

" Inhibierung Superantigen-induzierter T-Zellproliferation durch neue synthetische Peptide"

D I S S E R T A T I O N

der Fakultät für Biologie
der Eberhard Karls Universität Tübingen

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

vorgelegt von
Johannes Theodor Wessels
aus Meppen/ Ems
2002

Tag der mündlichen Prüfung: 06.03.2002

Dekan: Prof. Dr. H.-U. Schnitzler

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. D. Niethammer
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer.nat. H.-G. Rammensee

INHALTSVERZEICHNIS	3
1. VORWORT	5
2. EINLEITUNG	6
T-ZELLEN	6
SUPERANTIGENE	9
DER HAUPT-HISTOKOMPATIBILITÄTS-KOMPLEX (MHC)	10
HUMANE UND MAUS- MHC-KLASSE-II NOMENKLATUR	11
STRUKTUR DES HUMANEN UND MAUS-MHC-II	11
ANTIGENPROZESSIERUNG UND -PRÄSENTATION	13
ANTIGEN-PRÄSENTIERENDE ZELLEN (APC)	14
DIE INVARIANTE KETTE	15
DIE PEPTID- INTERAKTION MIT HLA-D MOLEKÜLEN	17
ZIELE DER ARBEIT – ARBEITSHYPOTHESE	18
3. MATERIAL & METHODEN	19
LÖSUNGEN	19
ANTIKÖRPER	20
TROCKENSUBSTANZEN	20
PLASTIKWAREN	21
GERÄTE	21
CHEMIKALIEN ZUR PEPTIDSYNTHESE	22
AUTOMATISIERTE FESTPHASENSYNTHESE VON PEPTIDEN	23
"MULTIPLE Abspaltung" VON MEHREREN PEPTIDEN	24
HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCROMATOGRAPHIE	25
GENERIERUNG MURINER DENDRITISCHER ZELLEN	25
AUFREINIGUNG MURINER CD4 ⁺ - T-ZELLEN	26
PROLIFERATIONSASSAYS	27
AUSWERTUNG MITTELS AUTOMATISIERTEM HARVESTER	28
2. DARSTELLUNG DER SYNTHETISIERTEN PEPTIDE	28
2.1 GLAT	28
2.2 P1-CLIP	28
2.3 P2-CLIP10	29
2.4 P3-CLIP15	29
2.5 P4-APE	30
2.6 P5- APE-20	30
2.7 P6- APE-S-T	31
2.8 P7-TCRBP	32
2.9 HEL	32
2.10 TGA	33
2.11 VERWENDETE VERSUCHSTIERE	33
2.12 SENSITIVIERUNG DER VERSUCHSMÄUSE MITTELS D-GALACTOSAMINE	34

4.	ERGEBNISSE	36
4.1	FACS-ANALYSE DER REINHEIT DER MURINEN T-ZELLEN NACH MACS	36
4.2	FACS-ANALYSE DER MHC-KLASSE-II PRÄSENTATION AUF MURINEN APC NACH GENERIERUNG	38
4.3	TITRATION DER VERWENDETEN PEPTIDE IM ³ H-THYMIDIN-PROLIFERATIONSASSAY	39
4.4	TITRATIONSASSAY (SEA) ZUR ERMITTLUNG DES OPTIMALEN ZELLZAHL-VERHÄLTNIS VON APC ZU CD4	46
4.5	SCHUTZ VOR SUPERANTIGEN-SCHOCK DURCH APPLIKATION DER PEPTIDE	47
4.6	ZUSAMMENFASSENDE VERGLEICH DER IN VIVO EINGESETZTEN PEPTIDE	52
4.8	DIE SOFTWARE EPIPREDICT – EINE KURZE EINFÜHRUNG	57
5.	DISKUSSION	64
5.1	MOLEKULARE WECHSELWIRKUNGEN VON SUPERANTIGENEN	64
5.1.2	SUPERANTIGEN UND DIE BINDUNG AN MHC-KLASSE-II- MOLEKÜLE	64
5.1.3	SUPERANTIGEN UND DIE BINDUNG AN DEN T-ZELL-REZEPTOR	65
5.1.3	SUPERANTIGENE UND DIE INTERAKTION ZWISCHEN MHC-KLASSE-II UND TCR	66
5.1.4	SUPERANTIGENE UND DIE BEDEUTUNG KOSTIMULATORISCHER MOLEKÜLE.	66
5.2	KLINISCHE ANWENDUNG VON PEPTIDEN ALS PHARMAKOLOGISCH WIRKSAME SUBSTANZEN.	69
5.3	SYNTHESE VON PEPTIDEN MIT EINER LÄNGE VON >35 AS; PROBLEME MIT DER REINHEIT ?	71
5.4	BINDUNG DER UNTERSCHIEDLICHEN PEPTIDE AN DAS DEFINIERTE MHC-KLASSE-II.	72
5.5	DOSIS UND WIRKUNG; SIND DIE PEPTIDE IM HUMANEN SYSTEM EINZUSETZEN?	74
5.6	CLIP, EIN STABILISATOR DES TRIMOLEKULAREN KOMPLEXES MIT SUPERANTIGENEN?	74
5.7	VORTEILE UND NACHTEILE DER NEUEN INTERNETSOFTWARE EPIPREDICT	75
6.	EPIPREDICT QUELLCODE	77
7.	LITERATURVERZEICHNIS	94
8.	ZUSAMMENFASSUNG	104
9.	DANKSAGUNG	105
10.	LEBENS LAUF	107

1. Vorwort

Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuer definierter Peptide mit der Funktion *in vitro* und *in vivo* (Mausmodell) Superantigen-induzierte T-Zellproliferation zu inhibieren oder wenn möglich ganz zu unterbinden. Die Grundlage für diese Arbeit stellte dabei ein randomisiertes Peptid GLAT^{1,2} (Synonym COP-I), das in verschiedenen *in vivo* Experimenten in der Maus eine Graft versus Host-Erkrankung (GvHD), die zuvor induziert wurde, verhindern konnte. Miconnet et al. konnten in Mäusen zeigen³, dass endogene Superantigene, sogenannte MTV's (Mammary tumor virus encoded superantigens) über oligoklonale T-Zellstimulation zu einer ersten Welle der T-Zellaktivierung bei der chronischen GvHD führen. Erst in einer zweiten Welle der T-Zellstimulation zeigen sich die typischen Krankheitssymptome der GvHD.

Um die Wirkung verschiedener Peptide im Rahmen der Behandlung einer im Mausmodell induzierten GvHD zu testen, verglich ich in dieser Arbeit neu erstellte synthetische Peptide mit dem von Schlegel et al. beschriebenen GLAT^{1,2}. Dazu wurden die Peptide, sowie Kontrollen in einem Surrogatassay unter Zusatz von exogenen Superantigenen (Staphylococcus Enterotoxin A und B) getestet. Diese Superantigene ersetzen dabei quasi die für eine erste Welle der oligoklonalen T-Zellstimulation im Rahmen der im Mausmodell (B10.D2 – BALB/cj) der GvHD verantwortlich scheinenden endogenen Superantigene. Um die Wirkung dieser Peptide auf die Proliferation von T-Zellen nach Stimulation mit einem Superantigen zu belegen, wurden die Versuche zuerst in der Zellkultur durchgeführt. In weiteren Versuchen an der lebenden Maus wurde dann untersucht, ob die zuvor applizierten Peptide einen Schutz vor einer letalen Dosis Superantigen bieten können. Im Verlauf dieser Arbeit wird der Fokus deutlich auf die Interaktion zwischen Superantigenen, Peptiden, T-Zellen und Antigen-präsentierenden Zellen (APC) gelegt. Im Kontext der Arbeit mit Peptiden und der engen Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Dr. Fleckenstein, Organische Chemie, Universität Tübingen (Sonderforschungsbereich 510 der Universität Tübingen) entstand eine neue Software zur Vorhersage von MHC-Klasse-II Liganden und T-Zellepitopen. Diese Internetsoftware, die von mir im Rahmen dieser Arbeit erstellt wurde, soll eingehend vorgestellt werden.

2. Einleitung

T-Zellen

Neben der ersten Hauptgruppe der Lymphozyten aus B-Lymphozyten stellen die T-Lymphozyten eine weitere zweite Hauptklasse immunologisch kompetenter Zellen dar. Reife T-Zellen entstehen im wesentlichen in einem Prozess aus drei Schritten. In einem ersten Schritt der Migration und Proliferation wandern die T-Zell-Vorläufer, die aus dem Knochenmark (sowie aus der fetalen Leber) stammen, in den aus 3. Kiementasche entwickelten Thymus ein und erfahren dort v.a. durch Zell-Zell-Kontakt mit Thymusepithelzellen und von diesen sezernierten Hormonen die Ausreifung in T-Zellen. Bereits im Knochenmark und der fetalen Leber findet Rearrangement des T-Zell-Rezeptors (TCR) mit Veränderungen der genetischen Information für die Gamma-Kette statt. Diese Zelle wandert in den Thymus ein ($CD2^+CD7^+$). Im Thymus findet in frühen Thymozyten die Transkription der γ -Kette und das Rearrangement der β -Kette des TCR statt ($CD4^-CD8^-$). In einem zweiten Reifungsschritt auf dem Weg zum reifen T-Lymphozyt kommt es während der thymischen Reifung zur Expression einer Reihe akzessorischer Moleküle, von denen einige, wie CD4 und CD8 eine wichtige Rolle bei der Antigenerkennung und der T-Zell-Aktivierung spielen. Ebenfalls in diesem Reifungsschritt erfährt der TCR die Ausbildung der β - und anschließend der α -Kette, die jetzt an der Zelloberfläche exprimiert werden. Erstmals erscheint in diesem Stadium der CD3- Antigenrezeptorkomplex auf der Oberfläche der allgemeinen Thymozyten. Im folgenden geht das Oberflächenantigen CD1 verloren und zwei differente Subpopulationen der Thymozyten entstehen durch Prägung im Thymus. T-Zellen, die nach diesem Schritt den Thymus verlassen sind positiv für CD4 oder CD8, wobei die $CD4^+$ -T-Zellen die $T_{H(elfer)}$ -Subpopulation stellen, die $CD8^+$ -T-Zellen als zytotoxische $T_{(ytotoxisch)}$ -Zellen gelten. Ungefähr 98% der T-Zellen exprimieren dabei $TCR\alpha/\beta$ auf ihrer Oberfläche, der kleine verbleibende Prozentsatz trägt den $TCR\gamma/\delta$. In einem dritten Selektionsschritt wird im Thymus das reife Repertoire der

fremdantigenspezifischen, eigen-MHC-restringierten T-Zellen aus einem großen Satz von durch die Keimbahn kodierten möglichen Spezifitäten ausgelesen. Nachdem die verschiedenen Rezeptoren auf der Oberfläche der verschiedenen Klone von sich entwickelnden T-Zellen exprimiert sind, wird das Repertoire in diesem dritten Reifungsschritt durch zwei eng verzahnte Selektionsprozesse modifiziert. Dabei ist die positive Selektion der Vorgang durch den das T-Zell-Repertoire eigen-MHC-restringiert wird. Exprimiert ein Thymozyt einen bestimmten T-Zell-Rezeptor, so kann er dessen Spezifität nicht mehr verändern. Diese positive Selektion bewirkt ein selektives Überleben, sowie eine Vermehrung der Thymozyten mit eigen-MHC-restringierten TCR und führt somit dazu, daß die Thymozyten, deren TCR nicht eigen-MHC restringiert sind, absterben. In einem zweiten Selektionsvorgang, der negativen Selektion, werden potentiell autoreaktive Klone eliminiert oder inaktiviert. Dieser Schritt stellt sicher, daß die reifen T-Zellen eigentolerant sind. Autoimmunerkrankungen haben ihre Ursache in Defekten dieser Eigentoleranz-Entstehung während der negativen Selektion.

Reife T-Zellen verlassen den Thymus und erfahren ersten Antigenkontakt z.B. in den Lymphknoten. Bis zu diesem ersten Kontakt tragen die T-Zellen den Oberflächenrezeptor CD45RA. Nach dem Kontakt mit einem Antigen erfolgt der Wechsel von CD45RA zu CD45RO, einer zelloberflächenverbundenen Phosphatase und die Expression von CD29, einem Fibronectinrezeptor, der für das Anheften der T-Zellen und die weitere Bewegung im Gewebe verantwortlich ist.

