

**Therapeutische Immunmodulation der Rheumatoiden Arthritis
mittels rekombinanter MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe:
Molekulare Mechanismen der Induktion regulatorischer
T-Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften



vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe - Universität
in Frankfurt am Main

von Sylvia Cienciala
aus Nidderau

Frankfurt 2019
(D 30)

vom Fachbereich Biowissenschaften der
Johann Wolfgang Goethe - Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. S. Klimpel

Erster Gutachter: Prof. Dr. J. Soppa

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Burkhardt

Datum der Disputation: 18.06.2020

Phantasie haben heißt nicht, sich etwas auszudenken,
es heißt, sich aus den Dingen etwas zu machen.

Thomas Mann

Dt. Schriftsteller und Nobelpreisträger für Literatur 1929

INHALTSVERZEICHNIS

I Inhaltsverzeichnis	I
II Zusammenfassung	III
1 Einleitung	1
1.1 Charakteristika der angeborenen Immunität	1
1.2 Mechanismen der adaptiven Immunität	2
1.3 Immunologische Toleranz	4
1.4 Lymphozytenreifung und zentrale Toleranzinduktion im Thymus	4
1.5 Periphere Toleranzmechanismen	5
1.6 Regulatorische T-Zellen	6
1.7 Die Rheumatoide Arthritis: Paradigma einer immunmedierten Inflammationserkrankung	8
1.8 Die Krankheitsentstehung: Eine immunologische Fehlerkennung des modifizierten „Selbst“	9
1.9 Zielstrukturen der aktuellen Therapien	13
1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit	16
2 Material & Methoden	18
2.1 Material	18
2.1.1 Verwendete Zellen	32
2.2 Methoden	34
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	34
2.2.2 Zellbiologische Methoden	42
2.2.3 Biochemische Methoden	52
3 Ergebnisse	54
3.1 Studien an murinen T-Zell-Hybridomen	54
3.1.1 Nachweis des CD3/TCR-Komplexes	54
3.1.2 Nachweis der T-Zell-Rezeptorspezifität der murinen T-Zell-Hybridome mittels Tetramerbindung	55
3.1.3 Aktivierung der murinen T-Zell-Hybridome nach Stimulation mit MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen	56
3.1.4 Nachweis der Antigenpräsentation der transgenen Makrophagenzelllinie BL25 und Hemmung durch Hydroxychloroquin (HCQ)	59
3.1.5 Nachweis der Antigenpräsentation mit humanen APCs und T-Zell-Hybridomen	61
3.2 Detektion antigenspezifischer humaner T-Zellen	63
3.2.1 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten und gesunden Spendern (HLA-DRB1*04:01) mittels Tetramerbindung	63
3.2.2 Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) mittels funktioneller Studien der T-Zellaktivierung	65

3.3	Amplifikation des humanen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors.....	66
3.3.1	Strategien zur Isolierung CII-spezifischer T-Zellen für die Einzelzellanalyse der variablen Region des T-Zell-Rezeptors	66
3.3.2	Sequenzanalysen der amplifizierten antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren	67
3.4	Jurkat-Zelllinie als humanes zelluläres Modellsystem	70
3.4.1	Extrazelluläre Charakterisierung der Jurkat-WT Zelllinie und der Jurkat-76 Zelllinie	70
3.4.2	Nachweis des transgenen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors	72
3.4.3	Nachweis der T-Zell-Rezeptorspezifität der Positivkontrollen mittels Tetramerbindung	73
3.4.4	Sequenzanalysen aller lentiviral transduzierter Konstrukte	74
3.4.5	Nachweis des CD3/TCR-Komplexes und der T-Zell-Rezeptorspezifität zweier humaner T-Zell-Rezeptorkonstrukte.....	78
3.4.6	Nachweis der Aktivierbarkeit der humanen gal264CII-spezifischen T-Zellen mittels MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen	80
3.4.7	Vergleich zwischen antigenspezifischen humanen T-Zell-Rezeptorsequenzen und der murinen T-Zell-Rezeptorsequenz	81
3.5	Phänotypische Charakterisierung der T-Zellimmunantwort	86
3.5.1	Phänotypische Charakterisierung humaner T-Helferzellen und Analyse des Zytokinprofils von PBMCs nach Differenzierung mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen	86
3.5.2	Nachweis von IL-2 und IL-10 nach Aktivierung von PBMCs, APCs und T-Helferzellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01)	89
3.5.3	Nachweis von Zytokinen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren nach Aktivierung von PBMCs, APCs und T-Helferzellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01)	91
3.5.4	Genexpressionsanalysen von antigenspezifischen T-Helferzellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) nach MHC-Klasse-II/Peptidkomplexstimulation	91
4	Diskussion.....	93
4.1	T-Zell-Hybridome als Modell zur Analyse der molekularen arthritogenen Mechanismen	93
4.2	Antigenabhängige Präsentation oder direkte T-Zell-Rezeptorinteraktion?	95
4.3	Nachweis CII-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01).....	97
4.4	Präferentielle V-Genverwendung in RA-Patienten	99
4.5	Jurkat-Zellen als humanes zelluläres System zur transgenen Expression von antigenspezifischen T-Zell-Rezeptorsequenzen	103
4.6	Phänotypische Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zellen	104
4.7	Ausblick	108
III	Literaturverzeichnis	109
IV	Abkürzungsverzeichnis.....	117
V	Danksagung.....	118
VI	Eidesstattliche Erklärung	119
VII	Lebenslauf	120

ZUSAMMENFASSUNG

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist die häufigste chronisch-entzündliche Gelenkerkrankung, die inadäquat therapiert zu Gelenkzerstörung und resultierender Invalidität führen kann. Genetische Risikofaktoren sowie Lebensstileinflüsse führen in präklinischen Erkrankungsstadien zu posttranslationalen Modifikationen körpereigener Strukturen, die die immunologische Selbst-Toleranz brechen und zur immunologischen Fehlerkennung von Gelenkstrukturen durch B- und T-Lymphozyten führen.

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war die Aufklärung von Wirkmechanismen eines für die immunmodulatorische Therapie der RA entwickelten innovativen Ansatzes zur Rekonstitution der immunologischen Autotoleranz mittels rekombinant hergestellter MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe durch Induktion regulatorischer T-Zellen. Im Mittelpunkt der *in vitro* Studien steht hierbei eine über Speziesbarrieren hinweg evolutionär konservierte, von T-Lymphozyten auf dem Kollagen Typ-II (CII) erkannte, durch Glykosylierung posttranslational modifizierte, autoantigene Strukturdeterminante. Dieses T-Zellepitop (CII-Peptid) stellt sowohl in der humanen RA als auch in der murinen Experimentalerkrankung der CIA (*Collagen induced arthritis*) eine immunodominante Struktur der arthritogenen Autoimmunität dar. Für die modellhaften *in vitro* Studien zur Aufklärung der Wirkweise rekombinanter MHC-II/Peptidkomplexe auf humane T-Zellen, standen über eine Kooperation mit Prof. R. Holmdahl (Karolinska Institut, Stockholm) T-Zell-Hybridome mit transgener Expression des humanen MHC-II/Moleküls DR4 (DRA1/DRB1*04:01) mit unterschiedlicher Epitopspezifität (T-Zell-Hybridom 3H8, Spezifität: unmodifiziertes CII-Peptid und mDR1.1, Spezifität: galaktosyliertes CII-Peptid an Position K264) zur Verfügung. Das aus einer α - und β -Kette bestehende MHC-II/Molekül DR4 ist durch das DRA1-Gen und allelische Varianten des DRB1-Locus (stärkste RA-Assoziation: DRB1*04:01) kodiert und bildet die Form seiner Bindungstasche für die Präsentation antigenener Peptide an den T-Zell-Rezeptor (TCR) auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen (APC). In den Studien zur Stimulation der Hybridomzellen konnte gezeigt werden, dass die T-Zellstimulation und die daraus resultierende Zytokinausschüttung (IL-2 und IL-10) kontextabhängig ist. Je nach Stimulationsart, ob festphasengebunden- oder löslich, erfolgt die Stimulusperzeption über differente TCR-Anordnungen in Mikrodomänen der Zelloberfläche und resultiert in entsprechend modulierten Signalstärken. So führt die Zellaktivierung über die festphasengebundene Stimulation mittels MHC-II/Peptidkomplexen zur Ausbildung einer hohen TCR-Dichte, die über hohe Signalstärken zu einer spezifischen IL-2 Sekretion als Antwort führen. Die Stimulation mit monomeren DR4/CII-Peptidkomplexen in gelöster Form adressiert dagegen die auf der gesamten Zelloberfläche verteilten T-Zell-Rezeptoren, was in einer geringeren Aktivierungs-

dichte und einer attenuierten Gesamtsignalstärke sowie der Sekretion des immunsuppressiv wirkenden IL-10 resultiert. Für den angestrebten pharmakologischen Einsatz der DR4/CII-Peptidkomplexe ist bedeutsam, dass die aktivierende TCR-Bindung der gelösten monomeren Komplexe nur partiell agonistisch wirkt und die Induktion immunregulatorischer IL-10 Zytokinantworten begünstigt. Neben der direkten T-Zellinteraktion konnte auch die Möglichkeit einer indirekten Aktivierung unter Vermittlung von APCs nach Endozytose der DR4/CII-Peptidkomplexe, ihrer lysosomalen Prozessierung und Präsentation auf endogenen neusynthetisierten DR4/Molekülen experimentell u.a. unter Verwendung der HLA-DR4-exprimierenden murinen Makrophagenlinie BL25 als APC-Modell belegt werden. Im Hinblick auf die intendierte Weiterentwicklung zu therapeutischen Anwendungen der MHC-II/CII-Peptidkomplexe unter Gesichtspunkten der Arzneimittelsicherheit ist wichtig, dass der aufgezeigte indirekte Weg der T-Zellaktivierung nach vorausgehender Prozessierung durch APCs ineffizient ist. Dieser Weg erfordert nämlich sehr hohe Konzentrationen an MHC-II/Peptidkomplexen, welche weit oberhalb der in tierexperimentellen Studien unter therapeutisch wirksamen Dosierungen erreichten Gewebespiegel liegen.

Darüber hinaus ist es uns gelungen, methodisch den Nachweis CII-spezifischer T-Zellen, die im Gesamtrepertoire der CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) nur in sehr niedriger Frequenz vorkommen, mittels T-Zellaktivierung und spezifischer Tetramerbindung als phänotypischen Marker zu verbessern. Für die Tetramerbindung wurden Monomere mit dem galaktosylierten CII-Peptid (CIIgal259-273) beladenen DR4/Moleküle über einen aminoterminal konjugierten Biotinrest mittels eines Fluorochrom-gekoppelten Streptavidins tetramerisiert. Unter Einsatz dieser Methoden ist es gelungen, aus den durchflusszytometrisch sortierten CII-spezifischen Zellen, mittels Nukleotidsequenzierung, ihr TCR-Repertoire zu analysieren und hinsichtlich präferentieller V-Genverwendung zu charakterisieren. Für zwei humane DR4-restringiert gal264CII-spezifische T-Zell-Rezeptoren aus RA-Patienten konnte die Funktionalität und Epitopspezifität durch rekombinante Expression demonstriert werden. Auf Basis der gemeinsamen Vorarbeiten mit Prof. Rikard Holmdahl im murinen CIA-Modell und den bekannten Daten zur Induktion regulatorischer T-Zellen (Tr1-Zellen) durch MHC-II/CII-Peptidkomplexe, wurden *in vitro* Differenzierungs-experimente an humanen PBMCs DR4-positiver RA-Patienten unter dem Einfluss von DR4/gal264CII-Peptidkomplexen durchgeführt. Die Studien belegen, dass die Komplexe mit den antigenspezifischen T-Zellen interagieren und zur Induktion von Markern eines Tr1-Phänotyps, darunter PD-1 und IL-10 führen. Zukünftige Kristallstrukturanalysen eines TCR/DR4/gal264CII-Komplexes sollen dem verbesserten molekularen Verständnis der TCR-Erkennung von CII als Autoantigen insbesondere bzgl. des flexibleren Galaktoserestes für Arthritogenität und Tolerogenität dienen. Fernziel ist die Entwicklung einer wirksamen und sicheren immunmodulatorischen Therapie der RA durch Induktion regulatorischer T-Zellen.

1 EINLEITUNG

Das Immunsystem dient der Protektion des Wirtsorganismus gegen die Bedrohungen seiner Integrität durch exogene oder endogene pathogene Agentien unter Einsatz eines großen Repertoires an löslichen Faktoren und zellulärer Elemente. Dieses bildet in seiner Gesamtheit ein komplexes, interaktiv autoreguliertes und hoch adaptionsfähiges Netzwerk. Um seiner evolutionsbiologischen Funktion gerecht zu werden und das Überleben der Art in einer sich permanent wandelnden Erregerwelt zu sichern, hat das Immunsystem Mechanismen entwickelt, um eine große Diversität mikrobieller Erreger wie Viren, Bakterien, Parasiten oder Würmer zu erkennen und dabei ihre Strukturen zuverlässig von denen des wirtseigenen gesunden Gewebes diskriminieren zu können. Es lassen sich aufgrund funktioneller und struktureller Unterschiede prinzipiell zwei kooperativ interagierende Subsysteme unterscheiden: das evolutionär ältere, angeborene (innate) und das sich mit der Wirbeltierentwicklung auf der Stufe der Gnathostomata vor 500 Millionen Jahren herausgebildete adaptive Immunsystem (Hirano et al. 2011). Beide Subsysteme verwenden humorale und zellvermittelte Immunmechanismen, um ihre Funktionen der protektiven Immunität unter Wahrung der immunologischen Autotoleranz zu sichern.

1.1 Charakteristika der angeborenen Immunität

Als angeborene Immunität werden unspezifische Abwehrmechanismen gegen meist exogene, aber auch wirtseigene Zielstrukturen bezeichnet, welche unmittelbar oder innerhalb weniger Stunden nach ihrer Perzeption als Gefahrensignale im Körper wirksam werden. Diese Mechanismen umfassen neben physikalischen Barrieren, wie z.B. die Haut, Protein-, Lipid- oder Kohlenhydratkomponenten im Blut, auch Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Diese Effektorzellen exprimieren eine limitierte Zahl invariabler, genetisch determinierter zellspezifischer Rezeptoren. Die Rezeptoren der natürlichen Immunität, die sog. „pathogenen Erkennungs-Rezeptoren (*pathogen recognition receptors, PRR*)“ können nur ein limitiertes Spektrum von Strukturen pathogener Mikroorganismen „Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen associated molecular patterns, PAMPs*)“ oder im Rahmen von Gewebetraumata geschädigter Selbststrukturen „Gefahren assoziierte molekulare Muster (*danger associated molecular patterns, DAMPS*)“ erkennen (Janeway 1989). Diese pathogenen Erkennungs-Rezeptoren vermitteln aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems (wie z.B. dendritischen Zellen, Makrophagen, Mastzellen, Neutrophile,

Basophile und Eosinophile) Zytokine zu produzieren oder führen über direkte Interaktionen mit anderen Zellen zur Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

1.2 Mechanismen der adaptiven Immunität

Die adaptive Immunität ist die Gesamtheit der während der Lebensspanne eines anpassungsfähigen Organismus erworbenen Fähigkeiten zu protektiven Immunantworten unter Erhaltung der Autotoleranz. Es gibt vier Hauptmerkmale der adaptiven Immunität: Antigen-spezifität, Diversität, immunologisches Gedächtnis und die Fähigkeit zur Diskrimination zwischen Selbst und Nicht-Selbst.

An adaptiven Immunantworten sind neben den Lymphozyten (B-Zellen und T-Zellen) als Hauptakteure auch antigen-präsentierende Zellen (*Antigen-presenting cells*, APCs; wie Makrophagen, B-Zellen und dendritische Zellen) beteiligt. Jeder naive Lymphozyt (d.h. ohne Antigenkontakt), der nach seiner Ausreifung aus Vorläuferzellen im Knochenmark und nachfolgend im Thymus in den Blutkreislauf gelangt (ca. 4×10^{11} T-Zellen, Jenkins et al. 2010), trägt Antigenrezeptoren mit einer singulären Spezifität. Ein einzigartiger genetischer Mechanismus, der von Tonegawa zunächst am Paradigma des B-Zell-Rezeptors gezeigt wurde (Tonegawa et al. 1983), analog aber auch Gültigkeit für die α - und β -Kette des heterodimeren T-Zell-Rezeptors (*T cell receptor*, TCR) besitzt. Es wird geschätzt, dass 10^{15} verschiedene T-Zell-Rezeptorsequenzen im menschlichen Körper existieren (Nikolich-Zugich, Slifka und Messaoudi 2004; Murugan et al. 2012; Zarnitsyna et al. 2013). Diese T-Zell-Rezeptoren ermöglichen es, die enorme Diversität von Millionen verschiedener Varianten der Gene zu erzeugen, die die Immunrezeptormoleküle für die Gesamtheit aller T-Zellen kodieren. Die Kodierung dieser Rezeptoren erfolgt durch sequentiell in der Keimbahn angeordnete Gensegmente, aus deren variabler Rearrangierung erst während der Lymphozytenreifung die Diversität der TCR-kodierenden Genabschnitte generiert wird. So wird durch somatische Rekombination aus den Genloci V, D (nur für die β -Kette), J und C, die jeweils eine unterschiedlich große allelische Varianz aufweisen ($V\alpha = 47$, $J\alpha = 50$, $C = 1$; $V\beta = 48$, $J\beta = 13$, $D\beta = 2$, $C = 2$), baukastenartig die Gensequenz, die den für die jeweilige T-Zelle charakteristischen TCR kodiert, zusammengesetzt. Für die Antigenerkennung sind distinkte Abschnitte der α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors, die sog. CDR-Regionen (*Complementarity determining region*; CDR1, 2 und 3), mit funktioneller Bedeutung für die spezifischen Interaktionen mit den MHC/Molekülen (*Major histocompatibility complex*, MHC) und den antigenen Peptiden in ihrer Bindungstasche von großer Bedeutung. Diese Regionen weisen über den Mechanismus ihrer Kodierung durch rearrangierte multiallelische Gensegmente eine besonders hohe Diversität auf (Hughes et al. 2003). Somit ist gewährleistet, dass ein einzelner Lymphozyt-Rezeptor nur eine Spezifität trägt. Die Gesamtheit der Millionen von Lymphozyten

mit einer entsprechenden riesigen Vielfalt distinkter Antigenrezeptorspezifitäten repräsentiert das Lymphozyten-Rezeptorrepertoire des Individuums.

Während des Lebens durchlaufen diese Lymphozyten einen Prozess, der der natürlichen Selektion ähnelt. Nur die Lymphozyten, die auf ein Antigen treffen, für die ihr jeweiliger Rezeptor eine ausreichende Bindungsaffinität aufweist, werden unter dem Einfluss zusätzlicher kostimulatorischer Signale aktiviert, um sich zu vermehren und in Effektorzellen zu differenzieren. Die TCR-vermittelte Antigenerkennung führt zur Zellaktivierung und Zellproliferation, aus der eine große Zahl identischer Nachkommen hervorgeht, die als Klon bezeichnet werden und einen klonotypischen TCR tragen. Aus dem expandierten Klon können in Abhängigkeit der initialen Antigenaktivierung über Ligandeninteraktionen durch Zell-Zell-Kontakt und über das lokale Zytokinmilieu zusätzlich bereitgestellte Stimuli, Effektor T-Lymphozyten unterschiedlichen Phänotyps wie z.B. CD4⁺ Th1-, Th2-, Th17-Zellen oder regulatorische T-Zellen entstehen (Janeway 1989). Auf analoge Weise differenzieren aus aktivierten B-Zellen Plasmazellen, die nun klonotypische Antikörper mit einer Spezifität sezernieren, die mit der des Membranrezeptors auf der B-Zelle identisch ist, der initial die Aktivierung und klonale Expansion ausgelöst hat. Dieses Prinzip der Antigen-induzierten klonalen Lymphozyten Expansion wurde erstmalig von Burnet in seiner klonalen Selektionstheorie (Burnet 1959), die einen Meilenstein auf dem Weg zum Verständnis der adaptiven Immunität darstellt, formuliert. Die Immunglobuline als extrazelluläre Strukturkomponenten der Rezeptoren von B-Zellen und der von ihren Effektorzellen, den Plasmazellen, gebildeten Antikörper haben die Fähigkeit, natürliche konformative (Ober)flächenstrukturen zu erkennen. T-Zellen binden dagegen über ihre Rezeptoren fragmentierte (d.h. nicht in ihrer natürlichen Konformation zugängliche) Antigenstrukturen im Rahmen adaptiver Immunantworten wie beispielsweise gegen infektiöse Agentien. Die Antigenerkennung durch den TCR erfolgt auf der Oberfläche interagierender Zellen in der Bindungstasche spezialisierter, der Antigenpräsentation dienender Moleküle, die von polymorphen Genen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*Major histocompatibility complex*, MHC) kodiert werden. Die zytotoxischen, den Marker CD8 exprimierenden T-Lymphozyten erkennen antigene Strukturen im Kontext von MHC-Klasse-I/Molekülen, die von allen kernhaltigen körpereigenen Zellen exprimiert werden. Die auf MHC-I/Molekülen präsentierten T-Zelldeterminanten entstammen in der Regel der zelleigenen Proteinsynthesemaschinerie der Wirtszelle, die im Rahmen von Virusinfektionen auch zur Erregerreplikation benutzt wird und dann Fremdantigene enthält. Im Unterschied hierzu erkennen T-Helferzellen (*T helper cells*, Th, CD4⁺ Lymphozyten) antigene Strukturen auf APCs im Kontext von MHC-Klasse-II/Molekülen, die in den APCs bereits in lysosomalen Kompartimenten enzymatisch fragmentiert wurden, wie z.B. von bakteriellen Erregern (Janeway 1989).

1.3 Immunologische Toleranz

Als immunologische Toleranz wird der Zustand einer spezifischen immunologischen Nichtreaktivität gegen eine distinkte antigene Determinante infolge einer vorausgehenden Exposition zum gleichen Antigen bezeichnet. Der physiologisch bedeutsamste Zustand immunologischer Nichtreaktivität betrifft die Selbsttoleranz des Immunsystems, welches die Fähigkeit hat, die antigenen Strukturen körpereigener Genprodukte als nicht bedrohlich zu erkennen, jedoch auf exogene Antigene uneingeschränkt mit protektiven Immunreaktionen antworten kann. Das Gleichgewicht zwischen immunologischer Abwehr und Selbsttoleranz ist kritisch für die physiologische Funktion des Immunsystems, sodass den Störungen der Mechanismen der Autotoleranz eine große Bedeutung in der Pathogenese von z.B. immunmedierten Inflammationserkrankungen zukommt.

Für die Etablierung immunologischer Selbsttoleranz ist die klonale Deletion als Eliminierung unreifer Lymphozyten mit hoher TCR-Affinität für Selbstantigene ein Hauptmechanismus der Toleranzinduktion im Thymus. Ein alternativer Mechanismus ist die funktionelle Suppression autoreaktiver Lymphozyten, die der thymischen Elimination, in den sekundären lymphatischen Organen bzw. peripheren Geweben entgangen sind. Diese beiden Prozesse werden als zentrale und periphere Toleranz bezeichnet (Janeway 1989).

1.4 Lymphozytenreifung und zentrale Toleranzinduktion im Thymus

Die aus dem Knochenmark in den Thymus eingewanderten zunächst sowohl CD4 als auch CD8 exprimierenden Prothymozyten treten nach Rearrangierung ihrer TCR-Gene im Kortex in Kontakt zum kortikalen Thymusepithel (cTEC), das auf seiner Zelloberfläche mit autologen Peptiden beladene MHC/Moleküle präsentiert. Für den Fall, dass die über den TCR-vermittelte Wechselwirkung mit dem MHC/Peptidkomplex zu einem überschwelligem Aktivierungssignal führt, erfährt der entsprechende Prothymozyt einen Überlebensstimulus, der ihn vor dem apoptotischen Zelltod bewahrt (Positivselektion). Die entsprechend positiv selektierten Lymphozyten differenzieren dann zu einfach positiven CD4- oder CD8-Zellen und gelangen in die Medulla des Thymus, wo ihnen von medullären Thymuszellen (mTEC) bzw. dendritischen Zellen autoantigene Determinanten im MHC-I bzw. MHC-II/Kontext präsentiert werden. Eine TCR-Selbstpeptid-MHC/Ligation mit hoher Avidität führt dann zur terminalen Elimination dieser potenziell bedrohenden autoreaktiven T-Lymphozyten aus dem T-Zellrepertoire durch Induktion des apoptotischen Zelltodes (Negativselektion, Janeway 1989). Im Prozess der Thymozytenreifung wird darüber hinaus auch eine Subpopulation von T-Lymphozyten mit TCR-Spezifitäten für Autoantigene positiv selektiert, die unter dem Einfluss distinkter Signale zu natürlichen regulatorischen T-Zellen (*natural* nTregs bzw. *thymic-derived* tTregs) ausdifferenzieren. Sie exprimieren als zellulären Marker den Transkriptionsfaktor Forkhead-

Box-P3 (Foxp3) und können nach ihrer Auswanderung in die sekundären lymphatischen Organe sowohl über direkte als auch über indirekte Wirkungen die angeborene als auch adaptive Immunreaktion im Rahmen peripherer Mechanismen der Immuntoleranz supprimieren (Mills 2004).

1.5 Periphere Toleranzmechanismen

Nicht alle potenziell autoreaktiven T-Zellen werden während ihrer Reifung im Thymus durch die klonalen Selektionsmechanismen der zentralen Toleranz eliminiert und daran gehindert, als reife T-Zellen den Thymus zu verlassen. Ihr Gefahrenpotenzial zur Auslösung bzw. Unterhaltung autoaggressiver Immunreaktionen gegen körpereigenes Gewebe wird durch periphere Schutzmechanismen der klonalen Ignoranz, T-Zellanergie und Suppression reguliert (Xing und Hogquist 2016).

Der Mechanismus klonaler Ignoranz wird wirksam in immunprivilegierten Regionen, in denen die potenziell selbstreaktiven T-Zellen durch die dort exprimierten Autoantigene nicht aktiviert werden wie z.B. im Hodengewebe, in dem die Spermatozyten keine MHC-I/Moleküle exprimieren und daher keine von CD8⁺ T-Zellen erkennbaren autoantigenen Strukturen präsentieren können (Fiszer und Kurpisz 1998). Auch anatomische Strukturen, wie die Blut-Hirn-Schranke, können Lymphozyten als Zugangsbarriere an der Autoantigenerkennung im Zentralnervensystem hindern (Pachter, De Vries und Fabry 2003).

Der Schutz vor Autoimmunität durch Anergie entsteht in der Folge einer TCR-Aktivierung in Abwesenheit suffizienter Kostimulation, die nicht nur in einer ausbleibenden T-Zellaktivierung, sondern einer langfristig veränderten Aktivierbarkeit durch Erhöhung der Aktivierungsschwelle des T-Zell-Rezeptors für nachfolgende antigenspezifische Stimulationen resultiert (Valdor und Macian 2010). Dieser Zustand einer erhöhten Aktivierungsschwelle bedeutet aber nicht, dass die T-Zelle dauerhaft komplett reaktionsunfähig bleibt. Reexposition von Autoantigenen im Kontext starker kostimulatorischer Reize, z.B. durch proinflammatorische Zytokine oder Aktivierungen des angeborenen Immunsystems im Rahmen von Infekten, können eine anergisierte T-Zelle bei adäquater Antigenpräsentation über die erhöhte Aktivierungsschwelle heben und pathogene Autoimmunreaktionen provozieren (Malvey, Jenkins und Mueller 1998). Somit bietet die periphere Induktion von T-Zellanergie einen relativen, d.h. kontextabhängigen Schutz vor potenziell aggressiver Autoimmunität im Gegensatz zu der sicheren Protektion, die die definitive Elimination einer autoreaktiven Zelle aus dem Gesamtrepertoire durch Negativselektion im Thymus bietet.

Ein weiterer Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion ist die Unterdrückung autoreaktiver Effektor-T-Zellen durch regulatorische T-Zellen. Diese regulatorischen T-Zellen sind unter dem Gesichtspunkt der Entwicklung neuer therapeutischer Möglichkeiten zur

Behandlung von Autoimmunerkrankungen, die sich infolge einer gestörten immunologischen Autotoleranz entwickeln, von besonderer Bedeutung für die translationale Forschung (Kubo et al. 2004).

1.6 Regulatorische T-Zellen

Initial wurde die potenzielle Bedeutung von T-Zellsubpopulationen für regulatorische Funktionen im Immunsystem 1969 durch die Entdeckung von Suppressor-T-Zellen beschrieben. Deren suppressive Wirkung wurde zunächst antigenaktivierten CD8⁺ T-Lymphozyten zugeschrieben (Nishizuka et al. 1969). Der Weiterentwicklung des Konzeptes stand jedoch für einen relativ langen Zeitraum der Mangel an zuverlässigen molekularen Markern entgegen, bis es Sakaguchi 1995 gelang für eine Subpopulation aus dem Thymus stammender charakterisierter CD4⁺ T-Zellen eine starke Oberflächenexpression der α -Kette des IL-2 Rezeptors (IL-2R α , CD25) nachzuweisen, welche thymektomierte Mäuse vor autoaggressiven Immunreaktionen schützen (Sakaguchi et al. 1995; Wierenga und Kapsenberg 2011). Durch diese und weitere Arbeiten konnte die kritische Bedeutung regulatorischer T-Zellen (Tregs) für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase (Sakaguchi et al. 2008) und die Protektion gegen pathogene Autoimmunität (Vandenbark und Offner 2008) gut belegt werden. Jedoch fehlen für die phänotypische Charakterisierung humaner Tregs weiterhin spezifische Marker. So hat sich erwiesen, dass die im murinen Immunsystem etablierten Marker für regulatorische T-Zellen über die Expression von CD25 und dem Transkriptionsregulator Foxp3 für die analoge humane Lymphozytensubpopulation nicht ausreichend sind, da diese Marker auch von Effektor-T-Zellen im Rahmen ihrer Aktivierung hochreguliert werden (Fontenot, Gavin und Rudensky 2017). Der Methylierungsstatus der Treg-spezifischen demethylierten Region (TSDR) (Polansky et al. 2008), eines konservierten nichtkodierenden Elements im Foxp3-Genlocus, kann zwar zur Identifizierung humaner Tregs verwendet werden (Toker et al. 2013), ist jedoch keine geeignete Identifizierungsmethode zur Zellsortierung für nachfolgende funktionelle Charakterisierungen des zellulären Phänotyps. Für diese Anwendung finden aktuell als Marker im Thymus gereifter Tregs neben CD4, CD25 auch die fehlende Expression der α -Kette des IL-7 Rezeptors (IL-7R, CD127) Verwendung (W. Liu et al. 2006).

Die im Thymus gebildeten Zellen stellen den Hauptanteil des Gesamtrepertoires Foxp3⁺ Tregs dar und werden als tTregs (*thymic-derived Tregs*) oder auch als natürlich vorkommende nTregs (*naturally-occurring Tregs*) bezeichnet. Ihre T-Zell-Rezeptoren erkennen überwiegend Autoantigene und repräsentieren damit autoreaktive Lymphozyten mit speziellen Eigenschaften (Sakaguchi et al. 2008). Nach Ihrer Differenzierung im Thymus wandern sie unmittelbar postnatal in die peripheren lymphatischen Organe, wo sie ca. 10% der CD4⁺ T-

Lymphozytenpopulation ausmachen. Die Mechanismen der Treg-Reifung im Thymus sind noch nicht im Detail aufgeklärt, jedoch spielen neben der über den TCR nach Antigenbindung vermittelten Signalstärke auch kostimulatorische Signale für die Induktion der Foxp3-Expression als Transkriptionsfaktor eine kritische Rolle für die weiteren Differenzierungsvorgänge.

Zusätzliche, den thymischen Reifungsprozess der Tregs fördernde Einflüsse, werden durch das Zytokin IL-2 vermittelt (Nazzari et al. 2014). Nach ihrer Auswanderung aus dem Thymus kontrollieren die tTregs die Aktivierung und Expansion autoreaktiver T-Zellen und anderer pathogener Immunzellen in den sekundären lymphatischen Organen und tragen so zur Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz bei (Kim et al. 2008).

In der Peripherie können aber unter bestimmten Bedingungen auch *de novo* Foxp3⁺ Tregs aus konventionellen CD4⁺ T-Lymphozyten entstehen. Die Konditionen für die Differenzierung dieser induzierbaren Tregs (iTregs) hängen wiederum von der Stärke der über den TCR bzw. der kostimulatorischen Moleküle bedingten Signale, sowie dem Zytokinmilieu ab. In diesem Kontext scheinen neben den Zytokinen TGF- β (*Transforming growth factor β*), IL-2 und IL-10, welchen eine Schlüsselfunktion für die Thymus-unabhängige Entstehung von iTregs zukommt, auch der Differenzierungszustand der APCs sowie die Dichte der präsentierten antigenen Determinanten von kritischer Bedeutung zu sein. Es ist derzeit unklar, zu welchem Grad iTregs und nTregs hinsichtlich Funktion, Stabilität oder Lebensdauer vergleichbar sind, wobei für iTregs eine deutlich höhere Plastizität beschrieben ist (Sakaguchi et al. 2013).

Unter bestimmten Bedingungen können auch konventionelle T-Zellen suppressive Wirkungen zur Aufrechterhaltung der immunologischen Autotoleranz ausüben, wie z.B. TGF- β produzierende Th3-Zellen und IL-10 produzierende Tr1-Zellen. Tr1-Zellen sind aus naiven Vorläufer T-Lymphozyten induzierbarer regulatorischer Lymphozyten entstanden. Sie differenzieren im Kontext der TCR-Aktivierung im Zytokinmilieu von IL-10 bzw. TGF- β unter dem Einfluss von IL-27 (Awasthi et al. 2007). Darüber hinaus scheinen zusätzlich die Zytokine IL-6 und IL-21 eine Rolle in der Ausprägung des Tr1-Phänotyps zu spielen, da sie die Expression von Transkriptionsfaktoren (z.B. c-Maf) regulieren, die kritische Induktoren der IL-10 Produktion, als vermutlich nachfolgend wesentlicher Auslöser, der Tr1-Differenzierung sind. Während murine Tr1-Zellen, die Expression der spezifischen Zelloberflächenmoleküle CD4, CD226, LAG3 (*Lymphocyte activation gene 3*) und CD49b aufweisen, ist die humane IL-10 produzierende Tr1-ähnliche CD4⁺ T-Zellsubpopulation deutlich heterogener (White und Wraith 2016). Tr1-Zellen benötigen weder für ihre Induktion noch für die Funktionalität Foxp3 (Gregori, Goudy und Roncarolo 2012), sodass sie diesen Transkriptionsfaktor nicht konstitutiv, sondern nur geringgradig transient im Rahmen ihrer Aktivierung, exprimieren (Yudoh et al. 2000; Gregori et al. 2012).

Den dargestellten distinkten regulatorischen Lymphozytenpopulationen stehen verschiedene Mechanismen zur Verfügung, über die sie regulatorisch die Aktivierung, Differenzierung, Expansion und Effektorfunktionen autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen sowie auch anderer pathogener Zellen wie CD8⁺ T-Zellen, NK-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und dendritischer Zellen unterdrücken bzw. modifizieren können (Shevach 2009). Die Kenntnisse über die beschriebenen suppressiven Mechanismen resultieren exklusiv aus *in vitro* Studien, sodass für die Bedingungen *in vivo* unklar bleibt, in welchen Gewebekompartimenten unter Beteiligung welcher Zielpopulationen diese wirksam werden.

Initiale Studien weisen für die TGF- β vermittelte suppressive Treg-Wirkung eine Zell-Zell-Kontakt-Abhängigkeit nach, die nachfolgend die Entwicklung der mechanistischen Konzeptvorstellungen geprägt haben (Nakamura, Kitani und Strober 2001). Andere von Tregs exprimierte zellmembrangebundene Moleküle mit suppressiver Wirkung sind CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*), LAG-3, PD-1 (*Programmed cell death protein 1*), CD73 oder CD39. Bei CTLA-4, LAG3 und PD-1 handelt es sich um inhibitorische Immunrezeptoren, die nach Interaktion mit ihren jeweiligen Liganden T-Zellaktivitäten, wie die Proliferation und Zytokinausschüttung hemmen. Die Moleküle CD73 (Ecto-5-prime-nucleotidase) und CD39 (Ectonukleosid-triphosphatdiphosphohydrolase 1) sind Ectonukleasen, die extrazelluläres ATP (Adenosintriphosphat), welches ein starkes proinflammatorisches Signal für APCs darstellt, durch Umwandlung in AMP (Adenosinmonophosphat) oder Adenosin inaktivieren (Deaglio et al. 2007). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Tregs den Metabolismus ihrer Zielzellen durch den Transfer von cAMP über die Formation von „*gap junctions*“ beeinflussen und die Attenuierung ihrer Aktivierung bewirken können (Wehbi und Taskén 2016). Tregs sind auch über die Produktion und Freisetzung von Granzym B zu zytotoxischen Wirkungen auf ihre Zielzellen befähigt (Gondek et al. 2005). Es hat sich jedoch herausgestellt, dass abweichend vom initialen Paradigma, Tregs ihre Zielzellen auch über lösliche Faktoren wie IL-10 oder, wie im Mausmodell gezeigt, über IL-35 beeinflussen können (Shevach 2009).

1.7 Die Rheumatoide Arthritis: Paradigma einer immunmediierten Inflammationserkrankung

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist die mit einer Häufigkeit von ca. 1% in der Gesamtbevölkerung am weitesten verbreitete Form einer chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankung (Aho et al. 1985). Die Erkrankung betrifft Frauen häufiger als Männer und kann prinzipiell in jedem Lebensalter auftreten. Die Erkrankung zeigt jedoch einen Gipfel der Neuerkrankungen zwischen dem 40. bis 60. Lebensjahr. Die RA ist eine chronische Erkrankung, bei der sich fehlgeleitete Abwehrreaktionen des körpereigenen Immunsystems gegen die Gelenke richten und diese in einer über Jahre bis Jahrzehnte anhaltenden

Entzündungsreaktion komplett zerstören können. Darüber hinaus hat sich erwiesen, dass der chronische Entzündungsprozess nicht auf die Gelenke beschränkt bleibt, sondern auch das Gefäßsystem erfassen kann (Wittrup et al. 2015). Außerdem stellt die Freisetzung inflammatorischer Botenstoffe in den chronisch entzündeten Gelenken einen unterschwellig auf das Gefäßsystem einwirkenden Entzündungsreiz dar, der die Gefäßverkalkung (Atherosklerose) begünstigen und damit das Risiko für Zweiterkrankungen wie die koronare Herzerkrankung oder einen Schlaganfall (Apoplex) erhöhen kann (Kitas und Gabriele 2011). Die Zusammenhänge zwischen chronischer Entzündung und Begleit- und Folgeerkrankungen am Gefäßsystem, die neben erhöhten krankheits- und therapiebedingten Infektionsrisiken wesentlich zur statistisch um einige Jahre reduzierten Lebenserwartung von Patienten beitragen, sind für die Notwendigkeit der stringenten Therapiegestaltung in der Langzeitbetreuung der Patienten relevant. Unter den derzeit verfügbaren in der Regel lebenslangen Pharmakotherapien wird trotz erheblichen Fortschritten in der Behandlung, das Ziel der Krankheitsremission in über 70% der Patienten noch immer nicht erreicht und ist zudem aufgrund ihrer immunsuppressiven Wirkungen mit erhöhten Infektrisiken verbunden (D. Liu et al. 2017). Hieraus ergibt sich ein unveränderter Forschungsbedarf zur Entwicklung verbesserter Behandlungsmöglichkeiten.

1.8 Die Krankheitsentstehung: Eine immunologische Fehlerkennung des modifizierten „Selbst“

Die RA wird als eine immunmedierte Inflammationserkrankung betrachtet, der eine immunologische Fehlerkennung modifizierter ubiquitär vorkommender Selbstproteine aber auch gelenkspezifischer Autoantigene zugrunde liegen (Smolen, Aletaha und McInnes 2016). Zur genetischen Prädisposition der immunologischen Fehlregulation tragen als stärkste genetische Komponente RA-assoziierte Allele des polymorphen MHC DR-Lokus bei (Raychaudhuri et al. 2012). Die in dieser Region kodierten Genprodukte sind MHC-II/Moleküle, die von spezialisierten APCs exprimiert werden und auf ihrer Zellmembran der Präsentation antigener Peptide an CD4⁺ T-Lymphozyten dienen. Die genetisch determinierte Form der Peptidbindungstasche in den jeweiligen MHC-II/Molekülen beeinflusst entsprechend sowohl die Selektion der Peptide für die Präsentation an allo- und autoreaktive oder regulatorische T-Lymphozyten als auch die aus den jeweiligen Interaktionen mit dem TCR-resultierenden Signalstärken.

Die stärkste für die RA bekannte genetische Prädisposition betrifft einen Genlocus mitzentraler funktioneller Bedeutung für die adaptive Immunität und wurde in nahezu allen untersuchten Bevölkerungsgruppen mit den HLA-DR4 Subtypen DRB1*04:01, *04:04, *04:05 und *04:08 assoziiert (Smolen, Aletaha und McInnes 2016). Alle RA-assoziierten HLA-DRB1 Allele weisen

in ihrer dritten hypervariablen Region (CDR3-Region) an der Position 70-74 der von ihnen kodierten β -Kette die homologen Aminosäuremotive QKRAA (*04:01), QRRAA (*04:04, *04:05, *04:08, *01:01, *01:02, *14:02) oder RRRAA (*10:01), deren Konsensus als "Shared Epitope" bezeichnet wird, auf (Gregersen, Silver und Winchester 1987). Etwa 50% aller kaukasischen RA-Patienten sind Träger des DRB1*04:01 Allels und 80 - 90% sind hetero- oder homozygot für eines der HLA-DR-Shared Epitope Allele (Reveille 1998). In Asien ist die RA dominant mit den Shared Epitope Allelen DRB1*04:05 (Japan und China: Frequenz > 50%, (Wakitani et al. 1998) und DRB1*10:01 (Indien: Frequenz > 50%, (Kong et al. 2002) assoziiert. Die Genprodukte der DR-Subregion sind polymorphe MHC-Klasse-II/Moleküle, die der Präsentation antigener Peptide an T-Lymphozyten dienen. Obgleich die genaue funktionelle Rolle der Shared Epitope Allele in der RA-Pathogenese noch nicht aufgeklärt ist, so ist im Kontext gelenkspezifischer Autoimmunantworten relevant, dass das Konsensus-Motiv QK(R)AA auf der β -Kette des MHC-II eine Bindungsstelle für die Präsentation einer immundominanten T-Zell-determinante des gelenkspezifischen Kollagen Typ-II (CII) (CII259-273) darstellt (Dessen et al. 1997). Auf die funktionelle Relevanz für die RA-Pathogenese weist die Detektierbarkeit humoraler und zellulärer Autoimmunantworten gegen das knorpelspezifische CII um den Zeitpunkt der klinischen Erstmanifestation hin, ohne dass damit die Bedeutung des CII als ein dominantes Autoantigen in der Pathogenese als gesichert gelten kann. Auch wenn die autoantigene(n) krankheitsauslösende(n) Determinante(n) für die RA derzeit nicht bekannt ist (sind), so ergeben sich aus dem oben dargestellten Kontext zur genetischen Prädisposition gut belegte indirekte Evidenzen für die Bedeutung adaptiver Immunantworten auf TCR-vermittelte Aktivierungen durch antigene Peptide im Kontext ihrer Präsentation auf Shared Epitop Allel kodierten MHC-Klasse-II/Molekülen.

Von der Qualität dieser TCR-Signale hängt ab, ob der entsprechende T-Lymphozyt als T-Helfer-Zelle (Th) entzündungsfördernde oder als regulatorische T-Zelle (Treg) inflammationshemmende Funktionen erfüllt. Aktivierte Th-Zellen gehen Interaktionen mit den B-Lymphozyten ein, um deren Differenzierung in Antikörper sezernierende Plasmazellen im Dienste spezifischer humoraler Immunantworten zu fördern. Mit der Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen (Zytokinen) wie den Interleukinen IL-1, IL-6, IL-17, IL-23, Tumornekrose Faktor (TNF) u.a. können Th-Zellen aber auch Zellen der angeborenen Immunität z.B. Monozyten oder Granulozyten sowie Endothel- und Bindegewebszellen (z.B. Synovialfibroblasten oder Chondrozyten) in den Gelenken aktivieren (zelluläre Immunantwort). Diese proinflammatorischen Zytokinwirkungen sind häufig mit der Freisetzung kataboler Enzyme verbunden, die z.B. den proteolytischen Abbau von Bestandteilen des Gelenkknorpels und Knochens bewirken. Da die Regenerationsfähigkeit insbesondere des Knorpels limitiert ist, resultiert über die Zeit eine irreversible Gelenkzerstörung mit Funktionsverlusten für den betroffenen Patienten bis hin zur Invalidität (s. Abb. 1).

