

**Interaktion des humanen CD8
mit MHC Klasse I und CD3/TCR**

Von dem Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biochem. Kerstin Potthast,
geboren am 30. Oktober 1967
in Dortmund

2002

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover unter der Leitung von Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt in der Arbeitsgruppe von Dr. Torsten Witte im Zeitraum vom 15.02.1999 bis zum 27.11.2002 angefertigt.

Referenten dieser Arbeit sind:

Referent: Prof. Dr. W. Müller

Koreferent: Prof. Dr. K. Resch

Tag der Promotion: 14.01.03

Meinen Eltern und meinen Schwestern,
vor allem meiner jüngeren (Du weißt schon warum...)
gewidmet.

Zusammenfassung

Periphere Blut-Lymphozyten (PBL) exprimieren den CD8 $\alpha\alpha$ -Homo- und CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer-Korezeptor auf der Zelloberfläche. Jede CD8-Kette besteht aus einer Immunglobulin-Domäne (Ig), dem „connecting peptide“ (CP), einer Transmembran- (TM) und cytoplasmatische Domäne (cyt). Da CD8-Moleküle eine wesentliche Rolle in der Aktivierung von MHC Klasse I-restringierten T-Zellen haben, wurde ihre Expression und Korezeptorfunktion intensiv untersucht. Die bisherigen Studien zur Expression der CD8-wt-Ketten zeigten Unterschiede in der Expression der CD8 β -Kette in unterschiedlichen Zelllinien und in Abhängigkeit von der Spezies der CD8 β -Kette. Aktivierungsstudien ergaben, dass der CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer-Rezeptor eine 100fach geringere Peptid-Konzentration benötigt, um in der T-Zelle eine IL-2-Antwort auszulösen.

Ziel dieser Studie war es, Konstrukte zu generieren, in denen jeweils eine der vier Domänen einer Kette gegen die jeweilige der anderen Kette ausgetauscht wurde. Diese Konstrukte sollten stabil in einer Jurkat-Variante exprimiert werden. Die Expressionsstärke sollte über die an der Inhibition der Expression der CD8 β -Kette beteiligten Domänen Aufschluss geben. Die Konstrukte mit Austausch der TM- und cyt-Domäne (CD8 $\alpha\alpha\beta\alpha$, CD8 $\alpha\alpha\alpha\beta$) werden gegenüber CD8 α wt deutlich reduziert exprimiert. Dieser inhibitorische Effekt der TM- und cytoplasmatischen Domäne addiert sich durch die Kombination dieser beiden Domänen (CD8 $\alpha\alpha\beta\beta$). Der Effekt der β cyt-Domäne und die deutlich verringerte Expression des CD8 $\beta\alpha\alpha\beta$ -Konstruktes im Vergleich zu CD8 $\beta\alpha\alpha\alpha$ lässt auf das Mitwirken der Palmitoylierungssequenz in der cytoplasmatischen Domäne schließen.

MART-1- und TAX-spezifische T-Zell-Rezeptoren wurden auf CTL als CD8-abhängig beschrieben. Die Aktivierung dieser TCRs nach Transfektion in Jurkat ergab jedoch, dass beide Rezeptoren bei der Aktivierung zur IL-2-Produktion den CD8-Korezeptor nicht benötigten und schon ab einer Peptid-Konzentration von 10^{-7} - 10^{-8} M eine IL-2-Produktion induzierbar war. Es wurden daher 80 Mutanten des TAX-Peptids in der Aktivierung untersucht, da Veränderungen der Affinität des CD3/TCR mit Peptid/MHC Klasse I durch Mutationen des Peptids oder MHC Klasse I-Moleküls zu einer CD8-Abhängigkeit führen kann. Von den 80 Peptid-Mutanten zeigte das Nonapeptid mit Austausch des Valins in Position 7 gegen Isoleucin eine 7,5 x stärkere IL-2-Produktion in der CD8 $\alpha\alpha^+$ -Linie. Dieses Peptid hatte aber in der Aktivierung keinen Einfluss auf die CD8-Abhängigkeit des TCR. Die Peptidmutation in Position 4 Glycin gegen Alanin

lag mit der Induktion der IL-2-Produktion dagegen weit unterhalb des wt-Peptids. Der TCR wird in der Erkennung dieses Peptids CD8-abhängig. CD8 wird als Korezeptor demnach nur bei einer niedrigen Affinität vom TCR zum Peptid/MHC Klasse I-Komplex benötigt. Mit diesem Peptid lassen sich die CD8-Konstrukte in ihrer Funktionalität überprüfen.

Schlagworte: CD8, Expression, Aktivierung

Abstract

On peripheral blood lymphocytes the CD8 $\alpha\alpha$ - homo- and CD8 $\alpha\beta$ -heterodimer-coreceptor is expressed on the cell surface. Each of the CD8-chains consists of four domains: An immunoglobulin-domain (Ig), the “connecting-peptide“ (CP), a transmembrane- (TM) and a cytoplasmic (cyt) domain. Because of the important role of CD8-molecules in activation of MHC class I restricted T cells, the expression and coreceptor-function had been examined extensively. Until now, expression data concerning the CD8 β -chain differ between cell lines and the species of transfected CD8 β -chain. Activation studies revealed that the CD8 $\alpha\beta$ -heterodimer receptor is activated through a peptide concentration 100 fold less than necessary for the CD8 $\alpha\alpha$ -homodimer to induce an IL-2 response.

The aim of the study was to engineer constructs in which every single CD8-domain of CD8 α was exchanged against the corresponding domain of CD8 β -chain and vice versa. These constructs were stably expressed in a Jurkat-variant. The difference in cell surface expression should reveal the inhibiting influence of the different domains in CD8 β cell surface expression. The constructs CD8 $\alpha\alpha\beta\alpha$, CD8 $\alpha\alpha\alpha\beta$ were diminished in expression compared to CD8 α -wt. This inhibitory effect of the TM and cytoplasmic domain in combination was additive (CD8 $\alpha\alpha\beta\beta$). The effect of β cyt and the diminished expression of the CD8 $\beta\alpha\alpha\beta$ -construct compared to CD8 $\beta\alpha\alpha\alpha$ suggests a functional relevance of the palmitoylation sequence.

MART-1 and TAX specific T cell receptors are described as CD8-dependent on CTL in literature. But activation of these TCR in Jurkat revealed that these receptors are CD8 independent on Jurkat cells. Both TCR's induced an IL-2 response at a peptide-concentration of 10^{-7} - 10^{-8} M. 80 TAX-peptide-mutants were generated because changes in the affinity between CD3/TCR and peptide/MHC class I through peptide- or MHC class I-mutations induce a different reaction of cytotoxic T cells. The nonapeptide with exchange of valine into isoleucine in position 7 induced a 7.5 fold increased IL-2 production in CD8 $\alpha\alpha^+$ expressing cells, without generating CD8-dependency of the TCR. Peptide mutation from glycine to alanine in position 4 reduced the IL-2-response compared to TAX-wt and the TCR became CD8-dependent. The CD8-coreceptor seems only to be required for low affinity-contacts between TCR and peptide/MHC class I complex. It is possible to investigate the functional relevance of CD8-constructs using this peptide.

Keywords: CD8, expression, activation.

1	Einleitung	1
1.1	T-Zellen und NK-Zellen	1
1.2	Struktur der humanen CD8-Korezeptoren	2
1.3	Funktion der CD8-Dimere	4
1.3.1	Entwicklung der CD4 ⁺ CD8 ⁺ -Thymozyten zu CD8 ⁺ -T-Zellen im Thymus	4
1.3.2	Funktion des CD8-Korezeptors in der Signaltransduktion	4
1.3.3	Reifung naiver CD8-T-Zellen zur cytotoxischen T-Zelle	5
1.3.4	Funktion der cytotoxischen T-Zelle	5
1.4	Expression der CD8-wt-Ketten	6
1.5	Interaktion des CD8-Korezeptors mit Peptid/MHC Klasse I Komplex	8
1.6	Interaktion des CD8-Korezeptors mit CD3/TCR	9
1.7	Zielsetzung	11
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Eukaryontische Zelllinien	13
2.1.2	<i>E. coli</i> -Bakterienstämme	13
2.1.3	Plasmide	14
2.1.4	Oligonukleotide	15
2.1.5	Zusätze für RT-PCR	16
2.1.6	Antikörper	16
2.1.7	Monoklonale Antikörper	17
2.1.8	Peptide	17
2.1.9	Kulturmedien und -Zusätze	18
2.1.9.1	Zell-Kultur	18
2.1.9.2	Bakterien-Kultur	19
2.1.10	Puffer und Lösungen	19
2.1.10.1	Molekularbiologische Arbeiten	19
2.1.10.2	Proteinchemische Arbeiten	20
2.1.10.3	Immunbiologische Arbeiten	22

2.1.11	Aktivierungsassay	23
2.1.12	Kits	23
2.1.12.1	Molekularbiologische Arbeiten	23
2.1.12.2	Aktivierungsassay	24
2.1.13	Molekulargewichtsstandards	24
2.1.13.1	Molekularbiologische Arbeiten	24
2.1.13.2	Proteinchemische Arbeiten	24
2.1.14	Chemikalien	24
2.1.15	Sonstige Materialien	26
2.1.16	Geräte	27
2.2	Methoden	29
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.1.1	DNA-Isolation aus Suspensionszellen	29
2.2.1.2	RNA-Isolierung aus Suspensionszellen	29
2.2.1.3	Agarosegelelektrophorese für DNA, Plasmide	29
2.2.1.4	RNA-Gelelektrophorese	30
2.2.1.5	RT-Reaktion und PCR	30
2.2.1.6	Polymerase-Kettenreaktion	31
2.2.1.7	Verknüpfungsreaktion und anschließende PCR	31
2.2.1.8	Aufreinigung von PCR-Produkten und DNAs aus präparativen Verdaus	32
2.2.1.9	Restriktionsendonuklease-Verdaus	32
2.2.1.10	Partieller Verdaus	33
2.2.1.11	Phenolextraktion	33
2.2.1.12	DNA-Präzipitation	34
2.2.1.13	Ligation	34
2.2.1.14	Ca ²⁺ -kompetente XL-blue	35
2.2.1.15	Transformation	35
2.2.1.16	Mini-Präparation	35
2.2.1.17	Maxi-Präparation	36
2.2.1.18	DNA-Gehaltsbestimmung	37
2.2.2	Zellbiologische Methoden	37
2.2.2.1	Ermittlung der Zellzahl	37
2.2.2.2	Einfrieren von Zellkulturzellen	38

2.2.2.3	Behandlung der Jurkat-Suspensionszellen mit Ciprofloxacin	38
2.2.2.4	Auftauen von Fusionszellen	38
2.2.2.5	Passagieren von Suspensionszellen	38
2.2.2.6	Passagieren von adhärenente Zellen	39
2.2.2.7	Separation von PBL aus Vollblut	39
2.2.2.8	Transfektion der Jurkat RT3-Linie	40
2.2.2.9	Selektion der transfizierten Jurkat RT3	40
2.2.2.10	Subklonierung von Transfektanten	40
2.2.2.11	Anreicherung positiver Zellen durch magnetische Beads (MACS)	41
2.2.2.12	Transiente Transfektion von COS-7	41
2.2.2.13	Aktivierungsassay	42
2.2.3	Proteinchemische Methoden	43
2.2.3.1	Biotinylierung der Jurkat-Transfektanten	43
2.2.3.2	Lyse der biotinylierten Zellen	43
2.2.3.3	Immunopräzipitation	43
2.2.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
2.2.3.5	Gelfärbung	44
2.2.3.6	Western-Blot	45
2.2.3.7	ECL-Färbung des Blots	45
2.2.4	Durchflusszytometrie (FACS)	45
2.2.4.1	Durchflußzytometrische Analysen	46
2.2.4.2	Immunfluoreszenz	47
2.2.4.3	Trypsinbehandlung der Zelloberflächen und intrazelluläre Antikörperfärbung	47
2.2.5	Quantitative Erfassung des IL-2 im Zellkulturüberstand nach Aktivierung	48
2.2.5.1	Quantitativer auf Durchflusszytometrie beruhender Immuno- Assay-Kit	48
2.2.5.2	Bestimmung der IL-2-Konzentration über die IL-2-abhängige Ratten-Linie G2	48
3	Ergebnisse	50
3.1	Mutation, Transfektion und Expression der CD8wt-DNAs und CD8 Konstrukte	50

3.1.1	Untersuchung der Jurkat-wt und HSA5-Linie auf Oberflächenexpression von TCR und CD28	55
3.1.2	Kotransfektion der Jurkat-Linie HSA5 mit CD8-wt-Ketten	56
3.1.3	Oberflächenantigene der Jurkat-Linien RT3 im Vergleich zu Jurkat-wt	57
3.1.4	CD8-Transfektanten der Jurkat-Linie RT3 RSD3	59
3.1.5	Herstellung von Zelllinien mit Expression von CD8-Konstrukten	61
3.1.5.1	Austausch einzelner Domänen	61
3.1.5.2	Expression der CD8-Konstrukte mit je zwei Domänen einer Kette	63
3.1.6	Oberflächenfärbung der CD8-Konstrukte mit α Ig- β CP-Anteil	64
3.1.7	Oberflächenfärbung von CD8 α -wt und CD8 $\alpha\beta\alpha\alpha$ mit dem CD8-Panel aus Leukocyte Typing IV auf COS-7	67
3.1.8	Extra- und intrazelluläre Färbung von PBL und CD8-wt-Jurkat-Transfektanten	68
3.1.9	Expression von CD8-Ketten auf COS-7-Zellen	70
3.2	Funktionelle Untersuchung der T-Zell-Rezeptor-positiven Linien	73
3.2.1	Jurkat-Linie HSA5, spezifisch für MART-1-Peptid	73
3.2.2	Bestimmung der CD8-Abhängigkeit der HSA5-Grundlinie	73
3.2.3	Aktivierungsstudie der verschiedenen Jurkat-Varianten mit verschiedenen APCs	76
3.2.4	Vergleich der HSA5-Transfektanten CD8 α und CD8 $\alpha\beta$ im Aktivierungsprofil	79
3.2.5	Aktivierung der RSD3-TCR-Transfektante der Jurkat Linie RT3	80
3.2.6	Stimulation von JRT3RSD3 und -CD8-Kotransfektanten mit monoklonalen Antikörpern	81
3.2.7	Aktivierung der Linie JRT3RSD3 und der CD8-wt-Kotransfektanten im Vergleich	82
3.2.8	Funktionelle Charakterisierung von 80 TAX-Peptid-Mutanten	83
3.2.9	Screening der Linien CD8 $^{-}$ - und CD8 $\alpha\alpha$ -JRT3RSD3 mit 80 Peptid-Mutanten	84
3.2.10	Quantitative IL-2-Messung über die IL-2-abhängige Zelllinie G2	89
3.2.11	Induktion der Aktivierung der CD8 $^{+}$ und CD8 $\alpha\alpha$ exprimierender JRT3 RSD3 Linie mit TAX-Mutanten L1M und G4A	90

3.3	Immunpräzipitation von CD8α-wt	93
3.4	Untersuchung der Jurkat-Grundlinien hinsichtlich der Expression von KIRs	95
4	Diskussion	99
4.1	Expression der CD8-wt-Ketten im Vergleich zu den generierten CD8-Konstrukten	99
4.2	Aktivierung der als CD8-abhängig beschriebenen MART-1- und TAX-TCR	105
4.3	Aktivierung der TCR⁻-Linie durch MART-1	109
5	Ausblick	111
6	Abkürzungsverzeichnis	112
7	Literatur	114
8	Lebenslauf	121
9	Danksagung	123

1 Einleitung

1.1 T-Zellen und NK-Zellen

T-Zellen sind in verschiedene Gruppen unterteilt, die je nach Funktion und Expression der T-Zell-Rezeptorarten und Korezeptoren unterschieden werden. Sie sind nötig, um körperfremde Peptide aufzuspüren, die von den meisten Körperzellen auf sogenannten Haupt-Histokompatibilitätskomplexen (MHC) bei Infektionen durch pathogene Erreger präsentiert werden. Ihre Aufgabe ist es, die Infektionserreger zu eliminieren. Grob lassen sich reife T-Zellen in CD8- und CD4-exprimierende T-Zellen untergliedern.

Die CD4⁺-T-Zellen sind MHC Klasse II restringiert, was bedeutet, dass ihr T-Zell-Rezeptor (TCR) in der Reifung mit MHC Klasse II Kontakt hatte und dadurch die CD4⁺-T-Zellen zur Proliferation anregte. Ihr TCR bindet an MHC Klasse II-Molekülen, die mit Peptiden von vor allem extrazellulären Erregern beladen sind. CD4⁺-T-Zellen werden in T_H1- und T_H2-Zellen eingeteilt. Die Aufgabe der T_H1-Zellen besteht im wesentlichen darin, zügig infizierte Makrophagen zu aktivieren, die körperfremde Peptide präsentieren, weil sie z. B. Pathogene phagozytiert und lysiert haben. T_H2-Zellen binden diese körperfremden Peptide auf MHC Klasse II-Molekülen von B-Zellen, die durch diesen Kontakt so stimuliert werden, dass sie letzten Endes zu Immunglobulin-bildenden Plasmazellen heranreifen. Sie bilden die spätere, humorale Antwort auf Infektionen. Die Anwesenheit des CD4-Korezeptors ist nötig, um eine effektive Signaltransduktion auszulösen (60).

Die CD8⁺-T-Zellen sind in ihrer Thymusreifung durch MHC Klasse I restringiert worden (1). CD8⁺-T-Zellen können virus- oder mit cytosolischen Pathogenen infizierte Zellen töten und damit eine Ausbreitung der Infektion verhindern. Sie lassen sich in verschiedene Subklassen unterteilen. Der größte Anteil der CD8⁺-T-Zellen exprimiert einen T-Zell-Rezeptor, der aus einer TCR- α - und einer - β -Kette besteht. $\alpha\beta$ -TCR exprimierende T-Zellen, die auf ihrer Oberfläche CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimere alleine exprimieren, finden sich innerhalb von Epithelien, z. B. Schleimhäuten, und werden auch intraepitheliale Lymphozyten (IEL) genannt (3). CD8 $\alpha\alpha$ -Homo- und CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimere exprimierende $\alpha\beta$ -TCR-Lymphozyten zirkulieren im peripheren Blut (PBL)(1). $\gamma\delta$ -TCR-exprimierende T-Zellen tragen zum großen Teil keinen CD8-Korezeptor, ein kleinerer Teil exprimiert das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer auf ihrer

Zelloberfläche. Sie erkennen MHC-ähnliche Moleküle, die hydrophobe Lipid- und Glykolipidantigene von z. B. Bakterien in ihrer Bindungsstelle präsentieren (2).

CD8 α^+ -TCR $^-$ -Lymphozyten werden aufgrund ihrer cytotoxischen Funktion auch Natürliche Killerzellen (NK) genannt (3). Sie benötigen den Kontakt mit einer konstanten Anzahl an MHC Klasse I-Molekülen, die körpereigene Peptide präsentieren, um in ihrem Ruhezustand zu bleiben. Durch diesen Kontakt bleiben sie cytotoxisch inaktiv und die Zielzelle wird nicht zerstört.

1.2 Struktur der humanen CD8-Korezeptoren

Die CD8-Korezeptoren werden als glykosylierte Typ I Oberflächenproteine exprimiert und gehören zur Immunglobulin-Superfamilie. Auf CD8 $^+$ -Lymphozyten werden zwei verschiedene CD8-Korezeptoren gebildet: das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer und das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer. Beide CD8-Ketten lassen sich in vier Domänen einteilen. Extrazellulär bestehen sie N-terminal aus einer Immunglobulindomäne (Ig), der die Stielregion („connecting peptide“, CP) folgt. Die Transmembran-Domäne (TM) verbindet die extrazelluläre mit der cytosolischen (cyt), in der Signaltransduktion aktiven Domäne (4,5). Die zwei Ig-Domänen des CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimers formen eine Struktur, die stark der variablen Antikörperregion ähnelt (4,6). Der Kontaktbereich dieser Ig-Anteile ähnelt in seiner Struktur den CDR-Regionen (komplementaritätsbestimmenden Regionen) des T-Zell-Rezeptors, der darüber den Peptid/MHC-Komplex bindet (7). Die Studie über den Kokristall des murinen CD8 α -Ig mit löslichem MHC Klasse I von Kern *et al.* deckte die Interaktion der CD8 α -Ig-Domäne mit der $\alpha 2$ -Domäne des MHC Klasse I α -Kette auf (4). Die Kristallisationsstudie von Gao *et al.* zeigte darüber hinaus, dass humanes CD8 $\alpha\alpha$ mit der $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Domäne des MHC interagiert und zusätzlich mit $\beta 2$ -Mikroglobulin des MHC Klasse I in Kontakt tritt (7). Auf der CD8 α -Kette ist die CP-Region mit 48 Aminosäuren und auf der CD8 β -Kette mit 26 Aminosäuren vergleichbar lang. Die CP-Region enthält zahlreiche O-Glykosylierungsstellen und in der Nähe der Zellmembran Cysteine, die bei der Disulfidbrückenbildung der Dimere benötigt werden (5). Für die Oberflächenexpression von CD8 α wie auch für CD8 β ist nicht nur die Dimerisierung von entscheidender Bedeutung. Für die CD8 β -Oberflächenexpression ist zusätzlich die Anwesenheit der CD8 α -Kette notwendig. Ein mögliches Retentionssignal in der TM-Domäne der β -Kette scheint dafür zu sorgen, dass CD8 β -Monomere nicht auf die Zelloberfläche gelangen (8). Die cytoplasmatische

Domäne der CD8 α -Kette enthält ein Motiv, das für die Assoziation mit der Tyrosinkinase p56^{lck} sorgt (9), während für diese Region der CD8 β -Kette keine Proteinbindungsmotive bekannt sind (10). Dafür wurde erst kürzlich eine Palmitoylierungssequenz im cytosolischen Rest der CD8 β -Kette charakterisiert, die es dem CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer ermöglicht, in hochgeordnete Strukturen der Zellmembran („rafts“) zu driften (11) und dort mit TCR/CD3 zu assoziieren (12). Diese „rafts“ bestehen aus einem hohen Anteil kurzer gesättigter Fettsäuren wie Palmitin- und Myristinsäure und sind dadurch charakterisiert, dass die Phosphatase CD45 dort keinen Zugang hat. So wird es der CD8 α -Kette des Dimers ermöglicht, in eine enge räumliche Nähe der dort vorliegenden Tyrosinkinase p56^{lck} zu gelangen und effizienter phosphoryliert und damit aktiviert zu werden (12).

Abb. 1 stellt eine Skizze der Interaktion von CD8 mit CD3/TCR-Peptid/MHC Klasse I-Komplex dar.

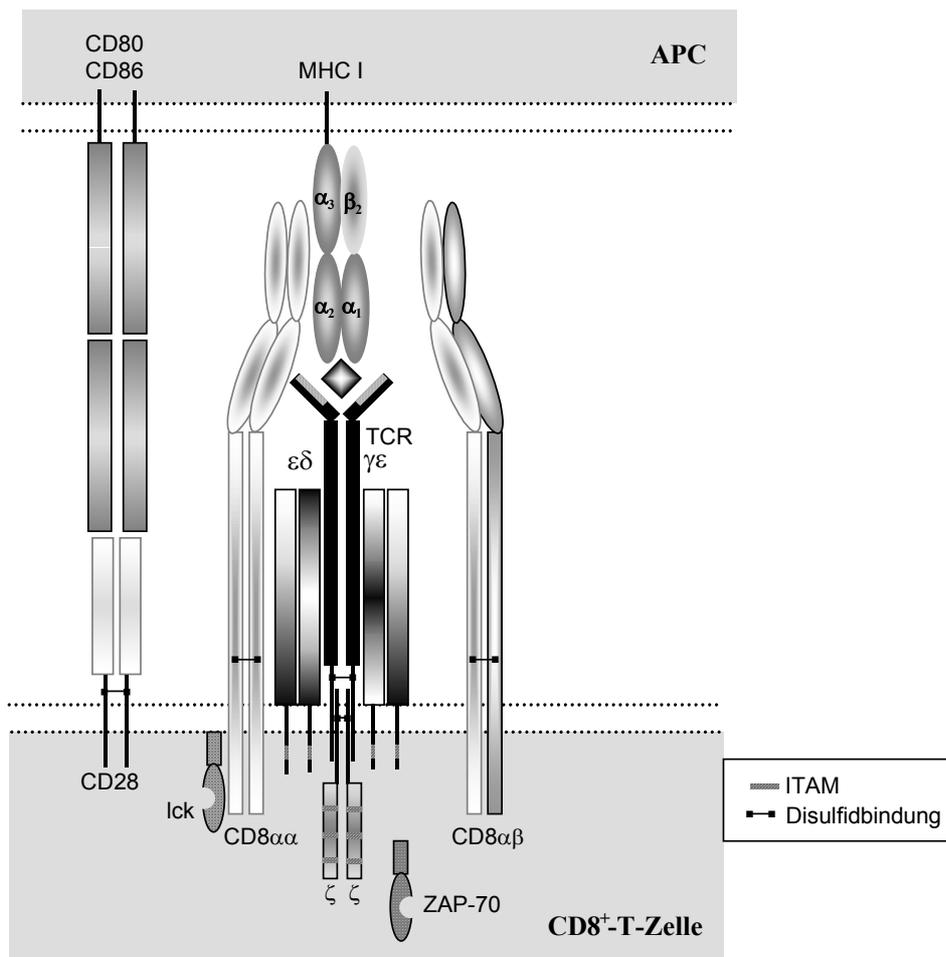


Abb.1: Skizze einiger am Kontakt zwischen CD8⁺-T-Zelle und APC beteiligter Moleküle. In der Skizze sind die wichtigsten gebundenen Oberflächenproteine und einige intrazytoplasmatischen Kinasen dargestellt. Tyrosinkinase lck = p56^{lck}, ZAP-70 = Zeta-assoziiertes Protein, TCR = T-Zell-Rezeptor, MHC I = MHC Klasse I.

1.3 Funktion der CD8-Dimere

1.3.1 Entwicklung der CD4⁺CD8⁺-Thymozyten zu CD8⁺-T-Zellen im Thymus

Die CD4- und CD8-Korezeptoren haben eine wichtige Funktion in der Thymusreifung. Im CD4⁺CD8⁺ doppelt positiven (DP) Stadium sterben Thymozyten, wenn sie nicht an Selbst-MHC-Komplexen binden („death by neglect“). Noch in diesem DP-Stadium gelangen sie in einen proliferierenden Status, wenn sie Selbst-MHC erkennen. Thymozyten, die mit hoher Avidität Peptid/MHC erkennen, werden negativ selektioniert. Nur die wenigen Zellen, die Peptid/MHC mit niedriger Avidität erkennen, überleben. Dabei werden die DP-Thymozyten zu CD4⁺ einfach positiven (SP) T-Zellen, wenn sie MHC Klasse II-Moleküle erkennen. Diejenigen, die MHC Klasse I erkennen, werden zu CD8⁺-T-Zellen (15). Bei der Entscheidung, in welche SP-T-Zelle die DP-Zellen differenzieren soll, spielt außerdem die Expression von Genen, die die jeweilige Funktion der Zellen programmieren, eine wesentliche Rolle (16).

1.3.2 Funktion des CD8-Korezeptors in der Signaltransduktion

Durch die Bindung von Peptid/MHC Klasse I Komplex an TCR/CD3 und CD8 werden eine Reihe von Effektorfunktionen ausgelöst. Dazu zählen die Bildung von verschiedenen Zytokinen, die die Aktivierung von Makrophagen und die eigene Proliferation auslösen, und die Tötung der infizierten Zielzelle. Durch den engen Kontakt von CD8⁺-T-Zelle mit der Zielzelle wird eine Schädigung des umliegenden Gewebes ausgeschlossen und der entstehende Schaden so gering wie möglich gehalten (30). Die Nähe der CD8-Moleküle zum TCR/CD3-Komplex bewirkt eine starke Aktivierung der CD8⁺-T-Zelle, da die mit CD8-assoziierte Tyrosin-Proteinkinase p56^{lck} in enge räumliche Nähe zur CD3ζ-Kette gelangt. So werden schnell und effizient die ITAMs (immunoreceptor-tyrosine-based motifs) der CD3ζ- und der CD3ε- Kette während des Kontakts des TCR/CD3/CD8-Komplexes mit Peptid/MHC Klasse I phosphoryliert (13). Durch die phosphorylierte CD3ζ-Kette wird das ZAP-70-Molekül (zeta-assoziiertes Protein), von p56^{lck} phosphoryliert und die Signalkaskade bis zu den Transkriptionsfaktoren in Gang gesetzt (60).

Die CD8-Dimere haben aber nicht nur die Funktion, die Aktivierung des TCR-CD3-Komplexes bei der Bindung von MHC Klasse I-Peptide-Komplex zu verstärken, sondern auch diesen Komplex zu stabilisieren (14) und eine ausreichende Signaltransduktion zu ermöglichen.

1.3.3 Reifung naiver CD8⁺-T-Zellen zur cytotoxischen T-Zelle

Reife, naive CD8⁺-T-Zellen werden nach dem ersten Kontakt (Priming) mit fremdem Peptid auf MHC-Klasse I-Molekülen im ersten Schritt zunächst zur Proliferation aktiviert und differenzieren dann zu bewaffneten Effektorzellen (17). Dieser Kontakt findet in lymphoiden Organen statt, in denen auf antigenpräsentierenden, überwiegend dendritischen Zellen (APC) das körperfremde Peptid auf MHC Klasse I gebunden wird. Für diesen ersten Kontakt sind weitere Oberflächenmoleküle nötig. Die APC exprimieren auf ihrer Oberfläche CD80/CD86 (B7.1/B7.2) das den Korezeptor CD28 auf den CD8⁺-T-Zellen bindet und das zweite stimulierende Signal auslöst (18). Fehlt die Aktivierung dieses zweiten Korezeptors bei einem schwachen Antigen (27), so wird dieser Kontakt die CD8⁺-T-Zelle zur toleranten Zelle machen, die damit auf dieses Peptid nicht mehr reagieren kann (Anergie) (19). Durch das stimulierende Signal des CD28-Moleküls wird die Proliferation über die Interleukin-2-Synthese (IL-2) und die Veränderung der IL-2-Rezeptor-Zusammensetzung angeregt. So können auch geringe Mengen des gebildeten IL-2 einen wesentlich affineren IL-2-Rezeptor binden und die CD8-T-Zelle zur klonalen Expansion und Differenzierung anregen (18). Exprimiert die Zelle, die das Antigen gebunden hat, wenig MHC Klasse I oder Korezeptoren, so können CD4⁺-T-Zellen zur Hilfe kommen, die über Peptid/MHC Klasse II die antigenpräsentierende Zelle anregen, mehr kostimulatorische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Damit kommt doch noch die Aktivierung der CD8⁺-T-Zelle zustande (20).

1.3.4 Funktion der cytotoxischen T-Zelle

Kommt es zu einem Kontakt zwischen einer bewaffneten CD8⁺-T-Zelle mit einer infizierten, antigentragenden Zelle, so reorganisiert das Cytoskelett der cytotoxischen T-Zelle und die lytischen Granula formieren sich im Kontaktbereich zur Zielzelle, wo sie dann auch freigesetzt werden (21, 22). Die Granula enthalten einen Vorrat an Perforin, das in der Membran der Zielzelle Poren bildet. Durch diese Poren gelangen Granzyme, die ebenfalls in den Granula gespeichert sind, in die Zielzelle (23). Eines davon ist das Granzym B, eine Serin-Protease, die eine ubiquitär vorkommende Caspase in ihre aktive Form spaltet. Daraufhin wird wiederum eine Nuklease aktiviert, die mit der Degradation der DNA beginnt. So wird der Zelltod (Apoptose) eingeleitet, dessen Hauptmerkmal die Bildung von 200 Basenpaaren (bp) großen DNA-Fragmenten ist

(24). Wenn die cytotoxische T-Zelle (CTL) diese Granula freisetzt, werden die Inhaltsstoffe erneut synthetisiert. So kann ein einziger CTL innerhalb von 5 Minuten in einer Zielzelle Apoptose auslösen und dann zur nächsten wandern, wo das Gleiche von vorne beginnt. Außer über diesen Weg der Granulafreisetzung kann das Signal für die Apoptose auch über den Fas-Liganden der CD8-T-Zellen an die Zielzellen über den Rezeptor Fas weitergegeben werden (25).

Neben IL-2 produzieren cytotoxische T-Zellen auch andere Cytokine, wie IFN- γ , TNF- α und TNF- β , die nun wiederum andere Zellen in ihrer Funktion oder Proliferation anregen. IFN- γ aktiviert Makrophagen, mehr MHC Klasse I zu exprimieren und induziert die NO-Produktion (26). Es wirkt weiterhin direkt inhibierend auf die virale Replikation und hat eine wichtige Funktion in der Aushungerung von intrazellulären Parasiten durch Tryptophanabnahme in der infizierten Zelle. TNF- α und - β wirken synergistisch auf die Makrophagenaktivierung und töten manche Zielzellen direkt über TNF-Rezeptoren (27).

1.4 Expression der CD8-wt-Ketten

Da CD8-Moleküle eine wesentliche Rolle in der Aktivierung von MHC Klasse I-restringierten T-Zellen haben, wurde ihre Expression intensiv untersucht. Die bisherigen Studien zur Expression der CD8-wt-Ketten zeigten Unterschiede in der Expression der CD8 β -Kette in unterschiedlichen Zelllinien und in Abhängigkeit von der Spezies der CD8 β -Kette.

Devine *et al.* (2000) untersuchten in ihrer Studie die Expression der CD8 α - und CD8 β -Einzelketten sowie die Kotransfektion von CD8 α und CD8 β (sowohl humaner als auch muriner Ketten) in der Nierenfibroblasten-Linie COS-7 (29). Transient transfizierte Zellen exprimierten auf ihrer Zelloberfläche sowohl humane als auch murine CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimere und CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimere. Bei der Expression der β -Kette zeigte sich ein Unterschied bei der verwendeten Spezies. Während die humane (h) CD8 β -Kette als Homodimer auf der Oberfläche exprimiert wurde, konnte die murine (m) CD8 β -Kette nicht nachgewiesen werden. Für die nähere Untersuchung, welche der vier Domänen für diesen Verlust der Expression auf der Oberfläche verantwortlich sein könnte, tauschten sie die murine β -Ig-Domäne gegen die humane β -Ig-Domäne und umgekehrt die humane gegen die murine β -Ig-Domäne aus. Das Konstrukt, das die murine β -Ig-

Domäne enthielt, konnte nicht von dem gegen die β -Kette gerichteten Antikörper auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Die für humanes CD8 β transgene Maus zeigte auf ihren PBL die Expression von mCD8 α /hCD8 β -Heterodimer, sowie hCD8 β ohne mCD8 α . Weiterhin konnten in den PBL dieser Tiere eine geringe Anzahl von mCD4/hCD8 β doppelt positiver Lymphozyten nachgewiesen werden. Es wurde gefolgert, dass die murine CD8 β -Ig-Domäne die Expression von CD8 β -Homodimeren inhibiert.

Im Gegensatz hierzu entdeckten Wheeler *et al.* (1992), dass die murine CD8 β -Kette auf einer Maus-Hybridoma-Linie exprimiert wird, wenn die TM- und die cytoplasmatische Domäne der β -Kette gegen die jeweiligen Domänen der α -Kette getauscht wurden (30). Sie führten die fehlende CD8 β -Homodimerexpression also nicht auf die murine β -Ig-Domäne zurück. Weiterhin ergab die Untersuchung dieses Konstruktes auf seine Korezeptorfunktion, dass dieses Dimer funktionell als Korezeptor des TCRs aktiv war. Hennecke *et al.* (1993) transfizierten COS-1-Zellen transient mit murinem CD8 α , CD8 α mit CD8 β und CD8 β einzeln (28). Sie konnten keine Oberflächenexpression des murinen CD8 β als Monomer oder Dimer nachweisen. Den Einfluss der einzelnen Domänen der beiden CD8-Ketten auf die Expression untersuchten sie durch mehrere Konstrukte, in denen gezielt die CD8 α -Ekto-, -Transmembran- oder -cytoplasmatische Domäne gegen Tac (α -Kette des IL-2-Rezeptors) oder CD8 β ausgetauscht wurden. Sie kamen zu dem Schluss, dass die funktionelle Bedeutung der β -TM-Domäne wahrscheinlich in der Retention von CD8 β -Monomeren liegt. Weiterhin zeigten sie, dass die Funktion der α -TM-Domäne in der Dimerisierung der CD8-Monomere liegt und dass die CD8 α -Ektodomäne für den Transport der Dimere aus dem Endoplasmatischen Retikulum notwendig ist. Die Dimerisierung des CD8 $\alpha\beta$ hebt die Retention von β -Monomeren durch die β -TM-Domäne auf und ermöglicht danach den Transport zum Golgi-Apparat.

1.5 Interaktion des CD8-Korezeptors mit Peptid/MHC Klasse I Komplex

Um eine CD8⁺ T-Zelle zu aktivieren, muss meist zusätzlich zum TCR auch CD8 an den Peptid/MHC Klasse I-Komplex binden und so die sonst niedrigaffine Interaktion von TCR und MHC stabilisieren.

Kristallisationsstudien und BIAcore-Studien zeigten, dass der CD8-Korezeptor den CD3/TCR-Peptid/MHC Klasse I-Komplex (14) durch die Bindung der CD8 α -CDR-ähnlichen Regionen an die $\alpha 2$ und $\alpha 3$ ähnliche Domänen sowie in schwächerer Form über das β_2 -Mikroglobulin stabilisiert (7). Eine flexible Schleife der MHC Klasse I $\alpha 3$ -Domäne ist zwischen zwei CDR-ähnlichen Schleifen zweier CD8 α -Moleküle eingeklemmt, was die Bindung eines weiteren MHC Klasse I an das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer ausschließt (6). Ein CD8-Molekül bindet also jeweils nur ein Peptid/MHC-Molekül. In diesen Studien wurden unterschiedliche Dimerformen der humanen bzw. murinen CD8 α -Ig-Domänen konstruiert und MHC Klasse I in löslicher Form mit β_2 -Mikroglobulin komplementiert. Bei den kristallographischen Daten zeigte der murine im Gegensatz zum humanen Komplex bei der Bindung von CD8 $\alpha\alpha$ an Peptid/MHC eine deutliche Konformationsänderung im Peptid-MHC Komplex (4, 16). Diese Spezies-Unterschiede zeigen sich beim Austausch der humanen gegen die murine $\alpha 3$ -Domäne. Eine für humanes MHC Klasse I transgene Maus mit murinem $\alpha 3$ -Anteil zeigte bei der Interaktion der spezifischen CTL eine dramatische Verbesserung der cytotoxischen Aktivität (32). Inwiefern die fehlende, energieaufwendige Konformationsänderung auf humaner Ebene von thermodynamischem Vorteil bei der Bindung des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers sein könnte, da die kürzere β -Kette möglicherweise die Kontaktstelle zu Peptid/MHC Klasse I präformiert, ist nach wie vor unklar. Es ist bis heute noch nicht gelungen, lösliches CD8 $\alpha\beta$ mit Peptid/MHC Klasse I zu kristallisieren.

In einer Aktivierungsstudie stellte sich heraus, dass CD8 $\alpha\beta$ ein 100fach effizienterer Korezeptor in der Erkennung von niedrigen Peptidkonzentrationen ist, als das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer (33). In der BIAcore-Untersuchung von Garcia *et al.* und Kern *et al.* hatten jedoch humanes und auch murines lösliches CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer im Vergleich zum CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer eine vergleichbare Affinität zu immobilisiertem MHC Klasse I (14, 34). Daher kann die bessere Korezeptorfunktion des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers nicht aus der Bindung an Peptid/MHC Klasse I-Komplex alleine kommen, sondern muss aus der Avidität aller beteiligter Komponenten CD8, TCR und MHC-Klasse I resultieren.

Devine *et al.* (1999) untersuchten in einer Adhäsionsstudie, welche Aminosäure-Mutationen im extrazellulären Anteil des humanen CD8 α bei der Bindung des MHC Klasse I funktionell von Bedeutung sind (35). Die Aminosäuren R4 und L25 stellten sich als existentiell für den Kontakt heraus. Die mit CD8 α R4A/CD8 α -wt transfizierten Linien zeigten im Vergleich zur CD8 α -wt transfizierten Linie keinen Unterschied in der Bindung. Dagegen banden CD8 α R4A/CD8 α R4A und CD8 α R4A/CD8 β deutlich schwächer und es war keine Adhäsion mehr zu beobachten. Daraus zogen sie den Schluss, dass die CD8 β -Ektodomäne keinen grossen Beitrag zur Bindung an MHC Klasse I leistet. Die stärkere Korezeptorfunktion des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers sollte ihrer Ansicht daher durch die TM-Domäne und cytoplasmatischen Anteil der CD8 β -Kette geleistet werde. Witte *et al.* (unveröffentlichte Daten) hingegen fanden in ihrer Aktivierungsstudie, dass die Mutationen K55A und G56A des murinen CD8 β -Ig-Anteils die IL-2-Produktion bei Stimulation drastisch reduziert. Auch Wheeler *et al.* (30) zeigten, dass die CD8 β -Ektodomäne in der Assoziation mit Peptid/MHC Klasse I-Komplex eine Funktion hat. Sie hatten ein Konstrukt aus extrazellulärem CD8 β -Anteil mit der TM- und cytoplasmatischen Domäne der CD8 α -Kette transfiziert und nachgewiesen, dass dieser Korezeptor aktiv war. In einer weiteren Arbeit stellte sich außerdem heraus, dass der gleichzeitige Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die CD3 ϵ -Kette die von CD8 $\alpha\beta$ induzierte IL-2-Produktion herabsetzte, nicht jedoch die von CD8 $\alpha\alpha$ (37).

1.6 Interaktion des CD8-Korezeptors mit CD3/TCR

Die Entwicklung von Thymozyten transgener Mäuse, die CD8 β ohne cytoplasmatische Domäne exprimierten, war in der Reifung von DP-Zellen zu CD8-SP-Zellen (39) behindert. Hier spielt die Aktivität der Ick, die durch CD8 β in „rafts“ verstärkt wird, eine wesentliche Rolle. So hängt die positive und negative Selektion der Thymozyten von der Ick-Interaktion mit CD4 und CD8 ab (39), auch wenn unreife Thymozyten im DP-Stadium „rafts“ nicht bei TCR-vermittelten Signalen polarisieren, wohl aber das Cytoskelett reorganisieren (40). In der neuesten Arbeit von Doucey *et al.* (paper in press) wurde deutlich, dass CD8 $\alpha\beta$, nicht aber CD8 $\alpha\alpha$ mit TCR assoziiert, und dass CD8 $\alpha\beta$ nicht mit einem TCR assoziieren kann, dem die CD3 δ -Kette fehlt. Durch Immunpräzipitationen wurde nachgewiesen, dass die CD3 δ -Kette CD8 $\alpha\beta$ und

TCR/CD3 in rafts miteinander verbindet und dass die CD3 δ -Kette aus dem CD3/TCR-Komplex mit CD8 β aus CD8 $\alpha\beta$ ko-immunopräzipitierbar ist (41). Ein weiterer Hinweis für die Interaktion zwischen der β -Kette des CD8 $\alpha\beta$ -Dimers und CD3 δ ist das Anhalten der Thymozytenentwicklung im Stadium der DP-Zellen (42) in CD3 $\delta^{-/-}$ Mäusen.

Eine weitere Interaktion des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers wiesen Naeher *et al.* nach (2002), die einen TCR konstruierten, der in der TCR- α -Kette einen Austausch des α -CPM-Motivs (α -chain connecting peptide motif) hatte (43). CD8 $\alpha\beta$ war daraufhin nicht mehr in der Lage, mit diesem T-Zell-Rezeptor zu interagieren. Thymozyten mit α -CPM defizientem TCR machen keine positive Selektion mehr durch.

