

Technische Universität München
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene

Analyse des Zusammenhangs zwischen struktureller T-Zell-Avidität und Immundominanz

Lukas Johannes Pfeifer

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

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. D. Busch
2. Univ.-Prof. Dr. J. Ruland

Die Dissertation wurde am 08.07.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 01.02.2012 angenommen.

Meinen Eltern

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Abbildungsverzeichnis	6
3	Abkürzungsverzeichnis	7
4	Einleitung	8
4.1	Immunodominanz.....	8
4.1.1	Definition	8
4.1.2	Einflüsse durch Antigen-Prozessierung und -Präsentation	8
4.1.2.1	Das Immunoproteasom – ein Spezialist	9
4.1.2.2	TAP transportiert selektiv Peptide aus dem Zytosol in das ER	10
4.1.2.3	MHC I und seine Präferenzen	11
4.1.2.4	Kreuzpräsentation.....	13
4.1.3	T-Zell abhängige Faktoren	14
4.1.3.1	T-Zell-Rezeptor-Repertoire.....	16
4.1.3.2	Vorläuferfrequenzen.....	17
4.1.3.3	T-Zell-Rezeptor-Avidität	18
4.1.3.3.1	Avidität und ihre Einflussgrößen	18
4.1.3.3.2	Verfahren zur Bestimmung der strukturellen Avidität.....	19
4.1.3.3.3	Strukturelle Avidität und Immunodominanz.....	20
4.2	Das Infektionsmodell der murinen Listeriose	21
4.3	Ziel dieser Doktorarbeit	22
5	Material und Methoden	23

5.1 Materialien	23
5.1.1 Chemikalien und Reagenzien	23
5.1.2 Puffer und Medien	24
5.1.3 Peptide	25
5.1.4 Antikörper	25
5.1.5 MHC-Streptamere	25
5.1.6 Mäuse	26
5.1.7 Mikroskop und Ausstattung für die TCR Aviditätsmessung	26
5.1.8 Ausstattung	26
5.1.9 Software	27
5.2 Methoden	27
5.2.1 Infektion von Mäusen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	27
5.2.2 Organentnahme und Milzpräparation	28
5.2.3 Negative Anreicherung mit Anti-CD4 und Anti-CD19 beladenen Beads	28
5.2.4 T-Zell-Färbung	29
5.2.5 Zellsortierung	29
5.2.6 Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Peptid-MHC-Komplexes vom T-Zell- Rezeptor	30
5.2.6.1 Praktische Umsetzung	30
5.2.6.2 Datenanalyse	30
6 Ergebnisse	32
6.1 Eine neue Methode zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Peptid-MHC- Komplexes vom gebundenen T-Zell-Rezeptor	32
6.1.1 Prinzip	32
6.1.2 Entwicklung eines Algorithmus zur Datenanalyse	34
6.1.3 Minimierung der notwendigen Ausgangszellzahl	37
6.1.4 Reproduzierbare Ergebnisse durch verschiedene Wissenschaftler	38

6.2 LLO ₉₁₋₉₉ -spezifische T-Zellen zeigen im sekundären Effektorrepertoire höhere Dissoziationshalbwertszeiten $T_{1/2}$ als im primären Effektorrepertoire	39
6.3. Funktionelle Avidität und Immundominanz	41
6.4 T-Zellen, die das immunodominante Epitop LLO ₉₁₋₉₉ erkennen, zeigen im sekundären Effektorrepertoire höhere Dissoziationshalbwertszeiten als T-Zellen, die die subdominanten Epitope p60 ₂₁₇₋₂₂₅ oder p60 ₄₆₇₋₄₈₄ erkennen.....	43
7 Diskussion	47
7.1 Optimierung einer neuen Methode zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Peptid-MHC-Komplexes vom gebundenen T-Zell-Rezeptor	47
7.2 Funktionelle und strukturelle Avidität	50
7.3 Strukturelle Avidität als ein Einflussfaktor auf die Immundominanz.....	52
7.3.1 Strukturelle Avidität als Selektionsvorteil	52
7.3.2 Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immundominanz.....	53
8 Zusammenfassung	56
9 Referenzen.....	58
10 Danksagung.....	68

2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des „Peptid-Beladungs-Komplexes“

Abbildung 2: Struktur eines an die Oberseite des MHC I-Peptid-Komplexes gebundenen T-Zell-Rezeptors

Abbildung 3: Schematische Darstellung der Veränderung im TCR-Repertoire auf primäre und sekundäre Antigenexposition

Abbildung 4: Peptid-MHC I-Komplex gebunden an den TCR und das CD8 Molekül

Abbildung 5: Prinzip der neuen, auf Streptamer basierenden Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} bzw. Dissoziationshalbwertszeit $T_{1/2}$

Abbildung 6: Bestimmung der Fluoreszenzintensität einer individuellen Zelle

Abbildung 7: Ermittlung des Analysebereichs der MHC-Dissoziation

Abbildung 8: Datenanalyse der MHC-Dissoziation

Abbildung 9: Vorbereitung zur Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit

Abbildung 10: Dissoziationshalbwertszeiten spezifischer MHC-Komplexe von Zellen einer LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellkultur gemessen von zwei Wissenschaftlern

Abbildung 11: Dissoziationshalbwertszeiten des Peptid-MHC-Komplexes von den LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen sind im sekundären Effektorrepertoire höher als im primären Effektorrepertoire

Abbildung 12: Funktionelle Avidität von LLO₉₁₋₉₉-, p60₂₁₇₋₂₂₅- und p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen

Abbildung 13: Dissoziationshalbwertszeiten der jeweiligen Peptid-MHC-Komplexe von LLO₉₁₋₉₉, p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ spezifischen T-Zellen des Sekundärrepertoire.

Abbildung 14: Dissoziationshalbwertszeiten der jeweiligen Peptid-MHC-Komplexe von LLO₉₁₋₉₉ und p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellen des Sekundärrepertoire einer Maus

Abbildung 15: Dissoziationshalbwertszeiten der jeweiligen Peptid-MHC-Komplexe von LLO₉₁₋₉₉ und p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen des Sekundärrepertoire einer Maus

3 Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
ATP	Adenosin Triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
CD	Differentierungscluster (Cluster of differentiation)
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EMA	Ethidium Monazid Bromid
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (Fluorescence activated cell sorting)
FCS	fötales Kälberserum (fetal calf serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
HLA	humanes Leukozytenantigen (entspricht dem humanen MHC)
IC ₅₀	peptidkonzentration bei der es zu einer 50% IFN- γ Produktion bei der ICCS kommt.
ICCS	Intrazelluläre Zytokinfärbung (Intracellular cytokine staining)
IFN	Interferon
LLO	Listeriolysin O
L.m.	Listeria monocytogenes
M	Molar
m	milli (10^{-3})
m β 2m	murines beta2-Mikroglobulin
NK	natürliche Killerzelle
μ	mikro (10^{-6})
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
min	Minuten
p60	murine Hydrolase
PBS	Phosphat Puffer (phosphate-buffered saline)
PE	R-Phycoerythrin
PI	Propidiumjodid (propidium iodide)
pIC ₅₀	- log (IC ₅₀)
TAP	Transporter assoziiert mit Antigenpräsentation
TCR	T-Zell-Rezeptor (T cell receptor)

4 Einleitung

4.1 Immunodominanz

4.1.1 Definition

Das spezifische Immunsystem identifiziert Krankheitserreger, indem es kurze Peptidsequenzen aus deren Proteinen erkennt. Viren und Bakterien exprimieren eine Vielzahl verschiedener Gene, die wiederum aus hunderten bis zu mehreren tausenden Aminosäuren bestehen. Dem Immunsystem werden also zahlreiche potentielle Ziele geboten. Bemerkenswerterweise wählt das Immunsystem aus dieser Vielzahl an kurzen Peptiden nur wenige aus, gegen die es besonders starke T-Zell-Antworten ausbildet. Dieses Phänomen, zuerst für CD4⁺ T-Zellen beschrieben, nennt man Immunodominanz (Sercarz et al., 1993). Als „immunodominant“ bezeichnet man die Epitope, die von quantitativ gesehen größeren T-Zell-Populationen erkannt werden; dem entsprechend bezeichnet man als „subdominant“ die Epitope, auf die quantitativ gesehen kleinere T-Zell-Populationen reagieren. Aufgrund der verschiedenen Größen der T-Zell-Populationen, die spezifisch ein bestimmtes Epitop erkennen, bildet sich also eine Hierarchie. Diese Hierarchie, die das Endprodukt komplexer zellulärer Mechanismen darstellt, ist bei genetisch identischen Versuchstieren erstaunlich gut reproduzierbar. Gerade diese Beobachtung zeigt, dass es nicht der Zufall, sondern vielmehr determinierte Prozesse sind, die dem Phänomen der Immunodominanz zugrunde liegen. Das genaue Verständnis dieser Prozesse ist die Grundlage dafür, in das System der Immunodominanz gezielt eingreifen zu können, um so zum Beispiel neue und bessere Impfstrategien entwickeln zu können. Man kann die Faktoren mit einem möglichen Einfluss auf die Immunodominanz in die zwei Kategorien – Antigen- Prozessierung / -Präsentation und T-Zell-Aktivierung – einteilen, die im Folgenden am Beispiel der CD8⁺ T-Zellen näher erläutert werden sollen (Yewdell and Bennink 1999; Yewdell 2006).

4.1.2 Einflüsse durch Antigen-Prozessierung und -Präsentation

CD8⁺ T-Zellen erkennen anhand ihres T-Zell-Rezeptors kurze Peptidepitope, typischerweise 8-10 Aminosäuren lang, die an der Oberfläche von Zellen auf

Haupthistokompatibilitätskomplexen der Klasse I (kurz MHC I) präsentiert werden (Rammensee et al. 1995; Garcia et al. 1996). Dieses Kapitel soll den Weg eines Peptides von der Verdauung durch das Proteasom im Zytosol über den Transporter in das ER (Endoplasmatische Retikulum) bis zur Bindung und Präsentation auf dem MHC I Molekül beschreiben und damit zeigen, inwiefern schon hier die Anzahl der potentiell immunodominanten bzw. subdominanten Peptide eingeschränkt wird.

4.1.2.1 Das Immunoproteasom – ein Spezialist

Die auf MHC I präsentierten Peptide stammen hauptsächlich von Proteinen aus dem Zytosol. Proteine werden in Zellen kontinuierlich abgebaut und durch neu synthetisierte ersetzt. Eine wichtige Rolle beim zytosolischen Proteinabbau spielt das Proteasom, ein großer zylindrischer Proteasenkomples, bestehend aus etwa 28 Untereinheiten. Durch IFN- γ induziert, werden einige dieser Untereinheiten ersetzt durch b1i (früher LMP2), b5i (früher LMP7) und b2i (früher MECL-1) und es entsteht ein verändertes Proteasom, das Immunoproteasom. b1i und b5i sind in der MHC-Region kodiert. Das Immunoproteasom ist auf die Herstellung von Peptiden, die auf MHC I-Molekülen präsentiert werden, spezialisiert. Es zeigt bevorzugte Spaltung nach hydrophoben Aminosäuren und verminderte Spaltung nach sauren Aminosäuren, wodurch die produzierten Peptide beim TAP-Transport sowie bei der Bindung an MHC I-Moleküle bevorzugt werden (Gaczynska et al., 1993; Janeway et al., 2005); siehe auch 2.1.2 und 2.1.3). So verwundert es nicht, dass in mehreren Studien Hinweise gefunden wurden, dass das Immunoproteasom einen Einfluss auf die Immunodominanz haben kann (Yewdell and Bennink, 1999). In einigen Mausmodellen, denen Untereinheiten des Immunoproteasoms fehlen, konnten Veränderungen der Immunodominanz-Hierarchie nachgewiesen werden, die zum Teil auf eine verminderte Peptid-Präsentation zurückgeführt wurden (Chen et al., 2001; Pang et al., 2006).

Erwähnt sei an dieser Stelle noch, dass es andere Peptidasen gibt, die Peptide für MHC I-Moleküle zurechtschneiden (Miller and Edward, 2006). Zwar benötigen die meisten dieser Peptidasen die Vorarbeit des Proteasoms, es gibt jedoch Hinweise, dass die Tripeptidyl-Peptidase TPPII unabhängig von dem Proteasom Peptide zur MHC I-Präsentation erzeugen kann (Seifert et al., 2003).

Immunoproteasome sind vornehmlich am ER lokalisiert und scheinen in Interaktion mit TAP (transporter associated with antigen processing, TAP) treten zu können (Begley et al., 2005; Brooks et al., 2000).

4.1.2.2 TAP transportiert selektiv Peptide aus dem Zytosol in das ER

TAP ist eine heterodimere ATPase aus TAP1 und TAP2, zwei im MHC-Locus kodierte Gene, die durch IFN- γ induzierbar sind. Die Aufgabe von TAP ist es, Peptide aus dem Zytosol in das ER zu transportieren. Interessanterweise ist die ideale Peptidlänge für den Transport der von auf MHC I präsentierten Peptide sehr ähnlich. Es können jedoch auch längere Peptide (bis etwa 25 Aminosäuren) transportiert werden, die dann durch Peptidasen im ER, wie beispielsweise ERAAP (endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing) weiter prozessiert werden können (Miller and Edward, 2006). Neben der Peptidlänge sind die Aminosäuren an den jeweiligen Peptidenden, dem Carboxyl- und dem N-Terminus, entscheidend, während die dazwischen liegenden Aminosäuren austauschbar sind (Uebel et al., 1997). Bei Menschen werden Peptide mit basischen und hydrophoben Resten am C-Terminus, bei Mäusen Peptide mit hydrophoben Resten am C-Terminus bevorzugt von TAP transportiert (Momburg et al., 1994). Des Weiteren werden hydrophobe Reste an der dritten Position sowie hydrophobe oder basische Reste an der zweiten Position des Peptides bevorzugt (van Endert et al., 1995). Basierend auf der Selektivität, die TAP bei dem Peptidtransport zeigt, ist es nicht verwunderlich, dass TAP Einfluss auf Peptidrepertoire hat, welches auf MHC I den T-Zellen präsentiert wird (Uebel et al. 1997; Daniel et al. 1998). Es ist also möglich, dass TAP einen Einfluss auf die Immunodominanz hat, indem es selektiv Peptide aus dem Zytosol in das ER transportiert. Dieser Einfluss konnte allerdings experimentell noch nicht gezeigt werden (Yewdell and Bennink, 1999). Zusammenfassend werden von TAP selektiv Peptide bevorzugt, deren Eigenschaften den Peptiden ähneln, die von MHC I gebunden werden und somit stellt der Transport bereits eine sinnvolle Selektion dar (Yewdell, 2006).

Es ist jedoch wichtig zu verstehen, dass die Motive des TAP-Transporters nicht zwingend mit den auf MHC I gebundenen Peptiden übereinstimmen, da die Möglichkeit besteht, dass Peptide als Vorläufersequenzen in das ER transportiert werden, um dort erneut geschnitten zu werden (van Endert et al., 1995). Weiter werden die Peptide, die auf MHC I präsentiert werden, zwar vorwiegend über TAP in das ER transportiert, es wurde jedoch anhand von

TAP-defizienten Zelllinien gezeigt, dass alternative Transportwege in das ER existieren (Henderson et al. 1992; Wei and Cresswell 1992; Miller and Edward 2006). Da es Krankheitserreger gibt, die dem Immunsystem zu entkommen versuchen, indem sie den TAP-Transport inhibieren, kann ein alternativer Transportweg ein evolutionärer Selektionsvorteil sein (Murphy et al., 2008). Es gibt Hinweise, das P-Glycoprotein ein solcher alternativer Transporter ist (Sharom et al. 1995; Sharom et al. 1996; Begley et al. 2005).

4.1.2.3 MHC I und seine Präferenzen

Im ER bildet sich der MHC I „Peptid-Beladungs-Komplex“ (Abbildung 1), bestehend aus MHC I, Tapasin, Calreticulin, ERp57 und TAP (Hammer and Shastri, 2007). Es gibt Hinweise, dass Tapasin zusammen mit ERp57 in diesem Komplex eine Schlüsselrolle einnehmen, indem sie das MHC I-Molekül in einem Zustand halten, der eine Peptidbindung begünstigt und gleichzeitig die Bindung von hoch affinen Peptiden bevorzugt (Kienast et al., 2007; Wearsch and Cresswell, 2007). Das Glykoprotein Tapasin bindet TAP und MHC I und kann so zu einer räumlichen Assoziation von TAP mit bis zu vier MHC I-Komplexen führen (Sadasivan et al. 1996; Ortmann et al. 1997). Calreticulin und Calnexin sind Chaperone, die die Faltung des MHC I-Komplexes begünstigen und kontrollieren. Calnexin scheint die schwere Kette von MHC I direkt nach ihrer Translation zu stabilisieren, während Calreticulin am endgültigen „Peptid-Beladungs-Komplex“ beteiligt ist (Purcell and Elliott, 2008).

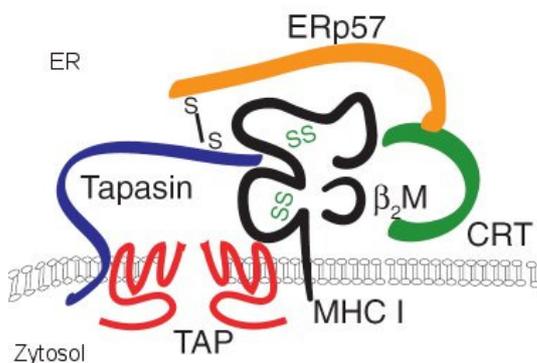


Abbildung 1. Schematische Darstellung des „Peptid-Beladungs-Komplexes“ bestehend aus MHC I, Tapasin, ERp57, Calreticulin (CRT) und TAP (Hammer and Shastri, 2007)

MHC I besteht aus zwei Polypeptidketten: einer größeren α -Kette, die in der MHC-Region kodiert ist, und einer kleineren, nicht kovalent angelagerten Kette, dem β_2 -Mikroglobulin, das nicht in der MHC-Region kodiert ist. Die MHC-Region ist ein Abschnitt der DNA, auf dem

viele verschiedene Gene wie z.B. Proteasombestandteile, Tapasin, TAP, MHC II, die schwere Kette von MHC I und viele andere - jedoch vornehmlich mit immunologischer Funktion - kodierte Proteine liegen. Eine MHC-Region kodiert für drei verschiedene MHC I-Allele (Maus: H2-K,-D und -L, Mensch: HLA-A, -B und -C). Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes werden so in jedem Individuum mindestens drei, jedoch meistens sechs verschiedene MHC I-Moleküle exprimiert (Janeway et al., 2005). MHC I setzt sich aus vier Domänen zusammen, von denen eine durch das nicht polymorphe β 2-Mikroglobulin gebildet wird. Die schwere Kette besteht aus drei Domänen und ist in der Membran verankert. Sie weist hoch polymorphe Abschnitte in ihrer α 1- und α 2-Domäne auf und so ist es nicht verwunderlich, dass diese zwei Domänen die peptidbindende Interaktionsfläche mit der T-Zelle bilden (Abbildung 2). Der Boden dieses Spaltes ist eine β -Faltblatt-Struktur, während die Ränder von zwei α -Helices gebildet werden. Das Peptid liegt längs in dieser Furche (Bjorkman et al., 1987; Guo et al., 1992). Peptide spielen eine wichtige Rolle für die Struktur der MHC I-Moleküle. In ihrer Abwesenheit werden die MHC-Moleküle unter physiologischen Temperaturen instabil (Ljunggren et al. 1990). Die Peptide, die an MHC I binden können, haben an zwei oder drei definierten Positionen innerhalb der Peptidsequenz dieselben oder sehr ähnliche Aminosäuren. Diese Aminosäuren nennt man Verankerungsreste, da sie in Taschen des MHC-Moleküls verankert sind. Die meisten Peptide, die an MHC I binden, haben einen hydrophoben (oder manchmal basischen) Verankerungsrest am Carboxylende (Falk et al., 1991; Rammensee et al., 1993). An dieser Stelle sei angemerkt, dass interessanterweise das Immunoproteasom bevorzugt nach hydrophoben Resten schneidet und TAP bevorzugt Peptide mit hydrophoben C-Termini transportiert (vgl. Kapitel 4.1.2.1 und 4.1.2.2). Neben dem meist ähnlichen Carboxylende unterscheiden sich weitere Verankerungsreste, je nach MHC I-Variante, sowohl in der Position als auch in der Aminosäure. So sind zum Beispiel, vom N-Terminus aus gezählt, Verankerungsreste bei H-2Kd an Position 2 in Form eines Tyrosins (Romero et al., 1991), bei H-2Kb an Position 5 in Form eines Phenylalanins oder Tyrosins (Falk et al., 1991) und bei HLA-B27 an Position 2 in Form eines Arginins zu finden (Jardetzky et al., 1991). Folglich präsentiert jedes MHC-Molekül Peptide mit einem bestimmten Sequenzmotiv. Strukturanalysen haben gezeigt, dass jedoch durchaus auch andere Aminosäuren des Peptides zur Bindung an MHC I beitragen (Zhang et al. 1992; Madden et al. 1993). Auch bei Nicht-Verankerungsresten werden einige Aminosäuren, je nach MHC I-Molekül, bevorzugt (Rammensee et al., 1995). Ein weiterer wichtiger Faktor für die Bindung eines Peptides an MHC I ist dessen Länge, die typischerweise zwischen 8 und 10 Aminosäuren beträgt

(Rammensee et al., 1995). An dieser Stelle sei angemerkt, dass es vereinzelt Berichte gibt über längere Peptide, die an MHC I binden (Probst-Kepper et al., 2004; Speir et al., 2001), sowie Peptide, die dem Sequenzmotiv nicht entsprechen (Mandelboim et al., 1994). Wenn sich ein stabiler Peptid-MHC I-Komplex gebildet hat, wird dieser an die Zelloberfläche transportiert, und somit für die CD8⁺ T-Zellen sichtbar (Murphy et al., 2008).