T-Zellen besitzen als reife T-Zellen also einen membranständigen TCR, der hochspezifisch körperfremde MHC-Moleküle bzw. bestimmte Aminosäurereste eines Peptids in Verbindung mit einem definierten, körpereigenen MHC-Allel erkennt. Dieses Phänomen der bedingten Erkennung prozessierter Peptidantigene nur in Assoziation mit eigenen MHC-Molekülen bezeichnet man als MHC-Restriktion^{5;6}. Der TCR ist ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette (MW je 40-50 kDa), die über Disulfidbindungen miteinander verknüpft sind. Dieses Heterodimer ist in nicht-kovalenter Weise mit fünf weiteren, nicht

variablen Molekülen des CD3-Komplexes assoziiert ⁷. Die Diversität des T-Zell-Rezeptors beruht auf den gleichen Mechanismen, die auch für die Entstehung der Antikörper-Vielfalt verantwortlich sind ⁸, jedoch finden sich keine somatischen Hypermutationen in den variablen Regionen. Die enorme Vielfalt von bis zu 10^{15} Spezifitäten ⁹ entsteht somit zum einen durch somatische Rekombination von V-, D-, J- und C-Segmenten aus der Keimbahn und zum anderen durch die Ungenauigkeit der Verknüpfung bei der Rekombination, was seinen Grund in Leserasterverschiebungen oder dem Entfernen bzw. Hinzufügen von Nukleotiden hat ⁷.

T-Zellen mit einem $\alpha\beta$ -TCR lassen sich grob in zwei Gruppen einteilen: die eine Klasse besitzt neben dem TCR ein als CD4 bezeichnetes, membranständiges Glykoprotein, und die Antigenerkennung erfolgt nur im Kontext mit MHC-Klasse-II-Molekülen. Zu dieser Klasse gehören im wesentlichen die T_{Helfer}-Zellen, die u.a. bei der Aktivierung von B-Zellen von Bedeutung sind. Die zweite Gruppe von T-Zellen trägt auf ihrer Oberfläche das sog. CD8-Glykoprotein und diese T-Zellen zeigen sämtlich eine MHC-Klasse I-Restriktion ¹⁰. Es handelt sich im allgemeinen um cytotoxische T-Zellen, die v.a. an der Eliminierung virusinfizierter Zellen und entarteter körpereigener Zellen beteiligt sind. Sowohl

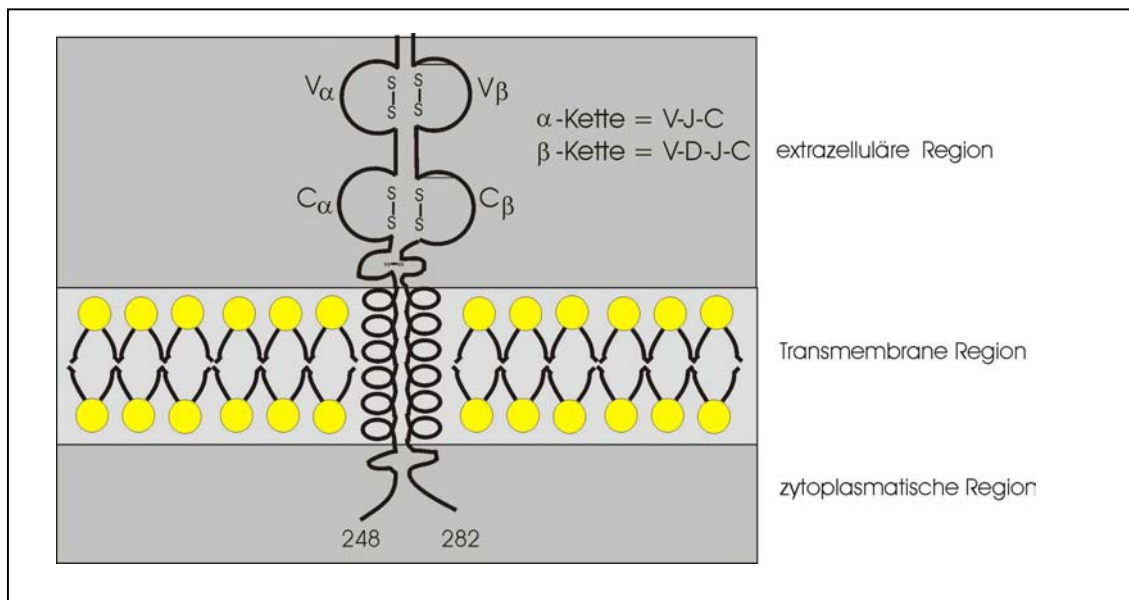


Abb.1: schematischer Aufbau des humanen $\alpha\beta$ -T-Zellrezeptors (hTCR).

CD4, als auch CD8 stabilisieren dabei den jeweiligen trimeren MHC-Peptid-TCR-Komplex ¹¹. Die Einteilung CD4⁺ T_{Helfer}-Zellen bzw. CD8⁺ cytotoxische T-Zellen gilt nicht streng, da auch CD4⁺ cytotoxische T- und CD8⁺ T-Helfer-Zellen identifiziert wurden ¹².

Superantigene

Im Jahr 1973 berichtet Festenstein erstmalig über Antigene mit stark stimulierendem Effekt auf Lymphozyten, die von ihm als „Minor Lymphocyte-stimulating“ – Antigene bezeichnet wurden. Der Begriff Superantigen wurde erst später eingeführt um eine Gruppe von mikrobiellen Antigenen zu beschreiben, die sich in multiplen Beziehungen von konventionellen Antigenen unterscheiden ¹³. Zum einen erfolgt die Erkennung der Superantigene durch den T-Zellrezeptor fast ausschließlich mit Hilfe der variablen Region der TCR β -Kette ($V\beta$). Während bei „normalen“ Antigenen die Spezifität der Reaktion mit einer T-Zelle von allen variablen Genen des T-Zellrezeptors bestimmt wird, ist bei Superantigenen diese Spezifität nur vom $V\beta$ -Anteil abhängig. Aufgrund der ca. 70 differenten $V\beta$ -Gene kann ein Superantigen mit einem sehr viel größeren Anteil des T-Zellrezeptors in Wechselwirkung treten als konventionelle Antigene (ca. 1 von 100.000). Verschiedene Forschergruppen konnten allerdings zeigen, daß wiederholte Injektionen von Superantigenen in vivo zu einer „non response“, einer Anergie der reagierenden Lymphozyten führen. Peptidantigene sowie Superantigene werden mit Hilfe des MHC-Klasse-II Moleküls den T-Zellen präsentiert. Superantigene werden jedoch nicht von antigenpräsentierenden Zellen phagozytiert und prozessiert, um dann in der antigenpräsentierenden Grube des MHC-Klasse-II Moleküls präsentiert zu werden, sondern binden vielmehr als komplettes Protein außerhalb der peptidbindenden Grube.

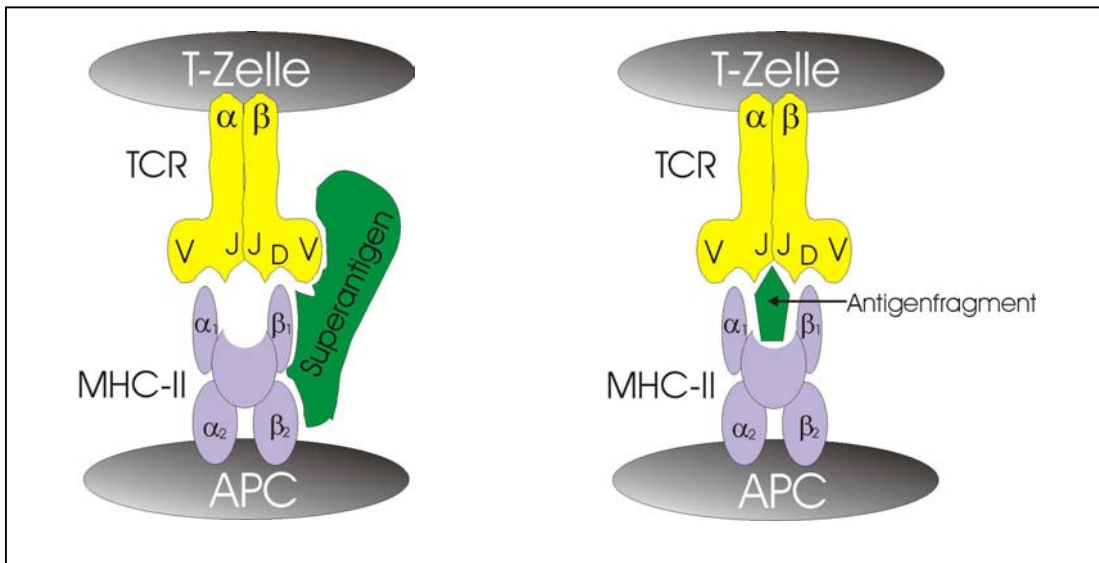


Abb.2: MHC-Klasse-II abhängige Präsentation eines Superantigenes im Vergleich zu einem konventionellen Antigen, das innerhalb der MHC-Klasse-II Grube präsentiert wird.

Der Haupt-Histokompatibilitäts-Komplex (MHC)

Durch Tierexperimente im Rahmen von Transplantationsversuchen wurde bereits 1914 von Little et al. festgestellt, daß bei genetisch differenten Tieren Transplantate abgestoßen wurden. Die Gene, die für diese Abstoßung verantwortlich zeichnen wurden daher als Haupthistokompatibilitätsantigene (MHC) bezeichnet. Nach der Entdeckung des H2-Systems der Maus im Jahre 1936 wurden in den 50er Jahren die homologen Strukturen im Mensch entdeckt und als HLA-Komplex (Human Leucocyte Antigen) bezeichnet. Während diese genomischen Loci, die als System funktionieren, beim Menschen auf Chromosom 6 (kurzer Arm) liegen, findet man sie in der Maus auf dem Chromosom 17. Sowohl das menschliche, als auch das Maus-MHC-System zeichnet sich durch einen extremen Polymorphismus aus.

Humane und Maus- MHC-Klasse-II Nomenklatur

In dieser Arbeit werden die Nomenklaturrichtlinien des WHO Nomenklatur-Komitees für das MHC-System des Menschen (HLA, human leukocyte antigen) verwendet und daher kurz erläutert:

HLA-Allele an den individuellen Loci werden mit vier Ziffern benannt, die nach einem Stern der Locusbezeichnung folgen. Die ersten beiden Stellen bezeichnen den jeweiligen "Typ" (allelische Gruppe), die letzten beiden Stellen einen "Subtyp". Als Beispiel sei angeführt:

HLA-A2.1 (frühere Bezeichnung) -HLA-A*0201 (neue Bezeichnung)

HLA-DR4 (frühere Bezeichnung) -HLA-DRB1*0401 (neue Bezeichnung)

Allelnamen basieren zunächst auf Aminosäuresequenzen. Im murinen System wird das HLA durch H2 ersetzt. Des weiteren stehen der nächste verwendete Buchstabe A, E, K oder D für MHC-Klassen. Es gelten dabei die Buchstaben A und E bezeichnen Maus-MHC-Klasse-II, wobei A dem humanen DQ, E dem humanen DR analog ist. Folgen dem H2 ein K oder D steht dieses für Maus MHC-Klasse I. Ein kleiner hochgestellter Buchstabe gibt das Allel an. So steht zum Beispiel H2-A^d für murines MHC-Klasse-II (analog humanem HLA-DQ) mit dem D-Allel. H2-E^d ist analog zu humanem HLA-DR.

Struktur des humanen und Maus-MHC-II

Anders als bei MHC Klasse-I- Antigenen, hier gehen die schweren Ketten mit der gleichen leichten Kette (β 2-Mikroglobulin) eine Verbindung ein, gibt es bei den Klasse-II Antigenen unterschiedliche Genorte die für die α - und β -Ketten kodieren. HLA-Klasse II-Moleküle bestehen aus einer α - (31-34 kD) und einer β -Kette (26-29 kD). Die Struktur der Ketten ist jeweils aus zwei extrazellulären Domänen (α_1 , α_2 bzw. β_1 , β_2), einer Transmembranregion und einem kurzen cytosolischen Abschnitt aufgebaut. HLA-Klasse II-Moleküle werden, im Gegensatz zu MHC-Klasse I, nur auf wenigen Zelltypen exprimiert. Zu diesen Zellen gehören z.B. B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, andere

Antigen-präsentierende Zellen und Thymus-Epithelzellen ⁷. Die Röntgenstrukturen der Klasse II-Moleküle sind neben denen von Klasse I-Molekülen bekannt (Brown et al., 1993; Gosh et al., 1995; Stern et al., 1994) und zeigen große Ähnlichkeit mit der der Klasse I-Moleküle, wobei sich die Peptidbindungstasche aus den α_1 - und β_1 -Domänen konstituiert. Die DR β -Aminosäuresequenzen sind mit Ausnahme bestimmter polymorpher Reste zum größten Teil konserviert, so daß daraus geschlossen werden kann, daß die Raumstruktur verschiedener HLA-DR-Allotypen derjenigen von HLA-DR1 sehr ähnlich ist. Im Gegensatz zur geschlossenen Peptidbindungstasche der Klasse-I Moleküle ist die Bindungsgrube der Klasse-II MHC Moleküle jedoch weitestgehend „offen“.