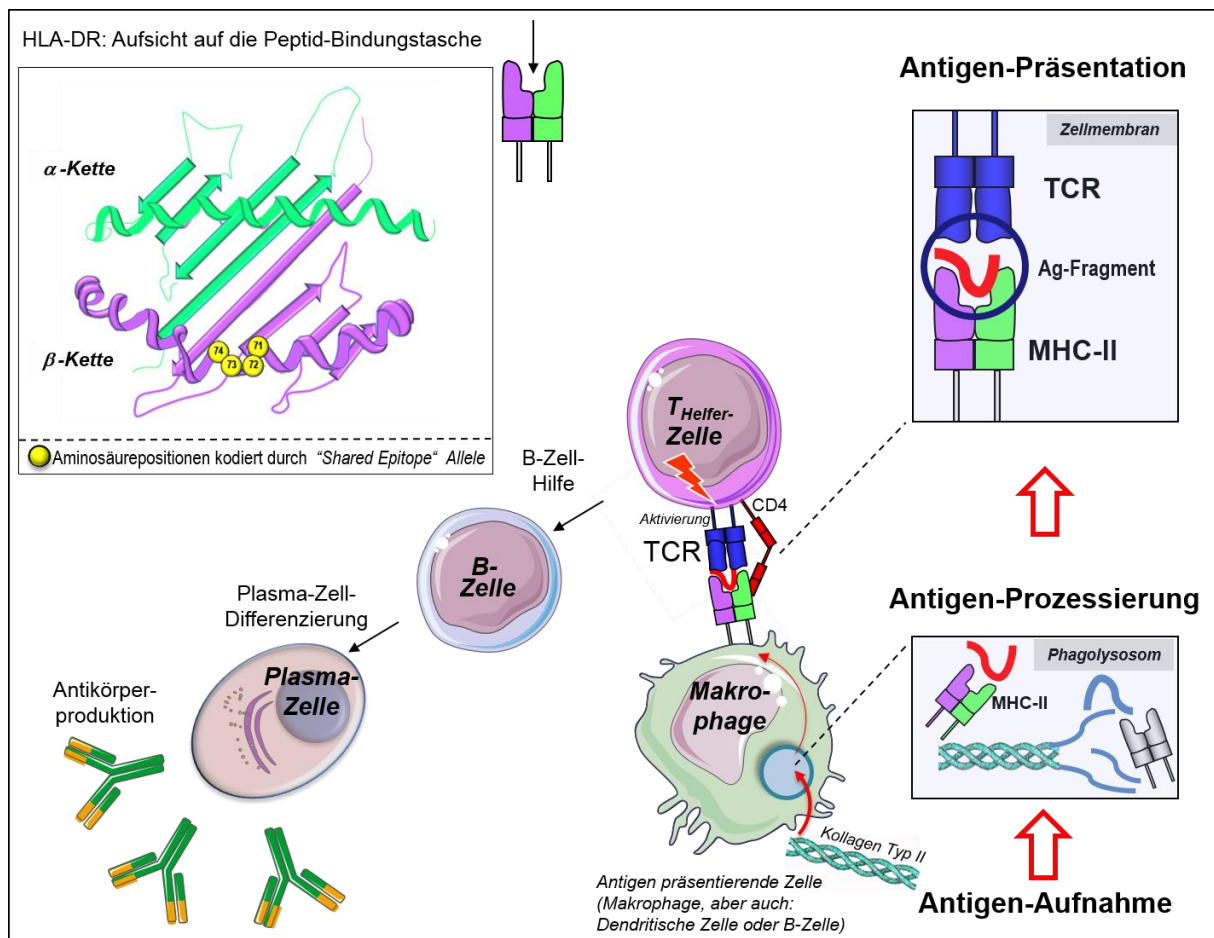


Abb. 1) Zentrale Bedeutung der Antigenerkennung in der RA-Pathogenese

T-Helferzellen erkennen Antigene auf der Oberfläche spezialisierter antigenpräsentierender Zellen (APC) in Form von Peptiden über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR). Hierzu ist es notwendig, dass das (Auto)Antigen (hier: Kollagen/Molekül) nach Aufnahme durch die APCs (hier: Makrophage) zunächst in lysosomalen Kompartimenten enzymatisch zerlegt wird, um dann als prozessiertes Peptid gebunden an MHC-II/Moleküle an die Zelloberfläche zur Präsentation an T-Zellen transportiert zu werden. Für die Antigenpräsentation ist das Peptid bindende MHC-II/Molekül kritisch. In der Aufsicht zeigt die Abbildung die Peptidbindungstasche des HLA-DR/Moleküls mit den variablen Aminosäurepositionen, deren RA-assoziierte allelische Varianten ("Shared Epitope") das stärkste genetische Risiko der Erkrankung repräsentieren. Die Antigen-aktivierte T-Helferzelle induziert in B-Zellen nach Zellkontakt u.a. durch Botenstoffe Differenzierungsprozesse in Plasmazellen, die dann die löslichen Antikörper produzieren [Abb. modifiziert nach: Burkhardt H.: Persönliche Mitteilung].

Während die genetische Prädisposition somit das adaptive Immunsystem betrifft, wurde Rauchen als erster exogener Risikofaktor der RA identifiziert (Klareskog et al. 2006). Durch die inhalative Noxe werden chronisch-rezidivierende Inflammationsprozesse in den oberen Luftwegen und im Bronchialsystem ausgelöst, welche mit der chronischen Freisetzung des Enzyms Peptidyl-Arginin Deiminase (PAD) aus Granulozyten und Makrophagen einhergehen. Dieses Enzym bewirkt eine Deiminierungsreaktion, die Argininreste in die nicht-natürliche Aminosäure Citrullin umwandelt. Diese enzymatische Modifikation führt zur Neuentstehung potenzieller Zielstrukturen des körpereigenen Abwehrsystems (Neoepitope), für die der

physiologische Zustand der immunologischen Autotoleranz im Kontext RA-spezifischer genetischer Prädispositionen nicht mehr gewährleistet ist (s. Abb. 2). So finden sich bereits in sehr frühen Krankheitsstadien in Bronchialflüssigkeiten von RA-Patienten Antikörper gegen citrullinierte Proteinstrukturen (ACPAs). Dies ist ein Hinweis auf eine extraartikuläre Krankheitsauslösung durch eine Induktion von Immunantworten gegen citrullinierte Proteine in der Lunge (Klareskog et al. 2015). Dem Rauchen kommt dabei wahrscheinlich nicht die Bedeutung der einzigen, aber der ersten identifizierten inhalativen Noxe, für die eine ACPA induzierende Wirkung belegt werden konnte, zu. Das Spezifische für die RA ist dabei nicht die Entstehung citrullinierter Neoantigene per se, da diese auch in nicht-RA-Patienten nachweisbar sind, wohl aber die adaptive Immunantwort mit Antikörperbildung gegen diese Strukturen. ACPAs sind somit hochspezifische serologische RA-Marker, die bei Gesunden oder Patienten mit anderen entzündlichen Erkrankungen nur selten (unter 5%) vorkommen. Das Auftreten dieser RA-spezifischen Antikörper im Serum ist dabei bereits bis zu 15 Jahre vor Ausbruch der Gelenkerkrankung nachweisbar (Klareskog et al. 2006; Holmdahl, Malmström und Burkhardt 2014). Diese ACPAs erkennen citrullinierte, ubiquitär vorkommende Proteine (Vimentin, Enolase oder Fibrinogen), jedoch auch das durch PAD-Enzyme modifizierte knorpelspezifische Kollagen Typ-II (Burkhardt et al. 2005). Die entsprechenden ACPAs sind dabei zum Teil kreuzreaktiv, indem sie an Citrullinreste verschiedener deiminerter Proteine binden können. In Phasen unmittelbar vor Ausbruch der klinischen Symptomatik kommt es zu Veränderungen der im Serum nachweisbaren ACPAs. Dies geschieht sowohl hinsichtlich ihres ansteigenden Titers als auch der Erkennung eines breiteren Spektrums citrullinierter Antigene. Es ist denkbar, dass akzidentelle Traumata oder Degenerationsprozesse des Knorpels zu unspezifischen Inflammationsreaktionen im Gelenk mit der Freisetzung von PAD-Enzymen führen. So können knorpelspezifische Matrixkomponenten (Kollagen Typ-II) (Uysal et al. 2009; Holmdahl, Malmström und Burkhardt 2014) oder aber an der Knorpeloberfläche adhärente Serumbestandteile (Fibrinogen) citrulliniert werden. Die bereits in der Latenzperiode der Prä-RA präformierten kreuzreaktiven ACPAs können als inflammatorische Präzipitationsfaktoren an die Knorpeloberfläche binden und über die Aktivierung proinflammatorischer Botenstoffe den Einstrom von Entzündungszellen bewirken (Klareskog et al. 2006; Uysal et al. 2010). So gelangen Zellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems in das synoviale Gewebekompartiment und gehen untereinander und mit den ortsständigen Fibroblasten der Gelenkinnenhaut multiple Interaktionen ein. Die zelluläre Kommunikation wird über ein Netzwerk proinflammatorischer Botenstoffe koordiniert und trägt zur Chronizität des Entzündungsprozesses bei.

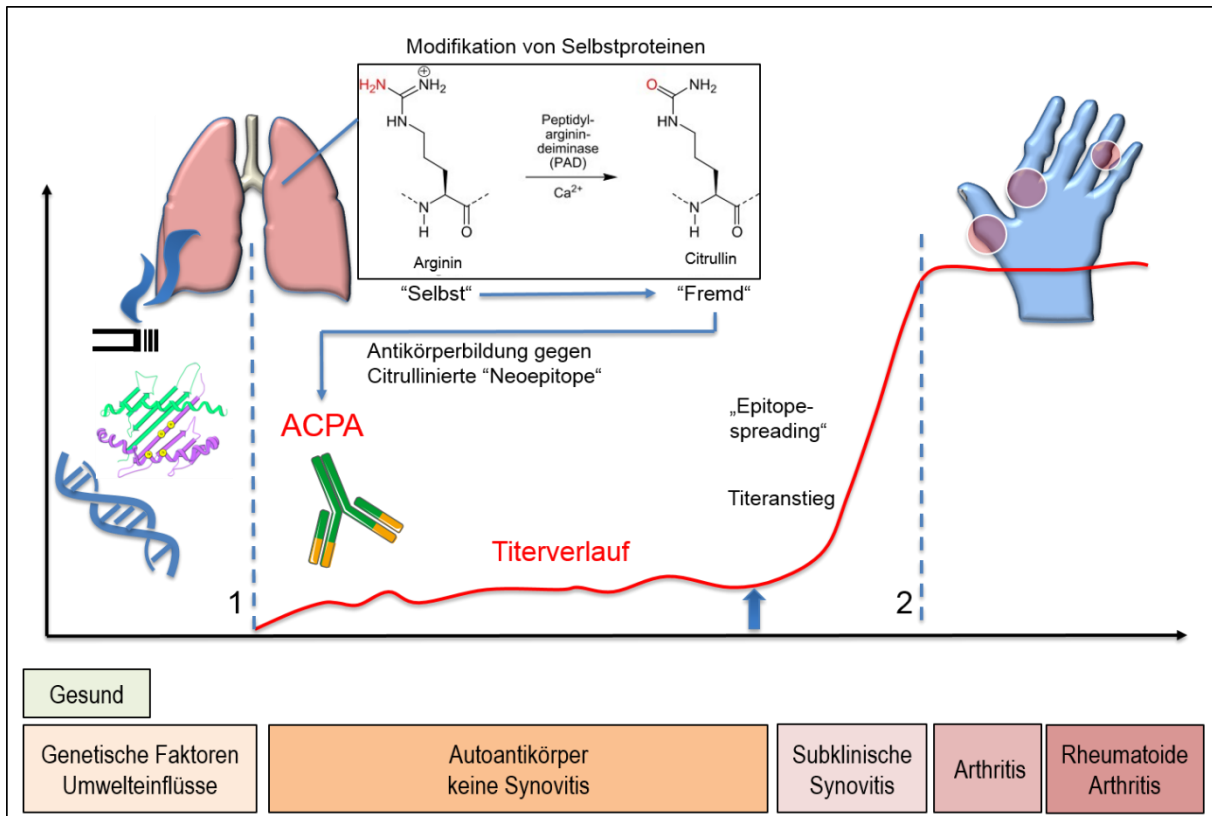


Abb. 2) Entwicklung der RA-spezifischen (Auto)Immunität gegen citrullinierte (Auto)antigene im zeitlichen Verlauf

Durch genetische Prädispositionen (insbesondere: HLA-DRB1/Allelen) kommt es in der Lunge zur Bildung von Antikörpern gegen citrullinierte Proteine (ACPAs). 1. Übergang in die Phase der Citrullin-spezifischen Immunität. Nach langjähriger Persistenz der ACPAs in der Zirkulation ist unmittelbar vor Ausbruch einer klinisch manifesten Arthritis ein Titeranstieg der ACPAs (Pfeil) verbunden mit einem verbreiterten Spektrum der Spezifitäten (*Epitop-Spreading*) nachweisbar. 2. Übergang in die Phase Gelenk-spezifischer Immunantwort (Ausweitung der pathogenen Autoimmunität (u.a. durch Kreuzreaktivität von Antikörpern ("crossreactivity") gegen weitere Autoantigene (sog. *Epitopspreiding*)), die schließlich zur klinisch manifesten Arthritis mit Erfüllung der RA-Diagnosekriterien führt [Abb. modifiziert nach: Mojtahed Poor S. und Burkhardt H.: Pathogenese der seropositiven Rheumatoiden Arthritis. Pharmakon 4. Jg. 5/2016: 416-422].

1.9 Zielstrukturen der aktuellen Therapien

Für die Therapie der RA steht heute ein Arsenal synthetischer und biotechnologisch hergestellter Pharmazeutika zur Verfügung (Smolen, Aletaha und McInnes 2016). Diese Pharmazeutika dämpfen entweder generell die Reaktionsfähigkeit des Immunsystems (z.B. Glukokortikoide oder Methotrexat), indem diese gezielt zentrale Botenstoffe der Entzündung durch Antikörper, wie z.B. IL-6 oder TNF- α blockieren oder sie hemmen intrazelluläre Aktivierungswege von Immunzellen über selektive Tyrosinkinase (z.B. Januskinase). Diese Therapien haben zu deutlich verbesserten Behandlungsergebnissen geführt, sodass heute durch Krankheitskontrollen und bei frühzeitigem Medikamenteneinsatz Gelenk-zerstörungen weitgehend verhindert werden können. Diese Therapien sind allerdings noch immer mit dem Nachteil behaftet, dass ihre krankheitsblockierende Wirkung dabei auch untrennbar mit der

Hemmung erwünschter Immunreaktionen, wie z.B. zur Infekt- oder Tumorabwehr, verbunden sind. Darüber hinaus werden auch lediglich die Effektor-mechanismen auf der Endstrecke der Entzündung, nicht aber die zugrundeliegenden immunologischen Fehlerkennungen beeinflusst, sodass eine Remission, jedoch keine Heilung erreicht wird (Donahue et al. 2008). Auf dem Weg zu neuen Behandlungsoptionen einer antigenspezifischen tolerogenen Immunmodulation sind präklinische Ergebnisse im experimentellen Modell der Kollagen-II induzierten Arthritis (CIA) beschrieben (Edward F. Rosloniec et al. 1997; E. C. Andersson et al. 1998; E F Rosloniec et al. 1998; Kollias et al. 2011). Die CIA ist die prototypische Experimentalerkrankung für die präklinische Arzneimittelentwicklung im Indikationsgebiet der RA. Kollagen Typ-II ist als Hauptbestandteil der Gelenkknorpelmatrix ein potenziell relevantes Autoantigen und tierexperimentelle Studien haben gezeigt, dass in allen bisher untersuchten Spezies (Maus, Ratte, Kaninchen, Makaken) durch Immunsierung mit CII eine erosive d.h. mit Gelenkerstörungen einhergehende Arthritis ausgelöst werden kann. Die Arthritis-entwicklung geht mit der Aktivierung adaptiver Immunantworten gegen evolutionär konservierte Struktur determinanten des CII einher und ist in dem am besten untersuchten murinen Krankheitsmodell immunogenetisch mit dem A^q, einem murinen Homolog der humanen DR Allele, assoziiert. In dieser murinen Experimentalarthritis konnte gezeigt werden, dass die Erkennung der in den arthritogenen Immunantworten dominanten T-Zelldeterminante im CII-Abschnitt CII259-270 durch die autoreaktiven murinen CD4⁺ T-Zellen von posttranslationalen kollagentypischen Modifikationen an den Lysinresten 264 und 270 (Hydroxylierung und Glykosylierung) abhängig ist (s. Abb.3; Michaëlsson et al. 1994). Mit der Aktivierung CD4⁺ T-Zellen ist auch die Stimulation CII-spezifischer B-Zellen zur Bildung arthritogener Antikörper verbunden. Die Spezifität dieser Antikörper, deren Pathogenität durch die krankheitsauslösende Wirkung im Transfer auf naive Tiere belegt ist (Burkhardt et al. 2002; Nandakumar et al. 2008), bleibt über Speziesbarrieren hinweg konserviert und lässt sich auch für IgG Autoantikörper in Seren von RA-Patienten nachweisen (Burkhardt et al. 2002). In diesem Modell konnte in gemeinsamen Vorarbeiten mit dem Kooperationspartner Prof. Rikard Holmdahl und seiner Arbeitsgruppe (Medical Inflammation Research, Karolinska Institute, Stockholm, Schweden) ein innovatives Prinzip der tolerogenen Immunmodulation zur Pharmakotherapie der immunmedierten Arthritis erstmalig entwickelt werden (Dzhambazov et al. 2006). Diese Studien haben gezeigt, dass durch die systemische Gabe eines rekombinanten murinen MHC-II-(A^q)/CII-Peptidkomplexes die CIA sowohl in einem präventiven Behandlungsmodus d.h. bei Therapiebeginn nach Krankheitsauslösung durch CII-Immunsierung aber auch vor Arthritismanifestation, als auch therapeutisch im induzierten Arthritisflare der etablierten CIA den schweren Verlauf der entzündlichen Gelenkerkrankung hochwirksam unterdrücken kann. Die Charakterisierung muriner T-Zellsubpopulationen in regionalen Gelenkdrainierenden Lymphknoten der Maus nach Gabe der tolerogenen

A^g/gal264CII-Komplexe ergab die Induktion regulatorischer Tr1-Zellen, die durch die Expression der Marker LAG3 und PD-1 charakterisiert sind (Dzhambazov et al. 2006). Da darüber hinaus der Transfer von T-Lymphozyten aus Mäusen nach Behandlung mit dem A^g/galCII-Peptidkomplex auf naive Mäuse, diese Tiere vor der Induktion der CIA schützen konnte, belegen die aufwendigen Vorarbeiten ein effizientes therapeutisches Wirkpotenzial der MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe (komplexiert mit dem immundominanten glykosylierten Peptid 259-273 des knorpelspezifischen Kollagen Typ-II) über die Induktion regulatorischer T-Zellen. Unter gleichen experimentellen Bedingungen konnte der unmodifizierte A^g/nCII-Peptidkomplex keine therapeutische Wirkung erzielen. Möglicherweise ist diese bemerkenswerte selektive Abhängigkeit des immunregulatorischen Effektes von der posttranslationalen Modifikation des Kollagenpeptids in der MHC/Bindetasche dadurch bedingt, dass das galaktosylierte CII ein strikt gewebespezifischer Bestandteil des Knorpels ist. Während das unglykosylierte CII auch im Thymus unter dem Einfluss des Transkriptionsfaktors AIRE (*Autoimmune regulator*, (Perniola 2018)) exprimiert wird (Raposo et al. 2018). Im Thymus bleibt das CII-Peptid nach Translation allerdings unmodifiziert, da den mTECs im Thymus, die für die posttranslationale CII-Modifikation erforderliche Enzymausstattung des Chondrozyten im Knorpel fehlt. Mit diesen Unterschieden in der posttranslationalen Modifikation des CII zwischen Thymus und Knorpelgewebe könnten differente Modi der T-Zellregulation zusammenhängen, mit Begünstigung zentraler Toleranzmechanismen (Chin et al. 2006) im Falle von T-Lymphozyten mit Spezifität für das unglykosylierte CII im Unterschied zum präferentiellen Einsatz peripherer Toleranzmechanismen (Campbell et al. 2009) in der Limitation von T-Zellantworten gegen das galaktosylierte CII.

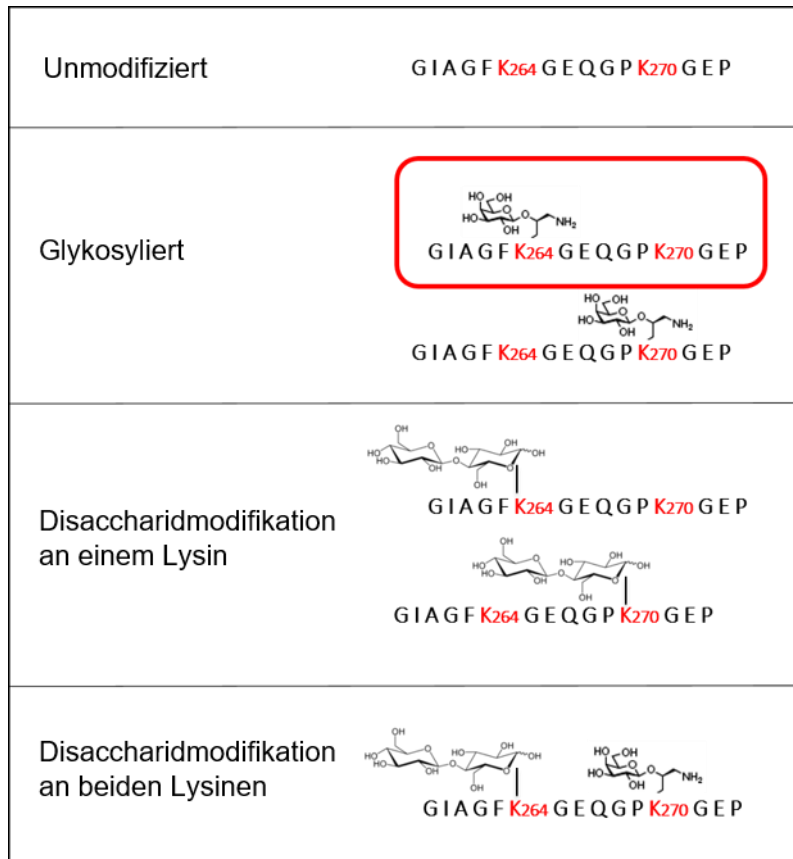


Abb. 3) Die posttranslationalen Modifikationen des CII (259-270)

Darstellung der posttranslationalen Modifikationen (PTM) innerhalb des CII-Epitops (G I A G F K G E Q G P K G E P). Hierbei können die Lysine (K) an den Positionen 264 und 270 hydroxyliert und mit Mono- oder Disacchariden, d.h. mit einem β -d-galactopyranosyl oder einem α -d-glucopyranosyl-(1-2)- β -d-galactopyranosylrest weiter glykosyliert werden. Für den in dieser Arbeit zu untersuchenden Wirkmechanismus ist die Galaktosylierung am K264 von großer Bedeutung [Abb. Basiert auf den Daten aus Ref.:(Andersson et al. 2007; Lindgren et al. 2018)].

1.10 Zielsetzung der vorliegenden Arbeit

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es Mechanismen eines für die immunmodulatorische Therapie der Rheumatoiden Arthritis entwickelten innovativen Ansatzes zur Induktion regulatorischer T-Zellen mittels rekombinant hergestellter MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe über *in vitro* Studien aufzuklären.

Der erste Teil der Arbeit (Kapitel 3.1) stellt exemplarisch die Ergebnisse funktioneller *in vitro* Studien am Modellsystem verschiedener muriner T-Zell-Hybridome, die durch ihren klonotypischen Antikörper mit analysierter Epitopspezifität und TCR-Sequenz charakterisiert sind, dar. Anhand der aus T-Lymphozyten von Mäusen nach CIA-Induktion etablierten T-Zell-Hybridome, sollten durch die systematische Analyse pharmakologischer Wirkungen unterschiedlicher rekombinanter MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe unter definiert variierten

Bedingungen, die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der immunmodulatorischen Wirkung aufgeklärt werden.

Zudem sollte wie in Kapitel 3.2 und 3.3 dargestellt, eine Methode zur epitopspezifischen Detektion und Isolation einzelner CII-spezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) u.a. mittels Fluoreszenz-markierter MHC-II/Peptid-Tetramerkomplexen etabliert werden. Diese Methodik dient dazu, Unterschiede im Expressionsprofil auf Einzelzellniveau zu detektieren und hat das Potential geeignete Biomarker mittels biostatistischer Analyseverfahren zu identifizieren. Komplementär dazu sollten antigenspezifische T-Zellen über die Expressionssteigerung des Aktivierungsmarkers CD154 nach epitopspezifischer Stimulation zur nachfolgenden Zellseparation identifiziert werden.

Darüber hinaus sollen nach der Isolation der Einzelzellen erstmalig, derzeit noch nicht identifizierte, humane T-Zell-Rezeptoren mit Spezifität für das galaktosylierte CII charakterisiert werden. Die hierzu notwendige Amplifikation der variablen Gensegmente der α - und β -Kette des TCRs erforderte die Etablierung einer Einzelzell-Multiplex-PCR zur Amplifikation der kodierenden Genelemente, für die an der CII-Erkennung beteiligten variablen Regionen (V-Gene) des TCRs. Die daraus resultierenden Sequenzanalysen erlauben dann mögliche Hinweise auf präferentielle V-Genverwendungen durch die CII-spezifischen T-Lymphozyten von RA-Patienten. Anschließend sollten die amplifizierten antigenspezifischen TCR-Sequenzen in eine TCR-defiziente T-Zelllinie transduziert und hinsichtlich ihrer Funktionalität getestet werden (s. Kapitel 3.4). Hierbei fungiert der bereits charakterisierte TCR eines murinen Kollagen Typ-II (CII AS259-273, K264gal) spezifischen T-Zellklons als Positivkontrolle.

Das Ziel im letzten Kapitel des Ergebnisteils dieser Arbeit (Kapitel 3.5) ist die phänotypische Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zellen mittels durchflusszytometrischer Studien der Expression von Oberflächenmarkern (z.B. CD49b, LAG3) und Zytokinen (INF- γ , IL-17, IL-4, IL-10, TGF- β), sowie ELISA-basierter Methoden (Bead-basierte Immunoassays z.B. LEGENDPLEX™). Ferner sollen Transkriptomanalysen (RNA-Sequenzierung) diese Charakterisierung komplementieren.

2 MATERIAL & METHODEN

2.1 Material

Tab. 2.1: Geräte und Verbrauchsmittel

Analysenwaage	Sartorius ENTRIS
Autoklav	Systec Dx-45
Bakterienschüttler	Edmund Bühler GmbH SM-30
Brutschränke	Eppendorf Galaxy 170S
Durchflusszytometer (Analysegerät)	BD LSR Fortessa
Durchflusszytometer (Sorter)	BD FACS Aria III
Eismaschine	Brema IceMakers
Elektrophoresekammer	Peqlab Biotechnologie GmbH
ELISA-Platten	Biolegend ELISA Max
FACS Röhrchen	VWR
Feinwaage	Sartorius ENTRIS
Gefrierschränke (- 20 °C)	Liebherr
Gefrierschränke (- 80 °C)	Thermo Fisher Scientific TSX Series
Gel-Dokumentationssystem	Biozym azure biosystems C300
Handschuhe	Starlab Starguard
Heizblock	Ika RCT Basic
Kühlschränke (4 °C)	Liebherr
Lichtmikroskop	Zeiss Primo Vert
LS Columns	Miltenyi Biotec
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec

MACS® Smart Strainers	Miltenyi Biotec
Magnetfeld MACS Multistand	Miltenyi Biotec
Messbecher	Vitlab (500 ml); Brand (100 ml)
Mikrowelle	Severin
Mini Gel Tank	Thermo Fisher Scientific
Mini Blot Module	Thermo Fisher Scientific
NanoDrop	DeNovix DS11 + Spectrophotometer
PCR Maschine	Peqlab Biotechnologie GmbH
Petrischalen	Greiner Bio-One Cellstar
pH-Meter	Mettler Toledo
Pipetboy	Integra Pipetboy 2
Pipetten	Gilson
Pipetten Spitzen	Greiner Bio-One Cellstar
Power Supply	GE Helathcare EPS 301
Reaktionsgefäße	Schott Duran Flaschen
Step One Plus Real Time PCR System	Applied Biosystem
Sterilbank	Thermo Fisher Scientific HERASAFE KS
Thermomixer	Eppendorf ThermoMixerC
Tischzentrifuge (mittel)	VWR
Tischzentrifuge (klein)	Biozym
Tiefkühltruhe (- 80 °C)	Thermo Fisher Scientific TSX Series
Vortexer	Scientific Industries Vortex-Genie2
Wasserbad	Memmert GmbH + Co KG
Zählkammern	Neubauer Marienfeld

Zellkulturflaschen (T75)	Greiner Bio-One Cellstar
Zellkulturplatten (24-, 48-, 96-Lochplatten)	Greiner Bio-One Cellstar
Zellzähler	Logos Biosystems Luna FL
Zentrifugen	VWR Mega Star 1.6 R

Alle verwendeten Glasgeräte wie Flaschen, Messzylinder usw. wurden für 20 Min. bei 121 °C autoklaviert. Die verwendeten Plastikmaterialien wie Pipettenspitzen oder Zellkulturplatten wurden steril bezogen.

Tab. 2.2 Chemikalien

Agarose	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ampicillin Natriumsalz	Carl Roth GmbH + Co. KG
Bovines Serum Albumin (BSA)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Calciumchlorid	Merck
DNA-Exitus Plus	Applichem
DNase	Roche
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Thermo Fisher Scientific
DTT (Dithiothreitol 0,1 M)	Invitrogen
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Ethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
FKS (Fötales Kälber Serum)	Gibco By Life Technology
Glycerol	Sigma Aldrich
Hydroxychloroquin (HCQ)	Sigma Aldrich
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
LDS Sample Puffer (4X)	Novex By Life Technology
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co. KG

Methanol	Carl Roth GmbH + Co. KG
Paraformaldehyd	Affymetrix Inc.
Penicillin-Streptomycin (Pen. /Strep.)	Thermo Fisher Scientific
Tris-hydrochlorid	Carl Roth GmbH + Co. KG
Trypanblau (0,4%-ige Lösung)	Gibco By Life Technology
Tween	Carl Roth GmbH + Co. KG
100 bp-DNA-ladder	Carl Roth GmbH + Co. KG
1 kp-DNA-ladder	Carl Roth GmbH + Co. KG

Flüssigkeiten wie LB-Medium oder LB-Agar wurden für 15 Min. bei 121 °C autoklaviert.

Tab. 2.3 Verwendete Software

Adobe Photoshop	Fa. Adobe System incorporated, San Jose, Ca., USA
FlowJo v10	FACS-Software; 2015 FlowJo, LLC
Microsoft Office	Word, Excel, Powerpoint; Fa. Microsoft Corporation, Redmond, USA
GraphPad Prism	Fa. GraphPad Software, Inc. USA

Tab. 2.4 Kommerzielle Kits

DNeasy Kit	Qiagen GmbH
ELISA MAX™ (IL-2 und IL-10)	Biolegend
Endotoxinfreies® Plasmid Kit	Qiagen GmbH
Expand™ High Fidelity PCR System	Roche
Gel-Extraction® Kit	Qiagen GmbH
JetPEI® (DNA Transfektionslösung)	Polyplus-transfection
LEGENDplex™ (Multi-Analyte Flow Assay Kit)	Biolegend

MACS® Aufreinigungs Kit	Miltenyi Biotec
PCR Aufreinigungs® Kit	Qiagen GmbH
pGEM® T-Easy Vector System I	Promega
Plasmid® Maxi Kit	Qiagen GmbH
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen GmbH
RNeasy® Mini Kit	Qiagen GmbH
RNase-free DNase Set	Qiagen GmbH

Tab. 2.5: Medien und Reagenzien für zellbiologische Arbeiten

Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium (DMEM)	Gibco By Life Technology
Dulbecco´s Phosphate Puffered Saline (DPBS)	Gibco By Life Technology
PSC Kryomedium (Einfriermedium PBMCs)	Gibco By Life Technology
Recovery Cell Culture Freezing Medium	Gibco By Life Technology
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (1X) + GlutaMAX	Gibco By Life Technology
TexMACS Medium	Miltenyi Biotec

Tab. 2.6 Reagenzien für molekularbiologische Arbeiten

BD Fixierungs- und Permeabilisierungslösung	BD Bioscience
BD Lysispuffer™	BD Bioscience
BD Golgi Stop™ Proteintransportinhibitor mit Monensin	BD Bioscience
BD Permeabilisierungs- und Waschpuffer	BD Bioscience
BD Lysispuffer™	BD Bioscience
BD Färbepuffer	BD Bioscience
Brefeldin A (1.000X)	Biolegend

Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)	Biolegend
Collagenase (Clostridium histolyticum)	Sigma Aldrich
D-Biotin	Invitrogen
Fc-Blockingreagenz	Miltenyi Biotec
ImmunoCult™ CD3/CD28 T-Zellaktivator	Stemcell Technologies
Ionomycin	Sigma Aldrich
Luria Bertani Medium (LB)	Carl Roth GmbH + Co. KG
Monensin	Thermo Fisher Scientific
Oligo(dt) Primer	Invitrogen
Perm./Waschpuffer™ I	BD Bioscience
Peggold DNTP-Mix	Peqlab
peqGreen DNA/RNA Dye	Peqlab
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma Aldrich
Prolong™ Gold antifade reagent with DAPI	Life Technologies
Staphylococcus enterotoxin B (SEB)	Sigma Aldrich

Tab. 2.7: Puffer

FACS Puffer	(1X) PBS + 0,5% BSA
Ficoll Waschpuffer	(1X) PBS + 0,5% BSA
MACS Puffer	(1X) PBS + 0,5% BSA + 2mM EDTA
PBS (1X)	4g NaCl + 0,1g KCl + 0,72g Na ₂ HPO ₄ + 0,12g KH ₂ PO ₄ auf 500ml Wasser, pH 7.2
PBST	0,1% Tween 20 in PBS
TAE Puffer	40 mM Tris-Acetat + 1 mM EDTA, pH 7.5
Trypsinlösung	0,25% Trypsin + 1 mM EDTA in PBS

Tab. 2.8: Antibiotika

Ampicillin	Stammlösung: 100 mg/ml
Kanamycin	Stammlösung: 50 mg/ml
Penicillin-Streptomycin (Pen./Strep.)	Pen.: 10,000 Units/ml Strep.: 10,000 µg/ml

Tab. 2.9: Enzyme

Polymerase Expand	Sigma Aldrich
Q5 DNA Polymerase	New England Biolabs
Restriktionsenzyme	New England Biolabs
Ribonuklease (RNase) A	Sigma Aldrich
RNase Inhibitor	Life Technologies
Superscript® II Reverse Transcriptase	Invitrogen
Taq Polymerase	VWR
T4-DNA-Ligase	Promega

Tab. 2.10: Mikrobeads

Anti-PE Mikrobeads	Miltenyi Biotec
CD3 Mikrobeads	Miltenyi Biotec
CD4 T-Zell-Isolierungs Kit	Miltenyi Biotec
CD154 Mikrobeads	Miltenyi Biotec
T-Zellaktivierungs-/Expansions Kit	Miltenyi Biotec

Tab. 2.11: Humane FACS Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma
Anti-human TCR $\alpha\beta$	PE	IP26	BD Bioscience
CD3	APC/Cy7	UCHT1	Biolegend
CD3	BV510	OKT3	Biolegend
CD3	BV785	OKT3	Biolegend
CD3	PerCP	OKT3	Biolegend
CD4	APC	A161A1	Biolegend
CD4	BB515	RPA-T4	BD Bioscience
CD4	BV510	OKT4	Biolegend
CD4	PE	OKT4	eBioscience
CD4	PerCp	OKT4	Biolegend
CD4	PE-Cy7	OKT4	Biolegend
CD4	PE-Cy7	RPA-T4	BD Bioscience
CD14	BV421	M5E2	Biolegend
CD19	BV605	SJ25C1	Biolegend
CD19	FITC	SJ25C1	Biolegend
CD25	BV421	M-A251	BD Bioscience
CD25	PE/Dazzle	M-A251	Biolegend
CD45RA	BV785	HI100	BD Bioscience
CD45RO	PE-Cy7	HI100	Biolegend
CD49b	BV711	AK-7	BD Bioscience
CD73	PerCp Cy5.5	AD2	Biolegend
CD123	BV711	6H6	Biolegend
CTLA-4	APC	14D3	Invitrogen

Foxp3	FITC	236A/E7	Invitrogen
IL-2	PE-Cy7	MQ1-17H12	eBioscience
IL-2	BV421	MQ1-17H12	Biolegend
IL-2	-	-	Peprotech
IL-6	PE	MQ2-13A5	Biolegend
IL-10	PE	JES3-19F1	Biolegend
IL-10	APC	JES3-19F1	Biolegend
IL-27	-	-	Peprotech
LAG3	BV421	T47-530	BD Bioscience
LEAF™ Purified anti-human CD28	-	CD28.2	Biolegend
LEAF™ Purified anti-human CD40	-	5C3	Biolegend
PD-1	BV650	EH12.2H7	Biolegend
Streptavidin	PE und APC	-	Biolegend
TGFβ-1	-	-	Peprotech
Ultra-LEAF™ Purified anti-human CD3	-	OKT3	Biolegend
Zombie Aqua™ Fixable Visibility Kit	-	-	Biolegend
Zombie NIR™ Fixable Visibility Kit	-	-	Biolegend

Tab. 2.12: Murine FACS Antikörper

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma
Anti-TCR β	PE	REA	Miltenyi Biotec

Tab. 2.13: FACS Antikörperkontrollen

Antikörper	Fluorochrom	Klon	Firma
IgG1, k Istotypkontrolle	PE	MOPC-21	Biolegend
REA Kontrolle	PE	REA	Miltenyi Biotec

Tab. 2.14: Peptide

galK264CII-Peptid	Immundominantes T-Zellepitop auf Kollagen Typ-II, CII 259-273: GIAGFKGEQGPKEP Hergestellt und zur Verfügung gestellt von Prof. Holmdahl (Karolinska Institut, Medical Research Inflammation, Stockholm)
nCII-Peptid	human-nCII H-GIAGFKGEQGPKEP-OH Hergestellt von der Firma Schafer-N

Tab. 2.15: MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe

DR4/gal264CII	DR4 Monomer im Komplex mit galaktosyliertem CII 259-273-Peptid, Galaktosylierung am Lysinrest an Position 264
DR4/HA	DR4 Monomer im Komplex mit immundominantem Hämagglutinin-Peptid (HA306-318: PKYVKQNTLKLAT) des Influenza A Virus H3N2
DR4/nCII	DR4 Monomer im Komplex mit unmodifiziertem CII 259-273-Peptid

Zur Analyse von spezifischen Immunantworten wurden biotinylierte MHC-Klasse-II/Moleküle (humaner HLA-Lokus DR4) im Komplex mit spezifischen Peptidantigenen verwendet. Alle MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe wurden von Prof. Rikard Holmdahl (Karolinska Institut, Medical Research Inflammation, Stockholm) zur Verfügung gestellt. Mit Hilfe eines Biotinrests an der DR4 α -Kette, konnten die Monomere bei Bedarf durch die Interaktion mit Streptavidin zu Tetrameren multimerisiert werden.

Tab. 2.16: MACS Selektion

CD3 Mikrobeads	Miltenyi Biotec
CD4 Mikrobeads	Miltenyi Biotec

Tab. 2.17: Plasmide (Vektorkarten siehe Anhang)

Bezeichnung	Firma
pGEM®-T Easy Vector pMK-Vektor SIEW-Vektor M334 (<i>gag/pol</i>) VSV-G (<i>envelope</i>)	Promega Geneart Georg-Speyer-Haus (Dr. Stefan Stein) Georg-Speyer-Haus (Dr. Stefan Stein) Georg-Speyer-Haus (Dr. Stefan Stein)

Tab. 2.18: Bakterienstämme

Stamm	Firma
<i>E. coli</i> DH5 α	Invitrogen

Tab. 2.19: Oligonukleotide

	Name	Sequenz (5' - 3')
Primer Einzelzell-PCR zur Amplifikation der variablen Region des humanen T-Zell-Rezeptors		
TCR α - 1. Runde	V α -114-for-out	AGS AGC CTC ACT GGA GTT G
	V α -1235-for-out	CTG AGG TGC AAC TAC TCA TC
	V α -2-for-out	CAR TGT TCC AGA GGG AGC C
	V α -3,25-for-out	GAA RAT GYC WCC ATG AAC TGC
	V α -4,20-for-out	WTG CTA AGA CCA CCC AGC C
	V α -5-for-out	AGA TAG AAC AGA ATT CCG AGG
	V α -6,14-for-out	RYT GCA CAT ATG ACA CCA GTG
	V α -7-for-out	CAC GTA CCA GAC ATC TGG G
	V α -8,21-for-out	CCT GAG YGT CCA GGA RGG
	V α -9-for-out	GTG CAA CTA TTC CTA TTC TGG
	V α -10,24-for-out	AST GGA GCA GAG YCC TCA G
	V α -11-for-out	TCT TCA GAG GGA GCT GTG G
	V α -12-for-out	GGT GGA GAA GGA GGA TGT G
	V α -13,19,26-for-out	SAA STG GAG CAG AGT CCT C
	V α -15-for-out	CCT GAG TGT CCG AGA GGG
	V α -16-for-out	ATG CAC CTA TTC AGT CTC TGG

	V α -17-for-out	TGA TAG TCC AGA AAG GAG GG
	V α -18-for-out	GTC ACT GCA TGT TCA GGA GG
	V α -22,31-for-out	CCC TWC CCT TTT CTG GTA TG
	V α -23,30-for-out	GGC ARG AYC CTG GGA AAG G
	V α -27-for-out	CTG TTC CTG AGC ATG CAG G
	V α -28-for-out	AGA CAA GGT GGT ACA AAG CC
	V α -29-for-out	CAA CCA GTG CAG AGT CCT C
	V α -32-for-out	GCA TGT ACA AGA AGG AGA GG
	C α -rev-out	GCA GAC AGA CTT GTC ACT GG
	TCR α – 2. Runde	V α -4/1-for-in
V α -4/2-for-in		GTC CAG TAC CTT GAT CCT GC
V α -6-for-in		GCA AAA TGC AAC AGA AGG TCG
V α -8/1-for-in		CAG TGC CTC AAA CTA CTT CC
V α -8/2-for-in		GCC TCA GAC TAC TTC ATT TGG
V α -14-for-in		ACA GAA TGC AAC GGA GAA TCG
V α -24-for-in		CCT TCA GCA ACT TAA GGT GG
V α -28-for-in		TCT CTG GTT GTC CAC GAG G
V α -2/1-for-in		TGG AAG GTT TAC AGC ACA GC
V α -2/2-for-in		TGG AAG GTT TAC AGC ACA GG
V α -5-for-in		CAG CAT ACT TAC AGT GGT ACC
V α -10-for-in		TCA CTG TGT ACT GCA ACT CC
V α -12-for-in		TAC AAG CAA CCA CCA AGT GG
V α -22-for-in		AGG CTG ATG ACA AGG GAA GC
V α -31-for-in		GTG GAA TAC CCC AGC AAA CC
V α -7-for-in		CTC CAG ATG AAA GAC TCT GC
V α -13-for-in		TTA AGC GCC ACG ACT GTC G
V α -17-for-in		CTG TGC TTA TGA GAA CAC TGC
V α -18-for-in		CC TTA CAC TGG TAC AGA TGG
V α -21-for-in		TGC TGA AGG TCC TAC ATT CC
V α -23-for-in		GTG GAA GAC TTA ATG CCT CG
V α -32-for-in		TCA CCA CGT ACT GCA ATT CC

	V α -3-for-in	TTC AGG TAG AGG CCT TGT CC
	V α -11-for-in	AGG GAC GAT ACA ACA TGA CC
	V α -15-for-in	CCT CCA CCT ACT TAT ACT GG
	V α -19-for-in	CCT GCA CAT CAC AGC CTC C
	V α -25-for-in	AGA CTG ACT GCT CAG TTT GG
	V α -26-for-in	CCT GCA TAT CAC AGC CTC C
	V α -29-for-in	ACT GCA GTT CCT CCA AGG C
	V α -1/235-for-in	AAG GCA TCA ACG GTT TTG AGG
	V α -1/14-for-in	CTG AGG AAA CCC TCT GTG C
	V α -9-for-in	ATC TTT CCA CCT GAA GAA ACC
	V α -16-for-in	TCC TTC CAC CTG AAG AAA CC
	V α -20-for-in	ACG TGG TAC CAA CAG TTT CC
	V α -27-for-in	ACT TCA GAC AGA CTG TAT TGG
	V α -30-for-in	CTC TTC ACC CTG TAT TCA GC
	C α -rev-in	AG TCT CTC AGC TGG TAC ACG
TCR β - 1. Runde	VP1-for	TSY TTT GTC TCC TGG GAG CA
	VP2-for	CCT GAA GTC GCC CAG ACT CC
	VP3-for	GTC ATS CAG AAC CCA AGA YAC C
	VP4-for	GGW TAT CTG TMA GMG TGG AAC CTC
	VP5-for	ATG TAC TGG TAT CGA CAA GAY C
	VP6-for	CAC TGT GGA AGG AAC ATC AAA CC
	VP7-for	TCT CCA CTC TSA AGA TCC AGC
	VP8-for	CAG RAT GTA RAT YTC AGG TGT GAT CC
	VP9-for	CCA GAC WCC AAR AYA CCT GGT CA
	C β -out-rev	TGG TCG GGG AAG AAG CCT GTG
TCR β - 2. Runde	VP1-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A TSY TTT GTC TCC TGG GAG CA
	VP2-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A CCT GAT GTCGCC CAG ACT CC
	VP3-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A GTC ATS CAG AAC CCA AGA YAC C
	VP4-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A GGW TAT CTG TMA GMG TGG AAC CTC
	VP5-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A ATG TAC TGG TAT CGA CAA GAY C

	VP6-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A CAC TGT GGA AGG AAC ATC AAA CC
	VP7-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A TCT CCA CTC TSA AGA TCC AGC
	VP8-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A CAG RAT GTA RAT YTC AGG TGT GAT CC
	VP9-up-for	ACA GCA CGA CTT CCA AGA CTC A TCA GAC WCCAAR AYA CCT GGT CA
	C β -in-rev	TCT GAT GGC TCA AAC ACA GC
Humane Primer für die quantitative PCR		
	c-Maf_for	CAGCTCACGATTCTGGGG
	c-Maf_rev	CAGCGGCTTGGGTTACTCA
	IL10_for	TCAAGGCGCATGTGAACTCC
	IL10_rev	GATGTCAAACCTCACTCATGGCT
	IL10R α _for	GAGATCCACAATGGCTTCATCC
	IL10R α _rev	TTCTCCAGAGGTTAGGAGGCT
	MALAT1_for	GACGGAGGTTGAGATGAAGC
	MALAT1_rev	ATTCGGGGCTCTGTAGTCCT
	PRDM1 α _for	TCAAACCTCAGCCTCTGTCCA
	PRDM1 α _rev	TCCAGCACTGTGAGGTTTCA
	S26_for	CTGAAGCGAGCGTCTTCGAT
	S26_rev	TGAATTGCACAACTCACACAGTA
	TGF β 1_for	CTAATGGTGGAAACCCACAACG
	TGF β 1_rev	TATCGCCAGGAATTGTTGCTG

2.1.1 Verwendete Zellen

Primäre Zellen

Es wurden mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut (*Peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) eines gesunden Blutspenders oder eines RA-Patienten (beide HLA-DRB1*04:01) mittels Dichte-Gradienten-Zentrifugation (s. 2.2.2.2) isoliert. Ein entsprechendes Ethikvotum des Universitätsklinikums Frankfurt/IME Fraunhofer-TMP für die Verarbeitung des primären Materials liegt vor (Ethik-Kommission des Fachbereichs Medizin, Geschäfts-Nr. 19/15). Alle Patienten wurden anhand eines Informationsblattes durch den behandelnden Arzt aufgeklärt und haben ihr schriftliches Einverständnis zur Verwendung des Gewebes gegeben.