Mehrere Studien haben die Bindungsaffinität zwischen verschiedenen Peptiden und MHC I untersucht, und diese mit der Immunogenität verglichen, welche die Fähigkeit eines Peptides beschreibt, Milzzellen von Mäusen, die mit dem gleichen Peptid beimpft wurden, in vitro zu stimulieren. Diese Experimente zeigen tendenziell, dass immunogene Epitope stärker an MHC I binden als nicht immunogene Peptide. Diese Korrelation scheint jedoch nur bis zu einem gewissen Grenzwert gültig zu sein. Bei Peptid-MHC I-Paaren, deren Affinität über diesem Grenzwert liegt, sind vermutlich andere Faktoren für die Immundominanz verantwortlich (Yewdell and Bennink, 1999).

Des Weiteren konnten Korrelationen zwischen der Stabilität des Peptid-MHC I Komplexes und der Immunodominanz gefunden werden (Levitsky et al., 1996; Sijts and Pamer, 1997). Allerdings deutet die Arbeit von Sijts et. al darauf hin, dass bei hohen Stabilitäten des Peptid-MHC I-Komplexes andere Faktoren für die Immunodominanz bestimmend sind. So ist die Peptid-MHC I-Stabilität für das immunodominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ im Listerienmodell ähnlich der des subdominanten Epitops p60₂₁₇₋₂₂₅. Allerdings zeigen subdominante Epitope, deren spezifische CD8⁺ T-Zell-Frequenzen deutlich unter der von p60₂₁₇₋₂₂₅ liegen, eine geringere Stabilität im Komplex mit MHC I (Sijts and Pamer, 1997).

4.1.2.4 Kreuzpräsentation

Früher dachte man, dass die Peptide, die auf MHC I präsentiert werden, ausschließlich von Proteinen stammen, die von der Zelle selbst synthetisiert wurden. Es hat sich jedoch gezeigt, dass auch extrazelluläre Antigene auf MHC I präsentiert werden und T-Zellen stimulieren können. Dieses Phänomen nennt man Kreuzpräsentation (Rock and Shen, 2005). In einer Studie von Guermonprez et al. wurde gezeigt, dass professionelle antigenpräsentierende Zellen, wie beispielsweise dendritische Zellen, diese Fähigkeit besitzen (Guermonprez et al., 2003). Dabei werden die Proteine durch Phagozytose oder Mikropinozytose aufgenommen und dann auf zwei alternativen Wegen prozessiert. Bei einem dieser Wege werden Proteine in das Zytosol transportiert, um dann dort von Proteosomen zerschnitten zu werden. Die Peptide

werden dann entweder in ein Phagosom oder über TAP in das ER transportiert, wo sie an MHC-I binden (Kovacsovics-Bankowski and Rock, 1995; York and Rock, 1996). Alternativ kann das Protein durch endosomale Proteasen, vornehmlich durch Cathepsin S, zerschnitten werden und die entstehenden Oligonukleotide können eventuell noch im endosomalen Kompartiment selbst an MHC-I binden (Rock and Shen, 2005; Shen et al., 2004). Es ist offensichtlich, dass auch diese Prozesse der Kreuzpräsentation einen potentiellen Einfluss auf die Immundominanz besitzen.

4.1.3 T-Zell abhängige Faktoren

Das vorherige Kapitel hat sich mit der Frage beschäftigt, wie Peptide prozessiert und präsentiert werden. Von diesen präsentierten Peptiden wird ein Teil einen subdominanten und ein noch geringer Teil immunodominanten Status erreichen. Die letzten entscheidenden Prozesse werden hauptsächlich von den Eigenschaften der T-Zellen mitbestimmt. Es ist also unter dem Gesichtspunkt der Immundominanz von besonderem Interesse, genauer auf die Biologie der T-Zellen einzugehen. Dieses Kapitel soll dabei speziell auf das T-Zell-Rezeptor-Repertoire, die naiven Vorläuferfrequenzen und die Avidität zwischen T-Zell-Rezeptor und Peptid-MHC-Komplex eingehen.

Die Peptid-MHC I-Kombinationen, die eine $CD8^+$ T-Zelle erkennen können, werden durch Expression des klonal verteilten, heterodimeren α/β -T-Zellrezeptors (T-cell receptor, TCR, Abbildung 2) bestimmt (Davis and Bjorkman, 1988). Ein mannigfaltiges TCR-Repertoire ist notwendig, um einen T-Zell-Pool zu schaffen, der fähig ist, einen ausreichenden Schutz gegen die zahlreichen potentiellen Antigene zu vermitteln, mit denen ein Immunsystem während eines Lebens konfrontiert werden kann (Goldrath and Bevan, 1999). Der bestimmte TCR, der von einer individuellen T-Zelle exprimiert wird, ist das Endprodukt einer Serie von zufälligen Rekombinationen von Gensegmenten, die in der Ontogenese der T-Zelle stattfinden. TCR-Gene werden durch Verbinden von Segmenten hergestellt, wobei V-, D- und J-Segmente für die β Kette kodieren und V- und J-Segmente für die α -Kette. Dadurch, dass es für jedes Segment mehrere Auswahlmöglichkeiten gibt und an den Verknüpfungsstellen sowohl Nukleotidadditionen als auch -deletionen stattfinden, ergibt sich eine enorme Vielfalt an verschiedenen möglichen TCR-Genen. Die dreidimensionale Struktur einer Kette des TCR enthält, ähnlich den Immunglobulinen, drei Schleifen, die man komplementaritätsbestimmende Region (complementarity determining region, CDR1, CDR2

und CDR3) nennt. Die CDR3-Schleifen werden von den D- und J- Segmenten gebildet und sind das Zentrum der Bindungsstelle für das hochvariable Antigen. So verwundert es nicht, dass die CDR3-Regionen des TCR eine größere Vielfalt aufweisen als die CDR1- und CDR2-Regionen, die hauptsächlich mit den relativ wenigen variablen MHC-Komponenten in Kontakt treten (Garcia et al. 1999; Goldrath and Bevan 1999; Murphy et al. 2008).

Der größte Teil der T-Vorläuferzellen wird im Thymus aufgrund deren T-Zellrezeptoren ausselektiert, bevor sie zu ausgereiften T-Lymphozyten werden. Zunächst werden in einem Prozess, den man positive Selektion nennt, diejenigen T-Zellen zum Überleben befähigt, deren TCR körpereigene MHC-Moleküle erkennen. Die darauf folgende negative Selektion bewirkt die Apoptose, also den programmierten Zelltod von T-Zellen, die körpereigene Strukturen erkennen. Somit wird die Funktionsfähigkeit der T-Zellen sichergestellt, indem sie einerseits das MHC-Molekül erkennen und andererseits nicht gegen körpereigene Strukturen vorgehen (Murphy et al., 2008).

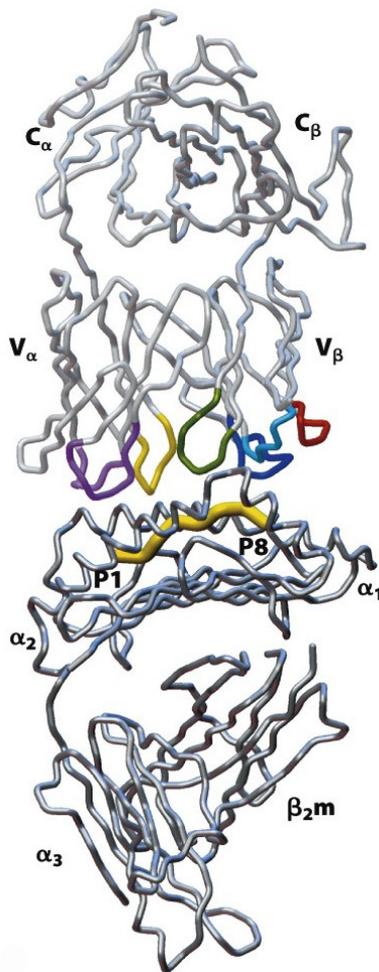


Abbildung 2. Struktur eines an die Oberseite des MHC I-Peptid-Komplexes gebundenen T-Zell-Rezeptors. Die CDR1- und CDR2-Schleifen der β -Kette sind hell- bzw. dunkelblau, die CDR1- und CDR2-Schleifen der α -Kette sind hell- bzw. dunkelviolett, die CDR3-Schleife der α -Kette gelb, die CDR3-Schleife der β -Kette grün, die HV4-Schleife der β -Kette orange dargestellt. Das Peptid ist in gelber Farbe in der Bindungsfurche der α_1 - und α_2 -Domänen des MHC-Moleküls zu sehen (Davis et al., 1998).

4.1.3.1 T-Zell-Rezeptor-Repertoire

Jede T-Zelle trägt etwa 100 000 identische Kopien eines TCR. Das T-Zell-Rezeptor-Repertoire stellt die Gesamtheit aller T-Zell-Rezeptoren dar, die von den T-Zellen eines Individuums exprimiert werden. Nach Schätzungen von J. Yewdell werden etwa 50% der auf MHC I präsentierten Peptide von T-Zellen erkannt (Yewdell and Bennink 1999; Yewdell 2006). Durch die Restriktion des TCR-Repertoires anhand von transgenen Mäusen konnte in einem Influenzavirusmodell ein tiefgreifender Einfluss auf die Immundominanz gezeigt werden (Daly et al. 1995). Auch konnte der potentielle Einfluss der thymalen negativen Selektion auf die Immundominanz - vermittelt über das TCR-Repertoire – in humanen T-Zell-Antworten gezeigt werden (Burrows et al. 1994; Burrows et al. 1995).

Wenn naive $CD8^+$ T-Zellen im Rahmen einer primären Immunantwort rekrutiert werden, kommt es zur klonalen Expansion antigenspezifischer Zellen (Lau et al. 1994; Goldrath and Bevan 1999; Kaech and Ahmed 2001; van Stipdonk et al. 2001). In der darauf folgenden Kontraktionsphase kommt es durch Apoptose zur Reduktion der spezifischen T-Zellen und das Gedächtnisrepertoire bildet sich aus (Badovinac et al., 2002; Sallusto et al., 1999)(Abbildung 3).

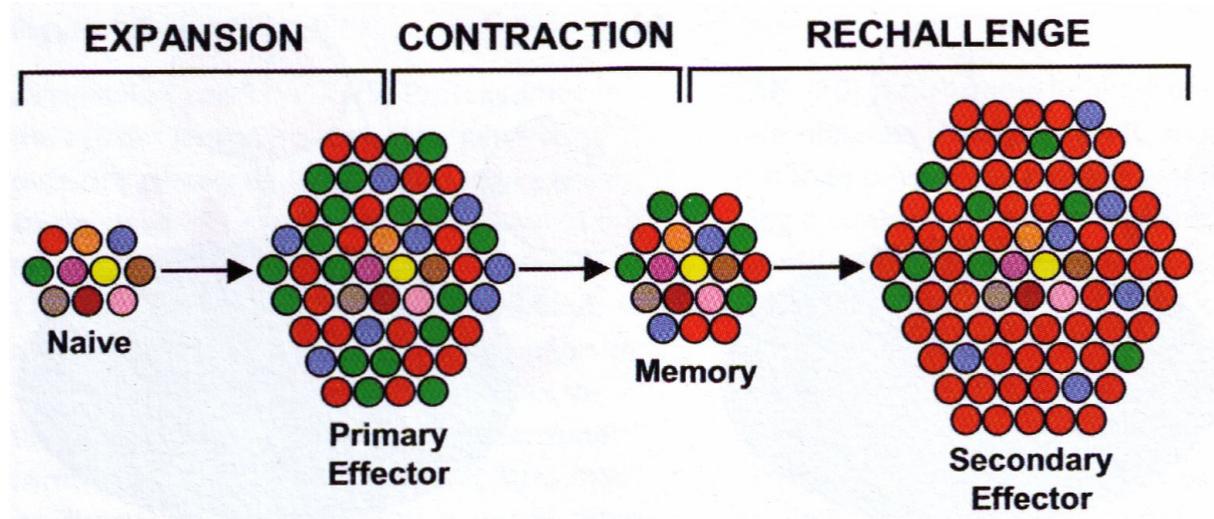


Abbildung 3. Schematische Darstellung der Veränderung im TCR-Repertoire auf primäre und sekundäre Antigenexposition. Der antigen-spezifische naive T-Zell-Pool wird aktiviert und die Zellen proliferieren und bilden das primäre Effektorrepertoire. Hieraus entsteht in der Kontraktionsphase das Gedächtnisrepertoire. Durch eine erneute Antigenexposition bildet sich das sekundäre Effektorrepertoire. In diesem Beispiel sind die roten Zellen immunodominant (Gaddis et al., 2006).

Das Gedächtnis-TCR-Repertoire scheint dem des Effektor-TCR-Repertoires zu ähneln. Bei dem sekundären Effektorrepertoire jedoch wurden widersprüchliche Ergebnisse gefunden. Während in einer Studie am *Listeria monocytogenes*-Modell das Reinfektionsrepertoire eine Restriktion des Gedächtnisrepertoires darstellt, kann in einem lymphozytären Choriomeningitisvirus-Modell ein solcher Unterschied nicht gezeigt werden (Busch et al., 1998; Sourdivé et al., 1998).

Interessanterweise zeigen einige Studien, dass sich die Diversität des TCR-Repertoires mit dem Lebensalter des Individuums verringert. Während die absolute Zahl der peripheren T-Zellen konstant bleibt, konnte eine selektive Expansion bestimmter T-Zell-Klone in älteren Individuen gezeigt werden, was auf ein restriktives TCR-Repertoire hindeutet. Die altersassoziierte Restriktion ist jedoch variabel und nicht immer detektierbar (Schwab et al. 1997; LeMaoult et al. 2000; Effros et al. 2003; Yager et al. 2008).

4.1.3.2 Vorläuferfrequenzen

Einen anderen möglichen Einflussfaktor auf die Immundominanz stellen die naiven CD8⁺ T-Zell-Populationen, also die Vorläuferfrequenzen, die ein bestimmtes Epitop erkennen, dar. Es ist denkbar, dass die naive T-Zell-Population, die das immunodominante Epitop erkennt, größer ist als die, die subdominante Epitope erkennt, und es dadurch zu einer quantitativ größeren T-Zell-Antwort kommt. Man findet in der Literatur Schätzungen von 50 - 3000 naiven T-Zellen, die spezifisch ein Epitop erkennen können (McHeyzer-Williams and Davis 1995; Blattman et al. 2002; Stetson et al. 2002; Moon et al. 2007). Die Untersuchung der naiven T-Zell-Populationen ist jedoch äußerst schwierig, da diese sehr klein sind. Macht man sich die auf den Organismus bezogen sehr geringe Zellzahl bewusst, wird diese Problematik deutlich.

Vor kurzem konnten jedoch mit einem Anreicherungsverfahren naive antigen-spezifische T-Zell-Populationen detektiert werden. Hierzu benutzte man Beads, kleine magnetische Teilchen, die an die markierte Zielzelle binden. So konnte für drei Epitope eine Korrelation zwischen Immundominanz und naiven CD8⁺ T-Zell-Populationen gezeigt werden (Obar et al., 2008). Auch für CD4⁺ T-Zellen wurden Hinweise für einen Zusammenhang zwischen Vorläuferfrequenz und der Größe der T-Zellantwort gefunden (Moon et al., 2007).

4.1.3.3 T-Zell-Rezeptor-Avidität

4.1.3.3.1 Avidität und ihre Einflussgrößen

Man unterscheidet die funktionelle und die strukturelle Avidität. Eine T-Zelle, die geringe Antigenmengen erkennen kann und darauf mit Aktivierung ihrer Effektorfunktion reagiert, hat definitionsgemäß eine höhere funktionelle Avidität als eine T-Zelle, die höhere Antigenmengen für denselben Effekt benötigt (Alexander-Miller, 2005). Sie ist unter anderem abhängig von der Effizienz der Signaltransduktionswege, des Expressionslevels des TCRs, der Expression des CD8 $\alpha\beta$ Heterodimeres (Cawthon and Alexander-Miller, 2002; Cawthon et al., 2001) und der TCR-MHC-Interaktion (Davis and Bjorkman, 1988).

Die strukturelle Avidität hingegen bezeichnet die kombinierte Affinität des CD8-Korezeptors und des TCR mit dem Peptid-MHC I-Komplex (Abbildung 4). Sie wird bestimmt durch elektrostatische Kräfte, Wasserstoffbrückenbindungen, Van-der-Waals-Kräfte und hydrophobe Interaktionen zwischen den Aminosäuren in den Bindungsregionen (Murphy et al., 2008). Die Stärke einer Affinität ist definiert durch die Dissoziationskonstante $K_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ (Janeway et al., 2005). Die strukturelle Avidität lässt sich – wenn auch vereinfacht – mathematisch mit demselben Modell beschreiben. Es gibt Hinweise in der Literatur, dass k_{off} der bestimmende Faktor für die strukturelle Avidität ist (Alam et al., 1996; Garcia et al., 1997; Lee et al., 2004; Lyons et al., 1996) (siehe auch 7.1). Somit ist eine hohe Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} bzw. eine niedrige Halbwertszeit $T_{1/2}$ ein starker Hinweis auf eine hohe strukturelle Avidität.

Für die funktionelle Avidität hat sich in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit in einem rekombinanten *L.m.*-Modell eine klare Korrelation zur Immundominanz im Primärrepertoire gezeigt (Zehn et al., 2009). Über den Zusammenhang zwischen struktureller Avidität und Immundominanz ist nur sehr wenig bekannt, da die Methodik zur Messung der strukturellen Avidität bis heute unzureichend ist (siehe hierzu 4.1.3.3.3).