Antigenprozessierung und -präsentation

Zur funktionellen Integrität des Immunsystems ist die kontrollierte proteolytische Bearbeitung (Prozessierung) von Peptidantigenen und deren anschließende Präsentation auf MHC-Molekülen von grundsätzlicher Bedeutung. Es wird dabei nach der Herkunft der Pathogene unterschieden: Pathogene Erreger, die ins Cytosol gelangen, wie z.B. von Viren und einige Bakterien, die daraus stammenden Proteine werden dort durch Proteasomen prozessiert ^{7;14-16} und die Peptide werden über die Peptid-Transportproteine TAP1 und TAP2 ins endoplasmatische Retikulum transportiert ^{16;17}. Nach dort erfolgter Bindung an MHC-Klasse I-Moleküle werden sie zur Erkennung durch cytotoxische CD8⁺ T-Zellen an der Zelloberfläche präsentiert. Intrazelluläre Pathogene, die in vesikuläre Kompartimente eindringen, sowie extrazelluläre Pathogene und Toxine werden hingegen in Vesikeln prozessiert und zur Präsentation an CD4⁺ T-Zellen auf MHC-Klasse-II-Moleküle geladen. Auch Fragmente körpereigener Proteine können, wahrscheinlich über Autophagosomen, auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert werden ¹⁸. Letztere bilden den größten Anteil aller identifizierter HLA-DR-assoziiierter Peptide aus EBV-transformierten B-Zellen ¹⁹. Im folgenden wird nur auf die MHC-Klasse-II-restringierte Antigenprozessierung eingegangen, da diese für die vorliegende Arbeit von Bedeutung ist.

Antigen-präsentierende Zellen (APC)

Antigen-präsentierende Zellen sind in der Lage, Antigen zu internalisieren, zu prozessieren und MHC-Klasse-II-assoziierte Peptidantigene zu präsentieren²⁰. Verschiedene APC besitzen unterschiedliche Proteasen bzw. differierende Protease-Verteilungsmuster in ihren intrazellulären Kompartimenten. Daher kann die Antigen-Präsentation auf verschiedenen Zelltypen auch zur Aktivierung unterschiedlicher T-Zell-Populationen führen²¹. Neben den klassischen B-Zellen und Makrophagen²² können z.B. auch dendritische Zellen wie die Langerhans-Zellen der Haut^{23;23;24}, vaskuläre Endothelzellen²⁵ und Mikrogliazellen^{26;27} als APC fungieren. Die Antigen-Aufnahme erfolgt dabei über Rezeptor-vermittelte Endozytose (B-Zellen, Makrophagen), Pinozytose (alle Zellen) oder Phagozytose (Makrophagen). Peptidantigene können außerdem über die Bindung an MHC-Klasse-II-Moleküle internalisiert werden^{28;29} und so an einem postulierten MHC-Recycling durch frühe endosomale Kompartimente teilnehmen. Neben der Internalisierungsrate spielen v.a. die Prozessierungseffizienz und die Dichte der MHC-Moleküle auf der Zelloberfläche^{30;31;31} für die Antigen-Präsentation entscheidende Rollen. Dendritische Zellen besitzen z.B. eine im Vergleich zu spezifischen B-Zellen und Makrophagen niedrige Internalisierungs- und Prozessierungseffizienz. Trotz dieser niedrigen Effizienz in Internalisierung und Prozessierung präsentieren dendritische Zellen den T-Zellen aber die Antigene aufgrund ihrer hohen Dichte an MHC-Klasse-II-Molekülen sehr effizient³¹.

Die invariante Kette

Neu synthetisierte MHC-Klasse-II Produkte werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) an eine dritte, nicht polymorphe und nicht vom MHC kodierte Kette angelagert. Dieses Peptid trägt historisch bedingt den Namen Invariante Kette (Ii), da es in einem zweidimensionalen Gel aufgrund seines Nicht-Polymorphismus „invariant“ zwischen verschiedenen Individuen oder murinen Inzuchtstämmen wanderte. Bei der Ii handelt es sich um ein ca. 30 kD großes Typ II Transmembranglykoprotein mit der Besonderheit, dass der Aminoterminus intrazytoplasmatisch liegt. Die invariante Kette liegt in verschiedenen Formen vor, die in der Maus durch alternatives Splicing, im Menschen durch alternatives Splicing und alternative Translation entstehen. Im menschlichen Organismus gibt es vier verschiedene Formen, die sich hinsichtlich ihres Molekulargewichtes unterscheiden: p33, p35, p41 und p43^{32,33}. Bei der nativen Invarianten Kette handelt es sich um einen Homotrimer. Jede Untereinheit bindet im MHC-Prozessierungsweg an ein neu synthetisiertes Klasse-II $\alpha\beta$ - Heterodimer. Es bildet sich somit ein Neuner-Polypeptid-Kettenkomplex. Dieser Komplex ist transportfähig³⁴. Im nächsten Schritt wird in einem sauren Kompartiment außerhalb des Golgi-Apparates die Ii durch proteolytische Aktivität entfernt³⁵. Hierdurch wird die Peptidbindungsstelle freigelegt. Die Invariante Kette (Ii) besitzt im wesentlichen vier wichtige Funktionen:

- Die Verhinderung einer vorzeitigen Peptidbeladung in Präendosomalen Kompartimenten³⁶. Durch die 1995 von Gosh et al. veröffentlichten Daten der Röntgenstruktur des HLA-DR3-*CLIP*-Komplexes, konnte nachgewiesen werden, dass ein bestimmter Abschnitt der invarianten Kette, die sogenannte CLIP-Region, in der Peptidbindungstasche von HLA-DR3 bindet und so kompetitiv die verfrühte Bindung von endogenen Peptiden verhindert.
- Chaperon-Funktion, die das Zusammenfügen und den weiteren Transport neu synthetisierter MHC-Klasse-II α und β -Ketten fördert.

- Targeting- und Retentionssignale für den endozytotischen Weg ³⁵
- Einen Cathepsin L- Inhibitor, (Cathepsin L ist einer der häufigsten und potentesten endosomalen Cysteinproteasen) als Schutzmechanismus gegenüber vorzeitiger Degradierung der invarianten Kette.
Untersuchungen konnten zeigen, dass die Thyreoglobulin-Domäne als ein sehr starker kompetitiver Inhibitor von Cathepsin L wirkt ³⁷

In Versuchen mit Mäusen konnte ferner gezeigt werden, dass die Zerstörung des Genes für die Ii durch homologe Rekombination in einer verminderten MHC-Klasse-II Oberflächenexpression, in ineffizientem Verlassen des endozytotischen Weges der MHC-Klasse-II-Moleküle, sowie in stark verminderter bis fehlender Antigen-Präsentation der meisten Antigene resultiert ³⁸.

Die Peptid- Interaktion mit HLA-D Molekülen

MHC-Klasse I und II Moleküle können eine Vielzahl von unterschiedlichen Peptiden binden und präsentieren³⁹⁻⁴². Um effektiv zu binden und präsentiert werden zu können müssen jedoch bestimmte Voraussetzungen gegeben sein. MHC-Klasse I Liganden zeigen häufig eine Länge von 9 Aminosäuren (AS)^{43;44}. Diese Peptide binden, so Madden et al. 1992⁴⁵ mit einer einheitlichen Orientierung in der Bindungstasche des MHC-Klasse I. Diese einheitliche Orientierung kommt zustande, da die sogenannten Bindungstaschen A und F sehr wesentlich an der Bindung beteiligt sind. Da die MHC-Klasse I Bindungstasche im starken Gegensatz zu MHC-Klasse-II, an Ihren Enden begrenzt ist, wölben sich Peptide mit mehr als 9 AS in der Mitte aus der Grube heraus, da nur noch die Enden die Peptidbindung vermitteln. Eine allelspezifische Bindung von Peptiden mit 9 AS kann nach Falk et al., 1991⁴⁴ dann erfolgen, wenn bestimmte Anker vor allem in Position 2 im Peptid (Tasche B), Position 5 im Peptid (Tasche C) und Position 8 oder 9 (Tasche F) greifen. Die allelspezifischen Ankerreste konnten gut über das Poolsequenzierungsverfahren von Falk et al. 1991 sowie von Stevanovic und Jung, 1993⁴⁶ definiert werden. Im Kontrast zu den MHC-Klasse I-Molekülen ist die Peptidbindungstasche der MHC-Klasse-II-Moleküle offen. Dies lässt ein Überhängen der Peptide, sowohl in C- als auch in N-terminaler Richtung über die eigentliche Bindungstasche hinaus zu. Aus diesem Grund meistern MHC-Klasse-II-Moleküle die Bindung auch deutlich längerer Peptide, die sehr große Längendifferenzen aufweisen können^{40, 44, 47}. Bestimmte Selbstpeptide wie CLIP oder MHC-Klasse I-Sequenzen, konnten von verschiedenen HLA-DR und auch DQ-Allelen identifiziert werden^{19, 44}. Ein degeneriertes Bindungsverhalten dieser Epitope wird vermutlich durch die konservierte Struktur der HLA-DR Bindungsgrube, sowie durch das Fehlen störender Reste in den entsprechenden Sequenzpositionen ermöglicht.

Ziele der Arbeit – Arbeitshypothese

In dieser Arbeit sollen Peptide definiert und synthetisiert werden, die entweder über eine starke Bindung zu Maus-MHC-Klasse-II eine Bindung von Superantigenen an MHC unterbinden oder über Ihre Länge außerhalb der MHC-Klasse-II- Bindungsgrube eine Bindung des Superantigenes verhindern. Eine dritte Gruppe von Peptiden soll das von Arad et al. beschriebene T-Zellrezeptor bindende Motiv enthalten und damit eine mögliche Bindung des Superantigenes an den T-Zell-Rezeptor über den Mechanismus der kompetitiven Verdrängung verhindern.

Die bindenden Sequenzen der Peptide sollen anhand von Datenbankvorhersagen (SYFPEITHI und EPIPREDICT) bestimmt werden. In einem weiteren Schritt sollen diese Peptide dann über Festphasen-peptidsynthese synthetisiert und gereinigt werden, um dann in in vitro und in vivo Studien mit Superantigenen getestet zu werden.

Ziel dieser Arbeit ist es Peptide zu synthetisieren, die in der Lage sind Superantigen-induzierte T-Zellproliferation, sowohl in vitro als auch in vivo zu inhibieren. Zudem soll mit EPIPREDICT eine Software erstellt werden, die es via Internetzugriff ermöglicht, Liganden und MHC-Klasse II restringierte T-Zellepitope vorherzusagen, wenn eine beliebige Aminosäuresequenz im Ein-Buchstaben-Code eingegeben wird.