1.7 Zielsetzung

Der CD8-Korezeptor wird als CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer oder CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer exprimiert und stabilisiert die Bindung des Peptid/MHC-Klasse I-Komplexes über verschiedene Aminosäurereste seiner Ig-Domänen. Die beiden unterschiedlichen Dimerformen zeigen keinen nennenswerten Unterschied in der Bindungsaffinität zu MHC Klasse I, aber einen deutlichen Unterschied bei der Aktivierung durch geringe Mengen von Peptid/MHC Klasse I-Komplexen. Ist die cytoplasmatische Domäne der CD8 β -Kette entfernt worden, so wird zwar 10 Mal mehr Peptid benötigt, um eine IL-2-Antwort auszulösen. Die Differenz zwischen der 100fach besseren Korezeptoraktivität des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers im Vergleich zum CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer ist damit aber nicht vollständig zu erklären. Die Expression eines humanen aber nicht murinen CD8 $\beta\beta$ -Homodimers wurde bisher nur auf COS-7-Zellen beobachtet, nicht jedoch auf T-Zell-Hybridomen oder PBL.

Ziel des Projektes war es, herauszufinden, welche Domäne für die fehlende CD8 $\beta\beta$ -Homodimerexpression verantwortlich ist und welche Domänen dem CD8 $\alpha\beta$ -Korezeptor seine höhere Empfindlichkeit gegenüber geringen Mengen von Peptid/MHC Klasse I-Komplexen verleiht.

Das Projekt gliederte sich dabei in folgende Teile:

- 1) Um den Einfluss der verschiedenen Domänen in der Expression der Dimere untersuchen zu können, sollten die einzelnen Domänen einer Kette gegen die jeweilige der anderen Kette ausgetauscht werden. Diese Konstrukte sollten dann in das T-Zell-Hybridom Jurkat mit bekannter Spezifität (siehe Punkt 2c) stabil transfiziert werden.
- 2) Um den Einfluss der verschiedenen Domänen auf die Korezeptorfunktion untersuchen zu können, wurden stabile Linien etabliert.
 - a) Die Jurkat-Linie HSA5, die den MART-1-spezifischen TCR trägt, sollte mit CD8-wt kotransfiziert und in der Aktivierung mit MART-1 auf seine CD8-Abhängigkeit hin überprüft werden.
 - b) Der T β -defiziente Jurkat-Klon RT3 sollte mit dem TAX-spezifischen TCR transfiziert werden. Diese Linie sollte als parentale Linie für Kotransfektionen mit CD8-wt dienen. Im Aktivierungsexperiment sollten die CD8-Abhängigkeit dieses TCRs untersucht werden.

- c) Die generierten CD8-Konstrukte sollten in eine CD8-abhängige Linie stabil kotransfiziert werden, um die Funktion der verschiedenen Domänen im Aktivierungsexperiment zu ermitteln.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Eukaryontische Zelllinien

Jurkat-Varianten:	wt:	Jurkat-Grundlinie, ATCC, Teddington, UK
	RT3:	T _i β defizienter Jurkat-Klon
	18B3:	T _i α-defizienter Jurkat-Klon, zur Verfügung gestellt von Dr. J. Zeuthen, Kopenhagen, DK
	HSA5:	Jurkat-Transfektante mit humanem TCR gegen MART-1. Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Nishimura, NIH, Bethesda, USA.
APC:	T2:	exprimiert MHC Klasse I vom Typ HLA-A2.1
EBV-B-Linien:	130:	exprimiert HLA-A2.1
	93:	exprimiert HLA-A11 und 25
	MCF-7:	adhärente Tumorzelllinie, die HLA-A2.1 exprimiert, ATCC.
IL-2 sensitive Zelllinie:	G2:	Ratten-Linie, reagiert quantitativ und obligat auf IL-2 mit Proliferation, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wonigeit, MHH, Deutschland.
Hybridoma-Zelllinien:	OKT11a:	Produktion von Maus-anti-human CD2 monoklonalen Antikörpern
	OKT3:	Produktion von Maus-anti-human CD3ε monoklonalen Antikörpern
	OKT8:	Produktion von Maus-anti-human CD8α monoklonalen Antikörpern

2.1.2 *E. coli*-Bakterienstämme

XL1-blue:	Stratagene:	La Jolla, USA
		F'::Tn10 proA ⁺ B ⁺ lacI ^q Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96(Nal ^r) thi hsdR17 (r _k ⁻ m _k ⁺) sup E44 relA1 lac

InvαF ['] :	Invitrogen:	Karlsruhe, BRD F' <i>endA1 recA1 hsdR17 (r_k⁻, m_k⁺) sup E44 thi-1</i> <i>gyrA96 relA1 ΦlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U16λ⁻</i>
TOP10F ['] :	Invitrogen:	F' { <i>lacI^q Tn10 (Tet^R)</i> } <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> <i>Φ80lacZΔM15 DlacX74 recA1 araD139</i> <i>Δ(ara-leu)7697 galUgalK rpsL (Str^R) endA1 nupG</i>

2.1.3 Plasmide

pBSks:	pBlueskript ks, Klonierungsvektor, Stratagene, La Jolla, USA. Der Multiklonierungsstelle ist ein LacZ-Gen nachgeschaltet, um ein Blau-Weiß-Screenen auf X-Gal-Platten zu ermöglichen. Das Selektionsmittel für diesen Vektor ist Ampicillin.
pCR [®] 2.1:	Klonierungsvektor für PCR-Produkte, Invitrogen: Der Vektor pCR2.1 wird in linearisierter Form mit TA-Überhängen geliefert, in die PCR-Produkte ligiert werden, die einen A-Überhang haben (Polymerasen wie Taq aber nicht Pfu bilden einen solchen Überhang). Ein vor dem Insert vorgeschalteter LacZ-Promotor, ermöglicht ein Blau-Weiß-Screening auf X-Gal-Platten. Zur Selektion können sowohl Ampicillin als auch Kanamycin verwendet werden.
pcDNA3.1(+):	eukaryontischer Expressionsvektor, Invitrogen Der Multiklonierungsstelle ist ein CMV-Promotor und dem Resistenzgen ein SV40 Promotor vorgeschaltet. Als Selektionsmittel in Bakterien dient Ampicillin und in eukaryontischen Zellen dienen Neomycin oder G418.
pSH:	eukaryontischer Expressionsvektor, zur Verfügung gestellt von J.P. Kinet, Boston, USA. Der Multiklonierungsstelle ist ein SV40-Promotor vorgeschaltet, dem Resistenzgen für eukaryontische Zellen geht ein TK-Promotor voraus und ist gegen Hygromycin gerichtet. Bakterienkulturen werden mit Ampicillin selektioniert.

bluntpSH: eukaryontischer Expressionsvektor pSH, für Klonierungsarbeiten mit der multiplen Klonierungssequenz von pBSks über die Schnittstellen: *Xho I/Sac I* erweitert.

2.1.4 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide für CD8 und KIRs wurden von der Firma MWG (Ebersberg, BRD) bezogen. Alle Primer wurden lyophilisiert geliefert und in Aqua bidest. in einer Konzentration von 100 pmol/ml gelöst.

CD8-Primer:

Der Übergang zwischen humaner CD8 α -Kette und β -Kette ist durch einen Schrägstrich gekennzeichnet.

Bezeichnung	Sequenz 5' – 3'	Beschreibung
CD8 α for	CTCGCGCCCAGCTTC	HuCD8 α : -42 – -27 bp
CD8 α rev	GTGACCCTTGTTGGTG	HuCD8 α : 920 – 906 bp
CD8 β 1	GCCAGGTGTCCCG	HuCD8 β : -21 – -11 bp
CD8 β 2	CCCTTTTCCCGGTC	HuCD8 β : 1070 – 1057 bp
H α Ig β Cp1	CGGTCTTCCTG/GATTTCCCTTCCC	HuCD8: α Ig: 389-399 - β .2Cp: 406-417 bp
H α Ig β Cp2	GGGAAGGAAATC/CAGGAAGACCG	HuCD8: β .2Cp: 417-406 - α Ig: 399-389 bp
H β Ig α Cp1	CTGAGTGTGGTT/CCAGCGAAGCC	HuCD8: β .2: 394–405 – α Cp: 400-410 bp
H β Ig α Cp2	GGCTTCGCTGG/AACCACACTCAG	HuCD8: α Cp:410-400 - β .2Ig: 405-394 bp
H α Cp β TMD1	GACTTCGCCTGT/GGCCCACTTTG	HuCD8: α Cp: 532-543 - β .2TMD: 493-503 bp
H α Cp β TMD2	CAAAGTGGGCC/ACAGGCGAAGTC	HuCD8: β .2TMD: 503-493 – α CP: 543-532 bp
H β Cp α TMD1	GAGACCCAGAAG/GATATCTACATCTG	HuCD8: β .2Cp: 481-492 – α TMD: 544-558 bp
H β Cp α TMD2	CAGATGTAGATATC/CTTCTGGGTCTC	HuCD8: α TMD: 558-544 - β .2CP: 492-481 bp
H α TMD β Cyt1	GTTATCACCCTTTAC/ATCCACCTGTGC	HuCD8: α TMD: 601-615 - β .2Cyt: 571-582 bp
H α TMD β Cyt2	GCACAGGTGGAT/GTAAAGGGTGATAAC	HuCD8: β .2Cyt: 582-571 – α TMD: 615-601 bp
H β TMD α Cyt1	GGGAGTGGCC/TGCAACCACAGG	HuCD8: β .2TMD: 561-570 – α Cyt: 616-627 bp
H β TMD α Cyt2	CCTGTGGTTGCA/GGCCACTCCC	HuCD8: α Cyt: 627-616 - β .2TMD: 570-561 bp

Tabelle 1: Primer für CD8-wt-Ketten und CD8-Konstrukte

Die Zählung der Basenpaare beginnt mit der ersten Base des Startmethionin der "Leader"-Sequenz.

Oligonukleotide spezifisch für KIRs 2DL1-3, 3DL1, 2DS1-5 und 3DS1:

Diese KIR-Subfamilien wurden durch Oligonukleotide amplifiziert, die von Uhrberg *et al.* entworfen wurden (Tabelle 2, 52).

KIR-Subgruppe	bindet auf	sense	antisense
KIR2DL1	DNA	ACTCACTCCCCCTATCAGG	AGGGCCCAGAGGAAAGTC
KIR2DL2	DNA	CCATGATGGGGTCTCCAAA	GCCCTGCAGAGAACCTACA
KIR2DL3	DNA	CCTTCATCGCTGGTGCTG	CAGGAGACAACCTTTGGATCA
KIR3DL1	DNA	CCATCGGTCCCATGATGCT	AGAGAGAAGGTTTCTCATATG
KIR2DS1	DNA/RNA	TCTCCATCAGTCGCATGAA/G	AGGGCCCAGAGGAAAGTT
KIR2DS2	DNA/RNA	TGCACAGAGAGGGAAGTA	CACGCTCTCCTGCCAA
KIR2DS3	DNA/RNA	TCCTCCCCCTATCAGTTT	GCATCTGTAGGTTCCCTCCT
KIR2DS4	DNA/RNA	CTGGCCCTCCCAGGTCA	GGAATGTTCCGTTGATGC
KIR2DS5	DNA/RNA	AGAGAGGGGACGTTTAACC	GCCGAAGCATCTGTAGGC
KIR3DS1	DNA	GGCAGAATATTCCAGGAGG	AGGGGTCCTTAGAGATCCA
KIR3DS1	RNA	GGCACCCAGCAACCCCA	AAGGGCACGCATCATGGA
Aktin	RNA	CGCGAGAAGATGACCCAGATC	TTGCGATCCACATCTGCTGG

Tabelle 2: Oligonukleotide spezifisch für KIRs 2DL1-3, 3DL1, 2DS1-5 und 3DS1

2.1.5 Zusätze für RT-PCR

Oligo(dT)15	Promega (Mannheim, BRD), C1101
RNasin	Recombinant RNasin Ribonuclease-Inhibitor, Promega, N2511
Reverse Transkriptase	Omniskript RT Kit, QIAGEN (Hilden, BRD), 205111

2.1.6 Antikörper

Polyklonale Antikörper:

Ziege-anti-Maus-FITC:	Jackson Immuno Research/Dianova (Hamburg (BRD), Nr. 115-016-044, lyophilisiert. (1 mg/1 ml steriles Aqua bidest., 40 µl-Aliquots bei -20 °C gelagert, Verdünnung 1:100, 50 µl pro Test)
Ziege-anti-Ratte-PE:	Coulter-Immunotech (Marseille, F) Nr. 112-116-143, lyophilisiert. (1 mg/ml steriles Aqua bidest, 40 µl-Aliquots bei -20 °C gelagert, Verdünnung 1:100, 50 µl pro Test, Kreuzreaktion mit Maus-mAK.)
Ziege-anti-Kaninchen-PE:	Martek Biosciences Corporation, Columbia, USA, Nr. 50806, lyophilisiert. (0,5 µg/0,5 ml, Verdünnung: 1:100, 50 µl pro Test)
H-160	Kaninchen-CD8 α , sc7188, Santa Cruz, USA
H-149	Kaninchen-CD8 β , sc9147, Santa Cruz, USA

2.1.7 Monoklonale Antikörper

Antikörper, die aus Zellkultur-Überständen aufgeeignet wurden:

OKT11a:	Maus-anti-human CD2, Hybridoma-Zellkultur-Überstand
OKT3:	Maus-anti-human CD3 ϵ , Hybridoma-Zellkultur-Überstand
OKT8:	Maus-anti-human CD8 α , Hybridoma-Zellkultur-Überstand
BMA-031:	Maus-anti-human TCR, konstante Domäne, Überstand
W6/32:	Maus-anti-human MHC Klasse I, Hybridoma-Zellkultur-Überstand

Käufliche Antikörper:

T10B9.1A-31:	Maus-anti-human TCR, konstante Domäne, Pharmingen, Heidelberg, BRD, Nr. 32255X
UCHT-1-Fitc:	Maus-anti-human CD3 ϵ , Becton-Dickinson, Heidelberg, BRD; Nr.555332
DK25:	Maus-anti-human CD8 α , Zell-Kulturüberstand, DAKO, Hamburg, BRD, Nr. M0707, Subtyp IgG $_1\kappa$
2ST8.5H7:	Maus-anti-human CD8 $\alpha\beta$, Coulter-Immunotech, Marseille, F, Nr. 2014, Subtyp IgG $_{2a\kappa}$
5F2:	Maus-anti-human CD8 β , Coulter-Immunotech, Nr. 1615, Subtyp IgG $_1$
CD28.2	Maus-anti-human CD28, Pharmingen, Nr. 33749X, Subtyp IgG $_1\kappa$, APC-gekoppelt.
MAM104	Maus-anti-human CD80/B7, Beckmann-Coulter Krefeld, BRD
HP-3D9	Maus-anti-human CD94, Pharmingen, 35154X, Subtyp IgG $_1\kappa$, FITC-gekoppelt.

2.1.8 Peptide

MART-1 (AS 27-35) Nonapeptid: AAGIGILTV

Es wurde aus dem malignen Melanom-Protein MART-1 isoliert, das auf HLA-A2.1 präsentiert wird. Zur Verfügung gestellt von Dr. M. Nishimura, NIH, Bethesda, USA.

- TAX (AS 11-19) Nonapeptid: LLFGYPVYV
 Es repräsentiert ein Epitop des HTLV-1-Virus und wird auf HLA-A2.1 präsentiert. Synthese von MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland.
- TAX-Mutanten Nonapeptid: LLFGYPVYV wurde von Dr. Ronald Frank, AG Molekulare Erkennung, GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH), Braunschweig in den Positionen 1, 4, 7, 8 mit allen 20 Aminosäuren mutiert. (P1-P80)

Peptid-Nr.	Pos. 1 AS-Austausch	Peptid-Nr.	Pos. 4 AS-Austausch	Peptid-Nr.	Pos. 7 AS-Austausch	Peptid-Nr.	Pos. 8 AS-Austausch
P1	L1L	P21	G4L	P51	V7L	P61	Y8L
P2	L1A	P22	G4A	P52	V7A	P62	Y8A
P3	L1C	P23	G4C	P53	V7C	P63	Y8C
P4	L1D	P24	G4D	P54	V7D	P64	Y8D
P5	L1E	P25	G4E	P55	V7E	P65	Y8E
P6	L1F	P26	G4F	P56	V7F	P66	Y8F
P7	L1G	P27	G4G	P57	V7G	P67	Y8G
P8	L1H	P28	G4H	P58	V7H	P68	Y8H
P9	L1I	P29	G4I	P59	V7I	P69	Y8I
P10	L1K	P30	G4K	P60	V7K	P70	Y8K
P11	L1L	P31	G4L	P61	V7L	P71	Y8L
P12	L1M	P32	G4M	P62	V7M	P72	Y8M
P13	L1N	P33	G4N	P63	V7N	P73	Y8N
P14	L1Q	P34	G4Q	P64	V7Q	P74	Y8Q
P15	L1R	P35	G4R	P65	V7R	P75	Y8R
P16	L1S	P36	G4S	P66	V7S	P76	Y8S
P17	L1T	P37	G4T	P67	V7T	P77	Y8T
P18	L1V	P38	G4V	P68	V7V	P78	Y8V
P19	L1W	P39	G4W	P69	V7W	P79	Y8W
P20	L1Y	P40	G4Y	P60	V7Y	P80	Y8Y

Tabelle 3: 80 Peptid-Mutanten des TAX-wt-Peptids

2.1.9 Kulturmedien und -Zusätze

2.1.9.1 Zell-Kultur

RPMI	Biochrom, Berlin, BRD
DMEM	GIBCOBRL, Karlsruhe, BRD
Fetales Kälberserum (FCS)	GIBCOBRL
Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml)	Biochrom
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Linz, AU
Natriumpyruvat (100 mM)	PAA

G-418, lyophilisiert (500 mg/ml in sterilem Aqua bidest.)	PAA
Hygromycin B (50 mg/ml)	Boehringer, Mannheim, BRD PAA
Rekombinantes IL-2, human (Gebrauchslösung: 300 u/μl)	Eurocetus, Amsterdam, NL
Ciprofloxacin (Ciprobay, Gebrauchslösung: 1000 μg/ml)	Bayer Vital, Leverkusen, BRD
PMA (50 ng/μl, in DMSO)	Sigma, Taufkirchen, BRD
DMSO	Sigma
β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, BRD
Insulin (Actrapid)	Novo Nordisk, Pharma GmbH, Mainz, BRD

2.1.9.2 Bakterien-Kultur

LB-Agar:	3,2 g (LB-Agar)/100 ml deionisiertes Wasser, autoklaviert, (Lennox L Agar, Nr. 22700-025, GIBCOBRL)
LB-Medium:	2 g (LB Broth Base)/100 ml deionisiertes Wasser, autoklaviert, (LB-Lennox L Broth Base, Nr. 12780-052, GIBCOBRL)
Ampicillin-Lösung:	sterile wässrige Lösung, 50 mg/ml, SIGMA, Nr. A-9518
Kanamycin-Lösung:	sterile wässrige Lösung, 50 mg/ml, SIGMA, Nr. K-4000

2.1.10 Puffer und Lösungen

2.1.10.1 Molekularbiologische Arbeiten

50 x TAE:	242 g Tris-Base 57,1 ml Eisessig 10 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0 ad 1 l Aqua bidest.
1 x TAE:	40 mM Tris-Acetat 1 mM EDTA

DEPC-Wasser	400 ml Aqua bidest., dazu 800 µl, 30 min lang vor Autoklavieren schütteln
5 x MOPS	3,28 g NaAc 20,6 g MOPS auf 800 ml mit DEPC-Wasser auffüllen, auf pH 7,0 mit 2N NaOH einstellen (Indikator-Streifen) + 10 ml 0,5 M EDTA-DEPC, (pH 8,0) auf 1 l mit DEPC-Wasser auffüllen, lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahren.
6 x DNA-Auftragspuffer:	<u>DNA-Fragmente größer 300 bp:</u> 6 ml 50 x TAE 44 ml Glycerol 1 Spatelspitze Bromphenolblau <u>DNA-Fragmente kleiner 300 bp:</u> (Stammlösung: 2,5 % (w/v) Orange G in 1 x TAE) 500 µl Glycerol 100 µl Orange G-Stammlösung 400 µl 1 x TAE
Natriumacetatpuffer:	3 M NaAc, pH 4,5
Ethidiumbromid-Lösung:	10 mg/ml in TAE, bei 4 °C unter Lichtabschluss haltbar.

2.1.10.2 Proteinchemische Arbeiten

BBS:	1 x PBS, pH 7,4/7,2 (500 ml) 1 mM MgCl ₂ (500 µl 1 M), 0,1 mM CaCl ₂ (50 µl 1 M).
BBS/Biotin:	Biotin frisch zugeben: 1 mg auf 5 ml, ausreichend für 2 x 10 ⁸ Zellen
Lyse-Grundpuffer:	1 % TritonX-100 in PBS: 10 ml 10 x PBS 10 ml 10 % TritonX-100 ad 100 ml mit Aqua bidest. auffüllen.

Lyse-Puffer:	<p><u>1 ml Lyse-Grundpuffer mit Protease-Inhibitorzusätzen:</u></p> <p>1:100: 10 µl Protease-Inh.-Cocktail III (Calbiochem, Nr. 539134: 80µM Aprotinin, 5 mM Bestatin, 2 mM Leupeptin, 1 mM Pepstatin, 1,5 mM E-64d, 100 mM AEBSF)</p> <p>1:100: 10 µl PMSF (100 mM)</p> <p>1:200: 10 µl Na₂VO₄ (200 mM)</p> <p>1:10: 100 µl NaF (100 mM in PBS gelöst)</p> <p>1:10: 100 µl Na₂P₂O₇ (100 mM in PBS gelöst)</p> <p>1:2000: 0,5 µl 0,5 M EDTA, pH 8,0</p> <p>1:100: 10 µl 1 M Iodacetamid (NH₂COHCH₂I)</p>
Antikörper-Bindungspuffer	<p>0,01 M NaH₂PO₄</p> <p>0,15 M NaCl</p> <p>0,01 M EDTA</p> <p>auf pH 7,0 mit HCl eingestellt</p>
10 x SDS-Laemmlipuffer:	<p><u>500 ml:</u></p> <p>15,1 g Tris (250 mM)</p> <p>72,05 g Glycin (1,9 M)</p> <p>5 g SDS (10 %)</p>
6 x SDS-Auftragungspuffer:	<p>2 ml Glyzerol</p> <p>0,5 g SDS</p> <p>10 mg Bromphenolblau</p>
reduzierend:	<p>+ 5 % β-Mercaptoethanol</p>
Gelcode Blue Stain:	<p>PIERCE, Bonn, BRD, Nr. 24590</p>
Semidry-Blotpuffer:	<p>11,6 g Tris-Base</p> <p>5,8 g Glycin</p> <p>0,74 g SDS</p> <p>400 ml Methanol</p> <p>ad 2 l mit Aqua bidest. auffüllen</p>

Ponceau S-Lösung	Serva, Heidelberg, BRD
PBS/Tween:	PBS mit 0,05 % Tween
Magermilchlösung:	5 % (w/v) Magermilch, 0,02 % Natriumazid in PBS

2.1.10.3 Immunbiologische Arbeiten

PBS:	<u>steril, Zentral-Apotheke MHH:</u> Na ₂ HPO ₄ *12H ₂ O 56,8 mM KH ₂ PO ₄ 17,9 mM NaCl 75 mM;
PBS/BSA/Azid:	PBS, angereichert mit 1 % (w/v) BSA und 0,02 % Azid
Nartiumazidlösung:	2 % (w/v) Na ₂ N in Aqua bidest.
Propidiumiodidlösung:	<u>Stammlösung:</u> 100 µg/ml im DMSO <u>Gebrauchslösung:</u> 10 µg/ml in Aqua bidest, 10 µl/Test
Trypsinlösung:	1 mg/ml Trypsin (Rind) in PBS
Paraformaldehydlösung:	1 % Paraformaldehyd in PBS
HEPES-Puffer:	1 M HEPES in Aqua bidest.
Saponin-Stammlösung:	10 % (w/v) in Aqua bidest.
Saponin-Gebrauchslösung:	50 ml: 500 µl HEPES-Puffer 500 µl Saponin-Lösung ad 50 ml mit PBS
Ficoll:	Biocoll Separating Solution, $\delta = 1.077$ g/ml, Biochrom, L 6115

Ig-Blocklösung Endoglobulin, ImmunoGmbH, Heidelberg, BRD
 50 mg/ml, 20 µl Blocklösung pro Test.

2.1.11 Aktivierungsassay

Peptidlösungen: MART-1-Peptid gelöst in 100% DMSO

 TAX-wt-Peptid gelöst in 50 %igem Ethanol

 TAX-Mutanten P1-P80 gelöst in DMSO/50-%igem Ethanol
 (im Verhältnis 1:1) gelöst,
 P11, 21 in 50 %igem Ethanol gelöst.
 Alle Verdünnungen in sterilem H₂O von 10⁻³ M bis 10⁻⁷ M
 aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

PMA-Lösung: 5 µg/ml in DMSO

2.1.12 Kits

2.1.12.1 Molekularbiologische Arbeiten

QIAamp DNA Mini Kit	QIAGEN, Hilden, BRD
QIAamp RNA Blood Mini Kit	QIAGEN
RNase-Free DNase Set	QIAGEN
Omniskript RT Kit (205111)	QIAGEN
GFX TM PCR: DNA and Gel Band- Purification Kit (27-9602-01)	Amersham- Pharmacia- Biotech, Freiburg, BRD
NucleoSpin Plasmid (740 588.250)	Macherey-Nagel, Düren, BRD
Nucleobond AX 500 (740 531.50)	Macherey-Nagel
Expand TM High Fidelity PCR System	Boehringer, Mannheim, BRD
AmpliTaq Gold	PerkinElmer, Branchburg, USA
Klenow Enzym, "large fragment"	Promega
"Weiss"-T4-Ligase	Boehringer

2.1.12.2 Aktivierungsassay

Humaner IL-2 Immunoassay Kit QTF1005 WAK-Chemie Medical GmbH,
Bad Soden, BRD
MTT-Cell Proliferation Test, Nr. M5655 Boehringer

2.1.13 Molekulargewichtsstandards

2.1.13.1 Molekularbiologische Arbeiten

1 kb-DNA-Ladder: GIBCOBRL
[kb]: 0,075; 0,134; 0,154; 0,201; 0,220; 0,298; 0,344; 0,396, 0,506;
0,517; 1.018; 1.636; 2.054, 3.054; 4.072; 5.090, 6.108; 8.144;
9.162; 10.180; 11.198; 12.216.

100bp-DNA-Ladder: NEB, Frankfurt a. M., BRD
[bp]: 100; 200; 300; 400; 500/517; 600; 700; 800; 900; 1.000; 1.200; 1.517.

λ -DNA/*Hind*III-Fragmente [0.5 μ g/ μ l]: 1:5 verdünnt GIBCOBRL

[kb]	0,56	2,03	2,23	4,63	6,68	9,41	23,13
[ng DNA/10 μ l Marker]	11,63	41, 8	47,9	89,9	135	194	477

2.1.13.2 Proteinchemische Arbeiten

“SDS-PAGE Molecular Weight Standards Low Range”: BioRAD, München, BRD
[kDa]: 14.4; 21.5; 31.0; 45.0; 66.2; 97.4

“Prestained SDS-PAGE Molecular Weight Standards Broad Range”: BioRAD
[kDa]: 7,1; 20,6, 28,9; 49,1, 80,0; 124,0; 209,0

“Prestained Protein Ladder 10-200 kDa”: MBI Fermentas, St. Leon-Rot, BRD
[kDa]: 10; 15; 20; 25; 30; 40; 50; 60; 70; 85; 100; 120; 150; 200

2.1.14 Chemikalien

Agarose, ultra PURETM GIBCOBRL
Alkalische Phosphatase (Kalb) Boehringer

Ampicillin	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-GAL)	Boehringer/Sigma
Bromphenolblau	Sigma
DEPC-Lösung	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck
DMSO	Sigma
dNTPs (je 100 mM dATP, dCTP, dTTP, dGTP), "ultrapure"	Amersham Pharmacia biotech
Essigsäure (reinst), 100%	Merck
Ethanol (absolut)	T.J. Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Sigma
Ethylendiamintetraessigsäure, Dinatriumsalz	Merck
Formaldehyd (37%ige Lösung)	Sigma
Glyzerol (wasserfrei, reinst)	Merck
HEPES (4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethan-sulfonsäure)	AppliChem, Darmstadt, BRD
Isopropanol (p.A.)	Merck
Kanamycin	Fluka, Steinheim, BRD
Kaliumchlorid	Merck
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid-Hexahydrat (p.A.)	Merck
Mineralöl	Sigma
MOPS (3-Morpholinopropansulfonsäure)	AppliChem
Natriumacetat	Merck
Natriumazid (reinst)	Riedel-de Haën, Seelze, BRD
Natriumchlorid (p.A.)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumthiosulfat	Sigma
Orange G	Fluka
Paraformaldehyd	Merck

Phorbolmyristataacetat (PMA)	Sigma
Ponceau S	Sigma
Propidiumiodid	Sigma
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma
ProteinG-Sepharose CL-4B	Amersham-Pharmacia-Biotech
Restriktionsenzyme	NEB
Rinderserumalbumin (Fraktion V)	Sigma
RNA-Sample-Loading-Buffer (R4268)	Sigma
Roti [®] Blue (5x), Kolloidale Coomassie-Färbung	Roth, Karlsruhe, BRD
Roti [®] -Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Salzsäure, konz. (p.A.)	Riedel-de Haën
Saponin	Riedel-de Haën
Stickstoff (flüssig)	Linde, Köln, BRD
Sulfo-NHS-Biotin (21217ZZ EZ-Link [™] -Sulfo-NHS-Biotin)	Pierce
Tris	Serva
Trypanblau	Merck

2.1.15 Sonstige Materialien

Abdeckplatten, steril	Greiner, Frickenhausen, BRD
BSA (Bovines Serum Albumin) Fraktion V	Sigma
Film: BioMax [™] MR, 18 x 24 cm (Nr. 8736936) (Z 35,394-9)	Kodak bzw. Sigma
Filterpapier (Blot)	Schleicher&Schüll, Dassel, BRD
50 und 250 ml Gewebe- und Suspensionskulturflaschen	Greiner
Kanülen 12" Luerlock	Braun, Melsungen, BRD
Kryogefäße (1 ml)	Nunc, Wiesbaden, BRD
Maxisorp	Nunc
Millex-GV Filter (0.22 µm, steril)	Millipore, Eschborn, BRD
Millex-GV Filter (0.45 µm, steril)	Millipore
Nitrocellulose 0.1 µm	Schleicher&Schüll

PCR-Reaktionsgefäße (0.5 ml)	Sarstedt
PCR-Reaktionsgefäße (0,25 ml)	Biozym, Hessisch-Oldendorf, BRD
Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, BRD
Polystyrolröhrchen, 0,6 ml	Greiner
Polystyrolröhrchen 5 ml, steril	Greiner
Polystyrolröhrchen, 5 ml, Nr 352052	Falcon, Lincoln Park, USA
PS-Microplatte 96K U-Form	Greiner
96-, 24-well Platten für Suspensionskultur, steril	Greiner
Nanotips	Eppendorf, Hamburg, BRD
Spritzen (2, 10, 20 ml)	Braun, Melsungen, BRD
Reaktionsgefäße (1.5 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße (1.5 und 2 ml), Safelock	Eppendorf
Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner
Sterilfilter (Easy Flow™)	Becton Dickinson
Zellkulturpipetten, 2, 5, 10, 25 ml, steril	Greiner

2.1.16 Geräte

Brutschrank (CO ₂ -Auto-Zero)	Haeraeus
Cäsiumquelle (GammaCell 2000)	Mølsgaard Medical
Durchflußzytometer (FACSCalibur)	Becton Dickinson
Cell Porator	GIBCOBRL, Life technologies
ELISA-Reader Titertek Multiskan®MCC1340	Flow Laboratories
Gelkammer Agarosegele	BioRad
Power Supplies	Pharmacia
MiniGel-Elektrophoresekammer	Biometra, Göttingen, BRD
Molecular Analyst	BioRad
Landgraf-Thermocycler, 5 variable Blöcke	VERS Laborsysteme GmbH, Hannover, BRD
T3-Thermocycler	Biometra
Thermostat 5320	Eppendorf
Thermomixer 5346	Eppendorf
Photometer (UV-Meter 1202)	Shimadzu Corporation
SpeedVac-Concentrator	Savant/Jürgens

Zentrifugen:	Biofuge 13	Haeraeus, Sepatech
	Biofuge pico	Haeraeus, Sepatech
	Megafuge 2.0R	Haeraues, Sepatech
	Kühlzentrifuge Modell J2-21	Beckmann

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 DNA-Isolation aus Suspensionszellen

Die Isolierung der DNA aus den Jurkat-Linien erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit von QIAGEN. Es wurden dazu 10^6 Zellen nach Waschen mit PBS in 200 μ l PBS resuspendiert und 20 μ l Proteinase K zugegeben. Nach Zugabe von 200 μ l AL-Puffer wurde das Protokoll wie von QIAGEN beschrieben durchgeführt. Die DNA-Konzentration wurde durch UV-Absorption bestimmt.

2.2.1.2 RNA-Isolierung aus Suspensionszellen

Die RNA-Isolierung erfolgte aus frisch aus der Zellkultur stammenden Zellen. Je 10^7 Zellen wurden von den einzelnen Jurkat-Linien eingesetzt, die mit dem QIAamp RNA Blood Mini Kit aufgereinigt wurden. Die Durchführung erfolgte nach Vorschrift unter Einsatz von RNase-freier DNase auf der Säule (RNase-Free DNase Set Protocoll, QIAGEN). Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte am UV-Spektrometer. Ein Aliquot der RNA wurde mit RNA-Probenladepuffer (enthält Ethidiumbromid) 10 min bei 65 °C erhitzt und aufgetragen. Ob die isolierte RNA eine Degradation aufwies, die ein erfolgreiche RT-PCR-Reaktion verhindern würde, konnte durch die Überprüfung auf einem RNA-Gel ermittelt werden. RNA guter Qualität wurde für die RT eingesetzt.

2.2.1.3 Agarosegelelektrophorese für DNA, Plasmide

Mit der Agarosegelelektrophorese können DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe aufgetrennt werden. PCR-Produkte und präparative Verdaus können über ein präparatives Agarosegel mit anschließender Gelextraktion aufgereinigt werden. Für Nukleinsäuren im Bereich 1.5-7 kb wird eine gute Auftrennung mit einem 0,7 %igem Agarosegel erreicht, für Fragmente zwischen 300-1000 bp mit 1 %igen, unter 300 bp mit 2 %igen Agarosegelen. Die entsprechende Menge Agarose wird in TAE in der Mikrowelle oder auf der Heizplatte so lange aufgekocht, bis sich sämtliche Agarosekristalle lösen. Nach Abkühlen auf 60 °C wird 2 μ l Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) auf 60 ml Gellösung gegeben und die Agaroselösung in den Gelträger zum Erkalten eingefüllt. Die Proben werden mit 6 x Auftragspuffer versetzt und in die

Geltaschen gefüllt. Als Standard-Marker dienen entweder die 100 bp bzw. 1 kb-Leiter (bei Größenabschätzung) oder die λ HindIII-Fragmente (als DNA-Konzentrationsabschätzung). Als Elektrophoresepuffer dient TAE, die Spannung beträgt 80-100 V; und die Laufzeit hängt von der gewünschten Auftrennung ab.

2.2.1.4 RNA-Gelelektrophorese

Für die RNA-Gelelektrophorese wurden alle Gegenstände mit DEPC-Wasser abgespült. Für ein 50 ml Kleingel wurden 0,56 g Agarose abgewogen und in 36 ml DEPC-Wasser aufgeköcht. Nach zügigem Zugeben von 11 ml 5 x MOPS (4 °C) und 10 ml Formaldehydlösung wurde das Gel gegossen. Die Proben wurden bei 65 °C im Heizblock mit 15 μ l RNA-Auftragspuffer, der Ethidumbromid enthält, inkubiert und anschließend für den Auftrag auf Eis schockgekühlt.

2.2.1.5 RT-Reaktion und PCR

Die Reverse Transkription lässt sich in zwei Schritte einteilen, die Annealing-Reaktion und die Transkription. Es wurden ca. 1 μ g RNA mit 2 μ l Oligo(dT)₁₅-Primern in 12,25 μ l RNase-freiem H₂O 10 min bei 65 °C erwärmt (Annealing) und anschliessend auf Eis abgekühlt. Zur Transkription wurden 2 μ l dNTP, 2 μ l 10 x RT-Puffer und 0,25 μ l (10 u) RNasin zugegeben, Nach Zugabe von 1 μ l Omniskript Reverse Transkriptase wurde die Lösung 1 h bei 37 °C inkubiert und dadurch die RNA in cDNA umgeschrieben. Von dieser cDNA wurden 2,5 μ l für eine PCR (siehe Punkt 2.2.1.6) mit spezifischen Primern eingesetzt, die ausschließlich mit der Polymerase AmpliTaq Gold durchgeführt wurde. Als Positiv-Kontrolle wurde ein Aktin-Primer-Paar eingesetzt, das ein PCR-Produkt von 734 bp ergab. Als Negativ-Kontrolle für eventuell eingeschleppte DNA-Spuren wurde eine RT-Reaktion ohne Zugabe der Reversen Transkriptase durchgeführt, die anschliessend unter gleichen Bedingungen in der PCR mitgeführt wurde.

Die PCR-Reaktion erfolgte unter folgenden Bedingungen: Jeweils 15 sec Vorlaufzeit um die gewünschte Temperatur zu erreichen. 5 Zyklen: 2 min 95 °C (erste Denaturierungsphase), 60 sec 94 °C, 60 sec 62 °C und 45 sec 72 °C, gefolgt von 30 Zyklen: 30 sec 94 °C, 45 sec 60 °C und 45 sec 72 °C.

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction; PCR) erlaubt die gezielte Amplifikation von DNA-Abschnitten. Die Reaktion erfolgt in mehreren Zyklen, die aus drei Schritten aufgebaut sind. Im ersten Schritt wird die DNA durch Erhitzen auf 95 °C in Einzelstränge denaturiert. Im folgenden Schritt binden bei niedrigerer Temperatur kurze, spezifische, komplementäre Einzelstränge an die DNA (Primer-Annealing). Im letzten Schritt wird bei 72 °C die zwischen den Primern liegende DNA-Sequenz amplifiziert.

Es wurde ein Gemisch aus der stabilen Taq-Polymerase und der thermolabileren Pfu-Polymerase, die eine 3'-5' Proofreading-Aktivität hat, verwendet. Für die PCR-Maschine von Landgraf wurde 1 Tropfen Mineralöl als Verdunstungsschutz aufgetropft. Auf diese Weise wurden sowohl die kompletten cDNAs amplifiziert als auch Fragmente, die anschliessend mit anderen Fragmenten durch die Klenow-Polymerase (large fragment) verknüpft wurden.

<u>50 µl Taq/Pfu-PCR-Ansatz:</u>	DNA	100-400 ng
	Primer (10 pmol/ml)	1 µl
	10 x Polymerase-Puffer	50 µl
	MgCl ₂ -Lösung (100 mM)	1-2 µl
	dNTP-Mix (10 mM)	2 µl
	Polymerase	1 µl
	Aqua bidest.	ad 50 µl

2.2.1.7 Verknüpfungsreaktion und anschließende PCR

Für die Herstellung der Konstrukte wurden amplifizierte Fragmente durch die Klenow- oder Pfu/Taq-Polymerase miteinander verknüpft. Es wurden jeweils 200 ng der zu verknüpfenden Fragmente in einer 30 µl Reaktion mit 3 µl 10 x Klenow-Polymerase-Puffer, 2 µl dNTP-Mix (ohne Klenow) 5 min aufgekocht, anschliessend im Heizblock für 10 min auf 55 °C abgekühlt (Annealingphase der Überhänge). In weiteren 10 min bei 42 °C, 37 °C und 25 °C wurden diese Bindungen stabilisiert. Das Auffüllen der DNA-Einzelstränge zum Doppelstrang erfolgte danach bei 37 °C für 60 min unter Zugabe von 1 µl Klenow-Polymerase. Ein Teil der Verknüpfungen wurden in der PCR-Maschine ohne Verwendung der Klenow-Polymerase durchgeführt. Dazu wurden

200 ng der zu verknüpfenden Sequenzen in einer 30 µl Reaktion mit 3 µl 10 x Pfu/Taq-Puffer von Boehringer eingesetzt. In diesem Ansatz wurde zu Beginn die Polymerase zugegeben. Die Denaturierungszeit betrug 10 min bei 95 °C, das Annealing erfolgte bei 55 °C, auch hier wurde die Reaktion in 10-Minuten-Schritten auf 42 und auf 37 °C abgekühlt. Das Erwärmen auf 72 °C ermöglichte der Polymerase das Auffüllen der Einzelstränge zu Doppelsträngen. Dieser Zyklus wurde 2 x wiederholt.

Von diesem Reaktionsmix wurden jeweils 3 µl für eine 50 µl PCR-Reaktion eingesetzt. Für die Amplifikation wurden die außen liegenden Primer der jeweilig verknüpften Sequenzen eingesetzt. Einige PCR-Reaktionen benötigten zusätzlich die Gabe an Mg^{2+} .

2.2.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten und DNAs aus präparativen Verdaus

PCR-Produkte und DNAs aus präparativen Verdaus wurden über Agarose-Gele aufgetrennt und über den GFX™ DNA and Gel Band Purification Kit von Amersham Pharmacia Biotech aufgereinigt. Die ausgeschnittenen Agarose-Banden wurden ausgewogen, mit dem 3fachen Volumen des Bindungspuffers (capture buffer) 10 min bei 60 °C gelöst, auf die GFX-Säule gegeben, 1 min inkubiert und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen, die Säule mit 500 µl ethanolhaltigem Waschpuffer gewaschen und bei 13000 rpm 1 min zentrifugiert. Die Säule wurde in ein frisches Reagiergefäß gesetzt, die DNA mit 50 µl Aqua bidest. 10 min gelöst und 1 min bei 13000 rpm zentrifugiert

2.2.1.9 Restriktionsendonuklease-Verdaus

Alle Enzyme wurden von der Firma NEB eingesetzt, ebenso die zugehörigen 10 x Puffer und gegebenenfalls die 100 x BSA-Lösung. Wichtig bei der Zusammenstellung der Reaktionskomponenten war, dass das Restriktionsenzym mindestens 1:10 verdünnt wurde, um optimal arbeiten zu können, da es in Glycerol gelagert wurde. Die Reaktionstemperatur wurde je nach Enzym eingestellt. Bei Doppelverdaus wurde nach Möglichkeit ein Puffer ausgewählt, der für beide Enzyme eine gute Leistung garantierte und auch eine Überaktivität verhinderte.

Die benötigte Enzymmenge wurde zum Teil mit folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{Größe der Referenz - DNA} \div \text{Zahl der Schnittstellen in der Referenz - DNA}}{\text{Größe der zu spaltenden DNA} \div \text{Zahl der Schnittstellen in dieser DNA}} = \frac{\text{benötigte Units des Enzyms}}{\mu\text{g DNA}}$$

Die Aufreinigung der restringierten Plasmide erfolgte über die Gelelektrophorese und anschließende Gelextraktion. Für Restriktionsanalysen in den Klonierungsschritten wurden Kämme bis 15 µl Auftragsvolumen genutzt. Präparative Verdauungen wurden in 80-300 µl-Ansätzen durchgeführt und gegebenenfalls zur Reduktion des Auftragsvolumens präzipitiert.

2.2.1.10 Partiemer Verdau

Für die Erweiterung der Klonierungsseite des pSHxs-Vektors wurde der Vektor pSHxs mit dem Insert MuCD8α mit *XhoI/SacI* geöffnet und dadurch das Insert entfernt. Die mit *XhoI/SacI* aus dem Vektor pBSks gewonnene Mehrfachklonierungssequenz mit Insert TAX-TCRα-Kette wurde in den geöffneten Vektor pSH kloniert. Für den partiellen Verdau wurde *SmaI* in Verdünnungen von 10; 5; 2,5; 1,25 und 0,625 u in einem 40 µl-Volumen angesetzt und 5 µg Plasmid wurden bei 25 °C 15 min inkubiert. Anschließendes Einfrieren der Ansätze stoppte die Enzymaktivität. Auf einem Agarosegel (0,7 %) wurden die unterschiedlich geschnittenen Fragmente aufgetrennt (6197, 4151, 2046 bp). Die gewünschte Größe (6197 bp) wurde ausgeschnitten und extrahiert. Der anschließende Verdau mit *EcoRV* lieferte 5353, 3308, 2888 und 843 bp große Fragmente, auf diese Weise wurde schließlich das Insert TAX-TCRα-Kette entfernt. Der *SmaI/EcoRV* geöffnete Vektor wurde in einer "blunt-end" Ligation geschlossen, transformiert, die gewonnenen Restriktionsschnittstellen durch Einzelverdauungen analysiert. Der erweiterte Vektor wurde bluntpSH benannt.