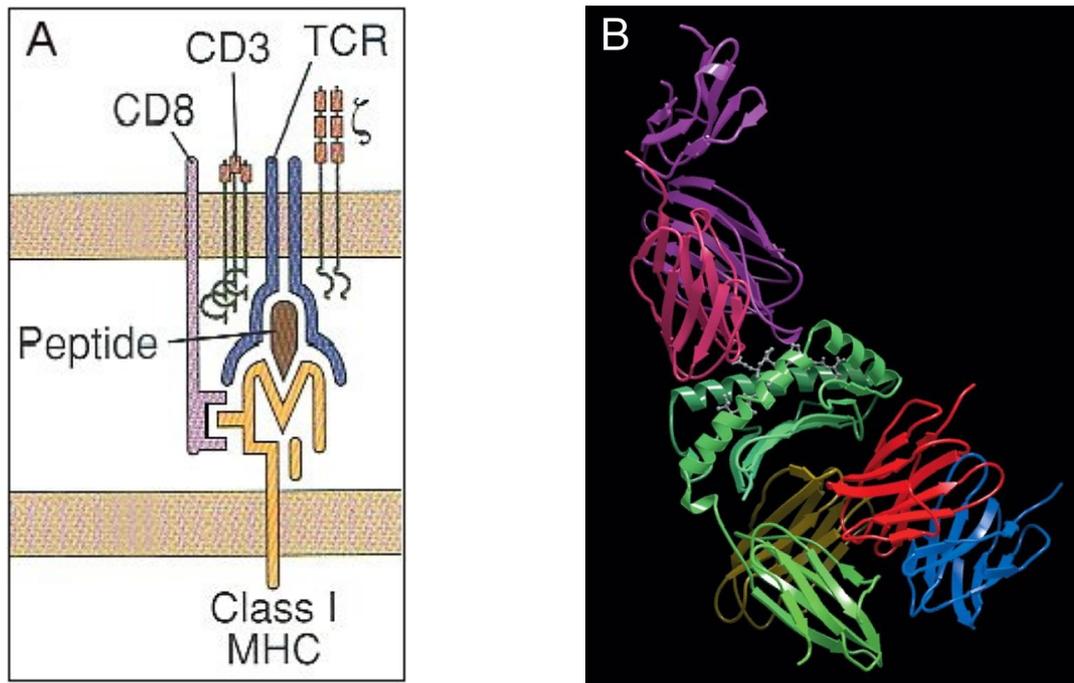


Abbildung 4. Peptid-MHC I-Komplexe gebunden an den TCR und das CD8 Molekül. (A) Schematische Darstellung (Abbas and Lichtman, 2003) (B) Darstellung der Sekundär, Tertiär und Quartär Struktur; grün: α -Kette des MHC Moleküls; gelb: $\beta 2$ Mikroglobulin; pink/lila : α -Kette / β -Kette des TCR; rot und blau: CD8 Molekül (Gao et al., 1997)

4.1.3.3.2 Verfahren zur Bestimmung der strukturellen Avidität

Um die strukturelle Avidität antigen-spezifischer T-Zellpopulationen abschätzen zu können, standen bisher nur zwei Methoden zur Verfügung. Eine Methode basiert auf der Färbeintensität und/oder Dissoziation von MHC-Tetrameren (Wang and Altman, 2003). MHC-Tetramere sind Komplexe, bestehend aus peptidbeladenen MHC I-Molekülen, die über ein Rückgrat miteinander verbunden sind. Anders als einzelne Peptid-MHC I-Komplexe sind sie in der Lage, stabil an die Rezeptoren der jeweils spezifischen T-Zellen zu binden (Altman et al. 1996). Einige Autoren haben jedoch eine Korrelation zwischen der Färbeintensität und der T-Zell-Avidität in Frage gestellt (al-Ramadi et al., 1995; Lawson et al., 2001; Palermo et al., 2001). Ein weiterer Mangel dieser Methode könnte die multimere Natur der Tetramere sein, die möglicherweise dazu führt, dass andere Faktoren als die TCR-Affinität die Dissoziation kontrollieren (Alexander-Miller, 2005). Es konnte z.B. gezeigt werden, dass Veränderungen in der Organisation von TCR auf der Membran die MHC-Tetramerbindung beeinflussen können (Drake and Braciale, 2001; Fahmy et al., 2001).

Die multimere Natur der Tetramere führt dazu, dass die Ergebnisse aus Tetramer-basierenden TCR-Aviditätsstudien schwer zu interpretieren sind. Es ist wahrscheinlich, dass die Dissoziation von MHC-Tetrameren aus mehreren Schritten besteht. Der erste Schritt resultiert nicht in verminderter Fluoreszenz, da hier nur ein „Arm“ dissoziiert, das Tetramer jedoch an der Zelle gebunden bleibt. Dieser Schritt ist reversibel, und die Konzentration der frisch dissoziierten MHC-Untereinheit extrem hoch (Wang and Altman, 2003). Es resultiert ein kompliziertes Dissoziationsmodell, welches eine direkte Aussage über die strukturelle Avidität zwischen einem einzelnen TCR zu seinem Peptid-MHC-Komplex fragwürdig erscheinen lässt.

Eine andere Methode zur Messung der strukturellen Avidität ist die auf Lichtbrechung basierende Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie (engl. surface plasmon resonance, SPR ; (Fagerstam et al., 1992; Liedberg et al., 1983). Die Herstellung von gelösten TCR ist jedoch sehr aufwendig und stellt ein Problem dar, welches bis heute nicht uniform gelöst ist. Außerdem ist die Erforschung des Einflusses von CD8 mit Hilfe dieser Methode bis jetzt nicht möglich, da eine Aufreinigung des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers noch nie gelang.

Eine vor kurzem in unserem Labor entwickelte Technik eröffnet neue Möglichkeiten zur Bestimmung von struktureller Avidität auf Einzelzellebene (siehe Material und Methoden). Der große Vorteil dieser Methode ist, dass sie den physiologischen Bedingungen sehr nahe kommt. Letztendlich wird die Dissoziation von einzelnen Peptid-MHC-Komplexen gemessen, die lebende T-Zellen über T-Zellrezeptoren binden. Damit sind einige der oben erörterten Probleme möglicherweise technisch gelöst worden.

4.1.3.3 Strukturelle Avidität und Immunodominanz

Die Expansion von T-Zell-Populationen *in vivo* zeichnet sich im Vergleich zur Ausgangspopulation durch eine geringere TCR-Diversität und eine erhöhte Sensitivität für Antigene in zytotoxischen T-Zell-Untersuchungen aus (Busch and Pamer, 1999). Weiter wurde gezeigt, dass LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zelllinien aus dem Sekundärrepertoire eine bessere Anfärbbarkeit im Titrationsexperiment mit Tetrameren besitzen als LLO₉₁₋₉₉ spezifische T-Zelllinien aus dem Primärrepertoire (Busch and Pamer, 1999). Zwar ist die Verwendung von konventionellen Tetramerversuchen zur Bestimmung der strukturellen Avidität umstritten (siehe hierzu 4.1.3.2), zusammengenommen deuten diese Daten jedoch darauf hin, dass es zu einer selektiven Expansion von strukturell hochaviden T-Zellen kommt.

Unter anderem aufgrund dieser Beobachtung ist die Frage aufgekommen, ob dieser Mechanismus nicht auch bedeutsam für die Immunodominanz sein könnte. Sollten immunodominante T-Zell-Populationen eine durchschnittlich höhere strukturelle Avidität als die subdominanten Populationen zeigen, würde dies für eine Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immunodominanz sprechen.

4.2 Das Infektionsmodell der murinen Listeriose

Listeria monocytogenes (*L.m.*) ist ein grampositives, fakultativ intrazelluläres Bakterium. Das *L.m.*-Genom besteht aus 2853 Genen, die für ein Protein kodieren (Glaser et al. 2001). Bemerkenswerterweise ist bei einer mit *L.m.* infizierten BALB/c Maus der Großteil der CD8⁺ T-Zell-Antworten gegen nur wenige Epitope gerichtet. Man bezeichnet das Peptid LLO₉₁₋₉₉ als immunodominant, da es von der quantitativ größten T-Zell-Population erkannt wird. Die T-Zell-Populationen, die die Peptide p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ erkennen, sind deutlich kleiner, weshalb diese Peptide als subdominant bezeichnet werden (Busch et al., 1998; Geginat et al., 2001; Vijn and Pamer, 1997).

Das Protein p60 ist eine Peptidoglykan-Hydrolase (Sijts et al., 1997). Nach phagozytärer Aufnahme ermöglicht das porenbildende Protein Listeriolysin O (LLO) dem Bakterium, sich dem phagolysosomalen Kompartiment zu entziehen und so das Zytoplasma zu erreichen (Bielecki et al., 1990; Gaillard et al., 1987). Durch fingerförmiges Vorschieben kann *L.m.* benachbarte Zellen infizieren. Es entsteht eine doppelte Membran, zu deren Aufbrechung wiederum Listeriolysin von Bedeutung ist (Gedde et al., 2000). Das Bakterium kann sich somit, ohne das extrazelluläre Kompartiment zu benutzen, vermehren, sowie weitere Zellen befallen.

Bei einer *L.m.* Infektion ist das angeborene Immunsystem, vornehmlich vermittelt durch NK Zellen und neutrophile Granulozyten, essentiell für das Überleben (North et al., 1997). T-Zellen sind zur endgültigen Beseitigung des Bakteriums unabdingbar (Unanue, 1997).

Die Arbeit mit *L.m.* ist bei Personen ohne Risikofaktor relativ ungefährlich und eine Infektion verläuft meist asymptomatisch. Jedoch sind bei Risikogruppen wie immundefizienten Personen, Neugeborenen und Schwangeren, schwere Verläufe mit lebensbedrohlichen Komplikationen zu befürchten (Gellin and Broome 1989; Southwick and Purich 1996; Pamer 2004).

4.3 Ziel dieser Doktorarbeit

Die Immunodominanz ist ein elementares und gleichzeitig faszinierendes Prinzip in unserem Immunsystem. Bis heute ist nicht abschließend geklärt, welche Faktoren maßgeblich zu diesem Phänomen beitragen. Die Einleitung dieser Arbeit hat einige dieser möglichen Einflussfaktoren vorgestellt. Theoretisch kann jeder Schritt, von der Antigenprozessierung/-Präsentation bis zu den T-Zell-abhängigen Faktoren, zur Immunodominanz beitragen. Die Bindungsstärke des T-Zell-Rezeptors stellt einen besonders interessanten und vielversprechenden – jedoch bisher experimentell kaum zugänglichen – T-Zell-abhängigen Faktor dar. Vor kurzem haben wir in unserem Labor eine neue Methode entwickelt, um die Dissoziationsgeschwindigkeit des gebundenen Peptid-MHC-Komplexes vom T-Zell-Rezeptor auf Einzelzellebene zu messen. Die Geschwindigkeit dieser Dissoziation ist eine bedeutende Größe für die strukturelle Avidität. Damit ist es uns erstmals möglich, der interessanten Frage nachzugehen, ob es einen Zusammenhang zwischen struktureller Avidität und Immunodominanz gibt.

Hierzu sollen unter anderem folgende Fragen adressiert werden:

1. Unterscheiden sich die strukturellen Aviditäten der T-Zell-Populationen, die das immundominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ erkennen, im primären- zum sekundären Effektorrepertoire?
2. Wie verhält sich die strukturelle zur funktionellen Avidität?
3. Besteht eine Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immunodominanz?

5 Material und Methoden

5.1 Materialien

5.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Die Reagenzien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammen von folgenden Unternehmen:

Reagenz	Vertrieb
Alexa-488-maleimide	Molecular Probes, Leiden, Niederlande
Ammoniumchloride (NH ₄ Cl)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Rinder Serum Albumin (BSA)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
d-Biotin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylformamid (DMF)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Ethanol	Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland
Ethidium Monazid Bromid (EMA)	Molecular Probes, Leiden, Niederland
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Gentamycin	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
RPMI 1640	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
L-Glutamin	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Streptomycin	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Streptactin-PE (ST-PE)	IBA, Göttingen, Deutschland
Trypan blau Lösung	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Propidiumjodid	Molecular Probes, Invitrogen, UK

Aqua-fluorescent reactive dye (L34957) Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
 Beads Schaf anti-Ratte IgG bei
 Kaufdatum Dynal heute Invitrogen, Karlsruhe,
 Deutschland

5.1.2 Puffer und Medien

Alle Puffer wurden mit einem Stericup 0,22µm Vakuum Filtersystem (Millipore, Bedford, USA) kurz vor der Benutzung gefiltert. Der entsprechende pH-Wert wurde durch Zugabe von NaOH oder HCL eingestellt.

Puffer/Medium	Zusammensetzung	
FACS Puffer	1x	PBS
	0.5% (w/v)	BSA
	pH 7,45	
RP10 ⁺ Medium	1x	RPMI 1640
	10% (w/v)	FCS
	0.025% (w/v)	L-Glutamine
	0.1% (w/v)	HEPES
	0.001% (w/v)	Gentamycin
	0.002% (w/v)	Streptomycin
	0.002% (w/v)	Penicillin
NH ₄ CL-Tris	0.17 M NH ₄ Cl	
	0.3 M Tris	
	pH 7.5	
d-Biotin 100 M Bestandslösung	2443,1 g	d-Biotin

ad 100 ml H₂O, um das d-Biotin in Lösung zu bringen wurde der pH-Wert auf pH \approx 11 erhöht und dann wieder auf pH = 7 abgesenkt.

5.1.3 Peptide

Alle Peptide wurden erworben bei Biosyntan GmbH, Berlin, Deutschland.

LLO₉₁₋₉₉: GYKDGNEYI

P60₂₁₇₋₂₂₅: KYGVSVQDI

P60₄₇₆₋₄₈₄: YLVGFGRV

5.1.4 Antikörper

Antikörper	Klon	Vertrieb
CD3 APC	145-2C11	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD8 α FITC	CT-CD8 α	Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland
CD8 α PE	CT-CD8 α	Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland
CD8 α APC	CT-CD8 α	Caltag Laboratories, Hamburg, Deutschland
CD4	GK1.5	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
CD19	1D3	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland

5.1.5 MHC-Streptamere

Die folgenden Streptamere wurden routinemäßig im Labor nach etablierten Protokollen hergestellt.

H2-K^d StreptagIII/m β ₂m LLO₉₁₋₉₉ Streptaktin-PE

H2-K^d StreptagIII/m β ₂m-cys67 Alexa-488/LLO₉₁₋₉₉ Streptaktin-PE

H2-K^d StreptagIII/m β ₂m-cys67 Alexa-488/p60₂₁₇₋₂₂₅ Streptaktin-PE

H2-K^d StreptagIII/m β_2 m-cys67 Alexa-488/p60₄₇₆₋₄₈₄ Streptaktin-PE

5.1.6 Mäuse

Es wurden 6-8 Wochen alte BALB/c-Mäuse von Harlan-Winkelmann (Borchen, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in dem Tierstall des Instituts für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, unter Beachtung der geltenden Tierschutzbestimmungen für die Versuchstierhaltung gehalten.

5.1.7 Mikroskop und Ausstattung für die TCR Aviditätsmessung

Zeiss LSM 510	Konfokales Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)
Leica SP5	Konfokales Mikroskop (Leica, Bensheim, Deutschland)
Zeiss temperierbarer Einsatz	Kühlungseinheit (Zeiss, Jena, Deutschland)
Huber Minikühler	(Huber Kältemaschinenbau, Offenburg, Deutschland)
Metaleinsatz für Kühlungseinheit	(Schlosserei, Klinikum rechts der Isar, München, Deutschland)
Polycarbonat Membranen Porengröße 5 μ m	(Millipore, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
	Beilagscheibe Membranfixierung (Schneider + Klein, Landscheid, Deutschland)
	Eucerin Creme pH 5 Verschlusspaste (Apotheke Klinikum Rechts der Isar, München, Deutschland)

5.1.8 Ausstattung

Zeiss LSM 510, Konfokalmikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Leica SP 5, Konfokalmikroskop	Leica, Bensheim, Deutschland
FACS Calibur Durchflusszytometrie	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
FACSAria Zytometer	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
MoFlo II	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

Multifuge 3S-R Zentrifuge	Thermo, Schwerte, Deutschland
Biofuge fresco table top Zentrifuge	Thermo, Schwerte, Deutschland
Biofuge 15 table top Zentrifuge	Thermo, Schwerte, Deutschland

Axiovert S100 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
MS2 Minishaker	IKA, Staufen, Deutschland
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

5.1.9 Software

FlowJo	Treestar, Ashland, USA
Microsoft Office	Microsoft, Redmond, USA
MetaMorph Offline	Molecular Devices, Downingtown, USA
Analyzer 2.2	Jörg Mages, Institut für Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München, München, Deutschland
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, La Jolla, USA

5.2 Methoden

Falls nicht anders angegeben, wurde stets auf eine ausreichende Kühlung der Milzzellen (4°C) geachtet. Alle Färbungen erfolgten auf Eis. Die Zentrifuge war auf 4°C gekühlt.

5.2.1 Infektion von Mäusen mit *Listeria monocytogenes*

Für Experimente mit Wildtyp-Listerien wurde das hochvirulente Isolat *L.m.* 10403s (ATTC, Rockville, MD) verwendet. Zunächst wurden 10 µl dieser bei -80°C gelagerten Baktieriensuspension in ein 10 ml BHI-Medium gegeben und dann bei 37°C in einem Schüttelinkubator kultiviert, bis ein OD₆₀₀ von 0,05 - 0,1 nach etwa 4 Stunden erreicht war.

Zur Dosiskontrolle wurden Proben des Ansatzes auf BHI-Platten ausplattiert, bei 37°C inkubiert und nach 24 h ausgezählt.

Die Primärinfektionen der BALB/c-Mäuse erfolgte mit der Injektion einer subletalen Dosis von 2×10^3 *L.m.* 10403s (in 200 µl PBS, entspricht ca. 0.1 x LD₅₀) in eine der Schwanzvenen. Die Reimmunisierungen wurden i.d.R. 5 Wochen nach Primärinfektion unter Gabe von 1×10^5 *L.m.* 10403s (ca. 5 x LD₅₀) i.v. durchgeführt.

5.2.2 Organentnahme und Milzpräparation

Den infizierten Mäusen wurde sieben Tage nach Primärinfektion bzw. fünf Tage nach Reimmunisierung die Milz mit sterilem Präparationsbesteck entnommen und 2 mal in 5 ml RP10⁺ gewaschen. Danach wurden die Zellen über ein Zellsieb (100µm) homogenisiert und die Erythrozyten über 5 ml NH₄CL-Tris für 7 min bei Raumtemperatur lysiert. Zum Stoppen der Reaktion wurden weitere 5 ml RP10⁺ zugegeben. Weiterhin erfolgte die Pelletierung (1500 rpm, 7 min) und die Resuspendierung der Milzzellen in 10 ml FACS. Anschließend wurden die Zellen über eine Neubauerkammer ausgezählt.

5.2.3 Negative Anreicherung mit Anti-CD4 und Anti-CD19 beladenen Beads

Die Mengenangaben der folgenden Beschreibung beziehen sich auf 10⁸ Milzzellen und wurden je nach Zellzahl angepasst.

Zur Vorbereitung der Beads mit den gebunden Antikörpern wurden 800 µl Sheep-anti-rat Dynal Beads steril aus dem zuvor gut geschüttelten Aufbewahrungsgefäß entnommen und in ein 10ml bzw. 50 ml Röhrchen gegeben. Zum Waschen wurde das Röhrchen an einen Magneten gehalten und nach 2 Minuten der Überstand abgesaugt, um die Beads erneut in 1 ml PBS zu resuspendieren. Nach dem zweimaligen Waschen wurden neben 10 ml PBS zum Resuspendieren je 50µl des purifizierten Anti-CD4 und Anti-CD19 „Ratten gegen Maus“-Antikörpers dazugegeben und die Lösung bei 4°C für 30 Minuten rotiert.

Nach dem erneuten Waschen wurden die Zellen dazu gegeben und erneut bei 4°C 30 Minuten lang rotiert. Mit Hilfe des Magneten konnten nun die angereicherten Zellen abgenommen werden, während Zellen mit CD4- oder CD19-Molekülen, welche an Beads gebunden hatten, zurückgehalten wurden.

5.2.4 T-Zell-Färbung

Pro Streptamerfärbung wurden 5×10^6 Zellen in je 50 μ l gefärbt. Die Färbung erfolgte je nach Menge in 96-well-Platten oder 10ml Röhrchen, auf Eis und im Dunkeln für 45 Minuten. Nach 20 min erfolgte die Zugabe der entsprechenden Antikörper. Anschließend wurden die Zellen 2,5 mal in FACS gewaschen.

Nach Zellsortierungen mit konventionellen Streptameren (ohne Alexa488) wurden diese abgelöst, indem die Zellen in 1mM d-Biotin FCS gesammelt und danach für 15 min bei 4° C in 1mM d-Biotin FACS inkubiert wurden. Um sicher zu stellen, dass keine relevanten Mengen an d-Biotin mehr vorhanden sind, die die darauf folgenden Streptamerfärbung stören könnten, wurden die Zellen 4 mal in 5 ml FACS gewaschen.

Die Lebend/Tod-Färbung erfolgte entweder mit Propidiumjodid direkt vor der Zellsortierung oder mit dem Aqua fluorescent reactive dye vor der Streptamerfärbung nach dem Protokoll des Herstellers.

5.2.5 Zellsortierung

Je nach Verfügbarkeit wurde das FACSAria Zytometer oder das MoFlo II verwendet. Sortiert wurden die Streptamer-PE-positiven, CD8-APC-positiven, Lebend/Tod-Farbstoff-negativen und je nach verwendetem Streptamer Alexa-488-positiven Zellen in FCS. Bei der Verwendung von nicht mit Alexa488 konjugierten Streptameren wurde d-Biotin dem FCS in einer Konzentration von 1mM zugesetzt.

Für die Kompensationseinstellungen des Gerätes wurden jeweils, 2×10^6 Zellen nicht bzw. mit nur einem der verwendeten Farbstoffe gefärbt. Die Kompensation der PE-Fluoreszenz des Streptamers erfolgte mit CD8 α -PE, die von Alexa-488 mit CD8 α -FITC.