3. Material & Methoden

Lösungen

RPMI160 (Medium 1x)	VLE, w 2.0 g/L NaHCO ₃	
	500 ml	
	#F1415	Biochrom KG, Berlin
Hepes Puffer 1M	50 ml	
	#L1613	Biochrom KG, Berlin
EDTA-Puffer	0,25 Mol/L, pH 8.0	
	250 ml; Enthält pro 500 ml 46,53 g Titriplex III und NaOH zum Einstellen des pH auf 8.0	Apotheke der Uniklinik Tübingen
PBS	"spezial"	
	500 ml	
	#041-90834	GibcoBrl
BSA	Bovine Albumin Fraction V	
	Solution 7,5% ; 100 ml	
	#15260-037	GibcoBrl
FCS	Fetal calf serum	
	Tested for mycoplasma	
	500 ml	
	#S 0115	Seromed
L-Glutamin	200 mM	
	50ml	
	#K0282	Biochrom KG, Berlin
Penicillin/ Streptomycin	10000 U/ 10000 µg/ml	
	100 ml	
	#A2213	Biochrom KG, Berlin
Ampuwa	500 ml	Fresenius, Bad Homburg

Antikörper

α-Maus CD4	Klon GK1.5	
	FITC,	#09424D, Pharmingen,
α-Maus H2-A^d/ E^d	Klon 2G9	
	FITC	Pharmingen
	PE	#06545A, Pharmingen
α-Maus CD3, mol. Kompl.	Klon 17A2	
	PE	#06344D, Pharmingen
α-Maus CD3, ε-Kette	Klon 145-2	
	PE	#01085A, Pharmingen
Iso-Kontr., rat IgG_{2b}, kappa	FITC	#11184C, Pharmingen
Iso-Kontr., rat IgG_{2b}, kappa	PE	#11185A, Pharmingen
Iso-Kontr., rat IgG_{2a}, kappa	FITC	#IC-006F, R&D Systems
α-Maus CD11c	Klon HL3	
	PE	#097058, Pharmingen

Trockensubstanzen

SEA	Staphyl. Enterot. A	
	0,1 mg	
	#S-9399	Sigma, Deutschland
SEB	Staphyl. Enterot. B	
	1 mg	
	#S-4881	Sigma, Deutschland
GLAT		
GLAT-AMCA		Eigensynthese
P1-CLIP		Eigensynthese
P2-CLIP10		Eigensynthese
P3-CLIP15		Eigensynthese
P4-APE		Eigensynthese
P5-APE-20		Eigensynthese
P6-APE-S-T		Eigensynthese
P7-T		Eigensynthese
HEL		Sigma
TGA		Sigma

Plastikwaren

Falcon Tubes	15 ml PP-Röhrchen, steril	
	#188.271	Greiner
96-Napf-Rundbodenplatten	U-Form, Cellstar®	
	#650180	Greiner
Zellkulturflaschen	162 cm ² ,	
	Costar®, Standart Cap	
	#3150	Costar, Cambridge, MA / USA
Zellschaber	25 cm, 1.8 cm Klinge	
	#3010	Costar, Cambridge, MA / USA
Falcon Tubes	15 ml PP-Röhrchen, steril	
	#188.271	Greiner

Geräte

MicroBeta	Auswertesystem	
	#188.271	Greiner
TomTec	Harvester	
Olympus IX-40	Zellkulturmikroskop, invers	OLYMPUS Optical GmbH
Olympus BX-60	Fluoreszenz-Routinemikroskop	OLYMPUS Optical GmbH
Standzentrifuge	Rotaxa	Hettich
Cytospin-Zentrifuge		Shandon
FACS-Calibur	Fluoreszenz-aktivierter Zellsortierer, 3 Lasersystem	BD, Heidelberg

Chemikalien zur Peptidsynthese

Die verwendeten Lösungsmittel wurden in *p.a.* Qualität von den Firmen Fluka (Neu-Ulm) und Merck (Darmstadt) bezogen. Für HPLC-Trennungen wurden Acetonitril und Methanol der Reinheit LiChrosolv (Merck, Darmstadt), Trifluoressigsäure zur UV-Spektroskopie (Fluka, Neu-Ulm) und Wasser aus einer Millipore-Filtrationsanlage (MilliRo, Millipore, Eschborn) verwendet.

Die N-Fmoc-Aminosäurederivate mit Seitenkettenschutzgruppen Asp(OtBu), Glu(OtBu), Gln(Trt), Asn(Trt), Cys(Trt), His(Trt), Ser(tBu), Thr(tBu), Tyr(tBu), Arg(Pmc), Trp(Boc), Lys(Boc) wurden von den Firmen Novabiochem (Bad Soden), Senn (Dielsdorf, Schweiz), Orpegen (Heidelberg) und Millipore (Eschborn) bezogen. 2-Chlortritylchlorid-1%-divinylbenzol-polystyrol-Harz stammt von Novabiochem (Bad Soden) und Alexis (Grünberg). Biotin, 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt), Diisopropylethylamin (DIEA), Thioanisol, p-Thiokresol, Phenol, Ethandithiol (EDT), Trifluoressigsäure (TFA), Diisopropylcarbodiimid (DIC), HCl und Eisessig (alle *purum*) wurden von Fluka (Neu-Ulm) bezogen. Piperidin (zur Synthese) und Acetanhydrid (zur Analyse) stammten von Merck (Darmstadt). Benzotriazol-1-yl-oxy-tetramethyluroniumtetrafluorborat (TBTU) wurde von Alexis (Grünberg) erworben, Azabenzotriazol-1-yl-oxy-tetramethyluroniumtetrafluorborat (HATU) und 1-Hydroxy-azabenzotriazol (HOAt) wurden von Millipore (Eschborn) bezogen.

Mikrotiter-Platten stammten von der Fa. NUNC, Streptavidin von der Fa. Mediagnost (Tübingen), BSA und Saccharose von Sigma-Aldrich, KLH von Boehringer. Die Herkunft anderer Chemikalien und Geräte ist jeweils im Text angegeben.

Automatisierte Festphasensynthese von Peptiden

Zur multiplen Peptidsynthese wurde ein vollautomatisiertes System (SYRO, MultiSynTech, Bochum) eingesetzt. Die Synthesen wurden als "Mikro-" (bis zu 10 mg Harz, $\sim 5 \mu\text{mol}$) oder "Makrosynthesen" ($\sim 30 \text{ mg Harz}$, $\sim 15 \mu\text{mol}$) durchgeführt, wobei i.d.R. Rink-Amid-MBHA-Harz, mit Fmoc-Aminosäuren beladene Wang-Harze, die dargestellten Biotin-Harze oder das heterobifunktionelle Harz (Fleckenstein et al., 1994) Verwendung fanden. Als Synthesegefäße wurden Pipettenspitzen mit Filterfritten verwendet (Eppendorf, Hamburg), die in drei Syntheseblöcken ("96-Napf-Rundbodenplatten"-Format) mit Vakuum- und Absaugvorrichtungen angeordnet waren, so daß parallel $3 \times 96 = 288$ verschiedene Peptide synthetisiert werden konnten. Die benötigten N-Fmoc-geschützten Aminosäuren wurden in separate Gefäße eingewogen und mit einer HOBt-Lösung (0.6 M in DMF) gelöst. Die Kupplung der Fmoc-Aminosäuren (200 μl ; Mengen im folgenden für die "Makrosynthese") an das Harz erfolgte in 8-fachem Überschuß nach *in situ* Aktivierung mit DIC, welches als 1.5 M Lösung in DMF/DCM (1:2, 80 μl) ebenfalls im 8-fachen Überschuß zugegeben wurde. Die Kupplungszeiten betragen 50 min. Es wurde 3 x mit DMF gewaschen, die Fmoc-Gruppe durch Zugabe von Piperidin/DMF (1:1, 250 μl) abgespalten und erneut 7 x gewaschen. Das Waschen der Peptidpolymere erfolgte durch wiederholte Zugabe von DMF (500 μl) mittels eines 4-fach Arms und Absaugen der überstehenden Lösung. Zwischen DMF-Zugabe und Absaugen war eine einminütige Absetzzeit programmiert. Nach beendeter Synthese wurden die Peptidpolymere durch wiederholtes Zupipettieren und Absaugen von MeOH und Diethylether gewaschen und getrocknet.

"Multiple Abspaltung" von mehreren Peptiden

Alle Peptidsynthesen wurde im Mikromaßstab mit kleinen Pipettenspitzen (200 µl, 5-10 mg Harz)) durchgeführt. Dazu wurde im Laufe dieser vorliegenden Arbeit folgende Methode nach Fleckenstein verwendet:

Die 96 Synthesegefäße mit getrocknetem Harz wurden auf eine weitere 96-Napf-Platte mit durchbohrten Löchern überführt. Durch kurzzeitiges Eintauchen (~ 1 s) der unten offenen Pipettenspitzen in ein Bad aus flüssigem 1-Octadecanol (60°C) wurden alle 96 Pipettenspitzen gleichzeitig verschlossen. Mit einer multiplen Pipette (Eppendorf) konnte die Abspaltlösung (TFA/Phenol/Ethandithiol/Thioanisol, 96:2:1:1(v/v), 120 µl) binnen Minuten auf alle 288 Harze verteilt werden. Die Platte wurde auf eine zweite 96-Napf-Platte gesetzt, die 96 PP-Gefäße (1.5 ml) enthält (Auffang-Platte). Durch Einwirkung der TFA, von der mit der Zeit Spuren den 1-Octadecanol-Pfropf erreichen, löst sich dieser (nach ca. 1 h) und die Abspaltlösung wird automatisch abfiltriert. Nach dieser Zeit ist die Abspaltung der Peptide vom Harz beendet und die Abspaltung von Seitenketten-Schutzgruppen setzt sich in den Auffanggefäßen fort. Nach 3.5 h wurde mit einem 8-fach Rechen Diethylether/n-Heptan (1:1, v/v, eiskalt) zugegeben und die gefällten Peptide abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einem zweiten 8-fach Rechen abgesaugt und die Peptide in der Folge 3 x gewaschen. Anschließend wurden die Peptide durch Zugabe von tert.-Butanol/Wasser (4:1, v/v) versetzt, im Ultraschall homogenisiert und in den 96-Napf-Platten lyophilisiert.

Da es sich bei allen Peptiden um Synthesen mit einer erwarteten Ausbeute von > 10 mg handelte, wurden die 96 Reaktionsgefäße einer Synthese-Platte auf zwei Platten mit je 48 Gefäßen verteilt. Dadurch konnte die Abspaltlösung in größeren Gefäßen (3.5 ml) aufgefangen werden. Dieses erwies sich bei den größeren Peptidmengen besonders hinsichtlich der Wascheffizienz nach der Präzipitation als vorteilhaft.

Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Hochdruckflüssigkeitschromatographie erfolgte als Umkehrphasenchromatographie (reversed-phase) an Nukleosil C-18-Säulen (5 μ , 2 oder 8 x 250 mm) (Grom, Ammerbuch) unter Einsatz eines HPLC-Systems von der Fa. Gynkotek (Germering) in der Abteilung Prof. Jung, Organische Chemie der Universität Tübingen. Trennungen im analytischen Maßstab wurden an einer Anlage, bestehend aus einer Niederdruckgradientenpumpe M480, einem Autoinjektor GINA160 und einem Photodiodenarraydetektor UVD-320, durchgeführt. Der präparative Teil der Anlage setzte sich aus zwei Hochdruckgradientenpumpen M480, einem manuellen Injektionssystem 7161 (Rheodyne, Cotati) und einem UV-Detektor SPD-6AV (Shimadzu, Kyoto) zusammen. Wässriges Laufmittel A war 0.1 % TFA in Wasser, hydrophobe Phase B war 0.1 % TFA in Acetonitril. Die Trennungen erfolgten mit einem Fluß von 0.3 ml/min (analytisch) bzw. 3 ml/min (semipräparativ).

Für analytische HPLC wurden Probenmengen von ca. 20 μ mol ($c = 1$ mg/ml) injiziert und mit einem linearen Gradienten bei RT chromatographiert:

Gradient A: 0 % B auf 50 % B in 60 min

Gradient B: 0 % B auf 100 % B in 45 min

Die Endkonzentrationen an B wurden jeweils 5 min isokratisch gehalten. Die Detektion erfolgte bei 214 nm oder mit dem Photodiodenarraydetektor über den gewählten Wellenlängenbereich.

Generierung muriner dendritischer Zellen

B10.D2- Mäusen (H2-A^d) wurden die Milzen, sowie das Knochenmark steril entnommen und in PBS (4°C) überführt. Durch ein steriles Metall-Zellsieb mit einer Maschenbreite von ca. 100 μ m wurden die Milzen dann steril in cRPMI1640 passiert. Das Knochenmark wurde mittels mehrfachem „flashen“ durch dünne Kanülen in cRPMI1640 suspendiert. Anschließend erfolgte eine erneute Passage über einen 40 μ m Nylonfilter. Die Zellsuspension wurde sofort in eine Zellkulturflasche überführt und für 3.5h bei 37°C und 5% CO₂ gelagert.

Im Anschluß konnte der Überstand verworfen werden und die adherenten Zellen wurden mit neuem Medium unter Zusatz von 5 ng rmGM-CSF und 5 ng rmTNF- α versetzt. Die Zellen wurden täglich auf den Ausdifferenzierungsgrad hin per Lichtmikroskop untersucht und nach 7 Tagen mittels Zellschaber und anschließendem 2x waschen für die Proliferationsassays vorbereitet.