Zelllinien

Murine T-Zell-Hybridome:

Für die Generierung von antigenspezifischen T-Zell-Hybridomen wurden HLA-DR4 und CD4 (human) transgene Mäuse mit dem CII-Peptid 261-273 (100 µg) mittels intradermaler Injektion in den Schwanz immunisiert. Nach 10 Tage wurden die Lymphknoten entnommen und die Zellen in Einzelzellsuspension *in vitro* restimuliert (2×10^6 Zellen pro 24-Lochplatte mit 100 µg CII-Peptid 261–273 pro Loch). Weitere 48 Std. später wurden die Zellen mit der immortalen T-Zell-Rezeptor α/β negativen Zelllinie BW5147 (ATCC® TIB-47™) fusioniert. Um T-Zell-Hybridome mit unterschiedlichen Epitopspezifitäten zu isolieren, wurden die Zellen mittels ELISA (beschichtet mit dem CII-Peptid 261-273 mit verschiedenen Zuckermodifikationen) und IL-2 Sekretion selektioniert (a Corthay et al. 1998; Dzhabazov et al. 2005). In dieser Arbeit wurden T-Zell-Hybridome, die restriktiv spezifisch für das galaktosylierte CII-Peptid an Position K264 sind (mDR1.1) und welche, die nur mit dem unmodifizierten CII-Peptid aktivierbar sind (3H8), verwendet. Die T-Zell-Hybridome wurden von Prof. Rikard Holmdahl (Karolinska Institut, Medical Research Inflammation, Stockholm) zur Verfügung gestellt.

Transgene murine Makrophagen:

Die murine P388D1 Makrophagen ähnliche Zelllinie (ATCC® TIB-63™) wurde stabil (G418 Selektion) mit cDNA Plasmiden, die für folgende humane Gene kodieren, transfiziert: HLA-DRA1*01:01 und HLA-DRB1*04:01. In dieser Arbeit wurde die Makrophagen Zelllinie BL25 verwendet, die das oben beschriebene Transgen exprimiert. Die Makrophagen Zelllinie wurde von Prof. Inga Melchers (Abteilung für Rheumatologie und klinische Immunologie, Albert-Ludwig Uniklinik Freiburg) zur Verfügung gestellt.

HEK293T:

Hierbei handelt es sich um humane embryonale Nierenkarzinomzellen, die mit dem Adenovirus E1A-Genprodukt künstlich transformiert wurden (ATCC® CRL-3216™). Die Transduktionseffizienz der HEK293T liegt bei 70 – 90%, weshalb sie für die Virusproduktion als Verpackungszelllinie verwendet wird.

Jurkat-Wildtyp (WT):

Jurkat-Zellen sind humane Leukämie-T-Lymphozyten, die immortalisiert wurden, um unter anderem T-Zellsignalwege zu entschlüsseln (ATCC® CRL-2902™). Jurkat-Zellen können Interleukin-2 (IL-2) produzieren und sezernieren, ähneln stark den primären T-Zellen und zählen zu den am weitesten verbreiteten zellulären T-Zellmodellen.

Jurkat-76:

Der Jurkat-76 Zelllinie fehlt im Gegensatz zu der Jurkat-WT Zelllinie die endogene α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors (TCR). Die Defizienz des endogenen T-Zell-Rezeptors erlaubt die Expression von transgenen Rezeptorketten und ermöglicht so die Analyse von antigenspezifischen Immunantworten. Die Zelllinie wurde von der Firma TRON aus Mainz zur Verfügung gestellt (Simon et al. 2014).

2.2 METHODEN

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolation von RNA

Für die Isolierung der RNA wurde das RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zum Schluss wurde die RNA-Konzentration gemessen und die RNA entweder bei - 20 °C gelagert oder sofort in cDNA umgeschrieben.

2.2.1.2 Reverse Transkription von mRNA

Die reverse Transkription von zellulärer Gesamt-mRNA in cDNA wurde mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase (SuperScript II) durchgeführt. Einzelzellen wurden in 4 µl Sortpuffer (75 µl PBS, 75 µl H₂O, 1,5 µl DTT und 4 µl RNase Inhibitor (20 U/µl)) am Durchflusssystem sortiert und mit folgendem Protokoll in cDNA umgeschrieben:

4 µl	Sortpuffer + Einzelzelle
0,4 µl	Randomprimer (150 ng)
1 µl	Oligo dt (0,5 µg)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
4,1µl	H ₂ O (RNase free)
65 °C	5'
4 °C	Pause
	runter zentrifugieren
3µl	5x RT Puffer
1µl	DTT (0,1 M)
0,5 µl	RNase Inhibitor (20 U)
42 °C	2'
	Pause
0,25 µl	SuperScript II
25 °C	10'
42 °C	50'
70 °C	15'
4 °C	Pause

2.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*Polymerase chain reaction*, PCR) wird eingesetzt, um einen kurzen, genau definierten Teil eines DNA-Stranges mittels Oligonukleotiden („Primer“) zu vervielfältigen. Diese Primer sind komplementär zum zu amplifizierenden DNA-Strang und flankieren die Sequenz. Je nach PCR-Programm wiederholen sich die verschiedenen Phasen der PCR in einer bestimmten Anzahl von Zyklen, wodurch der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell vervielfältigt wird.

Für einen PCR-Ansatz wird Folgendes benötigt: die zu vervielfältigende Original-DNA-Vorlage, Primer für beide Stränge, DNA-Polymerase zur Replikation, Nukleotide als Synthese-Bausteine und eine Pufferlösung für eine optimale Enzymaktivität. Die Standardbedingungen einer PCR beinhalten die initiale Denaturierung bei 94 °C für 2 Min., die wiederholte Denaturierung bei 94 °C für 30 Sek., die Primeranlagerung bei 58 °C für 30 Sek., die Elongation/Amplifikation bei 72 °C für 1 Min. (über 35 Zyklen), die finale Elongation bei 72 °C für 10 Min. und die anschließende Lagerung bei 4 °C.

Einzelzell-PCR der variablen Region des T-Zell-Rezeptors

Antigenspezifische T-Zellen wurden mittels T-Zellaktivierungsversuch oder Tetramerfärbung (Oberflächenmarkierung) identifiziert, einzeln am Durchflusszytometer (BD FACS Aria) in eine 96-Loch-PCR-Platte sortiert und anschließend bei – 80 °C asserviert. Eine separate Isolation der RNA war nicht notwendig, da die Einzelzellen durch den Einfrier-/Auftauvorgang platzen, weshalb direkt mit der reversen Transkription der mRNA in cDNA begonnen werden konnte. Für die Amplifikation von Gensegmenten (hier: variable Region des T-Zell-Rezeptors) aus Einzelzellen werden zwei PCR-Runden benötigt. Für die Amplifikation der variablen Region der α - und der β -Kette des T-Zell-Rezeptors wurde jeweils ein Pool aus spezifischen Primern verwendet. Verschiedene 5'- Primer repräsentieren die Gensegmentfamilien der variablen ($V\alpha$ - bzw. $V\beta$ -) Regionen der humanen T-Zell-Rezeptoren. In der 1. Runde wurden alle 24 5'- Primer ($V\alpha$ -Region-spezifisch) mit einem in der konstanten Region liegenden 3'- Primer ($C\alpha$ -rev-out) eingesetzt. In der 2. Runde wurden Pools gebildet, die 7 bis 8 Primer enthielten, diese wurden gemeinsam mit einem in der konstanten Region liegenden 3'- Primer ($C\alpha$ -rev-in) gemischt (Han et al. 2014). So wurde ein für jede TCR α -Kette spezifisches PCR-Produkt zwischen 250 und 400 bp amplifiziert. Die TCR β -PCR-Produkte, die mittels spezifischer 5'- Primer für 9 $V\beta$ -Regionen und dem konstanten 3'- Primer ($C\beta$ -out-rev) amplifiziert wurden, waren ebenfalls zwischen 250 und 400 bp groß (Kim et al. 2012). Folgendes Pipettierschema und PCR-Protokoll wurde für die zwei Einzelzell-PCR-Runden verwendet:

1. Runde	1x	PCR-Protokoll:	
cDNA Template	3,5 µl	94 °C	2'
dNTP (10 mM)	2 µl	94 °C	30"
Primer Mix (2,5 µM)	2 µl	55 °C	30"
Puffer 3 ⁻	4 µl	72 °C	55"
MgCl (25 mM)	4 µl	72 °C	5'
H ₂ O	33,5 µl	4 °C	Pause
Polymerase Expand (3 U)	1 µl		
Gesamt	50 µl	50 Zyklen	

2. Runde	1x	PCR-Protokoll:	
Template	3,5 µl aus 1. Runde	94 °C	2'
dNTP (10 mM)	0,5 µl	94 °C	30"
Primer for (einzeln, 2,5 mM)	2 µl	58 °C	30"
Primer rev (2,5 mM)	2 µl	72 °C	45"
Puffer 2 ⁺	5 µl	72 °C	5'
MgCl (25 mM)	1 µl	4 °C	Pause
H ₂ O	35,7 µl		
Polymerase Expand (1 U)	0,3 µl	50 Zyklen	
Gesamt	50 µl		

Aufreinigung von PCR-Fragmenten mittels Gel-Extraktion

Zur Aufreinigung von PCR-Fragmenten wurde das QIAquick® PCR Aufreinigungskit verwendet, das die Aufreinigung von bis zu 10 µg eines PCR Produktes (100 bp bis 10 kb) ermöglicht. Hier wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet (QIAquick® PCR Purification Kit, Qiagen).

2.2.1.4 Quantitative PCR (qPCR)

Mittels der quantitativen PCR (qPCR) kann die Anhäufung amplifizierter Produkte während des Reaktionsprozesses in realer Zeit verfolgt werden. Hierbei wird die Menge der vorhandenen DNA-Kopien eines Zielgens bestimmt. Durch einen Fluoreszenzfarbstoff, in diesem Fall SYBER Green, erfolgt die Detektion der PCR-Produkte. Die qPCR-Läufe von c-Maf, IL-2, IL-10, IL10R α , PRDM-1 und TGF- β wurden an einem Step One Plus Real Time PCR System von Applied Biosystem durchgeführt. Hier wurde die Methode der „*quantitativen comparative* C_T ($\Delta\Delta C_T$)“ verwendet, bei der die relative Expression eines Zielgens zu einer Referenz verglichen wird. Als *Housekeeping*-Gen zur Normalisierung der cDNA-

Ausgangskonzentration zwischen den Vergleichsproben wurde das ribosomale S26 verwendet.

	1x	PCR- Protokoll:		
cDNA Template (ca. 100 ng)	1 µl	95 °C	20"	1 Zyklus
5´ Primer (10 µM)	0,375 µl			
3´ Primer (10 µM)	0,375 µl	95 °C	3"	
SYBER Green	7,5 µl	60 °C	30"	40 Zyklen
H ₂ O	5,75 µl			
Gesamt	15 µl	95 °C	15"	
		60 °C	1'	1 Zyklus
		95 °C	15"	

Nach der qPCR wurde der Schwellenwert für die Signale auf 0,2 gesetzt und die entsprechenden C_T -Werte (*Threshold cycle*) für die Analyse verwendet. Somit können die relativen cDNA-Mengen in den verschiedenen Proben miteinander verglichen werden. Bei kleinen C_T -Werten sind nur wenige Zyklen notwendig, um den Schwellenwert zu überschreiten, d.h. es ist eine größere cDNA-Menge vorhanden, wobei es bei großen C_T -Werten genau umgekehrt ist. Alle Proben wurden als Duplikate erstellt.

2.2.1.5 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese können 0,5 - 25 kb große DNA-Fragmente in 0,2 - 2%-igen (w/v) Agarosegelen voneinander getrennt werden. Dies ist möglich, da die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren bei neutralem pH-Wert negativ ionisiert vorliegen, wodurch DNA, abhängig von ihrer Molekulargröße, Konformation und auch Kettenlänge, unterschiedlich schnell im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandert. Die aufzutrennenden DNA-Fragmente können durch das Mitführen eines DNA-Standards bekannter Größe annähernd zugeordnet werden.

Für den Nachweis der in der PCR amplifizierten DNA wurden in der vorliegenden Arbeit 0,5 – 2%-ige (w/v) Agarosegele, in Tris/Borsäure/EDTA (TBE)-Elektrophoresepuffer verwendet, der ebenfalls als Laufpuffer diente. Zum Auflösen der Agarose wurde diese in dem TBE-Puffer für 2 Min. in der Mikrowelle aufgekocht, unter Rühren abgekühlt und mit peqGreen RNA/DNA Dye versetzt. Das peqGreen RNA/DNA Dye interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Die lauwarmer Lösung wurde in die Gelkammer gegossen (12 x 14 cm PerfectBlue™ Gelsystem Mini L, Peqlab). Nach Durchführung der PCR wurden 10 - 20 µl der Proben mit OrangeG (6X) Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Gels aufgetragen. Als Größenstandard diente ein DNA-Standard (DNA-Leiter 100 bp oder 1 kbp, Roth). Die

Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 120 V und 200 mA für 45 Min.. Nach der Auftrennung wurde das Gel unter UV-Licht (365 nm) am Azure Biosystem Geldokumentationsgerät fotografiert.

Mit Hilfe des QIAEX® II Gel Extraktionskits (Qiagen) wurde DNA aus den Agarosegelen geschnitten. Das Protokoll ist für das Aufreinigen von DNA-Fragmenten von 40 bp bis zu 50 kb geeignet. Die DNA-Banden wurden mit einem scharfen Skalpell aus dem Agarosegel geschnitten und in einem 1,5 ml Gefäß verstaut. Dann wurde das 1,5 ml Gefäß mit dem DNA-Agarosegel gewogen und die Gelextraktion nach Angaben des Herstellers (QIAEX® II Gel Extraktionskit, Qiagen) durchgeführt.

2.2.1.6 Klonierung in den pGEM-Vektor

Zur Zwischenklonierung von PCR-Fragmenten wurde das pGEM-T-Easy-Vektor-System (Promega) verwendet. Der Klonierungsvektor pGEM mit überhängenden 3' T-Enden zeichnet sich durch eine schnelle und effiziente Ligation aus. Bei 72 °C wurde das PCR-Fragment für 20 Min. mit einer Taq-Polymerase inkubiert, die aufgrund ihrer terminalen Transferase-Aktivität und mit Hilfe des 10X PCR Puffers und dNTPs zusätzliche 3' Adenosinüberhänge an die neu-synthetisierte DNA angefügt. Anschließend konnte das PCR-Fragment in den pGEM-Vektor zwischenkloniert werden. Der Ligationsansatz bestand aus 1 µl pGEM-Vektor (10 ng), 3,5 µl des PCR-Fragmentes, 5 µl 2X Puffer (Rapid Ligationspuffer) und 0,5 µl Ligase. Die Ligationsreaktion erfolgte bei Raumtemperatur für 2 Std. mit nachfolgender Transformation in kompetente Bakterien.

2.2.1.7 Transformation chemisch kompetenter Bakterienstämme

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu erhalten, wurden die kompetenten DH5α-Bakterien mit der benötigten Plasmid-DNA transformiert und expandiert. Für die Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA wurde ein Aliquot chemisch kompetenter Bakterien auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 100 µl kompetenter Bakterien und 3 µl Plasmid-DNA aus dem Ligationsansatz wurden die Bakterien für 20 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 Sek. bei 42 °C. Dieser Vorgang ist notwendig, damit die Bakterienzellmembran permeabel wird und das Plasmid in die Zelle eindringen kann. Dann wurden die Zellen nochmal für 1 Min. auf Eis inkubiert, bis die Zugabe von 400 µl SOC Medium erfolgte. Daraufhin wurden die Zellen für 1 Std. bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Nach 1 Std. wurde 200 - 300 µl der Bakteriensuspension auf die LB-Agarplatte mit Selektionsantibiotikum ausplattiert.

2.2.1.8 Kultivierung und Selektion von Bakterienstämmen

Für die Kultivierung von Bakterien auf Nährböden wurden LB-Agarplatten, die das Selektionsantibiotikum Ampicillin oder Kanamycin enthielten, verwendet. Hierfür wurden für Transformationen 200 - 300 µl und für Retransformationen 10 µl der Bakteriensuspension aus der Transformation ausplattiert. Im Anschluss erfolgte über Nacht die Inkubation der LB-Platten bei 37 °C im Bakterienbrutschrank. Nur erfolgreich transformierte Bakterienzellen mit dem integrierten pGEM-Vektor tragen eine Ampicillin-Antibiotikaresistenz in sich und können somit auf den entsprechenden Selektionsplatten wachsen und Kolonien bilden. Für eine nachfolgende Maxi-Plasmidpräparation wurde eine Kolonie ausgewählt und zur Vorkultivierung in 3 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg Ampicillin/ml) versetzt. Es folgte eine Inkubation über 6 Std. im Schüttler bei 37 °C und 150 rpm. Am Abend wurde die 3 ml Bakteriensuspension in eine 500 ml Flasche, mit 100 ml LB-Medium und entsprechendem Antibiotikum überführt und über Nacht bei 37 °C und 150 rpm inkubiert. Für eine Mini-Plasmidpräparation wurde eine Bakterienkolonie in je 3 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum gegeben und über Nacht, wie oben beschrieben, inkubiert.

2.2.1.9 Isolierung von Plasmid DNA

Minipräparation

Zur Isolation kleiner Mengen an Plasmid-DNA wurde das Qiagen Minipräparationskit verwendet. Dieses Protokoll ist für die Aufreinigung von bis zu 20 µg Plasmid-DNA aus 1 - 5 ml E. Coli Übernachtskultur in LB-Medium. Alle Schritte wurden nach den Angaben des Herstellers (Qiagen) durchgeführt.

Endofree Maxi-Präparation

Zur Isolation von großen Mengen an Plasmid-DNA wurde das Qiagen Endofree® Plasmid Maxikit (Qiagen) verwendet. Das empfohlene maximale LB-Kulturvolumen liegt bei *high-copy* Plasmiden bei 100 ml und bei *low-copy* Plasmiden bei 250 ml. Die Übernachts-Bakterienkultur wurde bei 4000 x g für 15 Min. bei 4 °C zentrifugiert und in 10 ml Resuspensionpuffer (Puffer P1) resuspendiert. Als nächstes wurden 10 ml Lysispuffer (Puffer P2) hinzugegeben, das 50 ml Zentrifugenröhrchen 4 - 6-mal invertiert und bei RT für 5 Min. inkubiert. Während der Inkubationszeit wurde ein auswechselbarer Drehverschluss am Ende des QIAfilters befestigt. Anschließend wurde 10 ml kalter P3 Puffer in das Gemisch pipettiert, das Zentrifugenröhrchen 4 - 6-mal invertiert, bis die gesamten 30 ml in die Öffnung des QIAfilters gefüllt wurden und das Lysat für weitere 10 Min. bei RT inkubiert wurde. Danach wurde der Verschluss am Ende des QIAfilters abgeschraubt und das Lysat, mit Hilfe eines Stopfers, durch den QIAfilter in ein neues 50 ml Zentrifugenröhrchen gedrückt. Zu dem filtrierten Lysat wurde 2,5 ml Endotoxin

Entfernungspuffer (ER Puffer) hinzugegeben und nach 10-maligem invertieren wurde das Gemisch 30 Min. auf Eis inkubiert. Während dieser Zeit wurde das QIAGEN-tip 500 mit 10 ml Equilibrierungspuffer (QBT Puffer) equilibriert und nach der Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat ebenfalls auf den QIAGEN-tip pipettiert. Die DNA wurde im QIAGEN-tip aufgefangen. Nach zweimaligem Waschen mit QC Puffer wurde die DNA mit 15 ml Elutionspuffer (QN Puffer) eluiert. Zur Fällung der DNA wurden 10,5 ml raumtemperiertes Isopropanol zur eluierten DNA gegeben und bei 4000 x g für 1 Std. zentrifugiert. Daraufhin wurde das DNA-Pellet mit 5 ml 70%-igem, raumtemperiertem, endotoxinfreiem Ethanol gewaschen und erneut bei 4000 x g für 30 Min. zentrifugiert. Im letzten Schritt wurde das Pellet 5 - 10 Min. an der Luft getrocknet und die DNA in 75 µl endotoxinfreiem TE Puffer gelöst.

2.2.1.10 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zur Sequenzierung von doppelsträngiger DNA wurde die Didesoxynukleotid-Kettenabbruchmethode (Sanger und Coulson 1975) angewandt. Die Durchführung erfolgte durch die Firma SeqLab-Microsynth in Deutschland. Erhaltene Sequenzen wurden mit dem Programm IMG/Quest analysiert.

2.2.1.11 RNA-Isolation und Sequenzierung

Aus jeweils ca. 2000 in Puffer RLT plus (Qiagen) sortierten Zellen wurde die Gesamt-RNA mit dem QIASymphony SP Gerät (Qiagen) automatisiert und mittels dem QIASymphony RNA Kit isoliert. Die Qualität der isolierten RNA sowie die Quantifizierung wurden auf dem FEMTO Pulse Kapillarelektrophore-Instrument (Agilent) mit dem Ultra Sensitivity RNA Kit (Agilent) geprüft.

Von jeweils 200 pg RNA wurde mit dem SMART-Seq v4 Ultra-Low Input RNA Kit (Takara) cDNA in 15 Amplifikationszyklen synthetisiert, von dieser wurden je 0,5 ng für die Präparation der Sequenzierbibliotheken mit dem Nextera XT Kit nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Sequenzierung wurde im *single-read* Modus mit einer *Readlänge* von 50 Basen und einer durchschnittlichen Sequenziertiefe von 25 Mio. *Reads* pro Probe auf dem HiSeq2500 (Illumina) durchgeführt. Nach dem *Demultiplexing* mit der Illumina bcl2fastq-1.8.4 Software mit Standardeinstellungen (mindestens 90% Sequenzübereinstimmung und keine *Mismatches* im Sequenzierbarcode), wurden alle *Reads* qualitätsbasiert *getrimmt* um potentielle Kontaminationen, Sequenzieradapter und *Reads* mit geringer Qualität rauszufiltern. Hierfür wurde die BBDuk Software aus dem BBDuk Paket Version 34.41 (<https://sourceforge.net/projects/bbmap/>) verwendet. Um den Qualitätsfiltern zu genügen, musste die *Readqualität* höher als Phred Score 20 mit einer minimalen Länge von 50 bp nach Qualitäts- und Adapter*trimming* sein. Zusätzlich wurde jede Probe vor und nach dem *Trimming*

mit der FastQC Software (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) auf die Qualität hin überprüft. Die FastQC Software überprüft die Sequenzierqualität pro Base, die durchschnittliche Basenzusammensetzung, den GC Gehalt, die Verteilung der Sequenzierlänge und die Adapterkontaminationen nach dem *Trimmen*.

Quantifizierung

Alle *Reads* wurden gegen das humane Referenzgenom (GRCh38) mit NextGenMap 0.5.5 unter Verwendung von Standardeinstellungen *gemappt*. Die Quantifizierung der Gene in RPKM (*Reads per kilobase of exon model per million gemappter Reads* nach Mortazavi et al. (Mortazavi et al. 2008) wurde nur mit „*unique*“ gemappten *Reads* unter der Verwendung der Gencode annotation v21 mit dem Python Skript „*rpkmforgenes.py*“ aus dem RSeQC Paket (Wang, Wang und Li 2012) durchgeführt.

Zu jedem rpkm-quantifizierten Wert wurde 1 addiert, um bei Bildung des Quotienten die Teilung durch 0 zu vermeiden. Um die relative Änderung (*Fold Change, FC*) zu berechnen, wurde der Quotient der rpkm-Werte zwischen Test- und Referenzbedingung gebildet. Aus diesem Wert wurde der log₂-Wert errechnet. Als Filterkriterium wurde ein *fold change* von 2 oder -2 gesetzt, um über die verschiedenen Bedingungen möglichst differentiell regulierte Gene zu identifizieren. Die mRNA-Sequenzierung wurde von der Firma Fraunhofer Institute for Interfacial Engineering and Biotechnology IGB in Stuttgart durchgeführt.

2.2.1.12 Klonierung des T-Zell-Rezeptors in den SIEW-Vektor

Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Restriktionsenzyme erkennen spezifische, meist palindromische Basensequenzen und schneiden an diesen Sequenzen einen DNA-Doppelstrang. Die Schnittstelle für die Restriktionsenzyme wurde durch die Primer in die Sequenz eingebracht. Alle in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme hinterlassen überhängende Enden („*sticky ends*“). Nachfolgend sind die verwendeten Restriktionsenzyme, die Schnittstellensequenzen und das Temperaturoptimum angegeben:

Restriktionsenzym	Schnittstellensequenz	Temperaturoptimum
SacII	5'...CC GC↓GG...3' 3'...GG↑CG CC...5'	37 °C
PasI	5'...CC↓CWG GG...3' 3'...GG GWC↑CC...5'	55 °C

Der Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte in den vom Hersteller empfohlenen Inkubationspuffern in einem Zeitraum von 1 Std. bei dem Temperaturoptimum

des jeweiligen Enzyms (s. Tabelle). Da beide Enzyme unterschiedliche Temperaturoptima besitzen, wurden 37 °C verwendet. Für den Doppelverdau wurde der Pasi Puffer verwendet. 1 µg DNA wurde mit 0,4 µl (20 U) SacII, 1 µl Pasi (10 U) und 5 µl Puffer (ad 50 µl mit VE-Wasser) für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Mit Hilfe eines präparativen Agarosegels wurden die verdauten Gelbanden und der linearisierte Vektor isoliert und mittels Gelextraktion aufgereinigt. Anschließend wurde das Insert, welches für die TCR-Sequenz kodiert, in den linearisierten SIEW-Backbone ligiert:

$$\frac{30 \text{ ng SIEW-Backbone} \times 1900 \text{ bp Größe des Inserts}}{9600 \text{ bp Größe des SIEW-Backbones}} \times 3 = 17,81 \text{ ng}$$

Es wurden 30 ng und 100 ng des SIEW-Backbones und der 3- und 6-fache Überschuss an Insert, jeweils mit 0,5 µl T4 Ligase und 5 µl Rapid Ligasepuffer (Promega), in einem Gesamtvolumen von 10 µl verwendet. Die Ligation erfolgte für 2 Std. bei RT. Dann wurde eine Transformation in die DH5α-Bakterien durchgeführt. Am nächsten Tag wurden die Klone, die auf der LB-Platte mit Ampicillin wuchsen entnommen und in LB-Medium mit Ampicillin vervielfältigt. Es folgte eine DNA-Minipräparation und eine anschließende Sequenzierung der Proben.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Suspensionszellen

Jurkat-Zelllinien wurden in RPMI Medium mit Glutamax, 0,1% Pen./Strep. (50 U/ml Penicillin, 50 mg/ml Streptomycin) sowie 10% inaktiviertem (56 °C, 30 Min.) fötales Kälberserum (FKS) bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Zellinkubator kultiviert. T-Zell-Hybridome wurden in DMEM mit 5% FKS und 0,1% Pen./Strep. kultiviert. Die Zelllinien wurden drei Mal pro Woche im Verhältnis von 1:40 in eine neue Kulturflasche passagiert.

Adhärente Zellen

Adhärente Zelllinien (HEK293T, transgene Makrophagen Zelllinie BL25) wurden bei 37 °C und 5% CO₂ in einem Zellinkubator in DMEM-Medium mit 10% inaktiviertem FKS und 0,1% Pen./Strep. kultiviert. Für das weitere Passagieren (3-mal die Woche) wurden die adhärennten Zellen mit PBS gewaschen und mittels einer Trypsinlösung (0,25% in PBS) von der Zellkulturflasche abgelöst. Durch die Zugabe von frischem Medium wurde die enzymatische

Reaktion abgestoppt, da das darin befindliche FKS Proteaseinhibitoren enthält, die inaktivierend auf Trypsin wirken. Die Zellen wurden in einem geeigneten Verhältnis (1:10) in frischem Medium verdünnt und in eine neue Kulturflasche überführt.

2.2.2.2 Isolierung von PBMCs aus humanem Vollblut mittels Ficoll Dichtegradientenzentrifugation

Die Dichtegradientenzentrifugation dient der Isolierung von PBMCs aus humanem Vollblut, indem die zellulären Bestandteile während der Zentrifugation aufgrund der jeweiligen Dichteunterschiede in unterschiedliche Phasen aufgetrennt werden. Dafür wurden spezielle Ficollröhrchen oder Leucosepröhrchen verwendet. Voraussetzung ist die Verwendung eines Antikoagulans wie z.B. EDTA, Citrat oder Heparin, um die Blutgerinnung zu verhindern. In dieser Arbeit wurden die Blutproben in EDTA-Röhrchen akquiriert. Zur Isolierung wurde zunächst 15 ml Ficoll-Plaque™ (Dichte 1,007 g/cm³) in einem 50 ml Leucosep-Röhrchen mit Filter für 30 Sek. bei 1000 x g und RT zentrifugiert. Anschließend wurde das Spenderblut mit EDTA Waschpuffer (2 mM EDTA in PBS, pH 7,2, steril filtriert) verdünnt, auf das Leucosep-röhrchen überschichtet und für 10 Min. bei 800 x g zentrifugiert.

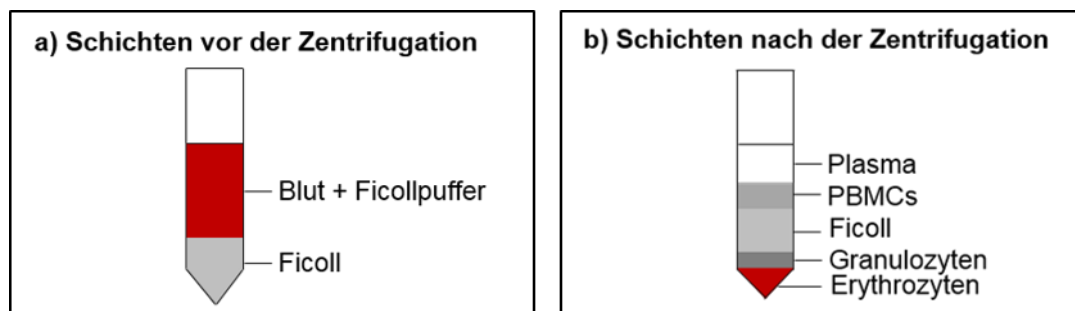


Abb. 4) Schematische Abbildung der Dichtegradientenzentrifugation

a) Schichten vor der Zentrifugation: Unten im 50 ml Zentrifugenröhrchen befindet sich das Ficollreagenz und durch langsames Beschichten mit dem Vollblut bildet sich auf dem Ficollreagenz die zweite Vollblut-Schicht. b) Schichten nach der Zentrifugation: Ganz unten befinden sich die Erythrozyten, dann folgen die Granulozyten, das Ficollreagenz, die PBMCs und ganz oben das Plasma [Abb. modifiziert nach: Miltenyi Biotec, Datenblatt].

Während die Thrombozyten in der oberen Plasmaphase verbleiben, reichern sich die PBMCs in der Interphase und die Granulozyten in der unteren Schicht des Lymphozytenseparationsmediums an. Erythrozyten und tote Zellen bilden während des zentrifugierens ein Pellet und sammeln sich am Boden des Leucosepröhrchens an (s. Abb. 4). Das Entnehmen der Interphase ermöglicht die Separation der PBMCs von den anderen Zellen, welche anschließend mehrfach mit dem EDTA Waschpuffer gewaschen wurden (5 Min, 500 x g) und zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml Lysepuffer (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA in H₂O) für 5 Min. bei RT inkubiert wurden. Nach erneutem Waschen des Pellets wurden die

Zellen gezählt und in einer Konzentration von 1 bis 2×10^7 Zellen/ml in Einfriermedium aufgenommen und zunächst bei -80 °C asserviert.

2.2.2.3 Auftauen und Einfrieren von Zelllinien und PBMCs

Eukaryotische Zellen können für eine kurze Dauer bei -80 °C gelagert werden. Für eine längere Aufbewahrung sollten die Zellen in flüssigem Stickstoff (-196 °C) asserviert werden. Zelllinien und primäre Zellen wurden in einer Konzentration von 1 bis 2×10^7 Zellen/ml in einem Kryoröhrchen und entsprechendem Einfriermedium (mit 10% DMSO) eingefroren. Für PBMCs wurde das Einfriermedium PSC Cryomedium (Gibco) und für Zelllinien das Einfriermedium *Recovery cell culture freezing* Medium (Gibco) verwendet. Um die Zellen aufzutauen, wurde das Kryoröhrchen im 37 °C Wasserbad kurz angetaut und unmittelbar danach in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit vorgewärmtem Medium (+ 25 U/ml DNase) überführt. Zur Entfernung des DMSO aus dem Medium wurden die Zellen bei 1900 rpm für 5 Min. zentrifugiert und das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert. Nach zwei weiteren Waschschritten, um das DMSO vollständig zu entfernen, wurden die Zellen in entsprechendem Medium (20 ml) in eine T75-Flasche überführt und bei 37 °C und 5% CO_2 kultiviert. Das erste Passagieren erfolgte je nach Zelllinie zwei bis drei Tage nach dem Auftauen.

2.2.2.4 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie ist eine Methode zur Charakterisierung und Sortierung von Zellen aus einer flüssigen Probe. Im sog. *Fluorescence activated cell sorting* (FACS™) wird die Funktionalität der Methode durch den Einsatz verschiedener fluorchromgekoppelter Antikörper erweitert, die spezifisch intrazelluläre Proteine und Oberflächenmoleküle markieren und detektierbar machen. Hierbei können Zellpopulation anhand ihrer Granularität und Größe auf Einzelzellebene charakterisiert werden. Die Methode beruht darauf, dass Zellen durch eine Kapillare gesaugt werden, wobei sie einen Laserstrahl passieren. Dabei messen Detektoren im Gerät die durch die Zelle verursachte Lichtstreuung, die mit der Größe und der Granularität der Zelle korreliert. Nach vorne abgeleitete Strahlen sind ein Maß für die Größe der gemessenen Zellen und wird als Vorwärtsstreulicht (*Forwardscatter*, FSC) bezeichnet. Das Seitwärtsstreulicht (*Sidescatter*, SSC) korreliert mit der Zellgranularität. Zusätzlich kann noch das Fluoreszenzlicht gemessen werden. Dabei können Oberflächenmarker durch Antikörper detektiert werden, an die eine fluoreszierende Gruppe gekoppelt ist (z.B. Phycoerythrin (PE) oder Allophycocyanin (APC)). Durch optische Filter ist es möglich, einzelne Floreszenzen zu detektieren. Um die intrazelluläre Expression des *enhanced Green Fluorescent Protein* (eGFP) der transduzierten Zellen zu messen, war keine Färbung notwendig, da dieses Molekül selbst fluoresziert. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte an einem FACS Fortessa

(BD Bioscience), welches mit vier verschiedenen Lasern (violett 405nm, blau 488 nm, gelb/grün 561 nm, rot 633 nm) ausgestattet ist. Zur Sortierung der Zellen wurde ein FACS Aria (BD Biosciences) mit der gleichen Laserkonfiguration verwendet. Die Messung wurde mit Hilfe einer entsprechenden Software (FlowJo v10) analysiert.

Extrazelluläre Färbung

Die Charakterisierung der Zellen anhand ihrer Rezeptoren auf der Zelloberfläche wurde mittels extrazellulärer Färbung durchgeführt. Für die FACS Analysen wurden 1×10^6 Zellen, der jeweiligen Zelllinie oder PBMCs, in ein FACS Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen mit FACS Waschpuffer gewaschen und 5 Min. bei 1900 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet im Rücklauf durch vortexen resuspendiert. Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen durch den Fc-Teil der Antikörper an die Zelloberfläche, wurden die Zellen für 10 Min. bei 4 °C mit 2 µl Fc-Rezeptorblockingreagenz blockiert und danach mit PBS gewaschen. Die Zellsuspension wurde mit 0,2 µl Zombie Aqua™ (oder Zombie/ NIR™), ein Farbstoff, der tote Zellen färbt und somit die Diskriminierung zwischen toten und vitalen Zellen ermöglicht, inkubiert. Mit je 1 µl des Fluoreszenzantikörpers wurden die Zellen für 20 Min. bei 4 °C im Dunkeln markiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 500 µl FACS Waschpuffer bis zur Analyse bei 4 °C dunkel gelagert.

Intrazelluläre Färbung

Mit Hilfe der intrazellulären Färbung können Transkriptionsfaktoren wie z.B. das *Forkhead-Box-Protein P3* (Foxp3) oder auch Interleukine im Zellinneren am Durchflusszytometer gemessen werden. Diese Methode ermöglicht in Verbindung mit der extrazellulären Färbung eine noch genauere Charakterisierung der Zellen.

Für die intrazelluläre Färbung von Proteinen wurden 1×10^6 Zellen, der jeweiligen Zelllinie oder PBMCs, in ein FACS Röhrchen überführt. Für die extrazelluläre Färbung wurden die Zellen wie oben beschrieben behandelt. Anschließend wurden die Zellen für 20 Min. bei 4 °C fixiert (100 µl BD CytoFix™) und zwei Mal mit einem Puffer (500 µl BD CytoPerm™), der die Zellen permeabilisiert und somit erst eine intrazelluläre Färbung ermöglicht, gewaschen. Danach wurden die Zellen mit je 1 µl Antikörper für 20 Min. bei 4 °C gefärbt, erneut gewaschen und bis zur Analyse bei 4 °C dunkel gelagert.

Tetramerfärbung

Die Tetramerfärbung dient der Detektion von antigenspezifischen T-Zellen in einer Lymphozytenpopulation. Hierfür werden biotinylierte MHC-Klasse-II/Monomere, die mit einem spezifischen Peptid einen MHC-Klasse-II/Peptidkomplex bilden, verwendet. Dabei bindet das Peptid über kovalente Wechselwirkungen in der Bindungstasche des MHC-Klasse-II/Moleküls. Durch die irreversible Bindung zwischen Biotin und Streptavidin bildet sich ein Tetramerkomplex der es ermöglicht, antigenspezifische T-Zellen im Durchflusszytometer mit Hilfe eines konjugierten Fluorochroms zu visualisieren. Diese Methode beruht auf den Wechselwirkungen des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors mit den peptidbindenden MHC-Klasse-II/Komplexen. Der Aufbau eines Tetramers ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

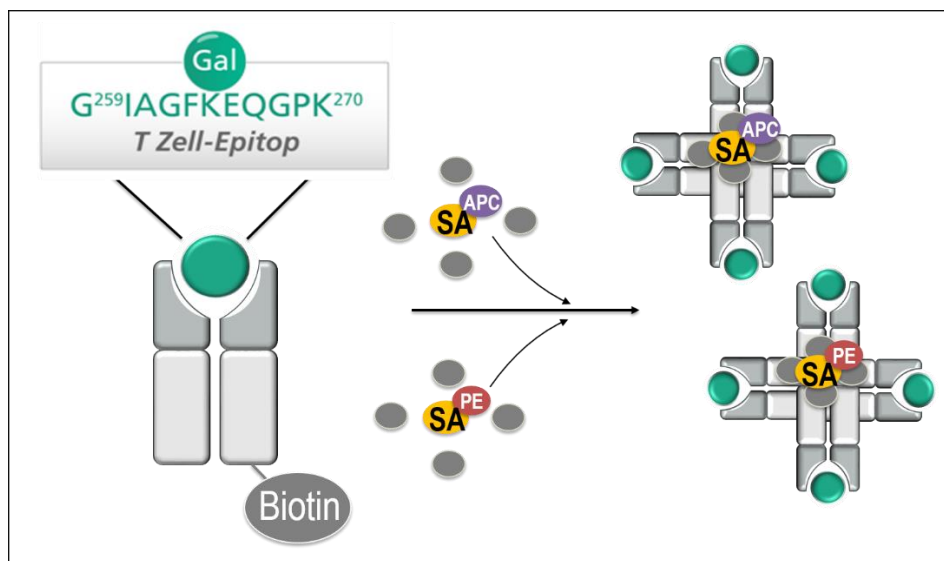


Abb. 5) Schematische Darstellung des MHC-Klasse-II/Peptidkomplexes

Mit Hilfe eines Biotinrestes an der α -Kette des MHC-Klasse-II/galCII264-273 Peptidkomplexes (links) kann durch Interaktion mit Streptavidin (SA) ein Tetramerkomplex (rechts) gebildet werden. Ein an das Streptavidin konjugiertes Fluorochrom (PE oder APC) ermöglicht die durchflusszytometrische Visualisierung nach Bindung an die Zelle.

Um die Avidität der HLA-DR4*04:01-restringierten, gal264CII-spezifischen T-Helferzellen zu bestimmen und eine durchflusszytometrische Sortierung dieser Zellen durchführen zu können, wurden die Zellen mit Hilfe von PE- und APC-konjugiertem HLA-DRB1*04:01-Tetramer gefärbt. Vor der Zellfärbung wurden die MHC-Klasse-II/Monomere in einem 4-fachen molaren Überschuss mit dem fluorchromkonjugierten Streptavidin für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die fluorchromkonjugierten Streptavidine mit Biotin inkubiert, um unspezifische Färbungen an der Zelloberfläche ausschließen zu können. Für die Färbung wurden 1×10^6 Zellen/ml ($CD4^+$ T-Helferzellen oder die Jurkat-Zelllinie) in ein FACS Röhrchen überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 2 μ l Fc-Rezeptorblockingreagenz und 1 μ l Dasatinib (50 nM Endkonzentration) inkubiert, um den T-Zell-Rezeptor vor einer

Internalisierung zu stabilisieren. Dann wurde 5 Min. bei 1900 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit dem entsprechenden MHC-Klasse-II/Tetramerkomplex (20 µg/ml in 100 µl, Biotin Kontrolle, DR4/gal264CII, DR4/nCII oder DR4/HA) für 1 Std. bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden daraufhin durchflusszytometrisch analysiert und/oder für eine darauffolgende Einzelzell-PCR sortiert. Die DR4/Petidkomplexe wurden langfristig bei – 80 °C gelagert. Frische *Batches* wurden jede Woche neu aufgetaut und bei 4 °C, maximal für 1 Woche, gelagert.

2.2.2.5 Immunmagnetische Separation mittels MACS-Aufreinigung

Mit der immunmagnetischen Separation (*Magnetic activated cell sorting*, MACS®) können Zellen zu einer homogenen Population angereichert werden. Das Prinzip beruht darauf, Zellen, die einen spezifischen Oberflächenmarker exprimieren, mit Hilfe von magnetischen *Mikrobeads* zu isolieren. Diese *Beads* erkennen spezifische Strukturen auf der Zelloberfläche und sorgen für die Kopplung der *Beads* an die gewünschte Zellpopulation. Beim Durchfluss des Zellgemisches durch die Säule ist es möglich, markierte Zellen von unmarkierten durch das magnetische Feld zu separieren. Wird der Durchfluss für weitere Analysen genutzt, handelt es sich hierbei um die Negativfraktion, da diese Zellen unmarkiert sind. Nach dem Entfernen des Magnetfeldes können die markierten Zellen mit Hilfe eines Stopfers aus der Säule gedrückt werden, hierbei handelt es sich um die Positivfraktion. Die Negativfraktion ist immer vorzuziehen, da diese Zellen nicht markiert sind und somit unbeeinflusst von den *Beads* keinem zusätzlichen Stress und keiner Vor-Aktivierung ausgesetzt sind. Die *Mikrobeads* bestehen aus Eisenoxid und Polysacchariden, an welche die Antikörper gebunden sind. Aus diesem Grund sind sie biologisch abbaubar und nach einigen Tagen nicht mehr an der Zielzelle gebunden.

Für die Aufreinigung von CD3⁺ T-Zellen aus dem peripheren Blut wurden 1 x 10⁷ PBMCs in 10 ml Medium aufgenommen und mit Hilfe eines Filters (70 µM) prä-separiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 10 Min.), das Pellet in 80 µl MACS Waschpuffer und 20 µl *Mikrobeads* (anti-CD3) resuspendiert und für 15 Min. bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 1 ml MACS Waschpuffer gewaschen und anschließend für die Beladung der Säule in 500 µl MACS Waschpuffer resuspendiert. Des Weiteren wurden die Zellen auf die zuvor mit MACS Waschpuffer equilibrierte MACS LS Säule gegeben. Die Säule wurde zwei Mal mit je 3 ml MACS Waschpuffer gewaschen. Bei den im Durchlauf befindlichen unmarkierten Zellen handelt es sich um antigenpräsentierende Zellen (APCs), welche ebenfalls von Interesse waren und separat weg gefroren wurden. Die MACS LS Säule wurde nun vom magnetischen Feld entfernt, so dass die Isolierung der CD3⁺ T-Zellen möglich war. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe eines Stopfers aus der Säule in ein frisches Falcon gedrückt. Die Säule wurde noch einmal mit MACS Waschpuffer gewaschen, um die Ausbeute an CD3⁺ T-Zellen zu erhöhen.

Die isolierten Zellen wurden entweder direkt in einem Experiment eingesetzt oder bei – 80 °C weggefroren.

Für die Aufreinigung von CD4⁺ T-Helferzellen wurden ebenfalls 1 x 10⁷ PBMCs in 10 ml Medium aufgenommen und mit Hilfe eines Filters (70 µM) präsepariert. Des Weiteren wurden die Zellen sedimentiert (300 x g, 10 Min.), das Pellet in 40 µl MACS Waschpuffer mit 10 µl eines CD4/Biotin-Antikörpercocktails resuspendiert und für 5 Min. bei 4 °C inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Pellet in 30 µl MACS Waschpuffer und 20 µl Mikrobeads (anti-CD4) durch vorsichtiges auf und ab pipettieren resuspendiert. Das Gemisch wurde 10 Min. bei 4 °C inkubiert. Analog zur oben beschriebenen CD3 Aufreinigung wurden die CD4 markierten T-Zellen ebenfalls mit Hilfe des Magnetfeldes isoliert. Zeitgleich wurde die MACS LS Säule, wie oben erwähnt, an den magnetischen Ständer geheftet und wie oben (s. CD3 Aufreinigung) vorbehandelt. In dem Durchlauf befanden sich die CD4⁺ T-Helferzellen, die nicht markiert wurden. Somit handelt es sich um eine Negativeselektion. In der Säule zurückgeblieben sind die APCs.