2.2.1.11 Phenolextraktion

Die Phenolextraktion diente dazu, Proteinverunreinigungen und störende Salze von der DNA abzutrennen. Dazu wurde der Reaktionsansatz auf ein Volumen von 300 µl mit Aqua bidest. aufgefüllt und 300 µl der Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1) zugesetzt. Nach 1 min Vortexen wurde das Gemisch zur Phasentrennung 5

min bei 13000 rpm zentrifugiert. Die wässrige, obere Phase enthielt die DNA. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und gefällt.

2.2.1.12 DNA-Präzipitation

DNA-Lösungen können zum Konzentrieren oder Reinigen gefällt werden. Dazu wird mit dem 0,1-fachen des Volumens 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,5) der pH-Wert gesenkt. Nach Zugabe des 2,5-fachen Volumens absoluten $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -kalten Ethanols wurde die unter Wasserentzug und durch Aussalzen unlöslich gewordene DNA für mindestens 30 min oder über Nacht bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefällt. Nach Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm wurde das Pellet mit 70 %igem $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -kaltem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in Aqua bidest. gelöst.

2.2.1.13 Ligation

Die durch Restriktion passend geschnittenen, aufgereinigten Vektor- und Insert-Fragmente wurden bei wesentlich kleinerem Insert im Verhältnis 1 : 3 (Vektor : Insert) zusammen gegeben (in äquimolaren Verhältnis, wenn Vektor und Insert ungefähr gleich groß sind). Allgemein reichen 20 fmol Vektor und 60 fmol Insert zur Ligation aus. Die Molaritäten der DNA-Fragmente lassen sich aus der Anzahl der Basenpaare berechnen ($1\text{ bp} = 650\text{ g/mol}$). Hat der Vektor an beiden geschnittenen Enden die gleiche Schnittstelle oder kompatible Überhänge, so wird vor dem Auftragen auf das Agarosegel eine Dephosphorylierung durch eine Phosphatase (AP) des Vektors vorgenommen, um eine Selbstligation zu verhindern.

20 μl Ligationsansatz: 2 μl 10 x Ligase-Puffer
 20-100 fmol Vektor
 60-300 fmol Insert
 1 μl Ligase
 ad 20 ml Aqua bidest.

Die Ligation erfolgt über Nacht (16 h) bei $14\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.2.1.14 Ca²⁺-kompetente XL-blue

XL blue wurden auf LB-Agar ohne Selektionsmittel ausplattiert, über Nacht bei 37 °C kultiviert, eine Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C und ca. 200 Umdrehungen pro min kultiviert. Am nächsten Tag wird eine 250 ml-Kultur mit 1 ml der Über-Nacht-Vorkultur angeimpft und bis zu einer OD = 0,5 kultiviert (ca. 4 h 20 min). Die Bakteriensuspension wurde 15 min auf Eis abgekühlt und steril in Falcon-Röhrchen abgefüllt. Nach Zentrifugation für 12 min bei 4000 rpm und 4 °C in der Megafuge von Haeraeus wurden die Bakterien pelletiert. Das Pellet wurde in 125 ml eiskalter steriler 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das gesamte Pellet in 10 ml eiskalter 50 mM CaCl₂-Lösung resuspendiert und 1 h auf Eis inkubiert, dann 2,9 ml Glycerol zugegeben und gut gemischt. 100 µl-Aliquots in vorgekühlten 1,5 ml Reagiergefäßen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert (Haltbarkeit 2 Jahre).

2.2.1.15 Transformation

Für die Transformation des Klonierungsvektors pCR2.1 wurden 50 µl INVαF' oder TOP10F' (Invitrogen) mit 5 µl Ligationsansatz 30 min bei 4 °C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte bei 42 °C 30-45 sec. Die Bakteriensuspension wurde anschliessend 2 min auf 4 °C abgekühlt. Nach Zugabe von 200 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C kultiviert und auf Kanamycin-Agar (100 mg/ml) ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht (16 h) bei 37 °C wurden Kolonien gepickt und in 5 ml LB/Kanamycinmedium angeimpft.

Für die Transformation von pSHxs-Ligationen wurden 100 µl calciumkompetente Bakterien (*E.coli* XL blue) auf Eis aufgetaut und mit ca. 1 µl Plasmid-DNA (10 ng ausreichend) bzw. 12,5 µl Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Nach 2 min Inkubation bei 42 °C und 2 min Abkühlen auf 4 °C wurden 200 µl LB-Medium ohne Ampicillin zugegeben und für 30 min bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Anschliessend wurde Bakteriensuspension auf LB-Agar mit 100 mg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.1.16 Mini-Präparation

Mini-Präparationen aus kleinen Kulturvolumina wurden für analytische Zwecke eingesetzt. Die Präparation wurde mit Nucleospin Plasmid Kit von Macherey-Nagel

durchgeführt. Dazu wurden ca. 5 ml über-Nacht-Kultur 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 250 µl S1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 250 µl S2-Lysepuffer wurde sofort zur Durchmischung geschwenkt und maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Neutralisation erfolgte durch die Zugabe von 300 µl S3-Puffer. Anschliessend wurde 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um Präzipitate aus der DNA-Lösung zu fällen. Der Überstand wurde auf die Säule gegeben und nach Zentrifugation bei 13000 rpm mit 600 µl A4-Puffer gewaschen. Nach Zentrifugation zur Trocknung erfolgte die Elution der DNA. Es wurden 50 µl Aqua bidest. auf die Säule gegeben und nach 5 min Inkubation mit bei 13000 rpm 1 min eluiert. Für Sequenzierungen wurde vor Eintrocknung des Pellets noch eine Phenolextraktion durchgeführt.

2.2.1.17 Maxi-Präparation

Vor der Maxi-Präparation wurde eine Vorkultur aus 3 ml LB/Amp-Medium mit einem Einzelklon der Platte beimpft und für ca. 4-6 h oder über Nacht bei 37 °C im Schüttelinkubator kultiviert. Von dieser Bakteriensuspension wurden 200-500 µl in 200 ml LB/Amp-Medium gegeben und über Nacht bei 300 rpm im Schüttelinkubator kultiviert. Die Maxi-Präparation wurde mit Nucleobond AX500 von Macherey-Nagel durchgeführt. Dazu wurde die Bakteriensuspension für 20 min bei 6000 x g in der Kühlzentrifuge J2-21 von Beckmann zentrifugiert, der Überstand dekantiert und jedes Pellet mit 12 ml Puffer A1 resuspendiert. Zu dieser Bakteriensuspension wurden 12 ml Lysepuffer A2 zugegeben, mehrfach geschwenkt und für maximal 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Neutralisiert wurde mit 12 ml Puffer A3 und durch Schwenken gemischt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die Mischung mit den Membranfragmenten und ausgefallenen Proteinen für 20 min bei 10.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde über Filterpapier auf die mit 6 ml N2-Puffer äquilibrierte Säule gegeben. Auf der Säule wurde die Plasmid-DNA gebunden, zweimal mit 16 ml Waschpuffer N3 gewaschen wurde. Die Elution erfolgte dann mit 15 ml N5-Puffer. Zu den 15 ml des plasmidhaltigen Puffers wurden das 0,7-fache des Volumens, also 10,5 ml Isopropanol gegeben und gefällt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugieren bei 4 °C für 30 min bei 4000 rpm sedimentiert, der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Pellet mit 20 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und für 10 min bei 4000 rpm bei 4 °C in der Kühlzentrifuge von Haeraeus zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und Reste abgesaugt. Die getrocknete Plasmid-DNA wurde

in 200-300 μl H_2O gelöst und für Transfektionen und Sequenzierungen phenolextrahiert.

2.2.1.18 DNA-Gehaltsbestimmung

In Quarzküvetten wurde in 1:200-Verdünnungen der DNA-Gehalt und die Reinheit des isolierten Plasmids über eine UV-Messung bestimmt und gegen H_2O abgeglichen. Bei 260 nm absorbieren die DNA-Basen, bei 280 nm absorbieren die aromatischen Reste der Proteine. Aus dem Quotienten der Extinktionen bei 260 nm : 280 nm wurde die Reinheit der DNA bestimmt, der Quotient sollte zwischen 1,5 und 1,9 liegen. Als Gegenkontrolle wurden Konzentrationsabschätzungen in einer Verdünnung von 1:50 über das Gel durchgeführt. Als Vergleich diente der Lambda/*HindIII*-Marker von MBI Fermentas.

Genomische DNA wurde in einer 1:50 Verdünnung gemessen. Dabei berechnet sich die DNA-Konzentration wie folgt: Extinktionswert (OD) x 50 ng/ μl dsDNA x Verdünnungsfaktor.

RNA-Konzentrationen wurden in 1:50 Verdünnungen gemessen und wie folgt berechnet: Extinktionswert x 30 ng/ μl x Verdünnungsfaktor.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

Alle Arbeiten an den Zellkulturen erfolgten an der Sterilbank. Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO_2 kultiviert.

2.2.2.1 Ermittlung der Zellzahl

Die Zählung der Zellen erfolgt in einer Zählkammer nach Neubauer mit Deckglas. Werden vier Großquadrate ausgezählt, gilt folgende Rechenformel für die Zellzahl pro ml:

$$\frac{\text{Anzahl der gezählten Zellen} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}}{2}$$

Zur Differenzierung zwischen membrangeschädigten (toten) Zellen und lebendigen Zellen wird die Zellsuspension 1:2 mit 1 %iger Trypanblaulösung in PBS verdünnt, die toten Zellen erscheinen blau angefärbt.

2.2.2.2 Einfrieren von Zellkulturzellen

Die Zellen wurden so lange kultiviert, bis sie in ausreichender Dichte und optimalem Zustand vorlagen. Nach 3 min Zentrifugation bei 1600 rpm (ca. 800 x g) wurde der Überstand steril abgesaugt, das Pellet durch Klopfen aufgelockert und mit 1 ml FCS mit 10 % DMSO (Einfriermedium) resuspendiert. Die Aliquots wurden 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und anschliessend in Stickstoff tiefgefroren. Die eingefrorene Zelldichte betrug zwischen $1\text{-}4 \times 10^6$ Zellen pro 1 ml Einfriermedium. EBV-transformierte B-Zelllinien bestimmten HLA-Typs wurden mit einer Zelldichte von $10\text{-}15 \times 10^6$ Zellen pro 1 ml eingefroren.

2.2.2.3 Behandlung der Jurkat-Suspensionszellen mit Ciprofloxacin

Die Zellsuspensionen wurden 14 Tage mit $10\text{ }\mu\text{l}/10\text{ ml}$ (Gebrauchslösung: $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$) in Kulturmedium unter dreitägigem Wechsel des Mediums behandelt, um eine eventuelle Mycoplasmen-Infektion der Jurkat-Zelllinien zu vermeiden. Nach den 14 Tagen wurde das Ciprofloxacin-haltige Kulturmedium vollständig entfernt. Ein Aliquot der Zellen wurde in Penicillin/Streptomycin-freiem Medium 3 Tage kultiviert, um die Kulturen durch eine PCR auf den Mycoplasmengehalt hin zu untersuchen. Eine Behandlung von 14 Tagen unter Ciprofloxacin stellte sich als ausreichend für eine mycoplasmenfreie Kultur dar.

2.2.2.4 Auftauen von Fusionszellen

Aus der Stickstofflagerung wurden die Kryoröhrchen zügig im $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut, dabei aber möglichst nicht erwärmt. Die aufgetaute Zellsuspension wurde mit 10 ml Kulturmedium gewaschen und der Überstand nach Zentrifugation bei 1600 rpm für 3 min restlos abgesaugt. Das Pellet wurde durch Klopfen gelockert und mit frischem Kulturmedium aufgenommen.

2.2.2.5 Passagieren von Suspensionszellen

Alle Jurkat-Linien und EBV-B-Linien wurden alle 2 Tage (Aktivierungs- und Elektroporations-experimente) im Verhältnis Zellsuspension : Kulturmedium 1:3 bis

1:10 passagiert, so dass die Zellzahl am Tag der Passage oder des Experiments $0,4-0,6 \times 10^6$ nicht überstieg.

Die antigenpräsentierende Linie T2 wurde alle 3 Tage passagiert, am Tag der Passage hatte sie eine Zellzahl von $0,6 \times 10^6$, für die Aktivierungsstudien wurden Zellkonzentrationen von max. $0,35 \times 10^6$ nicht überschritten.

Die IL-2-abhängige Zelllinie G2 (Ratte), die in Suspension kultiviert wird, wurde von Prof. Dr. Wonigeit zur Verfügung gestellt. Als erstes wurde eine IL-2-Titration durchgeführt, die ergab, dass eine IL-2-Konzentration von 20 u/ml IL-2 (rekombinat) für die exponentielle Wachstumsphase ausreichend ist (1 u entspricht 0,5 ng IL-2). Die Linie G2 wurde alle 2 Tage im Verhältnis 1:3 bis 1:5 in 20 u/ml rekombinates IL-2 in RPMI (15 % FCS, 10^{-5} M β -Mercaptoethanol) passagiert.

2.2.2.6 Passagieren von adhärenente Zellen

MSC-7 wurden in RPMI mit üblichen Zusätzen und 10 ng/ml (entspricht ca. 40 μ l) Insulin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Um diese Zellen alle 2-3 Tagen zu passagieren, wurden der Zellkulturüberstand (250 ml Flaschen) abgesaugt, der Monolayer mit 5 ml Trypsin-EDTA-Lösung (GIBCOBRL) für 3 min bedeckt und mit Klopfen und Spülen vom Flaschenboden gelöst. Die Zellsuspension wurde dann 1:3, maximal 1:6 verdünnt und in 30 ml Kulturmedium frisch ausgesät. Die Zugabe des Kulturmediums stoppte die Wirkung des Trypsins.

2.2.2.7 Separation von PBL aus Vollblut

Die Zugabe von $1/10$ des Gesamtblutvolumens an Liquemin-Lösung (2000 u/ml in PBS) schützt das Vollblut direkt bei der Abnahme vor Gerinnung. So gegen Gerinnung geschütztes Vollblut wird 1:2 mit PBS verdünnt und auf die Ficoll-Lösung gegeben.

Durch Dichtegradientenzentrifugation bei 2200 rpm für 20 min ohne Bremse werden die Blutzellen in verschiedene Phasen je nach Größe und Schwere aufgeteilt. Die Interphase (mittlere Schicht) zwischen zellfreiem Serum und Ficoll enthält die mononukleären Zellen aus dem Blut, darunter auch die T-Lymphozyten. Diese Interphase wird vorsichtig abgenommen und anschliessend mit 2 x 50 ml sterilem PBS gewaschen.

2.2.2.8 Transfektion der Jurkat RT3-Linie

Die optimale Zelldichte zur Transfektion der Zelllinie Jurkat RT3 lag bei $0,3-0,5 \times 10^6$ Zellen /ml Kulturmedium. Für eine Transfektion wurden 10^6 Zellen dreimal mit PBS (ohne Mg^{2+} , Ca^{2+}) gewaschen, um FCS aus dem Kulturmedium wegzuwaschen, das den Widerstand bei der Elektroporation erhöhen würde. Das Pellet wurde in 1 ml PBS, in dem mindestens 10 μ g DNA einer cDNA gelöst waren, resuspendiert. Nach Überführen in die Elektroporationsküvette inkubierte das Gemisch noch 10 min auf Eis im Elektroporator, damit sich die DNA an die Zelloberflächen anlagern konnte. Die Elektroporation erfolgte im Cell-Porator von GIBCOBRL bei 240 V, 800 μ F unter langsamen Entladen der Kondensatorplatten und bei ständiger Eiskühlung. Die Zellen inkubierten nochmals 10 min auf Eis bevor sie vorsichtig in 10 ml R10 umgesetzt wurden. Da die elektroporierten Zellen sehr vulnerabel sind, wurde darauf geachtet, möglichst wenig scherende Kräfte auf sie auszuüben.

Nach 48 h Zellkultur wurde die Zellsuspension unter Selektion gebracht.

2.2.2.9 Selektion der transfizierten Jurkat RT3

Die Zellsuspension wurde nach 48 h der Transfektion durch Elektroporation zu 200 ml Selektionmedium zugegeben und mit 2 ml/well in 4 x 24-well-Platten für Suspensionskulturzellen ausgesät. Das entsprach einer ungefähren Anzahl von 10^5 Zellen pro well. Für die Selektion des T-Zell-Rezeptors im Expressionsvektor pcDNA3.1(+) wurde 1 mg/ml G418 verwendet, für die Selektion der CD8-Moleküle im pSHxs wurde 1 mg/ml Hygromycin dem Standardmedium R10 zugesetzt. Alle 48 h wurde das alte Medium aus dem Überstand abgesaugt und mit 1,5 ml frischen Selektionsmediums ersetzt. Nach dem vierten Wechsel wuchsen die resistenten Zellen innerhalb von 2-3 Wochen zu Kolonien heran, die dann im FACS analysiert wurden. TCR- bzw. CD8-exprimierende Klone wurden zu einer Linie zusammengefasst.

2.2.2.10 Subklonierung von Transfektanten

Bei der Transfektion des T-Zell-Rezeptors für das TAX-Peptid und der Kotransfektion von CD8 α -wt mit CD8 β -wt war eine Subklonierung im 'limiting dilution assay' notwendig. Dazu wurden Zellsuspensionen eines wells, die wenigsten zu 50 % eine Expression zeigten, so stark verdünnt, dass die Zellzahl für die TAX-TCR-transfizierten Zellen 10 Zellen pro well und für die CD8 α -/ β -wt-Kotransfektion 0,5 Zellen pro well

betrogen. Auf einer 96-well-Platte wurde die Zellverdünnung für TAX-TCR in 1 mg/ml G418 und für CD8 α - β -wt in 1 mg/ml Hygromycin ausgesät. Eine geringere Zellzahl erwies sich als nicht überlebensfähig. Nach 14 Tagen wurden 50 μ l-Aliquots der hochgewachsenen Zellen im FACS untersucht und rein TCR oder CD8 exprimierende Zellen zu einer Linie zusammengefasst.

2.2.2.11 Anreicherung positiver Zellen durch magnetische Beads (MACS)

Bei einigen Transfektionen wurden schwach oder instabil exprimierende Zelllinien mit Hilfe magnetischer Beads, MACS (magnetic absorbent cell sorting) durch positive Selektion angereichert. Die Anreicherung erfolgt durch das Markieren der gewünschten Oberflächenproteine mit spezifischen Antikörpern, die dann von magnetischen Beads gebunden werden. Sie erkennen Immunglobuline unterschiedlicher IgG-Subklassen. Wichtig ist, dass alle Arbeiten zügig durchgeführt werden, um Temperaturen von 12-16 °C nicht zu überschreiten. Dadurch wird verhindert, dass große Mengen des gebundenen Antikörpers von den Zellen internalisiert werden.

Dazu wurden 10^7 Zellen mit Antikörper in Sättigung bei 4 °C für 30 min in sterilem PBS inkubiert. Die Säule wurde in der Zwischenzeit in den Magneten eingespannt und mit 2 x 500 μ l PBS gewaschen. Die antikörperbeladenen Zellen wurden 2 x mit PBS gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert und auf die Säule gegeben. Alle Zellen, die nicht genug Antikörper auf ihrer Oberfläche gebunden hatten, wurden durch zweifaches Spülen mit 1 ml PBS weggewaschen. Die Elution der positiven Zellen erfolgte in magnetfeldfreier Umgebung durch Zugabe von 1 ml PBS auf die Säule. Es wurde zum Vergleich jeweils ein Aliquot vor dem Aufreinigen, dann von der Negativ-Probe und von den angereicherten Zellen zur Untersuchung im FACS angefärbt.

2.2.2.12 Transiente Transfektion von COS-7

Die Affen-Nierenfibroblasten Zelllinie COS-7 wurde mit CD8-Ketten von Frau Dr. Renate Scheibe (Abt. Vegetative Physiologie, MHH) transfiziert. Die Aussaat von 6×10^5 COS-7 Zellen 24 h vor der Transfektion erfolgte auf 6 cm \varnothing Platten für adhärente Zellen, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 80 % hatten. Kurz vor der Transfektion wurde das FCS-haltige Medium gegen 0,5 ml FCS-freies ausgetauscht. Lösung A enthielt 5 μ g gelöste DNA in 0,5 ml serumfreien Medium. Für Lösung B wurden 7,5 μ l Transfectam (Promega) mit 0,5 ml serumfreiem Medium gemischt.

Sofort nach Mischen von Lösung A und Lösung B wurde das Transfektionsgemisch auf die Zellen aufgetropft. Nach 4 h wurden 4 ml Kulturmedium mit 10 % FCS und 50 nM Chloroquin zur Stabilisation der Zellmembran (Sigma) zugegeben. Täglich wurde das Medium ohne Zusatz von Chloroquin gewechselt. Am vierten Tag wurden die Zellen mit 0,2 mM EDTA in PBS abgelöst und im FACS analysiert.

2.2.2.13 Aktivierungsassay

Als antigenpräsentierende Zelllinien (APC) wurden die HLA-A2.1 homozygot exprimierenden Suspensionslinien T2, die EBV-transformierte B-Zelllinie 130 und die adhärente Tumorzelllinie MCF-7, die kein CD80 exprimiert, verwendet. Die EBV-transformierte B-Zelllinie 93 exprimiert das MHC Klasse I: HLA-A11/25. TAX- und MART-1-Peptid sollten darauf nicht präsentiert werden.

Effektor- (Jurkat-Transfektanten) und Zielzellen (APC) wurden auf eine Zellzahl von 1×10^6 pro ml RPMI im Fall der Suspensionszellen und 14.000/well bei den MCF-7-Zellen in DMEM eingestellt. Die MCF-7-Zellen wurden 24 h vor Peptidbeladung in die 96-well-Platten ausgesät, um sicherzustellen dass am Tag der Stimulation die Zellen für die Peptidbeladung und das Waschen adhärent waren.

Die APCs wurde mit Peptidkonzentrationen von 10^{-5} M bis 10^{-10} M und reinem Lösungsmittel des Peptids als Nullwert für 2 h bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Die anschließende Bestrahlung mit 30 Gy stellte sicher, dass sie zwar lebendig, aber nicht mehr teilungsfähig waren. Nach Zentrifugation der bestrahlten Zellen wurden das Medium weitgehend abgesaugt, um nicht gebundenes Peptid zu entfernen und in dem berechneten Volumen R10 resuspendiert. Zu den Effektorzellen wurden nun PMA in einer Endkonzentration von 10 ng/ml zugegeben. Es wurden pro well einer 96 well-Platte 100 µl Zellsuspension (100.000 Zellen) von Effektor- und Zielzellen pipettiert. Um den Kontakt zwischen Effektor- und Zielzellen möglichst schnell herzustellen, wurden die 96-well-Platten kurz zentrifugiert. Nach 24 h Zellkultur wurden die Platten 3 min bei 1600 rpm zentrifugiert, anschliessend 100 µl des zellfreien Zellkulturüberstandes eingefroren oder direkt für den IL-2-Nachweis abgenommen.

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Biotinylierung der Jurkat-Transfektanten

Für die Biotinylierung wurden 200×10^6 Zellen dreimal mit 10 ml BBS-Puffer gewaschen. Es wurde ein Aliquot zur FACS-Messung abgenommen und die Zellsuspension mit 1 mg Sulfo-NHS-Biotin von Pierce in 5 ml BBS bei 4 °C unter Rotation inkubiert (4 °C). Nach Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 min wurde das Zellpellet 3 x mit PBS gewaschen. Ein Aliquot wurde zur FACS-Messung verwendet und wie die Negativ-Probe mit SAV-FITC 15 min inkubiert, gewaschen und im FACS analysiert.

2.2.3.2 Lyse der biotinylierten Zellen

Für 100×10^6 Zellen wurde 1 ml Lysepuffer angesetzt, der 1 % (v/v) TritonX-100 enthielt. Dazu wurden 10 µl Protease-Inhibitor-Cocktail III (Calbiochem); 10 µl 100 mM PMSF; 10 µl 200 mM Na_2VO_4 ; 100 µl 100 mM NaF in PBS; 100 µl 100 mM $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ in PBS; 0,5 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0) und 10 µl 1 M Iodacetamid zugesetzt. Auf das Zellpellet wurde 1 ml Lyse-Puffer gegeben und mit der Pipette grob resuspendiert. Anschliessend wurde mit einer 2 ml Spritze mit 12"-Luerlock resuspendiert, die DNA gesichert und alles in ein frisches Reagiergefäß überführt. Nach 15 min Zentrifugation bei 13000 rpm sedimentierten die genomische DNA und die Zellmembranbestandteile. Der Überstand wurde in ein frisches Reagiergefäß überführt und zur Lagerung bei -20 °C eingefroren.

2.2.3.3 Immunopräzipitation

Vor der Immunpräzipitation wurde die berechnete Menge der Beads 3 x mit PBS gewaschen und 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert, um den ethanolhaltigen Lagerpuffer zu entfernen. Für 10^8 Zellen wurden 20 µl Beads zur Vorreinigung zum Lysat gegeben und 30 min bei 4 °C rotiert. Dadurch wurden Proteine, die unspezifisch an Protein G binden aus dem Lysat entfernt. Pro Spur wurden 10 µl Protein G-Beads und 4-8 µg Antikörper eingesetzt. Die Kopplung der Antikörper an die Beads erfolgte über Nacht in Kopplungspuffer bei 4 °C Kopf-über-Kopf. Nach Zentrifugation wurde der Kopplungsüberstand abgesaugt.

Pro Spur wurde nun des Lysats von 10^7 Zellen mit 10 μ l der Antikörper-beladenen Beads über Nacht bei 4 °C rotiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 5 x mit 500 μ l Lyse-Grundpuffer gewaschen, im letzten Waschschrift auf zwei frische Reagiergefäße aufgeteilt, und für die SDS-PAGE mit Lämmli-Auftragspuffer versetzt.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteingemischen erfolgte mit SDS-PAGE, je nach Proteingröße wurden Gele mit einer Acrylamid-Konzentration von 9 bis 12 % eingesetzt.

	9 %	10 %	12 %	Sammelgel
30 % Acrylamid-Mix [ml]	1,5	1,7	2,0	0,33
1,5 M Tris pH 8.8 [ml]	1,3	1,3	1,3	-
0,5 M Tris pH 6.8	-	-	-	0,25
H ₂ O [ml]	2,15	2,0	1,7	1,4
10 % SDS [μ l]	50	50	50	20
10 % APS [μ l]	50	50	50	20
TEMED [μ l]	2,5	2	2,0	2

Die Proben wurden dann 1:2 oder stärker mit 6 x Lämmli-Probenpuffer verdünnt und zur vollständigen Denaturierung vor dem Auftrag auf das Gel bei 95 °C 10 min erhitzt. Für das Durchwandern der Proteine im Sammelgel bis zur Trenngelgrenze wurden 80 V angelegt, die Trennung erfolgte schließlich bei 120-160 V. Die aufgetrennten Proteine wurden entweder gefärbt oder auf Nitrocellulose übertragen.

2.2.3.5 Gelfärbung

Nach Entfernen des Sammelgels wurde das Gel für 10-30 min Gelcode Blue Stain von PIERCE gefärbt. Da das Gel selbst dabei leicht mit angefärbt wurde, wurde das Gel anschließend gewässert, so daß nur noch die gefärbten Proteinbanden zu sehen waren.

2.2.3.6 Western-Blot

Der Transfer der im Gel aufgetrennten Proteine erfolgte durch das Semidry-Verfahren. Dazu wurden erst 2 Lagen in Semidrypuffer getränktes Filterpapier luftblasenfrei auf die Anode gelegt, darauf die in Blotpuffer äquilibrierte Nitrocellulosemembran. Das Trenngel wurde kurz im Blotpuffer geschwenkt, luftblasenfrei aufgelegt, als Abschluß folgten wieder 2 Lagen getränktes Filterpapier. Der Transfer erfolgte für 45-60 min bei 2 mA/cm² (15 V). Die Membran wurde reversibel mit Ponceau S-Lösung angefärbt, die Markerbanden markiert und der Blot durch Spülen mit deionisiertem Wasser wieder entfärbt.

2.2.3.7 ECL-Färbung des Blots

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran für 30 min oder über Nacht in 5 %iger Magermilchlösung in PBS / 0,05 % Tween inkubiert. Die Membran wurde dann für 1 h mit dem Streptavidin-HRP (1:5000) bei Raumtemperatur inkubiert und anschliessend 5 x 5 min mit PBS / 0,05 % Tween gewaschen, um unspezifische Bindungen an die Membran zu lösen. Die ECL-Färbelösung (enhanced chemoluminescence) wurde jeweils frisch vor der Zugabe aus Lösung A und B 1:1 zusammenpipettiert und der Blot darin 5 min unter Schwenken inkubiert. Anschliessend wurde er in feuchtem Zustand in Frischhaltefolie luftblasenfrei eingepackt. Die Expositionsdauer des Films hing von der aufgetragenen Proteinmenge ab.

2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

In der FACS-Analyse (FACS; fluorescence activated cell sorter) kann die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche und unter bestimmten Umständen auch intrazellulär quantitativ gemessen werden. Dabei werden die Zellen mit einem spezifischen Antikörper gegen das zu untersuchende Protein inkubiert. Sollte dieser Primärantikörper nicht direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein, so wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter Sekundärantikörper eingesetzt, der farbstoffgekoppelt ist. Pro Ansatz wurden etwa 10⁴-10⁵ Zellen eingesetzt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper an Fc-Rezeptoren zu blockieren, wurden die Proben mit 20 µl humaner IgG-Blocklösung (Endoglobulin) vorinkubiert.

2.2.4.1 Durchflußzytometrische Analysen

Die Immunfluoreszenzen wurden mit einem Zytofluorometer ausgewertet. Die zu untersuchenden Zellen werden dabei mit Druck in den sogenannten Mantelstrahl (sheath) injiziert. Sie werden auf diese Weise beschleunigt und gelangen einzeln hintereinander aufgereiht in die Meßkammer. Dort wird jede Zelle vom einem kohärenten Laserstrahl getroffen. Das gestreute Licht wird bei 180° (FSC = forward light scatter) und bei 90° (SSC = sideward light scatter) gemessen. Die entstehende Streuung ist zelltyp-spezifisch und abhängig von der Größe (FSC) und Granularität (SSC). So entstehen in der Dot Plot Grafik abgegrenzte Punktwolken, die sich den bestimmten Zellarten zuordnen lassen. Durch das Setzen eines "Gates" werden die gewünschten Zellen eingegrenzt und damit von anderen Zelltypen oder toten Zellen für die Analyse getrennt.

Bei der eigentlichen Fluoreszenzanalyse werden die Antikörper-tragenden Zellen, die auf diese Weise mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert wurden, durch einen Laserstrahl bestimmter Wellenlänge angeregt und geben dann ein für den Farbstoff charakteristisches Spektrum an Lichtstrahlen ab, das dann durch elektronische Detektoren als Signal aufgefangen und im Vervielfältiger verstärkt wird. Je mehr fluoreszenzmarkierte Antikörper auf der Zelloberfläche gebunden sind, desto größer ist auch die Fluoreszenzintensität der Zelle. Die Autofluoreszenz der Zellen wird durch Negativ-Kontrollen bestimmt und am Computer diskriminiert.

Die durch fluoreszierende, spezifische Antikörper eingefärbten Zellen können so von nicht gefärbten Zellen, die das gesuchte Oberflächenmolekül nicht tragen, unterschieden werden. Die prozentuale Verteilung negativer und positiver Zellen wird dann im Dot Plot ermittelt. Die Expressionsdichte oder auch die Stärke der Emission wird durch die Höhe der Fluoreszenzintensität (MFI = mediane Fluoreszenzintensität) repräsentiert. Auf diese Weise sind auch mit einem spezifischen Antikörper gegengefärbte beladene Beads im FACS ausgewertet worden.

Bei der Auswertung mit entsprechenden Computerprogrammen (CELLQuest oder WinMDI) wurde der DOT Plot gegebenenfalls in Quadranten unterteilt sowie die Verteilung der Zellen und die MFI des jeweiligen Quadranten ermittelt.

2.2.4.2 Immunfluoreszenz

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen handelte es sich im wesentlichen um Einfach- oder Doppelfärbungen. Eingesetzt wurden transfizierte Zellen oder durch Ficoll aufgereinigte PBLs.

Bei der Zweifarbenmessung wurden als erstes die indirekte Färbung durchgeführt. Nach 10 min Inkubation in der Ig-Blocklösung wurden der spezifische Antikörper für 30 min bei 4 °C zugegeben. Anschliessend wurde nicht gebundener Antikörper durch PBS/BSA/Azid-Lösung abgewaschen und dann mit dem Fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Sekundärantikörper 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde dann erst der direkt gekoppelte Antikörper zur Inkubation zugegeben. Überschüssige Antikörper wurde durch PBS/BSA/Azid gewaschen. Um tote Zellen sicher von der Messung ausschließen zu können, wurden die Proben 10 min vor der Messung im FACS mit Propidiumiodid angefärbt.

Bei der Einfarbmessung vereinfachte sich die Messung um einen Färbeschritt.

2.2.4.3 Trypsinbehandlung der Zelloberflächen und intrazelluläre Antikörperfärbung

Jurkat-Transfektanten und PBL wurden dreimal mit PBS gewaschen, um mögliches FCS aus dem Kulturmedium bzw. Ficoll zu entfernen. Danach wurden die Zellen 30 min mit Trypsin-PBS-Lösung (1 mg/ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend wurden die trypsinisierten Zellen mit PBS/BSA/Azid 3 x gewaschen, um Trypsin weitgehend zu entfernen. Die Zelloberflächen wurden wie üblich gefärbt. Für die intrazelluläre Messung wurden die Zellen als erstes 10 min mit 1 %igem Paraformaldehyd in PBS fixiert. In einem Vortest wurde sichergestellt, dass sich die gewünschten Oberflächenproteine nach Fixierung durch die Antikörper uneingeschränkt nachweisen lassen. Das Paraformaldehyd wurde durch 3 x Waschen mit PBS/BSA/Azid entfernt. Durch die Zugabe von 50 µl Saponin in HEPES-Puffer pro Probe wurden Löcher in der Zellmembran der Zellen erzeugt, so dass der spezifische Primärantikörper in die Zellen eindringen konnte. Nach 30 min Inkubation bei 4 °C, wurden die Proben zweimal mit PBS/BSA/Azid gewaschen und nach Zugabe von 50 µl Saponin mit dem gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Nach weiteren 30 min wurden die Proben zweimal mit PBS/BSA/Azid gewaschen, um ungebundene, fluoreszierende Antikörper aus den Zellen herauszuwaschen.

2.2.5 Quantitative Erfassung des IL-2 im Zellkulturüberstand nach Aktivierung

2.2.5.1 Quantitativer auf Durchflusszytometrie beruhender Immuno-Assay-Kit

Die quantitative Erfassung der produzierten IL-2 Mengen erfolgte mit Kit QTF1005 von WAK-Chemie (Humaner IL-2 Immunoassay Kit). Das Prinzip beruht auf der Bindung des humanen IL-2 aus dem Zellkulturüberstand an die Beads, die durch einen gegen humanes IL-2 gerichteten Phycoerythrin-gekoppelten monoklonalen Antikörper angefärbt werden. Die Auswertung der Farbintensität in Abhängigkeit der produzierten IL-2-Menge erfolgt am FACS. Die Sensitivität des Kits reicht von 5-5000 pg/ml IL-2. Die IL-2-Konzentrationen lassen sich aus der MFI durch das Mitführen der Standardverdünnungen des Kits mit bekannten IL-2-Konzentrationen errechnen.

Die Kopplung des IL-2 aus 100 µl Zellkulturüberstand an 2 µl Beads erfolgte unter Rotation bei 4 °C für mindestens 1 h, hier jedoch fast ausschließlich über Nacht. Die Beads wurden dann 2 min bei 3000 rpm in der Haeraeus-Tischzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach 2 x Waschen mit 1 x IFA-Puffer wurden 2 µl anti-IL-2-Antikörper zugegeben und erneut bei 4 °C Kopf-über-Kopf 1 h inkubiert. Nach 1 x Waschen mit 400 µl IFA-Puffer wurden die Zellen in 100 µl PBS aufgenommen und in 600 µl-FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte auf Kanal 4 im FACS (Calibur, Becton Dickinson) für Phycoerythrin-gekoppelte Antikörper.

2.2.5.2 Bestimmung der IL-2-Konzentration über die IL-2-abhängige Ratten-Linie G2

Die IL-2-abhängige Linie G2 wurde in einem Vorversuch unter IL-2-Entzug untersucht. Nach 3 Tagen stellten sich die ersten Mangelerscheinungen ein, ca. 30 % der Zellen zeigten ein granuliertes Zytoplasma. Daher wurden 3 Tage vor dem Aktivierungsassay die Zellsuspension 1:10 in 20 u/ml IL-2 verdünnt. Für die IL-2 Quantifizierung werden in einer 96-Flachboden-Platte für Gewebekultur 10.000 Zellen / well in 50 µl Kulturmedium (15 % FCS, 10⁵ M β-ME) ausgesät und sofort 50 µl des IL-2-haltigen Überstandes zugegeben. Durch Mitführen eines IL-2-Standards mit bekannten Konzentrationen konnte die IL-2-Konzentration im Überstand berechnet werden. Nach 3 Tagen Inkubation werden 50 µl der XTT-Lösung zu den Proben gegeben und für mindestens 5 h bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. In den Mitochondrien der viablen

Zellen wird der gelbe Farbstoff in den orangefarbenen Formazan-Zustand umgesetzt.
Die Farbintensität wird im ELISA-Spektrometer bei 450 nm nachgewiesen.

3 Ergebnisse

3.1 Mutation, Transfektion und Expression der CD8wt-DNAs und CD8-Konstrukte

Die CD8wt-DNAs wurden durch Amplifikation mit spezifischen Primern aus cDNA (Abb. 3 und Abb. 4) gewonnen, die als RT-PCR-Produkt aus PBLs vorlagen. Die CD8 α - und β -Moleküle sind aus 4 Domänen aufgebaut, die bei beiden Ketten bis auf die Verbindungsregion (connecting peptide, CP) annähernd gleich groß sind. In dieser Region ist die β -Kette 19 Aminosäuren kürzer.

	CD8 α -Kette [AS]	CD8 β -Kette [AS]
Ig-Domäne	133	135
Verbindungsregion	48	29
Transmembrandomäne	24	26
cytoplasmatischer Rest	35	31

Tabelle 4: Größenvergleich der einzelnen Domänen beider Ketten auf Aminosäure-Ebene.

Die Einteilung der Domänen erfolgte unter Berücksichtigung der jüngsten Forschungsergebnisse. Die humane CD8 α -Kette wurde nach Homologievergleich zwischen 7 Spezies nach D.R. Littman *et al.* eingeteilt (45) und nicht nach H. Nakauchi *et al.* (46). Damit wird die Ig-Domäne länger und die Transmembrandomäne (TM) kürzer. Die TM enthält dadurch weniger polare und geladene Aminosäuren, wie in Abb. 2A dargestellt. Die CD8 β -Kette wurde nach M.R. Pecoraro *et al.* (47) und A.M. Normant *et al.* (49) eingeteilt. Für den Beginn der cytoplasmatischen Domäne der CD8 β -Kette wurde die Palmitoylierungssequenz von A. Arcaro *et al.* (48) mit berücksichtigt, so dass diese Domäne 4 Aminosäuren früher beginnt als bei M.R. Pecoraro *et al.* angegeben. In Abb. 2B ist die Bindungsstelle der Tyrosinkinase p56^{lck} der CD8 α -Kette und die Palmitoylierungssequenz der CD8 β -Kette hervorgehoben.

Die Verbindungsregion enthält bei beiden CD8-Ketten Cysteinreste, die eine Dimerisierung zwischen zwei CD8 α -Ketten oder einer CD8 α -Kette und einer CD8 β -Kette ermöglichen. Da die CP-Domäne des CD8 α 19 Aminosäuren länger als die der CD8 β -Kette ist, können sich bei den CD8-Konstrukten mit β -CP Veränderungen in der Affinität der α -Ig-Domäne zu MHC Klasse I ergeben, da sich der extrazelluläre Arm des Konstrukts als zu kurz für eine derartige Interaktion erweisen könnte.

A.	HuCD8 α	182:	<u>DIYI</u> WAPLAGTCGVLLL SLVITLY	206
	HuCD8 β	165:	GPL CSPI TLGLLVAGVLVLLV SLGVA	190
B.	HuCD8 α	207:	CNHRNRRRV CKC PRPVVKSGDKP LSARY	235
	HuCD8 β	191:	IHL CRR RRARLR FMKQLRLHPLEKCS RMDY	221

Abb. 2: Aminosäure-Sequenzen der Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne der CD8-Ketten. **A.** Dargestellt ist die Sequenz der Transmembrandomäne, fettgedruckt sind polare, unterstrichen saure Aminosäurereste. **B.** Die Sequenz der cytosolischen CD8 α -Kette enthält die p56^{lck}-Bindungsstelle (fettgedruckt), die Palmitoylierungssequenz der CD8 β -Kette ist fettgedruckt hervorgehoben.

Die Verbindungsregion (CP) enthält bei beiden CD8-Ketten Cysteinreste, die eine Dimerisierung zwischen zwei CD8 α -Ketten oder einer CD8 α - und einer CD8 β -Kette ermöglichen. Generell gilt für alle Konstrukte im extrazellulären Bereich, dass bei ausgetauschtem CP Veränderungen in der Antikörpererkennung auftreten können.

Ergebnisse

```

ctccccctcgc  gcccgagctt  cgagccaagc  -65  cggct  cccgcgccgc  -48
agcgtcctgg  ggagcgcgtc  - 1

atg  gcc  tta  cca  gtg  acc  gcc  ttg  ctc  ctg  ccg  ctg  36
M    A   L   P   V   T   A   L   L   L   P   L   12

gcc  ttg  ctg  ctc  cac  gcc  gcc  agg  ccg  agc  cag  ttc  72
A   L   L   L   H   A   A   R   P   S   Q   F   24

cgg  gtg  tcg  ccg  ctg  gat  cgg  acc  tgg  aac  ctg  ggc  108
R   V   S   P   L   D   R   T   W   N   L   G   36

gag  aca  gtg  gag  ctg  aag  tgc  cag  gtg  ctg  ctg  tcc  144
E   T   V   E   L   K   C   Q   V   L   L   S   48

aac  ccg  acg  tcg  ggc  tgc  tcg  tgg  ctc  ttc  cag  ccg  180
N   P   T   S   G   C   S   W   L   F   Q   P   60

cgc  ggc  gcc  gcc  gcc  agt  ccc  acc  ttc  ctc  cta  tac  216
R   G   A   A   A   S   P   T   F   L   L   Y   72

ctc  tcc  caa  aac  aag  ccc  aag  gcg  gcc  gag  ggg  ctg  252
L   S   Q   N   K   P   K   A   A   E   G   L   84

gac  acc  cag  cgg  ttc  tcg  ggc  aag  agg  ttg  ggg  gac  288
D   T   Q   R   F   S   G   K   R   L   G   D   96

acc  ttc  gtc  ctc  acc  ctg  agc  gac  ttc  cgc  cga  gag  324
T   F   V   L   T   L   S   D   F   R   R   E   108

aac  gag  ggc  tac  tat  ttc  tgc  tcg  gcc  ctg  agc  aac  360
N   E   G   Y   Y   F   C   S   A   L   S   N   120

tcc  atc  atg  tac  ttc  agc  cac  ttc  gtg  ccg  gtc  ttc  396
S   I   M   Y   F   S   H   F   V   P   V   F   132

ctg  cca  gcg  aag  ccc  acc  acg  acg  cca  gcg  ccg  cga  432
L   P   A   K   P   T   T   T   P   A   P   R   144

cca  cca  aca  ccg  gcg  ccc  acc  atc  gcg  tcg  cag  ccc  468
P   P   T   P   A   P   T   I   A   S   Q   P   156

ctg  tcc  ctg  cgc  cca  gag  gcg  tgc  ccg  cca  gcg  gcg  504
L   S   L   R   P   E   A   C  R   P   A   A   168

ggg  ggc  gca  gtg  cac  acg  agg  ggg  ctg  gac  ttc  gcc  540
G   G   A   V   H   T   R   G   L   D   F   A   180

tgt  gat  atc  tac  atc  tgg  gcg  ccc  ttg  gcc  ggg  act  576
C  D   I   Y   I   W   A   P   L   A   G   T   192

tgt  ggg  gtc  ctt  ctc  ctg  tca  ctg  gtt  atc  acc  ctt  612
C   G   V   L   L   L   S   L   V   I   T   L   204

tac  tgc  aac  cac  agg  aac  cga  aga  cgt  gtt  tgc  aaa  648
Y   C   N   H   R   N   R   R   R   V   C   K   216

tgt  ccc  ccg  cct  gtg  gtc  aaa  tcg  gga  gac  aag  ccc  684
C   P   R   P   V   V   K   S   G   D   K   P   228

agc  ctt  tcg  gcg  aga  tac  gtc  taa  ccctgtgcaa  718
S   L   S   A   R   Y   V   STOPP  235

cagccactac  attacttcaa  actgagatcc  ttccttttga  gggagcaagt  768
ccttcccttt  cattttttcc  agtcttctct  cctgtgtatt  cattctcatg  818
attattattt  tagtgggggc  ggggtgggaa  agattacttt  ttctttatgt  868
gtttgacggg  aaacaaaact  aggtaaaatc  tacagtacac  cacaagggtc  918
ac  920

```

Abb. 3: Sequenz der cDNA der humanen CD8 α -Kette

Die abgebildete DNA-Sequenz enthält außer der gesamten kodierenden Sequenz die 3'- und 5'-untranslatierte Regionen. Der Beginn der jeweiligen Domäne (Ig, CP, TM und Cyt) ist fettgedruckt. Die Cysteine 164 und 181 sind unterstrichen.

