence that structural rearrangements and/or flexibility during TCR binding can contribute to T cell activation*, Mol. Cell **12**, 1367 (2003).
- [122] M. Degano, K. Garcia, V. Apostolopoulos, M. G. Rudolph, L. Teyton, and I. A. Wilson, *A functional hot spot for antigen recognition in a superagonist tcr/mhc complex*, Immunity **12**, 251 (2000).
- [123] M. D. Tallquist, A. J. Weaver, and L. R. Pease, *Degenerate recognition of alloantigenic peptides on a positive-selecting class I molecule*, J Immunol **160**, 802 (1998).
- [124] M. Aleksic, O. Dushek, H. Zhang, E. Shenderov, J.-L. Chen, V. Cerundolo, D. Coombs, and P. A. van der Merwe, *Dependence of t cell antigen recognition on t cell receptor-peptide mhc confinement time*, Immunity **32**, 163 (2010).
- [125] C. C. Govern, M. K. Paczosa, A. K. Chakraborty, and E. S. Huseby, *Fast on-rates allow short dwell time ligands to activate t cells*, Proc Natl Acad Sci USA **107**, 8724 (2010).
- [126] L. Gattinoni, S. E. Finkelstein, C. A. Klebanoff, P. A. Antony, D. C. Palmer, P. J. Spiess, L. N. Hwang, Z. Yu, C. Wrzesinski, D. M. Heimann, C. D. Surh, S. A. Rosenberg, and N. P. Restifo, *Removal of homeostatic cytokine sinks by lymphodepletion enhances the efficacy of adoptively transferred tumor-specific cd8+ t cells*, J Exp Med **202**, 907 (2005).



---

## Zusammenfassung

T-Lymphozyten erfüllen wichtige Funktionen im Rahmen der Reaktionen des adaptiven Immunsystems gegen Protein-Antigene. Sie erkennen MHC-gebundene Peptide (pMHC) mithilfe ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) und dessen Korezeptoren CD4 bzw. CD8 und entwickeln nach ihrer Aktivierung spezifische Effektor-Funktionen, wie z.B. die Aktivierung anderer Zellgruppen oder zytotoxische Eigenschaften. Die Schlüsselrolle in diesem Prozess spielt die pMHC-Erkennung durch den TCR, die im Fokus vielfältiger Forschungsansätze steht. Dabei gestaltet es sich schwierig, eine zuverlässige und reproduzierbare Größe für die Messung der Avidität des TCR zu seinem Liganden zu entwickeln. In unserer Arbeit interessierten wir uns für die Messung der Dissoziationskinetiken von T-Zell-Rezeptoren CD8<sup>+</sup> T-Zellen und ihrer Liganden. Die Halbwertszeit des TCR-pMHC-Komplexes hat sich in verschiedenen Arbeiten als wichtiger Parameter dieser Molekülinteraktion gezeigt, da sie mit funktionellen und protektiven Eigenschaften der T-Zellen korreliert. Da die bisher zur Verfügung stehenden Methoden zur Messung der Dissoziationskinetiken von TCR und pMHC-Komplex aus verschiedenen Gründen keine zufriedenstellenden Messungen erlaubten, wurde in der Arbeitsgruppe von Dirk Busch eine neue Methode unter Einsatz der Streptamer-Technologie entwickelt. Diese ermöglicht, pMHC-Moleküle reversibel zu multimerisieren. Im Gegensatz zu monomeren pMHC-Molekülen können diese Polymere stabil über die TCR an die T-Zellen binden. Nach schlagartig induzierter Monomerisierung diffundieren die fluoreszenzmarkierten pMHC-Moleküle von der Zelloberfläche ab. Die Dissoziation der pMHC-Komplexe wird in Form von abnehmenden Fluoreszenz-Intensitäten unter dem konfokalen Mikroskop gemessen und durch eine eigens entwickelte Software ausgewertet. So konnten Halbwertszeiten berechnet werden. Ziel dieser Arbeit war, den neuen, am murinen Modell etablierten  $k_{\text{off}}$ -rate-Assay auf das humane System zu übertragen. Streptamere wurden analog zum murinen System hergestellt. Im  $\beta_2\text{m}$ , der leichten Kette der humanen pMHC-Moleküle, wurde wie in den murinen Molekülen die Aminosäure Tyrosin an Position 67 durch ein Cystein ersetzt. Die pMHC-Moleküle wurden über dieses Cystein fluoreszenzmarkiert. Die fluoreszenzmarkierten pMHC-Moleküle wurden mit Streptactin inkubiert, sodass humane Streptamere entstanden, mit denen humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefärbt wurden. Die Durchführung von  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays war an diesen Zellen jedoch nicht möglich. In den Analysen zeigte