2.2.2.6 Lentivirale Transduktion

Herstellung der T-Zell-Rezeptor-Expressionskonstrukte

Die aus der Einzelzellsortierung von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) amplifizierten VJ α- und VDJ β-Regionen wurden mittels spezifischer Primer amplifiziert, in den pGEM-Vektor subkloniert (s. 2.2.1.5) und durch einen externen Dienstleister (Microsynth Seqlab GmbH) sequenziert (s. 2.2.1.9). Nach Analyse der V-Gensequenzen wurden die Zellen ausgewählt, von denen sowohl die α- als auch die β-Kette der T-Zell-Rezeptoren amplifiziert und ausgewertet werden konnten. Diese Gensegmente wurden von einem externen Dienstleister (GeneArt by Thermo Fisher Scientific) synthetisiert und mittels SacII/PasI Klonierung in den SIEW Backbone kloniert. Nach der Klonierung wurde dieser Transfervektor gemeinsam mit den Verpackungsplasmiden *gag/pol* und *envelope (env)* mittels lentiviraler Transduktion in die Jurkat-76 Zelllinie, die defizient für die α- und β-Kette des T-Zell-Rezeptors ist, transduziert.

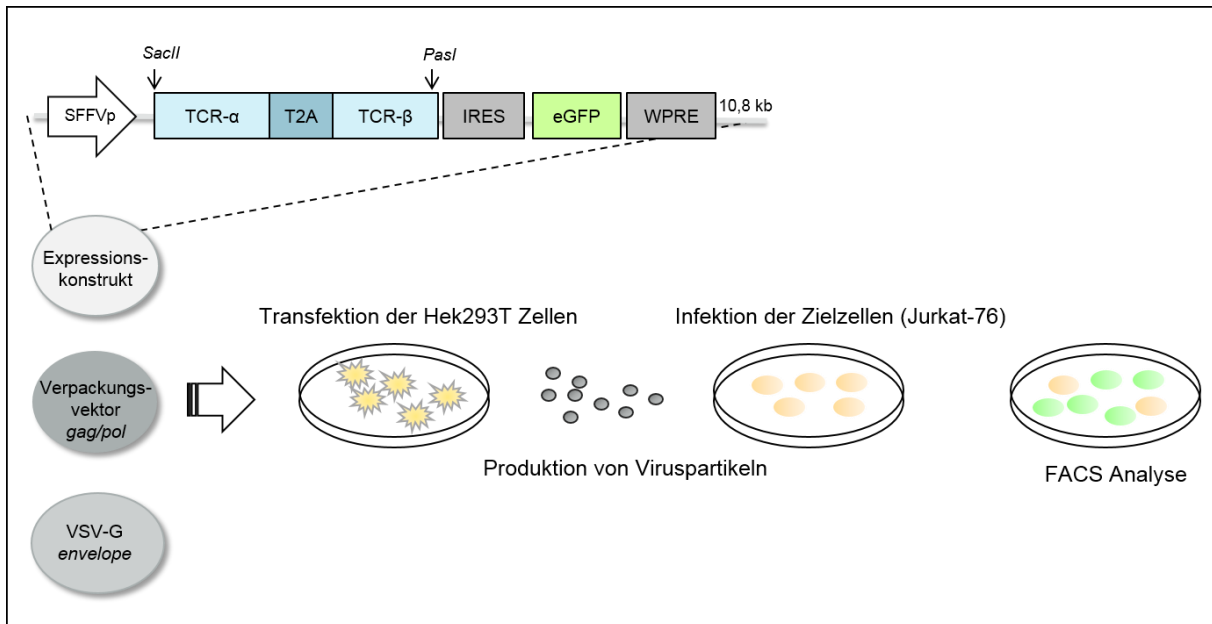


Abb. 6) Schematischer Aufbau der lentiviralen Transfektion und Transduktion

Für die Transduktion des transgenen T-Zell-Rezeptors wurde der SIEW-Vektor mit einem starken SFFVp Promotor verwendet. Um eine durchgehende Transkription zu gewährleisten, wurde ein T2A (Thoseasigna virus 2A) Element und ein IRES (ribosomale Eintrittsstelle) Element verwendet. Das auf dem Plasmid kodierte eGFP (*Green fluorescent protein*) ermöglicht eine visuelle Kontrolle der Transduktionseffizienz. Zur Verstärkung des Promotors wurde ein WPRE (*Woodchuck posttranscriptional regulatory element*) Element verwendet. Die Position der Restriktionsschnittstellen SacI und PstI ist dargestellt. Zusammen mit dem Transgenvektor wurden auch die Plasmide *gag/pol* und *envelope* in HEK293T Zellen transfiziert. Die Viruspartikel im Überstand wurden geerntet, aufkonzentriert und für die Transduktion der Jurkat-76 Zellen verwendet.

Herstellung von retroviralem Virusüberstand mittels Transfektion von HEK293T Zellen

Für das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zelllinien wurde ein Polyethylenimin (PEI) Derivat Jet-Pei® (PolyPlus) verwendet. Die DNA wird durch das Jet-Pei®-Reagenz verpackt und stellt somit einen positiv geladenen Komplex dar, der mit den negativ geladenen Proteoglykanen auf der Zelloberfläche interagiert und mittels Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Häufig werden HEK293T Zellen als Verpackungszelllinie zur Herstellung von Viruspartikeln verwendet, da sie sich mit einer hohen Effizienz mit Plasmid-DNA transfizieren lassen. Für die Replikation werden drei essentielle virale Gene benötigt. Das *gag* kodiert für gruppenspezifische Antigene (Strukturproteine), das *pol* kodiert für die Enzyme Reverse Transkriptase, Integrase, Polymerase und RNaseH, welche wichtig für die Replikation und die Integration sind und das *env* kodiert für die Glykoproteine der äußeren Hülle. Für die Transfektion wurden 5×10^6 HEK293T Zellen 16 Std. zuvor in eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 75 - 90% mit folgendem Ansatz transfiziert:

DNA-Ansatz	Trans-Pei-Ansatz
Transfervektor DNA: 15 µg	Trans-Pei: 64,1 µl
Plasmid M334 (<i>gag/pol</i>): 10 µg	
Plasmid VSV-G (<i>envelope</i>): 5 µg	

In je 1 ml Medium (DMEM ohne Zusätze)

Der PEI-Mix wurde nun zum DNA-Mix hinzugegeben, langsam durch vortexen vermischt und für 20 Min. bei RT inkubiert. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium durch 8 ml DMEM-Medium (15% FKS) ersetzt und die 2 ml des DNA- und PEI-Mixes wurden vorsichtig auf die HEK293T Zellen gegeben. Die Zellkulturschale wurde dann nochmal langsam geschwenkt, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten und für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und durch neues DMEM-Medium (10% FKS, 1% Pen./Strep.) ersetzt. Der Virus wurde 48 Std. nach der Transfektion geerntet. Hierzu wurde mit einer 10 ml Spritze das Medium, in dem sich der Virus befindet, vorsichtig entnommen, mit einem 0,22 µm Filter steril filtriert und in ein frisches 50 ml Falconröhrchen überführt. Um eine bestmögliche Transduktionseffizienz zu erhalten, wurde der Virus aufkonzentriert. Zuerst wurde der Virusüberstand in ein Polypropylene-Zentrifugationsröhrchen überführt und mit 20% Succrose unterschichtet. Daraufhin wurde der Virus für 2:20 Std. bei 20.500 rpm und bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und der Virus in 500 µl RPMI-Medium bei 4 °C, bis zur Transduktion der Zielzellen, im Kühlschrank verstaut.

Transduktion humaner Zelllinien

Als Transduktion wird der Vorgang bezeichnet, bei dem fremde DNA mit Hilfe von Viren auf eukaryotische Zellen übertragen werden kann. In dieser Arbeit fungieren Jurkat-76 Zellen, die defizient in der endogenen α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors sind, als Zielzellen.

Die Zellen wurden in einer 24-Lochplatte (1×10^5 Zellen/500 µl) ausgesät und 500 µl der selbst hergestellten Viruspartikel wurden hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 1 ml erreicht wurde. Anschließend wurden die Jurkat-76 Zellen mit den Viruspartikeln bei 37°C kultiviert. Vier Tage nach Transduktion wurde die Effizienz am Durchflusszytometer analysiert.

2.2.2.7 Versuche zur Analyse von antigenspezifischen Immunantworten

Aktivierungsversuch der murinen T-Zell-Hybridome

In dieser Arbeit wurden T-Zell-Hybridome verwendet, die entweder restriktiv spezifisch für das galaktosylierte CII-Peptid an Position K264 (mDR1.1) sind oder welche, die nur mit dem unmodifizierten CII-Peptid aktivierbar sind (3H8). Die T-Zell-Hybridome wurden von Prof. Rikard Holmdahl (Karolinska Institut, Medical Research Inflammation, Stockholm) zur Verfügung gestellt. Die Stimulation der Zellen, in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/ml, erfolgte in einer 24-Lochplatte bei 37 °C mit dem jeweiligen spezifischen DR4/CII-Peptidkomplex in Lösung oder zuvor beschichtet (festphasengebunden, 5 µg/ml). Nach 24 Std. wurde der Überstand hinsichtlich der Sekretion von IL-2 und IL-10 mittels ELISA analysiert.

Aktivierung humaner T-Zellen durch CII-Peptidstimulation

Die spezifische Aktivierbarkeit und generelle Funktionalität der primären T-Zellen wurde in einem T-Zellaktivierungsexperiment, basierend auf der Expression des Aktivierungsmarkers CD154, analysiert. Isolierte PBMCs von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) wurden für 7 Std. bei 37 °C entweder mit dem gal264CII-Peptid oder mit dem unmodifizierten CII-Peptid (je 50 µg) stimuliert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem T-Zellantikörper (CD3, 1 µl), einem T-Helferzell-Antikörper (CD4, 1 µl), einem B-Zell-Antikörper (CD19, 1 µl) und dem Aktivierungsmarker CD154 (1 µl) angefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Als Positivkontrolle diente die Aktivierung mit dem Superantigen *Staphylococcus aureus* Enterotoxin B (SEB).

Für die Analyse der TCR-Antigenspezifität wurden CD154⁺/CD4⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert und mit Hilfe eines Expansionskits (*T cell activation/expansion Kit*, Miltenyi) für ca. 30 Tage kultiviert. Mittels αCD2-, αCD3- und αCD28-Beads wurden die Zellen nach Angaben des Herstellers expandiert. Für den notwendigen Überlebensstimulus wurde das Medium alle vier Tage mit IL-2 (0,1 ng/ml) supplementiert. Nach ca. 30 Tagen wurden die Zellen durchflusszytometrisch hinsichtlich ihrer Antigenspezifität mittels Tetramerfärbung (s. 2.2.2.4) analysiert und anschließend Einzelzellen sortiert, um die variable Region des T-Zell-Rezeptors mittels PCR zu amplifizieren.

Antigenabhängige Aktivierung vermittelt durch antigenpräsentierende Zellen (APC)

Die antigenabhängige APC-vermittelte Aktivierung der murinen T-Zell-Hybridome wurde zunächst mit Hilfe einer transgenen murinen Makrophagenzelllinie, die den humanen HLA-DRA1*01:01/DRB1*04:01 exprimiert, untersucht. Hierfür wurden 1×10^5 Makrophagenzellen/500 µl in eine 48-Lochplatte ausgesät und für 5 Std. bei 37 °C mit 50 µg/ml DR4/nCII-

Komplex, 100 µg/ml DR4/gal264CII-Komplex oder 50 µg/ml CII-Peptid (gal264CII, nCII), inkubiert. Als Negativkontrolle wurde eine untransfizierte Makrophagenzelllinie mit dem gleichen Stimulus mitgeführt. Nach 5 Std. wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit PFA (1%) für 4 Min. fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS folgte eine Inkubation mit 1×10^5 T-Zell-Hybridomen/500 µl für 24 Std. bei 37 °C. Am nächsten Tag wurde die Sekretion von IL-2 in den Überstand mittels ELISA analysiert (s. 2.2.3.1).

Durch die Zugabe von 10, 40, 50 und 100 µM Hydroxychloroquin (HCQ) zu den transgenen Makrophagen wird durch pH-Wert-Änderung im Lysosom die Antigenpräsentation gehemmt und die endozytierten Peptide können nicht neu beladen und auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Die antigenabhängige APC-vermittelte Aktivierung der T-Zell-Hybridome wurde auch mit humanen APCs, isoliert aus dem peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01), untersucht. Hierfür wurden zunächst APCs mittels CD3 MACS Aufreinigung aus der Negativfraktion (s. 2.2.2.5) isoliert. Es wurden 1×10^6 APCs/ml in eine 24-Lochplatte ausgesät und für 5 Std. bei 37 °C entweder mit den DR4/Peptidkomplexen (500 µg/ml) oder mit 50 µg/ml CII-Peptid stimuliert. Das Protokoll wurde wie oben bereits beschrieben durchgeführt.

Differenzierung von CD4 T-Zellen in Tr1 regulatorische T-Zellen

Für eine bessere Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zellen wurden PBMCs eines HLA-DRB1*04:01-positiven RA-Patienten für acht Tage bei 37°C mit den DR4/Peptidkomplexen stimuliert und die Differenzierung in einen Tr1-Phänotyp durchflusszytometrisch analysiert.

Hierfür wurden 1×10^6 PBMCs/ml ausgesät und mit den DR4/Peptidkomplexen (je 3,6 µg/ml) stimuliert, vier Tage später wurde 1/5 des Mediums mit frischem Medium ersetzt und nochmal ein zweiter DR4/Peptidkomplexstimulus (3,6 µg/ml) gegeben. Die Abundanz von Tr1-Zellen wurde an Tag acht am Durchflusszytometer analysiert, indem die relativen Zellzahlen von CD49b, LAG3, CD73, PD-1 und Tetramer⁺ T-Helferzellen mit unstimulierten T-Helferzellen verglichen wurden. Die Sekretion von spezifischen Zytokinen in den Mediumüberstand wurde mit Hilfe eines ELISA und eines beadbasierten Zellexperiments namens LEGENDplex (s. 2.2.3.2) am Durchflusszytometer bestimmt.

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Zur Bestimmung der Zytokinkonzentration in Zellüberständen wurde ein *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) nach der Sandwichmethode durchgeführt. Hierbei wurde nach Angaben des Herstellers (ELISA Max™ Delux Set, Nachweis von humanem und murinem IL-

2 und IL-10, Biolegend) gearbeitet. Ein spezifischer *Coating*antikörper, der über Nacht an eine Mikrotiterplatte bindet, wurde mit den entsprechend verdünnten Zellüberständen inkubiert. Der Komplex wird gewaschen und mit einem zweiten, biotinmarkierten Detektionsantikörper inkubiert, der das Antigen ebenfalls spezifisch allerdings an einem anderen Epitop erkennt. Nach einem weiteren Waschschrift wird peroxidasemarkiertes Avidin zugegeben, das kovalent an das Biotin des Detektionsantikörpers bindet. Das gekoppelte Enzym bewirkt, dass eine erfolgte Antigenantikörperbindung indirekt sichtbar gemacht wird, indem aus einem farblosen Chromogen ein farbiges Reaktionsprodukt entsteht, das photometrisch bei 450/560 nm bestimmt werden kann.

2.2.3.2 LEGENDplex™

Für die Analyse von Zytokinen aus Zellüberständen wurde zudem eine beadbasierte Methode verwendet (LEGENDplex™, Biolegend). Dieses System ermöglicht die quantitative durchflusszytometrische Analyse von bis zu 13 verschiedenen Zytokinen. Prinzipiell handelt es sich hierbei um eine Art-Sandwich-ELISA, bei dem der *Capture*antikörper allerdings nicht an eine Mikrotiterplatte, sondern an Polymerkügelchen (*Beads*) gekoppelt ist. Um bei der FACS Analyse eindeutig identifiziert werden zu können, besitzt jeder *Bead* eine für sich einzigartige intrinsische Fluoreszenz. In einem zweiten Schritt bindet der spezifische Detektionsantikörper, gekoppelt an einen anderen Fluoreszenzfarbstoff als die *Beads*, an den Komplex aus *Capturebead* und Zytokin.

2.2.3.3 Zytocentrifugation zur Herstellung von Dünnschichtzellpräparaten

Für die Analyse von Proteinexpressionen auf der Oberfläche von T-Zellen wurden Fluoreszenzfärbungen angefertigt. Hierfür wurden 10.000 Zellen im Zytospin auf einen Objektträger fixiert, indem diese bei 290 rpm für 5 Min. zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Zellen für 24 Std. auf dem Objektträger getrocknet und am folgenden Tag wurden die Zellen mit 4%-igem Paraformaldehyd (PFA) für 15 Min. bei RT fixiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 Min. in PBS, 1% BSA und 0,1% Triton blockiert. Als nächstes wurde erneut dreimal für 5 Min. mit PBS gewaschen, bis der primäre Antikörper für 2 Std. auf die Zellen inkubiert wurde. Der primäre Antikörper (TCR- α , ab-18861) wurde in PBS und 0,1% BSA in einer Verdünnung von 1:50 oder 1:100 verwendet. Des Weiteren wurden die Zellen dreimal mit PBS 0,1% BSA für jeweils 5 Min. gewaschen. Danach folgte eine einstündige Inkubation des Sekundäantikörpers (*Texas red anti rabbit*) in einer Verdünnung von 1:100 oder 1:250 im Dunklen. Nach dreimaligem Waschen wurden die Zellkerne mit DAPI gefärbt, indem 1 Tropfen des DAPI-Mountingmediums auf die Zellen getropft wurde. Daraufhin wurden die Zellen am Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3 Ergebnisse

3.1 Studien an murinen T-Zell-Hybridomen

3.1.1 Nachweis des CD3/TCR-Komplexes

Die am häufigsten verwendete experimentelle Modellerkrankung für die Rheumatoide Arthritis (RA) ist die kollageninduzierte Arthritis (CIA) in Mauslinien mit dem immungenetischen A^g Hintergrund. So entwickeln Mäuse, Ratten, aber auch nicht-humane Primaten wie z.B. Rhesus Affen nach der Immunisierung mit CII eine mit der Destruktion von Gelenkstrukturen einhergehende Arthritis, die in vielen Aspekten der Humanerkrankung der RA ähnelt.

Es wurden DRA1/DRB1*04:01 transgene Mäuse (Fugger, Rothbard und Sonderstrup-McDevitt 1996) mit CIA-Suszeptibilität generiert und aus arthritischen transgenen Tieren T-Zell-Hybridome etabliert. Des Weiteren wurden diese T-Zell-Hybridome hinsichtlich ihrer Epitopspezifität, sowie Sequenzen ihrer T-Zell-Rezeptoren charakterisiert (Christina Andersson et al. 1998; Bäcklund, Treschow, et al. 2002), die auch für die vorliegende Doktorarbeit relevant sind.

Für die Analyse der antigenspezifischen Immunantwort wurden murine T-Zell-Hybridome verwendet, welche spezifisch entweder das unmodifizierte CII-Peptid (3H8) oder das galaktosylierte CII-Peptid an Position K264 (mDR1.1) erkennen. Die T-Zell-Hybridome wurden von unserem Kooperationspartner Prof. Rikard Holmdahl (Karolinska Institut, Medical Research Inflammation, Stockholm) zur Verfügung gestellt. Im Rahmen der Charakterisierung der T-Zell-Hybridome wurde zunächst durchflusszytometrisch der Nachweis der stabilen Expression eines CD3/TCR-Komplexes auf der Zelloberfläche durch Doppelfärbung mit einem spezifischen Antikörper für den CD3-Komplex und die TCR α -Kette geführt. Das in Abbildung 7 gezeigte Ergebnis mit einer Nachweisrate von 98,3% in den 3H8- und 69,4% in den mDR1.1 Zellen belegt, dass beide T-Zell-Hybridome den CD3/TCR-Komplex auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

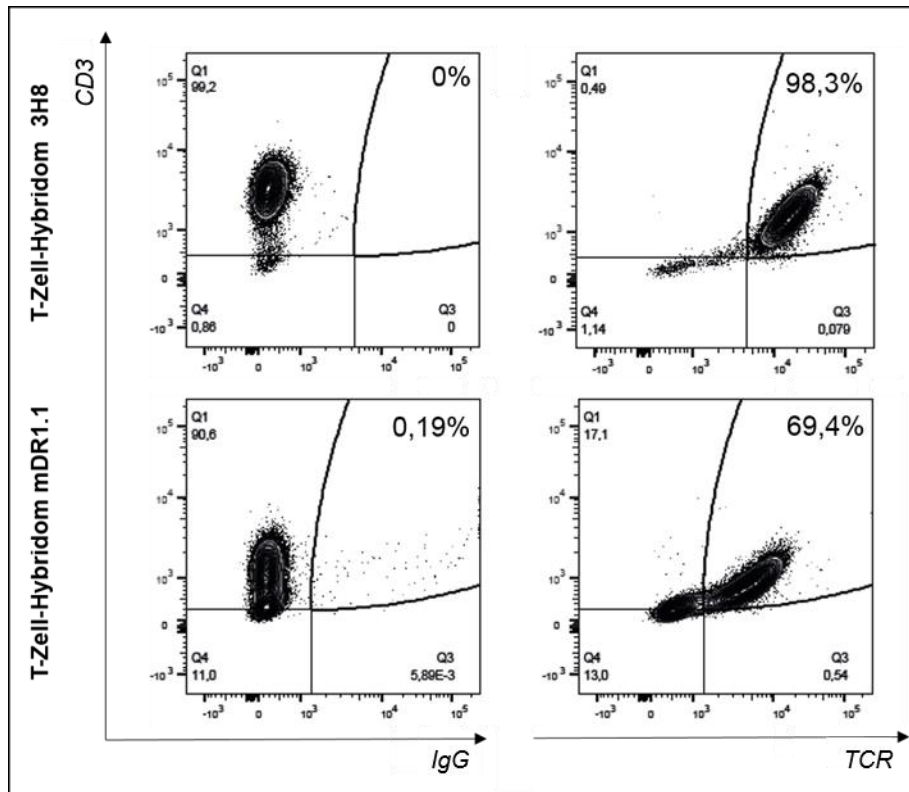


Abb. 7) Durchflusszytometrische Analyse des CD3/TCR-Komplexes auf der Zelloberfläche zweier muriner T-Zell-Hybridome mit unterschiedlicher Spezifität

Die Expression des CD3/TCR-Komplexes auf der Oberfläche der T-Zell-Hybridome, mit Spezifität entweder für das unmodifizierte (3H8) oder das galaktosylierte CII-Peptid (mDR1.1) wurde durchflusszytometrisch mit einem α TCR Antikörper und einem α CD3 Antikörper nachgewiesen. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende Zellpopulation. Als Negativkontrolle wurde eine IgG-Kontrolle mitgeführt.

3.1.2 Nachweis der T-Zell-Rezeptorspezifität der murinen T-Zell-Hybridome mittels Tetramerbindung

Zur Überprüfung, ob die T-Zell-Hybridome einen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptorkomplex an der Zelloberfläche erkennen und binden, wurden weitere durchflusszytometrische Analysen mit Hilfe von MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen durchgeführt.

In Abbildung 8 ist ein repräsentativer Dotplot dargestellt, welcher die Tetramerfärbung (Doppelbestimmung mit den Fluorochromen PE und APC) der T-Zell-Hybridome 3H8 und mDR1.1 zeigt. Die Zellen der 3H8 T-Zell-Hybridomlinie binden selektiv den Tetramerkomplex mit dem unmodifizierten CII-Epitop zu 98,2%, während die mDR1.1 Hybridomzellen über ihren TCR ausschließlich den DR4/gal264CII-Komplex zu 43,3% binden. Eine Kreuzreaktivität der T-Zell-Hybridome mit dem jeweils anderen DR4/Peptidkomplex ist nicht nachweisbar.

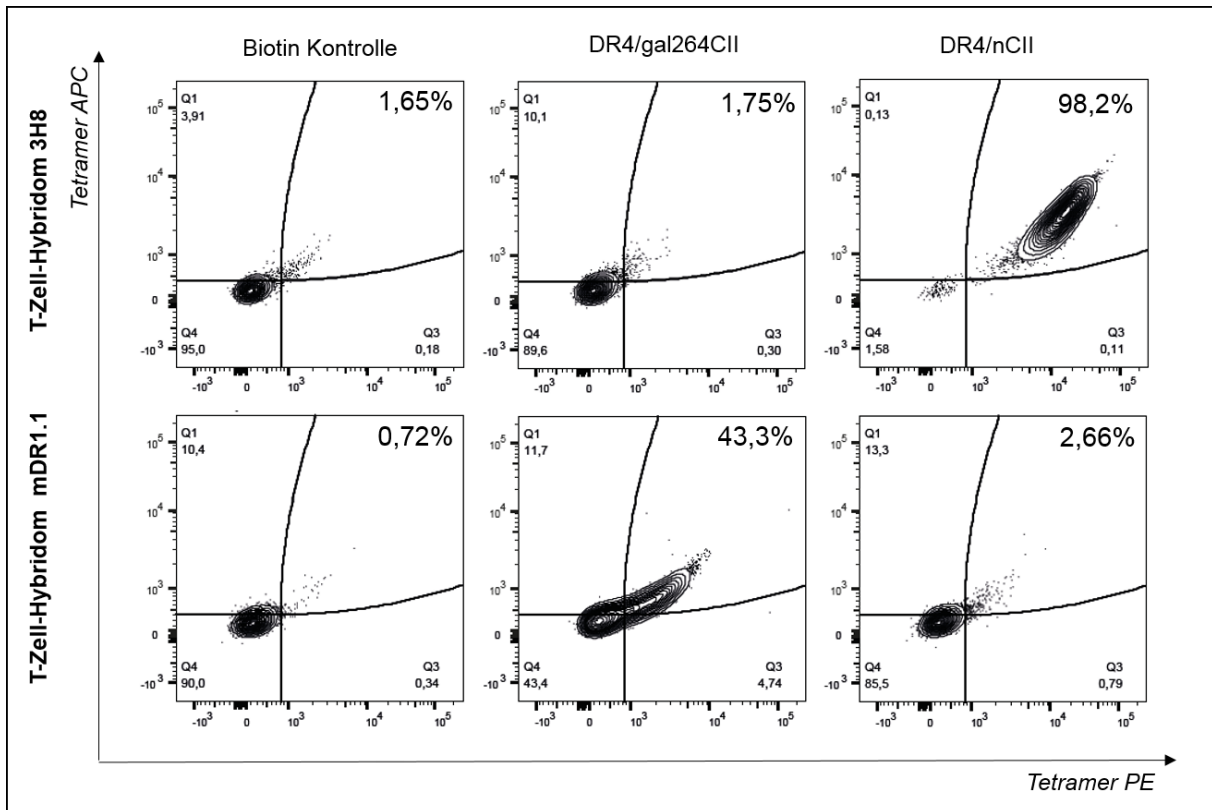


Abb. 8) Tetramerbindung der murinen T-Zell-Hybridome mit unterschiedlicher Spezifität

Die murinen Zelllinien wurden mittels MHC-Klasse-II/Tetrameren (DR4/g264CII, DR4/nCII), welche aus vier MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen bestehen, die über eine Biotin-Streptavidin-Bindung miteinander verknüpft sind, angefärbt. Der Komplex wird über zwei konjugierte Fluorochrome (Doppelbestimmung mit PE und APC) am Durchflusszytometer visualisiert. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende Zellpopulation. Als Negativkontrolle dient ein Biotin-Streptavidin-Komplex ohne ein spezifisches Peptidkonjugat.

3.1.3 Aktivierung der murinen T-Zell-Hybridome nach Stimulation mit MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen

Nach Überprüfung des CD3/TCR-Komplexes und der Antigen-spezifität wurden die T-Zell-Hybridome für 24 Std. mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen stimuliert und die Aktivierbarkeit mittels IL-2 und IL-10 ELISA untersucht.

Hierbei ist von Bedeutung, dass die Stimulationsstudien unter zwei prinzipiell zu unterscheidenden Bedingungen durchgeführt wurden. So erfolgte einerseits die T-Zellstimulation durch Vorbeschichtung einer Mikrotiterplatte, mit festphasengebundenen MHC-II/Peptidkomplexen. Diese Bedingungen repräsentieren das Modell der TCR-vermittelten Aktivierung unter Perzeption repetitiv Peptid beladener MHC/Moleküle, die in Mikrodomänen der T-Zelloberfläche die Ausbildung multimerer TCR-Anordnungen induzieren und Aktivierungsverhältnisse simulieren, wie sie im T-Zellkontakt mit antigenpräsentierenden Zellen, an der immunologischen Synapse, signalverstärkend entstehen.

Unter den alternativ verwendeten Bedingungen der Stimulation mit dem MHC/Peptidkomplex in Lösung, kann die Stimulation der monomeren T-Zell-Rezeptoren über die gesamte Zelloberfläche verteilt, d.h. in geringerer Dichte ohne verstärkende Einflüsse von Multimerisierungsprozessen, mit resultierend geringerer Signalstärke, erfolgen.

Die Aktivierung der 3H8 T-Zell-Hybridomzellen führt unter beiden der o.e. Stimulationsbedingungen zur Auslösung einer IL-2 Produktion als spezifische Zytokinantwort, die allerdings unter Aktivierung durch den löslichen DR4/nCII-Komplex geringer ausfällt. Unter gleichen Bedingungen ist für die mDR1.1 T-Zellen ausschließlich eine selektive Antwort auf den Stimulationsreiz mit dem festphasengekoppelten DR4/gal264CII-Komplexen im IL-2 ELISA messbar (s. Abb. 9). Die Stimulation mit dem DR4/HA-Komplex, einem Influenza spezifischen Antigen (Hämagglutinin), diente als zusätzliche Kontrolle der antigenspezifischen Aktivierbarkeit der T-Zellen.

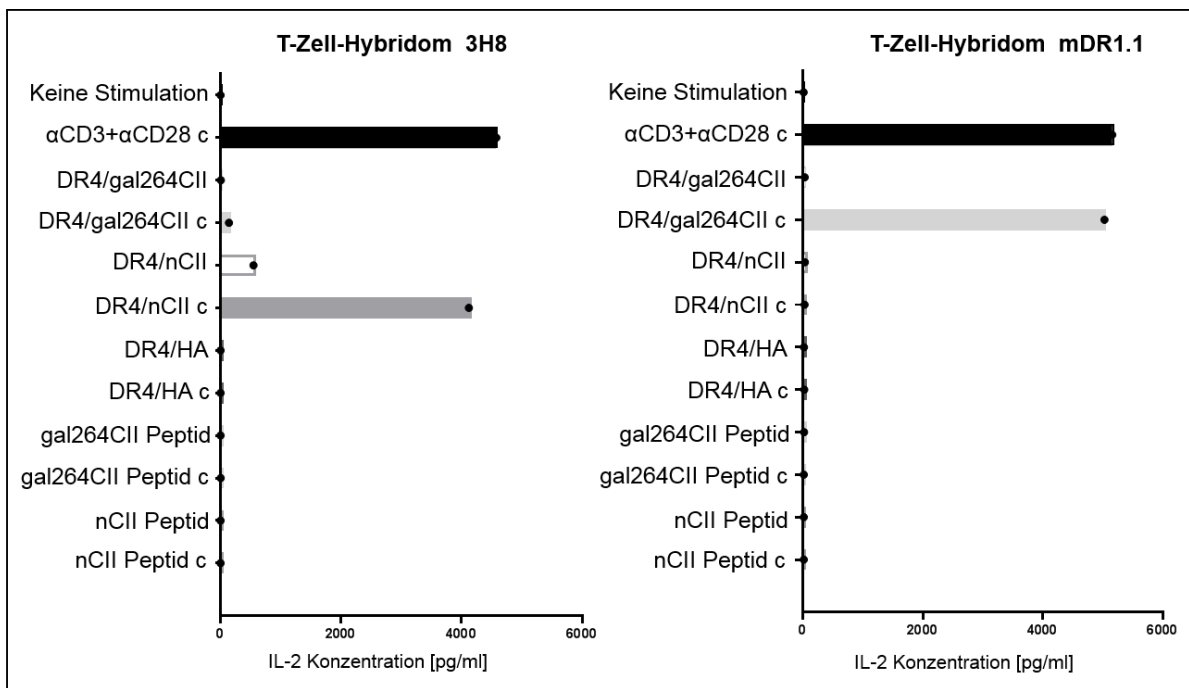


Abb. 9) Nachweis der selektiven Aktivierbarkeit der T-Zell-Hybridome nach Stimulation mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen mittels IL-2 ELISA

T-Zell-Hybridome (links: 3H8, rechts: mDR1.1) wurden sowohl mit CII-Peptiden (gal264CII, nCII 5 µg/ml) als auch mit DR4/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII, DR4/HA) für 24 Std. stimuliert. Die Stimulation wurde einmal in Lösung mit den Zellen und einmal zuvor beschichtet durchgeführt (c, coated). Die Aktivierbarkeit der Zellen wurde durch den Nachweis von IL-2 im Medium mittels ELISA gezeigt. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit αCD3 + αCD28 stimuliert. Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe.

Interessanterweise ergeben sich aus den Analysen der durch Stimulation mit den DR4/Peptidkomplexen induzierten IL-10 Produktion der 3H8- und mDR1.1-Hybridomzellen TCR- und Aktivierungsmodusabhängig differente Zytokinantworten. So lässt sich die Sekretion von IL-10 für beide T-Zell-Hybridome sowohl nach Stimulation mit dem DR4/gal264CII- als

auch mit dem DR4/nCII-Komplex nachweisen. Während die 3H8 T-Zell-Hybridomzellen unabhängig von der Art der Stimulation (in Lösung oder nach Festphasenbindung) IL-10 produzieren, ist die IL-10 Sekretion des mDR1.1 T-Zell-Hybridoms an den Stimulationsmodus über den gelösten DR4/Peptidkomplex gebunden. Darüber hinaus löst die Stimulation mit dem DR4/HA-Komplex in Lösung bei beiden Hybridomen eine IL-10 Sekretion aus (s. Abb. 10).

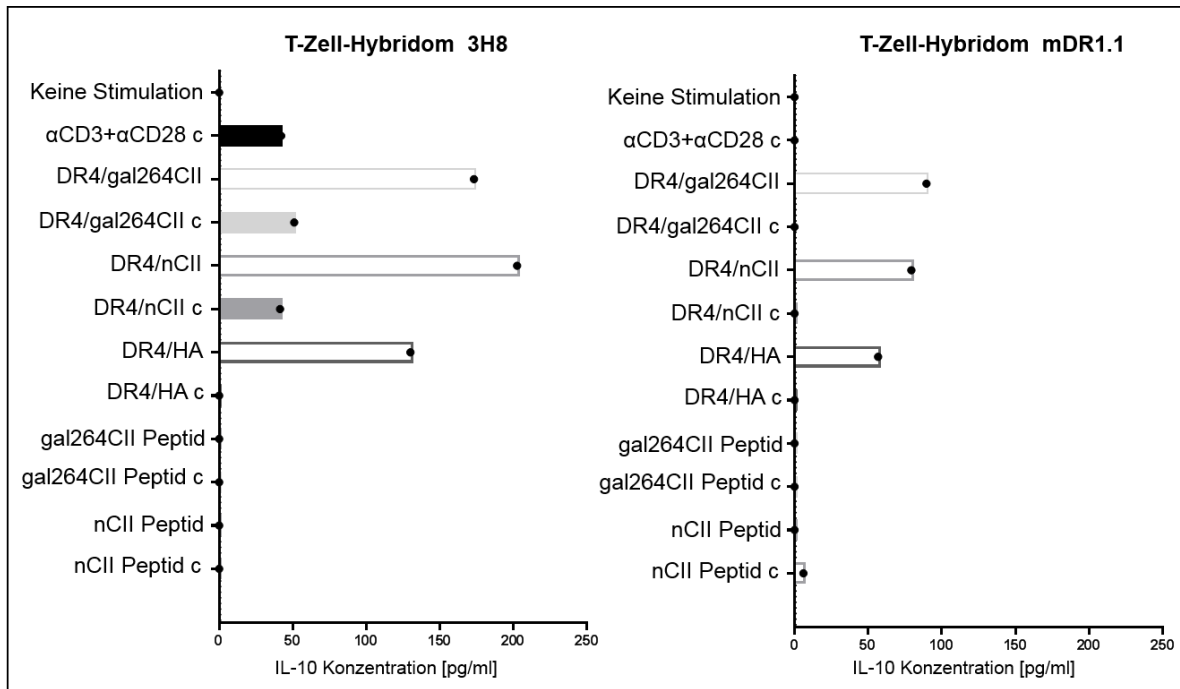


Abb. 10) Nachweis der Aktivierbarkeit der T-Zell-Hybridome nach Inkubation mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen mittels IL-10 ELISA

T-Zell-Hybridome (links: 3H8, rechts: mDR1.1) wurden sowohl mit CII-Peptiden als auch mit DR4/Peptidkomplexen für 24 Std. stimuliert, je einmal als Stimulation in Lösung mit den Zellen und einmal zuvor beschichtet (c). Die Aktivierbarkeit der Zellen wurde durch den Nachweis von IL-10 im Medium mittels ELISA gezeigt. Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe.

Zusammenfassend zeigen die bisher dargestellten Ergebnisse, dass beide murinen T-Zell-Hybridome 3H8 (Spezifität: unmodifiziertes CII-Peptid) und mDR1.1 (Spezifität: galaktosyliertes CII-Peptid an Position K264) einen antigenspezifischen TCR auf der Zelloberfläche exprimieren. Die über den TCR-vermittelte Spezifität der Erkennung der autoantigenen CII-Determinanten ist jedoch kontextabhängig und wird durch den Modus ihrer Aktivierung beeinflusst. Entweder über multimerisiert festphasengekoppelte oder monomer gelöst vorliegende MHC/Peptidkomplexe, die sehr wahrscheinlich die Art und Stärke der TCR-vermittelten Signalstärken bestimmen und mit distinkt unterschiedlichen Effektormechanismen der Zytokinantwort (IL-2 versus IL-10) verknüpft sind.

3.1.4 Nachweis der Antigenpräsentation der transgenen Makrophagenzelllinie BL25 und Hemmung durch Hydroxychloroquin (HCQ)

Die o.e. Studien zeigen, dass der lösliche MHC-II/Peptidkomplex in direktem Kontakt mit T-Zellen kontextabhängig unterschiedliche Zytokinantworten induzieren kann. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass nach systemischer Gabe des MHC-II/Peptidkomplexes sein MHC-Anteil nur die Aufgabe erfüllt, die in der Bindungstasche gebundenen CII-Peptide während der Passage in der Zirkulation vor dem Abbau zu schützen, bis die Aufnahme des Gesamtkomplexes durch antigenpräsentierende Zellen, wie z.B. Makrophagen, erfolgt. Über eine enzymatische Fragmentierung und "Umladung" der CII-Peptide auf neu synthetisierte endogene MHC-II/Moleküle in lysosomalen Kompartimenten der Makrophagen könnte nachfolgend der Transport an die Zelloberfläche und schließlich die Aktivierung CII-spezifischer T-Zellen erfolgen. Für die *in vitro* Studien dieser Möglichkeit der Endozytose von DR4/CII-Peptidkomplexen und ihrer nachfolgenden weiteren Antigenprozessierung/Antigenpräsentation wurde die transgene murine Makrophagenzelllinie BL25 verwendet. Diese Makrophagen ähnliche Zelllinie wurde stabil mit cDNA Plasmiden für die humanen Gene HLA-DRA*01:01 und HLA-DRB1*04:01 transfiziert und uns freundlicherweise von Frau Prof. Inga Melchers (Abteilung für Rheumatologie und klinische Immunologie, Albert-Ludwig Uniklinik Freiburg) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie eignet sich sehr gut, um Mechanismen der Antigenprozessierung und Präsentation im Kontext antigenspezifischer humaner T-Zellantworten modellhaft in einem heterologen System *in vitro* zu studieren. Vergleichsweise ist die Verwendung humaner antigenpräsentierender Zellen aus Patienten häufig mit dem Problem unkontrollierter Einflüsse durch Zytokine im Rahmen schubhafter Krankheitsexazerbationen bzw. der Medikation verbunden. Die antigenspezifische Aktivierung der T-Zell-Hybridome durch MHC-Klasse-II präsentierte CII-Determinanten auf der Zellmembran der transgenen Makrophagenzelllinie wurde über die Stimulation der IL-2 Sekretion gemessen. Des Weiteren wurde der modulierende Einfluss von Hydroxychloroquin (HCQ) als Hemmstoff der lysosomalen Antigenprozessierung analysiert.

Für diese Studien wurden exemplarisch 3H8 T-Zell-Hybridomzellen eingesetzt und für die T-Zellaktivierung neben dem DR4/nCII-Komplex auch das freie synthetische nCII-Peptid als Kontrollstimulus verwendet. So ist bekannt, dass kurze synthetische Peptide (z.B. nCII) auch ohne vorausgehende Prozessierung in lysosomalen Kompartimenten MHC-II/Moleküle auf der Zelloberfläche antigenpräsentierender Zellen z.B. der BL25 Zellen direkt beladen können. Eine Zellfixierung im Anschluss an eine der MHC-II/Peptidbeladung dienende Inkubationsphase, vor nachfolgender Koinkubation mit den T-Zellen, gewährleistet die Persistenz beladener DR4/Moleküle auf der Zelloberfläche durch Hemmung sekundärer Endozytoseprozesse. Analog wurden auch die BL25 Zellen im Anschluss an die Inkubation mit den DR4/nCII-Komplexen, vor Koinkubation mit den 3H8 Zellen, fixiert.

Sowohl unter Bedingungen der Antigenpräsentation durch die fixierten BL25 Makrophagen nach Vorinkubation entweder mit dem nCII-Peptid als auch mit dem DR4/nCII-Komplex, ist eine spezifische Stimulation der IL-2 Sekretion der 3H8 Hybridomzellen nachweisbar (s. Abb. 11). Die Stimulation mit dem gal264CII-Peptid bzw. dem DR4/gal264CII-Komplex resultiert in keiner IL-2 Zytokinantwort und belegt die Epitop- bzw. TCR-Spezifität der Zellaktivierung.

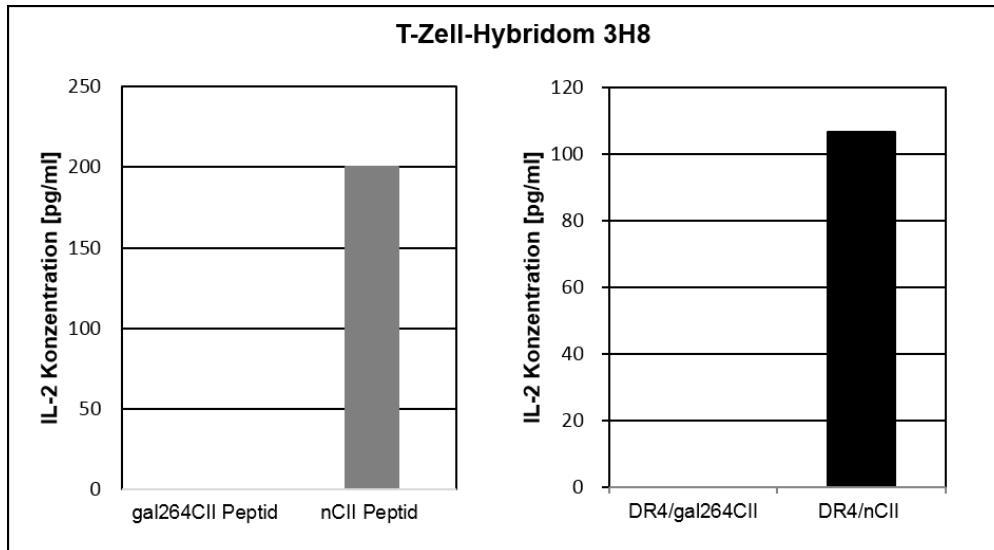


Abb. 11) Nachweis der antigenspezifischen APC-vermittelten Aktivierung der 3H8 T-Zell-Hybridome

Die transgene Makrophagenzellen wurden 5 Std. mit 50 µg/ml CII-Peptid (gal264CII, nCII), 50 µg/ml DR4/nCII- oder 100 µg/ml DR4/gal264CII-Komplex inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen folgte eine Fixierung der Makrophagen mit anschließender Inkubation für 24 Std. mit den 3H8 T-Zell-Hybridomen, welche spezifisch für das unmodifizierte CII sind. Die IL-2 Sekretion in den Mediumüberstand wurde mittels ELISA nachgewiesen. Als Kontrolle für die 3H8 Hybridome 3H8 dienen das gal264CII-Peptid und der DR4/gal264CII-Peptidkomplex.

Das Ergebnis zur Stimulierbarkeit der 3H8 Zellen durch die mit dem DR4/nCII-Komplex vorbehandelten fixierten BL25 Zellen, erlaubt es jedoch nicht zwischen den unten stehenden Möglichkeiten zu differenzieren:

1. Der aktivierende MHC-II/Peptidkomplex ist direkt an die APC-Oberfläche gebunden.
2. Nach dem bereits beschriebenen Mechanismus ist der MHC-II/Peptidkomplex in seiner T-Zellaktivierenden Wirkung von der vorausgehenden Endozytose und nachfolgenden lysosomalen Prozessierung abhängig.

Zur Klärung welche der alternativen Mechanismen involviert ist, wurde der Einfluss einer pharmakologischen Hemmung der lysosomalen Prozessierung während der Vorinkubation der BL25 Zellen mit den DR4/nCII-Komplexen auf die nachfolgende Aktivierung einer IL-2 Antwort der 3H8 Hybridomzellen analysiert.

Zu diesem Zweck wurden steigende Dosen von Hydroxychloroquin (HCQ), das die Prozessierung in lysosomalen Kompartimenten u.a. durch Alkalisierung beeinträchtigt, dem Inkubationsansatz der BL25 Linie mit dem DR4/nCII-Komplex bzw. dem nCII-Peptid zugefügt. Anschließend wurde die Aktivierung der 3H8 Zellen analog zu den in Abbildung 11 dargestellten Ergebnissen durchgeführt. Für den Fall des Einsatzes des synthetischen nCII-Peptides ergibt sich (erwartungsgemäß) kein Einfluss des HCQ auf die nachfolgende IL-2 Sekretion (Abb. 12). Im Gegensatz dazu belegt die in der Abbildung 12 dargestellte, von der eingesetzten HCQ konzentrationsabhängigen Reduktion der IL-2 Antwort durch den DR4/nCII-Komplex, die Abhängigkeit der Wirksamkeit dieses Stimulus unter den experimentellen Bedingungen einer APC-abhängig vermittelten T-Zellaktivierung von der Prozessierung in lysosomalen Kompartimenten nach Endozytose durch die BL25 Zellen.