Ergebnisse

gcgactgtct	ccgccgagcc	cccggggcca	ggtgtcccgg	gcgccaccag	- 1						
atg	cg	cg	ctg	tgg	ctc	ctc	ctg	gcc	gcg	cag	36
M	R	P	L	W	L	L	L	A	A	Q	12
ctg	aca	gtt	ctc	cat	ggc	aac	tca	gtc	ctc	cag	72
L	T	V	L	H	G	N	S	V	L	Q	24
acc	cct	gca	tac	ata	aag	gtg	caa	acc	aac	aag	108
T	P	A	Y	I	K	V	Q	T	N	K	36
gtg	atg	ctg	tcc	tgc	gag	gct	aaa	atc	tcc	ctc	144
V	M	L	S	C	E	A	K	I	S	L	48
aac	atg	cg	atc	tac	tgg	ctg	aga	cag	cg	cag	180
N	M	R	I	Y	W	L	R	Q	R	Q	60
ccg	agc	agt	gac	agt	cac	cac	gag	ttc	ctg	gcc	216
P	S	S	D	S	H	H	E	F	L	A	72
tgg	gat	tcc	gca	aaa	ggg	act	atc	cac	ggt	gaa	252
W	D	S	A	K	G	T	I	H	G	E	84
gtg	gaa	cag	gag	aag	ata	gct	gtg	ttt	cg	gat	288
V	E	Q	E	K	I	A	V	F	R	D	96
agc	cg	ttc	att	ctc	aat	ctc	aca	agc	gtg	aag	324
S	R	F	I	L	N	L	T	S	V	K	108
gaa	gac	agt	ggc	atc	tac	ttc	tgc	atg	atc	gtc	360
E	D	S	G	I	Y	F	C	M	I	V	120
agc	ccc	gag	ctg	acc	ttc	ggg	aag	gga	act	cag	396
S	P	E	L	T	F	G	K	G	T	Q	132
agt	gtg	gtt	gat	ttc	ctt	ccc	acc	act	gcc	cag	432
S	V	V	D	F	L	P	T	T	A	Q	144
acc	aag	aag	tcc	acc	ctc	aag	aag	aga	gtg	tgc	468
T	K	K	S	T	L	K	K	R	V	<u>C</u>	156
tta	ccc	agg	cca	gag	acc	cag	aag	ggc	cca	ctt	504
L	P	R	P	E	T	Q	K	G	P	L	168
agc	ccc	atc	acc	ctt	ggc	ctg	ctg	gtg	gct	ggc	540
S	P	I	T	L	G	L	L	V	A	G	180
ctg	gtt	ctg	ctg	gtt	tcc	ctg	gga	gtg	gcc	atc	576
L	V	L	L	V	S	L	G	V	A	I	192
ctg	tgc	tgc	cg	cg	agg	aga	gcc	cg	ctt	cg	612
L	C	C	R	R	R	R	A	R	L	R	204
atg	aaa	caa	cta	aga	tta	cat	cca	ctg	gag	aaa	648
M	K	Q	L	R	L	H	P	L	E	K	216
tcc	aga	atg	gac	tac	tga		atatacaggc		tcaaggggaa		720
S	R	M	D	Y	Stopp						221
gg	tata	tcag	gaac	cttt	gt	cccc	aatgc	ctg	cat	ggat	770
tact	aca	aacc	tcaca	gaga	agc	tgct	taacc	atg	gat	cctg	820
caaga	agc	ac	aggt	cct	gat	gagt	ggat	ct	tact	acttt	870
ctcc	ct	cgct	cag	agg	atcc	tccc	acac	ccag	cag	agaga	920
accat	ca	aacc	cccc	aagt	ca	tagg	ggg	ctc	tg	gagct	970
gtgg	cccc	ca	tcct	tgt	gaa	cccc	aaagt	tccc	ctt	gt	1020
gtat	ccat	ct	tga	ata	aat	tgccc	aaat	cct	aa	agacc	1070
aacc	attg							ggg	aaa	agg	1078

Abb. 4: cDNA-Sequenz der humanen CD8β.2-Kette

Die abgebildete Sequenz zeigt außer der kodierenden noch die 3'- und 5'-untranslatierte Regionen. Der Beginn der jeweiligen Domäne (Ig, CP, TM und Cyt) ist fettgedruckt dargestellt. Die Cysteine 155 und 168 sind unterstrichen.

Im ersten Schritt wurden für die Herstellung der CD8-Konstrukte Fragmente der wt-DNAs durch spezifische Primer amplifiziert. Die Primer sind durch einen Überhang von bis zu 15 Basenpaaren der jeweils zu verknüpfenden Domäne der anderen Kette charakterisiert (siehe auch 2.1.4, Tabelle 1). Die zu verknüpfenden Fragmente wurden im zweiten Schritt über die komplementären Überhänge verbunden und durch das Einsetzen der Klenow-Polymerase oder Taq/Pfu-Polymerase aufgefüllt. Das komplette Konstrukt wurde anschliessend durch Amplifikation mit den Rand-Primern der jeweiligen außenliegenden Domäne hergestellt. Die erhaltenen Konstrukte wurden dann in den Klonierungsvektor pCR2.1 ligiert. Nach Sequenzierung und eventueller Korrektur wurden die Fragmente in den eukaryontischen Expressionsvektor pSH umkloniert.

Es wurden CD8-Konstrukte hergestellt, in denen jeweils eine Domäne gegen diejenige der anderen Kette ausgetauscht wurde, um die Funktion der einzelnen Domänen untersuchen zu können. Das heißt, es wurde jede einzelne Domäne der α -Kette in die der β -Kette mutiert und umgekehrt. Negative Signale bei der Oberflächenfärbung im FACS sollten sicher als fehlende Expression interpretiert werden können und kein Bindungsproblem des spezifischen Antikörpers darstellen. Daher wurden für die Konstrukte mit dem Austausch in der Transmembran- und cytoplasmatischen Domäne DNAs konstruiert, die extrazellulär komplett aus einer Domäne bestehen. Es wurden noch weitere Konstrukte hergestellt, die in verschiedenen Positionen von einer Kette jeweils zwei Domänen enthalten. Damit sollte die Bedeutung der Dimerisierung und fehlende Oberflächenexpression der β -Kette untersucht werden.

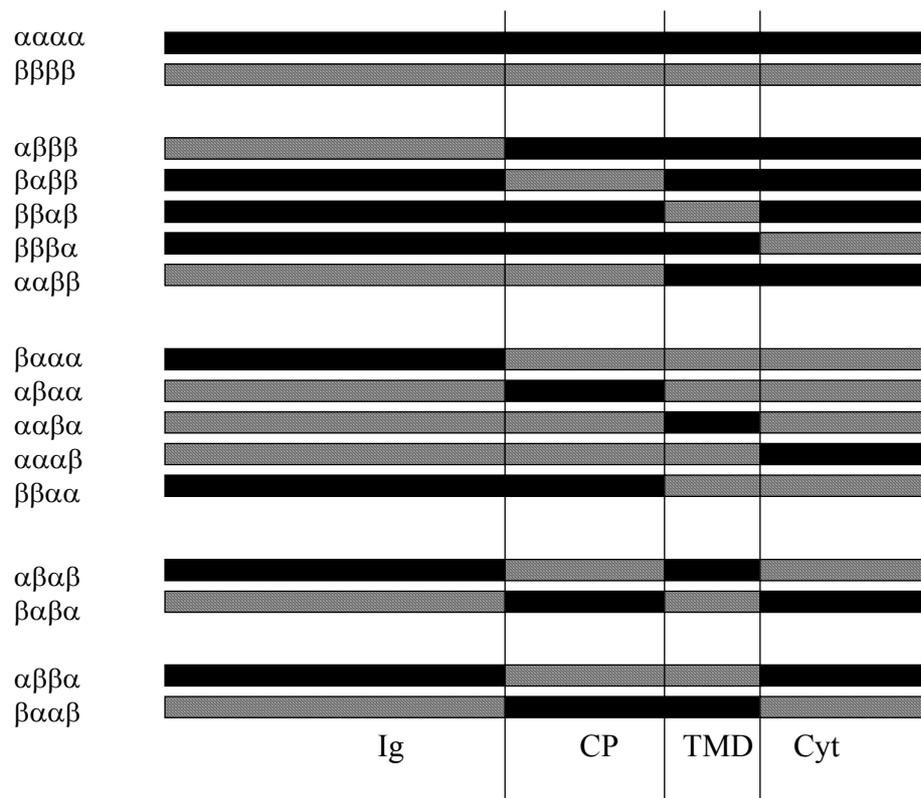


Abb. 5: Grafische Darstellung der CD8α- und β-Konstrukte

Die schwarzen Balken stellen Domänen der CD8α-Kette, die gestreiften Balken die der CD8β-Kette dar. (Ig = Immunglobulin-Domäne, CP = „connecting peptide“, TM = transmembrane Domäne und Cyt = cytoplasmatische Domäne).

Die CD8-wt-Ketten und auch die CD8-Konstrukte sollten nun in eine T-Zelllinie kotransfiziert werden, die einen CD8-abhängigen TCR bekannter Spezifität exprimiert. Dazu wurden unterschiedliche Jurkat-Varianten auf ihre Oberflächenexpressionen hin untersucht.

3.1.1 Untersuchung der Jurkat-wt und HSA5-Linie auf Oberflächenexpression von TCR und CD28

Die Linie HSA5, die mir von Dr. Nishimura zur Verfügung gestellt wurde, exprimiert stabil einen T-Zell-Rezeptor, der spezifisch auf das MART-1-Peptid reagiert (Beschreibung unter 3.2.1). Im Vergleich zur Jurkat-wt-Linie wurde diese Linie auf ihre T-Zell-Rezeptorexpression mit UCHT-1 (CD3ε) und BMA.031 (gegen die konstante Domäne des TCR gerichtet) und CD28-Expression (CD28.1) durchflusszytometrisch untersucht.

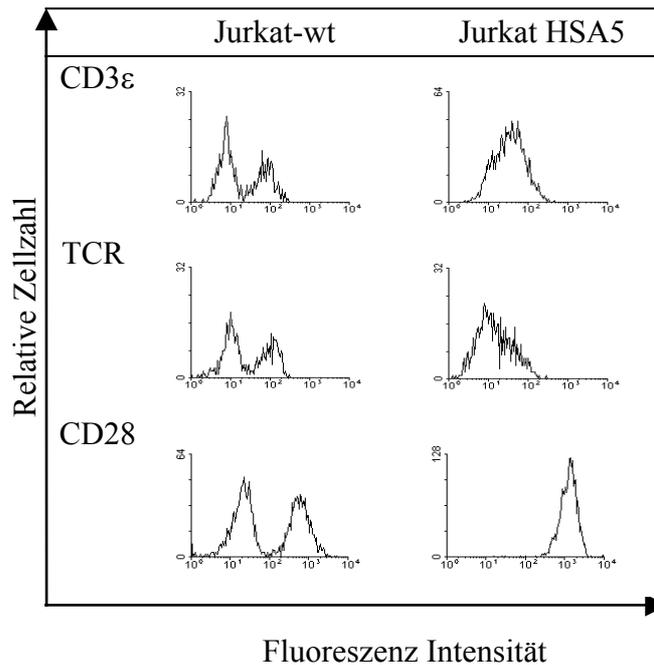


Abb. 6: FACS-Analyse der Oberflächenproteine TCR, CD3 ϵ und CD28

Die Jurkat-Linien wt und HSA5 wurden mit UCHT-1, FITC gekoppelt (CD3 ϵ) BMA.031, PE gekoppelt (gegen die konstante Domäne des TCR) und CD28.1, APC gekoppelt (CD28) inkubiert und die Fluoreszenz-Intensität im FACS erfasst.

Die durchflusszytometrische Untersuchung der MART-1 spezifischen Linie zeigt eine deutliche Anfärbung der TCR-CD3 ϵ -Kette und des TCRs für sich (Abb. 6). Die Bestätigung der MART-1 spezifischen TCR-Expression erfolgte im Aktivierungsassay. Im Vergleich zur wt-Linie zeigt HSA5 eine einheitliche positive CD28-Expression (Abb. 6).

3.1.2 Kotransfektion der Jurkat-Linie HSA5 mit CD8-wt-Ketten

In die Jurkat-Linie HSA5, spezifisch für MART-1, wurden die CD8 α - und CD8 β -Kette alleine und CD8 α - und β -Kette gleichzeitig kotransfiziert. Die CD8-Oberflächenexpression der Transfektanten wurde im Durchflusszytometer mit spezifischen Antikörpern untersucht.

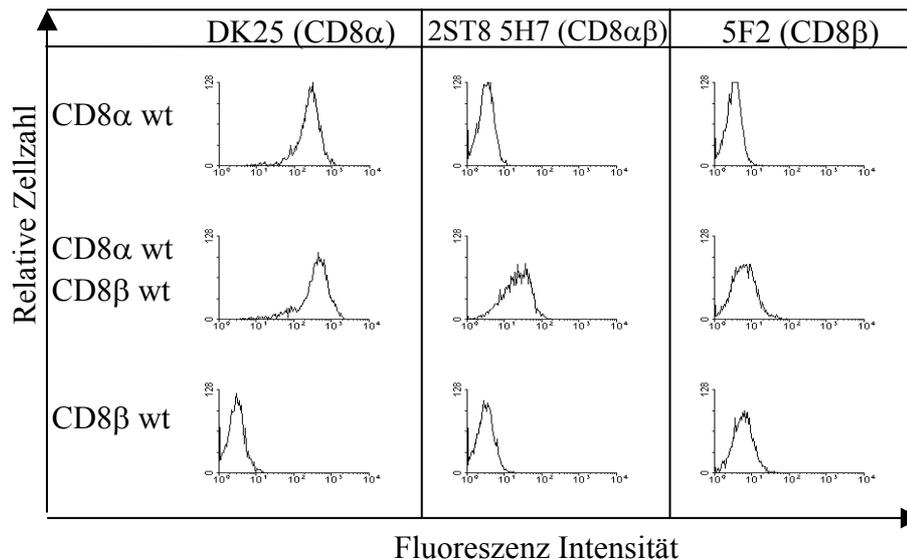


Abb. 7: CD8-wt-Expression auf HSA5

Die Oberflächenexpression des CD8 α -Homodimers wurde mit DK25, die des CD8 α β -Heterodimers mit 2ST8 5H7 und die des CD8 β β -Homodimers auf HSA5-Transfektanten mit 5F2 im FACS nachgewiesen. Alle gebundenen Primärantikörper wurden mit Ziege-anti-Maus-Fluoreszein nachgewiesen.

Die CD8 α -Homodimerexpression in den CD8 α -wt und CD8 α -wt/ β -wt-Transfektanten ist vergleichbar in ihrer Stärke und um eine log-Stufe geringer als in PBLs (Abb. 16). Die CD8 α β -Heterodimerexpression ist ebenso eine log Stufe schwächer im Vergleich zu PBL. Eine Expression der CD8 β -Kette als CD8 β β -Homodimer ist, wenn überhaupt, nur schwach erkennbar. Die CD8-Abhängigkeit des MART-1-spezifischen TCRs wurde im Aktivierungsexperiment untersucht (3.2.2).

3.1.3 Oberflächenantigene der Jurkat-Linien RT3 im Vergleich zu Jurkat-wt

Da sich der MART-1 spezifische TCR in der Jurkat-Linie HSA5 nicht als CD8-abhängig erwies, sollte als Zelllinie für die stabile Transfektion der CD8-Konstrukte die Linie RT3 verwendet werden. Sie ist aus einem Klon der Jurkat-wt-Linie entstanden. Die RT3-Linie exprimiert keinen T-Zell-Rezeptor (Abb. 8), da sie keine endogene T β -Kette trägt und sie ist CD8 negativ im Vergleich zu Jurkat-wt (Abb. 9), während Jurkat-wt in der Literatur (Leukocyte Typing workshop IV, 59) als 30 % positiv beschrieben ist. Die Oberflächenexpression von CD8-Dimeren wurde anhand von FACS-Analysen (Abb. 9) untersucht. Die Jurkat-Linie RT3 wurde mit dem TAX-spezifischen TCR

RSD3 transfiziert und ausschließlich TCR-exprimierende Klone nach Subklonierung als Linie zusammengefasst (Abb.8).

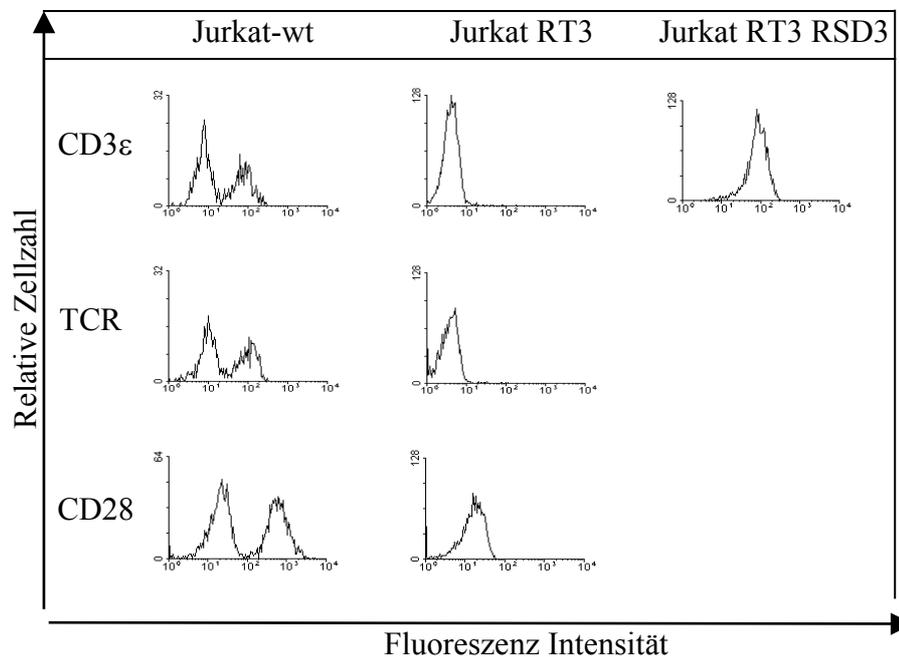


Abb. 8: Oberflächenexpression von TCR, CD3 ϵ und CD28 auf Jurkat-wt und RT3 und RT3-RSR3.

Die Jurkat-Linien wt und RT3 und RT3 RSD3 wurden mit UCHT-1 (CD3 ϵ), mit BMA.031 gegen TCR (konstante Domänen) und mit CD28.1 (CD28) im FACS untersucht.

Die Oberflächenexpression der Jurkat-Variante RT3 zeigt keine TCR/CD3 ϵ -Oberflächenexpression und ist daher als parentale Linie für eine Kotretransfektion mit CD8-wt-Ketten oder CD8-Konstrukten trotz fehlender CD28-Expression geeignet. Da CD28 zwar beim Primen von naiven T-Zellen in der Antigenerkennung bei der Entscheidung Toleranz oder Proliferation benötigt wird, aber nicht bei bereits cytotoxisch aktivem TCR bedeutsam ist, kann der Verlust als weiterer Korezeptor vernachlässigt werden (61).

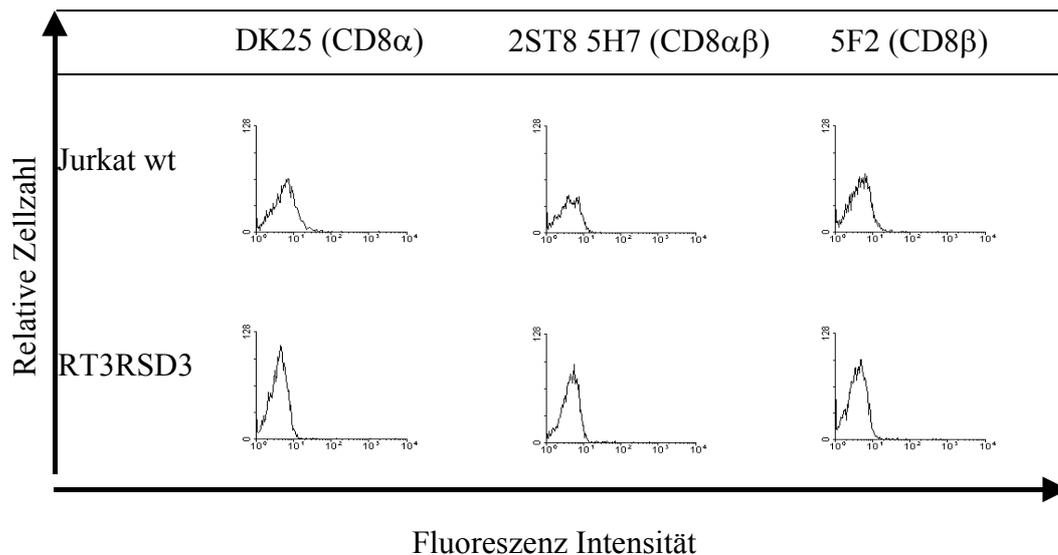


Abb. 9: Oberflächenfärbung der Linien RT3 und Jurkat-wt

Durchflusszytometrische Analyse von Jurkat-wt mit DK25 (CD8 α), 2ST8 5H7 (CD8 $\alpha\beta$) und 5F2 (CD8 β). Darstellung von Jurkat RT3 mit den selben Antikörpern.

Im Vergleich zur Jurkat-wt-Linie ist eindeutig zu erkennen, dass RT3 keine Oberflächenexpression von CD8-Dimeren zeigt. Die Grundvoraussetzung für die folgenden Transfektionen mit CD8-Ketten und -Konstrukten war somit gegeben.

3.1.4 CD8-Transfektanten der Jurkat-Linie RT3 RSD3

Die CD8wt-DNA und die CD8-Konstrukte im Expressionsvektor pSH wurden für die Transfektion mit *Sall* linearisiert. Um die Hygromycinresistenz bei der Kotransfektion von CD8 α - und β -Kette zu zerstören, wurde das Plasmid pSHHuCD8 α mit *MluI* linearisiert. Es wurden jeweils 10 μ g einer DNA, bei Kotransfektion 20 μ g der CD8 β -Kette pro 10 Millionen Zellen der RT3-Linie bei der Elektroporation eingesetzt. Nach Selektion in 24 well-Platten mit 1 mg/ml Hygromycin wurden nach 3-4 Wochen die Klone im FACS durch gegen CD8-wt-Dimere gerichtete Antikörper untersucht. Die Zellen mit der stärksten CD8-Expression wurden zu einer Zelllinie zusammengenommen. Gegebenenfalls wurden die positiven Zellen einer Linie noch über MACS (magnetic absorbent cell sorting) angereichert. Die Oberflächenexpression der transfizierten DNAs war in der Zellkultur über Wochen bis Monate stabil.

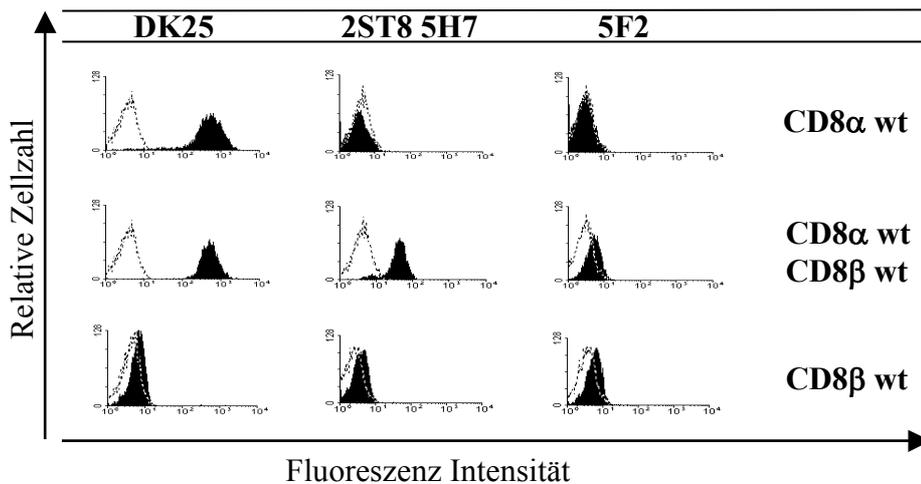


Abb. 10. FACS-Analyse der Jurkat-Transfektanten

Die CD8⁻-Linie JRT3-RSD3, und die CD8⁺-Linien wurden mit den Antikörpern DK25 (humanes CD8 α), 2ST8 5H7 (humanes CD8 $\alpha\beta$) und 5F2 (humanes CD8 β) und dem polyklonalen Sekundär-Antikörper Ziege-anti-Ratte-PE (kreuzreaktiv mit Maus-Ig) gefärbt.

Die Expression der CD8-wt-Ketten ist im gleichen Verhältnis reduziert wie aus HSA5 im Vergleich zur Expression auf PBL (vergleiche Abb. 16). Die Expression des CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimers in Abb. 10 ist mit der medianen Fluoreszenzintensität (MFI) von 10^3 am stärksten und ist damit vergleichbar mit der Expression des CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimers auf HSA5 (vergleiche Abb. 7). Die Expression des Heterodimers CD8 $\alpha\beta$ ist wesentlich schwächer als die des CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimers, entspricht aber auch der von CD8 $\alpha\beta$ -HSA5. Die Transfektion von CD8 β alleine wurde 5 mal wiederholt und zeigte eine nur minimale CD8 β -Expression. Daraus lässt sich schließen, dass in der Jurkat-Linie RT3 CD8 β -Monomere oder CD8 $\beta\beta$ -Homodimere nur in starker Überexpression unkontrolliert auf die Zelloberfläche gelangen. Diese wenigen Moleküle wurden mit dem Antikörper 5F2, nicht aber mit 2ST8 5H7 nachgewiesen. Der spezifische Antikörper 2ST8 5H7 erkennt damit die β -Kette alleine nicht, sondern nur das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer.

3.1.5 Herstellung von Zelllinien mit Expression von CD8-Konstrukten

3.1.5.1 Austausch einzelner Domänen

Die Jurkat-Linie RT3 RSD3 wurde mit den CD8-Konstrukten unter gleichen Bedingungen transfiziert, selektioniert und analysiert, wie die CD8-Wildtyp-Transfektanten. Um die Oberflächenexpression der CD8-Konstrukte nachzuweisen, wurden alle Konstrukte mit CD8 α Ig-Anteil mit DK25 (CD8 α) und CD8 β Ig-Anteil mit 5F2 (CD8 β) gefärbt.

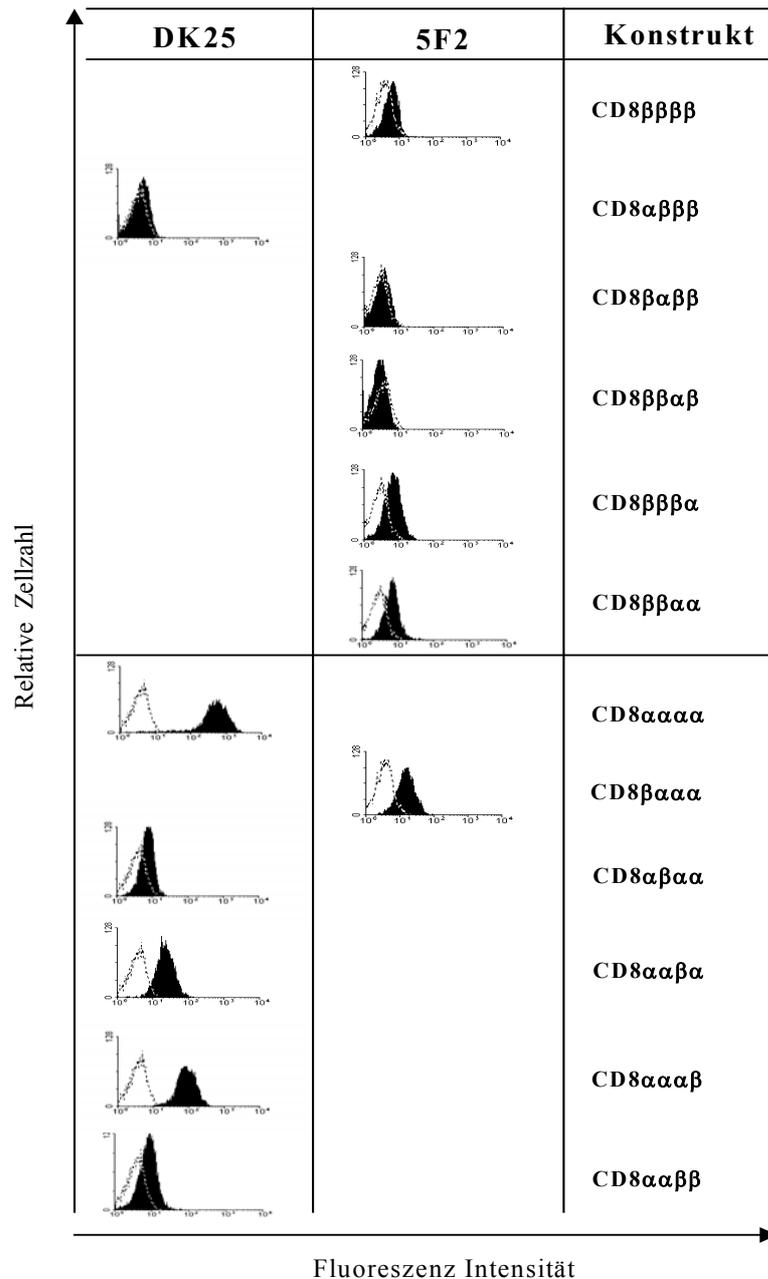


Abb. 11: Expression der CD8-Konstrukte

Jurkat-RT3-Transfektanten wurden mit DK25 gegen die α Ig-Domäne bzw. 5F2 gegen die CD8 β Ig-Domäne inkubiert und mit GAR-PE gefärbt. Das solide Histogramm zeigt die Expression des Konstruktes, das gestrichelte Histogramm stellt die entsprechende Antikörperfärbung der untransfizierten CD8⁻-RT3-Linie dar.

Die Untersuchung des Konstruktes CD8 $\beta\alpha\alpha\alpha$ zeigt, dass das Epitop des spezifischen Antikörpers 5F2 in der β Ig-Domäne liegt. Im Vergleich zur nicht transfizierten CD8-negativen Linie lassen sich alle schwachen Färbungen eindeutig als niedrige Expressionen interpretieren.

Die Expression der CD8 β -wt-Kette liegt nur gering über der Negativkontrolle. Die Konstrukte CD8 $\beta\beta\beta\alpha$, CD8 $\beta\beta\alpha\alpha$ und CD8 $\beta\alpha\alpha\alpha$ zeigen eine deutlich stärkere Expression als CD8 β -wt. Am stärksten wird CD8 $\beta\alpha\alpha\alpha$ exprimiert. Es hat den größten Anteil an α -Domänen, die eine funktionelle Aktivität in der Bildung der CD8-Dimere und im Transport zur Zelloberfläche haben. Der Vergleich der Expressionsstärke der CD8 $\beta\beta\beta\alpha$ -, CD8 $\beta\beta\alpha\alpha$ - und CD8 $\beta\beta\alpha\beta$ -Konstrukte zeigt, dass der Austausch der cytosolischen Domäne des CD8 β gegen α einen positiven Effekt auf die CD8-Expression hat, der Austausch der TM-Domäne dagegen lässt keine Verbesserung der CD8-Expression erkennen (CD8 $\beta\beta\alpha\beta$). Werden jedoch gleichzeitig die β -TM und β -cytoplasmatische Domäne gegen die der α -Kette ausgetauscht (CD8 $\beta\beta\alpha\alpha$), so nimmt die Expression deutlich zu, auch wenn sie noch unter der Expression des Konstrukts CD8 $\beta\alpha\alpha\alpha$ liegt. Das bedeutet, dass auch die β -CP-Region einen großen Einfluss auf die Oberflächenexpression hat. In dieser Region findet die Disulfidbrückenbildung statt, die für eine Oberflächenexpression unerlässlich ist. Wie Hennecke *et al.* in ihrer Arbeit zeigten, werden Monomere im ER zurückgehalten (28). Ob nun β CP die Expression unterdrückt oder α CP (CD8 $\beta\alpha\beta\beta$) die Dimerisierung ermöglicht, lässt sich hier nicht klären. Beim Konstrukt CD8 $\beta\alpha\beta\beta$ ist keine Oberflächenexpression zu erkennen. Der Einfluss der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domäne wird wahrscheinlich den Einfluss der Dimerisierung über die α -CP-Domänen überwiegen.

Beim Austausch einzelner Domänen der CD8 α -Kette gegen die entsprechenden Domänen der CD8 β -Kette sind deutlichere Abstufungen der CD8-Expression zu erkennen. Die MFI des CD8 $\alpha\alpha\alpha\beta$ -Konstrukts liegt eine log-Stufe tiefer als die des CD8 α -wt. Der Austausch der CD8 α -TM-Domäne gegen die der CD8 β -Kette (CD8 $\alpha\alpha\beta\alpha$) reduziert die Expression sogar um 1,5 log-Stufen. Werden sowohl die Transmembran- und cytosolische Domäne der CD8 α -Kette gegen die der CD8 β -Kette ausgetauscht, addiert sich der Effekt: Das CD8 $\alpha\alpha\beta\beta$ -Konstrukt wird nur noch minimal exprimiert.

Ob es sich bei der fehlenden Expression des CD8 $\alpha\beta\alpha\alpha$ -Konstrukts um ein Versagen (siehe auch Abb.18, 19, Cos-7-Transfektanten) der Antikörperfärbung durch den gegen

CD8 α -wt gerichteten Antikörper DK25 handelt oder ob nicht doch CD8 $\alpha\beta\alpha\alpha$ -Konstrukte in geringeren Mengen als Dimere auf die Zelloberfläche gelangen, kann hier nicht sicher gesagt werden.

3.1.5.2 Expression der CD8-Konstrukte mit je zwei Domänen einer Kette

Zusätzlich zum Austausch einzelner CD8-Domänen wurden als weitere Kontrolle auch Konstrukte generiert, in denen zwei CD8-Domänen ausgetauscht wurden.

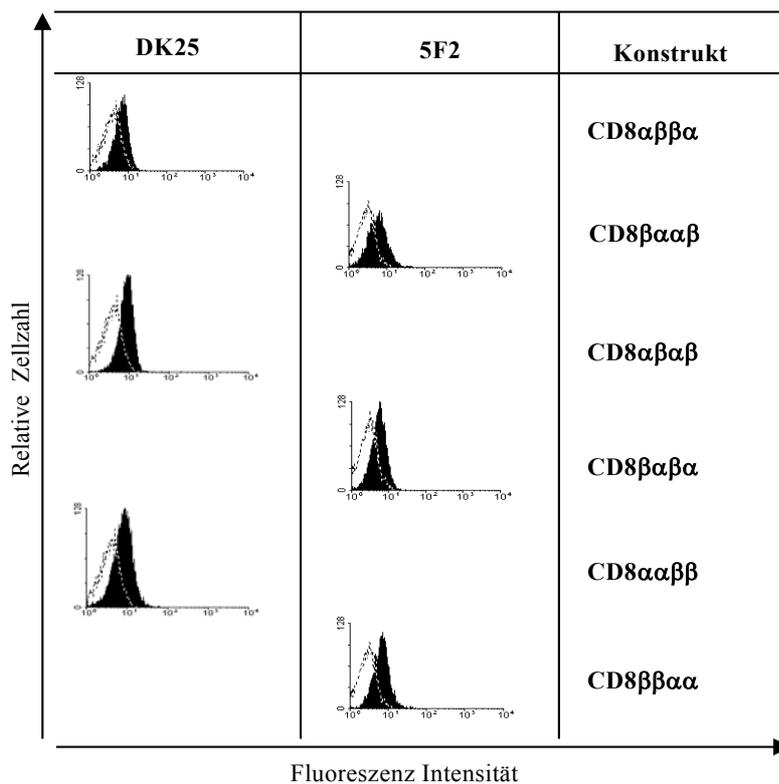


Abb. 12: Expression der CD8-Konstrukte mit jeweils 2 Domänen einer Kette in verschiedenen Positionen. Jurkat-Transfektanten wurden mit DK25 gegen die CD8 α -Ig-Domäne bzw. 5F2 gegen die CD8 β Ig-Domäne inkubiert und mit GAR-PE gefärbt. Das solide Histogramm zeigt die Expression des Konstruktes, das gestrichelte Histogramm stellt die entsprechende Antikörperfärbung der CD8⁻-Linie dar.

Der Nachweis der Konstrukte mit zwei Domänen einer Kette in unterschiedlichen Positionen erwies sich als schwierig. Wie unter Punkt 3.1.10 beschrieben (Abb.18, 19), ist der gegen CD8 α -wt gerichtete Antikörper DK25 nicht in der Lage, Konstrukte mit α Ig- β CP-Anteil zu erkennen. Somit lassen sich die Expressionen der Konstrukte CD8 $\alpha\beta\beta\alpha$ und CD8 $\alpha\beta\alpha\beta$ kaum von der Hintergrundfärbung mit der CD8-negativen Linie JRT3 RSD3 unterscheiden und es lassen sich keine Aussagen über die Expression machen. Die Konstrukte mit β Ig- α CP lassen sich mit dem spezifischen Antikörper

gegen CD8 β -wt anfärben, was gut in Abb. 10 in der Expression des Konstrukts CD8 $\beta\alpha\alpha$ oder bei durchflusszytometrischen Analyse der COS-7-Transfektanten (Abb. 18, 19) zu erkennen ist. Die Expression der Konstrukte CD8 $\beta\alpha\beta$ und CD8 $\beta\alpha\beta$ (Abb. 12) ist allerdings sehr niedrig, da die hemmende cytosolische oder Transmembran-Domäne der β -Kette bestimmend für die reduzierte Expression zu sein scheint.

3.1.6 Oberflächenexpression der CD8-Konstrukte mit α Ig- β CP-Anteil

Da auf COS-7-Transfektanten deutlich wurde, dass alle Konstrukte mit CD8 α Ig- β CP-Ektodomäne nicht durch den gegen CD8 α gerichteten Antikörper DK25 erkannt werden, wurde die Linie CD8 $\alpha\beta\alpha$ mit den monoklonalen Antikörpern des CD8-Panels aus dem Leukocyte-Typing Workshop IV (59) im Vergleich zur CD8 α -wt-Linie durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 13). Das Ziel der Untersuchung war, einen gegen α Ig gerichteten Antikörper zu finden, der unabhängig vom CP sein Epitop erkennt. So sollte es dann möglich sein, eine Aussage über die Expression der Konstrukte CD8 $\alpha\beta\alpha$, CD8 $\alpha\beta\beta$, CD8 $\alpha\beta\beta\alpha$ und CD8 $\alpha\beta\alpha\beta$ auf Jurkat RT3 RSD3 zu machen.

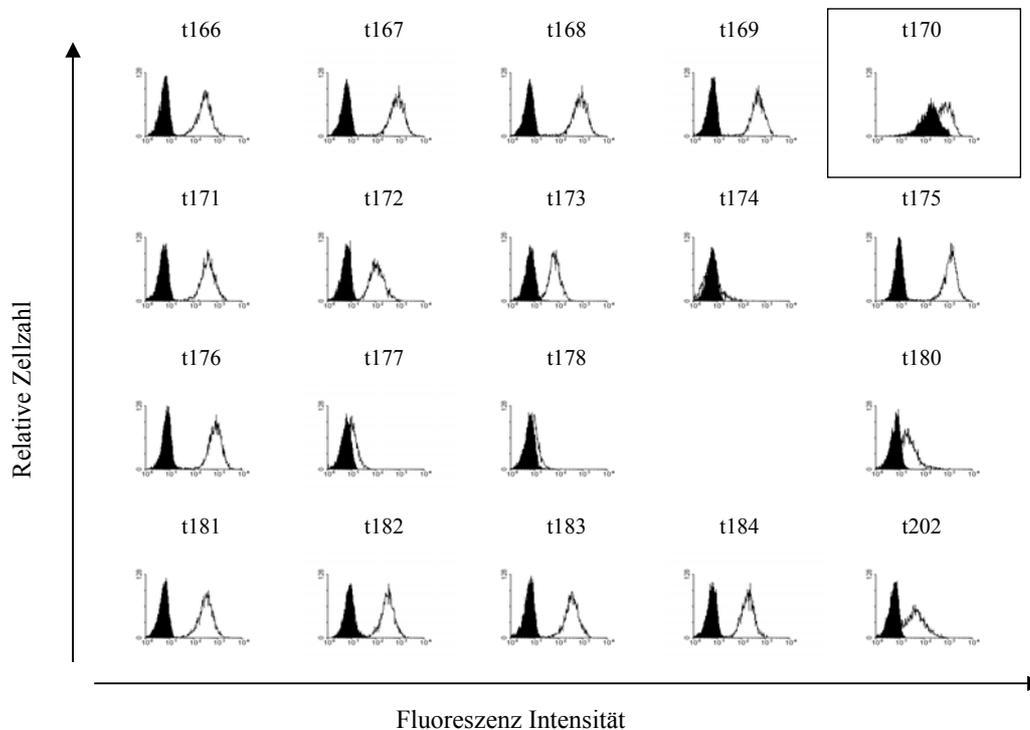


Abb. 13: Durchflusszytometrie mit monoklonalen Antikörpern aus dem CD8-Workshop Leukocyte-Typing IV. Die ausgefüllten Histogramme repräsentieren die Linie CD8 $\alpha\beta\alpha$, die durchgezogene Linie stellt die mit CD8 α -wt transfizierte Linie RT3 dar. Alle Primärantikörper wurden mit Ziege-anti-Maus-Phycoerythrin gefärbt.

Der Antikörper t170 (t8b, Yan Bai) bindet deutlich auf der mit CD8 $\alpha\beta\alpha$ transfizierten Linie (Abb.13). Die Expression ist etwa eine halbe log-Stufe niedriger als bei der CD8 α -wt transfizierten Linie. Die Antikörper t174, t177 und t178 binden überraschenderweise nicht auf der CD8 α -wt transfizierten Linie, obwohl sie im Leukocyte-Typing Workhop IV als CD8 α -wt erkennend, t174 sogar zusätzlich als CD8 α -wt-immunpräzipitierend beschrieben wurden.

Um sicher zu stellen, dass der Antikörper t170 die CD8 α -negative Linie nicht färbt, wurde anschliessend die Färbung unter gleichen Bedingungen auf der CD8-negativen Jurkat RT3 RSD3 im Vergleich zu CD8 $\alpha\beta\alpha$ wiederholt (Abb. 14).