5.2.6 Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Peptid-MHC-Komplexes vom T-Zell-Rezeptor

5.2.6.1 Praktische Umsetzung

Sämtliche Messungen der Dissoziationsgeschwindigkeit wurden mit einem konfokalen Laserscanningmikroskop (Zeiss LSM 500 oder Leica SP5) durchgeführt. Das Mikroskop war mit einer Zeiss-Kühlungseinheit und einem Kühler (Minichiller, Huber Kältemaschinenbau) ausgestattet. Um eine optimale Kühlung der Zellen während der Messung zu gewährleisten, haben wir für die Kühlungseinheit passende Stahleinsätze anfertigen lassen, die die laterale Begrenzung des Reservoirs, in dem sich die Zellen befinden, darstellen. Ein rundes Gläschen (Dicke 0,1mm) wurde an der Unterseite der Stahleinsätze mit einer Abdichtungspaste angebracht. Die auf 4°C gekühlten, mit Streptamer gefärbten Zellen wurden in einem Volumen von 1-5µl auf das Gläschen pipettiert. Damit die Zellen während der Messung ihre Position nicht ändern, wurde eine Polycarbonatmembran (Porengröße 5µm; Millipore) auf die Zellen gegeben, deren Position mit einem kleinen Metallring fixiert wurde. Um die Kühlungskette nicht zu unterbrechen, haben wir anschließend sofort 1600µl eiskalten FACS-Puffer in das Reservoir hinzugegeben. Nach dem ersten Foto der Aufnahmesequenz wurden 1600µl eiskaltes 2mM d-Biotin vorsichtig hinzugeben, wodurch es zur Dissoziation des Streptamerrückrats kam und somit die MHC-I-Dissoziation eingeleitet wurde. Eine Aufnahmesequenz besteht aus 160 Bildern wobei der Abstand zwischen zwei Bildern 10,0156 Sekunden beträgt.

5.2.6.2 Datenanalyse

Die Aufnahmen des Mikroskops wurden mit „MetaMorph Offline image analysis software“ (Molecular Devices, Downingtown, USA) ausgewertet. Um jede Zelle wurde ein möglichst kleiner Bereich definiert, in dem sich die Zelle während der gesamten Aufnahmesequenz befand, und die Fluoreszenzintensität dieses Bereiches für jedes Bild bestimmt. Als nächstes wurde ein Bereich mit identischer Fläche in unmittelbarer Nachbarschaft zur Zelle - jedoch ohne diese zu enthalten - definiert, um die Fluoreszenzintensität des Hintergrundes für jedes Bild zu bestimmen. Die Daten wurden in einer Microsoft Excel Datei (Microsoft, Remdon, USA) gespeichert. Die weitere Datenanalyse erfolgte automatisch mit dem Analyzer 2.2 (Jörg Mages, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen

Universität München) nach dem Algorithmus, der im folgenden beschrieben wird. Die Hintergrundintensität wurde von der absoluten Fluoreszenzintensität abgezogen. Um das „Ausbleichen“ der Farbstoffe, auch „bleaching“ genannt, zu berücksichtigen, wurde für das x -te Bild der x -fache Anteil einer zuvor ermittelten Bleachingkonstante abgezogen. Die Bleachingkonstante für PE beträgt $-71,38$ und die für Alexa-488 $-7,87$ (Knall, 2007). Mit Hilfe der Datenpunkte $(t;y)$ wurden mit der Methode der kleinsten Quadrate die Gleichung $y = f_1(t) = a e^{-k_{\text{off}} t} + y_0 + c * t$ ermittelt, wobei a , k_{off} , c , y_0 Konstanten aus der Menge der reellen Zahlen sind. Das Minimum dieser Funktion wurde als Endpunkt B der MHC-Dissoziation definiert, da ab diesem Punkt die Korrektur des Bleachingeffektes zu einem Anstieg der Fluoreszenzintensität führt. Der Startpunkt A der MHC-Dissoziation wurde definiert als der erste Datenpunkt mit einer Intensität kleiner gleich 80% der maximal gemessenen Fluoreszenzintensität. Anhand der Datenpunkte (t,y) zwischen dem Startpunkt A und Endpunkt B wurde mit der Methode der kleinsten Quadrate die Gleichung $y = f_2(t) = a e^{-k_{\text{off}} t} + y_0$ approximiert, wobei a , k_{off} , y_0 Konstanten aus der Menge der reellen Zahlen sind. Mit Hilfe der Dissoziationskonstante k_{off} kann man die Halbwertszeit $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$ bestimmen. Die kompletten Datensets sowie die ermittelten Funktionen werden graphisch in einer PDF-Datei (Adobe Systems Incorporated, San Jose, USA) ausgegeben. Die errechneten Dissoziationskonstanten k_{off} und die entsprechenden Halbwertszeiten werden in einer Microsoft Excel-Datei (Microsoft, Redmond, USA) gespeichert.

6 Ergebnisse

6.1 Eine neue Methode zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Peptid-MHC-Komplexes vom gebundenen T-Zell-Rezeptor

6.1.1 Prinzip

Die TCR-MHC-Interaktion zeigt geringe Bindungsaffinitäten mit einer leicht verzögerten Assoziation und raschen Dissoziation, so dass eine stabile Bindung von monomeren MHC-Molekülen an T-Zellen unmöglich wird (Matsui et al., 1994). Eine stabile Bindung von TCR-MHC-Komplexen konnte jedoch mit der Entwicklung der Tetramere - einem Multimer aus mehreren MHC-Molekülen - erreicht werden (Altman et al., 1996). Eine Weiterentwicklung aus unserem Labor sind die Streptamere, die den entscheidenden Vorteil mit sich bringen, dass sie durch Zugabe von d-Biotin von den Zellen gelöst werden können (Knabel et al., 2002). Streptamere sind Multimere, bestehend aus mehreren Peptid-MHC-Komplexen, die über StreptagIII an Streptactin-PE gebunden sind (Abbildung 5 B). Für die Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} wurden die MHC-Komplexe im Vergleich zu den konventionellen Streptameren mit Alexa-488 markiert (Abbildung 5 A). Hierzu wurde die Aminosäure an Position 67 des murinen $\beta 2$ -Mikroglobulins zu einem Zystein mutiert. Dieses Zystein liegt auf der Oberfläche des $m\beta 2m$ und dient der Konjugation des Farbstoffes Alexa-488 mit einer kovalenten Thioetherbindung. Hierzu wird die SH-Gruppe zunächst reduziert. In der eigentlichen Kopplungsreaktion reagieren Malemeide des Farbstoffes mit den reduzierten Thiolen unter Bildung stabiler Thioetherbindungen. Um eine Hydrolyse der Malemeide zu vermeiden und die Thiole in reduziertem Zustand zu stabilisieren, findet die Reaktion bei pH 7,5 statt. Theoretisch ist es denkbar, dass Alexa488 auch an andere Zysteine als das an Position 67 bindet. Um dies auszuschließen, haben wir die Kopplungsreaktion mit unmutiertem murinem $\beta 2$ -Mikroglobulin durchgeführt und gezeigt, dass es zu keiner Bindung von Alexa488 kommt (Daten nicht gezeigt).

Streptamere binden spezifisch an T-Zellen. Da Streptactin eine sehr viel höhere Affinität zu d-Biotin hat als StreptagIII, kommt es bei der Zugabe von d-Biotin zu einem Zerfall des Streptamers und zu einer raschen Dissoziation des Streptactin-PE-Rückgrates (Abbildung 5 C). Zurück bleibt eine T-Zelle, die monomere Peptid-MHC-I-Komplexe auf ihren TCR gebunden hat. Es kommt zur Dissoziation von MHC-Molekülen, deren Geschwindigkeit von

der Bindungsaffinität des TCR-Peptid-MHC-Komplexes abhängt (Abbildung 5 D). Diese Dissoziation kann anhand der abnehmenden Alexa-488-Färbung gemessen und daraus die Dissoziationskonstante k_{off} sowie die Halbwertszeit der MHC-Dissoziation bestimmt werden. Es ist anzunehmen, dass die Assoziationskonstante K_{on} in diesem Fall vernachlässigbar klein ist, da nichtgebundene MHC-Komplexe durch vorheriges Waschen entfernt wurden und abfallende MHC-Komplexe sich folglich nach dem Prinzip der Diffusion im kompletten Medium verteilen. Diese Behauptung wird unterstützt durch den exponentiellen Abfall der MHC-Komplexe (siehe 6.1.2, Abbildung 8).

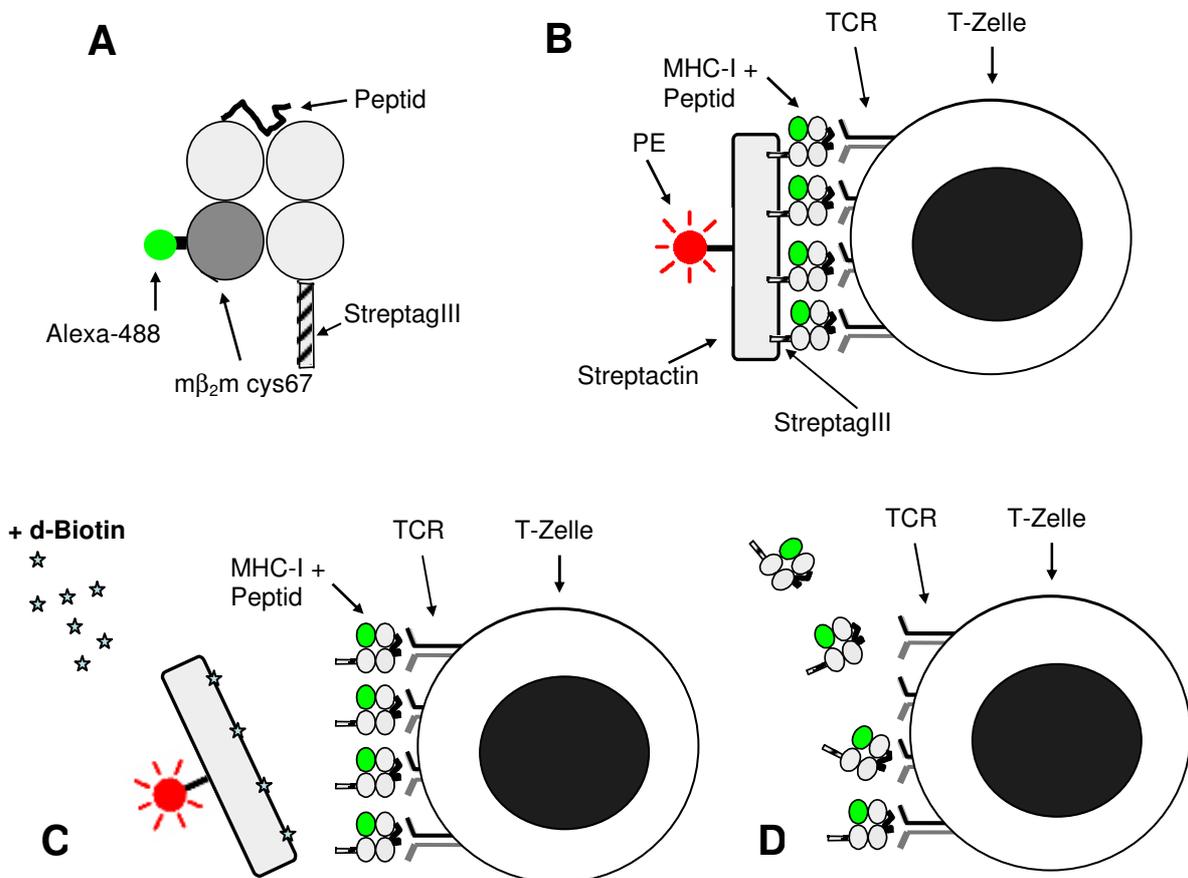


Abbildung 5. Prinzip der neuen, auf Streptamer basierenden Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} bzw. Dissoziationshalbwertszeit $T_{1/2}$. (A) Ein modifiziertes MHC-I-Molekül mit dem Farbstoff Alexa-488, gekoppelt an Zystein (Position 67) des murinen β_2 -Mikroglobulins. Der C-Terminus der schweren Kette besteht aus einer speziellen Sequenz (StreptagIII) und dient der Bindung an Streptactin. (B) Streptamere binden über den TCR an T-Zellen. (C) Zugabe von d-Biotin führt zur raschen Dissoziation von Streptactin-PE. (D) Monomere Peptid-MHC-I-Komplexe dissoziieren von der T-

Zelloberfläche.

6.1.2 Entwicklung eines Algorithmus zur Datenanalyse

Zunächst wurden die Fluoreszenzintensitäten jeder Zelle sowie deren Hintergrundintensität mit der Software MetaMorph Offline (Molecular Devices, Downingtown, USA), wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt (Abbildung 6).

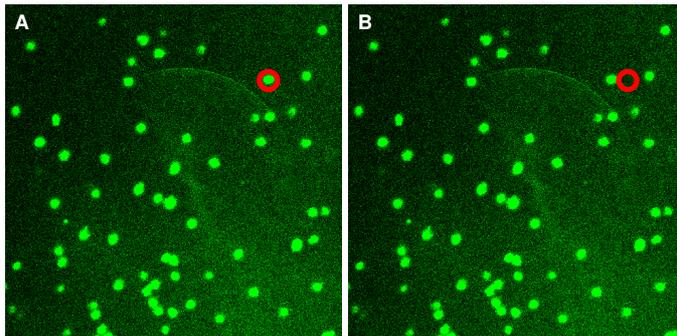


Abbildung 6. Bestimmung der Fluoreszenzintensität einer individuellen Zelle. Ein Bereich, der eine Zelle enthält (A) wird von einem unmittelbar benachbarten, gleich großen Bereich abgezogen (B) und dadurch die um das Hintergrundrauschen korrigierte Fluoreszenzintensität ermittelt.

Die Software Analyzer 2.2 (Jörg Mages, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der Technischen Universität München) implementiert einen Algorithmus, um aus gemessenen Fluoreszenzintensitäten die Dissoziationskonstanten sowie die Halbwertszeiten der MHC-Dissoziation zu berechnen. Um Fehler durch Hintergrundrauschen zu minimieren, wird zunächst von jeder gemessenen Zellintensität eine unmittelbar in der Nachbarschaft liegende, identische Fläche, die der Hintergrundintensität entspricht, subtrahiert. Aus den so ermittelten Datenpunkten wird das Ausbleichen der Fluoreszenzstoffe, auch Bleaching genannt, herausgerechnet (Knall, 2007). Aus den resultierenden Datenpunkten (Abbildung 8 A) wird nun ein Intervall [a,b] ausgewählt, um die Dissoziationskonstante zu berechnen. Es hat sich bewährt, den Startpunkt a als den ersten Punkt zu definieren, der kleiner/gleich 80% der maximal gemessenen Fluoreszenzintensität ist. Damit wird dem gelegentlichen Auftreten von experimentellen Artefakten am Anfang der Aufnahmesequenz Rechnung getragen (Abbildung 7 A). Dies ist unter anderem deswegen zulässig, da die berechneten Dissoziationskonstanten für variierte Startpunkte a zwischen 100%-50% der maximalen Fluoreszenzintensität relativ konstant sind, vorausgesetzt es tritt das eben genannte Artefakt nicht auf (Abbildung 7 B).

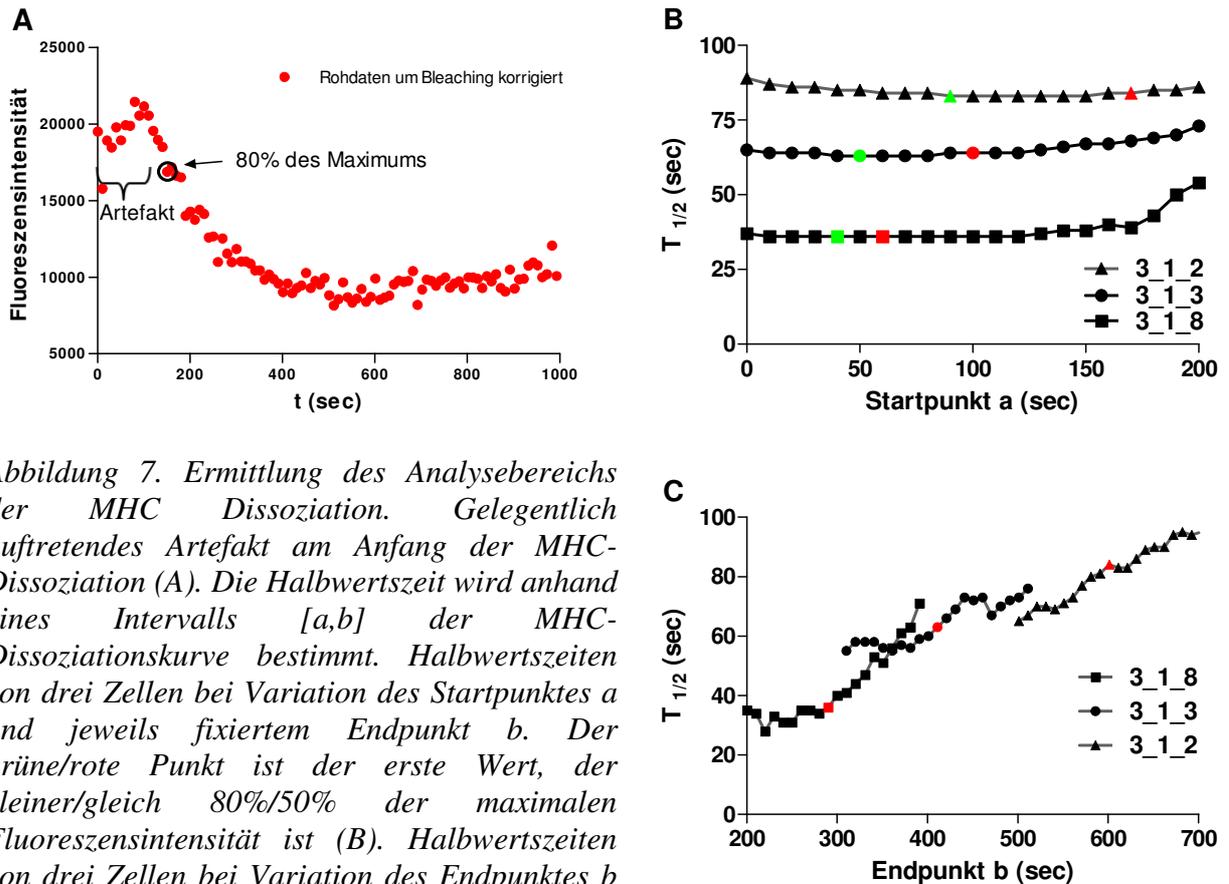


Abbildung 7. Ermittlung des Analysebereichs der MHC Dissoziation. Gelegentlich auftretendes Artefakt am Anfang der MHC-Dissoziationskurve (A). Die Halbwertszeit wird anhand eines Intervalls $[a,b]$ der MHC-Dissoziationskurve bestimmt. Halbwertszeiten von drei Zellen bei Variation des Startpunktes a und jeweils fixiertem Endpunkt b . Der grüne/rote Punkt ist der erste Wert, der kleiner/gleich 80%/50% der maximalen Fluoreszenzintensität ist (B). Halbwertszeiten von drei Zellen bei Variation des Endpunktes b und jeweils fixiertem Startpunkt a . Der rote Punkt markiert das Minimum der um Bleaching korrigierten Fluoreszenzkurve, von hier ausgehend sind jeweils ± 100 s dargestellt (C).

Da die Bleaching-Korrektur durch die Addition einer linearen Funktion erfolgt, kommt es zu einer Überkompensation, sobald die MHC-Dissoziation abgeschlossen ist, und zu einer virtuellen „Zunahme“ der Fluoreszenzintensität (Abbildung 8 B). Es liegt also nahe, das Minimum dieser Kurve als Endpunkt b zur Berechnung der Halbwertszeit zu definieren. Variationen des Endpunktes b um das Minimum der Dissoziationskurve bei fixem Startpunkt a führen zu sehr unterschiedlichen Halbwertszeiten (Abbildung 7 C). Dies unterstreicht die Wichtigkeit der exakten Bestimmung des Minimums. Hierzu wird die Funktion $f_1(t) = ae^{-k_{\text{off}} t} + y_0 + c t = y$ anhand der Datenpunkte (t,y) approximiert und das Minimum, der Endpunkt b , mathematisch bestimmt. Anhand der Datenpunkte (t,y) zwischen dem Startpunkt a und dem Endpunkt b wird die Funktion $f_2(t) = ae^{-k_{\text{off}} t} + y_0 = y$ approximiert. Mit der so ermittelten Dissoziationskonstante k_{off} kann die Halbwertszeit $T_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$ der MHC-Dissoziation bestimmt werden. Die Halbwertszeit $T_{1/2}$ ist somit von ihrem Informationsgehalt der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} gleichzusetzten, veranschaulicht jedoch das Ergebnis besser,

weswegen wir uns in den folgenden Darstellungen vor allem auf diese beziehen wollen. Eine hohe Halbwertszeit $T_{1/2}$ geht folglich mit einer niedrigen Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} – und umgekehrt – einher.