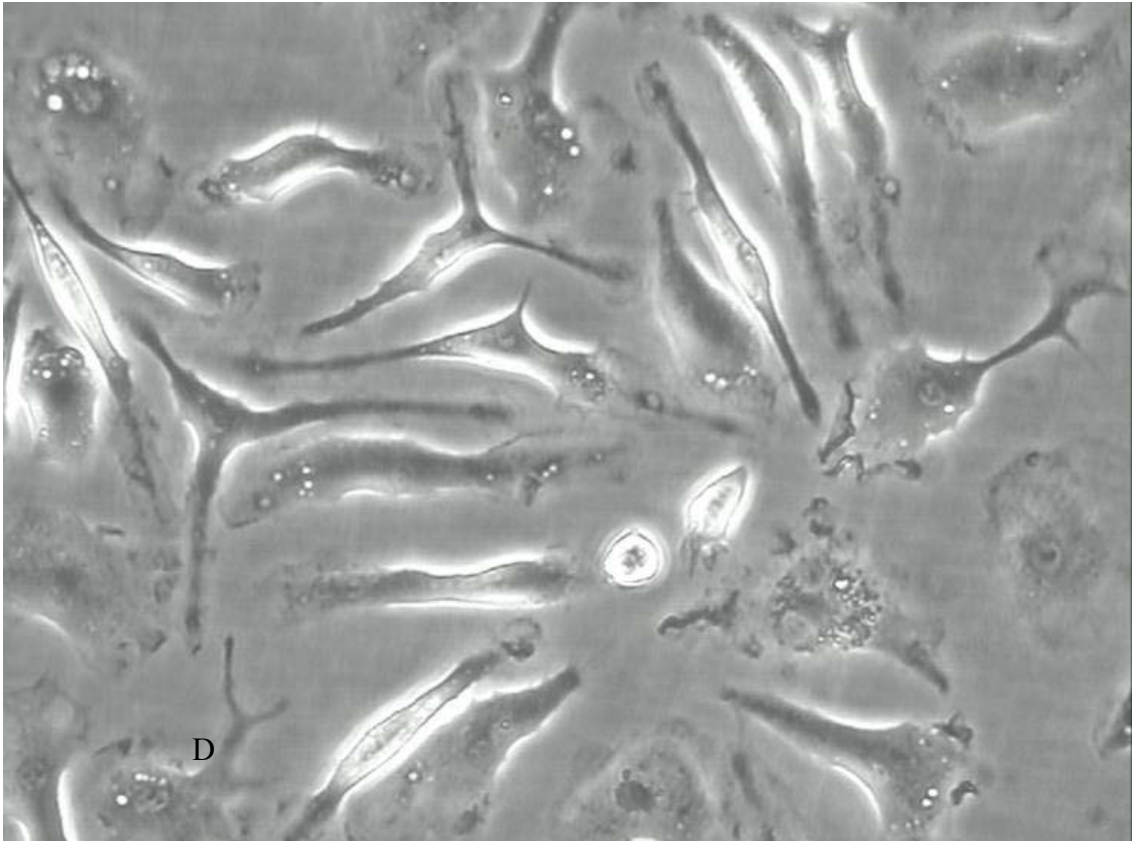


Abb.3: Lichtmikroskopische Aufnahme muriner dendritischer Zellen (D) nach sieben Tagen in Zellkultur (400x) unter Stimulation mit rmGM-CSF und rmTNF- α

Aufreinigung muriner CD4⁺ - T-Zellen

B10.D2- Mäusen (H2-A^d) wurden die Milzen steril entnommen und in PBS (4^oC) überführt. Durch ein Metall-Zellsieb mit einer Maschenbreite von ca. 100 μ m wurden die Milzen dann steril in cRPMI1640 passiert. Anschließend erfolgte eine erneute Passage über einen 40 μ m Nylonfilter. Die so gewonnene Milzzellsuspension wurde durch Lyse-Puffer von Erythrozyten befreit und anschließend konnte mittels Dichtegradientenzentrifugation (Percoll, $\delta=1,077$) die lymphoiden Zellen separiert werden. Um Zellklumpen zu vermeiden, wurden

die Suspension erneut durch ein 30 µm Nylonfilter in einen neuen Falcon-Tube überführt, 2x gewaschen und der Überstand vollständig entfernt. Das Zellpellet wurde in 90 µl MACS-Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen. Mit 10 µl MACS- CD4 Microbeads (Clon L3T4) pro 10^7 Zellen wurde anschließend nach Mixen 15 Minuten bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden jetzt durch die Zugabe von MACS-Puffer (20x Volumen) bei 300 g für 10 Minuten gewaschen und das Zellpellet anschließend in 500 µl Puffer je 10^8 Zellen gelöst. Je nach Zellzahl ($< 10^7$ Zellen = MS⁺/RS⁺- Säule; $> 10^7$ Zellen = LS⁺/VS⁺- Säule) wurde entsprechende gekühlte MACS-Säule gewählt und mit bestimmter Menge (MS⁺/RS⁺- Säule = 500 µl; LS⁺/VS⁺-Säule = 3 ml) im Magnetfeld vorbehandelt und benetzt. Nach dem Vorlauf mit Puffer erfolgte die Zugabe der Suspension, unter Zusatz geeigneter Mengen von Puffer (MS⁺/RS⁺- Säule = 500-1000 µl; LS⁺/VS⁺-Säule = 1-10 ml). Nachdem die negativen Zellen die Säule passiert haben, wurde mit 3x 1ml Puffer nachgespült, die Säule dann aus dem Magnetfeld entfernt und unter zügigem Druck die positiven Zellen mit 5ml Puffer ausgewaschen. Um die Kontamination der CD4⁺- T-Zellen mit dem im MACS-Puffer befindlichen EDTA zeitlich kurz zu halten, wurde umgehend zweimal mit cRPMI1640 gewaschen. Es folgte das Ausplattieren der Zellen für den Proliferationsassay nach Bestimmung der Zellzahl in 96-Napfplatten (Flacher Boden) .

Proliferationsassays

Für die Proliferationsassays wurden in einem vorherigen Titrationsassay das optimale Verhältnis zwischen Zellzahl T-Zellen und APC ermittelt. Es gilt im folgenden, daß immer $2.5 \cdot 10^4$ APC und $10 \cdot 10^4$ T-Zellen für die Proliferationsassays pro Napf eingesetzt wurden.

Die Zellen wurden nach vorherigem Vortexen in 96-Napf-Rundbodenplatten in definierter Zellzahl, in einem Volumen von je 100 µl cRPMI160 resuspendiert, ausplattiert. Nach 10 Minuten erfolgte die zeitgleiche Zugabe der Peptide und der Superantigene in entsprechenden Konzentrationen in einem Volumen von max. 20µl um einen Volumenfehler zu reduzieren. Die 96-Napf-

Rundbodenplatten wurden dann für 24h bei 37⁰C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1μCi/ Napf 3H-Thymidin und eine weitere Inkubation für 48h. Die Platten wurden bis zur weiteren Auswertung mittels automatisiertem Harvester bei -20⁰C eingefroren.

Auswertung mittels automatisiertem Harvester

Der Inhalt der 96 Lochplatten wurden mittels Tomtec-Harvester nach den Herstellerangaben auf 96-Loch Filterpapiermatten (Wallac Oy, Turku, Finnland, 1450 MicroBeta Printet Filtermat A, #1450-421) übertragen. Diese Filtermatten wurden anschließend mittels Mikrowelle (360 Watt, 15 Minuten) getrocknet und dann in einen speziellen Beutel (Wallac Oy, Turku, Finnland, 1450 MicroBeta Sample Bag, #1450-432) überführt. Zum Beutel mit innenliegender Filtermatte wurden 4ml Betaplate-Szintilationsflüssigkeit (Betaplate Scinti-Fluid, Wallac) gegeben und der Beutel anschließend durch ein spezielles Folienschweißgerät verschlossen (Wallac 1295-012 Heat Sealer, Wallac, Turku, Finnland). Die dann erfolgte Auswertung wurde mittels computergestütztem MicroBeta-System der Firma Wallac durchgeführt.

2. Darstellung der synthetisierten Peptide

2.1 GLAT

Bei diesem Peptid handelt es sich um ein synthetisch erstelltes randomisiertes Copolymer aus den L-AS E, K, A und Y im festen molaren Verhältnis von 1.9 : 4.7 : 6.0 : 1. GLAT besitzt ein mittleres Molekulargewicht von 6-8,5 kDa. Durch die randomisierte Anordnung der AS E,K,A und Y zeigt GLAT Spezifität für differente MHC-Allele bei Maus und Mensch.

2.2 P1-Clip

Bei dem Peptid P1-Clip handelt es sich um ein 17 AS langes Peptid mit der Sequenz

KPV-SQM-RMA-TPL-LMR-PM.

Die Clip-Sequenz wurde mittels Datenbank SYFPEITHI als MHC-Klasse-II Motiv

enthaltend für murines H2A^d ermittelt. Es handelt sich dabei um eine Peptidsequenz der Position 85-101 aus der Invarianten Kette des MHC.

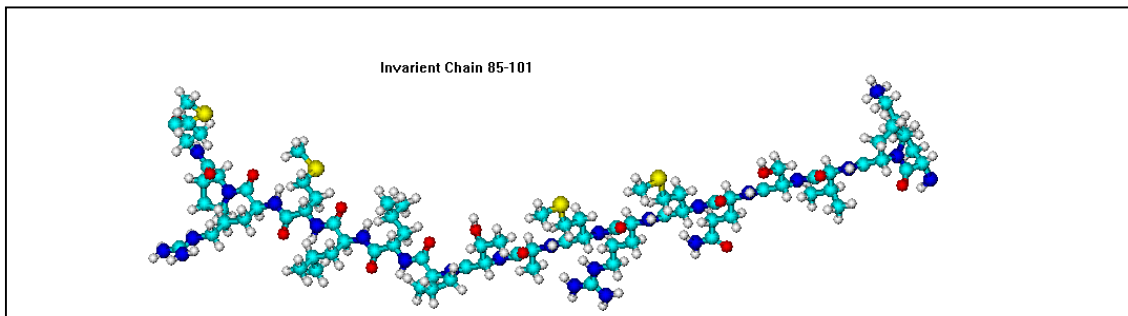


Abb.4 : Backbone-Darstellung der theoretisch wahrscheinlichen Struktur von P1-CLIP

2.3 P2-Clip10

Bei dem Peptid P2-Clip10 handelt es sich um ein nach beiden Seiten mit zehn randomisierten AS verlängertes Clip-Peptid der Sequenz:

r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-**KPS-VQM-RMA-TPL-LMR-PM**-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r

(r steht hierbei für eine randomisierte Aminosäure E,K,A oder Y).

2.4 P3-Clip15

Bei dem Peptid P3-Clip15 handelt es sich um ein nach beiden Seiten mit fünfzehn randomisierten AS verlängertes Clip-Peptid der Sequenz:

r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-**KPS-VQM-RMA-TPL-LMR-PM**-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r-r

(r steht hierbei für eine randomisierte Aminosäure E,K,A oder Y).

2.5 P4-APE

Das Peptid P4-APE ist nach der Motivvorhersage der SYFPEITHI-Datenbank ein sehr geeigneter Ligand für Maus- H2-A^d. Die Sequenz 268-283

WAN-LME-KIQ-ASV-ATN-P

des Apolipoprotein E wurde synthetisiert. Das Peptid aus 16 AS hat ein Molekulargewicht von 1773 Da.

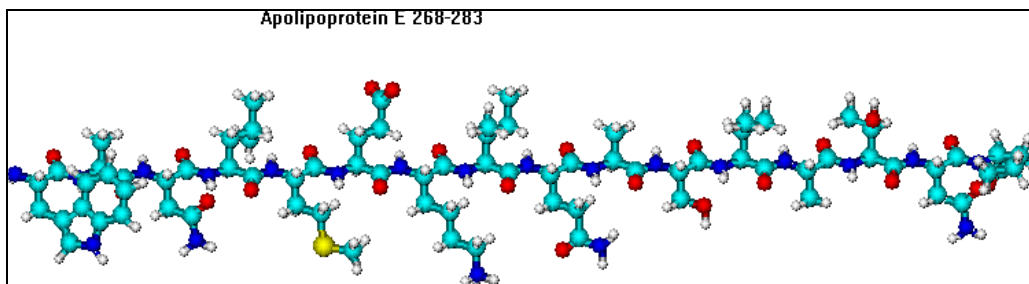


Abb.5 : Backbone-Darstellung einer theoretisch möglichen Struktur von P4-APE

2.6 P5- APE-20

Dieses Peptid besteht aus dem MHC-II Ligand des murinen H2-A^d, entsprechend dem Peptid P4-APE, ist jedoch nach beiden Seiten mit je 20 definierten AS verlängert. Es ergibt sich dadurch folgende Sequenz:

PHD-NPH-PDP-HHP-PHP-HPD-PH- WAN-LME-KIQ-ASV-ATN-P- PHD-NPH-PDP-HHP-PHP-HPD-PH

Die Wahl der AS für die N- und C-terminale Flankierung des Motives erfolgte in strenger Anlehnung an die AS des GLAT, also an E,K,A und Y. Die Aminosäure Glutaminsäure (E) als saure AS wurde durch die saure AS Asparaginsäure (D) ersetzt, die basische AS Lysin (K) durch die ebenfalls schwach basische AS Histidin (H), die aliphatische AS Alanin (A) wurde gegen Prolin (P), ebenfalls aliphatisch, ausgetauscht. Durch den Tausch der vierten in GLAT befindlichen AS Tyrosin (Y) als hydrophil polare AS gegen Asparagin (N) wurden die charakteristischen Eigenschaften der in GLAT befindlichen AS bestmöglich übernommen und ein Motiv für die Flanken entworfen, daß auch in den molaren

Verhältnissen der AS zueinander GLAT widerspiegelt. Durch die Verwendung der AS D,H, P und N konnten jedoch nach der Ligandenvorhersage für den murinen MHC-II Liganden H2-A^d bis auf die AS H und D auf Position 1 andere Bindungstellen vor allem auf den Positionen 4 und 6 ausgeschlossen werden. Es ist so wahrscheinlich, daß das Motiv trotz der GLAT-ähnlichen Flanken als Ligand zum Maus MHC-II fungiert.