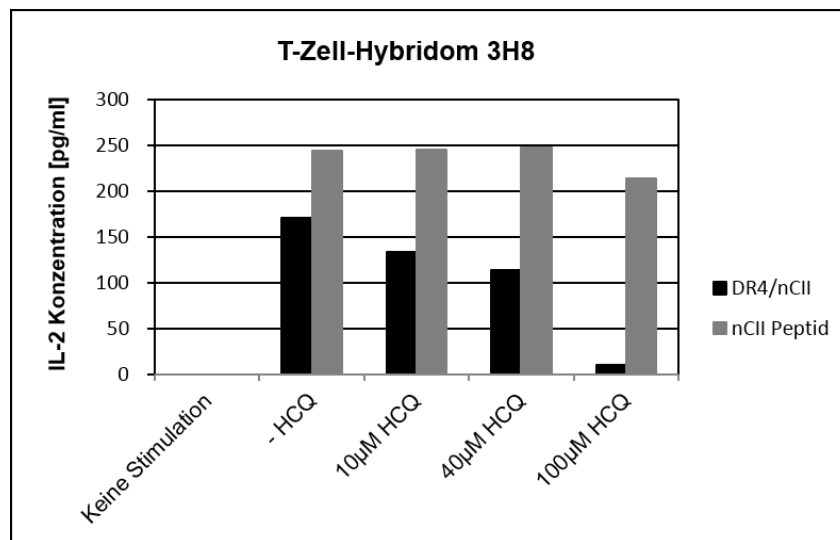


Abb. 12) Nachweis der Hemmung der Antigenpräsentation durch Hydroxychloroquin (HCQ)

Die Makrophagenzellen BL25 wurden für 5 Std. mit 50 µg/ml DR4/nCII-Komplexes oder 50 µg/ml nCII-Peptid inkubiert, gewaschen, fixiert und danach für 24 Std. mit den 3H8 Hybridiomen, welche spezifisch für das unmodifizierte CII sind, inkubiert. Zudem wurde in aufsteigender Konzentration HCQ hinzugegeben. Die IL-2 Sekretion in den Mediumüberstand wurde mittels ELISA nachgewiesen.

3.1.5 Nachweis der Antigenpräsentation mit humanen APCs und den T-Zell-Hybridomen 3H8

Basierend auf den an der BL25 Makrophagenzelllinie gewonnenen Ergebnissen, sollte exemplarisch untersucht werden, ob auch humane APCs nach Exposition zu DR4/nCII-Komplexen diese so prozessieren können, dass sie anschließend in Koinkubation mit den 3H8 Hybridomzellen eine epitopspezifische IL-2 Antwort induzieren können. Zu diesem Zweck wurden APCs eines gesunden DRB1*04:01 positiv genotypisierten Spenders mit dem nCII-Peptid bzw. dem DR4/nCII-Komplex vorinkubiert und nach ihrer Fixierung für die Stimulation von 3H8 T-Zellen eingesetzt. Abbildung 13 zeigt dazu entsprechend die Aktivierbarkeit einer

IL-2 Antwort in den T-Zellen, sowohl bei Einsatz von APCs nach Vorinkubation mit dem nCII-Peptid als auch dem DR4/nCII-Komplex. Die dargestellten Ergebnisse zeigen darüber hinaus, dass dieser über APCs-vermittelte Aktivierungsmodus der 3H8 Hybridomzellen Allelspezifisch HLA-DRB1*04:01 restringiert ist. Dieses Ergebnis belegt, dass unter den gewählten experimentellen Bedingungen der über APCs-vermittelte Weg der indirekten Aktivierung der 3H8 T-Zell-Hybridom durch den DR4/nCII-Komplex abhängig von der Allelspezifität der endogenen MHC-II/Moleküle der APCs ist. Dieses Ergebnis spricht zusammen mit den Studien in der BL25 Makrophagenzelllinie zur HCQ-Sensitivität der APC-vermittelten T-Zellaktivierung durch den rekombinanten DR4/nCII-Komplex für das nachfolgende Szenario: Der MHC-II/Komplex kann nach Endozytose durch APCs, z.B. Makrophagen, in ein lysosomales Kompartiment gelangen und dort enzymatisch prozessiert werden. Das aus dem Komplex freigesetzte nCII-Peptid kann dann nach Beladung neu synthetisierter endogener MHC/Moleküle an die Zelloberfläche gelangen und dort zur T-Zellaktivierung der 3H8 Zellen führen.

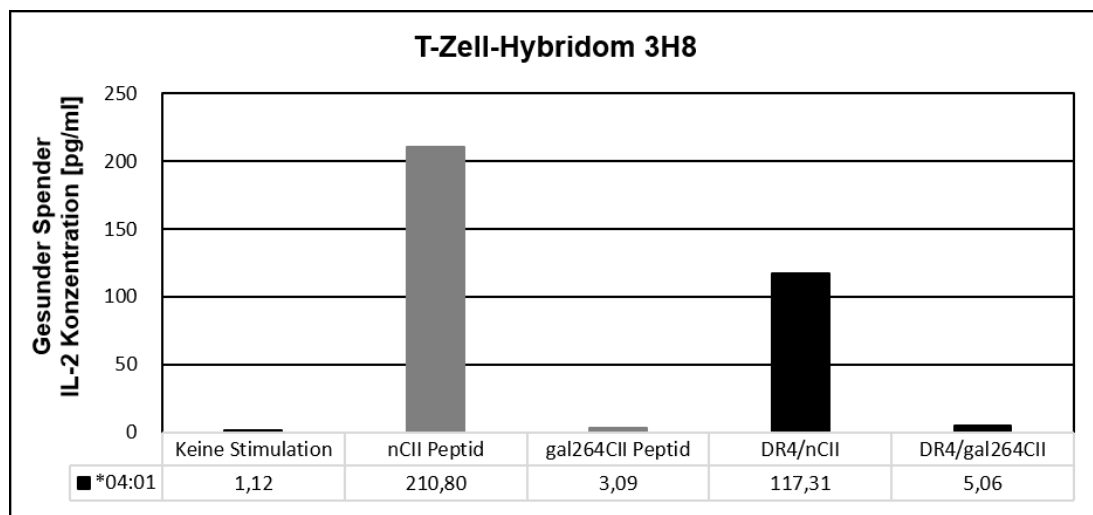


Abb. 13) Allel abhängige APC-vermittelte Aktivierung von T-Zell-Hybridomen mittels humaner APCs

Humane APCs eines gesunden HLA-DRB1*04:01 positiven Spenders wurden 5 Std. mit 50 µg/ml CII-Peptid (gal264CII oder nCII) oder 500 µg/ml MHC-Klasse-II/Peptidkomplex inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen folgte eine Fixierung der humanen APCs mit darauffolgender 24 Std. Inkubation mit den murinen T-Zell-Hybridomen 3H8. Die IL-2 Sekretion in den Mediumüberstand wurde mittels ELISA nachgewiesen.

Dieser von den o.e. indirekten Evidenzen unserer Studien gestützte Mechanismus scheint allerdings gegenüber einer direkten T-Zellstimulation (vgl. Abb. 9, DR4/Komplex: 5 µg/ml) nicht besonders effizient zu sein, da sehr hohe Konzentrationen des MHC-II/Peptidkomplexes (100 µg/ml, Abb.11 und 500 µg/ml, Abb. 13) notwendig sind.

3.2 Detektion antigenspezifischer humaner T-Zellen

3.2.1 Nachweis antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten und gesunden Spendern (HLA-DRB1*04:01) mittels Tetramerbindung

In gemeinsamen Vorarbeiten der eigenen Arbeitsgruppe mit Prof. R. Holmdahl konnten in Studien der murinen CIA und humanen T-Zellantworten kollagenspezifischer T-Zellen, die zum einen das unmodifizierte CII, aber auch das galaktosylierte CII an Position 264 erkennen, nachgewiesen werden (Bäcklund, Carlsen, et al. 2002).

In den nachfolgend dargestellten Ergebnissen der eigenen Studien wurde mittels Tetramerfärbung untersucht, ob in PBMCs von humanen RA-Patienten und gesunden Spendern, die Träger des Allels HLA-DRB1*04:01 sind, antigenspezifische T-Zellen detektiert werden können. Exemplarisch ist in Abbildung 15 ein repräsentatives Ergebnis mit dem Nachweis von 0,028% CII-Epitopspezifischen Zellen über die detektierte Bindung des DR4/gal264CII-Tetramers in der Gesamtpopulation an T-Helferzellen des analysierten RA-Patienten dargestellt. Im peripheren Blut des analog analysierten gesunden Spenders, konnten keine DR4/gal264CII-spezifischen T-Zellen durchflusszytometrisch identifiziert werden.

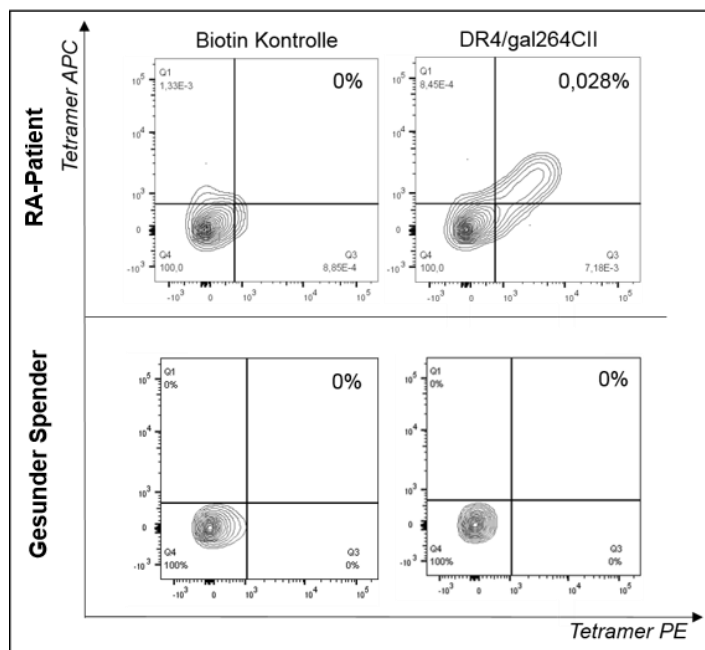


Abb. 14) Nachweis antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut eines RA-Patienten oder gesunden Spenders (HLA-DRB1*04:01) mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von MHC-Klasse-II/Tetrameren mit Spezifität für das galaktosylierte (K264) CII-Epitop

Für die T-Helferzellisolierung aus PBMCs wurde eine CD4 Anreicherung durchgeführt und die Zellen daraufhin mit MHC-Klasse-II/Tetrameren angefärbt. Der Komplex wird über zwei konjugierte Fluorochrome im Durchflusszytometer visualisiert (Doppelbestimmung, PE und APC). Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende CD4 Zellpopulation. Als Negativkontrolle dient ein Biotin-Streptavidin-Komplex ohne ein spezifisches Peptidkonjugat.

Die Frequenz von antigenspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten wurde im Folgenden statistisch ausgewertet. Hierfür wurden T-Helferzellen aus PBMCs von RA-Patienten und gesunden Spendern (HLA-DRB1*04:01) isoliert und durchflusszytometrisch nach Bindung mit den DR4/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) untersucht.

In RA-Patienten konnten gleichermaßen antigenspezifische T-Zellen, die entweder den DR4/gal264CII- oder den DR4/nCII-Komplex binden, detektiert werden (s. Abb. 15 a). Werden allerdings die Frequenzen von antigenspezifischen T-Zellen in RA-Patienten mit gesunden Spendern verglichen, lässt sich ein signifikant höherer Prozentsatz an antigenspezifischen T-Zellen in PBMCs von RA-Patienten quantifizieren (s. Abb. 15 b).

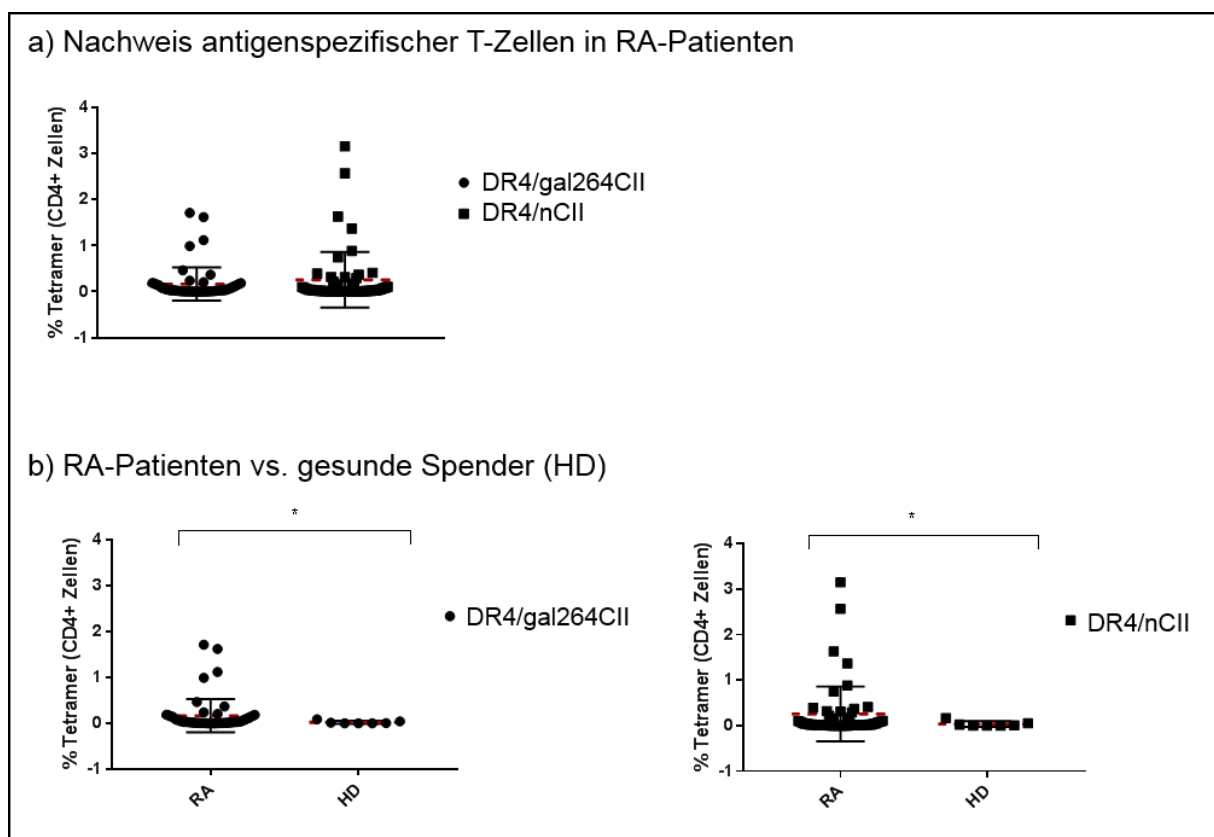


Abb. 15) Nachweis antigenspezifischer T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten oder gesunden Spendern (HLA-DRB1*04:01) mittels Durchflusszytometrie unter Verwendung von MHC-Klasse-II/Tetrameren

T-Helferzellen wurden aus PBMCs von RA-Patienten und gesunder Spendern mittels CD4 Aufreinigungsbeads isoliert und mit MHC-Klasse-II/Tetrameren (DR4/gal264CII, DR4/nCII) angefärbt. Der Komplex wird über die Fluorochrome PE und APC im Durchflusszytometer visualisiert. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende CD4 Zellpopulation. a) Spezifische Tetramerbindung von T-Helferzellen aus RA-Patienten (n = 55) unter Verwendung von MHC-Klasse-II/Tetrameren mit unterschiedlicher Spezifität. b) Signifikanter Unterschied (p = 0,0455) der antigenspezifischen Bindung mit beiden MHC-Klasse-II/Tetrameren (DR4/gal264CII, DR4/nCII) im Vergleich zwischen RA-Patienten (n = 55) und HD (n = 7). Statistische Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt.

3.2.2 Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) mittels funktioneller Studien der T-Zellaktivierung

In den vorherigen Ergebnissen konnten antigenspezifische T-Zellen in PBMCs von RA-Patienten mit dem HLA-DRB1*04:01 identifiziert werden. Es binden im Durchschnitt 0,17% der CD4⁺ T-Helferzellen das DR4/gal264CII-Tetramer und 0,26% das Tetramer mit dem unmodifizierten CII-Peptid. Um die Funktionalität dieser antigenspezifischen T-Zellen zu untersuchen, wurden T-Zellaktivierungsversuche durchgeführt. Hierbei wurde durchflusszytometrisch die Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD154 auf T-Helferzellen detektiert. Nur antigenspezifische T-Helferzellen, die das MHC-Klasse-II/Molekül mit entsprechendem Peptid auf APCs präsentiert bekommen, antworten mit einer detektierbaren Hochregulation ihres Aktivierungsmarkers CD154. Als Positivkontrolle, um die generelle Aktivierbarkeit der Zellen eines RA-Patienten zu analysieren, wurde mit dem Superantigen Staphylococcus enterotoxin B stimuliert. Dies ist insofern notwendig, da die hier analysierten RA-Patienten in unterschiedlichem Ausmaß unter immunsupprimierender Medikation stehen und daher im Einzelfall durch die hier verwendeten Stimuli grundsätzlich nicht aktivierbar sein können. Wie in Abbildung 16 veranschaulicht, werden signifikant mehr T-Helferzellen durch das Präsentieren des gal264CII an MHC-Klasse-II/Molekülen von APCs aktiviert, als mit dem unmodifizierten CII-Peptid.

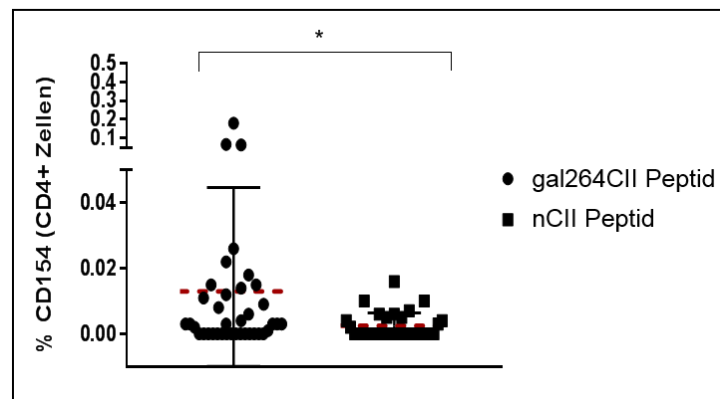


Abb. 16) Nachweis von antigenspezifischen T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) mittels Durchflusszytometrie nach Stimulation mit einem synthetischen CII-Peptid
 PBMCs von RA-Patienten wurden 7 Std. mit einem CII-Peptid (gal264CII, nCII) + α CD40 stimuliert. Die Expression des Aktivierungsmarkers CD154 wurde durchflusszytometrisch nachgewiesen. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende CD4 Zellpopulation. Dargestellt sind CD154⁺/CD4⁺ T-Helferzellen nach gal264CII- oder nCII-Peptidstimulation. Signifikant höhere Aktivierung von T-Helferzellen mit dem gal264CII-Peptid (n = 38) als mit dem unmodifizierten nCII-Peptid (n = 32, p = 0,0355). Statistische Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-Tests ermittelt.

Zusammenfassend zeigen die Studien zur antigenspezifischen Aktivierung in PBMCs HLA-DRB1*04:01 positiver RA-Patienten die Existenz kollagenspezifischer T-Zellen, die entweder eine galaktosylierte oder unmodifizierte Variante der immundominanten Region zwischen AS 259-270 im CII erkennen. Zudem zeigen die Daten, dass sehr wenige antigenspezifische T-Zellen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) in der Peripherie von gesunden Spendern vorkommen. Darüber hinaus lassen sich signifikant mehr T-Helferzellen identifizieren, die nach galCII-Peptidstimulation den CD154 Aktivierungsmarker hochregulieren als im Vergleich zur Stimulation mit dem nCII-Peptid.

3.3 Amplifikation des humanen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors

3.3.1 Strategien zur Isolierung CII-spezifischer T-Zellen für die Einzelzellanalyse der variablen Region des T-Zell-Rezeptors

Im Kontext des in den vorausgehenden Abschnitten erfolgten Nachweises CII-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten ist es zur weiteren Charakterisierung der funktionell relevanten T-Zellsubpopulation von Bedeutung, das für die Expression der CII-Epitop-spezifischen Rezeptoren verwendete V-Genrepertoire aufzuklären. So sollten die für die Antigenerkennung im Rahmen CII-spezifischer Autoimmunantworten wichtigen variablen Regionen des T-Zell-Rezeptors, die seine Bindungsspezifität für das galaktosylierte CII-Epitop im Kontext des HLA-DRA1/DRB1*04:01 Moleküls kodieren, identifiziert werden. Für die Identifikation, sowie Isolation CII-spezifischer T-Zellen und der darauffolgenden Einzelzellanalyse wurden drei experimentelle Strategien in der vorliegenden Arbeit verfolgt:

1. Oberflächenmarkierung des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors: Detektion der CII-spezifischen T-Zellen mittels MHC-Klasse-II/Peptidkomplexerfärbung
2. Funktionelle Analyse: Detektion der CII-spezifischen T-Zellen nach CII-Peptidstimulation und Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD154
3. Konsekutive Analyse: Identifikation der CII-spezifischen T-Zellen nach Aktivierung, anschließender Expansion und Reanalyse der Zellpopulation mittels Tetramerfärbung

Die konsekutive Analyse für die Isolierung CII-spezifischer T-Zellen wurde gewählt, um die spezifische Oberflächenmarkierung des T-Zell-Rezeptors mit dem funktionellen Aspekt der Aktivierung nach CII-Peptidstimulation zu kombinieren. Vor allem hinsichtlich der immunsupprimierenden Medikation der RA-Patienten und einem eventuellen damit einhergehenden anergen Zustand der T-Zellen sollte gewährleistet werden, dass funktionell aktive T-Zellen für die Analyse des Genexpressionsprofils verwendet werden.

Für die Untersuchung der variablen Regionen des antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors wurden die Einzelzellen am Durchflusszytometer isoliert und mittels PCR oder mRNA-Sequenzierung (Fraunhofer ITEM, Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Experimentelle Medizin ITEM) amplifiziert.

3.3.2 Sequenzanalysen der amplifizierten antigenspezifischen humanen T-Zell-Rezeptoren

Während der T-Zellreifung werden die α - und β -Gensegmente durch die V(D)J-Umlagerung gebildet. Die variablen Domänen der α - und β -Untereinheit setzen sich aus den VJ-Segmenten für die α - und den VDJ-Segmenten für die β -Kette zusammen.

Für die Auswertung der häufigsten $V\alpha$ - und $V\beta$ -Gene wurden 344 Einzelzellen aus 21 Patienten mittels Tetramerbindung (DR4/gal264CII) und/oder T-Zellaktivierung (gal264CII Peptid) isoliert. Nachfolgend sind alle mittels Multiplex-PCR und mRNA-Sequenzierung amplifizierten V(D)J-Segmente der α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors angegeben.

Das am häufigsten amplifizierte $V\alpha$ -Segment ist das TRAV25 mit 34%. Des Weiteren konnten sechs andere TRAV-Segmente in einer Häufigkeit von 6 - 10% identifiziert werden (TRAV9-2, TRAV8-2 oder TRAV8-4, TRAV8-6, TRAV4, TRAV23/DV6). Das TRAJ30 ($J\alpha$ Segment) wurde mit einer Häufigkeit von 14% amplifiziert. Unter den variablen β -Segmenten wurde das TRBV12-3 oder TRBV12-4 mit 34% am häufigsten identifiziert. Nachfolgend konnten mit einer Häufigkeit von 5 - 10% die Segmente TRBV28, TRBV7-8, TRBV6-6 und TRBV14 detektiert werden. Das TRBD1 (D Segment) ist mit 69% und das TRBJ1-2 (J Segment) ist mit 23% Häufigkeit amplifiziert worden (s. Abb. 17 a).

In Abbildung 17 b sind die zusammengehörenden VJ-Gensegmente für die α -Kette und die zusammengehörenden VDJ-Gensegmente der β -Kette aufgelistet. Hierbei fällt auf, dass das am häufigsten amplifizierte VJ α -Gen mit 15% das TRAV25/TRAJ■ ist. Gefolgt von TRAV25/TRAJ■ und TRAV25/TRAJ■, TRAV8-2 oder TRAV8-4/TRAJ■ und TRAV4/TRAJ■ mit einer Häufigkeit von 5 - 9%. Das am häufigsten amplifizierte VDJ β -Gen ist mit 20% das TRBV12-3/TRBD■/TRBJ■. Alle V(D)J-Segmente, die mit einer Häufigkeit von unter 5% amplifiziert wurden, sind in der Abbildung 17 gezeigt. Segmente die mit einer Frequenz < 1% amplifiziert wurden, sind nicht aufgelistet.

nicht aufgelistet, da keine passende β -Kette gefunden werden konnte. Das am stärksten vertretene $V\beta$ -Gen ist das TRBV12-3 bzw. TRBV12-4. Für dieses Gen wurden die meisten unterschiedlichen $V\alpha$ -Gene amplifiziert. Auch für die Gene TRBV28, TRBV7-8 und TRBV6-6 gibt es mehr als zwei unterschiedliche α -Gene.

Tab.3: Zusammengehörende $V\alpha$ - und $V\beta$ -Gene aus einer CD4⁺ Einzelzelle

Vα-Gen	Vβ-Gen
TRAV3	TRBV6-6
TRAV4	TRBV12-3, 12-4
TRAV6	TRBV3-1
TRAV8-2, 8-4	TRBV12-3, 12-4
TRAV8-4	TRBV6-6
TRAV8-4	TRBV13
TRAV8-4	TRBV28
TRAV8-6	TRBV12-3,12-4
TRAV8-6	TRBV24-1
TRAV9-2	TRBV2
TRAV9-2	TRBV5-6
TRAV9-2	TRBV14
TRAV10	TRBV12-3,12-4
TRAV12-1, 12-2	TRBV4-3
TRAV12-3	TRBV6-6
TRAV12-3	TRBV5-1
TRAV12-3	TRBV11-2
TRAV12-3	TRBV14
TRAV12-3	TRBV28
TRAV13-1	TRBV7-2, 7-8
TRAV17	TRBV12-3,12-4
TRAV19	TRBV7-2, 7-8
TRAV19	TRBV7-3, 7-4
TRAV24	TRBV28
TRAV25	TRBV2
TRAV25	TRBV5-6
TRAV25	TRBV6-1
TRAV25	TRBV7-2
TRAV25	TRBV7-3
TRAV25	TRBV7-3, 7-4
TRAV25	TRBV7-8
TRAV25	TRBV11-3
TRAV25	TRBV12-3,12-4
TRAV25	TRBV27
TRAV26-1	TRBV12-1
TRAV27	TRBV6-6
TRAV34	TRBV6-1
TRAV41	TRBV6-5

3.4 Jurkat-Zelllinie als humanes zelluläres Modellsystem

3.4.1 Extrazelluläre Charakterisierung der Jurkat-WT Zelllinie und der Jurkat-76 Zelllinie

Die aus einer Zelle amplifizierten TCR-Sequenzen wurden von der Firma Geneart synthetisiert und in einen lentiviralen Vektor kloniert. Anschließend wurde die klonierte TCR-Sequenz in eine humane Jurkat T-Zell-Rezeptor defiziente T-Zelllinie, der Jurkat-76 Zelllinie, transduziert, um nachfolgend die Spezifität des TCRs experimentell zu validieren und weitere Analysen neuer Erkenntnisse zum funktionellen Beitrag dieser antigenspezifischen T-Zellen im Kontext der RA-Pathogenese zu gewinnen.

Die Jurkat-Zelllinie ist eines der am weitesten verbreiteten zellulären T-Zellmodelle. Der hier verwendeten Zelllinie 76 fehlt im Gegensatz zu der Jurkat-WT Zelllinie die endogene α - und β -Kette des TCRs (Voss et al. 2006). Die Defizienz des endogenen TCRs erlaubt die Expression von transgenen Rezeptorketten und ermöglicht so die Analyse von antigenspezifischen Immunantworten. Die Zelllinie wurde uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Firma TRON, Mainz).

Zur besseren Charakterisierung der Jurkat-Zellen wurden diese in Abbildung 18 extrazellulär mit CD4, CD8, CD28 und dem TCR angefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Bei der Jurkat-WT Zelllinie handelt es sich um eine T-Zelle, die zu 24,3% CD4/CD28 und zu 32,4% den TCR auf der Zelloberfläche exprimiert. Bei der Jurkat-76 Zelllinie konnte zu 10,8% CD4/CD28 detektiert werden, jedoch fehlt wie erwartet die TCR-Expression auf der Zelloberfläche.

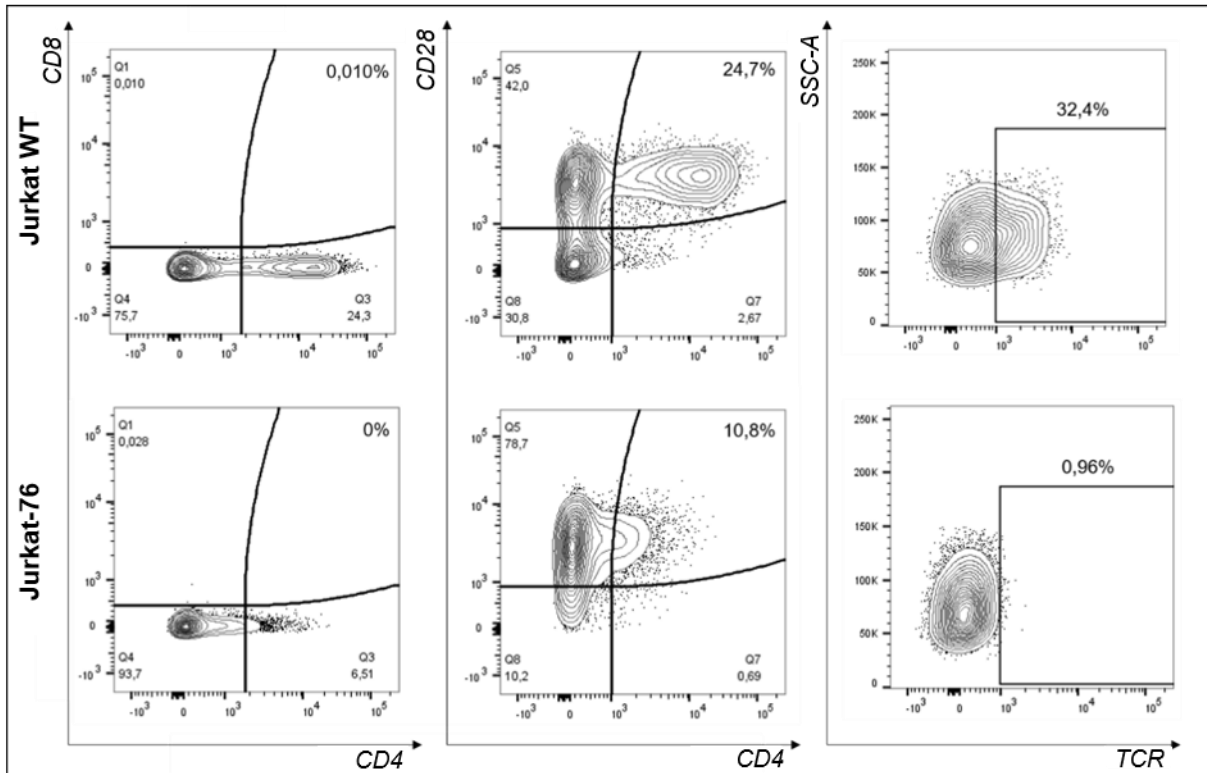


Abb. 18) Durchflusszytometrische Analyse der Jurkat-WT und Jurkat-76 Zelllinie

Die Jurkat-WT Zelllinie und die TCR defiziente T-Zelllinie Jurkat-76 wurden mit verschiedenen Oberflächenmarkern (CD4, CD8, CD28, α TCR) markiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende Zellpopulation.

Es konnte bestätigt werden, dass die Jurkat-76 Zelllinie keinen TCR auf der Zelloberfläche exprimiert und somit ein geeignetes Modell für die lentivirale Transduktion und Expression antigenspezifischer T-Zell-Rezeptorketten darstellt.

Zum besseren Verständnis und zur Kontrolle der experimentellen Stabilität wurden zunächst Positivkontrollen mit bereits bekannten Rezeptorsequenzen generiert. Zum einen wurde eine murine Rezeptorsequenz verwendet, die spezifisch das gal264CII-Epitop erkennt und zum anderen wurde eine humane Rezeptorsequenz benutzt, die spezifisch für das Influenza Hämagglutinin (HA)-Epitop ist. Der murine gal264CII-TCR wurde mittels PCR aus den murinen T-Zell-Hybridomen mDR1.1, welche spezifisch für das galK264CII ist, amplifiziert. Die Sequenz des humanen Influenza Hämagglutinin (HA) spezifischen TCRs ist aus der Literatur entnommen (Hennecke und Wiley 2002) und wurde für die Verwendung in den Expressionsstudien zur Nukleotidsynthese in Auftrag gegeben. Diese beiden Positivkontrollen sind in Abbildung 19 schematisch visualisiert.

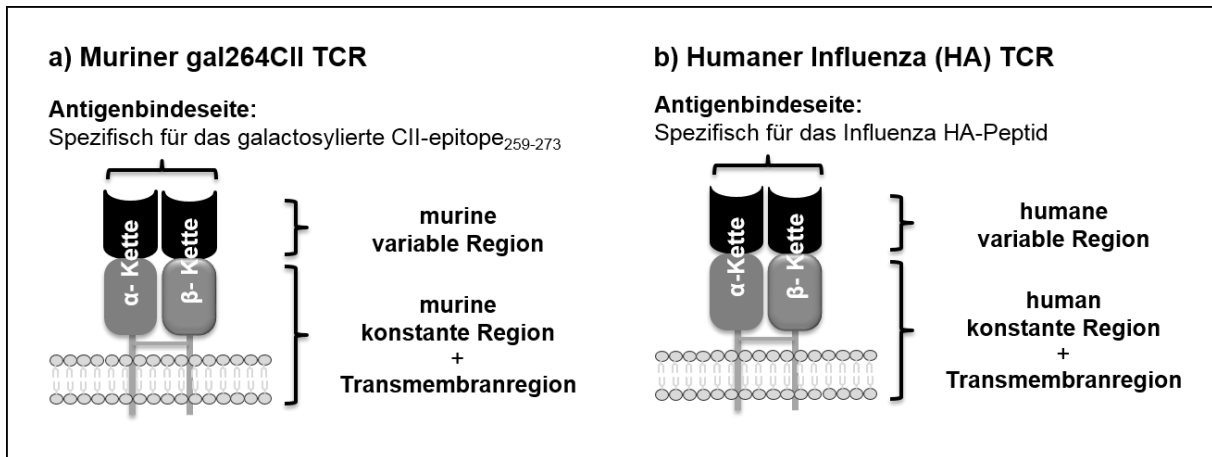


Abb. 19) Schematische Abbildung des murinen gal264CII- und des humanen Influenza (HA)-T-Zell-Rezeptors

Der TCR ist ein Proteinkomplex, bestehend aus einer α - und einer β -Kette. Dieser Rezeptor ist auf der Zelloberfläche in der Transmembranregion verankert und spielt bei der Erkennung von Antigenen, die durch MHC/Moleküle präsentiert werden, eine entscheidende Rolle. Zudem ist der TCR in eine variable Antigenbindeseite und eine konstante Region unterteilt. a) Humane Zelllinie (Jurkat-76), die einen murinen gal264CII-TCR, mit einer Spezifität für das galactosylierte CII-Epitop an Position K264, aufweist (TRAV6D-7/TRAJ12, TRBV13-2/TRBD2/TRBJ2-5). b) Humane Zelllinie (Jurkat-76), die einen humanen Influenza (HA)-TCR mit Spezifität für das Influenza HA-Peptid exprimiert (TRAV8-4/TRAJ48, TRBV28/TRBD1/TRAJ1-2).

3.4.2 Nachweis des transgenen antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors

Um die erfolgreiche Transduktion der Jurkat-Zellen nachzuweisen, wurde zunächst der CD3/TCR-Komplex auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch und mittels Immunfluoreszenzfärbung angefärbt (s. Abb. 20). Alle Zelllinien, bis auf die nicht transduzierte TCR-defiziente Jurkat-76 Zelllinie, exprimieren den CD3/TCR-Komplex auf der Zelloberfläche. Die Jurkat-WT Zelllinie exprimiert den CD3/TCR-Komplex zu 23,1%, die transduzierte humane Zelllinie mit dem murinen gal264CII-TCR zu 92,5% und die humane Influenza (HA) Zelllinie zu 70,4%. Mittels Fluoreszenzfärbung konnte eine geringe Dichte an TCR auf der Zelloberfläche der Jurkat-WT Zelllinie gemessen werden, während die humane Zelllinie mit dem TCR, welcher spezifisch für das murine gal264CII ist und die humane Influenza T-Zelllinie, welche spezifisch für das Influenza HA-Peptid ist, eine hohe TCR-Dichte auf der Zelloberfläche exprimieren.

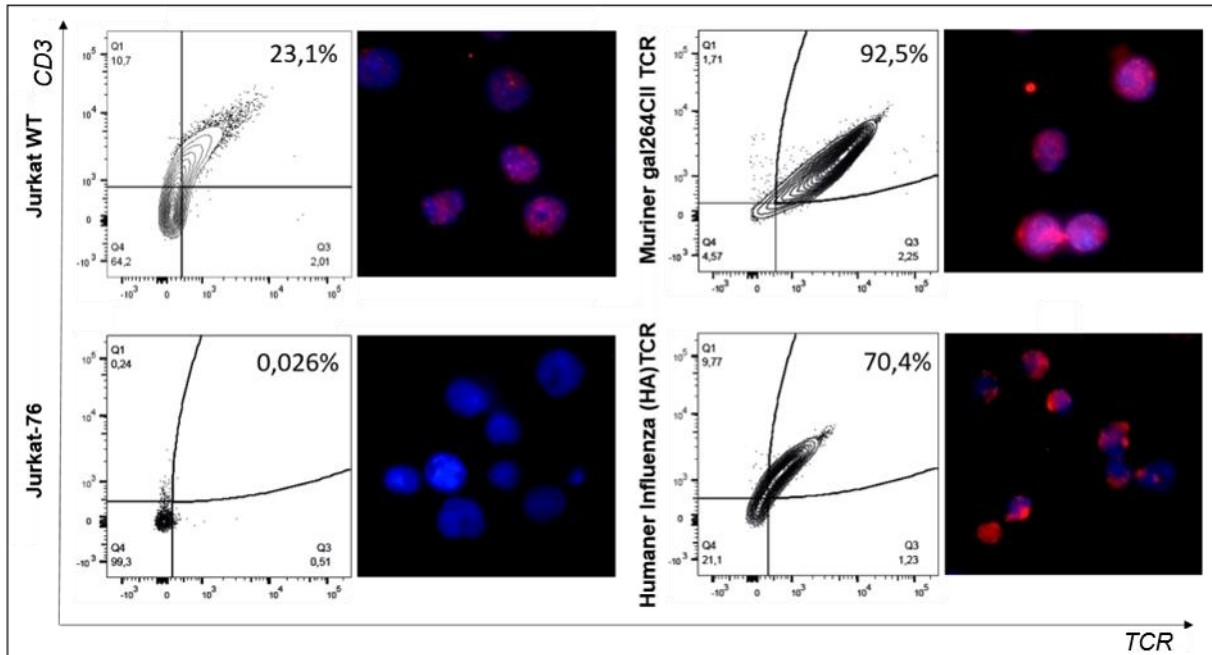


Abb. 20) Nachweis des T-Zell-Rezeptors mittels Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenzfärbung

Die CD3/TCR Expression der Jurkat-WT Zelllinie, der TCR-defizienten T-Zelllinie Jurkat-76 und zweier transduzierter humaner T-Zelllinien, die einen TCR mit unterschiedlicher Spezifität exprimieren. Die Zelllinien wurden mit einem α CD3 (human) und α TCR Antikörper (murin und human) angefärbt. Als Kontrolle wurde eine IgG-Kontrolle mitgeführt. Zudem wurde der TCR aller Zelllinien mittels Immunfluoreszenz angefärbt. Zur besseren Lokalisierung der Zellkerne wurde eine DAPI-Färbung angewendet. Die TCR α -Kette wurde mit einem Texas Red konjugierten Sekundärantikörper fallabhängig speziesspezifisch je anti-human oder anti-murin visualisiert. Die Mikroskopaufnahmen wurden in 40x Vergrößerung angefertigt.

3.4.3 Nachweis der T-Zell-Rezeptorspezifität der Positivkontrollen mittels Tetramerbindung

Nachfolgend wurde mittels Tetramerfärbung die Spezifität der transduzierten T-Zell-Rezeptoren, die des murinen gal264CII- und die des humanen Influenza (HA)-TCRs, untersucht. Die humane T-Zelllinie Jurkat-76, die den murinen gal264CII-TCR exprimiert, bindet den DR4/gal264CII-Komplex spezifisch zu 74,5% und die humane T-Zelllinie, die den Influenza TCR exprimiert, bindet den DR4/HA-Komplex spezifisch zu 56,4%. Beide Positivkontrollen, mit unterschiedlicher Spezifität, erkennen den jeweils anderen DR4/Peptidkomplex nicht (s. Abb. 21).

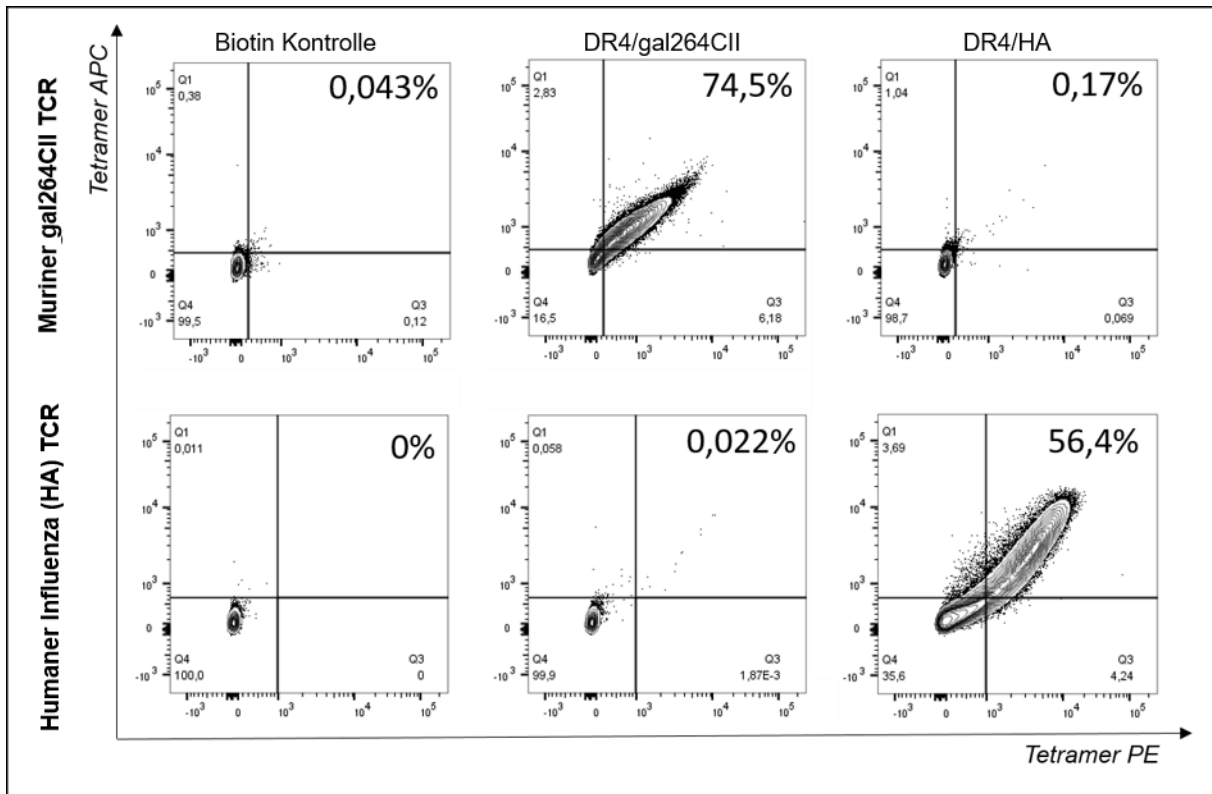


Abb. 21) Tetramerbindung der Jurkat-Zellen mit dem transduzierten murinen gal264CII- und dem humanen Influenza (HA)-TCR

Beide Zelllinien wurden mittels MHC-Klasse-II/Tetrameren (DR4/gal264CII, DR4/HA) angefärbt. Der Komplex wird über zwei konjugierte Fluorochrome PE und APC (Doppelbestimmung) am Durchflusszytometer visualisiert. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende Zellpopulation. Als Negativkontrolle dient ein Biotin-Streptavidin-Komplex ohne ein spezifisches Peptidkonjugat.

Die Daten zeigen, dass die lentivirale Transduktion erfolgreich war und die T-Zell-Rezeptoren der Positivkontrollen spezifisch den jeweiligen MHC-Klasse-II/Peptidkomplex binden. Somit wurden nun die amplifizierten humanen T-Zell-Rezeptoren, die aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) amplifiziert wurden (s. Tab. 4), in die Jurkat TCR-defiziente Zelllinie transduziert.

3.4.4 Sequenzanalysen aller lentiviral transduzierter Konstrukte

Im vorherigen Abschnitt konnte die Spezifität der Positivkontrollen gezeigt werden. In Tabelle 4 sind alle lentiviral transduzierten Konstrukte dargestellt, die ebenfalls in die Jurkat-76 Zelllinie transduziert wurden. Die Tabelle ist in Spezies, Spezifität, V(D)J-Gene der α - und β -Kette und in die CDR3-Regionen (*complementarity determining regions*, CDRs) unterteilt. In rot sind die konservierten Aminosäuren visualisiert.