Die Definition dieses Algorithmus und seine Implementierung ermöglicht eine schnelle und zuverlässige automatische Auswertung der Daten.

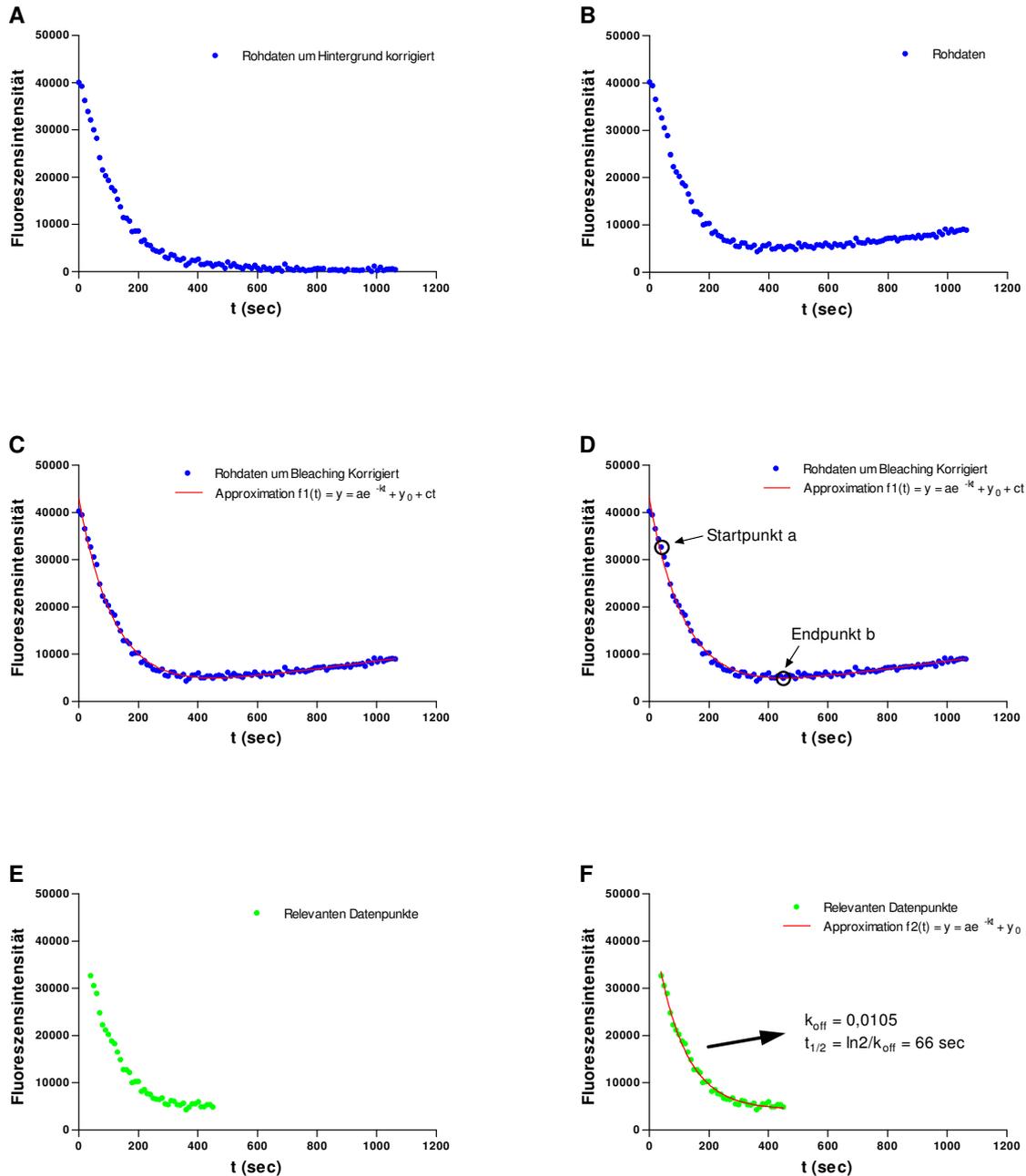


Abbildung 8. Datenanalyse der MHC-Dissoziation. Fluoreszenzintensität abzüglich des Hintergrundrauschens (A). Der Bleachingeffekt wird herausgerechnet (B) und die Gleichung $f_1(t) = ae^{-k_{\text{off}} t} + y_0 + ct$ approximiert (C). Das Minimum der resultierenden Funktion wird als

Endpunkt b , der erste Wert kleiner/gleich 80% der Maximalfluoreszenzintensität als Startpunkt a definiert (D). Die Datenpunkte im Intervall $[a,b]$ werden ausgewählt (E) und die Gleichung $f_2(t) = a e^{-k_{\text{off}} * t} + y_0$ approximiert und anhand dieser die Halbwertszeit der Dissoziation $t_{1/2} = \ln(2)/k_{\text{off}}$ bestimmt.

6.1.3 Minimierung der notwendigen Ausgangszellzahl

Mit der ursprünglichen Methode wäre die Ausbeute der auswertbaren Zellen bei den zu erwartenden Zellzahlen dieser Doktorarbeit zu gering gewesen. Bei den ersten Aviditätsmessungen haben wir die Zellen auf den Boden des mit 1600 μ l FACS gefüllten Reservoirs pipettiert und darauffolgend die Membran mit dem Metallring zum Fixieren der Zellen über dieser Stelle versenkt (vgl. Abbildung 9). Bei dieser Methode war nur ein geringer Teil der Zellen unter der Membran wiederzufinden. Aus diesem Grund sind wir dazu übergegangen, zuerst die Zellen und die Membran mit Fixationsring auf die Glasplatte aufzubringen (Abbildung 9 D,E) und dann den FACS-Puffer in das Reservoir zu geben (Abbildung 9 F). Es hat sich als ideale Lösung erwiesen, die Zellen in einem Volumen von 1-5 μ l entsprechend hoch konzentriert auf den Glasboden des Reservoirs zu pipettieren. Hierzu haben wir beim Waschen V-Platten benutzt, um nach dem Zentrifugieren das Volumen mit der Pipette auf etwa 5-20 μ l zu verkleinern. Dabei wurde mit äußerster Sorgfalt überschüssiger Puffer abpipettiert und dabei besonders darauf Acht gegeben, das Pellet nicht zu resuspendieren. So konnte bei einer Ausgangszellzahl von 10^3 Zellen nach einem Waschschrift in 80% der Fälle ein gut zu analysierender Bereich (~ 10 Zellen) gefunden werden.

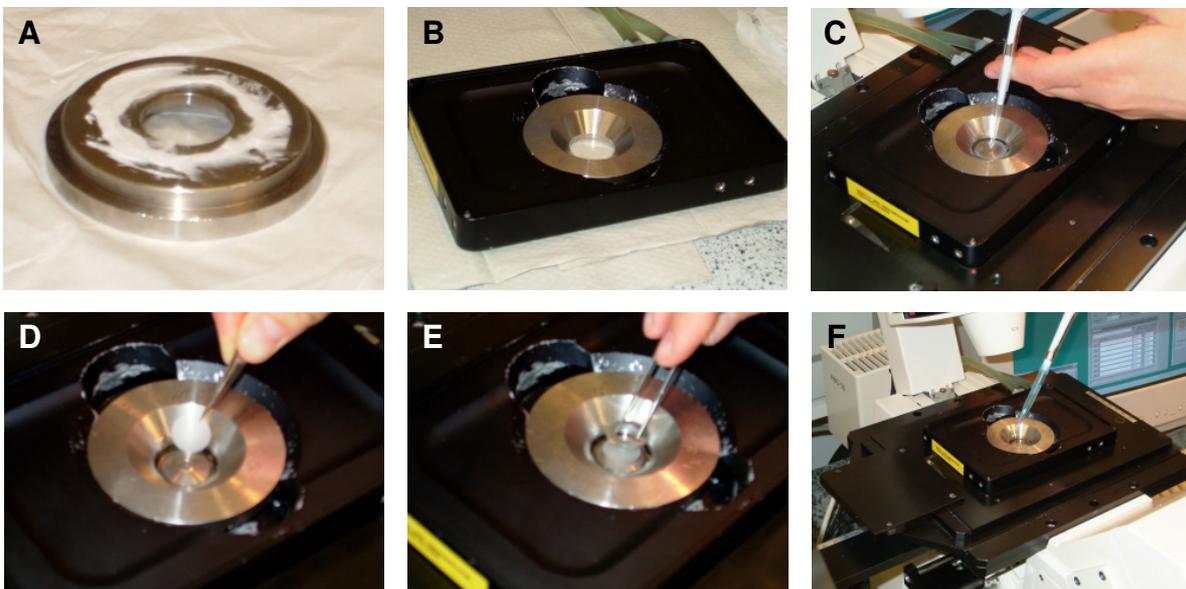


Abbildung 9. Vorbereitung zur Messung der Dissoziationsgeschwindigkeit. Ein Gläschen wird an der Unterseite einer Metallscheibe mit einer Abdeckpaste fixiert (A) und in eine Kühlungseinheit eingelegt (B). Die Kühlungseinheit wird am Mikroskop befestigt und die Zellen auf das Gläschen pipettiert (C). Damit sich die Zellen möglichst wenig bewegen, wird eine Membran auf die Zellen gelegt (D) und diese mit einem Metallring fixiert (E). Anschließend werden 1600µl eiskalter Puffer in das Reservoir hinzu gegeben (F).

6.1.4 Reproduzierbare Ergebnisse durch verschiedene Wissenschaftler

Es ist wichtig, dass unsere neue Methode Ergebnisse unabhängig vom Experimentator liefert. Aus diesem Grund haben zwei Wissenschaftler aus unserer Gruppe die gleiche LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zellkultur untersucht. Dabei ergaben sich vergleichbare Werte für die Halbwertszeit der MHC-Dissoziation (Abbildung 10). Beim Wissenschaftler A lag der Median bei 108 s, beim Wissenschaftler B bei 93 s. Die Daten sind in einem Intervall von 50 s bis 170 s bei Messung A und 50 s bis 150 s bei Messung B annähernd normalverteilt. Eine Zelle in Messreihe B zeigt eine Halbwertszeit der MHC-Dissoziation von nur 14 s. Der Versuch der Messreihe A wurde 5 Monate vor dem Versuch der Messreihe B durchgeführt. Da die Zellkultur einmal wöchentlich mit einer Peptidkonzentration von 10⁻⁹M stimuliert wurde, lagen somit 20 Stimulationen zwischen den Messungen.

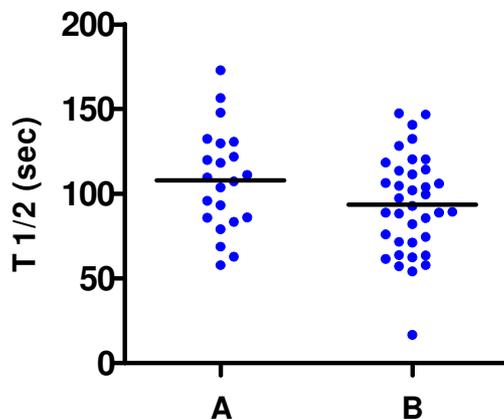


Abbildung 10.

Dissoziationshalbwertszeiten spezifischer MHC-Komplexe von Zellen einer LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellkultur gemessen von Wissenschaftler A bzw. B. Es sind 22 Zellen aus einem Versuch in Messreihe A und 37 Zellen aus zwei Versuchen in Messreihe B mit dem entsprechenden Mittelwert dargestellt.

6.2 LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zellen zeigen im sekundären Effektorrepertoire höhere Dissoziationshalbwertszeiten $T_{1/2}$ als im primären Effektorrepertoire

Wir haben die Beziehung der Dissoziationsgeschwindigkeiten des spezifischen Peptid-MHC-Komplexes von dem TCR der LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen des primären zum sekundären Effektorrepertoires untersucht (Abbildung 11). Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) in der Halbwertszeit der Dissoziation mit einem Median bzw. Mittelwert von 75 s bzw. 106 s im primären Effektorrepertoire zu 197 s bzw. 188 s im sekundären Effektorrepertoire. Um die Verteilung genauer zu analysieren, haben wir die Halbwertszeiten auf eine Dekade gerundet und die Zellen mit den entsprechenden Halbwertszeiten gezählt und dargestellt (Abbildung 11 B,C). Es fällt auf, dass im primären Effektorrepertoire die Halbwertszeiten der Dissoziation größtenteils im Bereich zwischen 20-120 s liegen, während die Halbwertszeiten der Zellen des sekundären Effektorrepertoires relativ homogen auf das komplette Spektrum (20-400 s) verteilt zu sein scheinen (Abbildung 11 A,B,C). Definiert man aufgrund dieser Beobachtung nun eine Grenze bei 120s und betrachtet die Halbwertszeit von kleiner/gleich 120 s als niedrig und eine höhere Halbwertszeit als hoch, dann zeigen 23% der Zellen des primären und 66% der Zellen des sekundären Effektorrepertoires hohe Halbwertszeiten und somit geringe Dissoziationsgeschwindigkeiten k_{off} (Abbildung 11 D,E).

Diese Daten zeigen, dass bei einer erneuten Infektion mit *Listeria monocytogenes* LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zellen mit einer geringen Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} des Peptid-MHC-Komplexes einen Selektionsvorteil gegenüber LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen mit einer hohen Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} des Peptid-MHC-Komplexes besitzen. Diese Beziehung lässt sich noch genauer beschreiben. Bildet man den Quotienten aus der Anzahl der Zellen mit hohen Dissoziationshalbwertszeiten und der Anzahl der Zellen mit niedrigen Dissoziationshalbwertszeiten, zeigt sich ein fast siebenfach höheres Verhältnis im sekundären Effektorrepertoire verglichen mit dem primären Effektorrepertoire (Abbildung 11 E). Mit anderen Worten: das sekundäre Effektorrepertoire besitzt im Vergleich zum primären Effektorrepertoire einen fast siebenfach höheren Anteil an LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen mit einer hohen Dissoziationshalbwertszeit, bezogen auf LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zellen mit einer niedrigen Dissoziationshalbwertszeit.

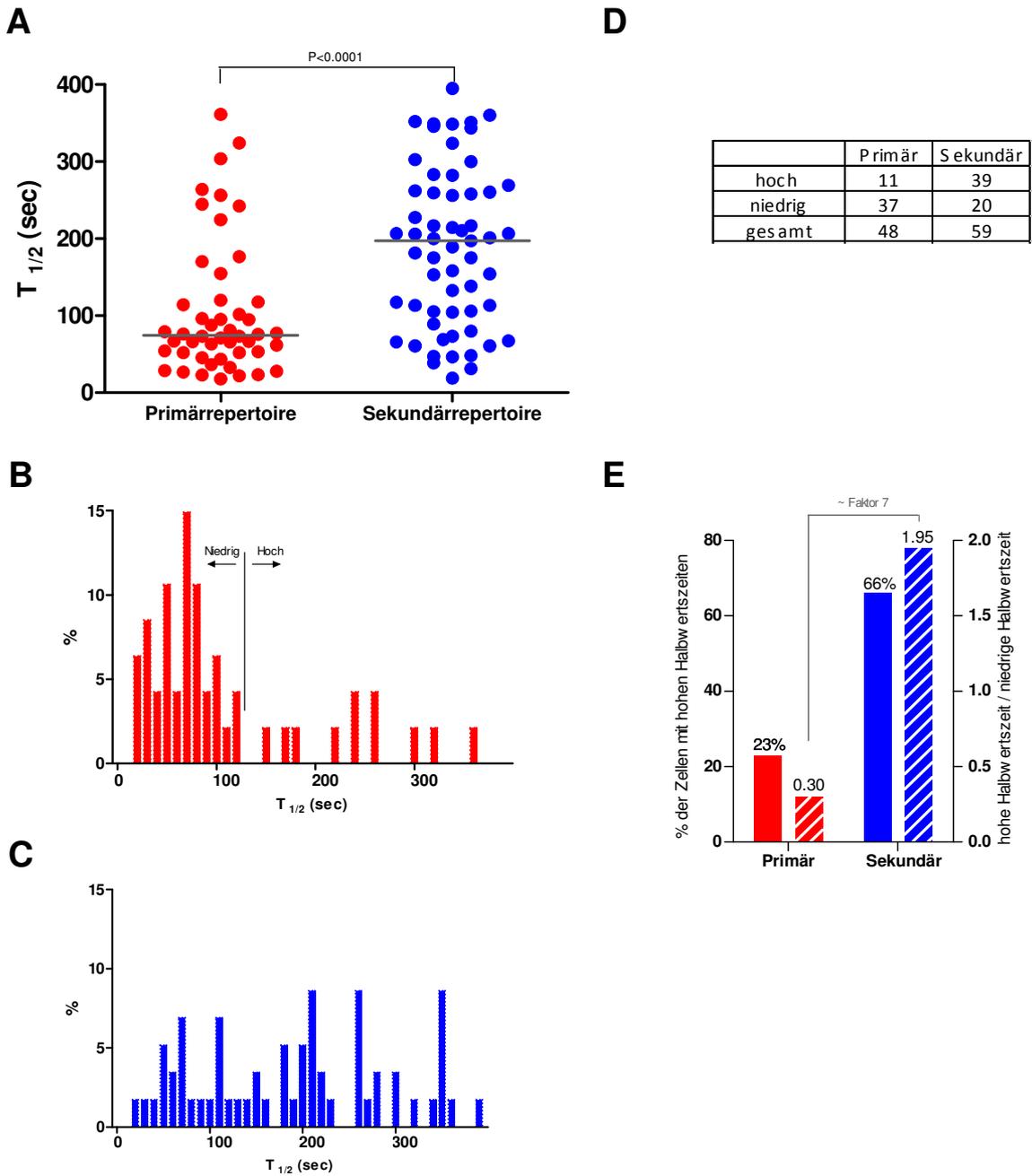


Abbildung 11. Dissoziationshalbwertszeiten des Peptid-MHC-Komplexes von den LLO_{91-99} -spezifischen T-Zellen sind im sekundären Effektorrepertoire höher als im primären Effektorrepertoire. Zellen aus der Primärantwort ($n=48$) wurden negativ angereichert mit CD4-/CD19 antigenbeladenen Beads und stammen aus zwei unabhängigen vergleichbaren Experimenten mit jeweils 6 gepoolten BALB/c Mäusen. Daten der Sekundärinfektion ($n=59$) stammen aus drei unabhängigen, vergleichbaren Experimenten mit zweimal zwei BALB/c Mäusen und einmal einer BALB/c Maus. (A) Die gemessenen Dissoziationshalbwertszeiten, der jeweilige Median, sowie die statistische Signifikanz – ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test –

sind dargestellt. Die Halbwertszeiten wurden auf eine Dekade gerundet und der prozentuale Anteil ist dargestellt für (B) Primär- und (C) Sekundärinfektion. (D) Tabelle mit der Anzahl der Zellen mit hohen Dissoziationshalbwertszeiten (> 120 s) und niedrigen Dissoziationshalbwertszeiten (≤ 120 s) im primären bzw. sekundären Effektorrepertoire. (E) Darstellung des prozentualen Anteils von Zellen mit hohen Dissoziationshalbwertszeiten, sowie des Quotienten: Zellen mit hohen Dissoziationshalbwertszeiten durch Zellen mit niedrigen Dissoziationshalbwertszeiten für Primär- bzw. Sekundärinfektion.