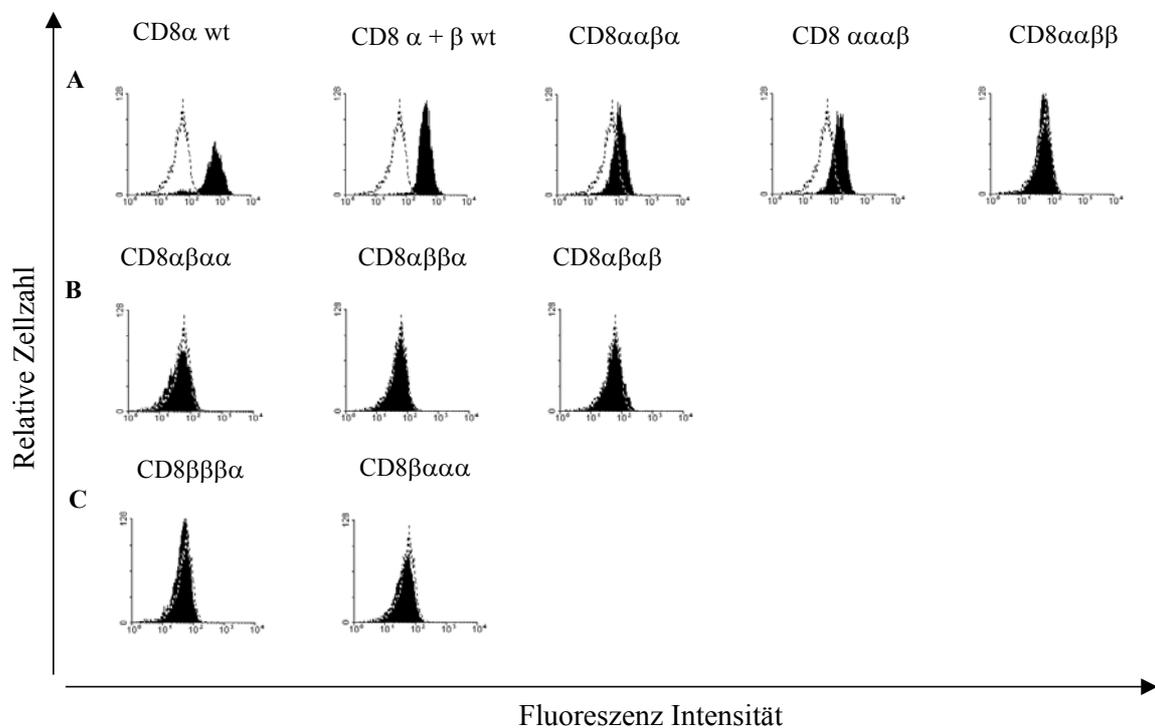


Abb. 14: FACS-Analyse der CD8-negativen Linie im Vergleich zu α -Ig-positiven Transfektanten mit dem monoklonalen Antikörper t170. Die ausgefüllten Histogramme repräsentieren Linien, die eine α -Ig-Domäne enthalten, die gestrichelte Linie stellt die CD8 α -negative Linie Jurkat RT3 RSD3 dar. **A.** Linien, die extrazellulär als Epitop CD8 α Ig und CD8 α CP haben. **B.** Linien, die extrazellulär CD8 α Ig- β CP exprimieren. **C.** CD8- β Ig-exprimierende Transfektanten als Negativkontrolle.

Der Antikörper t170 bindet an die CD8 α -wt transfizierte Linie. Es ist aber deutlich zu erkennen, dass auch die CD8-negativ Linie angefärbt wird. Diese Färbung ist lediglich eine log-Stufe schwächer. Die durchflusszytometrische Untersuchung der mit CD8 α Ig- β CP transfizierten Linien zeigte keine stärkere Expression als auf der CD8 α -Linie. Die Färbung der mit den Konstrukten CD8 $\alpha\alpha\beta$ und CD8 $\alpha\alpha\beta\beta$ transfizierten Linien ist

hingegen deutlich über derjenigen der CD8⁺-Linie, wenn auch im Vergleich zur Expression von CD8 α -wt vermindert. Die Hintergrundfärbung lässt sich nur auf eine Kreuzreaktivität gegen ein anderes Oberflächenprotein zurückführen. Damit ist dieser Antikörper entweder nicht in der Lage, Konstrukte mit α Ig- β CP-Anteil zu erkennen oder diese Konstrukte gelangen nicht als Dimere auf die Zelloberfläche.

3.1.7 Oberflächenfärbung von CD8 α -wt und CD8 $\alpha\beta\alpha$ mit dem CD8-Panel aus Leukocyte Typing IV auf COS-7

Um nachweisen zu können, ob Antikörper aus dem CD8-Panel aus dem Leukocyte-Typing IV (59) in der Lage sind die CD8 α -Ig-Domäne zu erkennen, wurden transient mit Leer-Vektor, CD8 α -wt und CD8 $\alpha\beta\alpha$ transfizierte COS-7-Zellen mit diesen Antikörpern unter gleichen Bedingungen wie bei den Jurkat-Transfektanten inkubiert (Transfektion von Dr. Renate Scheibe).

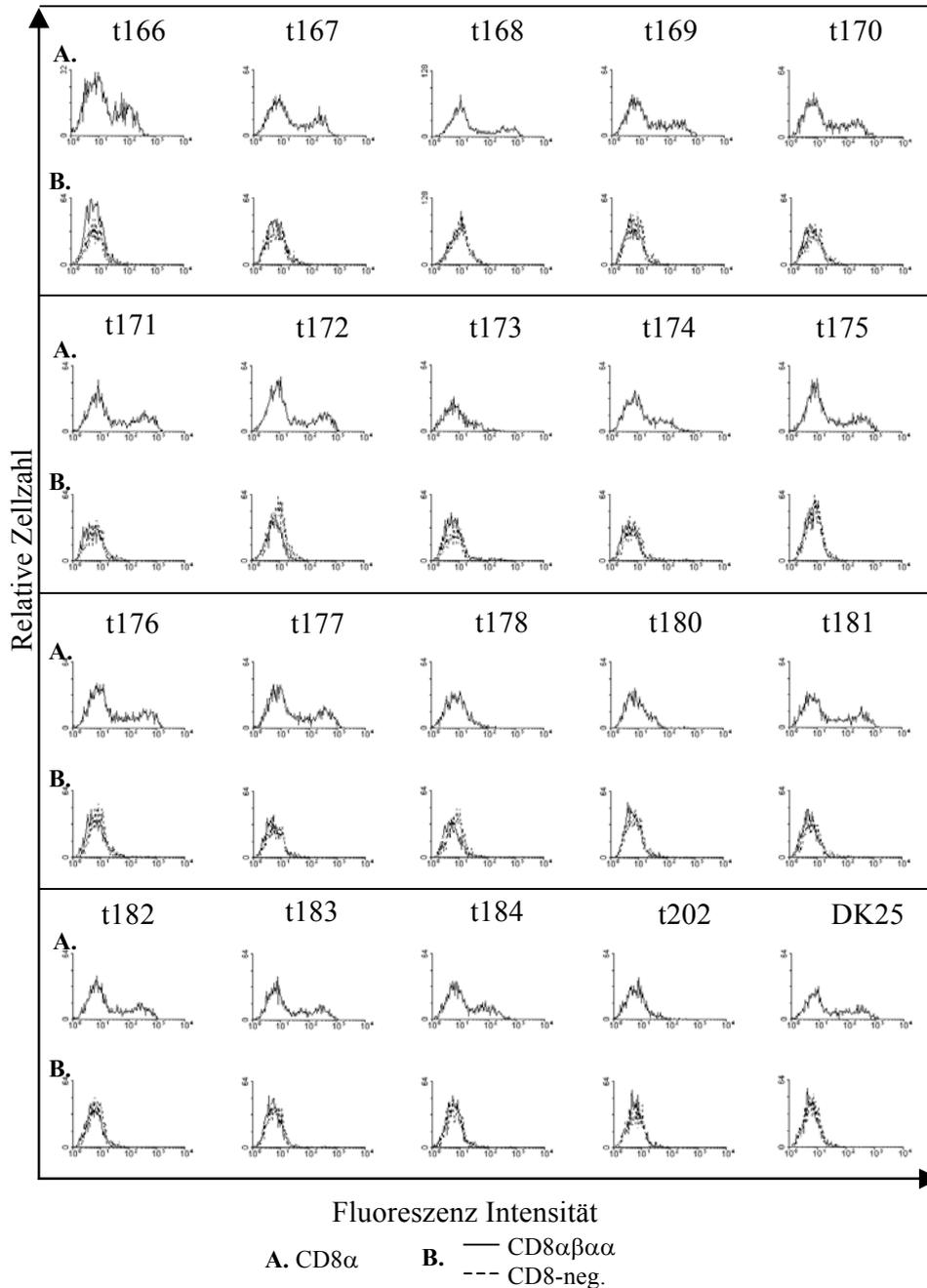


Abb. 15: FACS-Analyse der COS-7-Transfektanten mit CD8 α -Antikörpern aus dem CD8-Panel aus dem Leukocyte-Typing IV. COS-7 wurden transient mit dem Leer-Vektor (gestrichelte Linie, B), CD8 α -wt (A.) und CD8 $\alpha\beta\alpha$ (durchgezogene Linie, B) transfiziert und die Oberflächenexpression mit den mAK aus dem CD8-Panel untersucht (Sekundär-Antikörper: Ziege-anti-Ratte PE).

Die monoklonalen Antikörper aus dem CD8-Workshop (Leukocyte-Typing IV) zeigen eine deutliche Oberflächenexpression der mit CD8 α -wt transfizierten COS-7-Zellen als Positiv-Kontrolle (Abb. 15A). Antikörper, die eine reduzierte Bindung auf der Jurkat-Transfektante CD8 $\alpha\beta\alpha\alpha$ zeigten (t 177, t180, t202), binden bis auf t177 CD8 α -wt auf COS-7 nicht mehr. T177 zeigt hingegen eine wesentlich stärkere Bindung. T174 bindet auf Jurkat gar nicht, erkennt aber auf der COS-7-CD8 α -Transfektante deutlich sein Epitop. Unter identischen Bedingungen und zum gleichen Zeitpunkt wurde auch das Konstrukt CD8 $\alpha\beta\alpha\alpha$ sowie der Leer-Vektor als Negativ-Kontrolle transfiziert (Abb. 15B). Während t170 auch die nicht mit CD8 α -wt transfizierten Jurkat-Zellen erkannt hatte, zeigte dieser Antikörper auf der CD8 α -COS-7-Linie keine Bindung. Keiner der Antikörper aus dem CD8-Workshop ist in der Lage, Konstrukte mit extrazellulärem Anteil α Ig- β CP zu erkennen.

3.1.8 Extra- und intrazelluläre Färbung von PBL und CD8-wt-Jurkat-Transfektanten

Da auf der Zelloberfläche der CD8 β -Transfektanten und Konstrukte mit CD8 β -CP-Anteil keine Expression von Dimeren nachweisbar ist, sollten sich intrazellulär größere Mengen an CD8-Molekülen befinden. Da alle CD8-Ketten mit demselben Vektor transfiziert wurden, also auch denselben Promotor hatten, sollte auch die Menge des transkribierten Proteins in Abhängigkeit der gebildeten mRNA-Menge gleich sein. Es wäre also zu erwarten, dass sich membrangebundene Monomere bzw. Dimere im ER bzw. Golgi-Apparat nachweisen lassen. Zur Etablierung der intrazellulären Färbung wurden PBL verwendet, da hier die höchsten Expressionen zu erwarten waren. Die monoklonalen Antikörper DK25 gegen CD8 $\alpha\alpha$ -wt, 2ST8 5H7 gegen CD8 $\alpha\beta$ -wt und 5F2 gegen CD8 β wurden zuerst für die extrazellulären Durchflusszytometrie eingesetzt. Nach der Trypsinisierung wurden die Zelloberflächen nochmals angefärbt, um eindeutig den Verlust des Epitops für die Antikörper nachweisen zu können und auch eine Aussage über eine Hintergrundfärbung zu haben. Die intrazelluläre Färbung wurde unter Einsatz von Saponin durchgeführt, wobei den Waschschritten große Bedeutung zukam. Nicht gebundene Antikörper mussten genügend Zeit haben, um aus der Zelle herausdiffundieren zu können. Nur so konnte sichergestellt werden, dass nicht gebundene Primärantikörper Sekundärantikörper wegfangen (falsch negatives Signal) und nicht-gebundene Sekundärantikörper durch verschlossene Poren an der Diffusion

aus der Zelle gehindert werden (falsch positives Signal). Die gemessene Fluoreszenzintensität sollte einen Hinweis auf die maximal zu erwartende Expression der transfizierten Konstrukte in Jurkat RT3 RSD3 geben.

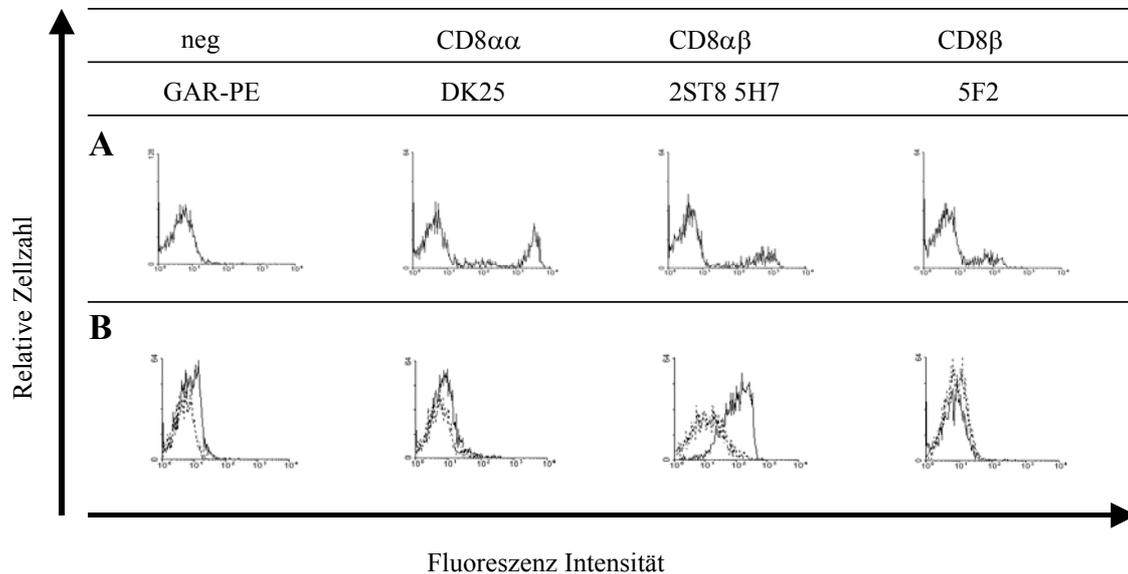


Abb. 16: Extrazelluläre und intrazelluläre Färbung von PBL

Über Ficoll-Separation aufgereinigte PBL wurden in Einfarb-Messung mit DK25 gegen CD8 $\alpha\alpha$ -wt, 2ST8 5H7 gegen CD8 $\alpha\beta$ -wt und 5F2 gegen CD8 β inkubiert und durchflusszytometrisch untersucht. **A.** Vor dem Trypsinverdau. **B.** Nach dem Trypsinverdau, extrazellulär gestrichelte Linie, intrazellulär schwarze Linie.

Die MFI des CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimers und auch des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers liegt um eine log-Stufe höher als die der Jurkat-Transfektanten. Der gegen CD8 β gerichtete mAK bindet auf PBL die CD8 β -Kette im CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer. Durch die Trypsinisierung der Zelloberfläche wurden die Epitope der drei Antikörper weitgehend vernichtet. Eine intrazelluläre Färbung der PBL sollte danach Aufschluss geben, ob größere intrazelluläre Reservoirs von CD8-Molekülen in PBL vorliegen. Wie in Abb. 16 zu sehen, binden die Antikörper DK25 und 5F2 intrazellulär nicht, während 2ST8 5H7 eine deutliche Färbung zeigt.

Um nun zu klären, ob es sich bei dem Signal durch 2ST8 5H7 um eine gegen CD8 $\alpha\beta$ -wt gerichtete Bindung handelt, wurden Jurkat RT3 Zellen intrazellulär gefärbt, die kein CD8 exprimieren. Als Positivkontrolle wurde die CD8 $\alpha\beta$ -wt-Linie extrazellulär vor und nach Verdau durch Trypsin gefärbt. Die CD8 negative Linie wurde auf gleiche Art wie CD8 $\alpha\beta$ -wt behandelt und intrazellulär gefärbt (Abb. 17).

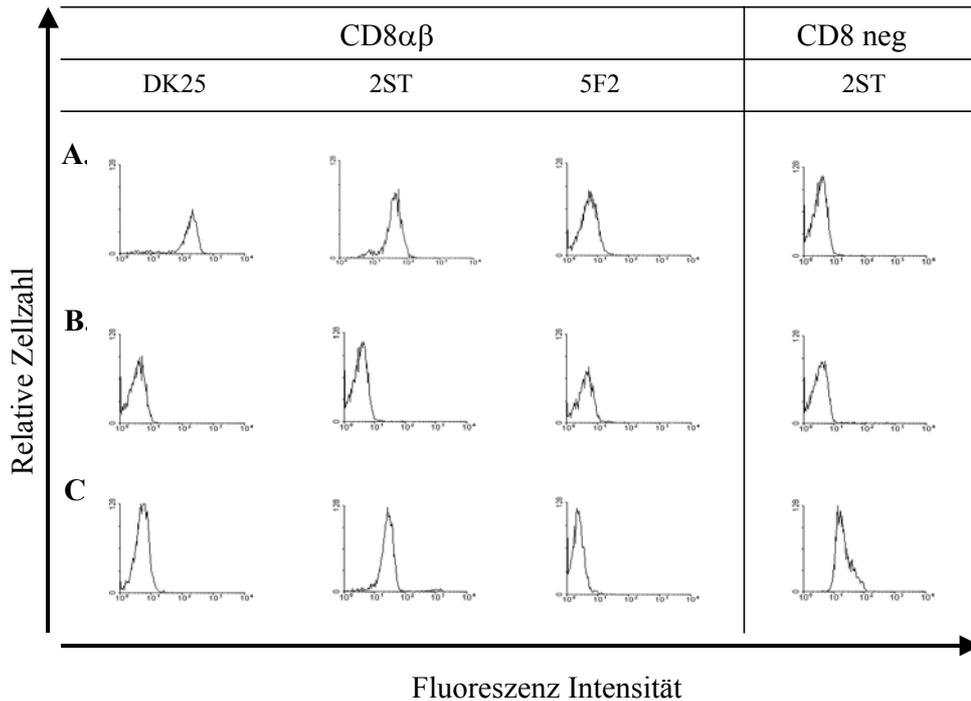


Abb. 17: Extra- und intrazelluläre Färbung der CD8-wt Jurkat-Transfektanten mit DK25, 2ST8 5H7 und 5F2. A. Extrazelluläre Färbung der CD8 $\alpha\beta$ -wt und CD8 neg. Linie vor Trypsinisierung. **B.** Extrazelluläre Färbung nach Trypsinisierung **C.** Intrazelluläre Messung nach extrazellulärer Trypsinisierung.

Der spezifische Antikörper 2ST8 5H7 erkennt hier in der CD8-negativen Linie ein Epitop, das nicht vom CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer stammen kann (Abb. 17). Es handelt sich hiermit also um eine intrazelluläre Kreuzreaktivität, nicht um einen größeren Pool an CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimeren, die durch Internalisierung bei Aktivierung cytotoxischer T-Zellen entstehen können (67).

3.1.9 Expression von CD8-Ketten auf COS-7-Zellen

Devine *et al.* hatten gezeigt, dass auf der Fibroblastenlinie COS-7 im Gegensatz zu unseren Ergebnissen mit den Jurkat-Transfektanten durchaus humanes, nicht aber murines CD8 β -wt exprimiert wird. Sie führten das Fehlen der Oberflächenexpression auf die murine β Ig-Domäne zurück. Daher untersuchte ich zusätzlich die Expression von CD8-Konstrukten nach transienter Transfektion von COS-7-Zellen, um einen eventuellen Einfluss der unterschiedlichen Domänen auf die Expression ermitteln zu können. Die transienten Transfektionen mit Transfektam (Promega) wurden von Dr. Renate Scheibe (Abteilung Vegetative Physiologie, Medizinische Hochschule Hannover) durchgeführt.

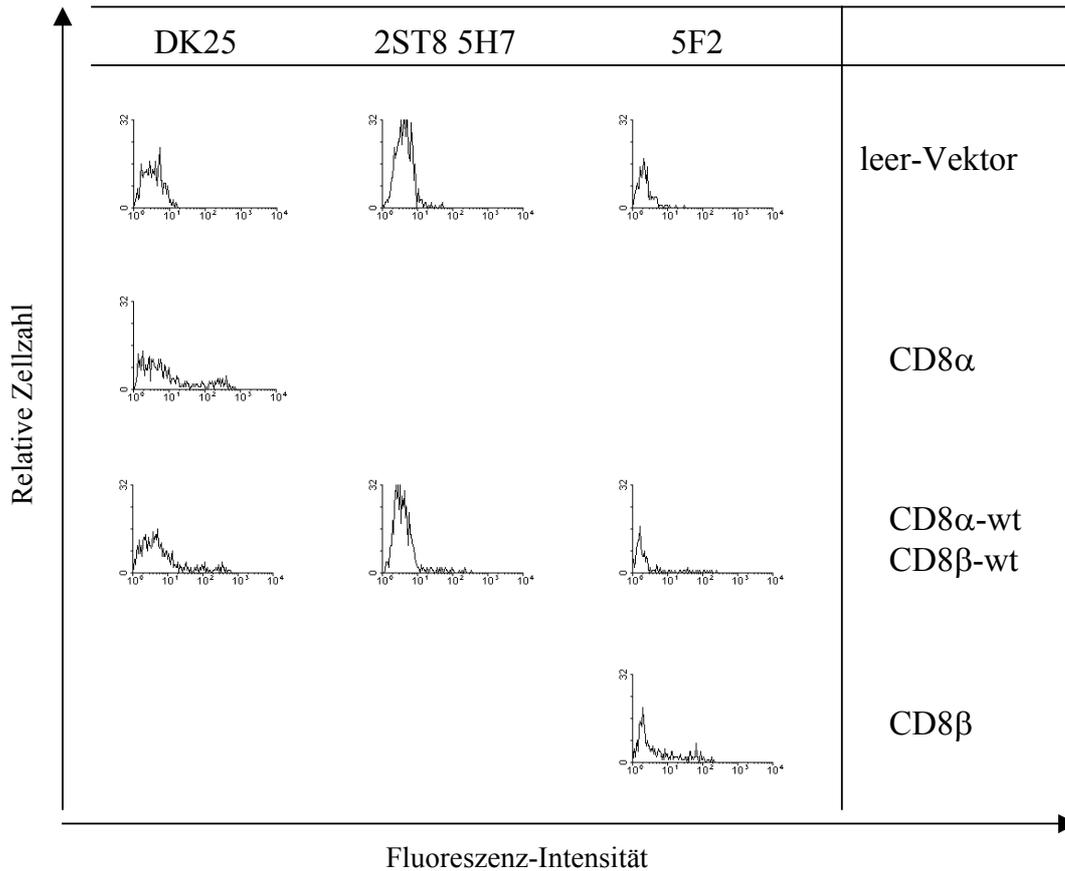


Abb. 18: FACS-Analyse der COS-7-Transfektanten mit den monoklonalen Antikörpern DK25, 2ST8 5H7 und 5F2. COS-7-Zellen wurden nach transienter Transfektion mit den CD8-wt-Ketten und dem Leer-Vektor als Negativkontrolle durchflusszytometrisch untersucht.

Die durchflusszytometrische Untersuchung erfolgte wie bei den Jurkat-Transfektanten mit den monoklonalen Antikörpern DK25, 2ST8 5H7 und 5F2. Auch hier wurde durch Blockade der Fc-Rezeptoren mit humaner Ig-Blocklösung ein falsch positives Signal verhindert. Wie in Abb. 18 zu sehen ist, wird humanes CD8β von COS-7-Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert.

Abb. 19 zeigt den prozentualen Anteil der medianen Fluoreszenzintensität aller Transfektanten im Vergleich zum Wildtyp (100%). 96 Stunden nach der Transfektion exprimierten 5-20 % der Zellen CD8. Als Negativkontrolle wurde der Leer-Vektor (Expressionsvektor pSHxs ohne Insert) unter gleichen Bedingungen transient transfiziert.

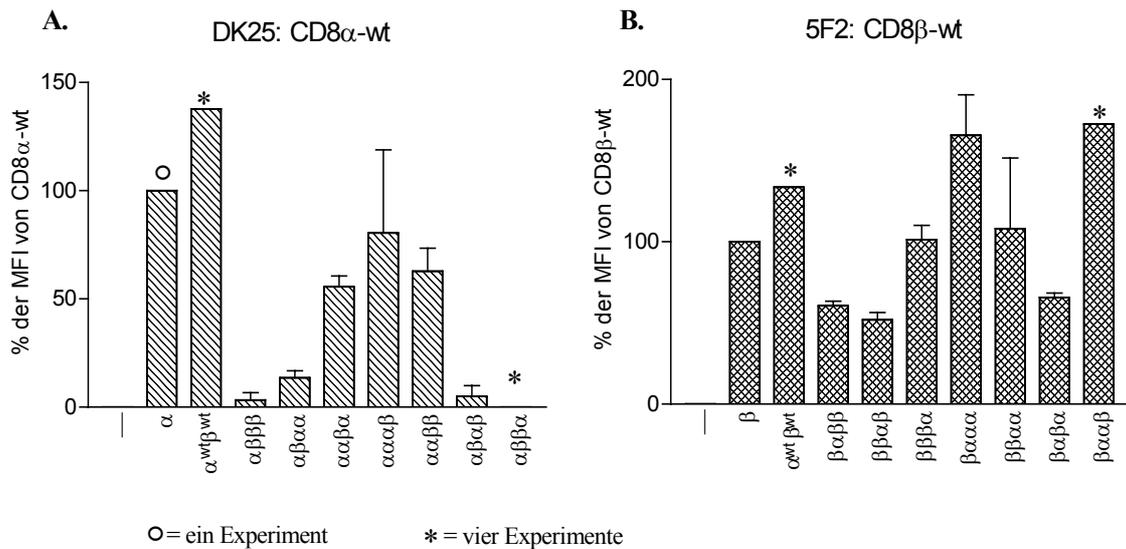


Abb. 19: Vergleich der medianen Fluoreszenzintensität der mit CD8-Konstrukten und Wildtyp-Ketten transfizierten COS-7-Zellen. **A.** Prozentualer Anteil der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der CD8 α -Konstrukte im Vergleich mit der MFI der CD8 α -wt-Expression, die gleich 100% gesetzt wurde. **B.** Prozentualer Anteil der MFI der CD8 β -Konstrukte verglichen mit der MFI der CD8 β -wt-Transfektanten. Die mit Sternchen gekennzeichneten Balken stellen Einfachmessungen dar, die mit einem Kreis gekennzeichneten Balken stellt eine 4-fach-Messungen dar.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit den COS-7-Zellen in Abb. 19 zeigen, dass alle CD8-Konstrukte etwa gleich stark exprimiert werden. Im Gegensatz zu den Jurkat-Zellen exprimiert COS-7 gut CD8 β -wt. Die Bindungsaffinität des monoklonalen Antikörpers zur CD8 β -Kette mit Austausch in der CP-Region gegen die α -Kette vermindert das Signal nur um ca. $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$. Der Austausch der transmembranen und cytosolischen Domänen (CD8 $\alpha\alpha\alpha\beta$, CD8 $\alpha\alpha\beta\alpha$, CD8 $\alpha\alpha\beta\beta$) verringert hier nicht die CD8-Expression wie in den Jurkat-Transfektanten (3.1.6.1). Es werden alle β -Konstrukte gebildet und von 5F2 (gegen CD8 β) erkannt. Weiterhin ist hier auch deutlich zu erkennen, dass der gegen CD8 α -wt gerichtete Antikörper DK25 nicht in der Lage ist, Konstrukte mit α Ig- β CP-Anteil zu erkennen, denn die β -CP-Domäne stellt keinen Hinderungsgrund für die Oberflächenexpression dar, wie die β -Konstrukte zeigen.

3.2 Funktionelle Untersuchung der T-Zell-Rezeptor-positiven Linien

Es wurden zwei Zelllinien mit T-Zell-Rezeptoren (TCR) bekannter Spezifität verwendet, um den Einfluss der unterschiedlichen Domänen des CD8-Korezeptors auf den T-Zell-Rezeptor/MHC Klasse I/Peptid-Komplex zu untersuchen. In diese Zelllinien wurden die CD8-wt-Ketten kotransfiziert und durch spezifische Peptide stimuliert. Die Interleukin-2-Produktion wurde quantitativ erfasst und die CD8-negative Linie mit den CD8wt-transfizierten Linien verglichen. Es sollte dabei ein deutlicher Unterschied in der Aktivierbarkeit der Zellen erkennbar werden.

3.2.1 Jurkat-Linie HSA5, spezifisch für MART-1-Peptid

Die Jurkat Linie HSA5 wurde von Dr. M. Nishimura (NIH, Bethesda, USA) hergestellt und mir zur Verfügung gestellt. Sie exprimiert einen humanen T-Zell-Rezeptor, der aus einem T-Zell-Klon isoliert wurde, der spezifisch auf HLA-A2 präsentierte Melanom-assoziiertes Peptid (MART-1) reagiert. Cole *et al.* identifizierte und charakterisierte die TCR α -Kette und TCR β -Kette in voller Länge und transfizierte sie in die Jurkat-wt-Linie (50). Der endogene T-Zell-Rezeptor wurde in der Zellkultur nach Transfektion durch gegen die endogene β -Kette gerichteten monoklonalen Antikörper herunterreguliert. Die so erhaltene Zelllinie reagierte in der Spezifität und Sensitivität wie die nativen MART-1-reaktiven cytotoxischen T-Zellen.

3.2.2 Bestimmung der CD8-Abhängigkeit der HSA5-Grundlinie

Ziel der Aktivierungsstudie der CD8-wt-Grundlinien war es, zu zeigen, dass der MART-1 spezifische T-Zell-Rezeptor in HSA5 CD8-abhängig ist. Dazu wurde die antigenpräsentierende Zelllinie (APC) mit in Zehnerschritten abnehmenden Peptid-Konzentrationen 2 Stunden beladen und anschliessend bestrahlt, um eine weitere Zellteilung der APC zu verhindern. Nicht gebundenes oder prozessiertes Peptid wurde durch Waschen entfernt. Pro 10^5 Effektorzellen (HSA5) wurden 10^5 Zielzellen (APC) in 200 μ l Gesamtvolumen kultiviert. Durch die Zugabe des Mitogens PMA wurden die T-Zell-Rezeptoren auf den Effektorzellen in größeren Arealen auf der Zellmembran aggregiert und so die Signaltransduktion verstärkt (Abb. 20).

Der Interleukin-2 (IL-2) enthaltende, zellfreie Zellkulturüberstand wurde nach 24 Stunden geerntet. Die quantitative Erfassung des IL-2 erfolgte durch Kopplung des IL-2

an IL-2-bindende Beads, die mit einem gegen humanes IL-2 gerichteten monoklonalen Antikörper gefärbt wurden. Im Durchflusszytometer konnte so nicht nur die mittlere Fluoreszenz-Intensität detektiert werden, sondern die Beads konnten auch klar von Zelltrümmern unterschieden werden. Die Konzentration des IL-2 im Überstand konnte durch das Mitführen eines internen IL-2-Standards mit bekannten IL-2-Konzentrationen ermittelt werden.

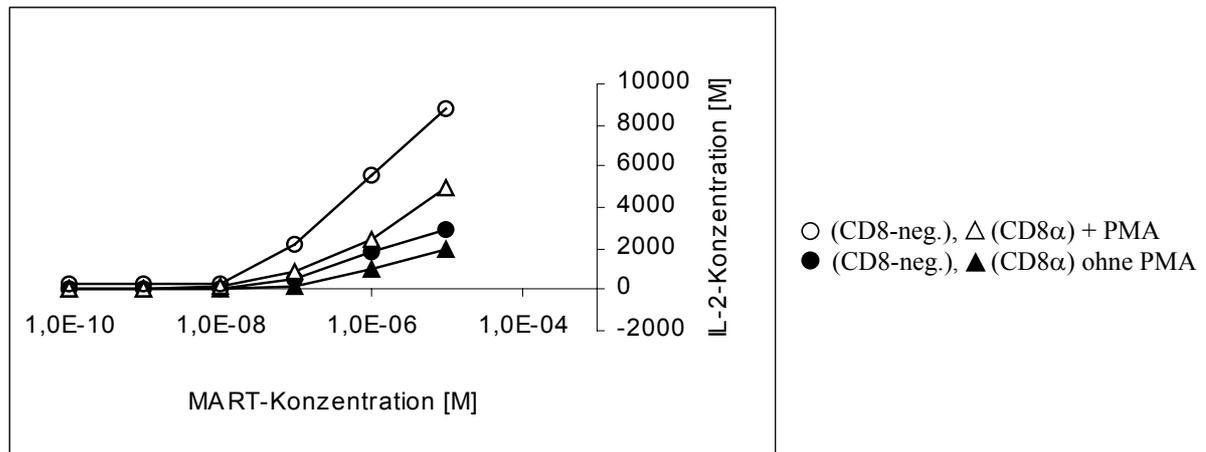


Abb. 20: Vergleich der Aktivierbarkeit mit und ohne PMA

Die CD8-negative (Dreieck) und CD8 α -wt (Kreis) transfizierte HSA5-Linie wurde 24 Stunden mit abnehmenden Mengen MART-1-Peptid auf der HLA-A2.1 exprimierenden Linie T2 stimuliert. Die IL-2-Konzentrationen aus dem Überstand wurden über einen Standard mit bekannten Peptidkonzentrationen berechnet. Die gefüllten Symbole stellen die Aktivierung bei Zugabe von 10 ng/ml Endkonzentration PMA dar.

Die Aktivierung der CD8-negativen Grundzelllinie HSA5 sowie der CD8 α -wt-Transfektante zeigen durch PMA-Zusatz eine deutlichere Aktivierung, ohne dass dabei eine logarithmische Verschiebung in der präsentierten Peptidmenge zu beobachten ist. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Experimente mit dem Zusatz von PMA durchgeführt. Die Linie HSA5 reagierte ohne CD8-Korezeptor stark auf MART-1, durch zusätzliche Expression des CD8 α -Homodimers wurde die Induktion der IL-2-Produktion nicht zu geringerer Peptid-Konzentration hin verschoben.

Durch die Inkubation der APC ohne Peptid in Anwesenheit der maximalen Lösungsmittelkonzentration konnte sichergestellt werden, dass das Lösungsmittel allein keine Aktivierung oder übermäßiges Absterben der Zellen verursacht (Abb. 21).

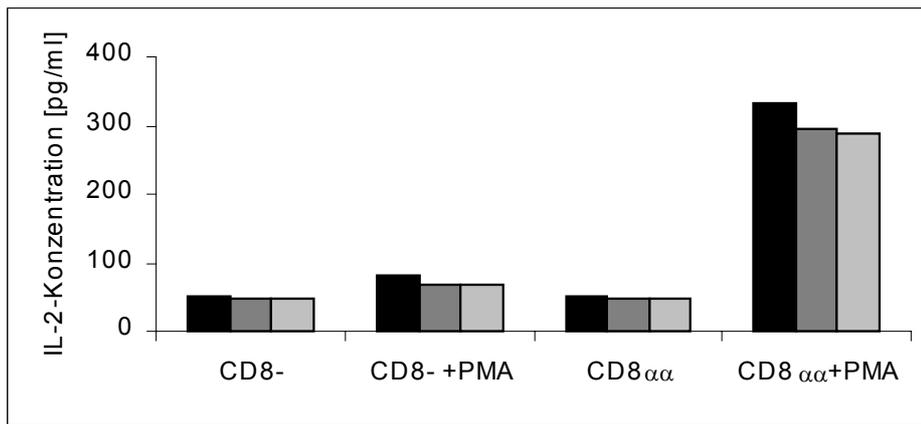


Abb. 21: Einfluss des Peptid-Lösungsmittels auf die Linien HSA5 CD8- und CD8 α -wt

Die antigenpräsentierende Linie T2 wurde mit der Lösungsmittelmenge ohne Peptid entsprechend dem Volumen für 10^{-5} M Peptidlösung unter Peptidbindungsbedingungen inkubiert (schwarzer Balken), der dunkelgraue Balken stellt die Aktivierung mit 10^{-10} M, der hellgraue Balken 10^{-9} M Peptidkonzentration dar.

Es ist deutlich zu erkennen, dass selbst das maximale Volumen Lösungsmittel keinen Einfluss auf die Aktivierung und damit auf die IL-2-Produktion hat. Bei allen weiteren Aktivierungsexperimenten wurde trotzdem die Aktivierung ohne Peptid immer mit dem maximal verwendeten Lösungsmittelvolumen als Negativ-Kontrolle durchgeführt und mit den Peptidkonzentrationen, die noch keine Aktivierung auslösten, verglichen.

Um sicher zu stellen, dass bovines β_2 -Mikroglobulin in vergleichbarer Quantität mit humanem MHC Klasse I- α -Kette assoziiert, wurde die antigenpräsentierende Linie T2 24 Stunden vor und während der Peptidbeladung mit humanem Serum statt mit FCS kultiviert (Abb. 22). Die Assoziation des β_2 -Mikroglobulins stabilisiert die ursprünglich leeren MHC Klasse I-Moleküle, die mit MART-1 beladen wurden.

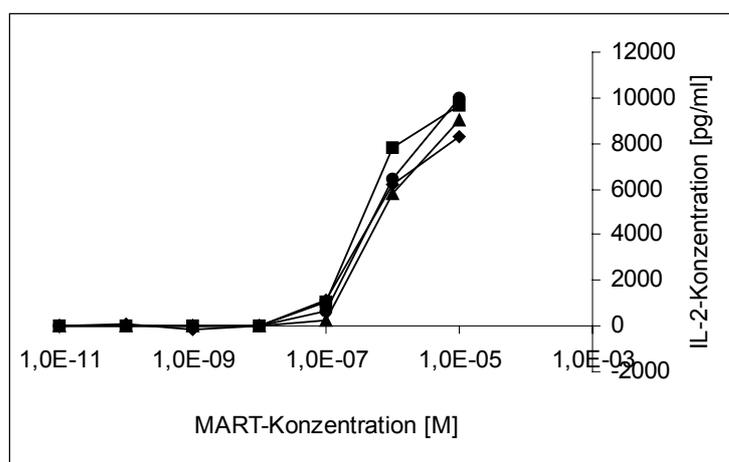


Abb. 22: Vergleich der Aktivierung unter Zusatz von humanem Serum versus FCS

Die mit FCS inkubierten HSA5 Transfektanten CD8-negativ (●), CD8 α -wt (◆), CD8 α -wt/ β -wt (■) und mit humanem Serum inkubierte Linie CD8 α -wt/ β -wt (▲) wurden 24 Stunden mit abnehmenden Mengen MART-1-Peptid auf der HLA-A2.1 exprimierenden Linie T2 stimuliert. Die IL-2-Konzentrationen aus dem Überstand wurden über einen Standard mit bekannten Peptidkonzentrationen berechnet und auf den Nullwert abgeglichen.

Es ist kein Unterschied in der Aktivierung mit humanem β_2 - oder bovinem β_2 -Mikroglobulin zu erkennen, daher wurden alle folgenden Aktivierungen mit FCS-haltigem Medium durchgeführt.

Weder die Anwesenheit der Korezeptoren CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer noch CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer hatten einen Einfluss auf die Empfindlichkeit bezüglich der Peptidkonzentration, die für eine Aktivierung erforderlich war. Die Anwesenheit des Korezeptors CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer im Vergleich zur CD8-negativen Linie sollte die Aktivierungsgrenze um das 100-fache in der Peptidverdünnung steigern. Der CD8 $\alpha\beta$ -Korezeptor sollte eigentlich im Vergleich zum CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer (33) eine IL-2-Produktion bei einer wiederum 100-fach niedrigeren Peptid-Konzentration auslösen. Daraus lässt sich schließen, dass der MART-1-spezifische T-Zell-Rezeptor in der Jurkat-Linie HSA5 keine CD8-Abhängigkeit zeigt. Abb. 22 repräsentiert für die Linien CD8 α -wt eine von 3 unabhängigen Messungen und CD8 α -/ β -wt eine von 2 unabhängigen Messungen.

3.2.3 Aktivierungsstudie der verschiedenen Jurkat-Varianten mit verschiedenen APCs

Die für MART-1 spezifische TCR-positive Zelllinie HSA5 wurde mit den T-Zell-Rezeptor-negativen Jurkat-Varianten Jurkat RT3 und 18B3 unter verschiedenen Bedingungen verglichen.

Ziel war es, eine Jurkat-Variante für ein Transfektion mit dem TAX-spezifischen T-Zell-Rezeptor RSD3 auszusuchen. Diese Grundzelllinie sollte keine IL-2-Produktion auf die Aktivierung mit Peptid zeigen. Da die Linien RT3 und 18B3 (Daten nicht gezeigt) unterschiedliche CD28-Expressionen zeigen, wurden als antigenpräsentierende Linien nicht nur T2 (CD80 positiv), sondern auch die EBV-transformierte B-Linie 130, die homozygot für HLA-A2.1 (CD80 positiv) ist, und die adhärenente Tumorzelllinie MCF-7, die HLA-A2.1 exprimiert (CD80-negativ), verwendet. Für die adhärenente Zelllinie MCF-7 wurden pro well 14.000 Zellen 24 Stunden vor Peptidbeladung ausgesät. Diese Zellen wurden nicht bestrahlt, da ihre Teilungsrate niedrig war. Die T2-Zellen wurden mit MART-1 und TAX beladen, nur mit TAX alleine und die Linien EBV130 und MCF-7 mit MART-1. Eine zusätzliche Aktivierung erfolgte ohne antigenpräsentierende Zelllinie als weitere Negativ-Kontrolle, um zu zeigen, dass das Peptid nur aktivierend wirken kann, wenn es auf MHC Klasse I präsentiert wird.