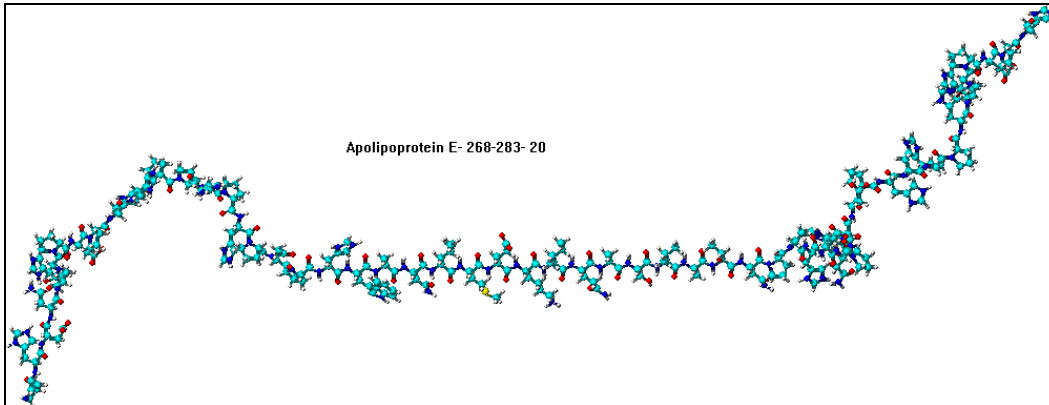


Abb.6 : Backbone-Darstellung einer theoretisch möglichen Struktur von P5-APE-20

Das Peptid aus 56 AS hat ein Molekulargewicht von 6358 Da.

2.7 P6- APE-S-T

Bei diesem Peptid flankiert C- terminal die bereits aus dem P4-APE20 bekannte Flanke das Hauptmotiv. Nach dieser, als Spacer fungierenden Verlängerung erfolgt ein zweites T-Zellrezeptor Bindungsmotiv. Die AS-Sequenz für dieses Peptid lautet damit:

WAN-LME-KIQ-ASV-ATN-P- PHD-NPH-PDP-HHP-PHP-HPD-PH-YNK-KKA-TVQ-ELD

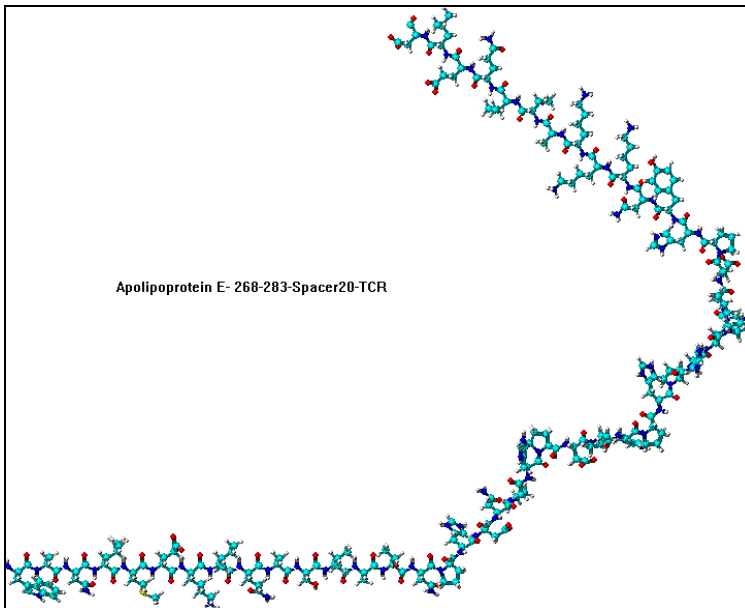


Abb.7 : Backbone-Darstellung einer theoretisch möglichen Struktur von P6-APE-S-T

Das T-Zellrezeptor Bindungsmotiv wurde dabei der Publikation von Gila Arad et al. aus der Nature-Medicine Publikation 2000 entnommen. Diese Sequenz zeigt Homologie zu einer „ β -strand hinge α helix“- Domäne und scheint strukturell in Superantigenen konserviert zu sein. Superantigene benötigen diese Domäne mit hoher Wahrscheinlichkeit für die T-Zellaktivierung. Das Peptid aus 47 AS hat ein Molekulargewicht von 5387 Da.

2.8 P7-TCRBP

Bei diesem Peptid von nur 12 AS handelt es sich um das bereits im Peptid P6-APE-S-T vorgestellte T-Zellen aktivierende Motiv der Sequenz:

YNK-KKA-TVQ-ELD

Das Peptid hat ein Molekulargewicht von 1436 Da.

2.9 HEL

HEL ist Hühnerei-Lysozym und wurde von Sigma bezogen. Es dient in Form einer natürlichen Peptidsequenz als unspezifische Kontrolle in den Versuchen.

2.10 TGA

TGA, von der Firma Sigma bezogen, fungiert als Kontrolle. Dieses Peptid ist aus den AS T, G und A zusammengesetzt, hat aber eine definierte Sequenz.

2.11 verwendete Versuchstiere

Weibliche BALB/cj (H2^d) und B10.D2 /nSnJ (H2^d) Mäuse wurden von den Jackson Laboratorien in Bar Harbor, Maine, USA bezogen und in die Tierhaltungsräume der Universitätskinderklinik Tübingen eingeschleust. Mausmodelle der GvHD, bei denen Minorhistokompatibilitäts-Differenzen die Ursache für den Ausbruch der GvHD stellen, sind von klinischer Relevanz, da bei der humanen Transplantation von Knochenmark Spender und Empfänger nach HLA-Kompatibilität ausgewählt werden. Die Stämme B10.D2 /nSnJ und BALB/cj sind beide H-2^d, entsprechend HLA Klasse I und Klasse II des Menschen. Die verwendeten Mausstämmen unterscheiden sich jedoch in vielen Minorhistokompatibilitäts-Antigenen (Hamilton, 1987; Korngold et al. , 1987) . Zudem trägt der BALB/cj- Stamm die bereits im Vorwort erwähnten endogenen Mtv-kodierten (engl. „mouse mammary tumor virus“) Superantigene auf der Zelloberfläche, für die B10.D2/nSnJ Mäuse keine Toleranz aufweisen (Miconnet et al., 1995) . Die Mäuse waren zum Zeitpunkt der Zell- bzw. Organentnahme 14 Wochen alt und wurden in einzeln belüfteten sterilen Käfigen in einer Techniplast- Mauseinheit bei 22° C, kontrollierter feinstgefilterter Luftumwälzung (SPF, Speziell Pathogenfrei) und 12 Stunden Tag-Nacht Rhythmus gehalten.

Alle Tiere erhielten autoklaviertes Trockenfutter und mit Bactrim[®] Roche Sirup angereichertes Wasser ad libitum¹. Die zur weiteren Untersuchung notwendigen Zellen und Organe wurden unter aseptischen Kautelen von euthanasierten Spendermäusen gewonnen.

¹ Bactrim[®] Roche Sirup für Kinder (20ml Sirup/ Liter H₂O, 160mg Trimethoprim und 800mg Sulfamethoxazol/ Liter H₂O)

2.12 Sensitivierung der Versuchsmäuse mittels D-Galactosamine

Normalerweise sind bereits geringe Gaben von Superantigenen durch die sich schnell entwickelnde ausgeprägte Schocksymptomatik und Immunsuppression letal. Durch die Gabe von Superantigenen kommt es zu einer verstärkten Proliferation V β -spezifischer T-Zellen und über dieses zur gesteigerten Sekretion von IL-2 und TNF- α . Eine Applikation von Superantigenen in vivo im Mausmodell ist durch das mögliche Nichtvorhandensein mancher respektiver V β - Subfamilien in bestimmten Mausstämmen jedoch nicht immer letal. Um eine sichere Letalität nach parenteraler Applikation von Superantigen zu gewährleisten, wurden die verwendeten Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von je 20 mg D-Galactosamine Hydrochlorid/Maus (zeitgleich zur Injektion von 20 μ g SEA/ Maus in die Fußballen) sensitiviert.

2.13 Vorhersage von T-Zellepitopen mit Hilfe der Software SYFPEITHI

Mit Hilfe der Internetdatenbank SYFPEITHI (<http://www.syfpeithi.de>) wurden für die verwendeten Mausstämme (Hintergrund H2-A^d) die entsprechenden Liganden gesucht. In der Datenbank zeigt sich, daß im H2-A^d –System bevorzugt die von ihrer Charakteristik hydrophil polaren Aminosäuren Serin (S), Threonin (T) oder Tyrosin (Y) neben anderen AS auf der Position 1 vorkommen. Auf der Ankerposition 4 scheint das Vorkommen von aliphatisch hydrophoben AS wie Valin (V), Leucin (L), Isoleucin (I) oder Alanin (A) besonders günstig zu sein. An der Ankerposition sechs gibt die Datenbank ebenfalls das Vorkommen von Alanin (A) und Valin (V) als günstig an. Damit ergibt sich mittels SYFPEITHI-Abfrage als besonders guter Ligand für murines H2-A^d die Sequenz des Apolipoproteins E 268-284 *WANLMEKIQASVATNPI* mit den entsprechenden Ankerpositionen hier rot dargestellt. Als zweiter wichtiger H2-A^d bindender Ligand wurde das ebenfalls mittels SYFPEITHI vorhergesagte Peptid aus der Invarianten Kette, Position 85-101, *KPVSQMRMATPLLMRPM* synthetisiert und verwendet. Hier ist allerdings ein zusätzlicher Anker in Position 6 mit der Aminosäure Prolin als in ihrer Charakteristik klein und aliphatisch sehr ungünstig.

Die Peptide und weitere auf dieser Vorhersage basierende Peptide werden unter Material und Methoden näher beschrieben.

4. Ergebnisse

Um zu untersuchen, ob eine durch Superantigene hervorgerufene T-Zell-Proliferation durch die erstellten synthetischen Peptide *in vitro* zu inhibieren ist, wurden zuerst die für die *in vitro* Versuche erforderlichen Zellkulturen optimiert. Dabei wurden die T-Zellen aus BALB/cj-Mäusen gewonnen und mittels verschiedener Techniken gereinigt, sowie die Methoden zugunsten hoher Reinheit optimiert. Im Vorfeld wurden jeweils ca. eine Woche vor der Gewinnung von T-Zellen bereits aus BALB/cj-Mäusen antigenpräsentierende Zellen gewonnen, deren „Präsentationsfähigkeit“ durch FACS-Analysen (MHC-Klasse-II, CD11c) verifiziert wurden. Im weiteren wurden eine Reihe von Peptiden zusammen mit T-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen in der Zellkultur auf ihre Fähigkeit hin getestet, Superantigen induzierte T-Zellproliferation zu minimieren. Die Peptide, die *in vitro* Experimenten eine Inhibition hinsichtlich Superantigen-induzierter T-Zellproliferation zeigten, wurden in finalen *in vivo* Versuchen an BALB/cj-Mäusen getestet, denen eine normalerweise lethale Dosis Superantigen appliziert wurde.