6.3. Funktionelle Avidität und Immundominanz

Eine Arbeit aus dem Jahre 1998 hat die Beziehung zwischen funktioneller Avidität und Immundominanz im *L.m.*-Modell anhand von LLO₉₁₋₉₉, p60₂₁₇₋₂₂₅, p60₄₄₉₋₄₅₇ und mpl₈₄₋₉₂-spezifischen T-Zellkulturen untersucht (Busch and Pamer, 1998). Es ergaben sich für alle vier Epitope ähnliche funktionelle Aviditäten unabhängig von der Immundominanz. Diese Daten wurden jedoch anhand von T-Zellkulturen erhoben und sind für *ex vivo* Zellen nur bedingt aussagekräftig. Aus diesem Grund und da noch keine Daten für p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifische T-Zellen vorlagen, haben wir uns entschlossen, die funktionellen Aviditäten immundominanter und subdominanter Epitope im *L.m.* Modell *ex vivo* anhand von intrazellulärer IFN- γ Färbung zu untersuchen. Spezifische T-Zellen zeigen hierbei für das immundominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ und das subdominante Epitop p60₂₁₇₋₂₂₅ im sekundären Effektorrepertoire ähnliche funktionelle Aviditäten, wobei sich im primären Effektorrepertoire keine genaue Aussage treffen lässt (Abbildung 12). Die p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen zeigen allerdings im primären und im sekundären Effektorrepertoire eine geringere funktionelle Avidität. Hierbei fällt weiter auf, dass die funktionelle Avidität der p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen im primären Effektorrepertoire geringer ist als im sekundären Effektorrepertoire.

Da deutliche Unterschiede in der Immundominanzhierarchie zwischen LLO₉₁₋₉₉ und p60₂₁₇₋₂₂₅ bestehen (Busch et al., 1998), sprechen diese Daten gegen eine Korrelation von Immundominanz und funktioneller Avidität.

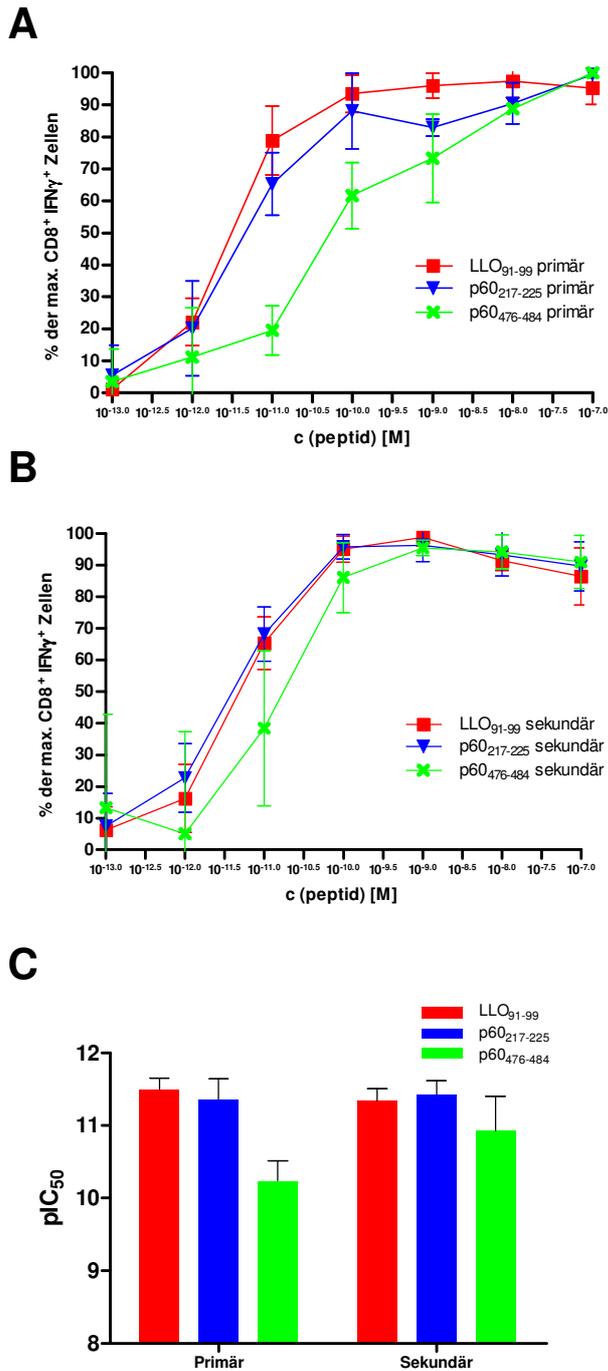


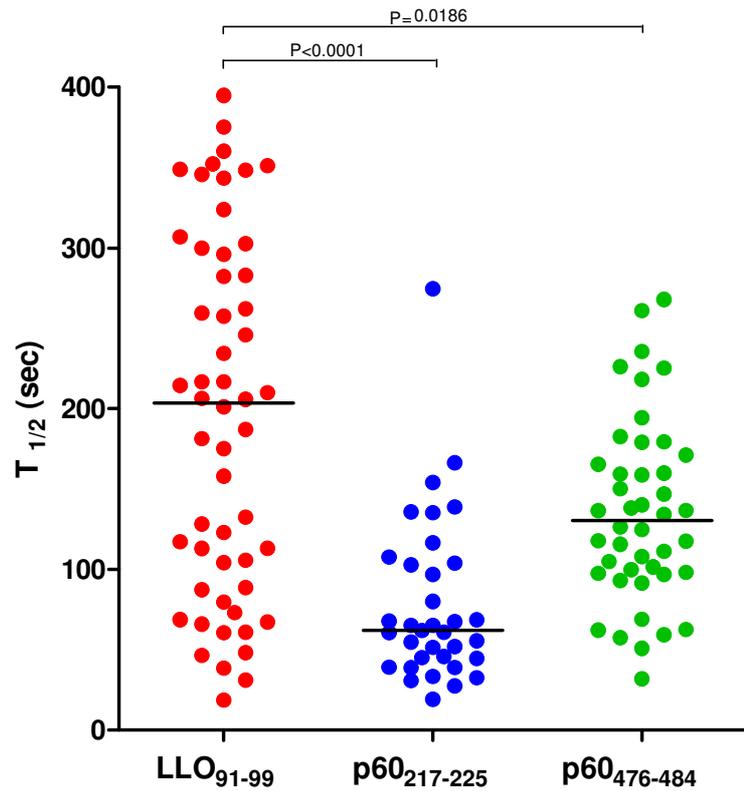
Abbildung 12. Funktionelle Avidität von LLO₉₁₋₉₉-, p60₂₁₇₋₂₂₅- und p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen *ex vivo* am 7. bzw. 5. Tag nach Primär- (A) bzw. Sekundärinfektion (B). Prozentzahl der CD8⁺ IFN- γ ⁺-Zellen ist aufgetragen gegen die Peptidkonzentration, mit der stimuliert wurde. (A) Daten sind gemittelt aus 2 unabhängigen Experimenten mit 2 BALB/c Mäusen. (B) Daten sind gemittelt aus 2 unabhängigen Experimenten mit je 3 BALB/c Mäusen., (C) Darstellung der pIC₅₀ Werte. Die hier gezeigten Daten wurden von Robert Knall erhoben.

6.4 T-Zellen, die das immunodominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ erkennen, zeigen im sekundären Effektorrepertoire höhere Dissoziationshalbwertszeiten als T-Zellen, die die subdominanten Epitope p60₂₁₇₋₂₂₅ oder p60₄₆₇₋₄₈₄ erkennen

Um die Beziehung zwischen struktureller Avidität und Immundominanz zu untersuchen, haben wir die Dissoziationsgeschwindigkeiten von immundominanten und subdominanten T-Zell-Populationen im T-Zellrepertoire von sekundär mit *L.m.* infizierten Mäusen gemessen. Erstaunlicherweise zeigen spezifische T-Zellen für das immunodominante LLO₉₁₋₉₉ durchschnittlich deutlich höhere Dissoziationshalbwertszeiten als spezifische T-Zellen für die subdominanten Epitope p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ (Abbildung 13). Der Median bzw. Mittelwert beträgt für LLO₉₁₋₉₉, p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ spezifische T-Zellen 205 s, 60 s und 130 s bzw. 195 s, 80 s und 135 s. Der Kruskal-Wallis-Test ergibt, dass signifikante Unterschiede zwischen den drei Populationen bestehen. Deshalb ist es zulässig, die Gruppen anhand des Mann-Whitney-Tests untereinander zu vergleichen (Bender et al., 2007). Zu beachten ist allerdings, dass bei nur zwei durchgeführten Messungen ein Signifikanzniveau von $0,05/2 = 0,025$ für jedes einzelne Experiment zu fordern ist, um ein Signifikanzniveau von 0,05 zu erhalten (Bonferroni, 1936). Die immunodominante Population der LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen zeigt eine signifikant höhere Dissoziationshalbwertszeit als die subdominanten Populationen der p60₂₁₇₋₂₂₅ - ($p < 0,001$) und der p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen ($p = 0,019$). Dies deutet auf eine zugrunde liegende Assoziation zwischen struktureller Avidität und Immundominanz hin.

Abbildung 13.

Dissoziationshalbwertszeiten der jeweiligen Peptid-MHC-Komplexe von LLO₉₁₋₉₉, p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ spezifischen T-Zellen des Sekundärrepertoire 5 Tage nach der Sekundärinfektion. LLO₉₁₋₉₉ spezifische T-Zellen aus zwei unabhängigen, vergleichbaren Experimenten mit je zwei BALB/c Mäusen. p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ spezifische T-Zellen aus je einem Experiment mit je einer BALB/c Maus. 21% bzw. 22% der CD8⁺-Zellen waren spezifisch für LLO₉₁₋₉₉, 8% für p60₂₁₇₋₂₂₅ und 2.5% für p60₄₇₆₋₄₈₄. Der Median ist dargestellt.



Um zu untersuchen, ob der Unterschied zwischen LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen und p60₂₁₇₋₂₂₅ – bzw. p60₄₇₆₋₄₈₄ - spezifischen T-Zellen auch in ein und der selben Maus statistisch signifikant nachweisbar ist, wurden weitere Experimente durchgeführt. Hierzu haben wir Milzzellen einer sekundär infizierten Maus im Verhältnis 1 zu 3 aufgeteilt und zur Messung den größeren Teil mit p60₂₁₇₋₂₂₅-Streptameren, den kleineren Teil mit LLO₉₁₋₉₉-Streptameren gefärbt. Tatsächlich ergibt sich auch hier, ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test, eine signifikant höhere Dissoziationsgeschwindigkeit T_{1/2} (p=0,04) der p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu den LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen (Abbildung 14). Die T-Zellen, die spezifisch für das immundominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ sind, zeigen einen Mittelwert von 190 Sekunden und einen Median von 180 Sekunden, die des subdominanten Epitops p60₂₁₇₋₂₂₅ einen Mittelwert von 130 Sekunden und einen Median von 70 Sekunden bzgl. der MHC-Dissoziationsgeschwindigkeit, die einen wesentlichen Parameter der strukturellen Avidität darstellt.

Um den Unterschied auch für LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen und p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen in einer Maus zu überprüfen, haben wir diesen Versuch analog mit p60₄₇₆₋₄₈₄-Streptameren anstelle von p60₂₁₇₋₂₂₅-Streptameren durchgeführt. Da aufgrund technischer

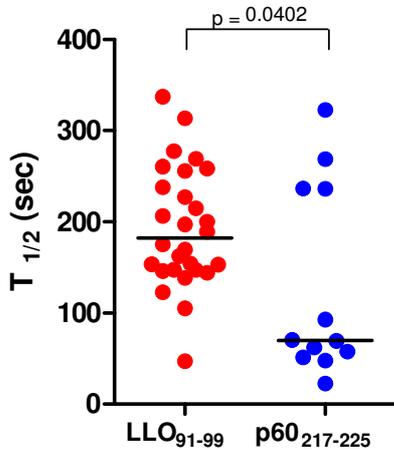


Abbildung 14. Dissoziationshalbwertszeiten der jeweiligen Peptid-MHC-Komplexe von LLO₉₁₋₉₉ und p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellen des Sekundärrepertoires einer Maus. Die Zellen wurden fünf Tage nach der Sekundärinfektion aus der Milz gewonnen. 26% der CD8⁺-Zellen waren spezifisch für LLO₉₁₋₉₉ und 2% für p60₂₁₇₋₂₂₅. Der jeweilige Median sowie die statistische Signifikanz, ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test, sind dargestellt.

Mängel das Zeiss LSM 510 Mikroskop zu diesem Zeitpunkt nicht zur Verfügung stand, haben wir die Daten mit dem Leica SP 5 Mikroskop erhoben. Erfreulicherweise hat sich auch hier unser vorheriges Ergebnis bestätigt. LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen zeigen einen Mittelwert von 121 s und einen Median von 118 s, während die p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen mit einem Mittelwert von 52 s und einem Median von 43 s deutlich geringere Halbwertszeiten zeigen (Abbildung 15). Dieser Unterschied ist, ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test,

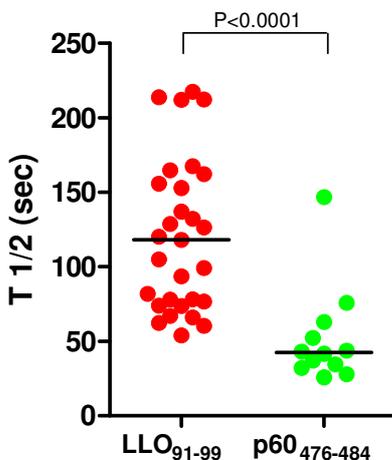


Abbildung 15. Dissoziationshalbwertszeiten der jeweiligen Peptid-MHC-Komplexe von LLO₉₁₋₉₉ und p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen des Sekundärrepertoire einer Maus. Die Zellen wurden fünf Tage nach der Sekundärinfektion aus der Milz gewonnen. 24% der CD8⁺-Zellen waren spezifisch für LLO₉₁₋₉₉ und 2% für p60₄₇₆₋₄₈₄. Der jeweilige Median sowie die statistische Signifikanz der Verteilungsunterschiede, ermittelt mit dem Mann-Whitney-U-Test, sind dargestellt.

statistisch signifikant ($p < 0,001$) und ist als ein weiterer Hinweis auf eine Korrelation zwischen Immundominanz und struktureller Avidität zu sehen.

7 Diskussion

Mit dieser Arbeit wurde an der Entwicklung einer neuen Methode mitgewirkt, die es erlaubt, MHC-Dissoziation und deren Halbwertszeit auf Einzelzellebene zu messen. Anhand dieser Methode konnten wir starke Hinweise dafür finden, dass T-Zellen mit einer langsameren Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} bzw. einer hohen Dissoziationshalbwertszeit $T_{1/2}$ – beides wesentliche Parameter der strukturellen Avidität – einen Selektionsvorteil haben. Weiter war es uns mit dieser Methode möglich, den bisher bedeutendsten Hinweis für eine Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immundominanz zu finden.

7.1 Optimierung einer neuen Methode zur Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit des Peptid-MHC-Komplexes vom gebundenen T-Zell-Rezeptor

Wir haben eine neue Methode entwickelt und optimiert, mit der es erstmals möglich ist, die Dissoziationsgeschwindigkeit des Peptid-MHC-Komplexes vom gebundenen T-Zell-Rezeptor auf Einzelzellebene zu messen. Diese neue Methode basiert auf der sogenannten MHC-Streptamertechnik (Knabel et al., 2002). Das MHC-Multimer zerfällt rasch bei der Zugabe von d-Biotin und es entsteht eine Situation, in der monomere fluoreszenzmarkierte Peptid-MHC-Komplexe an T-Zell-Rezeptoren lebender Zellen gebunden sind. Es kommt zur nachfolgenden Dissoziation der Peptid-MHC-Komplexe, die anhand der abnehmenden Fluoreszenz gemessen werden kann und somit eine Bestimmung der Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} bzw. der Halbwertszeit $T_{1/2}$ erlaubt. Die so erhobenen Daten sind valide (Knall, 2007).

Genau genommen messen wir mit unserer Methode nicht die strukturelle Avidität, welche sich durch die Dissoziationskonstante $k_d = k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ beschreiben lässt, sondern lediglich die Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} . Andere Arbeitsgruppen sind allerdings mit Hilfe der Oberflächenplasmonresonanz-Spektroskopie zu dem Ergebnis gekommen, dass vor allem die k_{off} der bestimmende Faktor für die strukturelle Avidität ist (Alam et al., 1996; Lyons et al., 1996). Dies wird unterstützt durch die Tatsache, dass für identische TCRs unterschiedliche Dissoziationsgeschwindigkeiten k_{off} , jedoch ähnliche Assoziationsgeschwindigkeiten K_{on} für verschiedene Peptid-MHC-Komplexe gemessen wurden (Garcia et al., 1997; Lee et al., 2004).

Diese Beobachtungen weisen stark darauf hin, dass eine niedrige Dissoziationsgeschwindigkeit k_{off} mit einer hohen strukturellen Avidität bei der Bindung des TCRs mit dem Peptid-MHC-Komplex einhergeht und umgekehrt. Unserer Meinung nach ist es deshalb zulässig, diese Korrelation bei der Interpretation der Ergebnisse anzunehmen, jedoch gleichzeitig zu verstehen, dass die absolute Gültigkeit dieser Korrelation nicht bewiesen ist.

Bei der Entwicklung und Optimierung unserer Methode waren einige Gesichtspunkte zu beachten, welche im Folgenden diskutiert werden sollen. Bei MHC-Multimer gefärbten T-Zellen kann es bei physiologischen Temperaturen zu einer Internalisierung der MHC-Multimere kommen (Knabel et al., 2002). Aus diesem Grund gewährleistet unsere Apparatur (Abbildung 9) während der gesamten Messung eine Kühlung der Zellen. Um zu verhindern, dass die Zellen bei der Zugabe von d-Biotin durch entstehende Turbulenzen weggespült werden, geben wir eine Polycarbonat-Membran (Porengröße $5\mu\text{m}$), die mit einem Metallring fixiert wird, direkt über die Zellen. Dadurch werden die Turbulenzen im Pufferreservoir unter der Membran so stark abgeschwächt, dass es bei vorsichtiger Zugabe des d-Biotins zu keiner bzw. nur zu einer vernachlässigbar kleinen Bewegung der Zellen kommt. Da bei einigen Experimenten dieser Arbeit nur eine geringe Anzahl an Ausgangszellmaterial zur Verfügung stand, bzw. die Gewinnung der Zellen sehr aufwendig und teuer ist, war es notwendig, mit möglichst geringen Ausgangszellzahlen vernünftige Ergebnisse produzieren zu können. Aus diesem Grund haben wir die ursprüngliche Vorgehensweise leicht modifiziert. Eine entscheidende Änderung war, die Zellen nicht in den Puffer zu pipettieren, sondern die Zellen auf den Boden des leeren Reservoirs zu geben und direkt anschließend die Membran mit Fixationsring, sowie darauffolgend den eiskalten Puffer dazuzugeben. Diese Schritte wurden möglichst schnell durchgeführt (etwa 10 Sekunden), so dass eine anhaltende Kühlung der Zellen gewährleistet war. Weiter war es wichtig, dass die Zellen in einer ausreichend hohen Konzentration vorliegen, um eine Zelldichte zu gewährleisten, die eine effiziente Ausbeute pro Messung zulässt. Unter Verwendung einer V-Platte und besonders vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes nach Zentrifugation ist es uns gelungen, die Verluste beim Waschen gering zu halten und die Zellen in einem Volumen von etwa $5\text{-}20\mu\text{l}$ zu resuspendieren. Je nach Zellkonzentration konnte dann mit Volumina von $1\text{-}5\mu\text{l}$ eine effiziente Ausbeute pro Messung erreicht werden.