sich, dass die Alexa488-Fluoreszenzmarkierung des pMHC-Komplexes am  $\beta_2m$ , die im murinen System keine Auswirkungen hat, an der humanen schweren Kette eine Interaktion der pMHC-Moleküle mit den TCR stört. Durch Integration der Fluoreszenz-Konjugationsstelle im C-Terminus der schweren Kette gelang uns eine stabile Streptamerbindung an T-Zellen. Unklar blieb, warum sich die Alexa488-Fluoreszenzmarkierung der pMHC-Moleküle trotzdem kaum detektieren ließ. Eine Lösung dieses Problems war im Rahmen dieser Arbeit leider nicht mehr möglich. Eine Methode, die an lebenden Zellen stattfindende Messungen von TCR-pMHC-Dissoziationskinetiken erlaubt, eröffnet vielfältige Möglichkeiten auch im Rahmen von therapeutischen Ansätzen. Diesem Ziel sind wir mit dieser Arbeit einen Schritt näher gekommen.

---

## Dankwort

Ausschlaggebend für die Entscheidung zu einer experimentellen Doktorarbeit war meine Neugier auf die Frage, wo und wie medizinische Forschung passiert. Der lange Weg bis zur Fertigstellung der Arbeit wäre ohne die Hilfe Vieler nicht möglich gewesen. Ich möchte die Gelegenheit nutzen, mich bei all denen zu bedanken, die diesen Weg begleitet haben.

An erster Stelle gilt mein Dank meinem Doktorvater Professor Dr. Dirk Busch. Er hat mir die Möglichkeit eröffnet, in einem spannenden Fachgebiet in seiner Arbeitsgruppe an einem hervorragenden Institut zu promovieren. Professor Busch ist ein herausragender Wissenschaftler und Lehrer, der für Fragen und Diskussionen immer ein offenes Ohr hat. Ich durfte von seinem immensen immunologischen Wissen ebenso profitieren, wie von seiner Begeisterung für die Materie und seiner Hartnäckigkeit beim Lösen von Problemen, die mich immer wieder motiviert hat.

Ebenso danke ich meinen Betreuern Dr. Robert Knall und insbesondere Dr. Magdalena Nauwerth. Ohne die enge Supervision durch Magdalena Nauwerth wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen. Sie ist eine exzellente Wissenschaftlerin, die ihr theoretisches Fachwissen und ihre Erfahrung großzügig mit mir teilte, mir alle praktischen Labortätigkeiten wie Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung beibrachte und meine Arbeit akribisch Korrektur las. Robert Knall begleitete meine ersten Schritte im Labor und arbeitete mich in die von ihm entwickelte Methode des  $k_{\text{off}}$ -rate-Assays ein.

Die Arbeitsgruppe Busch hat mich herzlich aufgenommen. Mein besonderer Dank geht an Florian Anderl, Georg Dössinger, Christian Stemberger, Anna Hochholzer und Martina Koffler. Eure Diskussionen, konstruktiv-kritischen Anmerkungen und euer Beistand bei Laborfragen aller Art haben mich vorangebracht und immer für gute Stimmung gesorgt. Matthias Schiemann danke ich für die exzellente Unterstützung in allen IT-Belangen und die Durchführung des Cell-Sorting. Die ersten Laborerfahrungen als Doktorand durfte ich mit meinem Kommilitonen Lukas Pfeifer teilen, dessen pragmatische und erfrischende Art den Laboralltag höchst unterhaltsam machte.

Ich danke meinen Eltern für ihre Unterstützung mein Leben lang. Ihr habt mir immer den Rücken freigehalten und an mich geglaubt. Eine besondere Rolle

beim Entstehen dieser Arbeit spielte mein Bruder Martin. Er ist nicht nur ein hervorragender Physiker, der mir insbesondere beim Schreiben dieser Arbeit mit Rat und Tat zur Seite stand und mich immer wieder motivierte, sondern auch der beste Bruder, den man sich nur wünschen kann.

Schlussendlich danke ich meinen Freunden für ihre Unterstützung. Lisa Mäkinen danke ich für unsere langjährige Freundschaft und ihre kompetente Hilfe bei manchen Abbildungen. Gerti und Gisi danke ich für ein immer offenes Ohr und Rat und Tat in allen Lebenslagen, Karin, Claudia, Johannes und Martin für eine spannende und witzige Studienzeit und eine Freundschaft, die weit darüber hinaus besteht, und Michaela, Eva und Isaac für den Blick auf die wirklich wichtigen Dinge im Leben.