Tab. 4: Amplifizierte humane und murine TCR-Sequenzen, die in die Jurkat defiziente T-Zelllinie (Jurkat-76) transduziert wurden

Spezies	Spezifität	α -Kette VJ Gen	CDR3-Region	β -Kette VDJ Gen	CDR3-Region
murin	gal264CII	TRAV6D-7/TRA		TRBV13-2/TRBD2/TRB	
human	HA	TRAV8-4/TRA		TRBV28/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV25/TRA		TRBV2/TRBD2/TRBJ	
human	gal264CII	TRAV9-2/TRA		TRBV2/TRBD1/TRBJ	
human	gal264CII	TRAV8-6/TRA		TRBV12-3/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV8-4/TRA		TRBV12-3/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV12-3/TRA		TRBV6-6/TRBD2/TRB	
human	gal264CII	TRAV12-3/TRA		TRBV28/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV8-4/TRA		TRBV6-6/TRBD2/TRB	
human	gal264CII	TRAV8-4/TRA		TRBV28/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV3/TRAJ		TRBV6-6/TRBD2/TRB	
human	gal264CII	TRAV24/TRA		TRBV28/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV8-4/TRA		TRBV14/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV8-4/TRA		TRBV13/TRBD2/TRB	
human	nCII	TRAV26-1/TRA		TRBV13/TRBD1/TRB	
murin	nCII	TRAV19/TRA		TRBV13-3/TRBD2/TRB	
human	gal264CII	TRAV27/TRA		TRBV6-6/TRBD1/TRB	
human	gal264CII	TRAV9-2/TRA		TRBV14/TRBD2/TRB	

Die CDR3-Region trägt wesentlich zu den antigenbindenden Strukturcharakteristika des TCRs bei und ist somit von großer Bedeutung für die nachstehenden durchflusszytometrischen Analysen zur Antigen-spezifität. Zudem zeigt die CDR3-Region aufgrund der somatischen Rekombination die größte Variabilität in der TCR-Sequenz auf (Susumu Tonegawa 1983). Die CDR3-Regionen der α -Kette sind zwischen 12 - 16 Aminosäuren lang, mit Ausnahme einer nur 9 Aminosäure kurzen CDR3-Region, kodiert durch eine aus den Gensegmenten TRAV25/TRAJ \blacksquare rekombinierte α -Kettensequenz. Die CDR3-Regionen der β -Kette sind 12 - 18 Aminosäuren lang. Hierbei gibt es zwei Ausnahmen, für die das V-Gensegment TRBV2 kodiert und eine CDR3-Region mit einer Länge von 10 Aminosäuren aufzeigt. Für die in Abbildung 22 dargestellte vergleichende Analyse der CDR3-Regionen mit der bekannten gal264CII-spezifischen murinen TCR-Sequenz, wurden nur die jeweils zugleich für die α - und β -Kette aus einer singulären humanen Zelle amplifizierten Gensegmente berücksichtigt.

Es konnten für die α -CDR3-Regionen die stärksten Sequenzhomologien zwischen der humanen TRAV8-4/TRAJ \blacksquare und TRAV9-2/TRAJ \blacksquare Sequenz mit der murinen gal264CII-TCR-Sequenz festgestellt werden. Im Vergleich der β -CDR3-Regionen ergaben sich die stärksten Sequenzhomologien zwischen der humanen TRBV13/TRBD \blacksquare /TRBJ \blacksquare und TRBV6-6/TRBD \blacksquare /TRBJ \blacksquare Sequenz mit der murinen gal264CII-TCR-Sequenz.

VJ α CDR3-Regionen

Human_gal264_TRAV12-3/		
Human_gal264_TRAV12-3/		
Human_gal264_TRAV25/TF		
Human_gal264_TRAV24/TF		
Human_gal264_TRAV8-4/T		
Murin_gal264_TRAV6D-7/T		
Human_gal264_TRAV9-2/T		
Human_gal264_TRAV27/TF		
Human_gal264_TRAV8-4/T		
Human_gal264_TRAV9-2/T		
Human_g264_TRAV3/TRA		
Human_gal264_TRAV8-6/T		
Human_gal264_TRAV8-4/T		

VDJ β CDR3-Regionen

Human_gal264_TRBV12-3/TRBD1/T		
Human_gal264_TRBV14/TRBD1/TR		
Human_gal264_TRBV28/TRBD1/TR		
Human_gal264_TRBV14/TRBD2/TR		
Human_gal264_TRBV13/TRBD2/TR		
Murin_gal264_TRBV13-2/TRBD2/TR		
Human_gal264_TRBV6-6/TRBD1/TR		
Human_gal264_TRBV2/TRBD2/TRB		
Human_gal264_TRBV2/TRBD1/TRB		
Human_gal264_TRBV6-6/TRBD2/TR		
Human_gal264_TRBV6-6/TRBD2/TR		

Abb. 22) Vergleich der α - und β -CDR3-Regionen aller gal264CII-spezifischen TCR-Sequenzen der transduzierten TCR-Konstrukte mit der murinen gal264CII-TCR-Sequenz

Auflistung aller α - und β -CDR3-Regionen, die aus einer Zelle amplifiziert wurden. Die in rot markierten Aminosäuren zeigen eine gute, in gelb eine mittelmäßige, in grün eine geringere und in blau die geringste Übereinstimmung der Aminosäuren.

Für die weiteren Untersuchungen sind neben den Sequenzhomologien zu der bereits bekannten epitopspezifischen (gal264CII) murinen TCR-Sequenz allerdings die Paarungen von α - und β -Genen, die aus einer Einzelzelle identifiziert wurden, wichtig.

Hierbei fällt auf, dass das humane α -Gen TRAV8-4 mit dem β -Gen TRBV13 und das humane α -Gen TRAV9-2 mit dem β -Gen TRBV14 aus einer Zelle amplifiziert wurden. Dies sind tatsächlich auch die Sequenzen, die die höchste Ähnlichkeit mit dem bekannten antigenspezifischen murinen gal264CII-TCR aufweisen (s. Abb. 22). Als nächstes wurden diese TCR-Sequenzen lentiviral in die Jurkat defiziente T-Zelllinie transduziert, um die Expression auf der Zelloberfläche und die Antigen-spezifität zu überprüfen.

3.4.5 Nachweis des CD3/TCR-Komplexes und der T-Zell-Rezeptorspezifität zweier humaner TCR-Konstrukte

Nachfolgend wurde der CD3/TCR-Komplex, die Spezifität und die Aktivierbarkeit dieser Zellen nach erfolgreicher TCR-Transduktion untersucht. Die erfolgreiche Transduktion der Jurkat-Zellen und die korrekte Expression auf der Zelloberfläche lässt sich anhand einer CD3/TCR Färbung mittels spezifischer Antikörper auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch nachweisen.

Die Jurkat-76 defiziente T-Zelllinie wurde zum einen lentiviral mit der humanen TRAV8-4/TRBV13 TCR-Sequenz und zum anderen mit der humanen TRAV9-2/TRBV14 TCR-Sequenz, welche ursprünglich aus unterschiedlichen humanen T-Zellen nach Selektion auf Spezifität für das gal264CII isoliert worden waren, transduziert. Die Jurkat-Zelllinie mit der humanen TCR-Sequenz TRAV8-4/TRBV13 exprimiert zu 84,5% und die humane TCR-Sequenz TRAV9-2/TRBV14 exprimiert zu 61,1% den CD3/TCR-Komplex auf der Zelloberfläche (s. Abb. 23).

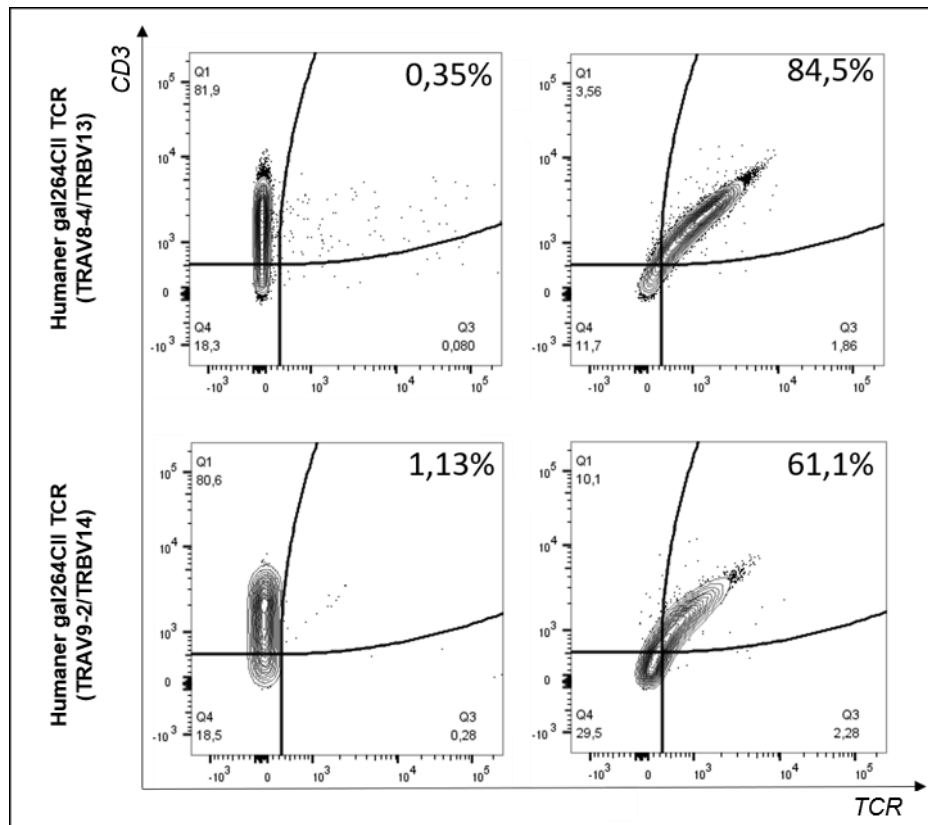


Abb. 23) Durchflusszytometrischer Nachweis des CD3/TCR-Komplexes auf der Zelloberfläche der transduzierten humanen T-Zelllinien mit dem spezifischen TCR für das galaktosylierte CII-Peptid an Position K264

Die Jurkat-76 Zelllinie wurde lentiviral mit zwei gal264CII-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduziert. Die Expression des CD3/TCR-Komplexes auf der Oberfläche der T-Zelllinie, wurde durchflusszytometrisch mit einem α TCR Antikörper und einem α CD3 Antikörper nachgewiesen. Zur Diskriminierung von toten Zellen wurde ein lebend/tot Marker verwendet. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende Zellpopulation. Als Negativkontrolle wurde eine IgG-Kontrolle mitgeführt.

Nachfolgend wurde mittels Tetramerfärbung die Spezifität der transduzierten T-Zellen untersucht. Beide gal264CII-TCR-Sequenzen, welche spezifisch isoliert und in die Jurkat-76 defiziente T-Zelllinie transduziert wurden, binden nach erfolgreicher Transduktion spezifisch den DR4/gal264-Komplex. Die Zelllinie mit der TCR-Sequenz TRAV8-4/TRBV13 bindet den Tetramerkomplex zu 20,1% und die Zelllinie mit der TCR-Sequenz TRAV9-2/TRBV14 bindet zu 7,79% (s. Abb. 24). Beide transduzierten T-Zell-Rezeptoren binden den DR4/Peptidkomplex mit dem nicht modifizierten CII-Peptid gar nicht bzw. allenfalls marginal unspezifisch. Die Ergebnisse belegen damit für beide exprimierten humanen T-Zell-Rezeptoren ihre Spezifität für den DR4/gal264CII-Peptidkomplex, wenn auch mit einer gegenüber dem rekombinanten murinen Rezeptor reduzierten quantitativen Bindungsfähigkeit.

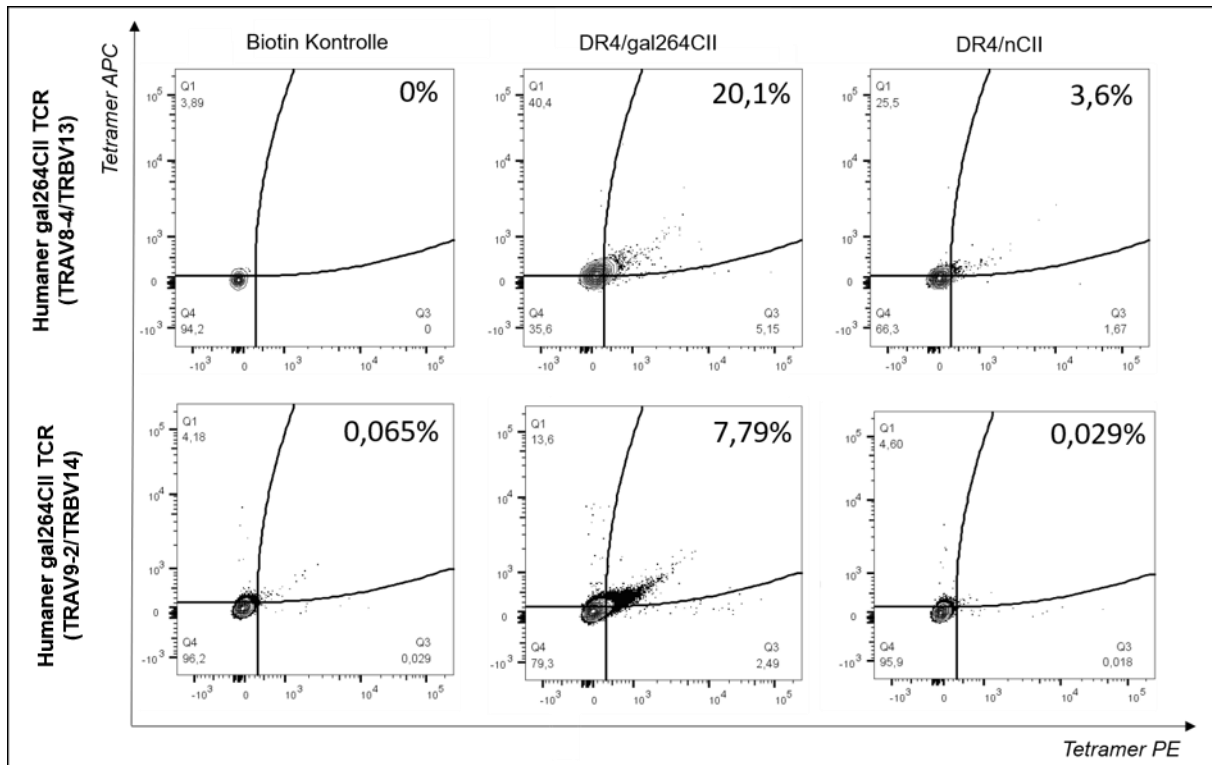


Abb. 24) Tetramerbindung der Jurkat-Zellen mit beiden transduzierten humanen gal264CII-spezifischen T-Zell-Rezeptoren

Die Jurkat-76 Zelllinie wurde lentiviral mit zwei gal264CII-spezifischen T-Zell-Rezeptoren transduziert. Diese Zellen wurden mittels MHC-Klasse-II/Tetrameren (DR4/gal264CII, DR4/nCII) angefärbt. Der Komplex wird über zwei konjugierte Fluorochrome PE und APC (Doppelbestimmung) am Durchflusszytometer visualisiert. Alle dargestellten Blots beziehen sich auf die lebende Zellpopulation. Als Negativkontrolle dient ein Biotin-Streptavidin-Komplex ohne ein spezifisches Peptidkonjugat.

3.4.6 Nachweis der Aktivierbarkeit der humanen gal264CII-spezifischen T-Zellen mittels MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen

Aus dem vorherigen Abschnitt wurde die Antigen-spezifität der lentiviral transduzierten gal264CII-TCR-Konstrukte aufgezeigt. Darüber hinaus sollte auch die Funktionalität der T-Zell-Rezeptoren in Studien zur Aktivierbarkeit dieser transduzierten Zelllinien mittels IL-2 ELISA analysiert werden.

Es lässt sich im Inkubationsmedium beider humaner gal264CII-spezifischer T-Zell-Rezeptoren, welche in die Jurkat-76 Zelllinien transduziert wurden, nach Stimulation mit dem DR4/gal264-Komplex eine spezifische IL-2 Zytokinantwort nachweisen. Die Jurkat-Zelllinie mit Expression des humanen TCRs der Sequenz TRAV8-4/TRBV13 sekretiert ca. 80 pg/ml IL-2, während die Zelllinie mit der humanen TCR-Sequenz TRAV9-2/TRBV14 60 pg/ml IL-2 sekretiert. Die Stimulation mit dem DR4/HA-Komplex als Spezifitätskontrolle induziert unter identischen Bedingungen lediglich die Freisetzung von ca. 15-20 pg/ml IL-2 ins Medium. Wird zudem als Stimulus das 264galCII-Peptid im Kontext der murine MHC-Klasse-II/Komponente A^q verwendet, d.h. der A^q/gal264CII-Peptidkomplex, dann bleibt die IL-2 Sekretion vollständig aus (s. Abb. 25). Somit belegen diese Studien den Nachweis der Epitopspezifität und MHC-II-Restriktion der gal264CII-Peptiderkennung im Kontext von DRA1/DRB1*04:01 Molekülen durch die beiden ursprünglich aus singulären humanen T-Zellen des peripheren Blutes von RA-Patienten isolierten und in Jurkat T-Zellen rekombinant exprimierten T-Zell-Rezeptoren.

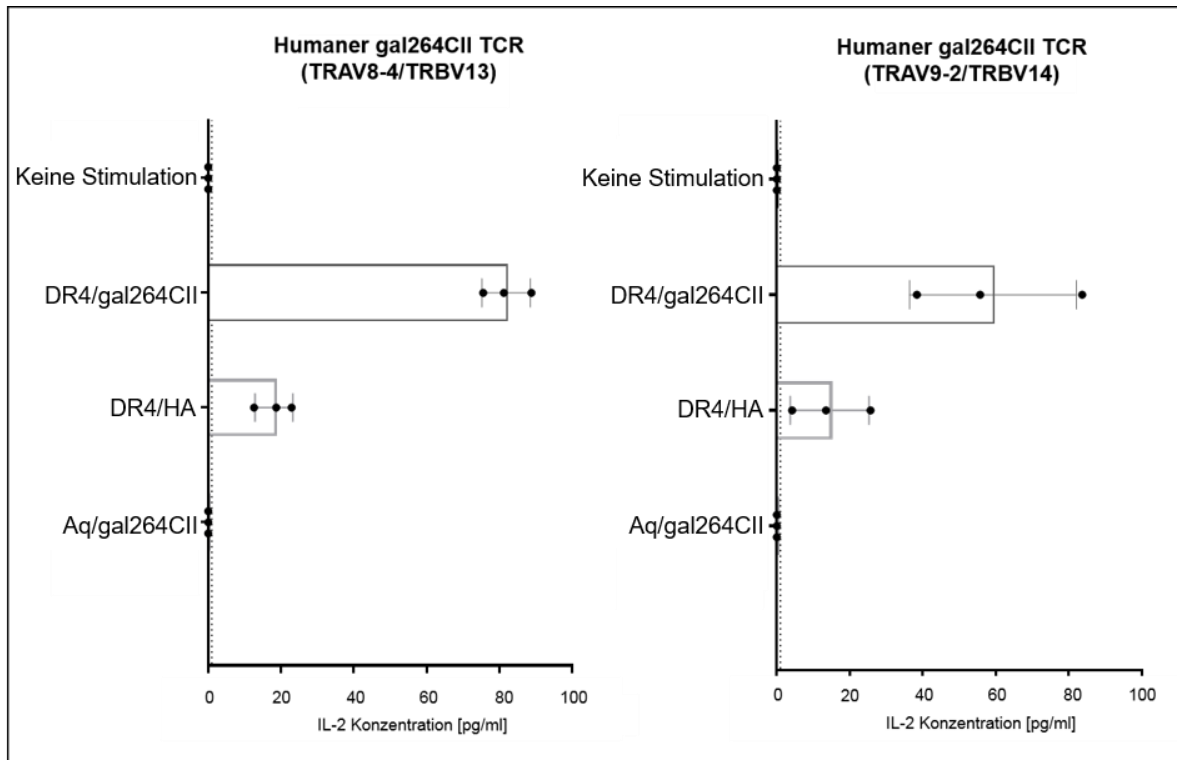


Abb. 25) Humaner IL-2 ELISA der Aktivierbarkeit der transduzierten humanen gal264CII-spezifischen T-Zelllinien nach Stimulation mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen

Die humanen gal264CII-spezifische T-Zelllinien (TRAV8-4/TRBV13, TRAV9-2/TRBV14) wurden für 24 Std. mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/HA) oder dem A^g/gal264CII-Komplex stimuliert. Die Aktivierbarkeit der Zellen wurde durch den Nachweis von IL-2 im Medium mittels ELISA gezeigt. Als Negativkontrolle diente zudem eine unstimulierte Probe.

3.4.7 Vergleich zwischen antigenspezifischen humanen TCR-Sequenzen und der murinen TCR-Sequenz

Somit konnten zwei antigenspezifische gal264CII-spezifische TCR-Sequenzen, die aus dem peripheren Blut unterschiedlicher HLA-DRB1*04:01 positiver RA-Patienten isoliert wurden, eindeutig in ihrer Spezifität und Funktionalität identifiziert werden.

Wie in Abschnitt 3.3.6 bereits beschrieben, wurden die CDR3-Regionen aller humaner gal264CII-spezifischer-Konstrukte mit der CDR3-Region der bereits bekannten murinen gal264CII-spezifischen verglichen. Als nächstes wurde in Abbildung 26 die TCR-Sequenz aus α - und β -Kette, ohne den konstanten Teil des T-Zell-Rezeptors, der beiden TCR-Konstrukte, die den spezifischen TCR für das galaktosylierte K264CII tragen (TRAV8-4/TRBV13, TRAV9-2/TRBV14) mit der murinen gal264CII-TCR-Sequenz und der humanen Influenza (HA) TCR-Sequenz verglichen.

Die α -Kette des murinen gal264CII-TCRs ähnelt in der CDR1- und CDR2-Region am stärksten der humanen gal264CII-TCR-Sequenz (TRAV9-2), wobei die andere humane α -Kette der gal264CII-spezifischen TCR-Sequenz (TRAV8-4) der humanen Influenza (HA) Sequenz am stärksten ähnelt, da diese dasselbe V α -Gen tragen.

Die β -Kette des murinen gal264CII-TCRs ähnelt in der CDR1- und CDR2-Region am stärksten der humanen Influenza (HA) TCR-Sequenz. Außerdem ähnelt die humane gal264CII-TCR-Sequenz (TRBV13) in der CDR1- und CDR2-Region am stärksten der humanen gal264CII-TCR-Sequenz (TRBV14). In der CDR3-Region, in der durch die VDJ Rekombination die höchste Diversität vorliegt, unterscheiden sich alle TCR-Sequenzen etwas voneinander. Die CDR3-Regionen aller humanen TCR-Sequenzen zeigen eine höhere Ähnlichkeit zueinander als zur murinen gal264CII-TCR-Sequenz.

Die konstanten Regionen sind in Abbildung 26 nicht aufgezeigt, jedoch sind diese im Menschen konserviert. Es sind speziesspezifisch Aminosäureunterschiede in der konstanten Region zwischen human und murin vorhanden, die strukturell jedoch Regionen mit deutlich räumlicher Distanz zu potenziellen Interaktionsdomänen auf der Oberfläche von MHC/Molekülen bzw. antigenen T-Zelldeterminanten aufweisen.

VJ α -Sequenz

		CDR1	CDR2	
Murin_gal264_TRAV	[REDACTED]	-DSVTQTEGQVALSEEDFLTIIHCNYSASG	[REDACTED]	58
Human_gal264_TRAV	[REDACTED]	GDSVTQMEGPVTLSEEAFLTINCTYTATG	[REDACTED]	59
Human_HA_TRAV8-4/	[REDACTED]	-QSVTQLGSHVSVSEGALVLLRCNYSSSV	[REDACTED]	59
Humangal264_TRAV8	[REDACTED]	AQSVTQLGSHVSVSEGALVLLRCNYSSSV	[REDACTED]	60
		:**** . *::** :: :*. *:::		
		CDR3		
Murin_gal264_TRAV	[REDACTED]	RGFEATYNKEATSFHLQKASVQESDSAVY	[REDACTED]	115
Human_gal264_TRAV	[REDACTED]	KGFEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVY	[REDACTED]	116
Human_HA_TRAV8-4/	[REDACTED]	NGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEY	[REDACTED]	118
Humangal264_TRAV8	[REDACTED]	NGFEAEFKKSETSFHLTKPSAHMSDAAEY	[REDACTED]	120
		.**** :.*. ***** * *.: **: * *		
Murin_gal264_TRAV	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	175
Human_gal264_TRAV	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	176
Human_HA_TRAV8-4/	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	178
Humangal264_TRAV8	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	180
Murin_gal264_TRAV	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	231
Human_gal264_TRAV	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	236
Human_HA_TRAV8-4/	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	238
Humangal264_TRAV8	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	240
Murin_gal264_TRAV	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	248
Human_gal264_TRAV	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	253
Human_HA_TRAV8-4/	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	255
Humangal264_TRAV8	[REDACTED]	[REDACTED]	[REDACTED]	257

Die graphischen Hervorhebungen in Abbildung 26 zeigen für die α -Kette, dass die CDR1-Regionen aus 6-, die CDR2-Regionen aus 5- und die CDR3-Region aus 13-16 Aminosäuren bestehen. Analog ergeben sich für β -Ketten Variationen der Länge für CDR1-Region von 5-, die CDR2-Region von 6- und die CDR3-Region in der Maus von 17- und im Menschen 13-14 Aminosäuren. Als nächstes wurden vereinfacht die CDR3-Regionen der Konstrukte aufgrund der besonderen Bedeutung der CDR3-Regionen für die Antigen-spezifität, miteinander verglichen. Wie in Abbildung 26 und 27 veranschaulicht, zeigen sich die größten Sequenzhomologien der α -Ketten für die humanen Konstrukte, wobei die humane TCR-Sequenz mit gal264CII-Spezifität (TRAV8-4) der des humanen TCR für das Influenza (HA) am stärksten ähnelt. Die CDR3-Region in der β -Kette zeigt ebenfalls die größten Gemeinsamkeiten für die humanen Konstrukte.

CDR3-Region der VJ α -Gene

Human_HA_TRAV8-4/TRAJ		
Human_gal264_TRAV8-4/TRAJ		
Murin_gal264_TRAV6D-7/TRAJ		
Human_gal264_TRAV9-2/TRAJ		

CDR3-Region der VDJ β -Gene

Human_gal264_TRBV14/TRBD		
Human_gal264_TRBV13/TRBD		
Human_HA_TRBV28/TRBD		
Murin_gal264_TRBV13-2/TRBD		

Abb. 27) Vergleich der CDR3-Regionen zweier humaner gal264CII-spezifischer TCR-, einer humanen Influenza (HA) TCR- und einer murinen gal264CII-TCR-Sequenz

Die in rot markierten Aminosäuren zeigen eine gute, in gelb eine mittelmäßige und in grün eine geringe Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz.

Insgesamt wurden aus dem peripheren Blut von HLA-DRB1*04:01 positiven RA-Patienten zwei T-Zell-Rezeptorsequenzen identifiziert, die spezifisch das galaktosylierte CII an Position K264 erkennen und darüber hinaus auch funktional sind. Es konnte eine präferenzielle V-Genverwendung sowohl für die α - als auch für die β -Kette gezeigt werden. Außerdem konnten in der CDR3-Region Sequenzhomologien zwischen den beiden humanen gal264CII-T-Zell-Rezeptorsequenzen und der bereits bekannten murinen gal264CII-T-Zell-Rezeptorsequenz identifiziert werden. Ebenso wurde gezeigt, dass das humane gal264CII-Konstrukt (TRAV8-4)

in der α -Kette dieselbe Sequenz trägt, wie das humane Influenza-Konstrukt (HA, TRAV8-4), wodurch diese in den CDR1- und CDR2-Regionen identisch sind.

3.5 Phänotypische Charakterisierung der T-Zellimmunantwort

3.5.1 Phänotypische Charakterisierung humaner T-Helferzellen und Analyse des Zytokinprofils von PBMCs nach Differenzierung mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen

Basierend auf der Tatsache, dass es antigenspezifische T-Zellen in RA-Patienten gibt, die Träger des HLA-DRB1*04:01 sind, wurden diese nun phänotypisch charakterisiert.

In A^g/Mäusen konnte gezeigt werden, dass sich nach Immunisierung mit CII und nach Gabe der DR4/Komplexe, in den Lymphknoten dieser Tiere Zellen ansammeln, die Marker eines regulatorischen Phänotyps aufweisen (Daten nicht publiziert, Karolinska Institut, Medical Research Inflammation, Stockholm, Holmdahl). Auch im Menschen existieren regulatorische T-Zellen. In der Literatur ist unter anderem beschrieben, dass diese tolerogenen Tr1-Zellen unter anderem die Marker CD73, CD49b, LAG3 (*Lymphocyte-activation gene 3*), PD-1 (*Programmed cell death protein 1*) und CTLA-4 (*Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*) exprimieren und IL-10 sekretieren (Groux et al. 1997; Francisco, Sage und Sharpe 2010; Gagliani et al. 2013). Aufgrund der Tr1-Marker, die im Mausmodell identifiziert werden konnten, wurden nun die antigenspezifischen T-Zellen in RA-Patienten phänotypisch während unterschiedlich langer Zeiten der *in vitro* Differenzierung charakterisiert.

Die Ergebnisse in Abbildung 28 zeigen, dass keine Expansion DR4/CII-Peptidtetramer positiver T-Helferzellen nach acht Tagen Differenzierung mit den MHC-II/Peptidkomplexen detektierbar ist. Es haben sich auch keine Änderungen der Anzahl der CD73, CD49b und LAG3 positiven Zellen unter den *in vitro* Bedingungen im Beobachtungszeitraum ergeben. Analog konnte auch keine gesteigerte Expression der nicht Tr1-typischen regulatorischen T-Zellmarker CTLA-4 bzw. des Transkriptionsfaktors Foxp3 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Allerdings lässt sich nach acht Tagen Stimulation mit dem DR4/gal264CII- ($p = 0,0431$) und dem DR4/nCII-Komplex ($p = 0,0390$) eine erhöhte Expression an PD-1 auf der Zelloberfläche nachweisen.

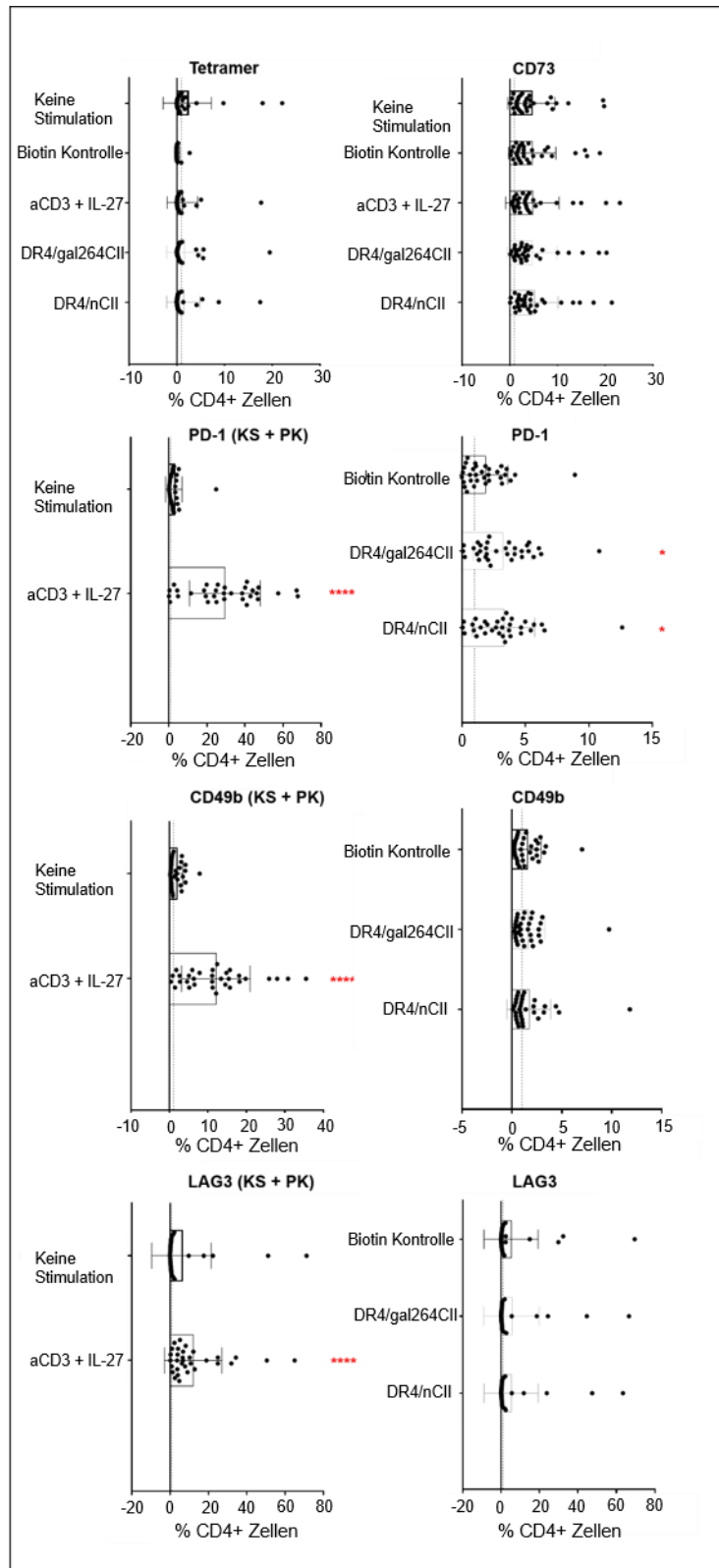


Abb. 28) Phänotypische Charakterisierung von T-Helferzellen nach Stimulation mit MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen

PBMCs isoliert aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) wurden für acht Tage mit MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) stimuliert. Die Abundanz von Tr1-Zellen durchflusszytometrisch analysiert, indem die relativen Zellzahlen von Tetramer positiven T-Helferzellen, CD73, PD-1, CD49b und LAG3 mit unstimulierten T-Helferzellen (KS) bzw. einer Biotin-Kontrolle verglichen wurden. Als Positivkontrolle (PK) für einen Tr1-Phänotyp wurden Zellen mit α CD3 + IL-27 stimuliert. Statistische Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt.

Um die phänotypische Charakterisierung zu komplementieren, wurde die Sekretion spezifischer Zytokine von PBMCs in den Mediumüberstand nach der acht Tage Differenzierung mit den DR4/Peptidkomplexen mittels LEGENDplex, untersucht. Hierbei wurden 13 unterschiedliche Zytokine (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-17f, IL-21, IL-22) gleichzeitig am Durchflusszytometer gemessen. Es konnte eine signifikant erhöhte Expression von IL-6 und IL-10 im Mediumüberstand nach Stimulation mit den DR4/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII $p = <0,0001$, DR4/nCII $p = <0,0001$) detektiert werden (s. Abb. 29). Die anderen 11 der 13 untersuchten Zytokine darunter IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17a, IL-17f, IL-21 und IL-22 zeigen nach Stimulation mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen keine signifikante Hochregulation im Vergleich zur unstimulierten Probe (Daten nicht gezeigt).

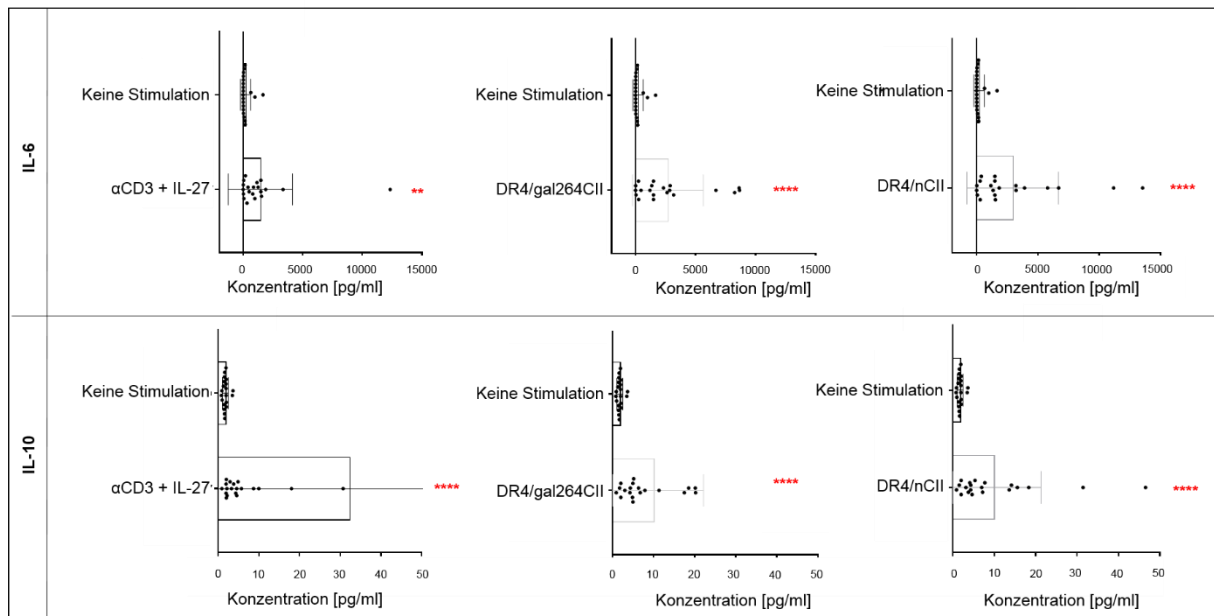


Abb. 29) Phänotypische Charakterisierung von PBMCs nach Stimulation mit MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen

PBMCs isoliert aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) wurden für acht Tage mit MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) stimuliert. Die Sekretion von spezifischen Zytokinen in den Mediumüberstand wurde mit Hilfe eines beadbasierten Zellassays (LEGENDplex™) am Durchflusszytometer bestimmt. Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe und als Positivkontrolle, für einen Tr1-Phänotyp, wurden Zellen mit αCD3 + IL-27 stimuliert. Statistische Signifikanzen wurden mittels Mann-Whitney-Tests ermittelt ($p < 0,0001$).

3.5.2 Nachweis von IL-2 und IL-10 nach Aktivierung von PBMCs, APCs und T-Helferzellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01)

Aufgrund der bereits nach 24 Std. messbar nachgewiesenen aktivierten IL-2 und IL-10 Antworten in den T-Zell-Hybridomaktivierungsstudien (s. 3.1.3) stellen sich die Fragen, ob die antigenspezifischen T-Helferzellen in Patienten nach Stimulation mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen sehr rasch zu regulatorischen T-Zellen differenzieren, ob durch den DR4/Komplex bereits synthetisiertes IL-10 durch Freisetzung aus intrazellulären Speicherkompartimenten respondierender Zellen sekretiert wird oder ob antigenspezifische T-Zellen durch den MHC-Klasse-II/Peptidkomplex aktiviert werden und diese dann wiederum andere nicht antigenspezifischen T-Zellen oder APCs dazu anregen, IL-10 zu sezernieren (sog. *bystander activation*).

Um diesen Fragen nachzugehen, wurden PBMCs, APCs und T-Helferzellen voneinander separiert und mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) inkubiert, um anschließend zu analysieren, welche Zellen IL-2 und IL-10 sekretieren.

Nach einer 24 Std. Stimulation der PBMCs mit den Komplexen DR4/gal264CII ($p = 0,0064$) und DR4/nCII ($p = 0,0373$) ist eine signifikant höhere Sekretion an IL-2 und IL-10 im Überstand messbar, während die isolierte Zellpopulation der APCs weder IL-2 noch IL-10 freisetzt. Die isolierte Fraktion der CD4⁺ T-Helferzellen sekretiert als antigenspezifische Antwort auf die separate Stimulation mit beiden MHC-II/Komplexen (DR4/gal264CII ($p = 0,003$), DR4/nCII ($p = 0,0010$)) eine signifikante Menge an IL-2, jedoch ist nur wenig IL-10 im Überstand messbar (s. Abb. 30).

Zusammenfassend zeigen diese Analysen, dass die CII-spezifischen Zellen in der CD4⁺ T-Helferzellpopulation nach Aktivierung ihres T-Zell-Rezeptors durch die DR4/Peptidkomplexe primär IL-2 sekretieren und nur sehr wenig IL-10. In einer Kooperation mit den enthaltenden Monozyten und den T-Helferzellen, in der PBMC-Zellfraktion, werden hingegen signifikante Mengen an IL-10 sekretiert.

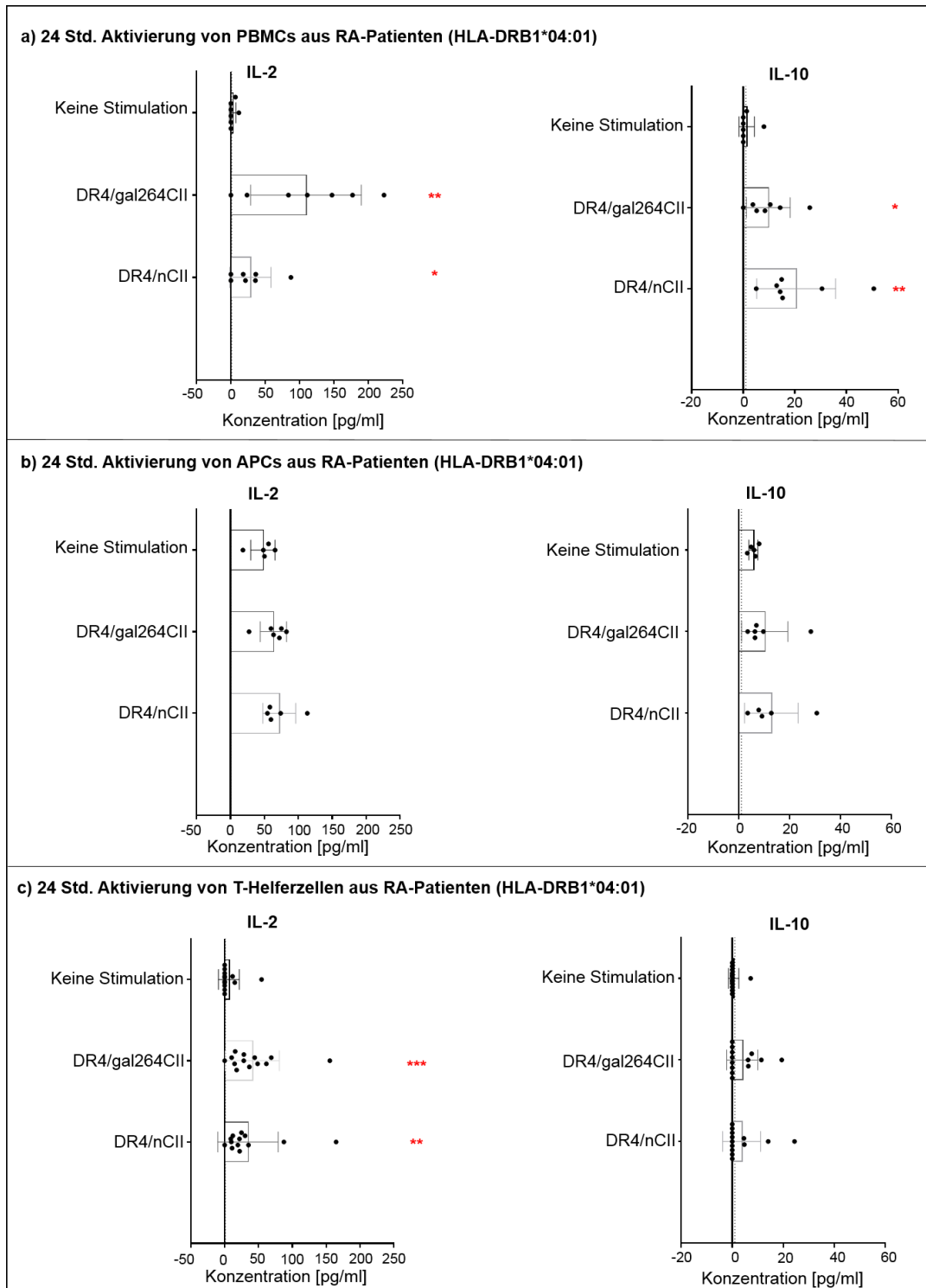


Abb. 30) Nachweis der IL2 und IL10 Sekretion von PBMCs, APCs und T-Helferzellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) nach Stimulation mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen
 PBMCs, APCs und T-Helferzellen aus RA-Patienten wurden für 24 Std. mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) stimuliert und am nächsten Tag wurde der Überstand mittels humanem IL-2 und IL-10 ELISA analysiert. Um die APCs aus PBMCs zu generieren wurde eine CD3-Depletion durchgeführt. Für die T-Helferzellisolierung wurde eine CD4-Anreicherung umgesetzt. a) Zeigt eine 24 Std. Stimulation der PBMCs b) der APCs und c) der T-Helferzellen nach Stimulation mit den DR4/Komplexen. Als Negativkontrolle diente eine unstimulierte Probe. Statistische Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt.

3.5.3 Nachweis von Zytokinen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren nach Aktivierung von PBMCs, APCs und T-Helferzellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01)

Zur besseren Charakterisierung wurde zudem die Hochregulation von Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren, die mit dem Vorhandensein bzw. der Differenzierung zu Tr1-Zellen korreliert, mittels qPCR untersucht. In der Literatur sind unter anderem die Transkriptionsfaktoren c-Maf und PRDM-1 für Tr1-Zellen beschrieben (Apetoh et al. 2011; Iwasaki et al. 2013).

Für diesen Versuch wurden PBMCs, APCs und T-Helferzellen aus RA-Patienten für 24 Std. mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) stimuliert und am nächsten Tag mittels qPCR analysiert. Nach einer 24 Std. Stimulation der PBMCs mit den DR4/Komplexen ist keine signifikante Hochregulation an IL-10, IL10R α , TGF- β , c-Maf oder PRDM-1 messbar. Lediglich die Positivkontrollen α CD3 + α CD28 und α CD3 + IL-27 zeigen eine signifikante Hochregulation an IL-10 im Vergleich zur unstimulierten Probe. Nach einer 24 Std. Stimulation der APCs und der isolierten T-Helferzellen mit den DR4/Komplexen ist bei keinem der angegebenen Faktoren eine Hochregulation messbar. Statistische Signifikanzen wurden mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests ermittelt.

Zusammenstellend zeigen die Daten, dass zum frühen Zeitpunkt nach einer 24 stündigen Stimulation weder mit den DR4/Komplexen noch unter Bedingungen der Standard Tr1-Differenzierungsbedingungen mit anti CD3 + IL27 mittels qPCR eine signifikante Hochregulation für die analysierten humanen Transkriptionsfaktoren oder Rezeptoren in APCs noch in T-Helferzellen nachgewiesen werden konnte. Lediglich PBMCs zeigen nach einer 24 Std. Stimulation, aber nur mit den Positivkontrollen, eine Hochregulation an IL-10.