Früh hat sich gezeigt, dass wir mit unserer neuen Methode eine enorme Menge an Rohdaten erzeugen, was dazu geführt hat, dass die Auswertung per Hand sehr zeitaufwendig wurde. Um sowohl die Auswertung zu beschleunigen, als auch den Auswertungsprozess zu

standardisieren, haben wir einen Algorithmus zur Datenanalyse entwickelt. Hierbei war es zunächst wichtig, einen Bereich der gemessenen Rohdaten zur letztendlichen Halbwertszeitbestimmung exakt zu definieren. Die naheliegende Lösung, einfach den ersten Wert der Fluoreszenzintensität als Startpunkt zu wählen, wäre nicht sinnvoll gewesen. Meist waren die ersten Datenpunkte durch Artefakte gestört, bevor der exponentielle Abfall der gemessenen Fluoreszenz einsetzte. Für diese Artefakte gibt es mehrere mögliche Erklärungen. Zum Einen kann man sich vorstellen, dass der über die Fluoreszenz gemessene Abfall der MHC-Moleküle zu Beginn nicht exponentiell ist, da das Rückgrat zunächst abdissoziieren muss. Monomere MHC-Moleküle würden natürlich von Anfang an exponentiell abfallen. Es würden jedoch mit exponentieller Geschwindigkeit (die der Streptactin-PE-Dissoziation) neue monomere MHC-Moleküle entstehen, die allerdings auch schon vorher, noch gebunden als Multimer, sichtbar sind. Die Streptactin-PE-Dissoziation ist mit einer Halbwertszeit von etwa 20-40s in der Regel deutlich schneller als die MHC-Dissoziation. Somit kommt es anfänglich zu einer Überlagerung von einem schnellen exponentiellen Zuwachs der monomeren MHC-Komplexe und einem langsameren exponentiellen Abfall der monomeren MHC-Komplexe. Die MHC-Komplexe werden also „zurückgehalten“ und es entsteht der Anschein eines langsameren Zerfalls von freien MHC/TCR-Paaren. Zusätzlich wird es jedoch auch MHC-Komplexe geben, die zwar an Streptactin-PE, aber nicht an einen TCR gebunden sind. Dies würde zu einer scheinbar schnelleren MHC-Dissoziation führen, da diese MHC-Moleküle sofort, nachdem sich die Bindung zum Streptactin-PE gelöst hat, in ungebundener Form vorliegen und von der Zelle bzw. aus dem Messbereich diffundieren. Welches dieser Modelle mit adversativen Effekten auf die gemessene MHC-Dissoziation in der Praxis stärkeren Einfluss besitzt, ist unklar. Sicher ist jedoch, dass beide dieser Effekte an Einfluss verlieren, je weiter die Streptactin-PE-Dissoziation fortgeschritten ist. All dies erklärt allerdings nicht, warum die Artefakte häufig einen paradoxen Anstieg der Fluoreszenz zeigen. Dieser ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass einige Farbstoffe erst nach einer gewissen Anregungszeit maximal fluoreszieren. Dies bezeichnet man als den Quenching-Effekt (Weissleder et al., 1999). Um nun all diesen am Anfang der Messung auftretenden Artefakten Rechnung zu tragen, haben wir uns entschlossen, erst ab dem ersten Wert kleiner/gleich 80% der maximalen Fluoreszenzintensität mit der mathematischen Auswertung zu beginnen. Wir konnten anhand von Zellen, bei denen dieses Artefakte nicht offensichtlich auftraten, zeigen, dass die errechnete Halbwertszeit dadurch kaum beeinflusst wird und unser Vorgehen somit legitim ist. Anhand von Analysen mit festem Startpunkt und variiertem Endpunkt des auszuwertenden Intervalls konnten wir zeigen, dass die exakte Definition des Endpunktes von

enormer Bedeutung ist. Dadurch, dass die Korrektur des Bleachingeffektes anhand einer linearen Funktion erfolgt, (Knall, 2007) kommt es ab einem gewissen Punkt zu einem virtuellen Anstieg der korrigierten Fluoreszenzintensität. Der Umschlagpunkt definiert den Endpunkt der Dissoziation. Da bei Messungen dieser Art immer eine gewisse Streuung der Intensitäten auftritt, approximieren wir eine Funktion mit einem exponentiellen und einem linearen Anteil. Anhand dieser Funktion wird mathematisch das Minimum errechnet und somit der Fehler durch Streuung minimiert. Aufgrund dieser Vorgehensweise ist es weiter sinnvoll, das Minimum dieser Approximation als Autofluoreszenz der Zelle zu definieren. Die Approximation einer exponentiellen Funktion an die Werte des ausgewählten Intervalls ermöglicht die Berechnung der Dissoziationsgeschwindigkeit sowie der Halbwertszeit der MHC-Dissoziation. Dieser Algorithmus ist in einer Software von Jörg Mages implementiert worden und ermöglicht somit eine schnelle und standardisierte Auswertung der gemessenen Daten.

Weiter konnten wir zeigen, dass unsere neue Methode unabhängig vom Experimentator ähnliche Ergebnisse liefert. Hierfür wurden von einem Wissenschaftler A die Halbwertszeit der MHC-Dissoziation von Zellen einer LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellkultur im Bereich 50s – 170s mit einem Mittelwert von 108s gemessen. Zellen der gleichen T-Zellkultur wurden 20 Stimulationsschritte später von Wissenschaftler B in einem Bereich von 50s – 150s mit einem Mittelwert von 93s gemessen. Hierbei zeigte sich lediglich ein „Ausreißer“ mit einem Wert von 14s. Das etwas geringere Spektrum der Messreihe B im Vergleich zu Messreihe A ist wahrscheinlich auf die Langzeitrestimulation mit limitierten Peptidkonzentrationen zurückzuführen, die zur klonalen Selektion führen kann (Knall, 2007).

7.2 Funktionelle und strukturelle Avidität

Die funktionelle Avidität einer T-Zelle ist definiert über die Menge an Antigen, die notwendig ist, um eine T-Zelle zu aktivieren und Effektorfunktionen auszulösen (Alexander-Miller, 2005). Diese Effektorfunktionen können über die IFN- γ Produktion oder die Fähigkeit, Zielzellen zu lysieren, quantifiziert werden. Die funktionelle Avidität wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. So haben neben der TCR-MHC-Interaktion (Davis and Bjorkman, 1988) und der Effizienz der Signaltransduktionswege auch die Expressionslevel des TCRs und die Expression der CD8 $\alpha\beta$ Heterodimere einen Einfluss auf die funktionelle Avidität (Cawthon and Alexander-Miller, 2002; Cawthon et al., 2001). Die strukturelle

Avidität hingegen stellt einen Aspekt der funktionellen Avidität dar. Sie bezeichnet die physikalische Bindungsstärke zwischen dem TCR, dem CD8-Molekül und dem Peptid-MHC-Komplex.

Im *L.m.*-Modell haben wir im Sekundärrepertoire ähnliche funktionelle Aviditäten für LLO₉₁₋₉₉- und p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische T-Zellen gemessen. Dieses Ergebnis ist in Einklang mit Untersuchungen an LLO₉₁₋₉₉- und p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellkulturen zu sehen (Busch and Pamer, 1998). Wir haben jedoch starke Hinweise, dass diese beiden Epitope unterschiedliche strukturelle Aviditäten besitzen. Somit kann hier keine Verbindung zwischen funktioneller und struktureller Avidität festgestellt werden. Hierfür spricht auch der Vergleich von LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen aus dem Primär- und Sekundärrepertoire mit ähnlichen funktionellen, aber signifikant unterschiedlichen strukturellen Aviditäten. Diese Tatsache hat uns zunächst verwundert, da Experimente mit LLO₉₁₋₉₉- und m164₂₅₇₋₂₆₅-spezifischen Langzeitrestimulierten T-Zellkulturen eine Abhängigkeit der funktionellen von der strukturellen Avidität gezeigt haben (Knall, 2007). Hierbei wurden für jedes der beiden Epitope Zellen aus dem Primärrepertoire mit je einer hohen bzw. einer niedrigen Peptidkonzentration restimuliert (10^{-6} M / 10^{-9} M für die LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zellkultur, 10^{-8} M / 10^{-10} M für die m164₂₅₇₋₂₆₅-spezifische T-Zellkultur). Es fiel auf, dass die Restimulation mit niedrigeren bzw. hohen Peptidkonzentrationen zu einer Selektion von T-Zellen mit hohen bzw. niedrigen funktionellen Aviditäten führt. Es wurden nun von jedem Epitop die strukturellen Aviditäten der funktionell hoch- und niedrigaviden T-Zellkultur verglichen. Es zeigte sich, dass hohe funktionelle Avidität mit hoher struktureller Avidität einhergeht und umgekehrt. Bei der LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellkultur mit niedriger struktureller Avidität zeigen 89% der Zellen eine Halbwertszeit der MHC-Dissoziation von unter 30 Sekunden, während die restlichen Zellen Halbwertszeiten um die 40 Sekunden aufweisen. Bei der funktionell niedrigaviden m164₂₅₇₋₂₆₅ spezifischen T-Zellkultur sind es 71% der Zellen, die eine Halbwertszeit der MHC-Dissoziation von unter 40 Sekunden zeigen, während die restlichen Zellen Halbwertszeiten zwischen 40 und 100 Sekunden aufweisen. Die strukturell niedrig aviden Zellpopulationen dieser Arbeit, wie die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellen oder die LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen aus dem Primärrepertoire zeigen jedoch deutlich höhere strukturelle Aviditäten. Die p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellen haben zu über 85% MHC-Dissoziationshalbwertszeiten von über 40 Sekunden. Auch sind die MHC-Dissoziationshalbwertszeiten der LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellen des primären Effektorepertoires in über 80% deutlich länger als 40 Sekunden. Es wäre also möglich, dass die strukturelle Avidität nur unter einem gewissen Grenzwert die funktionelle Avidität zu

schmäleren vermag. Wenn die strukturelle Avidität diesen Grenzwert jedoch überschreitet – wie es bei den hier erhobenen Daten der Fall wäre – würde sie keinen weiteren messbaren Einfluss mehr auf die funktionelle Avidität ausüben. Dies würde für die p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen, deren MHC-Dissoziationsgeschwindigkeiten im Mittel 135 s betragen und deutlich geringere funktionelle Aviditäten als p60₂₁₇₋₂₂₅ spezifische T-Zellen zeigen, bedeuten, dass die funktionelle Avidität hier noch entscheidend von anderen Faktoren als der strukturellen Avidität beeinflusst wird. Bei der Interpretation dieser Ergebnisse ist jedoch zu beachten, dass *ex vivo*- mit *in vitro*- Daten verglichen werden, wobei die T-Zellkulturen zunächst über einen langen Zeitraum wöchentlich restimuliert wurden.

Weiter sprechen die Daten dieser Arbeit dafür, dass LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zellen des sekundären Effektorrepertoires deutlich höhere strukturelle Aviditäten als LLO₉₁₋₉₉ spezifische T-Zellen des primären Effektorrepertoires besitzen. Vergleicht man jedoch die funktionellen Aviditäten von LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen im primären und sekundären Effektorrepertoire, kommt man zu widersprüchlichen Ergebnissen. Anhand der Fähigkeit, Zielzellen zu lysieren, wurde eine niedrigere funktionelle Avidität für LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zelllinien des Primärrepertoires zu den LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zelllinien des Sekundärrepertoires festgestellt (Busch and Pamer, 1999). Bei den in dieser Arbeit gezeigten Daten von Robert Knall konnte ebenjener Unterschied in der funktionellen Avidität anhand von intrazellulären IFN- γ -Färbungen nicht festgestellt werden. Die Definition der funktionellen Avidität (Alexander-Miller, 2005) über die Menge an Antigen, die notwendig ist, um eine T-Zelle zu aktivieren und Effektorfunktionen auszulösen, scheint hier somit nicht eindeutig. Es ist aufgrund der aktuellen Datenlage für LLO₉₁₋₉₉-spezifische T-Zelllinien des Primär- bzw. Sekundärrepertoires nicht möglich, eine klare Aussage über die funktionelle Avidität und somit in diesem Fall auch über den Zusammenhang von funktioneller und struktureller Avidität zu treffen. Es wäre deshalb sinnvoll und notwendig, hier weitere Experimente zur funktionellen Avidität durchzuführen.

7.3 Strukturelle Avidität als ein Einflussfaktor auf die Immundominanz

7.3.1 Strukturelle Avidität als Selektionsvorteil

Bei dem Vergleich von LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellen aus Primär- und Sekundärrepertoire hat sich gezeigt, dass es zu einer Selektion von T-Zellen mit hohen

Dissoziationshalbwertszeiten $T_{1/2}$ kommt. Eine hohe Dissoziationshalbwertszeit $T_{1/2}$ spricht für eine hohe strukturelle Avidität. Betrachtet man die Verteilung der Dissoziationshalbwertszeiten des LLO₉₁₋₉₉ spezifischen Primärrepertoires, ergibt sich ein annähernd normalverteilter Bereich zwischen 20 und 120 Sekunden, in dem 77% der Zellen liegen. In diesem Fall ist es sinnvoll, diese Zellen als niedrigavid zu definieren. Die restlichen 23%, annähernd gleichverteilt auf einen Bereich von 120-360 Sekunden, zeigen somit eine hohe Avidität. Betrachtet man nun anhand dieser Kriterien die Verteilung der LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellen des Sekundärrepertoires, zeigen 60% der Zellen eine hohe Avidität. Errechnet man die Quotienten aus hochaviden und niedrigaviden LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellen, lässt sich der Selektionsvorteil der hochaviden Zellen beziffern. Im Vergleich zu den niedrigaviden Zellen haben die hochaviden Zellen einen fast siebenfach höheren Anteil im Sekundärrepertoire. Dieser Selektionsvorteil ist beträchtlich und könnte ein allgemeines Prinzip - auch in der Immunodominanz - darstellen.

Unterstützt werden diese Daten durch eine Untersuchung an LLO₉₁₋₉₉ spezifischen T-Zellkulturen, gewonnen aus dem Primär- bzw. Sekundärrepertoire. Hier wurden anhand der Färbbarkeit mit abnehmenden Tetramerkonzentrationen Hinweise gefunden, dass LLO₉₁₋₉₉ spezifische T-Zellen im Sekundärrepertoire höhere strukturelle Aviditäten zeigen als im Primärrepertoire (Busch and Pamer, 1999). Eine weitere Arbeit dieser Gruppe zeigt, dass die V β -Ketten-Benutzung des LLO₉₁₋₉₉-spezifischen Primär- und Gedächtnisrepertoires einzelner Mäuse sehr ähnlich ist, während im Vergleich die V β -Ketten-Benutzung des Sekundärrepertoires eine Einschränkung dieses Repertoires darstellt (Busch et al., 1998). Dies spricht dafür, dass die in dieser Doktorarbeit beschriebene Selektion von hochaviden T-Zellen in der Expansionsphase des Sekundärrepertoires und nicht in der Kontraktionsphase des Primärrepertoires stattfindet.

Zusammengenommen weisen diese Daten stark darauf hin, dass es in der Immunantwort der Sekundärinfektion zu einer fast siebenfach stärkeren Expansion von hochaviden LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu niedrigaviden LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen kommt.

7.3.2 Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immunodominanz

Wir haben starke Hinweise dafür gefunden, dass fünf Tage nach Sekundärinfektion die strukturelle Avidität der spezifischen T-Zellen für das immundominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ signifikant höher ist als die strukturelle Avidität der spezifischen T-Zellen für die

subdominanten Epitope p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄. Die Halbwertszeiten der MHC-Dissoziation von LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen zeigen einen Median von 205 s. Die Halbwertszeiten der MHC-Dissoziation von p60₂₁₇₋₂₂₅- und p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen liegen statistisch signifikant darunter mit einem Median von 65 s und 130 s. Diesen Unterschied zwischen immundominanten und subdominanten T-Zellpopulationen konnten wir anhand zweier Experimente verifizieren, und auch dessen Gültigkeit innerhalb eines einzelnen Individuums zeigen. Dabei ergaben sich folgende Unterschiede in den Halbwertszeiten der MHC-Dissoziation: In einer individuellen Maus zeigten die LLO₉₁₋₉₉- bzw. p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifischen T-Zellen am Tag 5 nach Sekundärinfektion einen Median von 180 s bzw. 70 s. In einem anderen Individuum wurden am Tag 5 nach Sekundärinfektion ein Median von 120 s für LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen und ein Median von 40 s für p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen gemessen. Aufgrund eines technischen Defektes des Zeiss LSM 510 Mikroskops mussten wir bei dem letzten Versuch auf das Leica SP 5 Mikroskop ausweichen. Die Verwendung einer anderen Optik und die sich daraus ergebenden Unterschiede erklärt höchstwahrscheinlich die limitierte Vergleichbarkeit der Absolutwerte der MHC-Dissoziation der LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen beider Experimente. Diese Vermutung wird durch die Tatsache untermauert, dass die Messungen der LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen in drei unabhängigen Experimenten am Zeiss LSM 510 Mikroskop vergleichbare Ergebnisse geliefert hat. Betrachtet man jedoch die Verhältnisse der Mediane zueinander, lassen sich beide Experimente jedoch gut vergleichen. Es ergibt sich ein Faktor von 2,6 bzw. 2,9 zwischen den Medianen der MHC-Dissoziationsgeschwindigkeiten von LLO₉₁₋₉₉- und p60₂₁₇₋₂₂₅ bzw. LLO₉₁₋₉₉- und p60₄₇₆₋₄₈₄-spezifischen T-Zellen. Somit deutet dies für beide subdominanten T-Zellpopulationen auf eine ähnliche strukturelle Avidität im Verhältnis zur strukturellen Avidität der immundominanten T-Zellpopulation hin.

Zusammengenommen sind dies unserer Meinung nach die bisher überzeugendsten Daten, die für eine Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immunodominanz sprechen. In einer Arbeit von Dzutsev et al. wurde zwar eine Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immunodominanz gefunden, die hier verwendete Methode zur Messung der strukturellen Avidität zeigt jedoch einige Schwächen (Dzutsev et al., 2007). Es wurden Tetramer-PE gefärbte Zellen mit einem blockierenden Agens für 6 Stunden bei 10°C inkubiert um dann erneut mit Tetramer-APC gefärbt. Untersuchungen haben gezeigt, dass Tetramer gefärbte Zellen bei 37°C innerhalb von wenigen Minuten Tetramer internalisieren können. Bei 4°C war dieser Effekt nicht nachweisbar (Whelan et al., 1999). Wie sich Tetramer gefärbte Zellen bei 10°C über 6 Stunden verhalten, ist nicht bekannt. Es könnte jedoch auch hier zu

Internalisierung kommen und somit die Messung gestört werden. Auch ist die Verwendung von konventionellen Tetrameren zur Messung von struktureller Avidität als kritisch zu betrachten (siehe 4.1.3.3.1).

Eine andere Publikation von Price et al. hat die Abhängigkeit der Tetramerbindung von der CD8-Bindung an den Peptid-MHC-Komplex untersucht. Man spricht von einer umso höheren intrinsischen Avidität, je weniger die Tetramerbindung von der Interaktion zwischen CD8- und Peptid-MHC-Komplex abhängig ist. Die intrinsische Avidität ist somit abhängig von der strukturellen Avidität von TCR/Peptid-MHC-Komplex und anderen Faktoren wie Verteilung, Dichte und Mobilität des TCR auf der Zellmembran (Choi et al., 2003; Pittet et al., 2003; Price et al., 2005). Price et al. konnten bei Patienten mit chronischer Epstein-Barr-Virus bzw. Zytomegalievirus Infektion zeigen, dass dominante T-Zellklone eine höhere intrinsische Avidität besitzen als subdominante T-Zellklone (Price et al., 2005). Dies unterstützt die in dieser Arbeit gefundene Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immundominanz.

8 Zusammenfassung

CD8⁺-T-Zellen spielen bei der Bekämpfung von zahlreichen Pathogenen wie Bakterien oder Viren eine entscheidende Rolle. Interessanterweise sind hierbei nur gegen einige Wenige der vielen Peptide, die vom Genom des Erregers kodiert werden, CD8⁺-T-Zellen nachweisbar. Dieses Phänomen, welches in genetisch identischen Tieren erstaunlich gut reproduzierbar ist, nennt man Immundominanz. Die Immundominanz reflektiert das Endprodukt von zahlreichen Prozessen, die alle potentiellen Einfluss auf die Immundominanz besitzen. So ist einerseits wichtig, dass das Antigen effizient prozessiert und auf MHC-I stabil präsentiert wird. Andererseits scheinen T-Zell abhängige Faktoren wie das T-Zell-Rezeptor-Repertoire und die Vorläuferfrequenzen von Bedeutung zu sein. Ein bisher kaum untersuchter - da bis heute experimentell nicht zufriedenstellend zugänglicher - Faktor ist die Bindungsstärke zwischen dem Peptid-MHC-Komplex mit dem T-Zell-Rezeptor und dem CD8-Molekül, die auch als strukturelle Avidität bezeichnet wird. Wir haben in unserm Labor eine neue Methode entwickelt und optimiert, mit der es erstmals möglich ist, die strukturelle Avidität auf Einzelzellebene zu untersuchen. Hierzu werden T-Zellen mit multimerisierten Peptid-MHC-Komplexen gefärbt, welche unter kontrollierten Bedingungen schlagartig monomerisiert werden können. Monomere Peptid-MHC-Komplexe dissoziieren von der T-Zelle mit bestimmten Geschwindigkeiten, welche die Bindungsstärke des T-Zellrezeptors reflektieren und, da sie hauptsächlich von dieser Dissoziation abhängt, als ein Maß für die strukturelle Avidität benutzt werden kann. Um die Rolle der strukturellen Avidität in Bezug auf T-Zell-Kinetiken zu untersuchen, eignet sich das Modellsystem der murinen Listeriose in BALB/c Mäusen. Hier erkennt die größte und somit immundominante CD8⁺-T-Zellpopulation das Peptid LLO₉₁₋₉₉, während kleinere subdominante CD8⁺-T-Zellpopulationen die Peptide p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ erkennen. In diesem Modell konnten wir anhand unserer neuen Methode starke Hinweise dafür finden, dass die T-Zellantwort einer sekundär infizierten Maus einen deutlich höheren Anteil an hochaviden LLO₉₁₋₉₉-spezifischen T-Zellen besitzt als die T-Zellantwort einer primär infizierten Maus. Weiterhin war es uns möglich, in der T-Zellantwort von sekundär infizierten Mäusen starke Hinweise dafür zu finden, dass die CD8⁺-T-Zellen, die spezifisch das immundominante Epitop LLO₉₁₋₉₉ erkennen, durchschnittlich signifikant höhere Aviditäten zeigen als die CD8⁺-T-Zellen, die spezifisch die subdominanten Epitope p60₂₁₇₋₂₂₅ und p60₄₇₆₋₄₈₄ erkennen. Diese erstaunliche Entdeckung ist unserer Meinung

nach der bisher überzeugendste Hinweis, dass eine Korrelation zwischen struktureller Avidität und Immundominanz besteht.