4.1 FACS-Analyse der Reinheit der murinen T-Zellen nach MACS

Die Reinheit der murinen CD4⁺-T-Zellen wurde zu vor jedem Proliferationsassay mittels FACS-Analyse überprüft. Dabei zeigte sich, daß die Verwendung von negativen Depletionssäulen zur Gewinnung einer nichtaktivierten T-Zellpopulation alleine nicht in ausreichendem Maße geeignet war, CD4⁺ T-Zellen zu generieren. Die Reinheit lag zwischen 72-86%, die Überlebensfähigkeit der Zellen war jedoch mehrfach sehr schlecht, so daß von der weiteren Verwendung negativer Depletionssäulen für die Generierung muriner CD4⁺ T-Zellen abgesehen wurde.

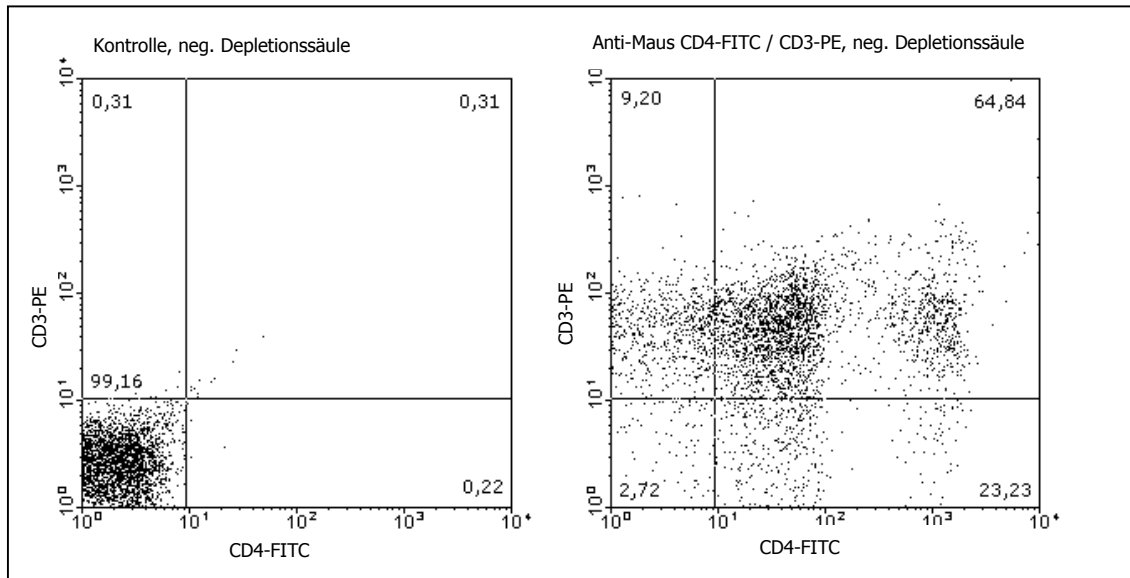


Abb.8: Dotplot-Darstellung der FACS-Analyse mittels negativer Depletionssäulen generierter muriner CD4⁺ T-Zellen. Links dargestellt die Isotypkontrolle, rechts dargestellt das FACS mit den verwendeten Antikörpern gegen murines CD3 (PE-Kanal) und gegen murines CD4 (FITC-Kanal). Eine breite Streuung der murinen CD4⁺ T-Zellen in zwei Populationen (dimm, bright), sowie das Auftreten von CD3⁺CD4⁻ Zellen ist zu beobachten.

Die Reinheit der mittels Ficoll und MACS generierten und verwendeten T-Zellen lag deutlich über 90%.

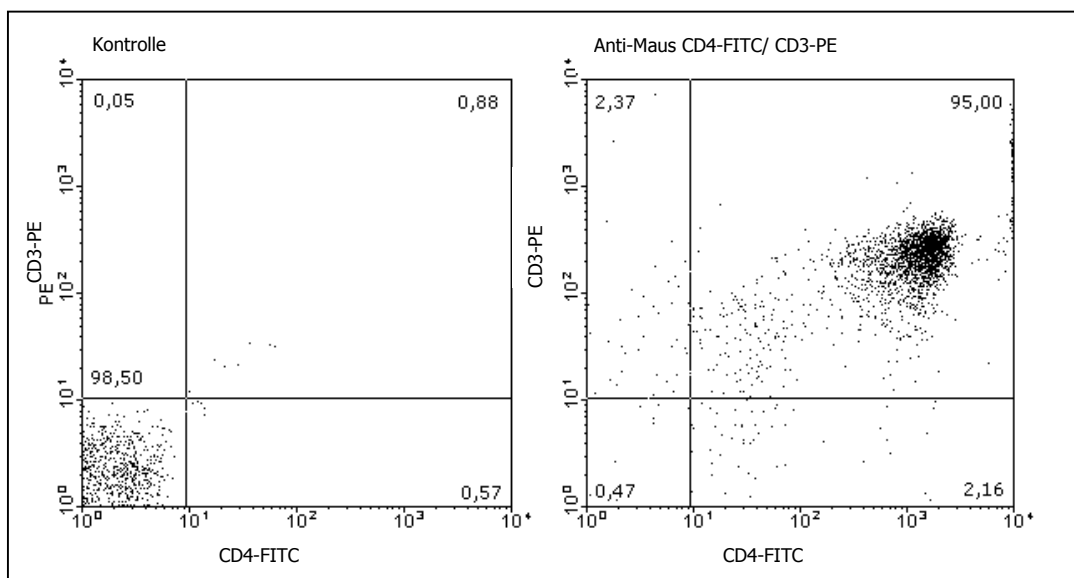


Abb.9: Dotplot-Darstellung der FACS-Analyse mittels Ficoll und MACS generierter muriner CD4⁺ T-Zellen. Links dargestellt die Isotypkontrolle, rechts dargestellt das FACS mit den verwendeten Antikörpern gegen murines CD3 (PE-Kanal) und gegen murines CD4 (FITC-Kanal).

4.2 FACS-Analyse der MHC-Klasse-II Präsentation auf murinen APC nach Generierung

Vor der Verwendung in entsprechenden Proliferationsassays wurde ebenfalls das Vorhandensein von MHC-Klasse-II auf antigenpräsentierenden Zellen mittels FACS überprüft. Dabei wurden die APC mit den Antikörpern gegen murines CD11c und gegen H2-A^d dargestellt. Nach der Stimulation mit rekombinantem murinen GM-CSF und TNF- α über einen Zeitraum von 7 Tagen zeigte sich eine starke MHC-Klasse-II Präsentation auf den generierten antigenpräsentierenden Zellen. Doppelt positive MHC-Klasse-II tragende APC lagen zwischen 78 und 92% vor (siehe Abbildung 10). Der verwendete Antikörper HL3 reagiert mit Maus- CD11c, der Integrin α_x -Kette von gp150/95. Diese wird auf dendritischen Zellen und auf CD4⁻CD8⁺ intestinalen intraepithelialen Lymphozyten (IEL) exprimiert und wird nach in vivo Aktivierung heraufregelt^{48; 30;49}.

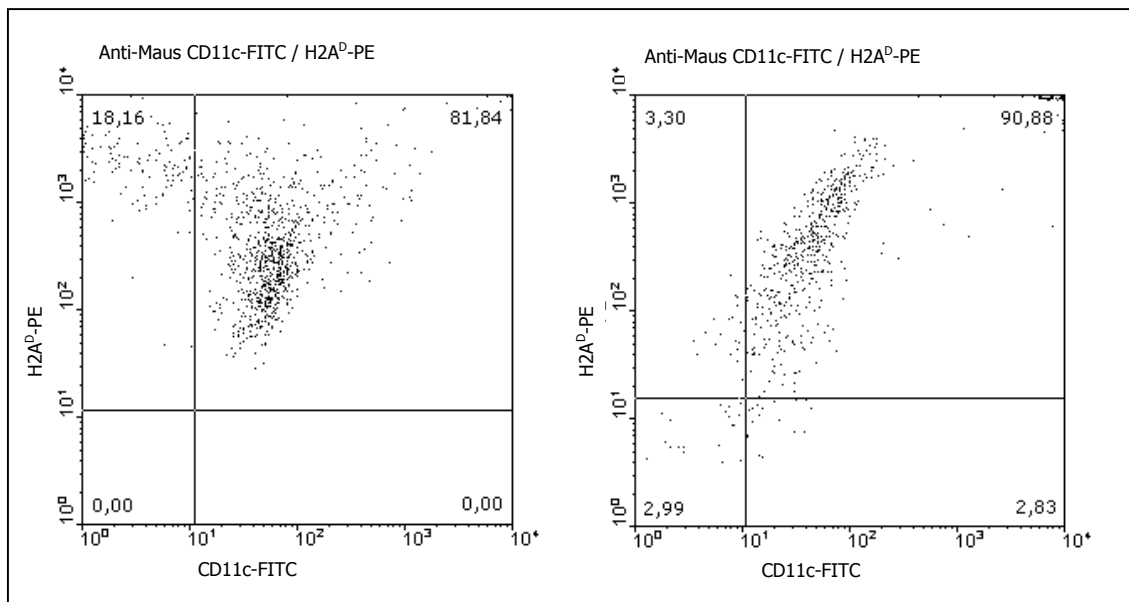


Abb.10: Dotplot-Darstellung der FACS-Analyse generierter muriner APC. Links dargestellt eine Fraktion mit 81.84% H2A^d – CD11c doppelt positiven Zellen. Eine Fraktion von 18,16% ist einfach positiv für Maus MHC-Klasse-II (linker oberer Quadrant). Rechts dargestellt ein FACS mit 90,88% H2A^d/CD11c doppelt positiven antigenpräsentierenden Zellen (rechter oberer Quadrant).

4.3 Titration der verwendeten Peptide im ³H-Thymidin-Proliferationsassay

Um die optimale Konzentration der verwendeten Peptide, sowie der Kontrollen zu ermitteln, wurden die Substanzen im Konzentrationsbereich von 25 µg/ml über 50 µg/ml, 100 µg/ml und 250 µg/ml eingesetzt. Dabei wurden in einem Assay 100000 CD4⁺ BALB/cj-T-Zellen/Napf und 25000 BALB/cj-APC/Napf mit je 1µg/ml SEA/Napf stimuliert, in einem zweiten Assay mit je 10 µg/ml SEB/Napf getestet. Für die Peptide CLIP und CC-10 zeigte sich dabei, dass unabhängig von der verwendeten Konzentration immer ein zusätzlicher stimulierender Effekt zum verwendeten Superantigen auftrat. Alle anderen Peptide inklusive der verwendeten Kontrollen mit dem synthetischen Polymer TGA (Sigma) und Hühnereiweiß zeigten eine sehr schwache bis starke konzentrationsabhängige Inhibierung. Im folgenden werden die einzelnen Peptide und ihre Titrationskurven dargestellt. Dabei sind die gemittelten Werte aus jeweils 3 gemessenen Werten eines repräsentativen Assays dargestellt. Die ermittelten Werte für die als Kontrollen fungierenden Peptide TGA und HEL sind jeweils zur besseren Beurteilbarkeit der Inhibition mit dargestellt und sind daher in allen folgenden Titrationskurven gleich.

Wird die Zahl der ermittelten cpm / Konzentration für SEA ohne Zugabe eines Peptides als 100%-Schwelle gesetzt, so zeigt das Kontrollpeptid TGA, gemittelt über alle gemessenen Konzentrationen, eine leichte Inhibition der T-Zellproliferation von 9,7%.

Bei dem ebenfalls als Kontrolle eingesetzten unspezifischen Protein HEL zeigte sich eine Inhibition, ebenfalls gemittelt über alle Konzentrationen von 18,8%. Es kann also von einer wirklich inhibitorischen Wirkung der synthetisch erstellten Peptide erst ab einer Reduktion Superantigen vermittelter T-Zellproliferation von über 20% gesprochen werden.