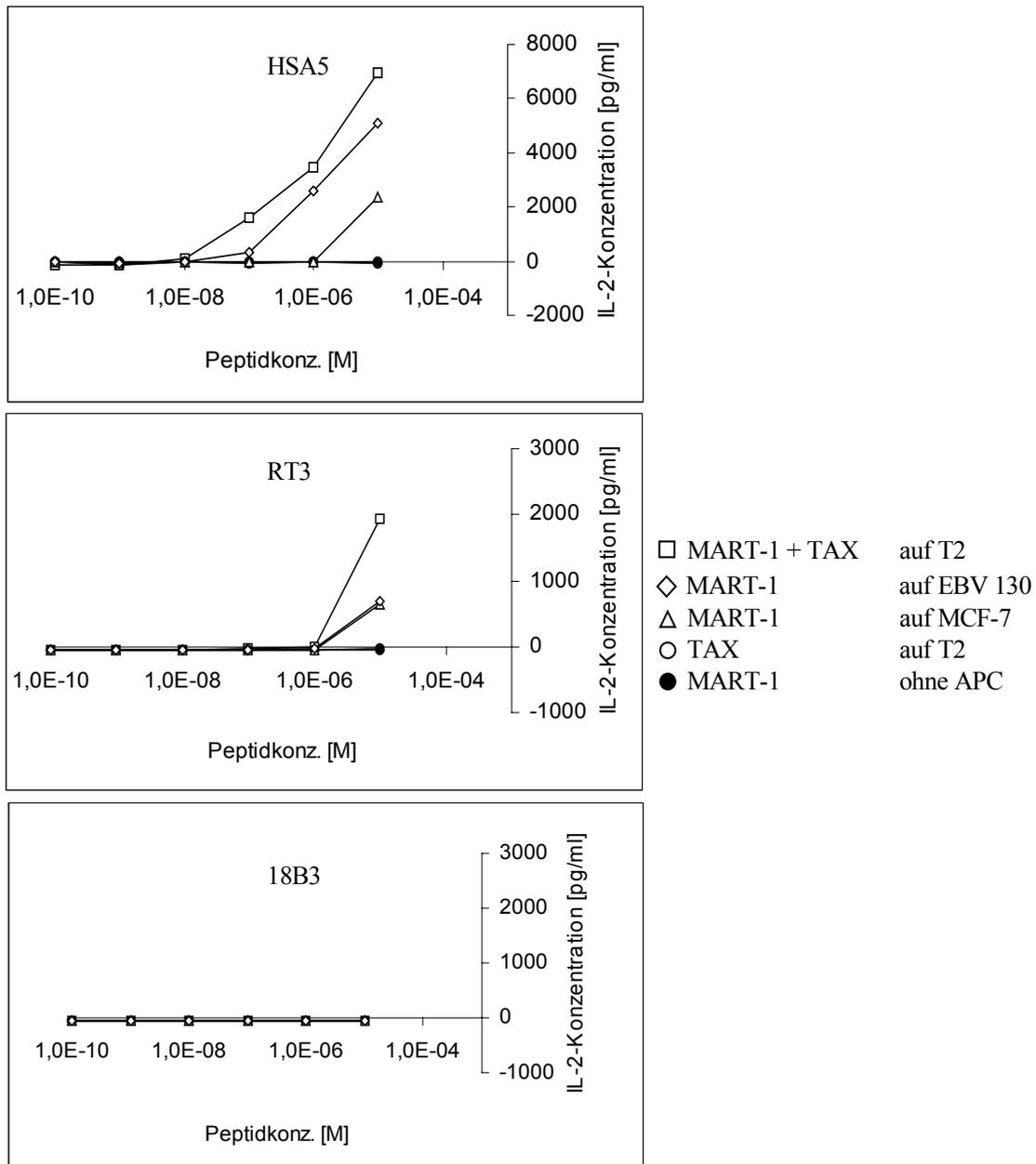


Abb. 23: Aktivierung der Linien HSA5 (TCR⁺ für MART-1), Jurkat RT3 und 18B3 (TCR⁻). Die APC-Linie T2 wurde mit MART und TAX beladen (□) und mit TAX allein (○). Die Linien EBV130 (◇) und MCF-7 (△) wurde mit MART-1 beladen. Als Negativ-Kontrolle wurde das MART-1-Peptid in die Effektorzellsuspension (HSA5) ohne APC gegeben (●). 24 Stunden nach Kultur wurde die IL-2-Konzentration aus dem Zellkulturüberstand quantitativ erfasst. Die Peptidkonzentrationen wurden durch den mitgeführten Standard berechnet und auf den Nullwert abgeglichen.

Die Linie HSA5 lässt sich nur mit dem MART-1-Peptid, aber nicht mit dem TAX-Peptid zur IL-2-Produktion aktivieren (Abb. 23 A). Auffällig ist, dass die Aktivierung mit auf MCF-7 präsentiertem Peptid die Aktivierbarkeit um eine log-Stufe schwächer ist. Das könnte an der fehlenden CD80-Expression liegen. Wahrscheinlicher ist aber, dass die geringere Aktivierung durch die niedrigere Anzahl von MHC Klasse I-Molekülen bedingt ist, da es sich um adhärenzte Zellen handelt, die in einer geringeren

Stöchiometrie als 1:2 eingesetzt wurden. Das Aktivierungsprofil der HSA-Linie durch T2 und EBV130 ist in etwa identisch. Beide APC-Linien lösen bei einer Konzentration von 10^{-7} M MART-1-Peptid die Bildung von IL-2 aus.

Die TCR-negative Linie Jurkat RT3 zeigt auf TAX-Präsentation auf MHC Klasse I keine Reaktion (Abb. 23B), wohl aber überraschenderweise bei einer Konzentration von 10^{-5} M MART-1 auf T2, EBV130 und etwas abgeschwächer auf MCF-7. Obwohl JRT3 keinen TCR auf der Oberfläche exprimiert, zeigt sie eine deutlichen Reaktion auf MART-1, solange dieses von HLA-A2.1 präsentiert wird. Es kann sich dabei nicht um eine Reaktion auf ein endogenes Peptid der verschiedenen APCs handeln, da dies konstitutiv in jeder MART-1-Verdünnung eine Aktivierung zeigen müsste. Noch dazu müssten sowohl die Linie T2 als auch EBV-B-Linie 130 dasselbe endogene Peptid präsentieren. Diese Reaktion deutet auf eine spezifische Reaktion auf MHC Klasse I-Präsentation, z.B. über NK-Rezeptoren hin.

Die Jurkat-Linie 18B3 zeigt weder auf MART-1 noch auf TAX eine Reaktion (Abb. 23C).

Es wurde als APC eine EBV-transformierte Linie mit heterozygoter Expression von HLA-A11 und HLA-A25 verwendet (Abb. 24), um zu bestätigen, dass es sich bei der Aktivierung der Linie JRT3 tatsächlich um eine HLA-A2.1-abhängige MART-1-Peptidpräsentation handelt.

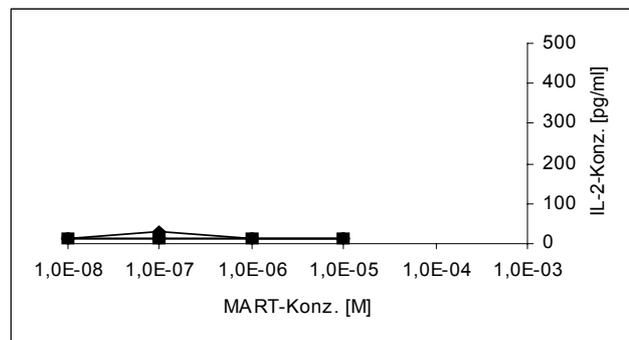


Abb.24: Aktivierung der Linien Jurkat-wt, Jurkat RT3 und 18B3

Die Linien Jurkat-wt (■), RT3 (●) und 18B3 (◆) wurden mit abnehmenden Konzentrationen MART-1-Peptid auf EBV-B-Linie 93 (HLA-A11 und HLA-A25) stimuliert, die IL-2-Produktion wurde quantitativ durch Mitführen eines Standards erfasst.

Die Aktivierung der Linie RT3 zeigt, dass nur die Aktivierung mit MART-1, nicht aber mit TAX oder endogen präsentiertem Peptid und nur auf HLA-A2.1 eine IL-2-Produktion zeigt.

Für die Generierung einer TCR positiven Linie, die das TAX-Peptid spezifisch bindet, kommen also die T-Zell-Rezeptor-negativen Jurkat-Linien RT3 und 18B3 in Frage. Beide reagieren weder auf endogen präsentiertes Peptid noch auf das TAX-Peptid.

3.2.4 Vergleich der HSA5-Transfektanten CD8 α und CD8 $\alpha\beta$ im Aktivierungsprofil

Die HSA5-Transfektanten CD8 α -wt und CD8 α -wt/ β -wt wurden mit den verschiedenen Zelllinien auf ihr Aktivierungsprofil hin untersucht, um die CD8-Unabhängigkeit des T-Zell-Rezeptors positiv zu bestätigen.

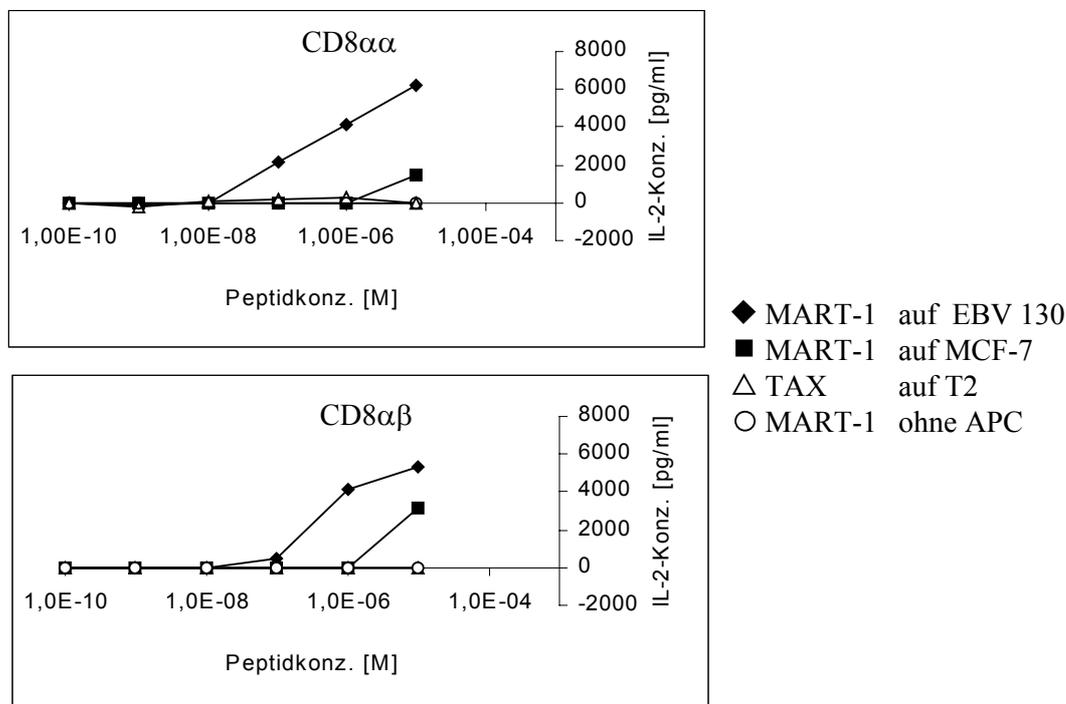


Abb. 25: Aktivierung der CD8 α -wt- und CD8 α -wt/ β -wt-HSA5-Transfektanten mit verschiedenen APCs. Beide Linien wurden 24 Stunden mit abnehmenden Mengen MART-1-Peptid auf der HLA-A2.1 exprimierenden EBV-B-Linie 130 (◆) und MCF-7 (■) und ohne Antigenpräsentierende Linie (○) stimuliert. Als Negativ-Kontrolle diente das TAX-Peptid, präsentiert durch T2 (△). Die IL-2-Konzentrationen aus dem Überstand wurden über einen Standard mit bekannten Peptidkonzentrationen berechnet und auf den Nullwert abgeglichen.

Hier bestätigt sich die CD8-Unabhängigkeit des gegen MART-1-gerichteten T-Zell-Rezeptors in Jurkat HSA5. Ohne APC findet keine Stimulation durch das MART-1 statt.

Beide CD8-wt-Linien zeigen eine deutliche Abnahme der Aktivierbarkeit durch die MART-1-Präsentation auf MCF-7. Es ist hier nicht eindeutig zu klären, ob die verminderte IL-2-Produktion auf eine verminderte MHC-Klasse I-Konzentration durch

geringere Zellzahl oder auf die fehlende CD80-Expression auf MCF-7 zurückzuführen ist. Verglichen mit der parentalen Linie HSA5 lässt sich jedoch kein Unterschied und damit auch kein Einfluss des CD80 erkennen (Abb. 23).

3.2.5 Aktivierung der RSD3-TCR-Transfektante der Jurkat Linie RT3

Der spezifische T-Zell-Rezeptor für das TAX-Peptid wurde aus cytotoxischen CD8 $\alpha\beta$ -positiven peripheren T-Zellen gewonnen, die im Cytotox-Assay (56) auf das HTLV-1-Peptid eine charakteristische Lyse der peptidbeladenen APCs zeigten (cDNA zur Verfügung gestellt von Dr. U. Utz, Montréal, Canada). Die T β -defiziente Jurkat-Linie RT3 wurde mit beiden Ketten des T-Zell-Rezeptors RSD3, spezifisch für das TAX-Peptid, transfiziert. Es wurde zusätzlich in die Linie RT3 nur die TCR β -Kette des RSD3-TCR transfiziert, um auszuschließen, dass eine Assoziation der endogenen T α -Kette mit der transfizierten TCR β -Kette des RSD3-TCRs bei der Aktivierung mit TAX eine IL-2-Produktion ausgelöst wird. Beide Linien wurden mit TAX-Peptid in Zehnerschritten abnehmenden Konzentrationen in Anwesenheit von PMA aktiviert.

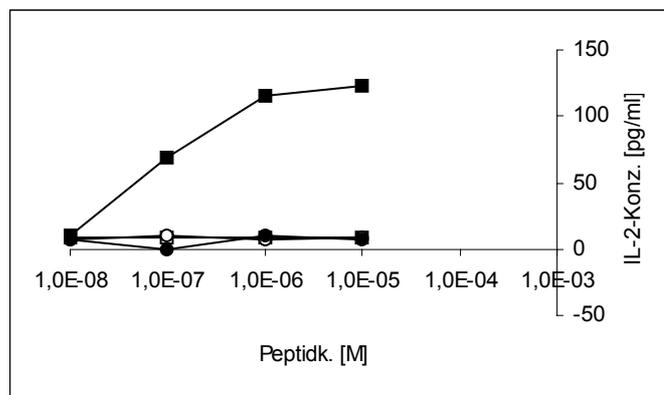


Abb. 26: Aktivierung der Jurkat RT3-Transfektanten TCR β - bzw. TCR $\alpha\beta$ -RSD3
Die Jurkat RT3-TCR $\alpha\beta$ - und (■, □) und RT3-TCR β -Transfektanten (●, ○) des TAX-TCRs RSD3 wurden mit TAX (■, ●) oder mit dem irrelevanten Peptid MART-1 (□, ○) stimuliert. Die IL-2-Produktion wurde durch Mitführen eines Standards berechnet.

Die mit dem spezifischen TCR (α - und β -Kette) gegen TAX-Peptid transfizierte Linie JRT3RSD3 zeigte im Gegensatz zur nur mit der TCR β -Kette transfizierten Linie eine eindeutige Aktivierung. Beide Linien reagieren nicht auf das irrelevante Peptid MART-1. Die Aktivierung mit TAX beginnt bei einer Konzentration von 10^{-7} M.

3.2.6 Stimulation von JRT3RSD3 und -CD8-Kotransfektanten mit monoklonalen Antikörpern

Als Kontrolle für die Aktivierbarkeit der Zellen ausschließlich über ihre T-Zell-Rezeptoren wurden monoklonale Antikörper in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Der Antikörper gegen die CD3 ϵ -Kette aktiviert die T-Zelle über den TCR/CD3-Komplex mit nachfolgender Signaltransduktion über die Tyrosinkinase p56^{lck}. Die Expression des Oberflächenrezeptors CD2 nimmt daraufhin um das 2-4-fache zu und der Zusatz des Antikörper gegen CD2 bewirkt eine weitere Stimulation. Hiermit lässt sich auf die Oberflächendichte des TCR auf den jeweiligen Zelllinien und ihre Signaltransduktion bzw. Aktivität schließen.

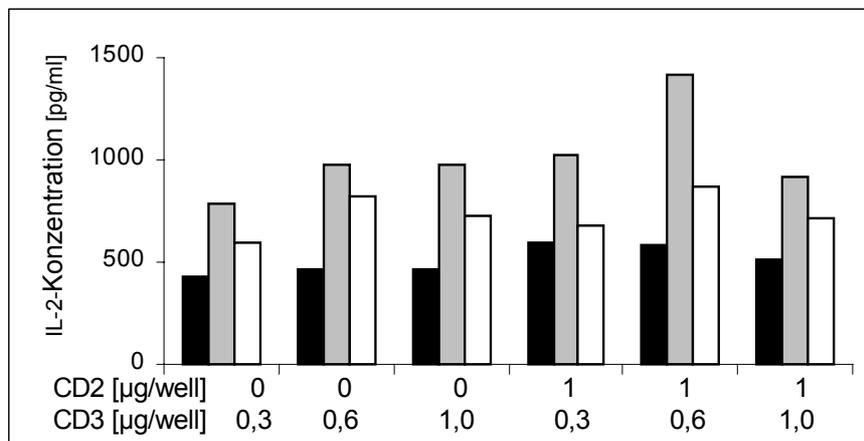


Abb. 27: Aktivierung der Jurkat RT3 RSD3-Linie und CD8-Transfektanten mit monoklonalen Antikörpern. Die Linien CD8⁻ (schwarzer Balken), CD8 α -wt (grauer Balken) und CD8 α -wt/ β -wt-Jurkat RT3RSD3 (weißer Balken) wurden mit unterschiedlichen Konzentration OKT3 (CD3 ϵ) mit und in Abwesenheit von 1 μ g OKT11 (CD2) pro well 24 Stunden kultiviert. Der Zellkulturüberstand wurde quantitativ auf seinen IL-2-Gehalt hin untersucht und durch das Mitführen eines Standards berechnet.

Die untersuchten Zelllinien zeigen eine unterschiedliche Dichte an RSD3-T-Zell-Rezeptoren, sie sind aber alle sehr gut stimulierbar. Wie sich in Abb. 28 zeigt, hat das keinen Einfluss auf die Aktivierung durch geringere oder höhere Peptid-Konzentrationsmengen. Werden sie mit dem mAK CD2 aktiviert, so nimmt die IL-2-Produktion noch etwas zu. Es tritt ein hemmender Effekt unter Stimulation mit jeweils 1 μ g beider Antikörper auf, wie er auch bei hohen Peptidkonzentrationen zu beobachten ist (siehe Abb. 25B, 26 und 33A; Lit. 33).

3.2.7 Aktivierung der Linie JRT3RSD3 und der CD8-wt-Kotransfektanten im Vergleich

Die CD8-negative Linie JRT3RSD3 wurde im Vergleich mit CD8 α -wt-, CD8 α -wt/ β -wt- und CD8 β -wt-transfizierter JRT3RSD3 mit TAX-Peptid stimuliert. Die Kotransfektion des TCRs mit CD8 α -Homodimer oder CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer sollte eine IL-2-Produktion bei niedrigeren Konzentrationen des Peptids ermöglichen.

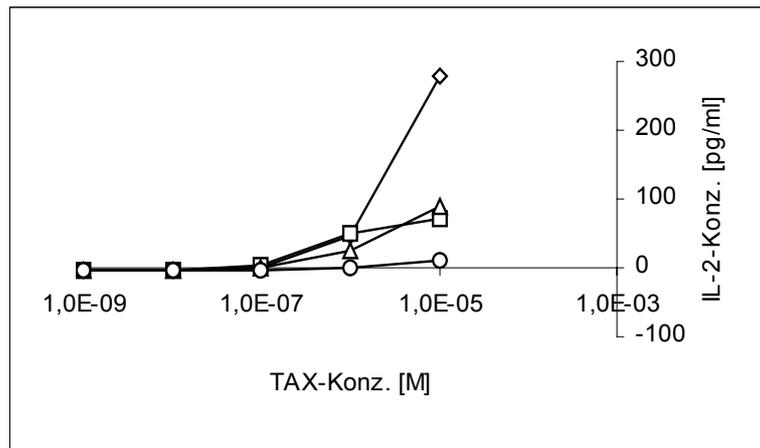


Abb. 28: Aktivierung der CD8-negativen Linie JRT3RSD3 und ihrer CD8-wt-Transfektanten. Die CD8-neg. Linie JRT3 RSD3 (◇), CD8 α -wt- (□), CD8 α -wt/ β -wt- (Δ) und CD8 β -wt- (K33) (○)-Transfektante wurden mit abnehmenden Konzentrationen des TAX-Peptids, präsentiert auf T2, stimuliert. Die IL-2-Konzentration wurde anhand des mitgeführten Standards berechnet.

Die Kotransfektion der CD8-wt-Ketten zeigte aber keine Verbesserung in der Aktivierbarkeit des TAX-TCRs RSD3. Bei allen Linien beginnt die Aktivierung bei einer Konzentration von 10^{-7} M TAX-Peptid. Hier zeigt sich keine CD8-Abhängigkeit des TCRs RSD3. Die fehlende IL-2-Produktion der CD8 β -Transfektante, Klon 33, ist ein klonaler Artefakt. Hier war ein Klon verwendet worden, während alle anderen Linien aus mehr als 5 Klonen bestanden. Die TCR-Dichte auf allen verwendeten Linien waren vergleichbar gut (Daten nicht gezeigt).

3.2.8 Funktionelle Charakterisierung von 80 TAX-Peptid-Mutanten

Durch eine Verminderung der Affinität des TCRs zum Peptid-MHC Klasse I-Komplex kann eine Veränderung in der Abhängigkeit des TCRs vom CD8-Korezeptor erreicht werden (54, 66). Da sowohl der MART-1- als auch der TAX-T-Zell-Rezeptor ein ähnliches Aktivierungsprofil zeigen und in minimaler Konzentration von 10^{-7} M Peptidkonzentration aktiviert werden und beide als CD8-abhängig in ihrer cytotoxischen Funktion beschrieben waren, konnte nur durch die Mutation des Peptids eine Veränderung hin zur CD8-Abhängigkeit im Aktivierungsprotokoll bewirkt werden. Die 80 Peptidmutationen des TAX-Peptids wurden in einer Kooperation von Dr. Ronald Frank (GBF, Braunschweig) hergestellt. Es wurden jeweils die Aminosäure-Positionen 1,4,7 und 8, die zum TCR hin gerichtet sind, gegen alle Aminosäuren ausgetauscht (2.1.8. Tabelle 3). Die Ankerpositionen 1 und 9 blieben unverändert, damit die Beladung der MHC Klasse I-Moleküle nicht beeinträchtigt wird.

3.2.9 Screening der Linien CD8⁻ und CD8αα-JRT3RSD3 mit 80 Peptid-Mutanten

Im Aktivierungsexperiment mit den 80 TAX-Peptid-Mutanten wurden die CD8-negative Linie JRT3RSD3 (Einfachmessung) mit der CD8αα-Transfektante (Doppelmessung) verglichen. Die Detektion der IL-2-Mengen im Zellkulturüberstand erfolgte, wie schon beschrieben, über Beads.

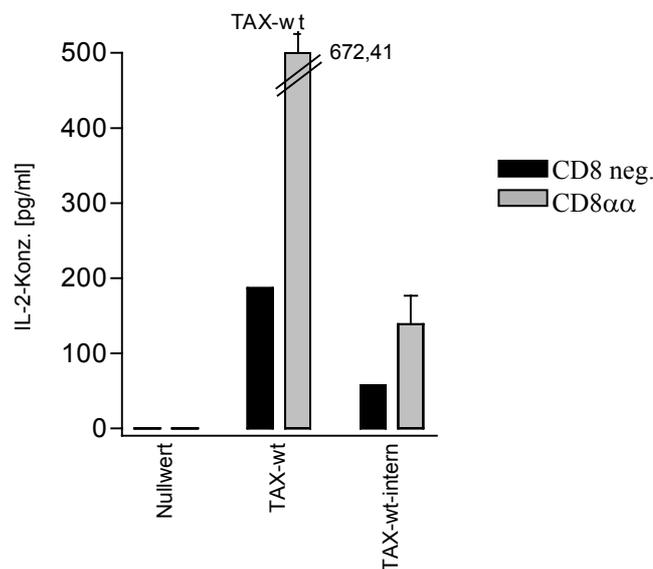


Abb. 29: Vergleich der TAX-wt-Peptidkonzentrationen

Es wurden die mitgelieferten TAX-wt-Peptide mit der genau bekannten TAX-Konzentration (TAX-wt) der Firma MWG verglichen, um für die Aktivierung mit den TAX-Mutanten einen Vergleich in der gelieferten, nur ungefähr angegebenen Menge (TAX-wt-intern) zu haben. Die schwarzen Balken stellen die Aktivierung der CD8⁻JRT3 RSD3-Linie dar, der graue Balken die CD8αα-wt-Transfektante dieser Linie.

Die Aktivierung bei 10^{-5} M Peptidkonzentration zeigt, dass die gelieferten Peptidmutanten in geringerer Menge als angegeben vorlagen. Die Konzentration waren jedoch ausreichend, um eine klare Aktivierung auszulösen (Abb. 29).

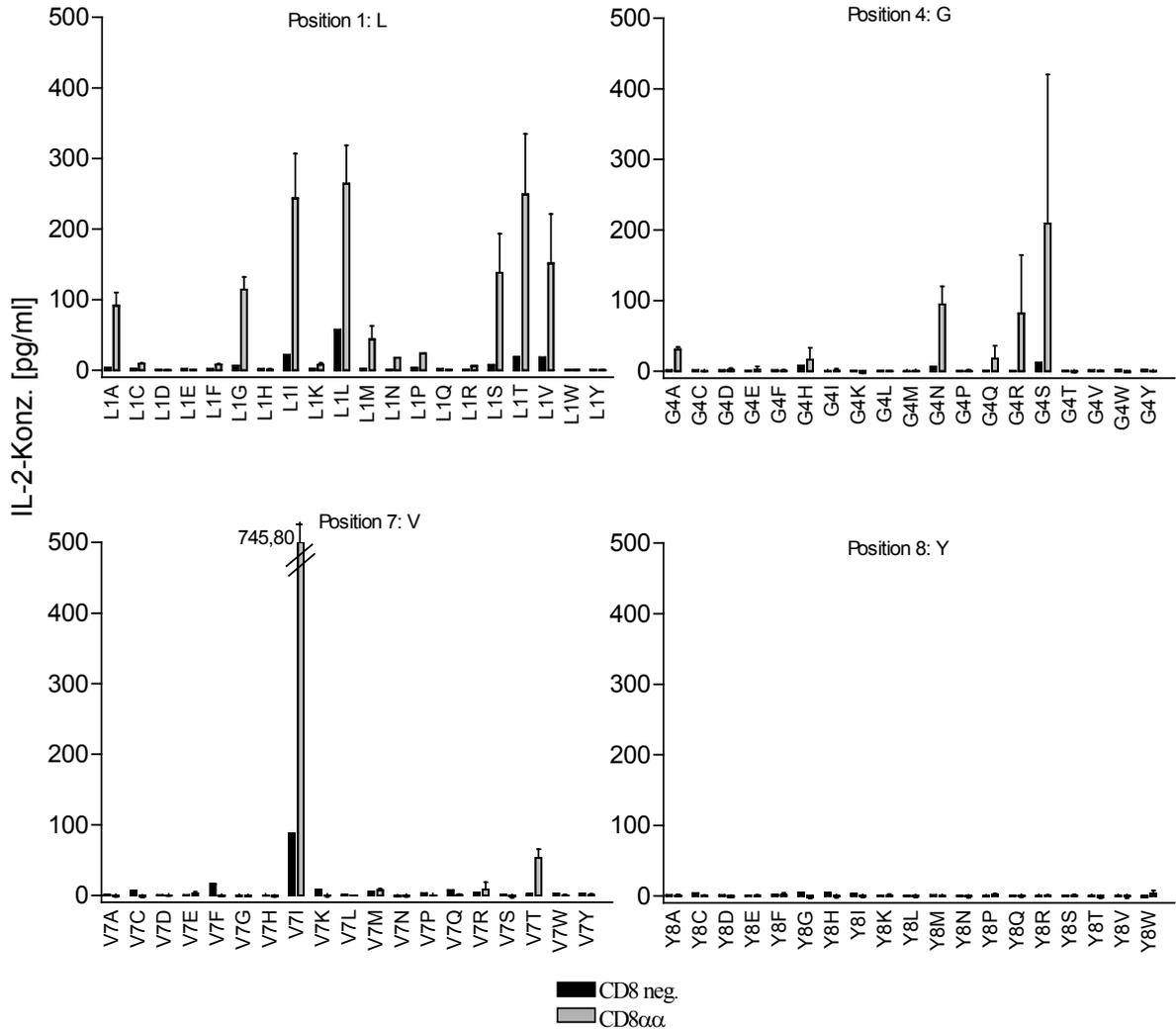


Abb. 30: Stimulation durch TAX-Mutanten des TAX-wt-Peptids: LLFGYPVYV

Die 80 Peptid-Mutanten wurden in einer Konzentration von ca. 10^{-5} M auf T2 präsentiert und mit Effektorzellen (CD8⁻-Linie JRT3RSD3 (schwarz) und CD8 $\alpha\alpha$ -wt-Transfektante (grau)) für 24 Stunden inkubiert. Die IL-2-Konzentration wurde über einen mitgeführten Standard berechnet und der Nullwert abgezogen. Als Positiv-Kontrolle wurde TAX-wt von der Firma MWG-Biotech verwendet (Abb. 29). Somit ließen sich die ungefähr angegebenen Mengen der Peptid-Mutanten (Abb. 30) einschätzen. Als interne Kontrolle für die Peptid-Mutanten wurden die 4 aus Braunschweig mitgelieferten TAX-wt-Peptide (L1L, G4G, V7V und Y8Y) verwendet (Abb. 29).

Bei drei der vier mutierten Positionen des wt-Peptids sind zumindest bei einigen Mutanten abnehmende oder gleichbleibende Aktivierungen in Anwesenheit des Korezeptors CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer induzierbar (Abb. 30). Die Mutation Valin in Position 7 gegen Isoleucin zeigt sogar eine extrem hohe Aktivierung der Effektorzellen, die 7,5 x stärker war als mit TAX-wt-Peptid. Mutationen in Position 8 (Tyrosin) zeigen hingegen keine Aktivierung mehr. Die Ursache könnte darin liegen, dass das Tyrosin für die

Bindung an MHC Klasse I unerlässlich ist und daher kein Peptid mehr von MHC Klasse I gebunden wird, also auch keine Stimulation der Effektorzellen erfolgen kann. Für die Titration der Peptidmutanten in stärkere Verdünnungsbereiche wurden solche Peptide ausgesucht, die nur bei der CD8⁺-Linie eine starke IL-2-Produktion induzieren, die CD8⁻-Linie dagegen gar nicht oder nur minimal stimulieren. Diese Bedingungen erfüllen die Peptide mit Austausch in Position 1: L1I und L1T, in Position 4: G4N und G4S und in Position 7: V7I. Diese Peptide wurden auf der CD8 negativen Linie JRT3RSD3 und CD8-wt-Transfektanten dieser Linie, CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta$ in den Peptid-Konzentration 0 M und 10⁻⁹ M – 10⁻⁵ M getestet (Abb. 31).

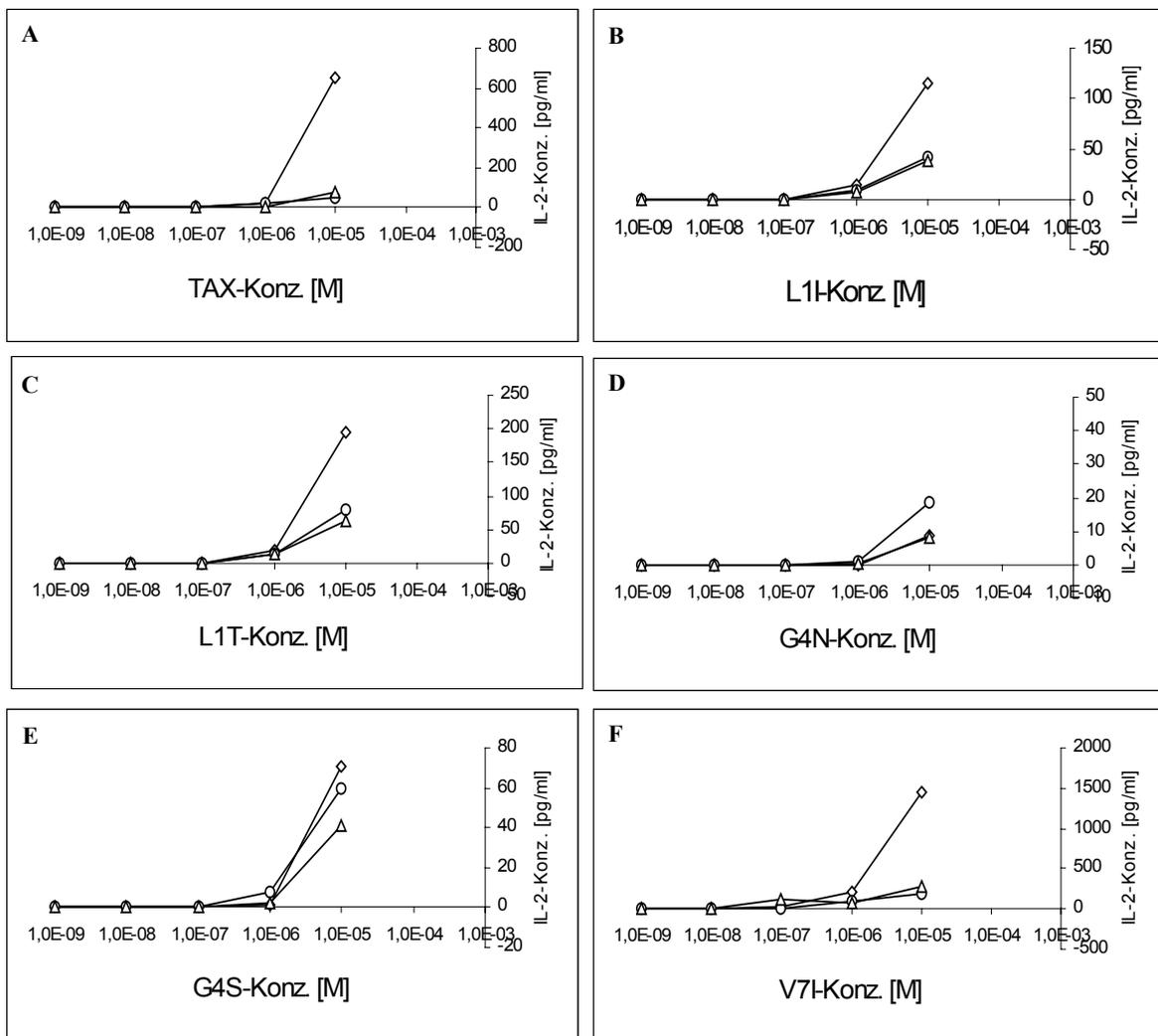


Abb. 31: IL-2-Induktion durch Peptidmutanten L1I, L1T, G4N, G4S und V7I
Peptidmutanten, die die IL-2-Produktion der CD8-wt-Transfektanten um mindestens das 5-fache im Vergleich zur CD8-negativen Linie steigerten, wurden in abnehmenden Konzentrationen mit der APC-Linie T2 inkubiert. Die IL-2-Konzentration wurde anhand des mitgeführten Standards berechnet und der Nullwert abgezogen. JRT3RSD3 (◇), CD8 $\alpha\alpha$ (○) und CD8 $\alpha\beta$ (Δ). **A:** TAX-wt, **B:** L1I, **C:** L1T, **D:** G4N, **E:** G4S und **F:** V7I.

Insgesamt zeigen diese Peptide keine Veränderung im Aktivierungsmuster im Vergleich zu TAX-wt. Die CD8⁺-Linien werden alle bei derselben molaren Peptid-Konzentration aktiviert wie die CD8⁻-Linie. Die CD8⁺-Linien waren insgesamt schwächer als die CD8⁻-Linie aktiviert worden. Sie waren vor der Aktivierung schon einige Wochen in Kultur und daher in der TCR-Oberflächendichte geringer als die CD8⁻-Linie.

Weitere vier Peptide, die bei der CD8 α -wt transfizierten Linie eine deutliche, bei der CD8⁻-Linie aber keine nennenswerte Aktivierung mehr auslösten, wurden in den Verdünnungen 0 M und 10⁻⁷ M – 10⁻⁵ M Peptidkonzentration auf der CD8 α β -Transfektante ausgetestet. Beispielhaft für einige Peptide wurden für den Austausch des Leucins in Position 1 ausgewählt: L1A, L1G und L1S. Ein weiteres Peptid, in dem in Position 7 Valin gegen Threonin ausgetauscht wurde, erfüllt diese Bedingung ebenso.

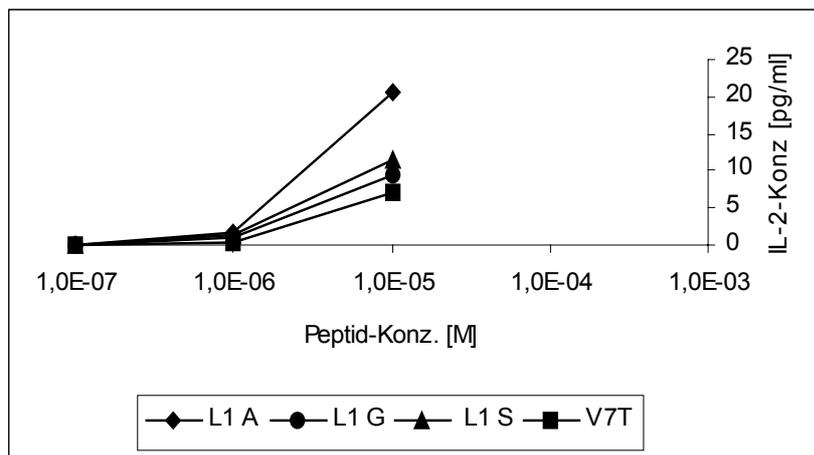


Abb. 32: Aktivierung der CD8 α β -Transfektante mit den Peptid-Mutanten L1A, L1G, L1S und V7T.

Die CD8 α -wt/ β -wt-Transfektante wurde mit den Peptid-Mutanten in abnehmender Konzentration auf T2 24 Stunden inkubiert, die IL-2-Menge über den mitgeführten Standard berechnet und der Nullwert abgezogen. Die Symbole in der Legende bezeichnen die Peptid-Mutanten.

Aber auch mit diesen Peptiden wurde eine Konzentration von mindestens 10⁻⁵ M benötigt, um die CD8 α β -Linie zu aktivieren (Abb. 32).

Für das nächste Aktivierungsexperiment (Abb. 33) wurden daher die Peptid-Mutanten L1C, L1M sowie G4A und V7M ausgewählt. Sie aktivierten im initialen Experiment die CD8⁻-Linie JRT3RSD3 nicht und die CD8 α -wt und CD8 α -wt/ β -wt-Transfektanten gering.

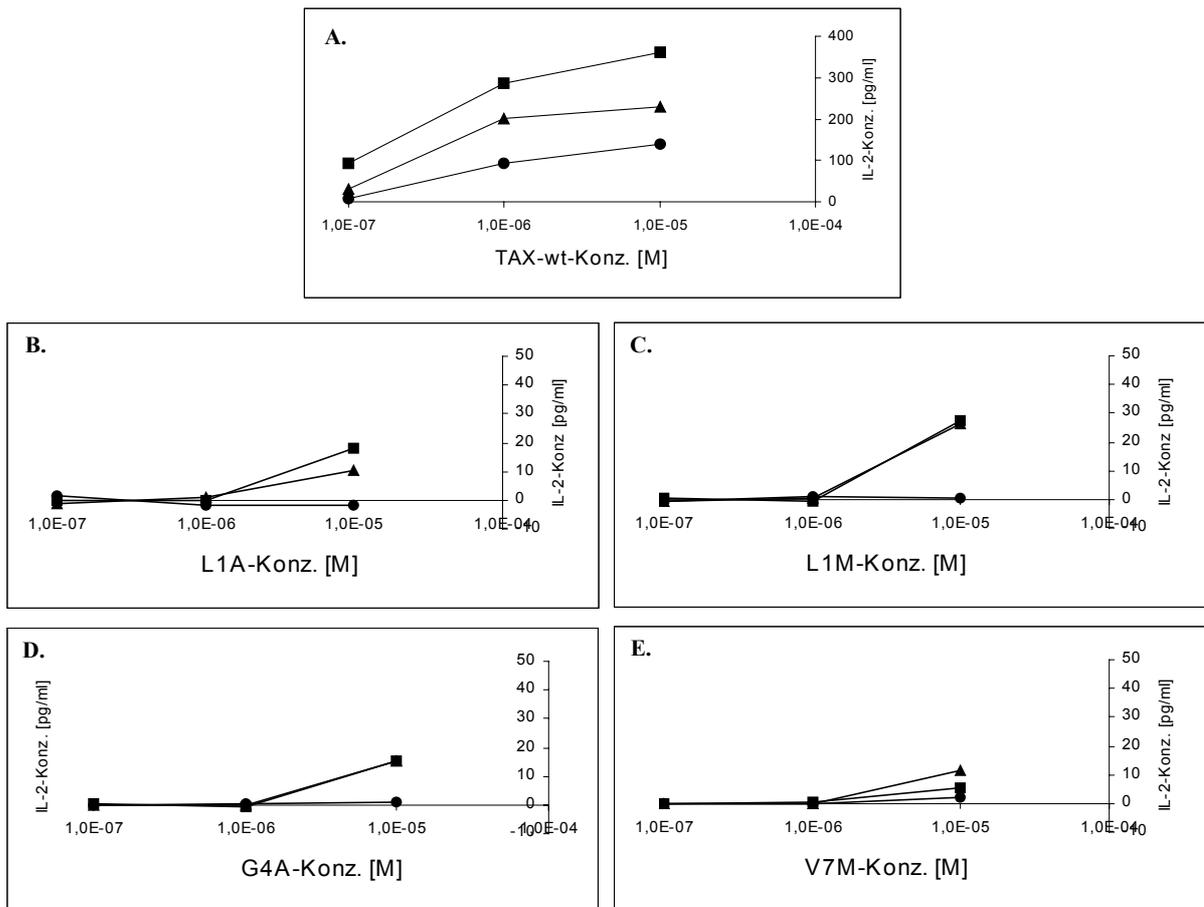


Abb. 33: Stimulation der CD8-neg., CD8 $\alpha\alpha$ - und CD8 $\alpha\beta$ -wt-Linien mit L1C, L1M, G4A und V7M.

Die Linien JRT3RSD3 CD8-neg. (●), CD8 α -wt (■) und CD8 α -wt/ β -wt (▲) wurden mit abnehmenden Konzentrationen der Peptid-Mutanten, präsentiert auf T2, 24 Stunden kultiviert. Die IL-2-Konzentration im Überstand wurde über einen mitgeführten Standard berechnet und der Nullwert abgezogen.

Die Aktivierung der CD8-neg., CD8 $\alpha\alpha$ - und CD8 $\alpha\beta$ -wt-Linien mit dem Wildtyp-Peptid zeigt das charakteristische Profil mit der beginnenden Aktivierung bei einer Peptid-Konzentration von 10^{-7} M (Abb. 33A). Das Peptid V7M (Abb. 33E) induziert bei allen drei Zelllinien eine IL-2-Produktion und L1A induziert hingegen eine schwache CD8-abhängige IL-2-Produktion (Abb. 33B). Die Aktivierung mit den Peptiden L1M und G4A (Abb. 33 C und D) ergab dagegen eine deutliche Differenz zwischen CD8 $^-$ - und CD $\alpha\alpha$ -Homodimer bzw. CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer exprimierenden Zellen. Bei diesen Peptiden besteht eine CD8-Abhängigkeit der TAX-T-Zell-Rezeptors RSD3, da nur die CD8 $^+$ -Linien aktiviert werden.

3.2.10 Quantitative IL-2-Messung über die IL-2-abhängige Zelllinie G2

Um die Sensitivität der IL-2-Bestimmung zu verbessern, wurde im folgenden statt der durchflusszytometrischen Messung der IL-2-Konzentration die Proliferation der IL-2-abhängigen Zelllinie G2 untersucht. Zur Optimierung dieses Verfahrens wurden 100 μl des IL-2-haltigen Überstandes mit 100 μl G2-haltiger Zellsuspension in 3 verschiedenen Zellsuspensionen und unterschiedlichen IL-2-Konzentrationen eingesetzt. Da sich nach drei Tagen Kultur die ersten deutlichen Mangelercheinungen der IL-2-abhängigen Linie zeigten, wurden nach 56 Stunden 100 μl der XTT-Lösung zugegeben. Das gelbe Tetrazoliumsals XTT (minimal absorbierend bei $\lambda = 450 \text{ nm}$) wird dabei von stoffwechselaktiven Zellen im Mitochondrium durch Elektronentransfer in das orangefarbene Formazan (Absorptionsspektrum 440-520 nm, Maximum ca. 480 nm) reduziert. Die Detektion der gebildeten Formazankonzentration erfolgt bei 450 und vergleichsweise 492 nm am UV-Spektrophotometer.