3.5.4 Genexpressionsanalysen von antigenspezifischen T-Helferzellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) nach MHC-Klasse-II/Peptidkomplexstimulation

Basierend auf den in den vorherigen Abschnitten gezeigten Ergebnissen und der Limitation verfügbarer phänotypischer Marker für humane Tr1-Zellen, wurden antigenspezifische T-Zellen phänotypisch, mittels mRNA-Sequenzierung, in präliminären Studien unter Berücksichtigung von Biomaterial aus 2 RA-Patienten, hinsichtlich ihrer Genexpressionsmuster charakterisiert.

Für dieses Experiment wurden PBMCs von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) für 24 Std. bzw. drei Tage mit dem DR4/gal264CII-Komplex inkubiert. Anschließend wurden Tetramer⁺ und Tetramer⁻ T-Helferzellen (2.000 Zellen) durchflusszytometrisch sortiert. Nicht stimulierte Zellen dienten dabei als Negativkontrolle, hierfür wurden die gleichen oben beschriebenen Zellpopulationen sortiert.

Die präliminären Daten der Genexpressionsanalyse zeigen für beide Patienten, dass in den Tetramer⁺ T-Zellen weder PD-1, Foxp3, CTLA-4, LAG3 noch CD49b zu den Analysezeit-

punkten detektiert werden konnten. Auffällig war jedoch, dass eine höhere Genexpression an IL-10 in den stimulierten Tetramer⁺ T-Zellen, im Vergleich zu den Tetramer⁺ unstimulierten Proben, gemessen werden konnte. In den Tetramer⁻ T-Zellen hingegen wurde keine Expression an IL-10 gemessen. Der IL10R α war in beiden Zellpopulationen, in den Tetramer⁻ - und Tetramer⁺-Zellen gleich hoch exprimiert, während der IL10R β in den Tetramer⁺ T-Zellen stärker exprimiert war, als in den Tetramer⁻ T-Zellen.

Insgesamt korrelieren die Analysen zur IL-10 Sekretion von PBMCs nach einer 24 Std. Stimulation mit denen der LEGENDplex Daten aus der acht Tage Differenzierung. IL-10 wird nur sekretiert, wenn PBMCs mit den DR4/Peptidkomplexen stimuliert werden, was zeigt, dass APCs und T-Zellen gemeinsam gebraucht werden. Alle in dieser Arbeit verwendeten Marker für einen Tr1-Phänotyp konnten bis auf PD-1 nicht nachgewiesen werden. Außerdem ist nach der Differenzierung kein erhöhtes Aufkommen an Tetramer⁺ T-Zellen detektierbar. Ebenfalls wird gezeigt, dass nach der 24 Std. Stimulation keine Transkriptionsfaktoren, die für einen Tr1-Phänotyp charakteristisch sind, hochreguliert werden. Die präliminären Genexpressionsanalysen bestätigen diese Annahmen.

4 DISKUSSION

4.1 T-Zell-Hybridome als Modell zur Analyse der molekularen arthritogenen Mechanismen

Der genetisch prädisponierten komplexen Erkrankung der RA liegt ein Inflammationsprozess auf der Basis einer immunologischen Fehlerkennung von Gelenkstrukturen zugrunde (Uysal et al. 2010). Das höchste genetische Risiko der RA ist mit dem polymorphen MHC (*major histocompatibility complex*) Locus DR assoziiert, insbesondere dem HLA-DRB1*04:01 Allel (50% der kaukasischen RA-Patienten sind Allelträger), das für die β -Kette des MHC-Klasse-II/Moleküls kodiert und damit von funktioneller Bedeutung für die Präsentation antigener Peptide an T-Lymphozyten ist. Sowohl autoreaktive als auch regulatorische T-Lymphozyten erkennen das MHC-Klasse-II/Molekül und das darin gebundene antigene Peptid.

Basierend auf gemeinsamen Studien zur Charakterisierung autoantigener Determinanten des gelenkspezifischen Kollagen Typ-II (CII) (Michaëlsson et al. 1994), konnten die Arbeitsgruppen von Prof. Holmdahl (Stockholm) und Prof. Burkhardt (Frankfurt) in Studien zur therapeutischen Immunmodulation in der experimentellen Modellerkrankung der CIA in Mäusen zeigen, dass ein lösliches rekombinantes MHC-Klasse-II/Molekül komplexiert mit dem immundominanten glykosylierten CII-Peptid 259-273, das Potenzial einer krankheitssupprimierenden Wirkung durch die Induktion regulatorischer T-Zellen besitzt (Dzhambazov et al. 2006). Für modellhafte *in vitro* Studien zur Charakterisierung der Interaktion der rekombinanten mit dem gal264CII-Peptid beladenen HLA-DR4-Komplexe (HLA-DRA1/HLA-DRB1*04:01) mit CII-Peptid-spezifischen T-Zell-Rezeptoren, wurden murine T-Zell-Hybridome verwendet. Diese T-Zell-Hybridome exprimieren klonotypisch einen CII-spezifischen TCR, der entweder das unmodifizierte CII-Epitop 256-273 (3H8) oder eine posttranslational modifizierte Determinante (Galaktosylierung des hydroxylierten Lys264, mDR1.1) erkennt. Die DR4-Restriktion der T-Zellantwort der Hybridomzellen und ihre Spezifität für CII ist dadurch erklärt, dass sie ursprünglich nach Arthritisinduktion durch CII Immunisierung aus HLA-DRA1/HLA-DRB1*04:01 transgenen Mäusen von der Arbeitsgruppe von Prof. Holmdahl (E. C. Andersson et al. 1998; Bäcklund, Carlsen, et al. 2002) etabliert und für die aktuellen *in vitro* Studien zur Verfügung gestellt wurden.

Zunächst wurde die TCR-Spezifität der beiden T-Zell-Hybridome durchflusszytometrisch über ihre selektive Bindungsfähigkeit für die distinkten HLA-DR4/Peptidtetramerkomplexe analysiert. Die anschließenden funktionellen Studien belegen die Selektivität der Induktion von IL-2 Zytokinantworten durch die festphasengebundenen monomeren HLA-DR4/CII-Peptidkomplexe nur in den Hybridomzellen, für deren T-Zell-Rezeptoren auch eine Bindung an den entsprechenden tetramerisierten MHC-II/Peptidkomplex durchflusszytometrisch

nachweisbar war. So werden die 3H8 Hybridomzellen nur durch das DR4/Molekül im Komplex mit dem unmodifizierten CII-Peptid stimuliert, während die mDR1.1 Hybridomzellen spezifisch auf das HLA-DR4/gal264CII mit einer IL-2 Freisetzung respondieren. Für die Freisetzung von IL-2 als T-Zellwachstumsfaktor und wichtiges regulatorisches Zytokin der Lymphozytenaktivierung und –differenzierung (Weiss, Wiskocil und Stobo 1984; Lühder et al. 2003) sind bestimmte Anforderungen an die über den TCR-vermittelte T-Zellaktivierung insbesondere hinsichtlich der Signalstärke erforderlich. So wurde von Gao beschrieben, dass durch eine schwache Stimulation des TCRs über Interaktionen mit Peptid beladenem MHC-Klasse-II/Molekülen die Signalgebung und resultierende IL-2 Sekretion gestört ist (Gao et al. 2016). Unter dem Einsatz hochauflösender Bildgebungsmethoden im nanoskopischen Bereich wurde nachgewiesen, dass die Signalgebung auf der Oberfläche aktivierter T-Zellen durch die Formation von TCR/CD3-Nanoklustern optimiert wird und die Clusterdichte mit der Assoziation der für die Signalweiterleitung relevanten Proteine und ihrem Phosphorylierungsgrad korreliert (Pageon et al. 2016). Die Stimulation spezifischer IL-2 Zytokinantworten durch die DR4/CII-Peptidkomplexe, in unseren Studien der T-Zell-Hybridome, korrelieren mit diesen publizierten Daten der Ausbildung von Nanodomänen optimierter Signaltransduktion hinsichtlich der Interaktionsverstärkungen des TCRs mit den MHC/Peptidkomplexen, als Folge ihrer multimeren Anordnung nach Mikrotiterplattenbeschichtung resultierend in einer hohen IL-2 Sekretion. Unter dem Gesichtspunkt der immunmodulatorischen Eigenschaften der MHC-II/CII-Peptidkomplexe wurde in den *in vitro* Studien auch die Sekretion von IL-10 untersucht. Das Zytokin IL-10 besitzt immunsuppressive Eigenschaften indem es die IL-2 Sekretion hemmt (de Waal Malefyt, Yssel und de Vries 1993). Diese Studienergebnisse zeigen, dass eine gesteigerte Sekretion von IL-10 als T-Zellantwort auf Stimulation mit den DR4/Peptidkomplexen im Gegensatz zur IL-2 Antwort präferentiell durch gelöste monomere Komplexe induziert und durch deren Multimersierung in Form einer Festphasenbeschichtung gestört wird. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass für die Aktivierung der IL-10 Produktion im Gegensatz zur IL-2 Produktion die Vermittlung einer geringeren Signalstärke über den TCR vorteilhafter ist. Darüber hinaus belegen die Ergebnisse, dass mehrere unterschiedliche, nur partiell sequenzhomologe T-Zell determinanten durch Stimulation desselben klonotypischen TCRs eine IL-10 Antwort auslösen können, während die Aktivierung der IL-2 Freisetzung durch die multimerisierten MHC-II/Peptidkomplexe hochselektiv von der TCR-Erkennung distinkter antigener Feinstrukturen abhängig ist. Sie erlaubt sogar im MHC-II/Petidkomplex die Diskrimination der An- bzw. Abwesenheit eines singulären Galaktoserestes am hydroxylierten Lysin 264 des CII-Peptids. So geht diese Diskriminationsfähigkeit der T-Zell-Hybridomen nach Stimulation mit den monomeren DR4/gal264CII-, DR4/nCII-Komplexen verloren, die beide eine IL-10 Sekretion induzieren und darüber hinaus auch der DR4/HA-Komplex, der als antigene Determinante mit dem Peptidfragment eines viralen Hämagglutinins, ein dem

autologen CII-Peptid partiell sequenzhomologes Fremdantigen, enthält. Diese gegenüber der spezifischen T-Zell-determinante des klonotypischen T-Zell-Rezeptors veränderten Agonisten der IL-10 Antwort können in ihrer Wirkung als "veränderte Peptidliganden" betrachtet werden. Der Terminus des veränderten Peptidliganden, *altered peptide ligand* (APLs), wurde 1991 von Evavold und Allen im Kontext von Studien über die Beziehung zwischen Proliferation und Zytokinproduktion von T-Zellklonen als Antwort auf Antigenpräsentation geprägt (Evavold und Allen 1991). Ein veränderter Peptidligand wird beschrieben als Peptidanalogen, welches kleine Änderungen in der Aminosäuresequenz zur ursprünglich agonistischen T-Zell-determinante aufweist (Evavold und Allen 1993). Derartig modifizierte Peptide können suboptimal mit einem TCR interagieren und im Vergleich zum optimalen Liganden ggf. nur einen Teil der TCR-vermittelten Funktionen als partielle Agonisten hervorrufen oder sogar antagonistisch wirken. Aus der veränderten, vom optimal aktivierenden Interaktionsmodus abweichenden Ligation des TCRs mit dem *altered peptide*, resultiert ein moduliertes TCR-Signal mit veränderter Signalwegweiterleitung (Park et al. 2012). Während bis heute detaillierte Kenntnisse der zugrunde liegenden Mechanismen auf molekularer Ebene fehlen, ist die Wirkung veränderter Peptidliganden auf die suboptimale Aktivierung von T-Zellen mit resultierend unzureichender Aktivierung von Effektorfunktion oder der Induktion von Anergie gut etabliert (Evavold und Allen 1991; De Magistris et al. 1992; Sloan-Lancaster et al. 1993; Candia und Pickl 2016). Diese Möglichkeit zur Anergisierung autoreaktiver T-Zellen durch *altered peptide ligands* wurde entsprechend auch in murinen Experimentalerkrankungen wie der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE), einem Modell der multiplen Sklerose, als wirksames Therapieprinzip evaluiert (Nicholson et al. 1995). Die *in vitro* Studien der pharmakodynamischen Wirkungen von rekombinanten DR4/CII-Peptidkomplexen auf die T-Zell-Hybridome zeigen modellhaft für die Interaktion mit autoreaktiven CII-spezifischen T-Zellen *in vivo*, dass die aktivierende Bindung der gelösten monomeren Komplexe die Induktion immunregulatorischer IL-10 Zytokinantworten begünstigt.

4.2 Antigenabhängige Präsentation oder direkte T-Zell-Rezeptorinteraktion?

In Ergänzung der initialen *in vitro* Modellstudien zur TCR-abhängigen Zellaktivierung der CII-spezifischen Hybridome durch direkte Stimulation über festphasengebundene oder gelöste monomere DR4/CII-Peptidkomplexe wurden weitere Analysen zur Charakterisierung ihrer möglichen indirekten über APCs-vermittelten Effekte durchgeführt. Durch diese Studien sollte das mögliche Szenario einer Endozytose der MHC-II/CII-Peptidkomplexe durch APCs wie z.B. Makrophagen mit nachfolgender enzymatischer Fragmentierung und "Umladung" der CII-Peptide auf neu synthetisierte endogene MHC-II-Moleküle in lysosomalen Kompartimenten,

dem Transport an die Zelloberfläche und schließlich die Aktivierung CII-spezifischer T-Zellen evaluiert werden.

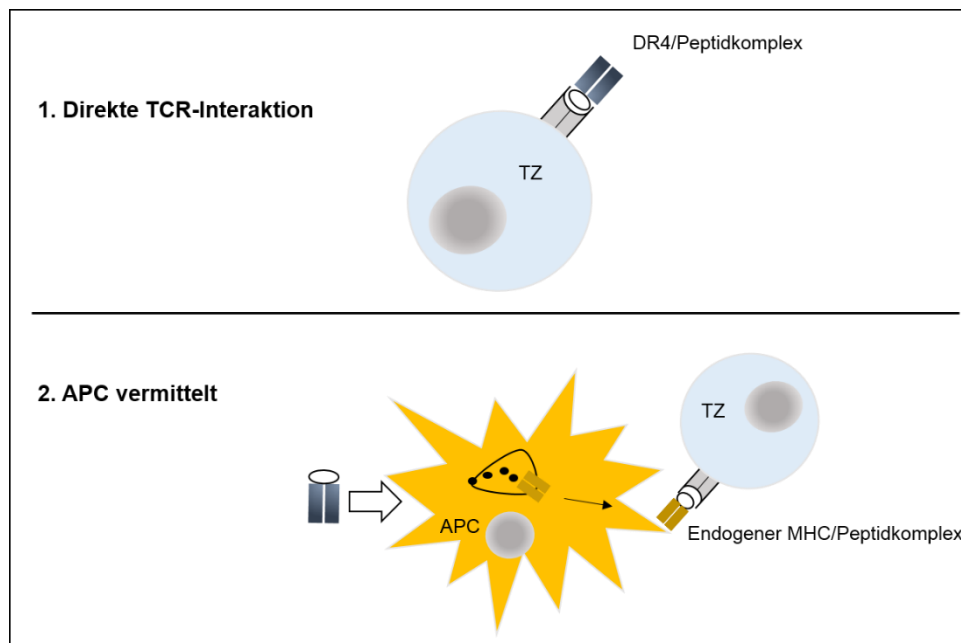


Abb. 31) Hypothesenmodell zum Wirkmechanismus des DR4/Peptidkomplexes

1. Der DR4/Peptidkomplex bindet direkt an den T-Zell-Rezeptor der antigenspezifischen T-Zelle (TZ).
2. Der DR4/Peptidkomplex wird von antigenpräsentierenden Zellen (APC) endozytiert, prozessiert und auf endogenen MHC-Klasse-II/Molekülen neu beladen auf der Zelloberfläche präsentiert, sodass die antigenspezifischen T-Zellen diese erkennen und binden.

Neben APCs von Patienten mit RA wurde auch eine stabil mit cDNA Plasmiden für die humanen Gene HLA-DRA*01:01 und HLA-DRB1*04:01 transfizierte murine Makrophagenzelllinie BL25 zur Aktivierung der T-Zell-Hybridome im Anschluss an eine Vorinkubationsphase mit den rekombinanten DR4/nCII-Komplexen sowie einer anschließenden Waschprozedur in fixiertem Zustand eingesetzt. Um die mögliche Bedeutung lysosomaler Prozessierungen während der Inkubation der BL25 Zellen mit den rekombinanten MHC-II/CII-Peptidkomplexen auf die in der anschließenden Koinkubationsphase mit den Hybridomzellen gemessene T-Zellaktivierung zu analysieren, wurde Hydroxychloroquin (HCQ) als pharmakologischer Modulator lysosomaler Funktionen eingesetzt. Der Wirkmechanismus von HCQ beruht dabei auf der Erhöhung des pH-Wertes in intrazellulären Vakuolen mit einer Modifikation proteolytischer Fragmentierungen, sowie posttranslationaler Proteinmodifikationen und einer Hemmung der MHC-II/Antigenpräsentation (Rietbrock et al. 2013). Insgesamt ergeben sich trotz fehlender direkter Evidenzen aus den in 3.1.4 und 3.1.5 dargestellten Studien eine Reihe stützender experimenteller Belege für das Szenario, dass MHC-II/CII-Peptidkomplexe nach Endozytose durch APCs enzymatisch prozessiert werden und die dabei aus den Komplexen freigesetzten CII T-Zell-determinanten nach Beladung neu synthetisierter endogener

MHC/Moleküle an die Zelloberfläche gelangen und dort zur T-Zellaktivierung führen können. Dieser Mechanismus scheint allerdings gegenüber einer direkten T-Zellstimulation (vgl. 3.1.3) nicht besonders effizient zu sein, da sehr hohe Konzentrationen des MHC-II/Peptidkomplexes (100 µg/ml) notwendig sind. Diese Ergebnisse sind hochrelevant für die Bewertung des Anwendungspotenzials rekombinanter MHC-II/CII-Peptidkomplexe als immunmodulatorische Biopharmazeutika zur Behandlung humaner immunmediierter Inflammationserkrankungen wie der RA. Die mit dem aufgezeigten Mechanismus verbundene Möglichkeit der Herauslösung der autoantigenen CII-Determinante aus dem rekombinanten DR4/Molekül als ihrer pharmakologische Ummantelung und ihrer anschließenden Präsentation auf der Oberfläche eines Makrophagen z.B. mit proinflammatorischem Phänotyp und evtl. starker kostimulatorischer Signale, impliziert grundsätzlich die Gefahr der Auslösung autoagressiver Immunreaktionen durch Aktivierung anergisierter autoreaktiver T-Zellen. Es ist daher im Hinblick auf die zukünftige Weiterentwicklung für potenzielle therapeutische Anwendungen der MHC-II/Peptidkomplexe unter Gesichtspunkten der Arzneimittelsicherheit wichtig, dass der aufgezeigte indirekte Weg der T-Zellaktivierung nach vorausgehender Prozessierung durch APCs ein offenbar sehr ineffizienter Mechanismus ist, der sehr hohe Konzentrationen erfordert, weit oberhalb der in tierexperimentellen Studien unter therapeutisch wirksamen Dosierungen (50-100 µg/Maus) erreichten Gewebespiegel (nicht publizierte Daten).

4.3 Nachweis CII-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01)

Auf der Basis bereits belegter Wirksamkeit im präklinischen Krankheitsmodell der murinen CIA (Dzhambazov et al. 2005b) ist für die Weiterentwicklung des antigenspezifischen Therapieansatzes der immunmodulierenden systemischen Gabe eines rekombinanten MHC-II/Peptidkomplexes zur Behandlung der RA der Nachweis einer T-Zell-Responderpopulation mit Expression CII-spezifischer T-Zell-Rezeptoren von kritischer Bedeutung. So wäre ohne die Existenz entsprechender spezifischer T-Zellen im Gesamtrepertoire von RA-Patienten die Entwicklung einer pharmakodynamischen Wirkung des rekombinanten MHC-II/Peptidkomplexes nicht denkbar. Darüber hinaus, sollte im Hinblick auf die klinische Anwendung für ein innovatives immunmodulierendes Wirkprinzip, auch sein spezifischer pharmakologischer Effekt über funktionelle bzw. phänotypische Veränderungen der adressierten Zellpopulation monitorierbar sein.

Ogleich aus der Literatur bereits bekannt war, dass die Detektion CII-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten eine Herausforderung darstellt (Londei et al. 1989; Snowden et al. 1997), ist es uns gelungen sie regelmäßig, wenn auch in sehr geringer Frequenz, aufgrund phänotypischer und funktioneller Charakteristika im peripheren

Gesamtrepertoire der T-Helferzellen von RA-Patienten, zu detektieren. Als größte Herausforderung des Nachweises CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen im peripheren Blut erwies sich dabei ihre niedrige Frequenz. Zur Detektion dieser CII-spezifischen T-Zellen wurden zwei Methoden eingesetzt. Der funktionelle Nachweis antigenspezifischer T-Zellen erfolgte über die Hochregulation des Aktivierungsmarkers CD154 (CD40L) auf ihrer Zellmembran nach *in vitro* Stimulation von PBMCs mit synthetischen CII-Peptiden (galaktosyliert an Position K264 und unmodifiziert). Es konnte gezeigt werden, dass sich signifikant mehr T-Zellen nach Stimulation mit dem galaktosylierten CII-Peptid aktivieren lassen als mit dem unmodifizierten CII-Peptid. Dieser Befund könnte Unterschiede in der thymischen Toleranzinduktion zwischen dem unmodifizierten und galaktosylierten CII-Peptid reflektieren (Raposo et al. 2018). So kann das glykosylierte CII-Peptid im Gegensatz zum unmodifizierten lokal im Thymus nicht hergestellt werden, da die zu seiner Biosynthese erforderliche Enzymausstattung nur gewebespezifisch im Chondrozyten des Gelenkknorpels vorhanden ist, sodass potenziell autoreaktive Zellen dieser Spezifität leichter der zentralen Toleranzinduktion durch Negativselektion entgehen. Diese galCII-spezifischen T-Zellen wären im Gegensatz zu den, von der zentralen Toleranzinduktion betroffenen T-Zellen, mit Spezifität für das unmodifizierte CII in der Peripherie noch aktivierbar. Ein alternatives Erklärungsmodell für die fehlende Aktivierung der T-Zellen nach Stimulation mit dem unmodifizierten CII-Peptid könnte sein, dass die T-Zellen entsprechender Spezifität zwar der Negativselektion entgangen sind, aber in der Peripherie in einem Zustand der klonalen Ignoranz toleriert sind (Raposo et al. 2018). Da die Methode des Nachweises antigenspezifischer Lymphozyten über *in vitro* Stimulationsversuche von PBMCs aufgrund der Variabilität des aus RA-Patienten stammenden Biomaterials z.B. durch einen im Ausgangsmaterial vorhandenen Anteil bereits voraktivierter T-Zellen differenter Antigen-spezifität sowie Einflüsse immunsupprimierender Medikamente in seiner Zuverlässigkeit limitiert ist, wurde ein komplementäres tetramerbasiertes Nachweisverfahren etabliert. Nach direkter Bindung des Tetramerkomplexes an den antigenspezifischen TCR wurden die markierten T-Zellen mittels Durchflusszytometrie analysiert und sortiert. In der vorliegenden Arbeit konnten für die Gesamtpopulation von T-Helferzellen in RA-Patienten vergleichbare Frequenzen sowohl von DR4/gal264CII-spezifischen (Durchschnitt 0,17% der CD4⁺ Zellen) als auch DR4/nCII-spezifischen T-Helferzellen (Durchschnitt 0,26% der CD4⁺ Zellen) detektiert werden. In gesunden Spendern (n = 7) waren die Detektionsfrequenzen antigenspezifischer T-Zellen niedriger als im Vergleich zu den RA-Patienten: im Durchschnitt 0,02% DR4/gal264CII-spezifische und 0,04% DR4/nCII-spezifische T-Zellen. Eine Limitation der Ergebnisinterpretation der unterschiedlichen Vorläuferfrequenzen CII-Epitop spezifischer T-Zellen zwischen gesunden Probanden und RA-Patienten ergibt sich durch die deutlich unterschiedlichen Stichprobenumfänge (gesunde Probanden: n = 7, RA-Patienten: n = 55). Allerdings ist zu berücksichtigen, dass für die Analysen nur HLA-DRB1*04:01 positive Allelträger in Frage

kommen, die einem Anteil von ca. 50% der RA-Patienten und 20 - 30% der gesunden Probanden (Weyand et al. 1992) entsprechen. Darüber hinaus war die Anzahl, der für die Studie zur Verfügung stehenden HLA-typisierten gesunden Probanden aus der Blutspenderpopulation, unter dem zu beachtenden Rahmen des Ethikvotums, stark eingeschränkt. Der Nachweis antigenspezifischer autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie gesunder Probanden ist in Übereinstimmung mit publizierten Studiendaten zu autoreaktiven Lymphozyten auch anderer Antigenespezifitäten (Klein et al. 2009; Derbinski und Kyewski 2010; Richards, Kyewski und Feuerer 2016) und belegt für die CII-spezifischen T-Zellen, dass ihre Negativselektion im Thymus inkomplett ist und die immunologische Toleranzkontrolle peripheren Mechanismen unterliegt. Um die Sortiergenauigkeit des Zellisoliationsverfahrens CII-spezifischer T-Zellen zu ihrer weiteren phänotypischen Charakterisierung zu erhöhen, wurde die Identifikation über die spezifische Tetramerbindung an den TCR mit dem funktionellen Aspekt der Aktivierbarkeit durch CII-Peptidstimulation in einem konsekutiven Ansatz kombiniert. Vor allem hinsichtlich der immunsupprimierenden Medikation der RA-Patienten und einem eventuell damit einhergehenden anergen Zustandes der T-Zellen soll somit gewährleistet werden, dass nur funktionell aktive T-Zellen für die Analyse von Genexpressionsprofilen verwendet werden.

4.4 Präferentielle V-Genverwendung in RA-Patienten

Auf der Basis der etablierten Methodik der Detektion und Isolation CII-spezifischer T-Zellen dienten die weiteren Studien ihrer phänotypischen und funktionellen Charakterisierung. Für initiale Analysen des CII-spezifischen TCR-Repertoires wurden zunächst CD4⁺ T-Zellen aus 21 RA-Patienten isoliert und mittels Einzelzell-PCR analysiert. Insgesamt wurden 416 gal264CII-spezifische T-Zellen durchflusszytometrisch sortiert. Von diesen 416 isolierten Einzelzellen konnten nur für 1/3 der Zellen (ca. 140 Zellen) nach PCR-Amplifikation Sequenzen erhalten werden, die in 50% produktiv rekombinierten TCR-Ketten entsprachen. Tabelle 5 zeigt deutlich, dass die Einzelzell-PCR eine aufwendige und nicht sehr effiziente Methode ist, um den TCR zu amplifizieren, da aus 388 isolierten Einzelzellen für nur 24 die vollständigen TCR-Sequenzen für beide Ketten (α und β) aus den Amplifikaten bestimmt werden konnten. Im Vergleich war es möglich, durch mRNA-Einzelzellsequenzierung von 28 isolierten T-Zellen 23 vollständige TCR-Sequenzen zu identifizieren. Zudem weisen von 18 aus einem singulären RA-Patienten mittels konsekutiver spezifischer Oberflächenmarkierung und CII-Peptidstimulation isolierte Einzelzellen, 10 Zellen eine identische TCR-Sequenz als Indikator eines klonalen Expansionsprozesses auf.

Tab. 5: Überblick der isolierten gal264CII-spezifischen T-Zellen aus RA-Patienten

Methode zur Zellisolierung	PCR	RNA-Seq ITEM
Funktional mittels Assay zur T-Zellaktivierung	RA-Patienten: 6 Isolierte Zellen: 145 α - und β -Kette aus einer Zelle: 7	-
Oberflächenmarkierung mittels MHC-II-Tetramerfärbung	RA-Patienten: 13 Isolierte Zellen: 221 α - und β -Kette aus einer Zelle: 14	RA-Patienten: 1 Isolierte Zellen: 10 α - und β -Kette aus einer Zelle: 11*
Kombinierte Methode aus funktionalem Assay und Oberflächenfärbung	RA-Patienten: 4 Isolierte Zellen: 22 α - und β -Kette aus einer Zelle: 3	RA-Patienten: 1 Isolierte Zellen: 18 α - und β -Kette aus einer Zelle: 12

*2 unterschiedliche α -Ketten mit einer β -Kette amplifiziert

Aufgrund dieser Ergebnisse scheint die sequentielle Verwendung der spezifischen Oberflächenmarkierung mit MHCII/CII-Peptidtetrameren und anschließender Expansion der (vor)selektierten Zellen durch CII-Peptidstimulation zur Isolierung der antigenspezifischen T-Zellen in Kombination mit der mRNA-Einzelzellsequenzierung die am besten geeignete Methode für die Analytik CII-spezifischer T-Zell-Rezeptoren zu sein. Im Vergleich ist die Multiplex Einzelzell-PCR mit dem Nachteil behaftet, dass sehr viele Primer verwendet werden müssen, um die gleichmäßige Amplifikation eines hoch diversen Gesamtrepertoires von TCR-Sequenzen zu gewährleisten. Hierzu ist es auch notwendig, für die Primer der V α -Gene Pool-Familien zu bilden. Weitere Einschränkungen des Anwendungskomforts ergeben sich aus dem Umstand, dass nicht alle Primer die gesamte Länge der TCR-Sequenz amplifizieren und der *in silico* Nachbearbeitung durch Sequenzvervollständigungen aus der Datenbank bedürfen. Methodenunabhängig können in der Datenanalyse Interpretationsprobleme der Ergebnisse auftreten, wenn aus einer Einzelzelle zwei unterschiedliche α - und/oder zwei unterschiedliche β V-Gene amplifiziert werden (s. Tabelle 5). In der Literatur wurde beschrieben, dass die meisten T-Lymphozyten nur einen Rezeptortyp auf der Oberfläche tragen (Uematsu et al. 1988; Turka et al. 1991). Es wurde jedoch von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt, dass ungefähr 42% der T-Lymphozyten zwei α -Ketten und 22% zwei β -Ketten exprimieren (A. Corthay, Nandakumar und Holmdahl 2001; Brady, Steinell und Bassing 2010; Stubbington et al. 2016). Während der T-Zellreifung werden die α - und β V-Gensegmente durch die V(D)J-Umlagerung gebildet. Die variablen Domänen der α - und β -Untereinheit setzen sich aus den VJ-Segmenten für die α - und den VDJ-Segmenten für die β -Kette zusammen. Für die Auswertung der häufigsten V α - und V β -Gene wurden 416 Einzelzellen aus 21 RA-Patienten mittels Tetramerbindung (DR4/gal264CII) und/oder T-Zellaktivierung (gal264CII-Peptid) isoliert. Die am häufigsten amplifizierten V α -Gene waren TRAV8, TRAV9 und TRAV25 und die häufigsten V β -Gene: TRBV6, TRBV7, TRBV12 und

TRBV28. Ein Vergleich der Nachweisfrequenz von V α - und V β -Gensegmenten aus der aktuellen TCR-Analyse CII-spezifischer CD4⁺ T-Zellen von RA-Patienten mit publizierten Studiendaten zur Repräsentanz der einzelnen V-Gensegmente im gesamten T-Zellrepertoire gesunder Probanden, ist in Abbildung 32 dargestellt (Hawes, Struyk und van den Elsen 1993). Der Vergleich zeigt sowohl für die V α - als auch die V β -Gene eine HLA-DR4/gal264CII-Peptid spezifische V-Genselektion. So ergibt sich aus den TCR-Sequenzierungen der CII-spezifischen T-Zellen keine Detektion von V α -Genen, für die die höchsten Nachweisfrequenzen im T-Zellrepertoire von RA-Patienten beschrieben sind (TRAV2, TRAV3, TRAV4, TRAV6, TRAV7, TRAV15 und TRAV16) und bezüglich der V β -Elemente nur eine partielle Repräsentanz der Gensegmente TRBV6 und TRBV7 ohne Nachweis der Mehrzahl RA-typisch verwendeter V β -Segmente (TRBV2, TRBV3, TRBV4, TRBV8 und TRBV17) (Utz, Martin und Brooks, 1995.; VanderBorghet et al. 2000). Trotz bestehender präferentieller V-Genverwendung für die Kodierung der T-Zell-Rezeptoren der CII-spezifischen CD4⁺ T-Lymphozyten konnte durch die Analyse der Sequenzdaten kein bevorzugtes *“Pairing“* bestimmter V α - und V β -Elemente erkennen. So konnte das häufig identifizierte V α -Gen TRAV25 in Kombination mit unterschiedlichen β -Ketten amplifiziert werden ebenso wie das am häufigsten detektierte V β -Gen TRBV12 mit unterschiedlichen α -Ketten identifiziert wurde. Für die Beurteilung der Sequenzanalyseergebnisse mittels Multiplex-PCR gilt es allerdings methodenbedingte Limitationen zu berücksichtigen, die die Zuordnung amplifizierter V-Gensegmente aufgrund ihrer Sequenzen zu V-Genfamilien z.B. TRAV8 und ihren Untergruppen z.B. TRAV8-2 oder TRAV8-4 betrifft. Die Sequenzen der letztgenannten Untergruppen unterscheiden sich häufig kaum voneinander, sodass sich die eindeutige Zuordnung in kritischen Einzelfällen abhängig von Primerbindung und Amplifikatlängen schwierig gestaltete. In dieser Hinsicht bietet die Einzelzell-Gesamtranskriptomsequenzierung methodische Vorteile. Unter alleiniger Berücksichtigung der V-Genfamilien (ohne Untergruppen) waren in der Gesamtanalyse der TCR-Sequenzen CII-reaktiver T-Helferzellen die Kombinationen aus den V α - und V β -Genen TRAV25/TRBV7, TRAV8/TRBV12 und TRAV19/TRBV7 jeweils zweimal vertreten. In der Analyse der TCR-Sequenzen der humanen CII-reaktiven T-Zellen ist die Diversität der Rekombinationen präferentiell verwendeter V α - und V β -Gene mit unterschiedlichen J- und D-Segmenten auffällig, die zu variablen Sequenzen in der für die Antigenbindung als besonders relevanten CDR3-Region der α - und β -Kette führen.

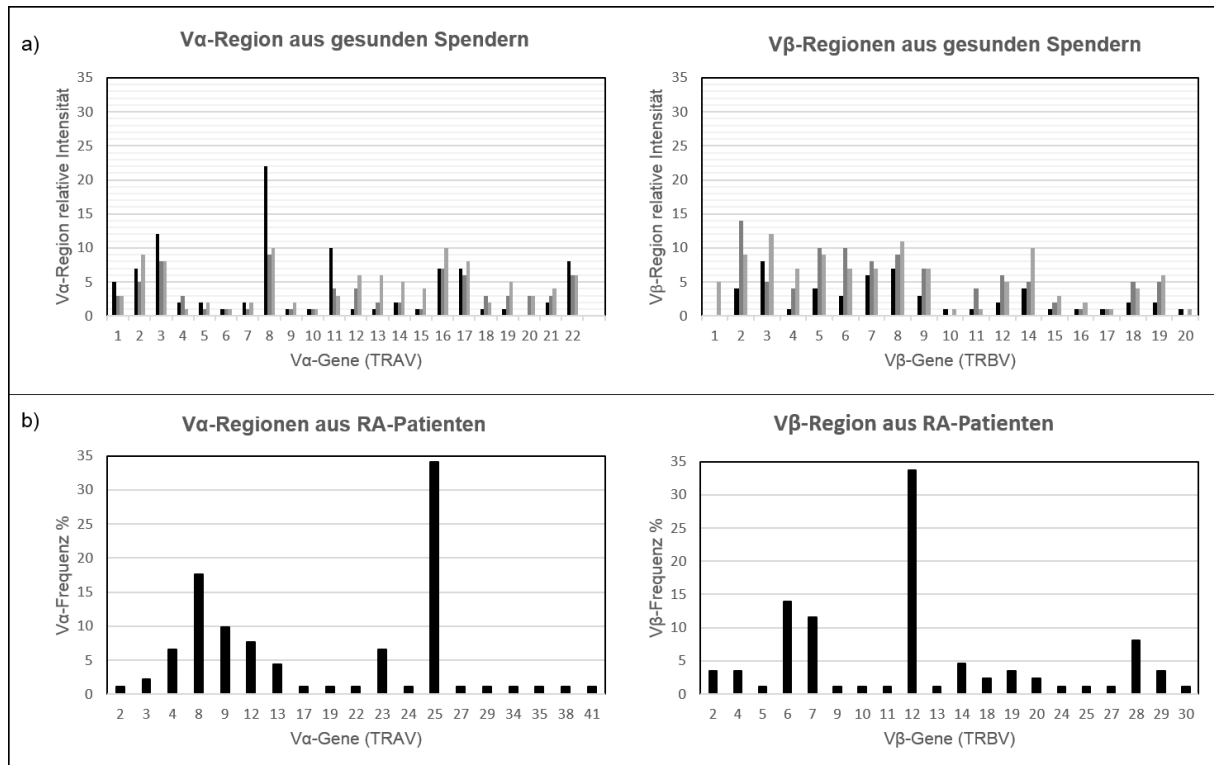


Abb. 32) V α - und V β -Repräsentanz im gesamten TCR-Repertoire gesunder Spender im Vergleich zum TCR-Repertoire DR4-restringierter CII-reaktiver T-Zellen aus RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01)
 a) V-Regionen aus drei gesunden Spendern. b) V-Regionen der sequenzierten TCR-CII-reaktiver CD4⁺ T-Zellen nach Isolation aus 21 RA-Patienten (HLA-DRB1*04:01) mittels DR4/gal264CII-Tetramerbindung oder mit Hilfe der T-Zellaktivierung mit dem gal264-Peptid [Abb. a) Modifiziert nach Hawes, Struyk und van den Elsen, 1993].

Die TCR-Sequenzvergleiche mit der des murinen gal264CII-spezifischen mDR1.1 Hybridoms zeigen für einige humane T-Zell-Rezeptoren Homologien in den CDR3-Regionen, die sowohl die α - als auch die β -Kette betreffen (vgl. Abb. 22 und 27), trotz grundsätzlich bestehender Sequenzdiversität. In dieser Hinsicht reflektieren die TCR-Analysen der humanen gal264CII-reaktiven T-Zellen die Ergebnisse publizierter Analysen des TCR-Repertoires A⁹ restringierter T-Zellen aus dem murinen CIA-Modell (A. Corthay et al. 1998). Im Vergleich zu T-Zellen mit Spezifität für das nicht-modifizierte CII, hatte sich in dieser Studie ein diverseres TCR-Repertoire für die T-Zellerkennung der glykosylierten CII-Determinante ergeben. Ein hypothetisches Erklärungsmodell besteht darin, dass möglicherweise die vom TCR erkannte Carbohydratstruktur nach Bindung des CII-Peptids an das MHC-II/Molekül flexibel bleibt und dann von verschiedenen Verwandten, aber nicht notwendigerweise sequenzidentischen TCR-Strukturen in unterschiedlichen Konformationen noch mit hinreichender Affinität gebunden werden kann, um ein aktivierendes Signal in der entsprechenden T-Zelle auszulösen. Während in dieser Hinsicht die Erkennung der reinen CII-Peptidstruktur eine stärkere Restriktion in der Selektion möglicher bindender komplementärer TCR-Strukturen bedingt.

4.5 Jurkat-Zellen als humanes zelluläres System zur transgenen Expression von antigenspezifischen TCR-Sequenzen

Die CII-Spezifität der durch Sequenzierung charakterisierten T-Zell-Rezeptoren aus CII-reaktiven humanen CD4⁺ T-Zellen sollte funktionell durch rekombinante Expression validiert werden. Zu diesem Zweck erfolgte die TCR-Rekonstitution in einer für die α - und β -Kette des T-Zell-Rezeptors defizienten Jurkat-76 Zelllinie (Heemskerk et al. 2003, Simon et al. 2014), durch lentivirale Transduktion mit jeweils unterschiedlichen TCR-Konstrukten. Als Positivkontrollen fungierten zum einen der murine gal264CII-spezifische TCR, welcher ursprünglich aus einer antigenaktivierten T-Zelle nach CIA-Induktion etabliert wurde (mDR1.1 T-Zell-Hybridom) sowie zum anderen ein humaner TCR mit Spezifität für das Influenza Hämagglutinin (HA). Die Spezifität der beiden transduzierten Positivkontrollen wurde jeweils mittels spezifischer MHC-Klasse-II/Peptidtetramerbindungen validiert. Aus den 38 unterschiedlichen humanen gal264CII-spezifischen TCR-Sequenzen wurden 14 Sequenzen lentiviral in die Jurkat-76 Zelllinie transduziert (s. Tabelle 6).

Tab. 6: Lentiviral transduzierte TCR-Sequenzen

Spezies und Spezifität	Anzahl der transduzierten TCR-Sequenzen	Quelle
Murin, gal264CII	1	Positivkontrolle, Sequenz bekannt durch Kooperationspartner R. Holmdahl
Murin, nCII	1	Positivkontrolle, Sequenz amplifiziert aus T-Zell-Hybridom 3H8
Human, Influenza HA	1	Positivkontrolle, Sequenz bekannt aus Literatur
Human, gal264CII	14	Aus antigenspezifischen T-Zellen aus RA-Patienten isoliert
Human, nCII	1	Aus antigenspezifischen T-Zellen aus RA-Patienten isoliert

Bevor die TCR-Sequenzen der humanen gal264CII-reaktiven T-Zellen lentiviral transduziert wurden, erfolgte ein Sequenzvergleich ihrer CDR3-Regionen mit der des murinen TCRs des gal264CII-spezifischen T-Zell-Hybridoms mDR1.1, da die CDR3-Regionen strukturell signifikant zur TCR-Erkennung MHC-II gebundener Peptide beitragen. Im Gegensatz zu den komplementaritätsbestimmenden Regionen (CDR-Regionen) CDR1- und CDR2, zeichnet sich der kodierende DNA-Sequenzabschnitt des TCR für die CDR3-Region durch eine besonders hohe Varianz aus, die in diesem Abschnitt im Kontext der V(D)J-Rekombinationen durch

unpräzise Verbindungen von Gensegmenten entsteht und als junktionale Diversität bezeichnet wird (Hughes et al. 2003). In dem TCR-Sequenzvergleich der CII-reaktiven humanen T-Zellen fiel auf, dass sich die Länge der CDR3-Region zwischen der α - (12-16 Aminosäuren) und β -Kette (12-18 Aminosäuren) kaum unterscheiden. Zudem konnten zwei TCR-CII-spezifische HLA-DRB1*04:01 restringierte T-Zellen (TRAV8-4/TRBV13, TRAV9-2/TRBV14) aus RA-Patienten identifiziert werden, deren α - und β -CDR3-Regionen im Sequenzvergleich die größten Sequenzhomologien mit der murinen TCR-Sequenz des gal264CII-spezifischen T-Zell-Hybridoms mDR1.1 aufwiesen. Für diese beiden gal264CII-spezifischen humanen T-Zell-Rezeptoren konnte mittels lentiviralen Transfers in eine TCR defiziente Jurkat Zelllinie der Nachweis ihrer DR4-Restriktion und Epitopspezifität in funktionellen Assays der TCR-rekonstituierten Zellen geführt werden. Die Validierung der gal264CII-Spezifität der humanen T-Zell-Rezeptoren erfolgte zunächst mittels MHC-II/Peptidkomplextetramerbindung an die mit den jeweiligen TCR-Konstrukten lentiviral transduzierten Jurkat-76 Zellen. Nach erfolgreicher TCR-Rekonstitution ist es darüber hinaus möglich, in Jurkat-76 Zellen spezifische IL-2 Sekretionsantworten durch TCR-Stimulation zu induzieren (Abraham und Weiss 2004; Gillis und Watson 1980; Manger et al. 2019). Entsprechend konnten in den, mit den beiden humanen T-Zell-Rezeptoren der CII-reaktiven humanen T-Lymphozyten transduzierten Jurkat-76 Zellen, unter DR4/gal264CII-Komplexstimulation spezifische IL-2 Induktionen im Zytokin ELISA nachgewiesen werden. Als Kontrollen dienten dabei die MHC-Klasse-II/Peptidkomplexe DR4/HA und A^q/gal264CII. Deren fehlende Funktionalität in der Stimulation einer IL-2 Antwort für den HA-Peptid enthaltende DR4-Komplex die Peptidspezifität und die gal264CII-Peptidkomponente im tragenden A^q-Komplex die MHC-II/Restriktion belegt. Entsprechend zeigen die experimentellen Evidenzen der Validierungsstudien in den transduzierten Jurkat-76 Zellen die Spezifität der analysierten Rezeptoren, sodass ihre Sequenzen u.a. für dynamische Modellierungen des trimolekularen MHC-II/Glykopeptid/TCR-Komplexes bzw. Kokristallisationsstudien zur Strukturaufklärung der T-Zellerkennung der kollagentypischen Glykosylierung als kritische autoantigene Determinante arthritogener Immunantworten und potenzielle Zielstruktur innovativer immunmodulatorischer Therapieansätze dienen können.

4.6 Phänotypische Charakterisierung der antigenspezifischen T-Zellen

Auf der Basis des Nachweises DR4-restringierter antigenspezifisch CII-reaktiver T-Zellen in RA-Patienten mit genotypischem Nachweis des HLA-DRB1*04:01 Allels, dienten *in vitro* Differenzierungen dieser CD4⁺ T-Lymphozyten ihrer phänotypischen Charakterisierung unter dem Einfluss rekombinanter DR4/CII-Peptidkomplexe.