Von der strukturellen Avidität ist die funktionelle Avidität abzugrenzen, die über die Antigenmenge definiert ist, die notwendig ist, um eine T-Zelle zu aktivieren und Effektorfunktionen auszulösen. Anhand der hier erhobenen Daten konnten wir keine Beziehung zwischen funktioneller und struktureller Avidität für LLO₉₁₋₉₉- und p60₂₁₇₋₂₂₅-spezifische T-Zellen feststellen.

Mit dieser Arbeit sind wir an dem „großen Puzzle“ der Immunodominanz ein Stück vorangekommen. Die Immundominanz ist und bleibt ein grundlegendes, spannendes und faszinierendes Forschungsgebiet in der Immunologie.

9 Referenzen

Abbas, A.K., Lichtman, A.H. (2003). Cellular and Molecular Immunology. 5th ed, Elsevier Science.

al-Ramadi, B.K., Jelonek, M.T., Boyd, L.F., Margulies, D.H., Bothwell, A.L. (1995). Lack of strict correlation of functional sensitization with the apparent affinity of MHC/peptide complexes for the TCR. *J Immunol* 155, 662-73.

Alam, S.M., Travers, P.J., Wung, J.L., Nasholds, W., Redpath, S., Jameson, S.C., Gascoigne, N.R. (1996). T-cell-receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381, 616-20.

Alexander-Miller, M.A. (2005). High-avidity CD8+ T cells: optimal soldiers in the war against viruses and tumors. *Immunol Res* 31, 13-24.

Altman, J.D., Moss, P.A., Goulder, P.J., Barouch, D.H., McHeyzer-Williams, M.G., Bell, J.I., McMichael, A.J., Davis, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274, 94-6.

Badovinac, V.P., Porter, B.B., Harty, J.T. (2002). Programmed contraction of CD8(+) T cells after infection. *Nat Immunol* 3, 619-26.

Begley, G.S., Horvath, A.R., Taylor, J.C., Higgins, C.F. (2005). Cytoplasmic domains of the transporter associated with antigen processing and P-glycoprotein interact with subunits of the proteasome. *Mol Immunol* 42, 137-41.

Bender, R., Lange, S., Ziegler, A. (2007). Multiple testing. *Dtsch Med Wochenschr* 132 Suppl 1, e26-9.

Bielecki, J., Youngman, P., Connelly, P., Portnoy, D.A. (1990). *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* 345, 175-176.

Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329, 506-12.

Bonferroni, C.E. (1936). *Teoria statistica delle calssi e calcolo delle probabilit 'a*. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze 8, 3-62.

Brooks, P., Murray, R.Z., Mason, G.G., Hendil, K.B., Rivett, A.J. (2000). Association of immunoproteasomes with the endoplasmic reticulum. *Biochem J* 352 Pt 3, 611-5.

Busch, D.H., Pamer, E.G. (1998). MHC class I/peptide stability: implications for immunodominance, in vitro proliferation, and diversity of responding CTL. *J Immunol* 160, 4441-8.

Busch, D.H., Pamer, E.G. (1999). T cell affinity maturation by selective expansion during infection. *J Exp Med* 189, 701-10.

Busch, D.H., Pilip, I., Pamer, E.G. (1998). Evolution of a complex T cell receptor repertoire during primary and recall bacterial infection. *J Exp Med* 188, 61-70.

Busch, D.H., Pilip, I.M., Vijn, S., Pamer, E.G. (1998). Coordinate regulation of complex T cell populations responding to bacterial infection. *Immunity* 8, 353-62.

Cawthon, A.G., Alexander-Miller, M.A. (2002). Optimal colocalization of TCR and CD8 as a novel mechanism for the control of functional avidity. *J Immunol* 169, 3492-8.

Cawthon, A.G., Lu, H., Alexander-Miller, M.A. (2001). Peptide requirement for CTL activation reflects the sensitivity to CD3 engagement: correlation with CD8 α beta versus CD8 α alpha expression. *J Immunol* 167, 2577-84.

Chen, W., Norbury, C.C., Cho, Y., Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (2001). Immunoproteasomes shape immunodominance hierarchies of antiviral CD8(+) T cells at the levels of T cell repertoire and presentation of viral antigens. *J Exp Med* 193, 1319-26.

Choi, E.M., Chen, J.L., Wooldridge, L., Salio, M., Lissina, A., Lissin, N., Hermans, I.F., Silk, J.D., Mirza, F., Palmowski, M.J., Dunbar, P.R., Jakobsen, B.K., Sewell, A.K., Cerundolo, V. (2003). High avidity antigen-specific CTL identified by CD8-independent tetramer staining. *J Immunol* 171, 5116-23.

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

Davis, M.M., Boniface, J.J., Reich, Z., Lyons, D., Hampl, J., Arden, B., Chien, Y. (1998). Ligand recognition by alpha beta T cell receptors. *Annu Rev Immunol* 16, 523-44.

Drake, D.R., 3rd, Braciale, T.J. (2001). 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, 7009-13.

Dzutsev, A.H., Belyakov, I.M., Isakov, D.V., Margulies, D.H., Berzofsky, J.A. (2007). Avidity of CD8 T cells sharpens immunodominance. *Int Immunol* 19, 497-507.

Fagerstam, L.G., Frostell-Karlsson, A., Karlsson, R., Persson, B., Ronnberg, I. (1992). Biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance detection applied to kinetic, binding site and concentration analysis. *J Chromatogr* 597, 397-410.

Fahmy, T.M., Bieler, J.G., Edidin, M., Schneck, J.P. (2001). Increased TCR avidity after T cell activation: a mechanism for sensing low-density antigen. *Immunity* 14, 135-43.

Falk, K., Rotzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H.G. (1991). Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351, 290-6.

Gaczynska, M., Rock, K.L., Goldberg, A.L. (1993). Gamma-interferon and expression of MHC genes regulate peptide hydrolysis by proteasomes. *Nature* 365, 264-7.

Gaddis, D.E., Fuller, M.J., Allan, J.Z., *CD8 T-cell Immunodominance, Repertoire, and Memory*, in *Immunodominance: The Choice of the Immune System*. 2006. p. 109-145.

Gaillard, J.L., Berche, P., Mounier, J., Richard, S., Sansonetti, P. (1987). In vitro model of penetration and intracellular growth of *L. monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect. Immun.* 55, 2822-2829.

Gao, G.F., Tormo, J., Gerth, U.C., Weyer, J.R., McMichael, A.J., Stuart, D.I., Bell, J.I., Jones, E.Y., Jakobsen, B.K. (1997). Crystal structure of the complex between human CD8alpha(alpha) and HLA-A2. *Nature* 387, 630-4.

Garcia, K.C., Tallquist, M.D., Pease, L.R., Brunmark, A., Scott, C.A., Degano, M., Stura, E.A., Peterson, P.A., Wilson, I.A., Teyton, L. (1997). Alphabeta T cell receptor interactions with syngeneic and allogeneic ligands: affinity measurements and crystallization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 13838-43.

Gedde, M., Higgins, D., Tilney, L., Portnoy, D. (2000). Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 68, 999-1003.

Geginat, G., Schenk, S., Skoberne, M., Goebel, W., Hof, H. (2001). A novel approach of direct ex vivo epitope mapping identifies dominant and subdominant CD4 and CD8 T cell epitopes from *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 166, 1877-84.

Goldrath, A.W., Bevan, M.J. (1999). Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402, 255-62.

Guermonprez, P., Saveanu, L., Kleijmeer, M., Davoust, J., Van Endert, P., Amigorena, S. (2003). ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells. *Nature* 425, 397-402.

Guo, H.C., Jardetzky, T.S., Garrett, T.P., Lane, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. (1992). Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360, 364-6.

Hammer, G.E., Shastri, N. (2007). Construction and destruction of MHC class I in the peptide-loading complex. *Nat Immunol* 8, 793-4.

Janeway, C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M.J. (2005). *Immunobiology - The immune system in health and disease*. 6th Edition ed, Garland Science Publishing.

Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R., Wiley, D.C. (1991). Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353, 326-9.

Kienast, A., Preuss, M., Winkler, M., Dick, T.P. (2007). Redox regulation of peptide receptivity of major histocompatibility complex class I molecules by ERp57 and tapasin. *Nat Immunol* 8, 864-72.

Knabel, M., Franz, T.J., Schiemann, M., Wulf, A., Villmow, B., Schmidt, B., Bernhard, H., Wagner, H., Busch, D.H. (2002). Reversible MHC multimer staining for functional isolation of T-cell populations and effective adoptive transfer. *Nat Med* 8, 631-7.

Knall, R. (2007). Direct ex vivo identification of individual antigen-specific T cells with optimal avidity for protection. Dissertation an der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München.

Kovacsovics-Bankowski, M., Rock, K.L. (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on MHC class I molecules. *Science* 267, 243-6.

Lawson, T.M., Man, S., Wang, E.C., Williams, S., Amos, N., Gillespie, G.M., Moss, P.A., Borysiewicz, L.K. (2001). Functional differences between influenza A-specific cytotoxic T lymphocyte clones expressing dominant and subdominant TCR. *Int Immunol* 13, 1383-90.

Lee, J.K., Stewart-Jones, G., Dong, T., Harlos, K., Di Gleria, K., Dorrell, L., Douek, D.C., van der Merwe, P.A., Jones, E.Y., McMichael, A.J. (2004). T cell cross-reactivity and conformational changes during TCR engagement. *J Exp Med* 200, 1455-66.

Levitsky, V., Zhang, Q.J., Levitskaya, J., Masucci, M.G. (1996). The life span of major histocompatibility complex-peptide complexes influences the efficiency of presentation and immunogenicity of two class I-restricted cytotoxic T lymphocyte epitopes in the Epstein-Barr virus nuclear antigen 4. *J Exp Med* 183, 915-26.

Liedberg, B., Nylander, C., Lundstrom, I. (1983). Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing. *Sensors and Actuators* 4, 299-304.

Lyons, D.S., Lieberman, S.A., Hampl, J., Boniface, J.J., Chien, Y., Berg, L.J., Davis, M.M. (1996). A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists. *Immunity* 5, 53-61.

Mandelboim, O., Berke, G., Fridkin, M., Feldman, M., Eisenstein, M., Eisenbach, L. (1994). CTL induction by a tumour-associated antigen octapeptide derived from a murine lung carcinoma. *Nature* 369, 67-71.

Matsui, K., Boniface, J.J., Steffner, P., Reay, P.A., Davis, M.M. (1994). Kinetics of T-cell receptor binding to peptide/I-Ek complexes: correlation of the dissociation rate with T-cell responsiveness. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 12862-6.

Miller, P.J., Edward, J.C., in *Immunodominance: The Choice of the Immune System*, J.A. Frelinger, Editor. 2006. p. 3-30.

Momburg, F., Roelse, J., Howard, J.C., Butcher, G.W., Hammerling, G.J., Neefjes, J.J. (1994). Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367, 648-51.

Moon, J.J., Chu, H.H., Pepper, M., McSorley, S.J., Jameson, S.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K. (2007). Naive CD4(+) T cell frequency varies for different epitopes and predicts repertoire diversity and response magnitude. *Immunity* 27, 203-13.

Murphy, K., Travers, P., Walter, P. (2008). *Janeway's Immunobiology 7th Edition* ed, Garland Science Publishing.

North, R.J., Dunn, P.L., Conlan, J.W. (1997). Murine listeriosis as a model of antimicrobial defense. *Immunol Rev* 158, 27-36.

Obar, J.J., Khanna, K.M., Lefrancois, L. (2008). Endogenous Naive CD8(+) T Cell Precursor Frequency Regulates Primary and Memory Responses to Infection. *Immunity*.

Palermo, B., Campanelli, R., Mantovani, S., Lantelme, E., Manganoni, A.M., Carella, G., Da Prada, G., della Cuna, G.R., Romagne, F., Gauthier, L., Necker, A., Giachino, C. (2001). Diverse expansion potential and heterogeneous avidity in tumor-associated antigen-specific T lymphocytes from primary melanoma patients. *Eur J Immunol* 31, 412-20.

Pang, K.C., Sanders, M.T., Monaco, J.J., Doherty, P.C., Turner, S.J., Chen, W. (2006). Immunoproteasome subunit deficiencies impact differentially on two immunodominant influenza virus-specific CD8⁺ T cell responses. *J Immunol* 177, 7680-8.

Pittet, M.J., Rubio-Godoy, V., Bioley, G., Guillaume, P., Batard, P., Speiser, D., Luescher, I., Cerottini, J.C., Romero, P., Zippelius, A. (2003). Alpha 3 domain mutants of peptide/MHC class I multimers allow the selective isolation of high avidity tumor-reactive CD8 T cells. *J Immunol* 171, 1844-9.

Price, D.A., Brenchley, J.M., Ruff, L.E., Betts, M.R., Hill, B.J., Roederer, M., Koup, R.A., Migueles, S.A., Gostick, E., Wooldridge, L., Sewell, A.K., Connors, M., Douek, D.C. (2005). Avidity for antigen shapes clonal dominance in CD8⁺ T cell populations specific for persistent DNA viruses. *J Exp Med* 202, 1349-61.

Probst-Kepper, M., Hecht, H.J., Herrmann, H., Janke, V., Ocklenburg, F., Klempnauer, J., van den Eynde, B.J., Weiss, S. (2004). Conformational restraints and flexibility of 14-meric peptides in complex with HLA-B*3501. *J Immunol* 173, 5610-6.

Purcell, A.W., Elliott, T. (2008). Molecular machinations of the MHC-I peptide loading complex. *Curr Opin Immunol* 20, 75-81.

Rammensee, H.G., Falk, K., Rotzschke, O. (1993). Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu Rev Immunol* 11, 213-44.

Rammensee, H.G., Friede, T., Stevanović, S. (1995). MHC ligands and peptide motifs: first listing. *Immunogenetics* 41, 178-228.

Rock, K.L., Shen, L. (2005). Cross-presentation: underlying mechanisms and role in immune surveillance. *Immunol Rev* 207, 166-83.

Romero, P., Corradin, G., Luescher, I.F., Maryanski, J.L. (1991). H-2Kd-restricted antigenic peptides share a simple binding motif. *J Exp Med* 174, 603-12.

Sallusto, F., Lenig, D., Forster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A. (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708-12.

Seifert, U., Maranon, C., Shmueli, A., Desoutter, J.F., Wesoloski, L., Janek, K., Henklein, P., Diescher, S., Andrieu, M., de la Salle, H., Weinschenk, T., Schild, H., Laderach, D., Galy, A., Haas, G., Kloetzel, P.M., Reiss, Y., Hosmalin, A. (2003). An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat Immunol* 4, 375-9.

Sercarz, E.E., Lehmann, P.V., Ametani, A., Benichou, G., Miller, A., Moudgil, K. (1993). Dominance and crypticity of T cell antigenic determinants. *Annu Rev Immunol* 11, 729-66.

Shen, L., Sigal, L.J., Boes, M., Rock, K.L. (2004). Important role of cathepsin S in generating peptides for TAP-independent MHC class I crosspresentation in vivo. *Immunity* 21, 155-65.

Sijts, A.J., Pamer, E.G. (1997). Enhanced intracellular dissociation of major histocompatibility complex class I-associated peptides: a mechanism for optimizing the spectrum of cell surface-presented cytotoxic T lymphocyte epitopes. *J Exp Med* 185, 1403-11.

Sijts, A.J., Pilip, I., Pamer, E.G. (1997). The *Listeria monocytogenes*-secreted p60 protein is an N-end rule substrate in the cytosol of infected cells. Implications for major histocompatibility complex class I antigen processing of bacterial proteins. *J Biol Chem* 272, 19261-8.

Sourdive, D.J., Murali-Krishna, K., Altman, J.D., Zajac, A.J., Whitmire, J.K., Pannetier, C., Kourilsky, P., Evavold, B., Sette, A., Ahmed, R. (1998). Conserved T cell receptor repertoire in primary and memory CD8 T cell responses to an acute viral infection. *J Exp Med* 188, 71-82.

Speir, J.A., Stevens, J., Joly, E., Butcher, G.W., Wilson, I.A. (2001). Two different, highly exposed, bulged structures for an unusually long peptide bound to rat MHC class I RT1-Aa. *Immunity* 14, 81-92.

Uebel, S., Kraas, W., Kienle, S., Wiesmuller, K.H., Jung, G., Tampe, R. (1997). Recognition principle of the TAP transporter disclosed by combinatorial peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 8976-81.

Unanue, E.R. (1997). Studies in listeriosis show the strong symbiosis between the innate cellular system and the T-cell response. *Immunol Rev* 158, 11-25.

van Endert, P.M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A., Bach, J.F. (1995). The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. *J Exp Med* 182, 1883-95.

Vijh, S., Pamer, E.G. (1997). Immunodominant and subdominant CTL responses to *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol* 158, 3366-71.

Wang, X.L., Altman, J.D. (2003). Caveats in the design of MHC class I tetramer/antigen-specific T lymphocytes dissociation assays. *J Immunol Methods* 280, 25-35.

Wearsch, P.A., Cresswell, P. (2007). Selective loading of high-affinity peptides onto major histocompatibility complex class I molecules by the tapasin-ERp57 heterodimer. *Nat Immunol* 8, 873-81.

Weissleder, R., Tung, C.H., Mahmood, U., Bogdanov, A., Jr. (1999). In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol* 17, 375-8.

Whelan, J.A., Dunbar, P.R., Price, D.A., Purbhoo, M.A., Lechner, F., Ogg, G.S., Griffiths, G., Phillips, R.E., Cerundolo, V., Sewell, A.K. (1999). Specificity of CTL interactions with peptide-MHC class I tetrameric complexes is temperature dependent. *J Immunol* 163, 4342-8.

Yewdell, J.W. (2006). Confronting complexity: real-world immunodominance in antiviral CD8+ T cell responses. *Immunity* 25, 533-43.

Yewdell, J.W., Bennink, J.R. (1999). Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu Rev Immunol* 17, 51-88.

York, I.A., Rock, K.L. (1996). Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu Rev Immunol* 14, 369-96.

Zehn, D., Lee, S.Y., Bevan, M.J. (2009). Complete but curtailed T-cell response to very low-affinity antigen. *Nature* 458, 211-4.

10 Danksagung

Am Schluss möchte ich die Gelegenheit nutzen, all den Menschen zu danken, die mich auf dem Weg unterstützt haben diese Arbeit zu verfassen.

Mein erster Dank geht an meinen Doktorvater Dirk Busch, der es mir ermöglicht hat, an diesem interessanten und spannenden Thema zu arbeiten. Er verstand es auf eine motivierende, unterstützende, jedoch durchaus auch kritische Art und Weise, meine Arbeit zu bereichern. Seine Kompetenz als Führungspersönlichkeit hat mich tief beeindruckt.

Weiter geht ein großer Dank an all die Kollegen der AG Busch. Insbesondere an Robert Knall für die Einarbeitung, an Matthias Schiemann und Katleen Wild für die Sorts, an Florian Anderl, Magdalena Nauerth, Georg Dössinger, Christian Stemberger, Michael Neuenhahn, Anja Kriegeskorte, Friedemann Gebhardt, Lydia Frimmer, Martina Koffler und Anna Hochholzer für die kommunikative, wissenschaftliche und freundschaftliche Atmosphäre.

Meinen Freunden danke ich für die nötige Ablenkung von Labor und Uni.

Ich möchte meinen Eltern Barbara und Michael danken, ohne die ich vieles im Leben nicht erreicht hätte. In gewisser Weise ist diese Arbeit auch ihr Verdienst.

Ein ganz besonderer Dank geht an Miriam, nicht nur für ihre Geduld und das Verständnis, wenn es mal wieder etwas später wurde, sondern auch für die Liebe, die Sie mir geschenkt hat.