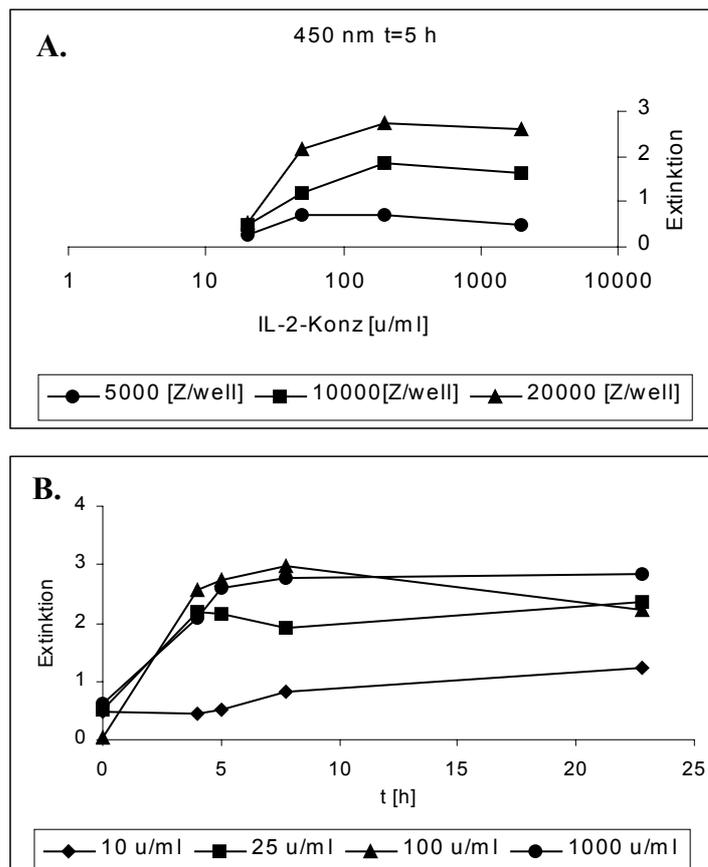


Abb. 34: Optimierung der quantitativen IL-2-Erfassung über die G2-Linie

A. Titration der Zellzahl bei gleichen IL-2-Konzentrationen, Messung nach 5 Stunden.
B. Zeitkinetik der entstandenen Formazanmengen bei einer Zellzahl von 20.000 Zellen pro well ab dem Zeitpunkt $t = 0 \text{ h}$ und $t = 22,75 \text{ h}$. Messung bei $\lambda = 450 \text{ nm}$. 1 u entspricht 0,5 ng.

Die Messung bei 492 nm zeigte mehr Hintergrund und eine schlechtere Aufspaltung in geringeren Konzentrationsbereichen (Daten nicht gezeigt) als bei 450 nm (Abb. 34). Die Zellzahl von 20.000 Zellen pro well bei Einsatz von 100 μ l IL-2-haltigen Zellkulturüberstands ergab die beste Aufspaltung in niedrigen Konzentrationsbereichen. Wie in Abb. 14B zu sehen ist, zeigt die Umsetzung des Tetrazoliumsalses zum Formazan eine Sättigung nach 4 bis 7 Stunden. Alle weiteren Messungen wurden daher mit 50 μ l IL-2-haltigen Zellkulturüberstandes bei einer Zellzahl von 10.000 Zellen pro well durchgeführt und bei 450 nm nach 5-6 Stunden gemessen. Verdünnungen vor allem im niedrigen Konzentrationsbereich von 1-50 u/ml IL-2 zeigten den typischen Charakter einer Sättigungskurve (Daten nicht gezeigt). Die größte Empfindlichkeit der Kurve liegt daher im minimalen Konzentrationsbereich. Fehler fallen dort ebenso stärker ins Gewicht. Für große Konzentrationen ab einem Extinktionswert größer als 0,8 bis 1,0 ist damit keine quantitative Aussage mehr möglich.

3.2.11 Induktion der Aktivierung der CD8⁺ und CD8 α exprimierender JRT3 RSD3 Linie mit TAX-Mutanten L1M und G4A

Wie in Abb.14 dargestellt, ist die Aktivierung des TAX-TCRs mit den Peptiden L1M und G4A CD8-abhängig. Um zu testen, wie stark die CD8-Abhängigkeit der Linien ist, wurde in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-4} M Peptidkonzentration stimuliert. Die Aktivierung der CD8-negativen Jurkat-Linien RT3 RSD3 und die CD8 α -wt- bzw. CD8 α -wt/ β -wt exprimierenden Transfektanten mit den TAX-Mutanten L1M und G4A wurde verglichen (Abb. 35).

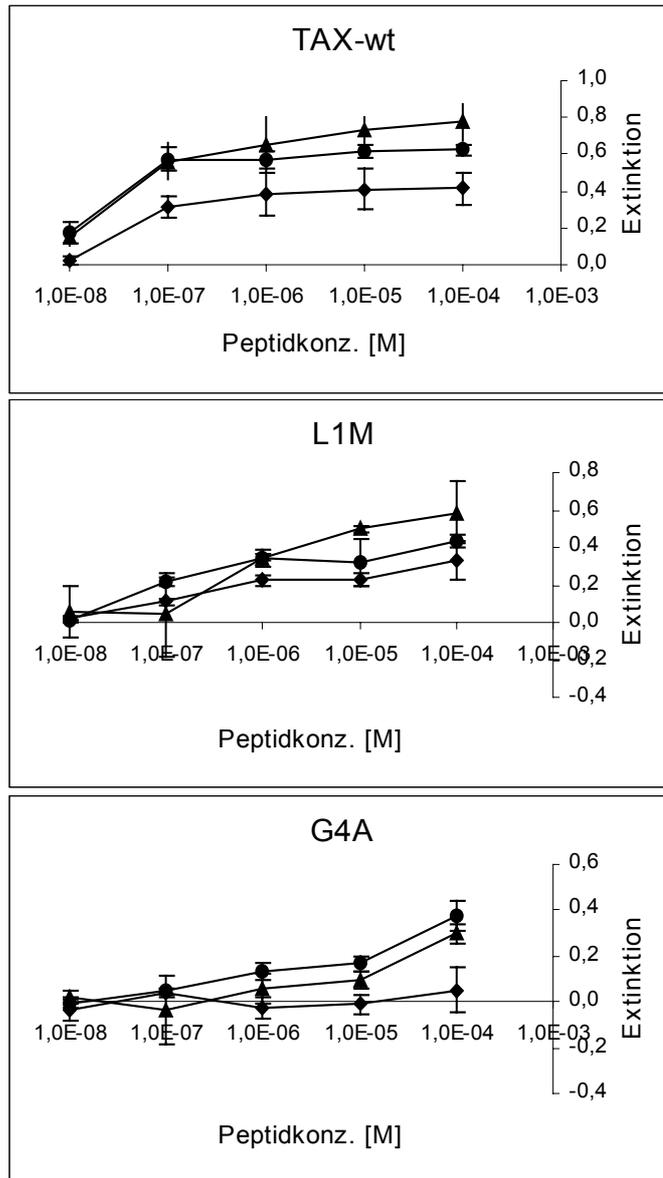


Abb. 35: Aktivierung der CD8- und CD8 α - und CD8 α β -exprimierenden Jurkat-Transfektanten mit Tax-Mutanten L1M und G4A. \blacklozenge symbolisiert die CD8-negative Linie RT3 RSD3, \bullet steht für die CD8 α -wt und \blacktriangle für CD8 α -wt/ β -wt-Transfektante. Die Peptidpräsentation erfolgte auf T2 für 24 h. Der IL-2-haltige Überstand induzierte bei der IL-2-abhängigen Reporterlinie G2 abhängig von der IL-2-Konzentration eine Proliferation, deren Stärke durch den Umsatz des gelben Tetrazoliums in den Mitochondrien in das orangefarbene Formazan sichtbar wurde.

Durch die Verwendung des sensitiveren Proliferationstests konnte eine IL-2-Produktion der Zelllinien durch geringere Peptidkonzentrationen nachgewiesen werden. Das TAX-wt-Peptid induziert bei einer Konzentration von 10^{-7} M eine IL-2-Antwort, die von der Anwesenheit eines CD8-Korezeptors unabhängig ist. Die Peptidmutante L1M aktiviert alle Zelllinien bis zu einer Konzentration von 10^{-7} M unabhängig von der CD8-

Expression. Der Austausch des Glycin in Position 4 (G4A) bestätigt in diesem IL-2-Detektionsprotokoll, dass das Peptid als CD8-abhängig erkannt wird (Abb. 35). Während die CD8-negative Linie RT3 RSD3 auch bei einer Peptidkonzentration von 10^{-4} kein IL-2 produziert, so sind die CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer- und auch die CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer- exprimierenden Linien schon bei einer Konzentration von 10^{-6} M stimulierbar.

3.3 Immunpräzipitation von CD8 α -wt

Außer in der FACS-Analyse und funktionell in den Aktivierungsexperimenten sollte die Proteinexpression auf der Zelloberfläche durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Es wurden dazu die monoklonalen Antikörper DK25 und OKT8 und der polyklonale Antikörper H160 von der Firma Santa Cruz gegen CD8 α eingesetzt. Die CD8 β -Kette sollte mit dem polyklonalen Antikörper H149 von Santa Cruz aus der CD8 α -wt/ β -wt exprimierenden Jurkat-Linie immunpräzipitiert werden. Da sich 10^7 lysierte Zellen pro Spur als zu wenig erwiesen, wurden pro Spur 5×10^7 Zellen biotinyliert und mit 1 %iger Triton X100-Puffer lysiert. Die Lysate wurden mit Protein G-Sepharose vorab aufgereinigt, um unspezifische Bindungen an die Protein G-Beads abzufangen. Nach der Immunpräzipitation erfolgte die Auftragung auf ein 10 %iges SDS-PAGE-Gel unter nicht reduzierten Bedingungen, um Monomere und Dimere auf der Zelloberfläche unterscheiden zu können. Mulligan *et al.* (51) zeigten in ihrer Arbeit, dass die CD8 α -Antikörper DK25 und OKT 8 nur in Verbindung mit einem weiteren CD8 α -Antikörper ein ausreichend gutes Signal bei 2×10^7 PBL in der Immunpräzipitation (IPP) ergeben. Aus diesem Grund wurde der Antikörper OKT8 ohne und in Kombination mit DK25 eingesetzt. Die Blotentwicklung erfolgte mit Streptavidin-HRP (SAV-HRP, Meerrettichperoxidase) im ECL-System von Pierce (enhanced chemoluminescence).

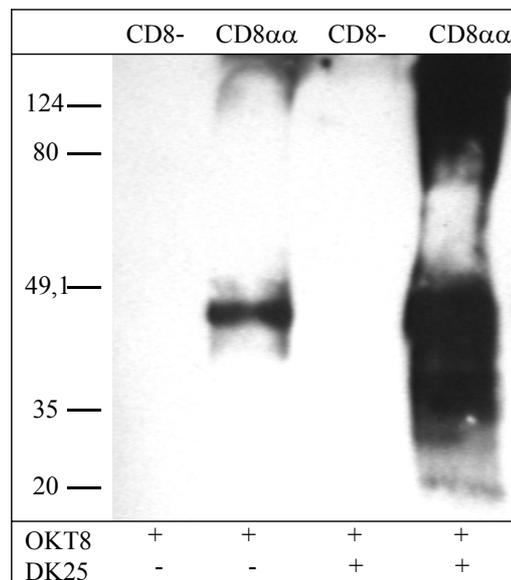


Abb. 36: Immunpräzipitation der CD8-negativen und CD8 α -wt-exprimierenden RT3 RSD3-Linien.

Pro Spur wurden von den Jurkat-Linien 5×10^7 biotinylierte Zellen lysiert. Biotinylierte und immunpräzipitierte Oberflächenproteine wurden unter nicht reduzierenden Bedingungen im 10 %-SDS-PAGE aufgetrennt und mit SAV-HRP durch ECL detektiert. 8 μ g OKT 8 und 80 μ l DK25 wurden pro IPP eingesetzt.

Die Immunpräzipitation der CD8 α -Ketten ließ sich durch den Einsatz enorm hoher Mengen an lysierten Zellen im Vergleich zu CD8-negativen Lysaten sicher nachweisen (Abb. 36). Überraschenderweise liegt die Dimergröße nicht bei den erwarteten 64 kDa, sondern nur bei etwa 45 kDa, was auf ein verändertes Glykosylierungsmuster schließen lässt. Die Immunpräzipitation des CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimers weist bei dem Einsatz beider CD8 α -mAK eine breite Verteilung über einen großen kDa-Bereich auf. An der Gelgrenze zum Sammelgel haben ungelöste CD8 $\alpha\alpha$ -Moleküle eine starke Phosphoreszenz ausgelöst. Immunpräzipitationen mit geringeren Lysat-Mengen verminderten diesen Effekt nicht (Daten nicht gezeigt). Die spezifische Bande bei ca. 45 kDa konnte bei geringeren Antikörpermengen nicht mehr nachgewiesen werden.

Die Immunpräzipitationen der CD8-Konstrukte waren nicht erfolgreich, da erstens die Expressionsdichte auf der Zelloberfläche um 1,5 - 2 log-Stufen geringer ist und daher die Signale unter die Nachweisgrenze fielen. Zweitens wurden die CD8-Konstrukte mit α Ig- β CP-Anteil von keinem der Antikörper erkannt (FACS-Daten mit OKT8 nicht gezeigt).

Die polyklonalen Antikörper von der Firma Santa Cruz wurden als immunpräzipitierend bei Einsatz von $3,5 \times 10^7$ biotinylierten und lysierten CD8-transfizierter Zellen beschrieben. Es war unter Einsatz von 5×10^7 biotinylierten und lysierten Zellen aber nicht möglich, ein Signal zu erhalten (Daten nicht gezeigt).

3.4 Untersuchung der Jurkat-Grundlinien hinsichtlich der Expression von KIRs

Das MART-1-Peptid hat bei der TCR-negativen Zelllinie Jurkat RT3 in Aktivierungsexperimenten zur IL-2-Produktion induziert (siehe Abschnitt 3.1.3), wenn dieses Peptid von HLA-A2.1 präsentiert wurde. Da auf T- und NK-Zellen KIRs (killer inhibitory receptor) exprimiert werden, die jeweils bestimmte MHC Klasse I-Moleküle erkennen, sollte hier die Expression potentiell aktivatorischer KIRs auf den Jurkat-Linien untersucht werden.

KIRs sind aus 2 oder 3 extrazellulären Ig-Domänen aufgebaut. Sie haben cytoplasmatisch entweder eine lange Domäne, die ein ITIM (immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) enthält, oder eine kurze Domäne, die dann mit einem membrangebundenen Protein assoziiert ist, das ein ITAM (aktivierendes Motiv) enthält. Auf einer Zelle kommen sowohl inhibitorische als auch aktivierende KIRs vor (4,5). Eine gleichbleibende MHC Klasse I-Expression mit zelltypischen Peptiden bewirkt eine Signalweiterleitung durch inhibitorische KIRs, so dass die NK-Zellen nicht aktiv werden. Veränderungen in der MHC Klasse I-Expression, in der MHC-Dichte oder durch Beladung mit fremden Peptiden, z. B. bei Virus-infizierten Zellen, aktivieren die NK-Zellen. Sie töten die veränderten Zellen, indem sie in der Zielzelle eine Apoptose auslösen.

Nur von einigen der inzwischen bekannten KIRs sind auch schon die Liganden (MHC Klasse I- und nicht klassische MHC Klasse I-Moleküle) bekannt. Da bei der Aktivierung mit MART-1-Peptid (HLA-A2.1) eine IL-2-Produktion und damit Proliferation der Effektorzellen hervorgerufen wurde, wird es sich nicht um einen inhibitorischen Rezeptor handeln.

KIR-Gruppierung	Nomenklatur	Typ
KIR2DL1	CD158a	inhibitorisch
KIR2DL2	CD158b1	inhibitorisch
KIR2DL3	CD158b2	inhibitorisch
KIR3DL1	CD158e1	inhibitorisch
KIR2DS1	CD158h	aktivierend
KIR2DS2	CD158j	aktivierend
KIR2DS3		aktivierend
KIR2DS4	CD158i	aktivierend
KIR2DS5	CD158g	aktivierend
KIR3DS1	CD158e2	aktivierend

Tabelle 5: Übersicht über einen Auszug der bisher bekannten KIRs

Erklärung der KIR-Gruppierung. KIR: killer inhibitory receptor, Ziffer + D: Anzahl der extrazellulären Ig-Domänen. L: lange cytoplasmatische Domäne (inhibitorisch), S: kurze cytoplasmatische Domäne (assoziiert mit ITAM-Proteinen), letzte Ziffer: Subfamilie.

Abb. 37 stellt die genomische Repräsentanz der in der Tabelle 5 aufgeführten KIR-Subfamilien in der Jurkat Zelllinie 18B3 dar.

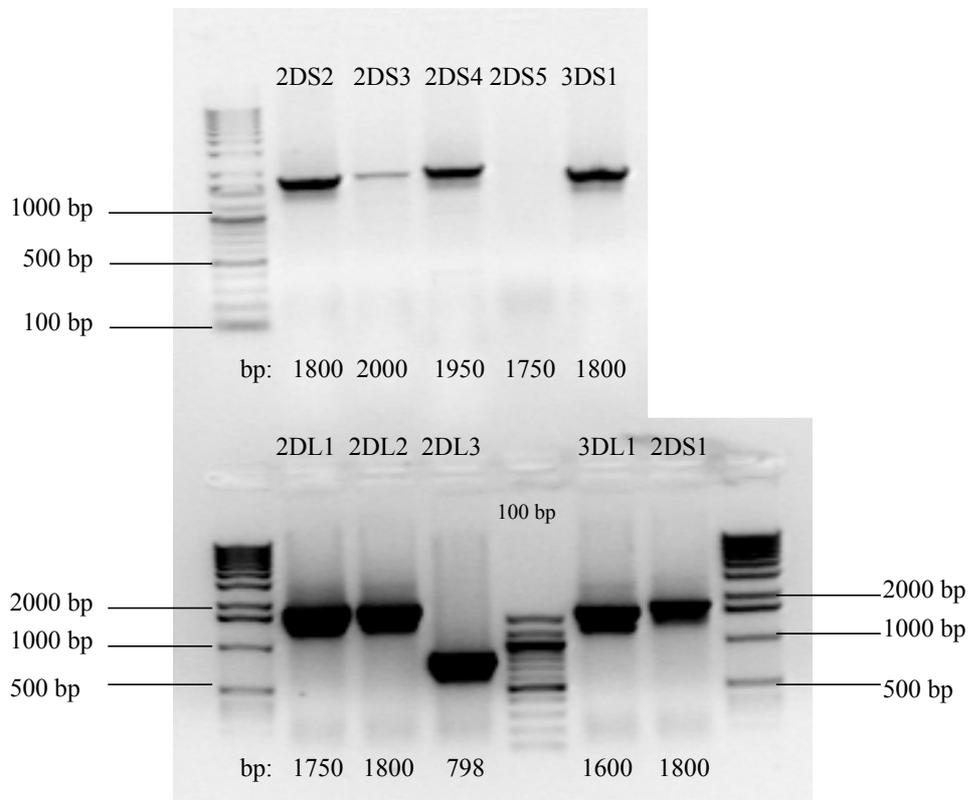


Abb. 37: Amplifikation der in der Tabelle aufgelisteten KIRs

Genomische DNA wurden aus der Linie 18B3 isoliert und durch spezifische Primer mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde auf einem 1 %igem Agarosegel aufgetragen und durch Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Bis auf 2DS5 sind alle KIR-Subfamilien genomisch angelegt. 2DS5 ist ein rares Allel oder Spleiß-Variante des gleichen Gens wie KIR2DS3, es konnte bisher noch nicht als Transkript detektiert werden (52).

Es wurden im folgenden die vier Jurkat Linien auf die Anlage der aktivierenden KIRs auf genomischer Ebene untersucht: Jurkat-wt, Jurkat RT3 ($T_i\beta$ -defizient), 18B3 ($T_i\alpha$ -defizient) und die TCR-positive Linie HSA5 (spezifisch für MART-1-Peptid).

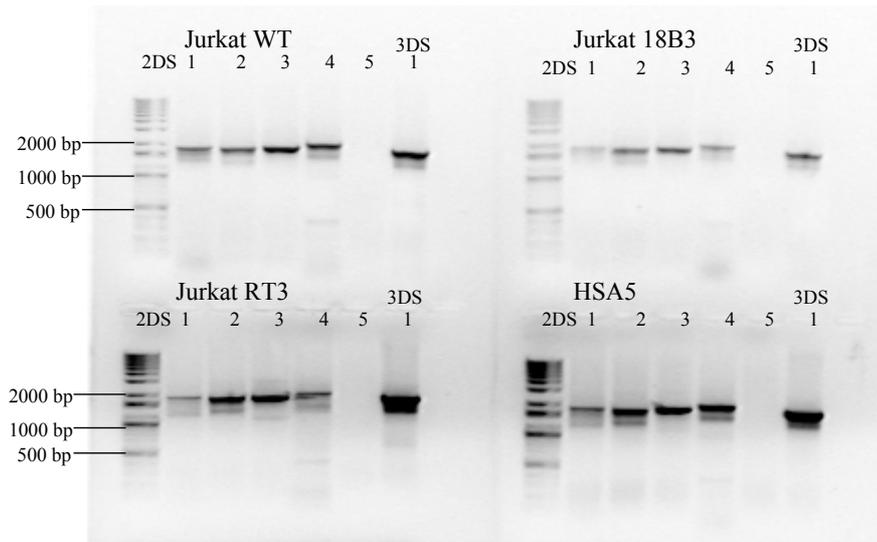


Abb. 38: Vergleich der genomischen Expression aktivierender KIRS auf Jurkat-Linien. Die nicht-inhibitorischen KIRs wurden durch PCR mit spezifischen Primern amplifiziert und das PCR-Produkt auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen. Die DNA wurde unter UV-Licht durch Interkalation mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

Es ist kein Unterschied in den verschiedenen Klonen der Jurkat-wt-Linie erkennbar. Alle Linien zeigen die genomische Repräsentanz von 2DS1-4 und 3DS1. 2DS5 ist, wie oben schon erwähnt, nicht angelegt (Abb. 38).

Auf RNA-Ebene sollte nun erkennbar werden, ob das T-Zell-Hybridom Jurkat einige dieser KIRs transkribiert. Dazu wurde von den Linien Jurkat-wt, RT3 und 18B3 RNA isoliert, durch RT-PCR in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen Primern durch PCR amplifiziert.

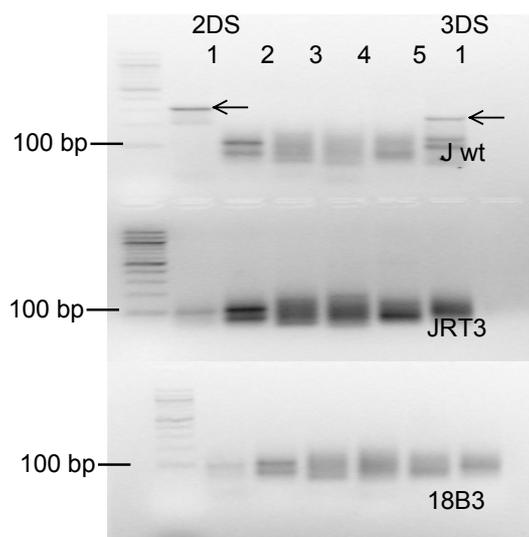


Abb. 39: RT-PCR der nicht-inhibitorischen KIRs 2DS1-5 und 3DS1
Amplifikation der aus RNA umgeschriebene cDNA mittels spezifischen Primern. Die Pfeile kennzeichnen RT-PCR-Produkte.

Von den aktivierenden KIRs wurden ausschließlich von der Jurkat-wt-Linie 2DS1 und 3DS1 transkribiert (Abb. 39). Alle anderen Linien zeigten keine Expression dieser KIRs. Da nun aber die Jurkat-Linie RT3 und nicht Jurkat-wt auf MART-1 spezifisch durch IL-2-Produktion reagierte, kann keiner der beiden KIRs für diese Reaktion verantwortlich sein. Als Positiv-Kontrolle diente RNA aus PBL unterschiedlicher Blutspender (Daten nicht gezeigt).

Ein weiterer NK-Rezeptor ist der NKG2, der mit CD94 als Heterodimer assoziiert und von dem aktivierende und inaktivierende Formen vorliegen (53). Die CD94-Expression kann durch FACS-Analyse dargestellt werden, da ein spezifischer monoklonaler Antikörper erhältlich ist.

Als Positiv-Kontrolle wurden PBL eingesetzt, da ein Teil der T-Zellen CD94 exprimiert. Es wurden zusätzlich die Jurkat-Linien RT3 RSD3 und ihre CD8 α -wt und CD8 α -wt/ β -wt-Transfektanten auf ihre Oberflächenexpression hin untersucht.

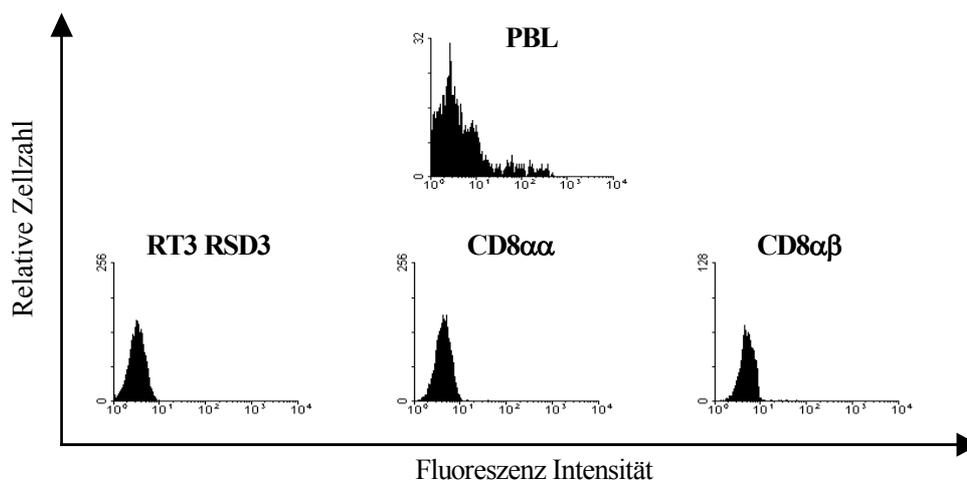


Abb. 40: CD94-Expression auf PBL, Jurkat RT3 RSD3 sowie auf den CD8 α - bzw. CD8 $\alpha\beta$ -Transfektanten. Es wurden mit CD94-Fitc (HP-3D9) PBL, Jurkat RT3 RSD3, die CD8 α -wt-Transfektante und die CD8 $\alpha\beta$ -Transfektante markiert und im Durchflusszytometer untersucht.

Von den PBL sind 2,5 % CD94⁺. Dagegen exprimiert die Jurkat-Linie RT3 das NKG2/CD94-Heterodimer nicht auf ihrer Zelloberfläche (Abb. 40). Dieser Rezeptor ist daher ebenfalls nicht für die Aktivierung durch MART-1 der Jurkat RT3-Linie verantwortlich.

4 Diskussion

Der CD8-Korezeptor wird als CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer oder als CD8 $\beta\beta$ -Heterodimer, nicht aber als CD8 $\beta\beta$ -Homodimer auf PBL exprimiert. Er stabilisiert die Bindung des T-Zell-Rezeptors mit Peptid/MHC Klasse I-Komplex und verstärkt die Signaltransduktion bei geringen Peptidmengen und schwach aktivierenden Peptiden. Zwischen den beiden Dimerformen gibt es keinen nennenswerten Unterschied in der Bindungsaffinität zu MHC Klasse I. In der Aktivierung von T-Zellen stellt sich der CD8 $\alpha\beta$ -Korezeptor als 100fach effizienter heraus als das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der einzelnen Domänen der CD8-Moleküle untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die fehlende Expression des CD8 $\beta\beta$ -Homodimers auf die inhibierende Wirkung des „connecting peptide“, der Transmembran- und der cytoplasmatischen Domäne der CD8 β -Kette zurückzuführen ist. Die Untersuchung der für MART-1 und TAX spezifischen T-Zell-Rezeptoren in der Aktivierungsstudie zeigte, dass diese als CD8-abhängig beschriebenen TCRs bei niedrigen Peptidkonzentrationen aktivierbar waren und dazu den CD8-Korezeptor nicht benötigten. Die TAX-Peptid-Mutante G4A hingegen zeigte, dass die CD8 $^-$ -Linie nicht, dafür aber die CD8 $\alpha\alpha^+$ - und CD8 $\alpha\beta^+$ -Linien zur IL-2-Produktion angeregt werden konnten.

4.1 Expression der CD8-wt-Ketten im Vergleich zu den generierten CD8-Konstrukten

In der vorliegenden Arbeit wurden jeweils die Immunglobulin-Domäne (Ig), das „connecting peptide“ (CP), die Transmembran- (TM) und die cytoplasmatische (cyt) Domäne einer CD8-Kette jeweils einzeln gegen die entsprechende Domäne der anderen CD8-Kette ausgetauscht. Die wt-DNA und die nach der Mutagenese erhaltenen cDNA-Konstrukte wurden in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert und in der zuvor generierten, TAX-TCR $^+$ -exprimierenden Jurkat-Linie RT3, exprimiert. Als weitere Kontrolle wurden sämtliche Ketten auch in COS-7 transient transfiziert. Die letzten Transfektionen ergaben, dass alle CD8-Konstrukte und wt-DNAs ohne Unterschied und unabhängig von den unterschiedlichen Domänen in COS-7 exprimiert werden. Nur Konstrukte, die CD8 α Ig- β CP enthielten, konnten mit keinem der 20 mir zur Verfügung stehenden CD8 α -Antikörper nachgewiesen werden. Devine *et al.* (29)

zeigten, dass humanes aber nicht murines CD8 β auf COS-7-Zellen exprimiert wird. Die Expressionen der von mir hergestellten Konstrukte bestätigen dies. Warum murines CD8 β nicht exprimiert wird bzw. humanes exprimiert wird, bleibt hier ungeklärt.

Die Expression der CD8-wt-Ketten in Jurkat entsprach dem Muster, das auch auf den peripheren Blutlymphozyten zu finden ist. Das CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer (CD8 $\alpha\alpha\alpha\alpha$) war mit einer MFI von 10^3 am höchsten exprimiert, danach folgte das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer mit einer MFI von $0,5 \times 10^2$ und das CD8 $\beta\beta$ -Homodimer (CD8 $\beta\beta\beta\beta$) wurde, wenn überhaupt, nur marginal exprimiert. CD8 α -Konstrukte, in denen die TM- oder cyt-Domäne gegen die entsprechende Domäne des CD8 β ausgetauscht worden war (CD8 $\alpha\alpha\beta\alpha$, CD8 $\alpha\alpha\alpha\beta$), zeigten eine starke Reduktion in der Expression. Die MFI der CD8 $\alpha\alpha\beta\alpha$ -Expression lag dabei mit $0,5 \times 10^2$ noch unter der des CD8 $\alpha\alpha\alpha\beta$ -Konstruktes mit 10^2 und zeigte somit die gleiche Expressionshöhe wie das CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer. Beim Austausch der CD8 α -TM- und cytoplasmatischen Domäne gegen die der CD8 β -Kette addierte sich der inhibierende Effekt: Das CD8 $\alpha\alpha\beta\beta$ -Konstrukt wurde nur noch minimal exprimiert. Die Expression des CD8 $\alpha\beta\alpha\alpha$ -Konstruktes konnte nicht beurteilt werden, da kein Antikörper käuflich war oder zur Verfügung stand, der CD8 α Ig erkannt hätte.

Das umgekehrte Transfektionsexperiment, in dem im CD8 β -Konstrukt die cytoplasmatische Domäne der β -Kette gegen diejenige der CD8 α -Kette ausgetauscht worden war (CD8 $\beta\beta\beta\alpha$), zeigte im Vergleich zu CD8 β -wt eine Zunahme der Expression in Jurkat um eine halbe log-Stufe. Die Expression des CD8 $\beta\beta\alpha\alpha$ war nicht besser als die von CD8 $\beta\beta\beta\alpha$, erst der zusätzliche Austausch der β CP-Region gegen α -CP führte zu einer starken Expression des CD8 $\beta\alpha\alpha\alpha$ -Konstruktes mit einem MFI von $0,5 \times 10^2$. Bei der Einteilung der Domänen für die Herstellung der Konstrukte wurde die Ektodomäne der CD8 β -Kette nach Pecoraro *et al.* (47) und nach Normant *et al.* (49) eingeteilt. Beide ordneten in der β -Kette das Cystein 168 der Transmembran-Domäne zu. So fehlt allen Konstrukten, die die β CP und α TM-Region exprimieren, dieses Cystein. Hennecke *et al.* transfizierten COS-1-Zellen mit mehreren Konstrukten, um den Einfluss der einzelnen Domänen auf die Expression hin zu untersuchen (28). Beim Austausch der Ektodomänen blieben je ein Cystein sowohl von der murinen CD8 α -Kette (Cyt-193) als auch von der CD8 β -Kette (Cys-171) der Transmembran-Domäne zugeordnet. Wurde das proximale zu TM gelegene Cystein 193 gegen Serin mutiert (*), so war die Dimerisierung der CD8 α (*)-Kette stark reduziert. Die Mutation des Cysteins

178 (CD8 α) verhinderte die Dimerisierung vollständig. Ihre Expressionsdaten führen zu dem Schluss, dass das Cystein 193 in der CD8 α -Kette in der Dimerisierung der CD8 α -Kette eine Schlüsselposition einnimmt und daher als proximal zur TM-Domäne gelegen angesehen werden kann, während das 15 Aminosäurereste weiter entfernte Cystein 178 der gleichen Kette einen wesentlich schwächeren Effekt aufweist. Um das an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligte Cystein in der CD8 β -Kette zu isolieren, koexprimierten sie CD8 α mit einem Konstrukt, das die Transmembran- und cytoplasmatische Domäne der CD8 β -Kette (mit proximal zur TM bzw. in der TM gelegenen Cystein 171) und extrazellulär die Domäne der IL-2-Rezeptor α -Kette (T) enthält (T $\beta\beta$). Es wurde weder als CD8 α T $\beta\beta$ - noch als T $\beta\beta$ T $\beta\beta$ -Dimer exprimiert. Daraus zogen sie den Schluss, dass das Cystein 171 der CD8 β -Kette keinen Einfluss auf die Dimerisierung hat. Die humanen Konstrukte CD8 $\beta\beta\alpha\beta$ und CD8 $\beta\beta\alpha\alpha$ enthalten das Cystein 168 der β -Kette nicht mehr und zeigen in den Jurkat-Transfektanten eine Reduktion der Expression ($\beta\beta\alpha\alpha$) bzw. einen völligen Verlust der Expression ($\beta\beta\alpha\beta$). Der Verlust des Cysteins 171 in den humanen CD8 β Cp- α TM-enthaltenden Konstrukten wird wegen den Expressionsdaten von Hennecke *et al.* und auch der guten Expression der humanen Konstrukte CD8 $\beta\beta\alpha\alpha$, CD8 $\beta\beta\alpha\beta$ auf COS-7 offensichtlich nicht die alleinige Ursache für die fehlende Oberflächenexpression der Konstrukte in Jurkat sein. Die Reduktion der CD8 $\beta\beta\alpha\beta$ - im Vergleich zur CD8 $\beta\beta\alpha\alpha$ -Expression lässt sich durch den inhibierenden Einfluss der cytoplasmatischen Domäne der β -Kette erklären, wie schon bei CD8 $\alpha\alpha\alpha\beta$ zu sehen war. Überraschenderweise wurden bei der Kotransfektion eines murinen CD8 α -Konstruktes in COS-1 (Hennecke *et al.*, 28), in dem beide Cysteine in Serine mutiert worden waren mit CD8 β -wt CD8 β -Homodimere (keine CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimere) auf der Oberfläche exprimiert, die mit CD8 α kopräzipitierbar waren. So war für die Bildung von CD8 β -Dimeren scheinbar die Anwesenheit der CD8 α -Kette notwendig, aber nicht die β -TM-Domäne (T $\beta\beta$, mit proximalem Cys 171) verantwortlich. Die Größe des immunpräzipitierten CD8 β -Konstrukts (T $\beta\beta$), das nur die CD8 β -TM- und cytoplasmatische Domäne enthielt, zeigte, dass die Monomere ein Glykosylierungsmuster entsprechend des Endoplasmatischen Retikulums (ER) aufwiesen und dass die wenigen gebildeten Dimere das ER verlassen konnten und eine andere Glykosylierung erhielten. Daraus lässt sich schließen, dass die Transmembran-Domäne der CD8 β -Kette wahrscheinlich ihre funktionelle Bedeutung in der Retention von CD8 β -Monomeren hat und dass die

Dimerisierung die Retention durch die TM-Domäne im ER aufhebt und den Transport zum Golgi-Apparat ermöglicht.

Um die Frage zu klären, welche Anteile der CD8 α -Kette für die Dimerisierung und Oberflächenexpression von CD8 β notwendig sind, generierten Hennecke *et al.* (28) ein Konstrukt, das aus der CD8 β -Ektodomäne und aus der TM- und cytoplasmatischen Domäne aus der CD8 α -Kette bestand (Cystein 193). Dieses Konstrukt dimerisierte im Gegensatz zu CD8 β erfolgreich, konnte aber das Endoplasmatische Retikulum nicht verlassen. Daraus zogen sie den Schluss, dass die CD8 α -Ektodomäne für den Transport auf die Zelloberfläche eine zentrale Rolle spielt, möglicherweise durch die Bildung größerer Komplexe mit Disulfidbrücken-Bindungen aus mehreren CD8 α - und CD8 β -Ketten. Die starke Expression meines CD8 $\beta\alpha\alpha$ -Konstruktes in Jurkat weist darauf hin, dass dazu das CD8 α -„connecting peptide“ benötigt wird, wenn dieser Effekt nicht allein auf das Vorhandensein des proximal zur TM gelegenen Cysteins 181 zurückzuführen ist.

Die stark reduzierte Expression des CD8 $\beta\alpha\alpha\beta$ - im Vergleich zum CD8 $\beta\alpha\alpha$ -Konstrukt lässt vermuten, dass die CD8 β -cyt-Domäne mit der Palmitoylierungssequenz eine wichtige Rolle spielt. Hennecke *et al.* ordneten das dafür notwendige Cystein noch der TM-Domäne zu. Ihr Konstrukt T $\beta\beta$ weist keine Dimerisierung auf und wird damit auch nicht auf der Oberfläche exprimiert. Die Funktion der β cyt-Domäne liegt daher wahrscheinlich nicht in der Verhinderung der Dimerbildung sondern könnte über die Palmitoylierung in der Zuordnung in Bereiche der Lipidschicht in den Zellkompartimenten liegen. Die Funktion der Palmitoylierung der CD8 β -Kette im CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer liegt in der Verbesserung der lck-Assoziation mit CD8 α in „rafts“ (11, 36). Witte *et al.* koexprimierten CD8 α und CD8 β ohne cytoplasmatischen Rest aber mit Palmitoylierungssequenz als Heterodimer (33). Die Funktion dieses Heterodimers war eingeschränkt. Wie in der Einleitung unter 1.6 beschrieben, entwickeln transgene Mäuse, die CD8 β ohne cytoplasmatischen Anteil exprimieren, keine CD4⁻CD8⁺-Zellen (39). Ob hier in der verkürzten cytoplasmatischen Domäne des CD8 β -Konstrukts (enthält die Palmitoylierungssequenz) das Cystein palmitoyliert vorlag, ist unklar. Die lck-Aktivität durch Interaktion mit CD4 und CD8 spielt bei der positiven und negativen Selektion im Thymus eine entscheidende Rolle (39).

Damit widersprechen diese Daten den Expressionsdaten von Devine *et al.* (29). Sie exprimierten humane (h) und murine (m) CD8-Ketten einzeln und in Kombination

beider Ketten innerhalb einer Spezies in COS-7. Im Unterschied zur murinen CD8 β -Kette wurde die humane CD8 β -Kette als Homodimer auf der Zelloberfläche exprimiert. Die Expression der CD8 β -wt und meiner CD8 β -Konstrukte bestätigen, dass humanes CD8 ohne Unterschied exprimiert wird. Devine *et al.* (29) tauschten die humane CD8 β -Ig Domäne gegen die murine Domäne aus und zeigten damit, dass dieses Konstrukt nicht mit dem gegen die CD8 β -Kette gerichteten Antikörper im Homodimer, wohl aber im Heterodimer mit murinem CD8 α nachgewiesen werden konnte. In ihrer Arbeit untersuchten Devine *et al.* PBL von für humanes CD8 β transgenen Mäusen. Diese Tiere exprimierten mCD8 α /hCD8 β -Heterodimere und eine geringe Anzahl mCD4/hCD8 doppelt positiver Lymphozyten. Daraus folgerten sie, dass die murine Ig-Domäne für den Verlust dieser Homodimer-Expression verantwortlich sein sollte. Aus ihren Daten lässt sich aber vielmehr der Schluss ziehen, dass erstens das CD8 β -Chimär aus muriner Ig-Domäne und humanem Rest in der Anwesenheit von CD8 α auf der Oberfläche exprimiert wird, was die Daten von Hennecke *et al.* unterstützt. Die CD8 α Ketten beider Spezies weisen eine Homologie von 56% auf, wobei 45 % der Aminosäuren identisch sind. Die CD8 β -Ketten beider Spezies sind zu 65% homolog und zeigen 50 % identische Aminosäuren (BLASTP 2.0.14). Zweitens reichen diese Homologien für die Heterodimer-Bildung des humanen CD8 β mit dem murinen CD8 α aus. Wheeler *et al.* (30) exprimierten in einer murinen T-Zell-Linie ein Konstrukt aus CD8 β Ig-CP und CD8 α TM-cyt. Dieses Konstrukt wurde in Übereinstimmung mit meinen Daten, aber im Gegensatz von Devine *et al.* (29) exprimiert. Die Expression war etwa eine halbe log-Stufe schwächer als die der CD8 β -Kette im $\alpha\beta$ -Heterodimer. Ob dabei das proximal zur TM-Domäne gelegene Cystein 193 der CD8 α oder das Cystein 171 der CD8 β -Kette noch in diesem Konstrukt vorhanden ist, geht aus der Beschreibung nicht hervor.

Die Immunpräzipitation der von mir angefertigten Konstrukte zur Beurteilung der Frage, ob Mono- oder Dimere exprimiert werden, war nicht möglich, da keine Antikörper erhältlich waren, die gut immunpräzipitieren. Mulligan *et al.* (51) benötigten für ihre CD8 α -Präzipitation die Kombination aus drei verschiedenen Antikörpern: OKT8, DK25 (beide in dieser Arbeit genutzt) und WM-50 (nicht käuflich). Für eine Spur in der Immunpräzipitation wurden von mir 5×10^7 Zellen biotinyliert und lysiert, mit OKT8 allein oder in Kombination mit DK25, sowie mit dem polyklonalen Antikörper gegen CD8 α von Santa Cruz präzipitiert. Die CD8 α -wt-Kette scheint in

Jurkat in einer anderen Glykosylierungsform vorzuliegen, denn das Dimer ist auf der Höhe von ca. 45 kDa zu finden. Die CD8⁻-Linie wurde als Negativ-Kontrolle eingesetzt. Da die Expression des CD8αα-Homodimers mit einer MFI von 10³ sehr hoch liegt, die Konstrukte aber deutlich schwächer exprimiert werden, konnte bisher kein Signal der Konstrukte nachgewiesen werden. Erschwerend kommt hinzu, dass auch der polyklonale gegen CD8α-wt gerichtete Antikörper kein Signal unter diesen Bedingungen ergab, und auch im FACS die Konstrukte mit CD8αIg-βCP nicht nachgewiesen werden konnten. Die Möglichkeit, durch Immunpräzipitation extra- oder intrazellulär Dimere oder Monomere nachzuweisen, entfiel daher. Hennecke *et al.* verwendeten für ihre Immunpräzipitation mit ³⁵S-markierten COS-1-Transfektanten (murine CD8-Konstrukte) aus 150 mm Schalen, also eine sehr hohe Anzahl an Zellen. Sie konnten im nicht reduzierten SDS-PAGE-Gel die Expression von CD8αα-Homodimeren und CD8αβ-Heterodimeren, sowie die Expression der intrazellulär zurückgehaltenen CD8β-Monomere nachweisen. Meine intrazelluläre FACS-Messungen nach Oberflächen-Trypsinisierung zur Epitop-Eliminierung ergaben, dass lediglich der gegen CD8αβ-Heterodimer gerichtete monoklonale Antikörper 2ST8 5H7 intrazellulär spezifisch bindet. Bei dieser Bindung handelt es sich nicht um internalisiertes CD8αβ, da die CD8⁻-Linie dasselbe Signal zeigte.