In noch unpublizierten Studien an A^g Mäusen konnte von der Arbeitsgruppe unseres Kooperationspartners Prof. R. Holmdahl gezeigt werden, dass die systemische Gabe von A^g/gal264CII-Komplexen nach CIA-Induktion in den regionalen, die Gelenke drainierenden Lymphknoten zur Akkumulation von CD4⁺ Lymphozyten führt, die Marker eines regulatorischen Phänotyps (Tr1-Zellen) exprimieren. T-Lymphozyten des regulatorischen Tr1-Phänotyps tragen über ihre suppressive Wirkung auf autoreaktive Immunantworten zur Aufrechterhaltung der immunologischen Selbsttoleranz bei. Neben charakteristischen auch funktionell relevanten Markermolekülen CD73, CD49b, LAG3 und PD-1 wurden für tolerogene Tr1-Zellen auch Expressionen weiterer Faktoren mit immunregulatorischer Wirkung wie CTLA-4 und Interleukin 10 beschrieben (Groux et al. 1997; Francisco, Sage und Sharpe 2010; Brockmann et al. 2019). In den *in vitro* Differenzierungsstudien von PBMCs aus RA-Patienten wurde die Expressionsänderung phänotypischer Tr1-Marker durchflusszytometrisch sowie die Zytokinsekretion mittels ELSA bzw. Multiplex-Bead-Assays unter dem stimulierenden Einfluss der DR4/CII-Peptidkomplexe (DR4/gal264CII, DR4/nCII) über einen 8 tägigen Beobachtungszeitraum analysiert. Es konnte eine Heraufregulation von PD-1 als einzigem der analysierten zellulären Tr1 typischen Oberflächenmarker auf den CD4⁺ T-Lymphozyten nachgewiesen werden. PD-1 ist ein Immuncheckpoint, der durch die Interaktion mit seinem Liganden PDL-1 über die Induktion der Genexpression von IL-10 in Monozyten an der Hemmung von Immunantworten beteiligt ist. Zudem hemmt PD-1 die Phosphorylierung von Zap70 in T-Helferzellen (Sheppard et al. 2004; Said 2010). Der in den *in vitro* Studien fehlende Nachweis der Heraufregulation weiterer immuninhibitorischer Rezeptoren neben PD-1 als typische, vorwiegend in Mausstudien charakterisierte, Tr1-Oberflächenmarker ist jedoch gut vereinbar mit aktuellen Publikationen zur Heterogenität humaner Tr1-ähnlicher Zellen mit sehr variabler Markerexpression bei häufigem Nachweis von PD-1 sowie TIM-3 und obligatorisch heraufreguliertem IL-10 (White und Wraith 2016). In der Zytokinanalyse konnte im Differenzierungsmedium der humanen PBMCs unter der stimulierenden Wirkung entsprechend auch eine Erhöhung des immunsuppressiven Zytokins IL-10 nachgewiesen werden. Mit Ausnahme einer Stimulation von IL-6 konnte für keines der weitereren analysierten Zytokine (IFN γ , TNF α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17a, IL-17f, IL-21, IL-22) eine Spiegelerhöhung im Mediumüberstand unter dem Einfluss der DR4/Peptidkomplexe detektiert werden. Diese Ergebnisse sind insbesondere im Hinblick auf intendierte zukünftige Weiterentwicklungen in Richtung therapeutischer Anwendungen der DR4/CII-Komplexe relevant, da die Daten zeigen, dass diese Stimuli unter den 8 tägigen *in vitro* Studienbedingungen keine „Zytokinsturm“ ähnliche Freisetzungen proinflammatorischer Zytokine, wie TNF α , IL-17 oder IFN γ provozieren. Die Stimulation der IL-6 Produktion in der gemischten Zellpopulation der PBMCs unter dem Einfluss der DR4/CII-Komplexe, zu der neben T-Zellen auch B-Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, aber auch dendritische

Zellen beitragen können, ist in seiner funktionellen Bedeutung unklar. IL-6 ist ein Zytokin, für das neben seinen im Kontext der RA-Pathogenese bekannten proinflammatorischen Wirkungen auch eine Reihe antiinflammatorischer Effekte bekannt sind (Adam Moser, Kevin Range 2008; Neurath und Finotto 2011). So ist beispielsweise die IL-6 Expressionssteigerung in IL-4 induzierten M2 Makrophagen und ihr IL-6 abhängiger immunsuppressiver *in vitro* sowie protektiver *in vivo* Effekt gegen die Induktion einer immunmedierten neuroinflammatorischen Experimentalerkrankung beschrieben (Casella et al. 2016). Für IL-6 konnte auch gezeigt werden, dass es die Differenzierung naiver CD4 T-Zellen in IL-10-produzierende Tr1-ähnlichen Zellen in Abwesenheit von IL-27 und TGF- β über die Heraufregulation von IL-21, das synergistisch mit IL-2 die IL-10-Produktion induziert, fördern kann (Jin Jo et al. 2013). Außerdem beschleunigt IL-6 in TCR aktivierten Zellen die Hochregulation des Transkriptionsfaktors c-Maf (Yang et al. 2005), der in regulatorischen T-Zellen häufig aktiviert vorliegt.

Aufgrund der in den T-Zell-Hybridomaktivierungsstudien nachgewiesenen bereits nach 24 Std. messbar aktivierten IL-2 und IL-10 Antworten wurden auch PBMCs nach Kurzzeitexposition mit den DR4/Peptidkomplexen für 24 Std. hinsichtlich der Sekretionsstimulation von IL-2, IL-6 und IL-10 analysiert. Die Studiendaten zeigen, dass das Interleukin 6 in hohem Maß von Monozyten, geringer aber nachweisbar auch von T-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen sezerniert wird. Während T-Zellen die einzigen Zellen sind, die IL-2 sekretieren, wurde das im ELISA detektierbare IL-10 von Monozyten in Über-einstimmung mit Literaturdaten freigesetzt, die auch für T- und B-Zellen das Potenzial der IL-10 Produktion belegen (Moore et al. 2001; Maloy und Powrie 2001; Roncarolo et al. 2006). Unter Differenzierungsbedingungen dieser initialen 24 stündigen frühen DR4/CII-Komplex-stimulation wurde analysiert, welcher Stimulus responsiven Zellpopulationen welche Beiträge zur Zytokinfreisetzung leisten. Zu diesem Zweck wurde parallel die Gesamtpopulation von PBMCs, eine gesondert isolierte Zellpopulation an APCs sowie die reine Fraktion der T-Helferzellen nach Isolation aus RA-Patienten für 24 Std. mit den MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen (DR4/gal264CII, DR4/nCII) stimuliert. Es stellte sich heraus, dass PBMCs signifikant höhere Mengen an IL-2 und IL-10, die APCs weder IL-2 noch IL-10 und T-Zellen IL-2 und in einer geringen Menge IL-10 sekretieren. Somit konnte bestätigt werden, dass die CII-spezifischen T-Zellen aufgrund der Aktivierung mit den DR4/Peptidkomplexen IL-2 sekretieren und durch die Kooperation mit den Monozyten (APC-Zellfraktion) zur Induktion einer IL-10 Antwort bedürfen. Die Aufklärung der, dieser zellulären Interaktionen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen, bleibt jedoch künftigen Studien vorbehalten. Für die sehr früh unter DR4/CII-Komplexstimulation nachweisbare Zytokinsekretion ist es aufgrund der Zeitkinetik und der Literaturdaten unwahrscheinlich, dass hierfür Differenzierungen antigenspezifischer T-Helferzellen in Tr1-ähnliche Zellen verantwortlich sein können. Alternativ könnten bereits im Patienten *in vivo*

differenzierte regulatorische CII-spezifische T-Zellen sehr niedriger Vorläuferfrequenz unter den *in vitro* Bedingungen der spezifischen TCR-Triggerung ihrer immunregulatorischen Effektorfunktionen eine Phänotypmodulation der in der PBMC-Population zusätzlich vorhandenen, bereits durch andere Antigene *ex vivo* voraktivierten, T-Zellen bewirken. Diese hypothetische Form der *in vitro* induzierten Immundeviation könnte als Form einer "infektiösen Toleranz" betrachtet werden. Hierzu könnte beispielsweise beitragen, wenn derart vordifferenzierte Tr1-ähnliche Zellen zur raschen Mobilisation von IL10 aus präformierten Speichern in intrazellulären Vesikeln im Rahmen ihrer MHC-II/Peptidkomplex-Triggerung befähigt wären. Keines der genannten hypothetischen Konzepte ist jedoch durch die experimentellen Evidenzen unserer Studien gestützt und erfordert weitere separate Studien. Allerdings erscheint bereits aufgrund der Tatsache, dass die isolierte CD4⁺ T-Zellpopulation unter einer 24-stündigen Stimulation mit den DR4/CII-Komplexen keine gesteigerte IL-10 Sekretion aufweist, der Beitrag einer antigenspezifisch getriggerten IL-10 Freisetzung aus internen Speichern präformierter regulatorischer T-Zellen unwahrscheinlich. Dies schließt allerdings nicht die Existenz bereits vordifferenzierter Tr1-ähnlicher Zellen und ihre Aktivierung in der Interaktion mit APCs aus. Das synergistische Zusammenwirken von APCs und in Richtung eines Tr1-ähnlichen Phänotyps vorgeprägter T-Lymphozyten ist durch die Anforderungen der Präsenz beider Zellpopulationen für die Induktion einer in der Zeitkinetik bereits frühzeitig nachweisbaren MHC-II/CII-Peptidkomplex abhängig stimulierten IL-10 Freisetzung, eher wahrscheinlich. Im Fokus der auf den Ergebnissen dieser Arbeit aufbauenden zukünftigen Studien, wird daher die Aufklärung der komplexen Interaktionen der Subpopulationen von APCs (Monozyten/Makrophagen, myelomonozytäre und plasmazytoide dendritische Zellen und B-Zellen) mit den DR4/CII-Peptidtetramer positiven antigenspezifischen und den Tetramer-negativen CD4⁺ T-Lymphozyten im zeitlichen Verlauf des etablierten *in vitro* Differenzierungsmodells stehen. In diesem Kontext wird der Aufklärung der wechselseitigen Transkriptombeeinflussung durch Einsatz von *Next Generation Sequencing* Verfahren eine besondere Bedeutung zukommen, auch unter dem Aspekt einer Identifizierung potenzieller Biomarker, die geeignet sind, für den Fall einer späteren immunmodulierenden therapeutischen Anwendung der rekombinanten DR4/CII-Peptidkomplexe, ihre *in vivo* Effekte auf distinkte lymphozytäre und/oder myelomonozytäre Zellpopulationen zu monitorieren. Darüber hinaus werden die Ergebnisse auch vergleichende Analysen mit Ergebnissen aus dem tierexperimentellen Modell der murinen CIA erlauben.

4.7 Ausblick

Über die bereits erwähnten Studien, die dem verbesserten mechanistischen Verständnis der immunmodulierenden Wirkung von MHC-Klasse-II/Peptidkomplexen zur Therapie der RA und der Entwicklung potenzieller Biomarker für die Translation in die klinische Anwendung dienen, ergeben sich aus den Ergebnissen der aktuellen Studie eine Reihe weiterer Anschlussprojekte.

So sollen klonotypische Antikörper gegen die beiden funktionellen humanen DR4/gal264CII-spezifischen T-Zell-Rezeptoren hergestellt werden, um eine spezifische und auch für die Hochdurchsatzanalytik des klinischen Probenmaterials geeignete Methodik zur Bestimmung der Vorläuferfrequenzen dieser antigenspezifischen T-Zellen und ihrer klonalen Expansionen zu etablieren. Darüber hinaus sollen mit Hilfe der etablierten Analytik antigenspezifischen T-Zellen sowie mit der verbesserten Methodik ihrer Isolation eine systematische Fortsetzung der Studie zur Charakterisierung eines möglichst umfassenden Repertoires der CII-spezifischen T-Zell-Rezeptoren inklusive ihrer lentiviralen Transduktion in die Jurkat-76 Zelllinie erfolgen. Exemplarisch ist vorgesehen, die beiden identifizierten DR4-restringierten CII-spezifischen T-Zell-Rezeptoren mit dem rekombinanten DR4/gal264CII-Peptidkomplex zu ko-kristallisieren, um die molekulare Basis der Erkennung von CII als Autoantigen insbesondere im Hinblick auf die Bedeutung des flexibleren Galaktoserestes für Arthritogenität und Tolerogenität besser zu verstehen.

Nachdem die Ergebnisse dieser Arbeit zur Anmeldung von insgesamt drei Patenten beigetragen und entsprechend zu Verzögerungen ihrer Publikation geführt haben, sind mehrere Veröffentlichungen geplant. Aktuell ist ein Manuskript zur systematischen Detektion antigen-spezifischer T-Zellen im peripheren Blut von HLA-DRB1*04:01 RA-Patienten mittels Tetramertechnologie in Vorbereitung. Des Weiteren folgt der erste direkte experimentelle Nachweis der Existenz autoreaktiver gal264CII-spezifischer DR4-restringierter T-Zell-Rezeptoren durch lentivirale Expression in funktionell aktiver Form in einer TCR-defizienten Jurkat Zelllinie unter Beteiligung der Kooperationspartner am Karolinska Institut.

III Literaturverzeichnis

- Abraham and Weiss. 2004. "Jurkat T Cells and Development of the T-Cell Receptor Signalling Paradigm." *Nature Reviews. Immunology*.
- Aho, K., T. Palosuo, V. Raunio, P. Puska, A. Aromaa and J. T. Salonen. 1985. "When Does Rheumatoid Disease Start?" *Arthritis & Rheumatism*.
- Andersson, E C, B E Hansen, H Jacobsen, L S Madsen, C B Andersen, J Engberg, J B Rothbard, et al. 1998. "Definition of MHC and T Cell Receptor Contacts in the HLA-DR4restricted Immunodominant Epitope in Type II Collagen and Characterization of Collagen-Induced Arthritis in HLA-DR4 and Human CD4 Transgenic Mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Andersson, Ida E., Balik Dzhambazov, Rikard Holmdahl, Anna Linusson and Jan Kihlberg. 2007. "Probing Molecular Interactions within Class II MHC AQ / glycopeptide/T-Cell Receptor Complexes Associated with Collagen-Induced Arthritis." *Journal of Medicinal Chemistry*.
- Apetoh, Lionel, Francisco J Quintana, Caroline Pot, Nicole Joller, Sheng Xiao, Deepak Kumar, Evan J Burns, David H Sherr, Howard L Weiner and K Vijay. 2011. "The Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Interacts with c-Maf to Promote the Differentiation of IL-27-Induced Regulatory Type 1 (TR1) Cells." *Nature Immunology*.
- Awasthi, Amit, Yijun Carrier, Jean P.S. Peron, Estelle Bettelli, Masahito Kamanaka, Richard A. Flavell, Vijay K. Kuchroo, Mohamed Oukka and Howard L. Weiner. 2007. "A Dominant Function for Interleukin 27 in Generating Interleukin 10-Producing Anti-Inflammatory T Cells." *Nature Immunology*.
- Bäcklund, Johan, Stefan Carlsen, Torsten Höger, Björn Holm, Lars Fugger, Jan Kihlberg, Harald Burkhardt and Rikard Holmdahl. 2002. "Predominant Selection of T Cells Specific for the Glycosylated Collagen Type II Epitope (263-270) in Humanized Transgenic Mice and in Rheumatoid Arthritis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Bäcklund, Johan, Alexandra Treschow, Robert Bockermann, Björn Holm, Lotta Holm, Shohreh Issazadeh-Navikas, Jan Kihlberg and Rikard Holmdahl. 2002. "Glycosylation of Type II Collagen Is of Major Importance for T Cell Tolerance and Pathology in Collagen-Induced Arthritis." *European Journal of Immunology*.
- Brady, B. L., N. C. Steinel and C. H. Bassing. 2010. "Antigen Receptor Allelic Exclusion: An Update and Reappraisal." *The Journal of Immunology*.
- Brockmann, Leonie, Nicola Gagliani, Babett Steglich, Anastasios D Giannou, Jan Kempfski, Penelope Pelczar, Maria Geffken, et al. 2019. "IL-10 Receptor Signaling Is Essential for TR1 Cell Function In Vivo." *The Journal of Immunology*.
- Burkhardt, Harald, Tobias Koller, Åke Engström, Kutty Selva Nandakumar, Javier Turnay, Hans G. Kraetsch, Joachim R. Kalden and Rikard Holmdahl. 2002. "Epitope-Specific Recognition of Type II Collagen by Rheumatoid Arthritis Antibodies Is Shared with Recognition by Antibodies That Are Arthritogenic in Collagen-Induced Arthritis in the Mouse." *Arthritis and Rheumatism*.
- Burkhardt, Harald, Bettina Sehnert, Robert Bockermann, Ake Engström, Jochen R Kalden and Rikard Holmdahl. 2005. "Humoral Immune Response to Citrullinated Collagen Type II Determinants in Early Rheumatoid Arthritis." *European Journal of Immunology*.

- Burnet, F. M. 2011. "The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity." *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*.
- Campbell, Ian K., Sarah A. Kinkel, Sarah F. Drake, Annemarie Van Nieuwenhuijze, François Xavier Hubert, David M. Tarlinton, William R. Heath, Hamish S. Scott and Ian P. Wicks. 2009. "Autoimmune Regulator Controls T Cell Help for Pathogenetic Autoantibody Production in Collagen-Induced Arthritis." *Arthritis and Rheumatism*.
- Candia, Martín and Winfried F Pickl. 2016. "On Peptides and Altered Peptide Ligands : From Origin, Mode of Action and Design to Clinical Application." *Allergy and Immunology*.
- Casella, Giacomo, Livia Garzetti, Alberto T. Gatta, Annamaria Finardi, Chiara Maiorino, Francesca Ruffini, Gianvito Martino, Luca Muzio and Roberto Furlan. 2016. "IL4 Induces IL6-Producing M2 Macrophages Associated to Inhibition of Neuroinflammation in Vitro and in Vivo." *Journal of Neuroinflammation*.
- Chin, Robert K., Mingzhao Zhu, Peter A. Christiansen, Wenhua Liu, Carl Ware, Leena Peltonen, Xuejun Zhang, et al. 2006. "Lymphotoxin Pathway-Directed, Autoimmune Regulator-Independent Central Tolerance to Arthritogenic Collagen." *The Journal of Immunology*.
- Christina Andersson, Ellen, Bjarke Endel Hansen, Helle Jacobsen, Lars S Madsen, Claus B Andersen, Jan Engberg, Jonathan B Rothbard, et al. 1998. "Definition of MHC and T Cell Receptor Contacts in the HLA-DR4-Restricted Immunodominant Epitope in Type II Collagen and Characterization of Collagen-Induced Arthritis in HLA-DR4 and Human CD4 Transgenic Mice." *Immunology*.
- Corthay, a, J Bäcklund, J Broddefalk, E Michaëlsson, T J Goldschmidt, J Kihlberg, and R Holmdahl. 1998. "Epitope Glycosylation Plays a Critical Role for T Cell Recognition of Type II Collagen in Collagen-Induced Arthritis." *European Journal of Immunology*.
- Corthay, Alexandre, Johan Bäcklund, Johan Broddefalk, Erik Michaëlsson, Tom J. Goldschmidt, Jan Kihlberg, and Rikard Holmdahl. 1998. "Epitope Glycosylation Plays a Critical Role for T Cell Recognition of Type II Collagen in Collagen-Induced Arthritis." *European Journal of Immunology*.
- Corthay, Alexandre, Kutty Selva Nandakumar and Rikard Holmdahl. 2001. "Evaluation of the Percentage of Peripheral T Cells with Two Different T Cell Receptor α -Chains and of Their Potential Role in Autoimmunity." *Journal of Autoimmunity*.
- Deaglio, Silvia, Karen M. Dwyer, Wenda Gao, David Friedman, Anny Usheva, Anna Erat, Jiang Fan Chen, et al. 2007. "Adenosine Generation Catalyzed by CD39 and CD73 Expressed on Regulatory T Cells Mediates Immune Suppression." *Journal of Experimental Medicine*.
- Derbinski, Jens and Bruno Kyewski. 2010. "How Thymic Antigen Presenting Cells Sample the Body's Self-Antigens." *Current Opinion in Immunology*.
- Dzhambazov, Balik, Meirav Holmdahl, Hisakata Yamada, Shemin Lu, Mikael Vestberg, Björn Holm, Olof Johnell, Jan Kihlberg and Rikard Holmdahl. 2005. "The Major T Cell Epitope on Type II Collagen Is Glycosylated in Normal Cartilage but Modified by Arthritis in Both Rats and Humans." *European Journal of Immunology*.
- Dzhambazov, Balik, Kutty Selva Nandakumar, Jan Kihlberg, Lars Fugger, Rikard Holmdahl and Mikael Vestberg. 2006. "Therapeutic Vaccination of Active Arthritis with a Glycosylated Collagen Type II Peptide in Complex with MHC Class II Molecules." *The Journal of Immunology*.
- Evavold, Brian D. and Paul M. Allen. 1991. "Separation of IL-4 Production from Th Cell Proliferation by an Altered T Cell Receptor Ligand." *Science*.

- Fiszer, Dorota and Maciej Kurpisz. 1998. "Major Histocompatibility Complex Expression on Human, Male Germ Cells: A Review." *American Journal of Reproductive Immunology*.
- Fontenot, Jason D., Marc A. Gavin and Alexander Y. Rudensky. 2017. "Foxp3 Programs the Development and Function of CD4+CD25+ Regulatory T Cells." *Journal of Immunology*.
- Francisco, Loise M., Peter T. Sage and Arlene H. Sharpe. 2010. "The PD-1 Pathway in Tolerance and Autoimmunity." *Immunological Reviews*.
- Gagliani, Nicola, Chiara F. Magnani, Samuel Huber, Monica E. Gianolini, Mauro Pala, Paula Licona-Limon, Bingge Guo, et al. 2013. "Coexpression of CD49b and LAG-3 Identifies Human and Mouse T Regulatory Type 1 Cells." *Nature Medicine*.
- Gao, Xuefeng, Christophe Arpin, Jacqueline Marvel, Sotiris A. Prokopiou, Olivier Gandrillon and Fabien Crauste. 2016. "IL-2 Sensitivity and Exogenous IL-2 Concentration Gradient Tune the Productive Contact Duration of CD8 + T Cell-APC: A Multiscale Modeling Study." *BMC Systems Biology*.
- Gillis, Steven and James Watson. 1980. "Biochemical and Biological Characterization of Lymphocyte Regulatory Molecules: V. Identification of an Interleukin 2-Producing Human Leukemia T Cell Line." *Journal of Experimental Medicine*.
- Gondek, David C., Li-Fan Lu, Sergio A. Quezada, Shimon Sakaguchi and Randolph J. Noelle. 2005. "Cutting Edge: Contact-Mediated Suppression by CD4+ CD25+ Regulatory Cells Involves a Granzyme B-Dependent, Perforin-Independent Mechanism." *The Journal of Immunology*.
- Gregersen, Peter K, Jack Silver and Robert J Winchester. 1987. "The Shared Epitope Hypothesis." *Arthritis and Rheumatism*.
- Gregori, Silvia, Kevin S. Goudy and Maria Grazia Roncarolo. 2012. "The Cellular and Molecular Mechanisms of Immuno-Suppression by Human Type 1 Regulatory T Cells." *Frontiers in Immunology*.
- Groux, Hervé, Anna Garra, Mike Bigler, Mattieu Rouleau, Svetlana Antonenko, Jan E Vries, Maria-Grazia G Roncarolo, et al. 1997. "A CD4+ T-Cell Subset Inhibits Antigen-Specific T-Cell Responses and Prevents Colitis." *Nature*.
- Han, Arnold, Jacob Glanville, Leo Hansmann and Mark M Davis. 2014. "Linking T-Cell Receptor Sequence to Functional Phenotype at the Single-Cell Level." *Nature Biotechnology*.
- Hennecke, Jens and Don C Wiley. 2002. "Structure of a Complex of the Human T Cell Receptor (TCR) HA1.7, Influenza Hemagglutinin Peptide, and Major Histocompatibility Complex Class II Molecule, HLA-DR4 (DRA * 0101 and DRB1 * 0401): Insight into TCR Cross-Restriction and Alloreactivity." *J. Exp. Med.*
- Hirano, Masayuki, Sabyasachi Das, Peng Guo and Max D. Cooper. 2011. "The Evolution of Adaptive Immunity in Vertebrates." *Advances in Immunology*.
- Holmdahl, Rikard, Vivianne Malmström and Harald Burkhardt. 2014. "Autoimmune Priming, Tissue Attack and Chronic Inflammation - The Three Stages of Rheumatoid Arthritis." *European Journal of Immunology*.
- Hughes, Maureen M, Maryam Yassai, John R Sedy, Tara D Wehrly, Osami Kanagawa, Jack Gorski and Barry P Sleckman. 2003. "T Cell Receptor CDR3 Loop Length Repertoire Is Determined Primarily by Features of the V(D)J Recombination Reaction." *European Journal of Immunology*.

- Iwasaki, Yukiko, Keishi Fujio, Tomohisa Okamura, Atsushi Yanai, Shuji Sumitomo, Hirofumi Shoda, Tomohiko Tamura, Hiroki Yoshida, Patrick Charnay and Kazuhiko Yamamoto. 2013. "Egr-2 Transcription Factor Is Required for Blimp-1-Mediated IL-10 Production in IL-27-Stimulated CD4+ T Cells." *European Journal of Immunology*.
- Janeway, Charles A. 2013. "Pillars Article: Approaching the Asymptote? Evolution and Revolution in Immunology." *Journal of Immunology*.
- Jenkins, Marc K., H. Hamlet Chu, James B. McLachlan and James J. Moon. 2010. "On the Composition of the Preimmune Repertoire of T Cells Specific for Peptide–Major Histocompatibility Complex Ligands." *Annual Review of Immunology*.
- Kim, Song Min, Latika Bhonsle, Petra Besgen, Jens Nickel, Anna Backes, Kathrin Held, Sigrid Vollmer, Klaus Dornmair and Joerg C. Prinz. 2012. "Analysis of the Paired TCR α - and β -Chains of Single Human T Cells." *PLoS ONE*.
- Kitas, George D. and Sherine E. Gabriele. 2011. "Cardiovascular Disease in Rheumatoid Arthritis: State of the Art and Future Perspectives." *Annals of the Rheumatic Diseases*.
- Klareskog, Lars, Leonid Padyukov, Johnny Lorentzen and Lars Alfredsson. 2006. "Mechanisms of Disease: Genetic Susceptibility and Environmental Triggers in the Development of Rheumatoid Arthritis." *Nature Clinical Practice Rheumatology*.
- Klein, Ludger, Maria Hinterberger, Gerald Wirnsberger and Bruno Kyewski. 2009. "Antigen Presentation in the Thymus for Positive Selection and Central Tolerance Induction." *Nature Reviews Immunology*.
- Kollias, George, Piyi Papadaki, Florence Apparailly, Margriet J. Vervoordeldonk, Rikard Holmdahl, Vera Baumans, Christian Desaintes, et al. 2011. "Animal Models for Arthritis: Innovative Tools for Prevention and Treatment." *Annals of the Rheumatic Diseases*.
- Kong, K. F., S. S. Yeap, S. K. Chow and Maude E. Phipps. 2002. "HLA-DRB1 Genes and Susceptibility to Rheumatoid Arthritis in Three Ethnic Groups from Malaysia." *Autoimmunity*.
- Kubo, T., R. D. Hatton, J. Oliver, X. Liu, C. O. Elson and C. T. Weaver. 2004. "Regulatory T Cell Suppression and Anergy Are Differentially Regulated by Proinflammatory Cytokines Produced by TLR-Activated Dendritic Cells." *The Journal of Immunology*.
- Lindgren, Cecilia, Mohit Tyagi, Johan Viljanen, Johannes Toms, Changrong Ge, Naru Zhang, Rikard Holmdahl, Jan Kihlberg and Anna Linusson. 2018. "Dynamics Determine Signaling in a Multicomponent System Associated with Rheumatoid Arthritis." Research-article. *Journal of Medicinal Chemistry*.
- Liu, Di, Na Yuan, Guimei Yu, Ge Song and Yan Chen. 2017. "Can Rheumatoid Arthritis Ever Cease to Exist: A Review of Various Therapeutic Modalities to Maintain Drug-Free Remission?" *American Journal of Translational Research*.
- Liu, Weihong, Amy L Putnam, Zhou Xu-yu, Gregory L Szot, Michael R Lee, Shirley Zhu, Peter A Gottlieb, et al. 2006. "CD127 Expression Inversely Correlates with FoxP3 and Suppressive Function of Human CD4+ T Reg Cells." *The Journal of Experimental Medicine*.
- Londei, M., C. M. Savill, A. Verhoef, F. Brennan, Z. A. Leech, V. Duance, R. N. Maini and M. Feldmann. 1989. "Persistence of Collagen Type II-Specific T-Cell Clones in the Synovial Membrane of a Patient with Rheumatoid Arthritis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.

- Lühder, Fred, Yun Huang, Kevin M Dennehy, Christine Guntermann, Ingrid Müller, Erna Winkler, Thomas Kerkau, et al. 2003. "Topological Requirements and Signaling Properties of T Cell-activating, Anti-CD28 Antibody Superagonists." *The Journal of Experimental Medicine*.
- Magistris, M. Teresa De, Jeff Alexander, Mark Coggeshall, Amnon Altman, Federico C.A. Gaeta, Howard M. Grey and Alessandro Sette. 1992. "Antigen Analog-Major Histocompatibility Complexes Act as Antagonists of the T Cell Receptor." *Cell*.
- Maloy, K J and F Powrie. 2001. "Regulatory T Cells in the Control of Immune Pathology." *Nature Immunology*.
- Malvey, E N, M K Jenkins and D L Mueller. 1998. "Peripheral Immune Tolerance Blocks Clonal Expansion but Fails to Prevent the Differentiation of Th1 Cells." *Journal of Immunology*.
- Manger, Bernhard, Arthur Weiss, Cornelia Weyand and Joerg Goronzy. 2019. "T Cell Activation : Differences in the Signals Required for IL 2 Production by Nonactivated and Activated T Cells." *Journal of Immunology*.
- Michaëlsson, Erik, Vivianne Malmström, Sigrid Reis, Åke Engström, Harald Burkhardt and Rikard Holmdahl. 1994. "T Cell Recognition of Carbohydrates on Type II Collagen." *Journal of Experimental Medicine*.
- Mills, Kingston H.G. 2004. "Regulatory T Cells: Friend or Foe in Immunity to Infection?" *Nature Reviews Immunology*.
- Moore, Kevin W., Rene de Waal Malefyt, Robert L. Coffman and Anne O'Garra. 2001. " Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor." *Annual Review of Immunology*.
- Mortazavi, Ali, Brian A. Williams, Kenneth McCue, Lorian Schaeffer and Barbara Wold. 2008. "Mapping and Quantifying Mammalian Transcriptomes by RNA-Seq." *Nature Methods*.
- Murugan, Anand, Thierry Mora, Aleksandra M. Walczak and Curtis G. Callan. 2012. "Statistical Inference of the Generation Probability of T-Cell Receptors from Sequence Repertoires." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Nakamura, K., A. Kitani and W. Strober. 2001. "Cell Contact-Dependent Immunosuppression by CD4+CD25+ Regulatory T Cells Is Mediated by Cell Surface-Bound Transforming Growth Factor β ." *Journal of Experimental Medicine*.
- Nandakumar, Kutty Selva, Estelle Bajtner, Leigh Hill, Beate Böhm, Merrill J. Rowley, Harald Burkhardt and Rikard Holmdahl. 2008. "Arthritogenic Antibodies Specific for a Major Type II Collagen Triple-Helical Epitope Bind and Destabilize Cartilage Independent of Inflammation." *Arthritis and Rheumatism*.
- Nazzari, D., A. Gradolatto, F. Truffault, J. Bismuth and S. Berrih-Aknin. 2014. "Human Thymus Medullary Epithelial Cells Promote Regulatory T-Cell Generation by Stimulating Interleukin-2 Production via ICOS Ligand." *Cell Death and Disease*.
- Neurath, Markus F. and Susetta Finotto. 2011. "IL-6 Signaling in Autoimmunity, Chronic Inflammation and Inflammation-Associated Cancer." *Cytokine and Growth Factor Reviews*.
- Nicholson, Lindsay B., Judith M. Greer, Raymond A. Sobel, Marjorie B. Lees and Vijay K. Kuchroo. 1995. "An Altered Peptide Ligand Mediates Immune Deviation and Prevents Autoimmune Encephalomyelitis." *Immunity*.
- Nikolich-Zugich, Janko, Mark K. Slifka and Ilhem Messaoudi. 2004. "The Many Important Facets of T-Cell Repertoire Diversity." *Nature Reviews Immunology*.

- Pachter, Joel S., Helga E. De Vries and Zsuzsa Fabry. 2003. "The Blood-Brain Barrier and Its Role in Immune Privilege in the Central Nervous System." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*.
- Pageon, Sophie V., Thibault Tabarin, Yui Yamamoto, Yuanqing Ma, John S. Bridgeman, André Cohnen, Carola Benzing, et al. 2016. "Functional Role of T-Cell Receptor Nanoclusters in Signal Initiation and Antigen Discrimination." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
- Park, Jeoung-eun, David Cullins, Lillian Zalduondo, Stacey L Barnett, Ae-kyung Yi, Sandra Kleinau, John M Stuart, Andrew H Kang and Linda K Myers. 2012. "Molecular Basis for T Cell Response Induced by Altered Peptide Ligand of Type II Collagen." *The Journal of Biological Chemistry*.
- Perniola, Roberto. 2018. "Twenty Years of AIRE." *Frontiers in Immunology*.
- Polansky, Julia K., Karsten Kretschmer, Jennifer Freyer, Stefan Floess, Annette Garbe, Udo Baron, Sven Olek, Alf Hamann, Harald von Boehmer and Jochen Huehn. 2008. "DNA Methylation Controls Foxp3 Gene Expression." *European Journal of Immunology*.
- Raposo, Bruno, Patrick Merky, Christina Lundqvist, Hisakata Yamada, Vilma Urbonaviciute, Colin Niaudet, Johan Viljanen, et al. 2018. "T Cells Specific for Post-Translational Modifications Escape Intrathymic Tolerance Induction." *Nature Communications*.
- Richards, David M., Bruno Kyewski and Markus Feuerer. 2016. "Re-Examining the Nature and Function of Self-Reactive T Cells." *Trends in Immunology*.
- Roncarolo, Maria Grazia, Silvia Gregori, Manuela Battaglia, Rosa Bacchetta, Katharina Fleischhauer and Megan K. Levings. 2006. "Interleukin-10-Secreting Type 1 Regulatory T Cells in Rodents and Humans." *Immunological Reviews*.
- Rosloniec, E F, D D Brand, L K Myers, Y Esaki, K B Whittington, D M Zaller, A Woods, J M Stuart and A H Kang. 1998. "Induction of Autoimmune Arthritis in HLA-DR4 (DRB1*0401) Transgenic Mice by Immunization with Human and Bovine Type II Collagen." *Journal of Immunology*.
- Rosloniec, Edward F., David D. Brand, Linda K. Myers, Karen B. Whittington, Marina Gumanovskaya, Dennis M. Zaller, Andrea Woods, Daniel M. Altmann, John M. Stuart and Andrew H. Kang. 1997. "An HLA-DR1 Transgene Confers Susceptibility to Collagen-Induced Arthritis Elicited with Human Type II Collagen." *Journal of Experimental Medicine*.
- S, Tonegawa. 1983. "Somatic Generation of Antibody Diversity." *Nature*.
- Said. 2010. "PD-1 Induced IL-10 Production by Monocytes Impairs CD4 T-Cell Activation during HIV Infection." *Nature medicine*.
- Sakaguchi, Shimon, Tomoyuki Yamaguchi, Takashi Nomura and Masahiro Ono. 2008. "Regulatory T Cells and Immune Tolerance." *Cell*.
- Sanger, F. and A. R. Coulson. 1975. "A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase." *Journal of Molecular Biology*.
- Sheppard, Kelly Ann, Lori J. Fitz, Julie M. Lee, Christina Benander, Judith A. George, Joe Wooters, Yongchang Qiu, et al. 2004. "PD-1 Inhibits T-Cell Receptor Induced Phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ Signalosome and Downstream Signaling to PKC θ ." *FEBS Letters*.
- Shevach, Ethan M. 2009. "Mechanisms of Foxp3+ T Regulatory Cell-Mediated Suppression." *Immunity*.

- Simon, Petra, Tana A. Omokoko, Andrea Breitzkreuz, Lisa Hebich, Sebastian Kreiter, Sebastian Attig, Abdo Konur, et al. 2014. "Functional TCR Retrieval from Single Antigen-Specific Human T Cells Reveals Multiple Novel Epitopes." *Cancer Immunology Research*.
- Smolen, Josef S., Daniel Aletaha and Iain B. McInnes. 2016. "Rheumatoid Arthritis." Elsevier.
- Snowden, Neil, Irena Reynolds, Keith Morgan and Lennox Holt. 1997. "T Cell Responses to Human Type II Collagen in Patients with Rheumatoid Arthritis and Healthy Controls." *Arthritis and Rheumatism*.
- Stubbington, Michael J.T., Tapio Lönnberg, Valentina Proserpio, Simon Clare, Anneliese O. Speak, Gordon Dougan and Sarah A. Teichmann. 2016. "T Cell Fate and Clonality Inference from Single-Cell Transcriptomes." *Nature Methods*.
- Toker, Aras, Dirk Engelbert, Garima Garg, Julia K. Polansky, Stefan Floess, Takahisa Miyao, Udo Baron, et al. 2013. "Active Demethylation of the Foxp3 Locus Leads to the Generation of Stable Regulatory T Cells within the Thymus." *The Journal of Immunology*.
- Turka, Laurence A., David G. Schatz, Marjorie A. Oettinger, Jerold J.M. Chun, Carolyn Gorka, Kelvin Lee, Wayne T. McCormack and Craig B. Thompson. 1991. "Thymocyte Expression of RAG-1 and RAG-2: Termination by T Cell Receptor Cross-Linking." *Science*.
- Uematsu, Yasushi, Stefan Ryser, Zlatko Dembić, Peter Borgulya, Paul Krimpenfort, Anton Berns, Harald von Boehmer and Michael Steinmetz. 1988. "In Transgenic Mice the Introduced Functional T Cell Receptor β Gene Prevents Expression of Endogenous β Genes." *Cell*.
- Utz, Ursula, Roland Martin and Janet A Brooks. n.d. "Linearization, Optimization, Protection Page Inserted by Evaluation Version T-Cell Receptor Use in Multiple Sclerosis." *Immunology and Rheumatology*.
- Uysal, Hüseyin, Robert Bockermann, Kutty S Nandakumar, Bettina Sehnert, Estelle Bajtner, Ake Engström, Guy Serre, Harald Burkhardt, Marjolein M G M Thunnissen and Rikard Holmdahl. 2009. "Structure and Pathogenicity of Antibodies Specific for Citrullinated Collagen Type II in Experimental Arthritis." *The Journal of Experimental Medicine*.
- Uysal, Hüseyin, Kutty Selva Nandakumar, Christoph Kessel, Sabrina Haag, Stefan Carlsen, Harald Burkhardt and Rikard Holmdahl. 2010. "Antibodies to Citrullinated Proteins: Molecular Interactions and Arthritogenicity." *Immunological Reviews*.
- Valdor, Rut and Fernando Macian. 2010. "Mechanisms of Self-Inactivation in Anergic T Cells." *Immunologia*.
- Vandenbark, Arthur A. and Halina Offner. 2008. "Critical Evaluation of Regulatory T Cells in Autoimmunity: Are the Most Potent Regulatory Specificities Being Ignored?" *Immunology*.
- VanderBorgh, a, P Geusens, C Vandevyver, J Raus and P Stinissen. 2000. "Skewed T-Cell Receptor Variable Gene Usage in the Synovium of Early and Chronic Rheumatoid Arthritis Patients and Persistence of Clonally Expanded T Cells in a Chronic Patient." *Rheumatology*.
- Voss, Ralf Holger, Jürgen Kuball, Renate Engel, Philippe Guillaume, Pedro Romero, Christoph Huber and Matthias Theobald. 2006. "Redirection of T Cells by Delivering a Transgenic Mouse-Derived MDM2 Tumor Antigen-Specific TCR and Its Humanized Derivative Is Governed by the CD8 Coreceptor and Affects Natural Human TCR Expression." *Immunologic Research*.

- Waal Malefyt, R de, H Yssel and J E de Vries. 1993. "Direct Effects of IL-10 on Subsets of Human CD4+ T Cell Clones and Resting T Cells. Specific Inhibition of IL-2 Production and Proliferation." *Journal of Immunology*.
- Wakitani, S., K. Imoto, N. Murata, H. Oonishi, T. Ochi and M. Yoneda. 1998. "An Association between the Natural Course of Shoulder-Joint Destruction in Rheumatoid Arthritis and HLA-DRB1 *0405 in Japanese Patients." *Scandinavian Journal of Rheumatology*.
- Wang, Liguo, Shengqin Wang and Wei Li. 2012. "Quality Control of RNA-Seq Experiments." *Bioinformatics*.
- Wehbi, Vanessa L. and Kjetil Taskén. 2016. "Molecular Mechanisms for cAMP-Mediated Immunoregulation in T Cells - Role of Anchored Protein Kinase a Signaling Units." *Frontiers in Immunology*.
- Weiss, A, R L Wiskocil and J D Stobo. 1984. "The Role of T3 Surface Molecules in the Activation of Human T Cells: A Two-Stimulus Requirement for IL 2 Production Reflects Events Occurring at a Pre-Translational Level." *Rheumatology*.
- White, Anna Malgorzata and David C. Wraith. 2016. "Tr1-like T Cells - An Enigmatic Regulatory T Cell Lineage." *Frontiers in Immunology*.
- Wittrup, Anders, Angela Ai, Xing Liu, Peter Hamar, Radiana Trifonova, Klaus Charisse, Muthiah Manoharan, Tomas Kirchhausen, Judy Lieberman and Nat Biotechnol. 2015. "Visualizing Lipid-Formulated siRNA Release from Endosomes and Target Gene Knockdown HHS Public Access Author Manuscript." *Nat Biotechnol*.
- Xing, Yan and Kristin A Hogquist. 2016. "T-Cell Tolerance : Central and Peripheral." *Cold spring harbor laboratory press*.
- Yang, Yu, Jordi Ochando, Adam Yopp, Jonathan S. Bromberg and Yaozhong Ding. 2005. "IL-6 Plays a Unique Role in Initiating c-Maf Expression during Early Stage of CD4 T Cell Activation." *The Journal of Immunology*.
- Yudoh, Kazuo, Hiroaki Matsuno, Fujio Nakazawa, Tamon Yonezawa and Tomoatsu Kimura. 2000. "Reduced Expression of the Regulatory CD4+ T Cell Subset Is Related to Th1/Th2 Balance and Disease Severity in Rheumatoid Arthritis." *Arthritis and Rheumatism*.
- Zarnitsyna, Veronika I., Brian D. Evavold, Louis N. Schoettle, Joseph N. Blattman and Rustom Antia. 2013. "Estimating the Diversity, Completeness and Cross-Reactivity of the T Cell Repertoire." *Frontiers in Immunology*.

IV Abkürzungsverzeichnis

ACPA	<i>Anti-citrullinated peptides antibody</i>
APC	<i>Antigen presenting cell</i>
bp	Basenpaar
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity determining region</i>
cDNA	Komplementäre DNA
CIA	<i>Collagen induced arthritis</i>
CII	Kollagen Typ-II
CTLA-4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4</i>
HCQ	Hydroxychloroquin
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
For	<i>Forward</i>
Foxp3	<i>Forkhead-Box-P3</i>
IL	<i>Interleukin</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte activation gene 3</i>
M	Molar
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
Min.	Minute
PD-1	<i>Programmed cell death protein 1</i>
RA	Rheumatoide Arthritis
Rev	<i>Revers</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
Sek.	Sekunde
Std.	Stunde
TCR	<i>T cell receptor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
Treg	Regulatorische T-Zelle
μ	Mikro
°C	Celsius

V Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME im Institutsteil Translationale Medizin und Pharmakologie TMP unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Harald Burkhardt am Universitätsklinikum Frankfurt am Main angefertigt.

Mein besonderer Dank gebührt vor allem Prof. Dr. Harald Burkhardt für die Bereitstellung des Dissertationsthemas, der Betreuung meiner Arbeit und vielen fachlichen Anregungen in dieser Zeit. Sein stetiges Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die ausgezeichnete materielle Ausstattung der Arbeitsgruppe haben diese Arbeit wesentlich erleichtert.

Ebenso danke ich Prof. Dr. Jörg Soppa für die Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit zu übernehmen.

Außerdem möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit bei unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Rikard Holmdahl und seinen Mitarbeitern am Karolinska Institut in Stockholm und für die Bereitstellung der T-Zell-Hybridome und MHC-II/Peptidkomplexe bedanken.

Für die konstruktive Betreuung im Labor möchte ich mich insbesondere bei Dr. Nadine Schneider für die fachliche Unterstützung, viele wissenschaftlich anregende Gespräche, die kompetente Beratung bei der Bearbeitung meines Themas und ihre aufmunternden Worte in schwierigen Zeiten bedanken. Ebenso möchte ich mich an dieser Stelle für die in das leidige Korrekturlesen meiner Arbeit investierte Zeit bedanken.

Den gesamten Mitarbeitern des Forschungslabors von Prof. Dr. Harald Burkhardt (Dr. Nadine Schneider, Verena Dresing, Dr. Beate Böhm, Yuliya Fehrl, Tomasz Janczi) möchte ich für die wirklich gute Zeit, für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft im Labor und die (nicht immer) fachbezogenen Diskussionen danken. Es war ein sehr angenehmes und freundschaftliches Arbeitsklima.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern und meiner Schwester für die jahrelange Unterstützung und ihr Vertrauen in mich. Meinem Lebensgefährten danke ich besonders für sein Verständnis und seine Unterstützung auch in schwierigen Phasen meiner Doktorarbeit.

VI Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertation über die therapeutische Immunmodulation der Rheumatoiden Arthritis mittels rekombinanter MHC-II/Peptidkomplexe: Molekulare Mechanismen der Induktion regulatorischer T-Zellen selbstständig angefertigt und mich keiner anderen Hilfsmittel als der in ihr angegebenen bedient habe, dass alle Entlehnungen aus anderen Schriften mit Angabe der betreffenden Schrift gekennzeichnet sind.

Ich versichere, die Grundsätze der guten wissenschaftlichen Praxis beachtet, und nicht die Hilfe einer kommerziellen Promotionsvermittlung in Anspruch genommen zu haben.

Frankfurt am Main, den 18.12.2019

VII Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Sylvia Cienciala
Anschrift: Saalburgstr. 58, 61130 Nidderau
Geburtsdatum: 09. August 1989
Geburtsort: Frankfurt am Main
Staatsangehörigkeit: deutsch



Promotion

08/2015 – 12/2019 Promotionsarbeit am Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und Angewandte Oekologie IME, Institutsteil Translationale Medizin und Pharmakologie TMP unter der Leitung von Herrn Prof. Burkhardt
06/2015 – 07/2015 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Fraunhofer-Institut

Hochschulausbildung

10/2013 – 05/2015 Master in technischer Biologie an der technischen Universität in Darmstadt
Thema: Bestimmung regulatorischer Faktoren in germinativen Zonen im adulten Mäusehirn mit Hilfe der Laser-Mikrodissektion
10/2009 – 09/2013 Bachelor in Biologie an der technischen Universität in Darmstadt
Thema: Chemische Mimikry der Kohlenwasserstoffe in Wirt-Parasit-Interaktionen