Aus den oben genannten Daten lassen sich folgende Schlüsse für die fehlende CD8β-Homodimerexpression ziehen:

1. Die Transmembran- und die cytoplasmatische Domäne der CD8β-Kette haben einen additiven inhibierenden Effekt auf die Expression der CD8β-Kette (hCD8ααβα, hCD8ααβ und hCD8ααββ).
2. Darüber hinaus ist die Anwesenheit der CD8α-Kette für die erfolgreiche Dimerisierung von CD8β-Monomeren wichtig (mCD8α(*) führt zu CD8β-Homodimer-Expression auf der Zelloberfläche, Hennecke *et al.*).
3. An der Dimerisierung ist die αTM-Domäne (mCD8βαα Hennecke *et al.*), nicht aber die β-TM-Domäne (mCD8α/Tββ, Hennecke *et al.*) beteiligt. Ferner ist ein Teil der CD8α-Ektodomäne (mCD8α(*)/mCD8β, Hennecke *et al.*) und hier wahrscheinlich die αCP-Region (hCD8βαα) für die Oberflächenexpression der Dimere notwendig.

4. Die Funktion der CD8 β -TM-Domäne liegt in der Retention der CD8 β -Monomere im ER. Eine erfolgreiche Dimerisierung kann diese Retention aufheben (Hennecke *et al.*). CD8 $\alpha\alpha\beta$ wird exprimiert, aber deutlich niedriger als CD8 α -wt.
5. Die deutlich verringerte aber gut detektierbare Expression des CD8 $\alpha\alpha\beta$ -Konstruktes im Vergleich zu CD8 α -wt und die deutlich verringerte Expression des CD8 $\beta\alpha\alpha$ -Konstruktes im Vergleich zu CD8 $\beta\alpha\alpha$ lässt das Mitwirken der Palmitoylierungssequenz in der cytoplasmatischen Domäne der CD8 β -Kette vermuten.

4.2 Aktivierung der als CD8-abhängig beschriebenen MART-1- und TAX-TCR

Es wurden zwei als CD8-abhängig beschriebene T-Zell-Rezeptoren durch Stimulation mit spezifischen Peptid in abnehmenden Konzentrationen auf ihre CD8-Abhängigkeit untersucht, um dann die Funktionen der einzelnen Domänen der CD8 α - bzw. - β -Korezeptorketten untersuchen zu können.

Die Linie HSA5 exprimiert den TCR, der spezifisch das Melanoma-assoziierte Peptid (MART-1) auf HLA-A2.1 erkennt (zur Verfügung gestellt von Dr. M. Nishimura, NIH; Bethesda, USA). Diese Linie wurde mit CD8 α und CD8 β allein und in Kombination stabil transfiziert und mit MART-1 aktiviert. Anschliessend wurde die induzierte IL-2-Produktion als Aktivierungsmarker bestimmt. In diesen Aktivierungsexperimenten stellte sich heraus, dass das MART-1-Peptid in der CD8 α -Linie schon bei einer Konzentration von 10^{-7} M eine IL-2-Produktion induziert. Die CD8-Transfektion verbesserte die Aktivierbarkeit bei niedrigeren Peptidmengen nicht mehr. Daher wurde eine Jurkat-Linie generiert, die den TAX-spezifischen TCR RSD3 stabil exprimieren sollte. Durch Elektroporation wurden die schon vorliegenden Expressionsvektoren der TCR α -RSD3 und TCR β -RSD3-Kette in die T β -defiziente Linie RT3 transfiziert und mittels Selektion durch Antibiotikum stabil exprimiert. Die Kotransfektion und anschließende Aktivierung mit den CD8-wt-Ketten allein und in Kombination ergab, dass auch dieser T-Zell-Rezeptor in seiner Aktivierbarkeit nicht durch die CD8-Korezeptorfunktion in der IL-2-Induktion durch geringere Peptid-Konzentrationen verbessert wurde. Da die TCR $^{+}$ -Jurkat-Linie HSA5 CD28 als zweiten kostimulierenden Rezeptor exprimiert, die TCR $^{+}$ -Jurkat-Linie RT3 RSD3 jedoch nicht, und bei beiden keine Verbesserung der Aktivierung durch CD8 nachzuweisen war, wird das CD28-Molekül als zweites kostimulatorisches Signal in den Hybridomen keine

weitere Rolle spielen. Diese Vermutung wird unterstützt durch die Tatsache, dass beide TCRs aus schon cytotoxisch aktiven CTL isoliert worden sind. Wang *et al.* (61) zeigten in ihrer Arbeit, dass naive CD8⁺ T-Zellen für die Proliferation und Differenzierung in cytotoxische Effektorzellen bei stark aktivierenden Peptiden keine Kostimulation durch CD28 benötigen (67).

Mutationen im Peptid/MHC Klasse I-Komplexes durch Aminosäuremutationen in der Peptid-Bindungsgrube des MHC (Meurer *et al.*, 62) oder des präsentierten Peptids (Buslepp *et al.*, 54) resultieren in einer veränderten Interaktion mit dem T-Zell-Rezeptor. Buslepp *et al.* und Sloan-Lancaster *et al.* (66) zeigten, dass Aminosäure-Mutationen der Peptid-Antigene diese zu Antagonisten oder zu stärkeren oder schwächeren Agonisten machten. Cassian *et al.* (63) untersuchten CTL, die auf Peptide mit schwacher und starker Avidität reagierten, mit der Bindung von löslichen Peptid/MHC-Tetrameren. CTL, die zwar schwach-avide Peptide binden konnten, waren aber noch nicht fähig, Tumor-Zellen zu lysieren. Dagegen wurde bei Peptiden mit starker Avidität (z. B. MART-1) sowohl auf das präsentierte Peptid als auch auf das Tumorgewebe reagiert. Hausmann *et al.* (64) zeigten in ihrer Arbeit, dass TAX-Mutationen, in denen deutlich mehr als eine Aminosäure ausgetauscht worden war, präsentiert und erkannt wurden und für die verwendeten CTL Agonisten darstellten. Aus all diesen Studien lässt sich der Schluss ziehen, dass Peptid-Mutationen von MART-1 oder TAX eine Veränderung der Affinität des Peptid-spezifischen TCRs ergeben sollten. Die reduzierte Affinität des TCR zu MHC/Peptid führt zu einer verkürzten Kontaktzeit und damit zu einer Signalabschwächung. Die Reduktion sollte sich besonders bei niedrigen Peptid-Konzentrationen bemerkbar machen. Die Avidität des TCR/Peptid/MHC-Komplexes kann durch CD8 erhöht werden. Durch eine Mutation des Peptids, die zu einer leichten Reduktion der Affinität zum TCR führt, sollte daher ein vorher CD8-unabhängiger TCR bei niedrigen Peptid-Konzentrationen CD8-abhängig werden können. Auf Mutationen des MART-1-Peptids wurde aufgrund seiner enormen Hydrophobizität verzichtet. Es wurden daher für diese Arbeit 80 TAX-Peptid-Mutanten hergestellt. Die Ankerpositionen 2 und 9 des Nonapeptids wurden nicht mutiert, dafür die Positionen 1 (Leucin, L), 4 (Glycin, G), 7 (Valin, V) und 8 (Tyrosin, Y). Diese Peptide wurden, wie zuvor beschrieben, in der Aktivierung der TAX-spezifischen CD8⁻- und CD8⁺-Jurkat-Linie bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M untersucht. Die Y-Mutationen in Position 8 führten zu einem kompletten Verlust der Aktivierung. Dieser Tyrosinrest hat offensichtlich eine große Bedeutung in der Bindung

an HLA-A2.1. Die Mutation V7I führte zu einer extrem starken Aktivierung vor allem der $CD8\alpha\alpha^+$ -Linie (7,5 x stärker als TAX-wt). Diese Peptid-Mutante stellt damit einen sehr starken Agonisten dar. Dieses Peptid wird die Konfiguration der Konformation zwischen MHC Klasse I und Peptid als auch MHC Klasse I/Peptid zu TCR stabilisieren, also in der immunologischen Synapse eine festere Bindung zwischen Effektor- und Zielzelle und damit eine stärkere Signaltransduktion bewirken. Weitere Mutationen in Position 1, 4 und 7 zeigten Aktivierungsunterschiede, die es ermöglichten, die Peptide in 4 Gruppen einzuteilen. 1. Peptide, die sowohl die $CD8^-$ - als auch die $CD8^+$ -Linie stärker aktivierten (V7I). 2. Peptide, die die IL-2-Produktion um mindestens das 5-10fache in der $CD8\alpha\alpha^+$ -Linie induzierten und in der $CD8^-$ -Linie eine schwächere Aktivierung als TAX-wt-Peptid zeigten (L1I, L1T, G4N, G4S). 3. Peptide, die bei der $CD8\alpha\alpha^+$ -Linie eine deutliche, auf der $CD8^-$ -Linie aber keine nennenswerte Aktivierung mehr auslösten (L1A, L1K, L1S, V7T). 4. Peptide, die auf der $CD8^-$ -Linie keine und auf der $CD8\alpha\alpha^+$ -Linie nur eine sehr schwache IL-2-Induktion bewirkten (L1A, L1M, G4A, V7M). Die Peptide der Gruppen 1-4 wurden in den Konzentrationen von 10^{-7} – 10^{-5} M titriert und die IL-2-Induktion detektiert. Dabei ergab sich, dass lediglich die Peptide L1M und G4A aus der 4. Gruppe bei 10^{-5} M ausschließlich in der $CD8\alpha\alpha$ -exprimierenden Linie eine IL-2-Induktion bewirkten. Um die Empfindlichkeit des Aktivierungsexperimentes zu steigern, wurde nun auf die IL-2-Detektion durch Beads verzichtet und auf ein biologisches Nachweissystem zurückgegriffen. Die IL-2-Abhängigkeit der IL-2-sensitiven Linie G2 wurde durch Absterben nach drei Tagen unter IL-2-Entzug bestätigt. L1M und G4A aus der Peptidgruppe 4 wurden in Aktivierungsexperimenten in einer Konzentrationen von 10^{-8} – 10^{-4} M eingesetzt und die IL-2-Menge durch die Proliferation der G2-Zellen quantifiziert. Die neuesten Daten der Aktivierung durch die TAX-Mutante G4A bestätigen die $CD8$ -Abhängigkeit. Sowohl die $CD8\alpha\alpha^+$ - und auch die $CD8\alpha\beta^+$ -Linie wurden bei einer Peptid-Konzentration von 10^{-7} M aktiviert, während die $CD8^-$ -Linie mindestens 10^{-4} M für eine Stimulation benötigte. Andere Gruppen hatten gezeigt, dass $CD8\alpha\beta$ ein stärkerer Korezeptor ist als $CD8\alpha\alpha$ (33, 65). Der fehlende Unterschied von $CD8\alpha\alpha$ und $CD8\alpha\beta$ kann in der recht niedrigen $CD8\alpha\beta$ -Expression in Jurkat liegen. Damit ist die Möglichkeit gegeben, weitere Untersuchungen der $CD8$ -Ketten und der $CD8$ -Konstrukte durchzuführen.

Die Untersuchung der Funktionen der verschiedenen Domänen beider $CD8$ -Ketten wurde bisher von einigen Gruppen aufgegriffen. Eichmann *et al.* zeigten in einer sehr frühen Arbeit durch den Einsatz von blockierenden Antikörpern, dass

unterschiedliche Bereiche der CD8-Ketten verschiedene Funktionen haben (38). Sie konnten mit den gleichen blockierenden Antikörpern die cytolytische Funktion der CTL inhibieren und die Aktivierung der ruhenden T-Zellen zu CTL beobachten, oder aber sie sahen durch zwei andere Antikörper den umgekehrten Effekt.

Irie *et al.* (1998) zeigten, dass auf murinen T-Zell-Hybridomen CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimere exprimiert werden, die keine cytoplasmatische Domäne der CD8 β -Kette (β') mehr enthalten (31). In diesen Zellen wurden bei Stimulation durch Kreuzvernetzung des TCR und CD8 eine Aktivierung und damit eine Phosphorylierung der Tyrosinkinase Ick ausgelöst. Transfektanten mit CD8 $\alpha\beta$ -wt Dimer zeigten eine deutliche Ick-Phosphorylierung, während die CD8 $\alpha\beta'$ eine deutliche Reduktion der Phosphorylierung aufwiesen. Transgene Mäuse für die verkürzte CD8 β -Kette zeigten eine Einschränkung in der Entwicklung der Thymozyten durch die verminderte Ick-Aktivität. Die Anzahl der CD4⁺CD8 $\alpha\beta$ ⁺-exprimierenden Thymozyten war drastisch reduziert.

Die Entdeckung von Arcaro *et al.* (2001), dass die CD8 β -Kette eine Palmitoylierungssequenz aufweist, die eine Orientierung der Heterodimere in „rafts“ bewirkt, deckte einen Teil der besseren Aktivierung durch das Heterodimer auf (11, 36). In der Aktivierungsstudie von Witte *et al.* zeigten alle CD8-Transfektanten ($\alpha'\alpha',\alpha'\beta$, $\alpha\beta'$ und $\alpha'\beta'$), die ohne cytoplasmatischen Anteil (α' , β') transfiziert wurden, die Reduktion der Aktivierung um eine log-Stufe, aber nicht die Differenz um zwei, die der Vergleich von CD8 $\alpha\alpha$ und CD8 $\alpha\beta$ ergab (33). Durch die Palmitoylierung der CD8 β -Kette driftet CD8 $\alpha\beta$ nicht nur in „rafts“, die cytoplasmatische Domäne von CD8 β vermittelt darüber hinaus konstitutiv die Assoziation von CD8 $\alpha\beta$ mit CD3/TCR in „rafts“. Diese Komplexe aus CD8/CD3/TCR zeigen anschliessend eine hohe Affinität für den Peptid/MHC Klasse I-Komplex (36). Auf diese Weise ergibt sich eine hohe Dichte an CD8 und CD3/TCR in diesen organisierten Zellmembrandomänen und es kommt zu einer multimeren Bindung von Peptid/MHC Klasse I-Komplexen, was die Aviditätstheorie unterstützt (33). Die effizientere Phosphorylierung der p56^{lck} in den „rafts“ wird durch das Fehlen der cytoplasmatischen Domäne der CD8 β -Kette im CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer aufgehoben (11).

Wheeler *et al.* (37) zeigten, dass CD8 β möglicherweise mit β_2 -Mikroglobulin interagiert, wenn es zusammen mit CD8 α exprimiert wird. Der gleichzeitige Einsatz von monoklonalen Antikörpern gegen die CD3 ϵ -Kette bei der Aktivierung ergab, dass

zwar die CD8 $\alpha\beta$ -induzierte IL-2-Produktion vermindert war, nicht jedoch die von CD8 $\alpha\alpha$. Wie in Abschnitt 1.6. beschrieben, interagiert die CD8 β -Kette über ihre Ektodomäne mit CD3 δ (Doucey *et al.*, 42). Bei diesem Kontakt könnte es sich um eine Stabilisierung über zweiwertige Kationen wie z. B. Zink handeln, das über freie Cysteinreste chelatisiert wird. In Immunpräzipitationen einmal in Anwesenheit des Chelators für zweiwertige Kationen EDTA und das andere Mal durch vorherige Inkubation mit Ethylmaleinimid, das mit der SH-Gruppe des Cysteins eine kovalente Bindung eingeht, reduzierten beide die Ko-Präzipitation von CD8 δ mit CD8 β . Neueste, noch nicht veröffentlichte Daten in einer Aktivierungsstudie von Wong *et al.* (65) zeigen, dass CD8 β -CP für einen Teil der besseren Korezeptorfunktion des CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimers verantwortlich ist. Sie konstruierten dafür ein Konstrukt, das die Ig-, TM und cytoplasmatische Domäne der CD8 α und die CP-Region der CD8 β -Kette enthält. Dabei setzten sie die Ektodomäne so zusammen, dass ein deutlich größerer Teil der CD8 α -Kette als dem α Ig-Anteil entspricht (also noch ein Teil der α CP-Region enthält) mit der kürzeren β CP-Domäne (im Vergleich zur CD8 α -Kette) ligiert wurde. Das so erhaltene Konstrukt entspricht damit eher der Länge der CD8 α -wt-Kette als der kürzeren CD8 β -wt-Kette. Ob sich durch diese Mischung der α CP/ β CP-Domäne Vorteile in der Aktivierung durch den α -Anteil ergeben, muss noch gezeigt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Aktivierungsunterschiede zwischen dem CD8 $\alpha\alpha$ -Homodimer und dem CD8 $\alpha\beta$ -Heterodimer um zwei log-Stufen in der Peptid-Konzentration wohl auf zwei Domänen zurückführen lassen:

1. Die cytoplasmatische Domäne der CD8 β -Kette, die durch ihre Palmitoylierung in „rafts“ driftet und dort für eine effizientere Assoziation und Signaltransduktion der lck mit CD8 α sorgt.
2. Die β -CP-Region, die wahrscheinlich mit der CD3 δ -Kette in der β -CP-Region über ein Kation-Cystein-Chelat Komplex mit dem TCR vor dem Antigenkontakt assoziiert und durch die Palmitoylierung in „rafts“ organisiert ist.

4.3 Aktivierung der TCR-Linie durch MART-1

Bei der Untersuchung der verschiedenen TCR⁻-Linien im Vergleich zur TCR⁺-Jurkat Linie HSA5, die spezifisch das MART-1-Peptid erkennt, stellte sich heraus, dass die T β -defiziente Linie RT3 durch MART-1 bei einer Konzentration von 10⁻⁵ M spezifisch aktiviert wird. Stimulation ohne APC mit MART-1 oder mit APC, die mit

TAX beladen wurden oder ein anderes HLA exprimierten, das MART-1 nicht bindet, lösten keine IL-2-Produktion aus. Die IL-2-Induktion war also von MART-1 und HLA-A2.1 abhängig. Aus dem Grund sollte die Expression von aktivierenden KIRs (killer inhibitory receptors), die auf CD8 $\alpha\alpha$ -exprimierenden Lymphozyten exprimiert werden (Natürliche Killerzellen, NK) auf den verschiedenen Jurkat-Varianten untersucht werden. KIRs erkennen Selbstpeptid/MHC Klasse I-Komplexe und bleiben durch diesen ständigen Kontakt inaktiv.

Auf genomischer Ebene konnte die Anlage folgender aktivierender KIRs nachgewiesen werden: 2DS1-4 und 3DS1. Es wurden davon aber nur 2DS1 und 3DS1 in Jurkat-wt aber nicht in Jurkat RT3 transkribiert. Jurkat-wt war jedoch nicht durch MART-1 aktivierbar gewesen, sondern nur die RT3-Linie. Das NKG2/CD94-Heterodimer ist ebenso ein aktivierender Rezeptor, der auf NK-Zellen exprimiert wird. Die FACS-Analyse des CD94 ergab, dass auch dieser Rezeptor nicht für die IL-2 Induktion durch MART-1 auf der TCR⁻-Linie verantwortlich war.

Somit sind weder KIRs noch CD94 assoziierte NK-Rezeptoren für die IL-2 Produktion verantwortlich. Als weitere Kandidaten kommen jetzt noch andere MHC Klasse I-bindende Moleküle wie z. B. die „immunglobuline-like transcripts“ (ILTs) in Betracht.

5 **Ausblick**

Mit der jetzt gegebenen Möglichkeit der funktionellen Untersuchung der CD8-Domänen der CD8-Korezeptoren und seiner Konstrukte in der Stimulation der Jurkat-Linie RT3 RSD3 mit der TAX-Mutante G4A wird es möglich sein, das Zusammenspiel der CD8-Domänen aufzudecken. Sinnvoll wäre es, die Konstrukte, die das Cystein 168 nicht mehr enthalten, wie in den β CP- α TM-enthaltenden Konstrukten, so zu gestalten, dass dieses Cystein statt wie bisher der β TM- nun der β CD-Domäne zugeteilt wird. Der Vergleich der bisher fertig gestellten Konstrukten mit den neuen Konstrukten hinsichtlich der Expression und der Funktion als Korezeptor wird die Rolle des Cysteins deutlich machen.

Mit dem jetzt etablierten Aktivierungssystem können nicht nur die CD8-Konstrukte funktionell untersucht werden. Es können auch funktionell relevante Aminosäuren identifiziert werden, die in der Interaktion des CD8 α und CD8 β mit MHC Klasse I beteiligt sind. So kann die Orientierung insbesondere des CD8 $\alpha\beta$ zum MHC, für die zwei alternative Computermodelle existieren, geklärt werden.

6 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP	alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
APC	antigenpräsentierende Zelle
Aqua bidest.	bidestilliertes, steriles Wasser
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
CD	<i>cluster of differentiation</i>
COS	Affen-Nieren-Fibroblasten-Linie
CP	<i>connecting peptide</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
cyt	cytoplasmatisch
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosintrisphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FACS	Fluoreszenz-aktivierter Zell-Sortierer
FCS	fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FSC	vorwärts-Lichtstreuung
h	Stunde
HLA	humaner Histokompatibilitätskomplex
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	<i>intracellular tyrosin-based activation motif</i>
ITIM	<i>intracellular tyrosin-based inhibition motif</i>
kb	Kilobase
lck	Tyrosinkinase p56 ^{lck}
mAK	monoklonaler Antikörper

MCS	multiple Klonierungsstelle
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NK	Natürliche Killerzelle
PE	Phycoerythrin
PBL	periphere Blutlymphozyten
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
rafts	hochgeordnete Bereiche der Zellmembran, Palmitin- und Myrisitinsäure-reich
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
R10	RPMI mit Standard-Zusätzen
SSC	seitwärts-Lichtstreuung
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TCR	T-Zell-Rezeptor
TM	Transmembrandomäne
u	<i>unit</i> = Einheit
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
v/w	Volumen/Gewicht
w/w	Gewicht/Gewicht
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chlor-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid

7 Literatur

1. Miceli, M.C., P. von Hoegen, and J.R. Parnes. 1991. Adhesion versus coreceptor function of CD4 and CD8: Role of the cytoplasmic tail in coreceptor activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:742-47.
2. Sugita, M., D.B. Moody, R.M. Jackmann, E.P. Grant, J.P. Rosat, S.M. Behar, P.J. Peters, S.A. Porcelli, and M.B. Brenner. 1998. CD1-a new paradigm for antigen presentation and T cell activation. *Clin. Immunopathol.* 87:8-14.
3. Jarry, A., N. Brousse, F. Selz, and D. Guy-Grand. 1990. Subsets of CD3⁺ (T cell receptor $\alpha\beta$ or $\gamma\delta$) and CD3⁻ lymphocytes isolated from normal human epithelium display phenotypical features different from their counterparts in peripheral blood. *Eur. J. Immunol.* :1097-103.
4. Leahy, D.J., R. Axel, and W.A. Hendrickson. 1992. Crystal structure of a soluble form of the human T cell receptor CD8 at 2.6Å resolution. *Cell* 68: 1145-62.
5. Boursier, J. P., A. Alcover, F. Herve, I. Laisney, and O. Acuto. 1993. Evidence for an extended structure of the T cell receptor CD8 α as deduced from the hydrodynamic properties of soluble forms of the extracellular region. *J. Biol. Chem.* 268:2013-20.
6. Kern, P.S., M.-K. Teng, A. Smoylar, J.-H. Liu, J. Liu, R.E. Hussey, R. Spoerl, H.-C. Chang, E.L. Reinherz, and J.-H. Wang. 1998. Structural basis of CD8 coreceptor function revealed by crystallographic analysis of a murine CD8 $\alpha\alpha$ ectodomain fragment in complex with H-2K^b. *Immunity* 9:519-30.
7. Gao, G.F., J. Tormo, U.C. Gerth, J.R. Wyer, A. J. McMichael, D.I. Stuart, J.I. Bell, E.Y. Jones, and B.K. Jakobsen. 1997. Crystal structure of the complex between human CD8 $\alpha\alpha$ and HLA-A2. *Nature* 387:630-634.
8. Hennecke, S., and P. Cosson. 1993. Role of transmembrane domains in assembly and intracellular transport of the CD8 molecules. *J. Biol. Chem.* 268:26607-12.
9. Veillette, A., M.A. Bookman, E.M. Horak, and J.B. Bolen. 1988. The CD4 and CD8 T cell surface antigens are in association with the internal membrane tyrosine-protein kinase p56^{lck}. *Cell* 55:301-8.
10. Zamoyska, R., P. Derham, S.D. Gorman, P. von Hoegen, J.B. Bolen, A. Veillette, and J.R. Parnes. 1989. Inability of CD8 α' polypeptides to associate with p56^{lck} correlates with impaired function in vitro and lack of expression in vivo. *Nature* 342:278-81.

11. Arcaro, A., C. Grégoire, N. Boucheron, S. Stotz, E. Palmer, B. Malissen, and I.F. Luescher. 2000. Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J. Immunol.* 165:2068-76.
12. Arcaro, A., C. Grégoire, T. R. Bakker, L. Baldi, M. Jordan, L. Goffin, N. Boucheron, F. Wurm, P.A. van der Merwe, B. Malissen and I. F. Luescher. 2001. CD8 β endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56^{lck} complexes. *J. Exp. Med.* 194:1485-95.
13. Emrich, F., U. Strittmatter, and K. Eichmann. 1986. Synergism in the activation of human CD8 T cells by cross-linking the T cell receptor complex with the CD8 differentiation antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:8298-302.
14. Garcia, K.C., C.A. Scott, A. Brunmark, F.R. Carbone, P.A. Peterson, I.A. Wilson, and L. Teyton. 1996. CD8 enhances formation of stable T-cell receptor/MHC class I molecule complexes. *Nature* 384:577-581.
15. Von Boehmer, H., P. Kisielov, H. Lishi, B. Scott, P. Borgulya, and H.S. Teh. 1989. The expression of CD4 and CD8 accessory molecules on mature T cells is not random but correlates with the specificity of the $\alpha\beta$ receptor for antigen. *Immunol. Rev.* 109:143-51.
16. Singer, A., R. Bosselut, and A. Bhandoola. 1999. Signals involved in CD4/CD8 lineage commitment: current concepts and potential mechanisms. *Semin. Immunol.* 11:237-81.
17. Schlienger, K., N. Craighead, K.P. Lee, B.L. Levine, and C.H. June. 2000. Efficient priming of protein antigen-specific human CD4⁽⁺⁾ T cells by monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96: 3490-98.
18. Cerdan, C., Y. Martin, M. Courcoul, C. Mawas, F. Birg, and D. Olive. 1995. CD28 costimulation regulates long-term expression of the three genes (alpha, beta, gamma) encoding the high affinity IL2 receptor. *Res. Immunol.* 146:164-68.
19. Greenfield, E.A., K.A. Nguyen, and V.K. Kuchroo. 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit. Rev. Immunol.* 18:389-418.
20. Mackey, M.F., R.J. Barth, and R.J. Noelle. 1998. The role of CD40/CD154 interactions in the priming, differentiation, and effector function of helper and cytotoxic T cells. *J. Leukoc. Biol.* 63:418-28.
21. Kuppers, R.C., and C.S. Henney. 1977. Studies on the mechanism of lymphocyte-mediated cytotoxicity. IX. Relationships between antigen recognition and lytic expression in killer T cells. *J. Immunol.* 118:71-76.

22. Griffiths, G.M.. 1995. The cell biology of CTL killing. *Curr. Opin. Immunol.* 7:343-48.
23. Squier, M.K.T., and J.J. Cohen. 1994. Cell mediated cytotoxic mechanisms. *Curr. Opin. Immunol.* 6:447-52.
24. Barry, M., J.A. Heibin, M.J. Pinkoski, S.F. Lee, R.W. Moyer, D.R. Green, and R.C. Bleackley. 2000. Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol. Cell Biol.* 20:3781-94.
25. Medana, I.M., A. Gallimore, A. Oxenius, M.M. Martinic, H. Wekerle, and H. Neumann. 2000. MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway.
26. Paulnock, D.M. 1992. Macrophage activation by T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 4:344-49.
27. Callan, M.F., C. Fazou, H. Yang, T. Rostron, K. Poon, C. Hatton, and A.J. McMichael. 2000. CD8⁽⁺⁾ T-cell selection, function, and death in the primary immuno response in vivo. *J. Clin. Invest.* 106:1251-61.
28. Hennecke, S. and P. Cosson. 1993. Role of transmembrane domains in assembly and intracellular transport of the CD8 molecule. *J. Biol. Chem.* 268:26607-612.
29. Devine, L., L. Kieffer, V. Aitken, and P. Kavathas. 2000. Human but not mouse CD8 β , can be expressed in the absence of CD8 α as a $\beta\beta$ Homodimer. *J. Immunol.* 164:833-38.
30. Wheeler, C.J., P. von Hoegen, and J.R. Parnes. 1992. An immunological role for the CD8 β -chain. *Nature* 357:247-49.
31. Irie, H.Y., M.S. Mong, A. Itano, M.E. Casey Crooks, D.R. Littman, S. J. Burakoff, and E. Robey. 1998. The cytoplasmic domain of CD8 β regulates lck kinase activation and CD8 T cell development. *J Immunol.* 161:183-91.
32. Kalinke, U., B. Arnold, and G.J. Hammerling. 1990. Strong xenogeneic HLA response in transgenic mice after introducing an $\alpha 3$ domain into HLA B27. *Nature* 348: 642-44.
33. Witte, T., R. Spoerl, and H.-C. Chang. 1999. The CD8 β -ectodomain contributes to the augmented coreceptor function of CD8 $\alpha\beta$ heterodimers relative to CD8 $\alpha\alpha$ homodimers. *Cell. Immunol.* 191: 90-96.

34. Kern, P., R.E., Hussey, R. Spoerl, E.L. Reinherz, and H.-C. Chang. 1999. Expression, Purification, and functional analysis of murine ectodomain fragments of CD8 $\alpha\alpha$ and CD8 $\alpha\beta$ Dimers. *J. Biol. Chem.* 274:27237-43.
35. Devine, L., S. Jiaren, M.R. Barr, and P.B. Kavathas. 1999. Orientation of the domains of CD8 $\alpha\beta$ relative to MHC class I. *J. Immunol.* 162:846-51.
36. Arcaro, A., C. Grégoire, T. R. Bakker, L. Baldi, M. Jordan, L. Goffin, N. Boucheron, F. Wurm, P. A. van der Merwe, and B. Malisson. 2001. CD8 β endows CD8 with efficient coreceptor function by coupling T cell receptor/CD3 to raft-associated CD8/p56^{lck} complexes. *J. Exp. Med.* 194:1485-95.
37. Wheeler, C.J., J.Y. Chen, T.A. Potter, and J.R. Parnes. 1998. Mechanisms of CD8 β -mediated T cell response enhancement: Interaction with MHC class I/ β_2 -microglobuline and functional coupling to TCR/CD3. *J. Immunol.* 160:4199-207.
38. Eichmann, K., A. Ehrfeld, I. Falk, H. Goebel, J. Kupsch, A. Reimann, A. Zgaga-Griesz, K.M. Saizawa, P. Yachelini, and K. Tomonari. 1991. Affinity enhancement and transmembrane signalling are associated with distinct epitops on the CD8 $\alpha\beta$ heterodimer. *J. Immunol.* 147:2075-81.
39. Itano, A., D. Cado, F.K. Chan, and R.E. Robey. 1994. A role for the cytoplasmic tail of the β -chain of CD8 in thymic selection. *Immunity* 1:287-90.
40. Trobridge, P.A., K.A. Forbush, and S.D. Levin. 2001. Positive and negative selection of thymocytes depends on lck interaction with the CD4 and CD8 coreceptors. *J. Immunol.* 166:809-18.
41. Ebert, P.J.R., J.F. Baker, and J.A. Punt. 2002. Immature CD4⁺CD8⁺ thymocytes do not polarize lipid rafts in response to TCR-mediated Signals. *J. Immunol.* 165:5435-42.
42. Doucey, M.-A., L. Goffin, D. Naehrer, O. Michielin, P. Baumgärnter, P. Guillaume, E. Palmer, and I. F. Luescher. 2002. CD3 δ establishes a functional link between the T cell receptor and CD8. *J. Bio. Chem.*, paper in press.
43. Vibhuti, P.D., C. Zhensheng, C. Browne, B. Alarcon, G. Fernandez-Miguel, J. Lafaille, A. de la Hera, S. Tonegawa, and D. J. Kappes. 1997. CD3 δ deficiency arrests development of the $\alpha\beta$ but not the $\gamma\delta$ T cell lineage. *EMBO* 16:1360-70.
44. Naehrer, D., I.F. Luescher, and E. Palmer. 2002. A role for the α -chain connecting peptide motif in mediating TCR-CD8 cooperation. *J. Immunol.* 169:2964-70.

45. Littman, D. R., Y. Thomas, P.J. Maddon, L. Chess, and R. Axel. 1985. The isolation and sequence of the gene encoding T8: a molecule defining functional classes of T lymphocytes. *Cell* 40: 237-246.
46. Nakauchi, H., G.P. Nolan, C. Hsu, H.S. Huang, P. Kavathas, and L.A. Herzenberg. 1982. Molecular cloning of Lyt-2, a membrane glycoprotein marking a subset of mouse T lymphocytes: molecular homology to its human counterpart, Leu-2/T8, and to immunoglobulin variable regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:5126-130.
47. Pecoraro M.R., M. Shimojima, K. Maeda, Y. Inoshima, Y. Kawaguchi, C. Kai, and T. Mikami. 1996. Molecular cloning of the feline CD8beta-chain. *J. Immunol.* 1:86-88.
48. Arcaro A., C. Grégoire, N. Boucheron, S. Stotz, E. Palmer, B. Malissen, and I.F. Luescher. 2000. Essential role of CD8 palmitoylation in CD8 coreceptor function. *J. Immunol.* 165: 2068-2076.
49. Norment, A.M., and D.R. Littman. 1988. A second subunit of CD8 is expressed in human T cells. *EMBO* 7:3433-39.
50. Cole, D.J., D.P. Weil, J. Shilyansky, M. Custer, Y. Kawakami, S.A. Rosenberg, and M.I. Nishimura. 1995. Characterization of the functional specificity of a cloned T-cell-receptor heterodimer recognizing the MART-1 melanoma antigen. *Cancer Res.* 55:748-52.
51. Mulligan, S.P., L.P. Dao, S.E. Francis, M.E. Thomas, J. Gibson, M.F. Cole-Sinclair, and M. Wolf. 1998. B-cell chronic lymphocytic leukaemia with CD8 expression reprot of 10 cases and immunochemical analysis of the CD8 antigen. *Brit. J. Haematol.* 103:157-62.
52. Uhrberg M., N.M. Valiante, B.P. Shum, H.G. Shilling, K. Lienert-Weidenbach, B. Corliss, D. Tyan, L.L. Lanier, and P. Parham. 1997. Human Diversity in Killer cell inhibitory receptor genes. *Immunity* 7:753-763.
53. McMahon, C.W., and D.H. Raulet. 2001. Expression and function of NK-receptors in CD8⁺ T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 13:465-470.
54. Buslepp, J., R. Zhao, D. Donnini, D. Loftus, M. Saad, E. Apella, and E.J. Collins. 2001. T cell activity correlates with oligomeric Peptid/MHC Binding on T cell surface. *J. Biol. Chem.* 276:47320-28.
55. Hausmann, S., W.E. Biddison, K.J. Smith, Y.-H. Ding, D.N. Garboczi, U. Utz, D.C. Wiley, and K.W. Wucherpfennig. 1999. Peptide recognition by two HLA-A2/

- TAX₁₁₋₁₉-specific T cell clones in relationship to their MHC/peptide/TCR crystal structures. *J. Immunol.* 162:5389-5397.
56. Utz, U., D. Banks, S. Jacobson, and W.E. Biddison. 1996. Analysis of the T-cell-receptor repertoire of Human T-cell Leukemia Virus type 1 (HTLV-1) Tax-specific CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease: evidence for oligoclonal expansion. *J. Virol.* 70:843-851.
57. Lanier, L.L. 1998. NK cell receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 16:359-93.
58. Renard, V., A. Cambiaggi, F. Vely, M. Blery, L. Olcese, S. Olivero, M. Bouchet, and E. Vivier. 1997. Transduction of cytotoxic signals in natural killer cells: a general model of fine tuning between activatory and inhibitory pathways in lymphocytes. *Immunol. Rev.* 155:205-21.
59. Knapp, W., B. Dörken, W.R. Gilks, E.P. Rieber, R.E. Schmidt, H. Stein, and A.E.G.Kr. von den Borne. 1989. T8 Cluster report: CD8 (Moebius, U.). Leukocyte Typing IV, Oxford University Press 1989.
60. Janeway, C.A., P. Travers., M. Walport, and M. Shlomchik. 2001. Immunobiology. Garland Publishing, Taylor & Francis Group. Churchill Livingstone, Edingburgh, GB.
61. Wang, B., R. Maile, R. Greenwood, E.J. Collins, and J. A. Frelinger. 2000. Naive CD8⁺ T cells do not require costimulation for proliferation and differentiation into cytotoxic effector cells. *J. Immunol.* 164:1216-22.
62. Maeurer, M.J., H.-W. Chan, J. Karbach, R.D. Salter, A. Knuth, M.T. Lotze, and W.J. Storkus. 1996. Amino acid substitutions at position 97 in HLA-A2 segregate cytotoxicity from cytokine release in MART-1/Melan-A peptide AAGIGILTV-specific cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 26:2613-23.
63. Cassian, Y., P.A. Savage, P.P. Lee, M. M. Davis, and P.D. Greenberg. 1999. Isolation of high avidity melanoma-reactive CTL from heterogeneous populations using peptide-MHC tetramers. *J. Immunol.* 162:2227-34.
64. Hausmann, S., W.E. Biddison, K.J. Smith, Y.-H. Ding, D.N. Garboczi, U. Utz, D. C. Wiley, and K.W. Wucherpfennig. 1999. Peptide recognition by two HLA-A/Tax₁₁₋₁₉-specific T cell clones in relationship to their MHC/Peptide/TCR crystal structures. *J. Immunol.* 162:5389-97.
65. Wong, J.S., X. Wang, N. Carvou, L. Nie, T. Witte, and H.-C. Chang. 2002. Replacement of the CD8 α stalk region with that of CD8 β enhances the efficiency of the CD8 $\alpha\alpha$ coreceptor function. *Paper submitted.*

66. Sloan-Lancaster, J., B.D. Evavold, and P.M. Allen. 1993. Induction of T-cell anergy by altered T-cell-receptor ligand on live antigen-presenting cells. *Nature* 363:156-9.
67. Terry, L.A., J.P. DiSanto, T.N. Small, N. Flomenberg. 1990. Differential expression of the human CD8 alpha and CD8 beta chains. *Tissue Antigens* 35:82-91.

8 Lebenslauf

Name: Kerstin C. Potthast
Geburtsdatum: 30. Oktober 1967
Geburtsort: Dortmund, Nordrhein-Westfalen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1973-1977 Grundsule Hochdorf (Ludwigsburg) und Korntal (BW)
1977-1979 Realschule Korntal (BW)
1979-1987 Gymnasium Korntal, Abitur: Juli 1987

Berufsausbildung:

1987-1989 Ausbildung zur Zytologie-Assistentin
1. Jahr: Zytologische Schule des Klinikums Mannheim
2. Jahr: Praktikumsjahr in der gyn. Gemeinschaftspraxis
DRS. med. Schauder und Hofmiller, Bad Waldsee

Berufstätigkeit:

Okt. 1989-Sept. 1993 Anstellung als Zytologie-Assistentin in der Pathologie des
Katharinenhospitals in Stuttgart

Hochschulausbildung:

Okt. 1993-April 1998 Studium der Biochemie an der Universität Hannover,
April 1998 mündliche Diplomprüfung
Mai 1998-Okt. 1998 Diplomarbeit in der Forschungsgruppe von Fr. Dr. rer. nat.
Rita Gerardy-Schahn
Thema: Induktion und Charakterisierung
monoklonaler Antikörper gerichtet gegen
eukaryontische Polysialyltransferasen.

Promotion:

seit 15.2.1999 Doktorarbeit in der Abteilung der Klinischen
Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover
unter Prof. Dr. med. R.E. Schmidt in der Arbeitsgruppe
von Dr. med. Torsten Witte.
Thema: Interaktion des humanen CD8 mit MHC
Klasse I und TCR/CD3
Apr. -Sept. 02 Unterstützung durch Prof. Dr. R. Huber, MPI für
Biochemie, Abt. Strukturforschung, München.

Originalpublikationen:

1. K.C. Potthast, R.J. Scheibe, J.D. Meissner, S. Werwitzke, R.E. Schmidt, T. Witte.
The CD8 β transmembraneous and cytoplasmic domain inhibits expression of CD8 $\beta\beta$ on
T cells. Manuskript in Vorbereitung.

Tagungsbeiträge:

- September 2001 32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in
Dresden (Poster)
K. Potthast, R.E. Schmidt, T. Witte:
MART-1 peptide stimulates Jurkat T cells independent of TCR
expression. *Immunobiology* 204: 93-94.
- März 2002 18. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie
in Halle
K.C. Potthast, R.E. Schmidt, T. Witte:
The CD8 β -cytoplasmic domain inhibits expression of CD8 $\beta\beta$ on T
cells.
- September 2002 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie in
Marburg (Poster)
K.C. Potthast, R.J. Scheibe, J.D. Meissner, R.E. Schmidt, T. Witte:
The CD8 β transmembrane and cytoplasmic domain inhibits
CD8 $\beta\beta$ -expression on T cells. *Immunobiology* 206: 86-87

9 Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt, dem Institutsleiter, für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können und seiner immerwährende Unterstützung bei der Teilnahme an Kongressen und den fortlaufenden Arbeitsverträgen.

Herrn Dr. Torsten Witte, für seine wissenschaftliche Betreuung, die vielen hilfreichen Tipps und Ideen zur Problemlösung, die wissenschaftlichen Diskussionen und „Beratungsstunden“ am Mikroskop, für die hilfreichen Bemerkungen beim Verfassen dieser Arbeit, seinen Optimismus und Geduld in stürmischen Zeiten.

Herrn Prof. Dr. Walter Müller, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, vor allem in schwierigen Phasen und seinen Einsatz für diese Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Resch, für die Übernahme des Koreferats.

Frau Dr. Renate Scheibe, für die Durchführung der transienten Transfektionen der COS-7-Zellen und **Herrn Dr. Joachim Meissner**, für die Northern-Blot-Analyse der Jurkat-Transfektanten fürs Paper.

Herrn Dr. H. Heiken, für die finanzielle Unterstützung.

Prof. Dr. R. Huber, für die finanzielle Unterstützung.

für die Bereitstellung von Zelllinien, cDNAs und Peptiden:

Dr. M. Nishimura, NIH, Bethesda, USA für die Zelllinie HSA5 und das MART-1-Peptid.

Dr. J. Dietrich, Kopenhagen, DK für den Jurkat-Klon 18B3.

Prof. Dr. K. Wonigeit, MHH, für die IL-2-abhängige Linie G2.

Dr. D. Littman, Boston, USA, für die humanen CD8-cDNAs.

Dr. U. Utz, Montréal, Canada, für die cDNAs des TAX-TCRs.

Dr. R. Frank, GBF, Braunschweig, für die Synthese der 80 Mutanten des TAX-Peptids.

allen Mitarbeitern der Abteilung der Klinischen Immunologie, die auf irgendeine Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben: Andreas, Anja, Anna, Bettina, David, Esther, Gabi, Hendrick, Jörg, Julia, Karsten, Margot und Marion (für die vier zusätzlichen Arme und Beine...), Martin, Nelli, Olga, Roland (für den einen oder anderen Antikörper plus Beratung und bei sämtlichen Schwierigkeiten am PC), Sabine (für die „unendlichen“ Mycoplasmentests), Silke, Sonja, Tanja (für den Beistand bei der RNA-Isolierung) und Torsten. Ihnen allen Danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre, die Hilfsbereitschaft bei den alltäglichen Problemen und die anregenden fachlichen und nicht-fachlichen Diskussionen.

meinen Eltern, für die finanzielle und natürlich ideelle, nicht an Uhrzeiten gebundene, liebevolle Unterstützung.

meinen Schwestern, ihre finanzielle Hilfe und für die „geliehenen Ohren“ bei Frust und Freude dieser Arbeit.

meinen Freunden, für die ideelle Unterstützung, die finanzielle Unterstützung und Hilfestellungen die praktischen Dinge des Lebens betreffend.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig durchgeführt und verfasst habe. Es wurden keine anderen außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet.

Hannover, den 27.11.2002