4.3.1 CLIP, in vitro

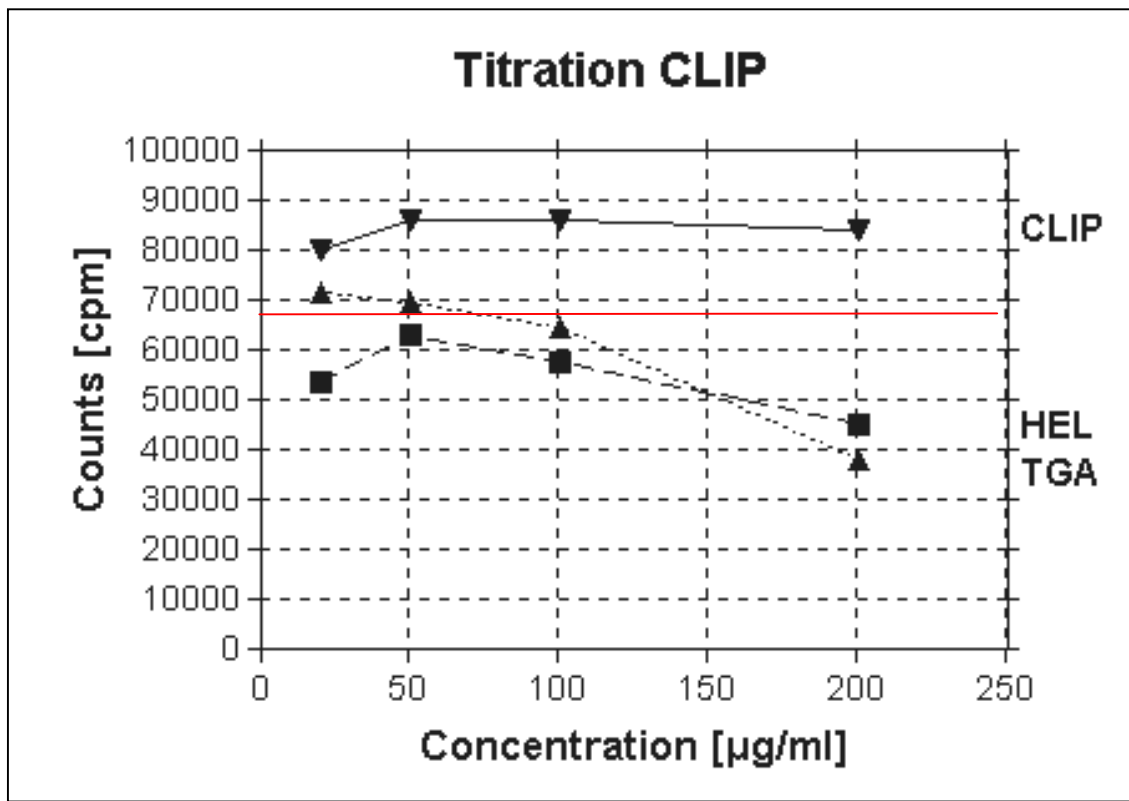


Abb.11: Titration des Peptides CLIP im Assay mit 1µg/ml SEA als Stimulanz. Es wurde 100000 CD4⁺ BALB/cj-T-Zellen und 25000 BALB/cj-APC je Napf eingesetzt. Während sich bei den verwendeten Kontrollen HEL und TGA eine konzentrationsabhängige Wirkung einstellt, lässt sich durch Zugabe von bereits 50 µg/ml der stimulierende Effekt des verwendeten Superantigens SEA noch steigern. Allerdings kann dieser Effekt durch weitere Konzentrationserhöhung (100 µg, 200 µg) nicht weiter gesteigert werden. Die rote Linie bei 67435 gibt die maximale Proliferation durch SEA ohne Peptide an.

Unter der Zugabe von Superantigen und dem Peptid CLIP kam es in den Konzentrationen von 25 µg/ml bis hin zu 200 µg/ml in allen durchgeführten autologen Assays zu einem Anstieg der durch Superantigen hervorgerufenen T-Zellproliferation.

Auch im allogenen durchgeführten Proliferationsassay konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Versuche auch mit höheren CLIP-Konzentrationen zeigten keine Änderung. Die Steigerung der T-Zellproliferation,

gemessen an der Differenz der durchschnittlichen cpm (SEA = 100%), betrug durch die Zugabe von CLIP 24,75%.

Dabei zeigte CLIP weder im allogenen, noch im autologen Setup ein konzentrations-abhängiges Verhalten. Gegenüber den verwendeten Kontrollen (HEL, TGA) war durch den Einsatz von CLIP ein hoch signifikanter Anstieg (one way ANOVA, Signifikanzniveau=95%, $p=0,0062$) in der T-Zell Proliferation zu beobachten. Dabei ist ein hochsignifikanter Unterschied sowohl zwischen CLIP und TGA (Newman Keuls Multiple Comparison Test, $p<0,01$), als auch zwischen CLIP und HEL (Newman Keuls Multiple Comparison Test, $p<0,01$) zu beobachten.

4.3.2 CC-10, in vitro

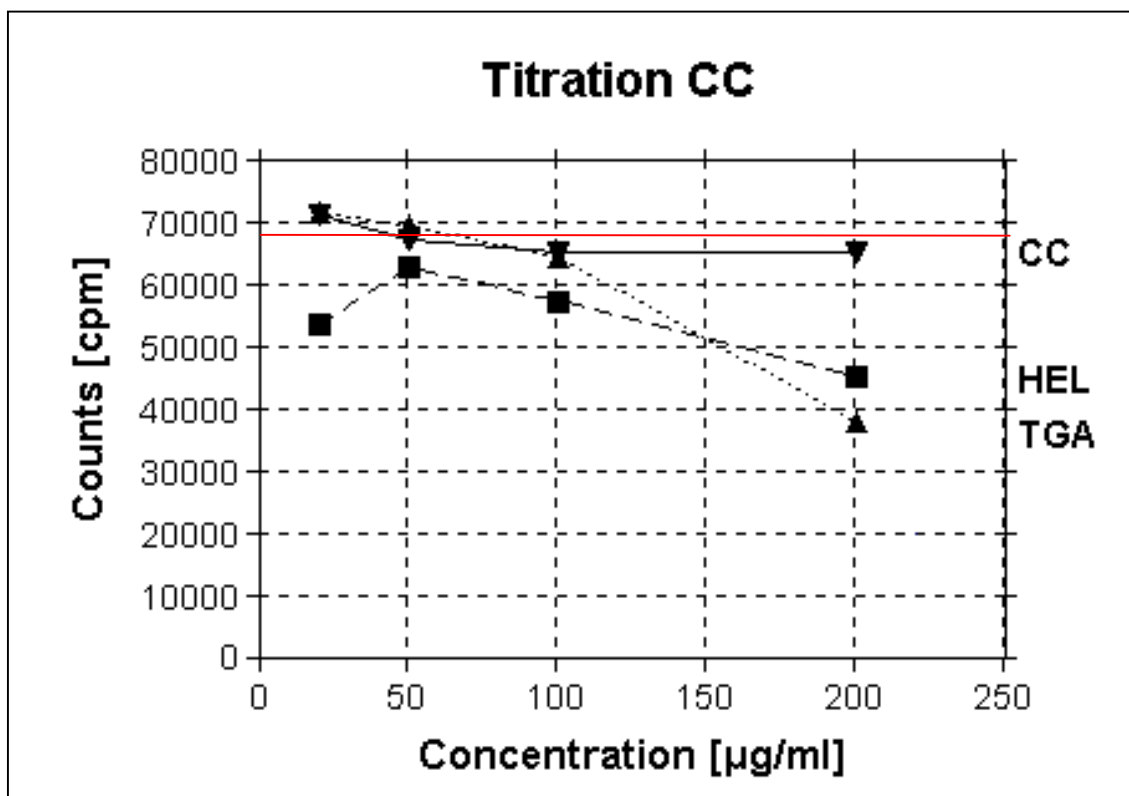


Abb.12: Titration des Peptides CC-10 im Assay mit 1 µg/ml SEA als Stimulanz. Es wurde 100000 CD4⁺ T-Zellen und 25000 APC je Napf eingesetzt. Während sich bei den verwendeten Kontrollen HEL und TGA eine konzentrationsabhängige Wirkung einstellt, bleibt diese Wirkung bei dem verwendeten Peptid CC-10 weitestgehend aus. CC-10 erreicht eine Plateauphase etwa auf der Höhe der maximalen Stimulation durch das verwendete Superantigen SEA (max. Proliferation SEA = 67435 cpm, rote Linie).

Das Peptid CC-10, zeigte in allen Assays keine signifikante Reduktion der durch Superantigen hervorgerufenen T-Zellproliferation. Legt man die Stimulation im Surrogatassay durch Superantigen (SEA) ohne Zugabe von weiteren Peptiden als 100% (\emptyset cpm = 67435) fest, so beträgt die Inhibition im Mittelwert über alle Konzentrationen von CC-10 lediglich 3,5% (\emptyset cpm = 65076) und ist auch gegenüber den Kontrollen nach Durchführung einer one-way Anova-Analyse nicht signifikant (one way Anova, Signifikanzniveau=95%, $p=0,2734$). Zudem ist zu beobachten, dass ähnlich wie auch schon bei CLIP beschrieben, in den autologen Surrogatassays nur ein sehr geringer konzentrationsabhängiger Effekt eintrat.

4.3.3 APE-20, in vitro

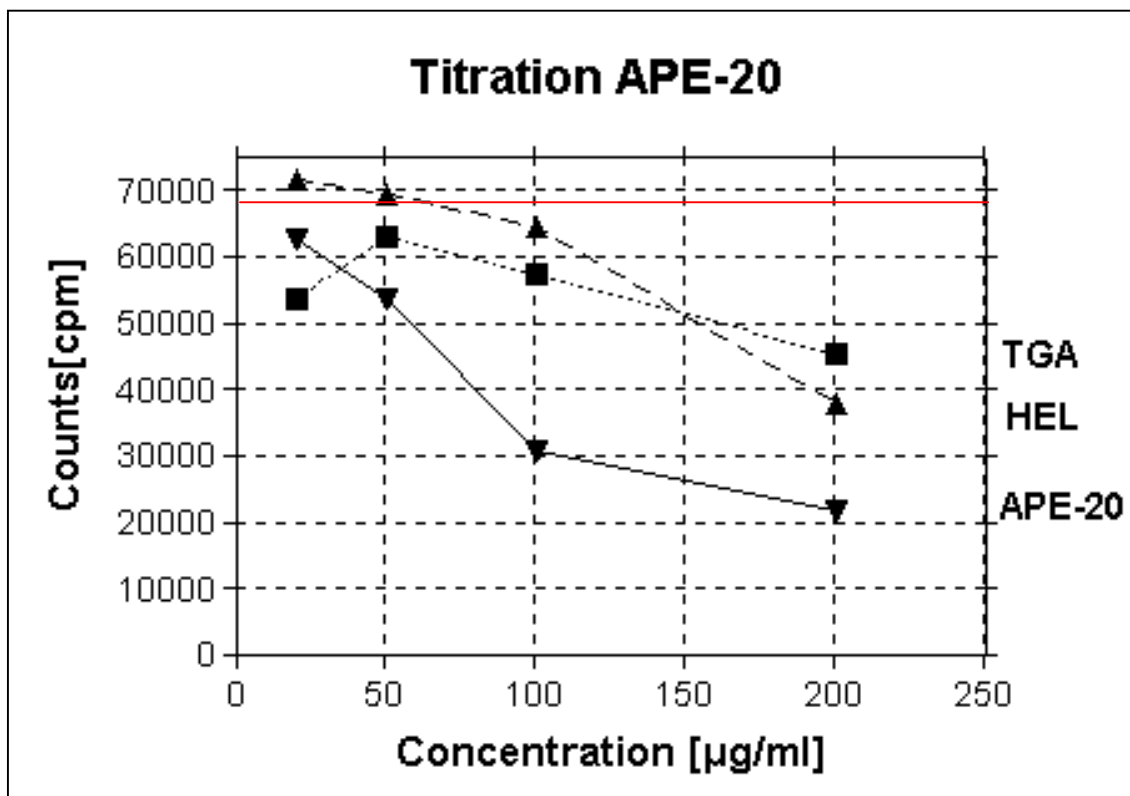


Abb.13: Titration des Peptides APE-20 im Assay mit 1 µg/ml SEA als Stimulanz. Es wurde 100000 CD4⁺ T-Zellen und 25000 APC je Napf eingesetzt. Durch die Zugabe des Peptides APE-20 zeigt sich ab einer Konzentration von 100 µg/ml bereits eine deutliche Inhibition der durch Superantigen vermittelten T-Zellproliferation. Die maximale Proliferation durch SEA betrug 67435 cpm (rote Linie).

Das synthetische Peptid APE-20 zeigt im Vergleich zu CLIP und CC-10 erstmals einen deutlichen konzentrationsabhängigen inhibitorischen Effekt ab einer Konzentration von 100µg/ml. Im Mittelwert über alle Konzentrationen konnte gegenüber der max. Proliferation von SEA (\bar{x} cpm = 67435) durch Einsatz von APE-20 (\bar{x} cpm = 42292,75) dieser Wert um 37,20% gesenkt werden. Ein Absenken gegenüber dem Mittelwert der am stärksten unspezifisch wirkenden Kontrolle HEL (\bar{x} cpm = 54824) erfolgte um 22,28%. Damit kann bei Verwendung des Peptides APE-20 bereits von einer signifikanten Reduktion der durch Superantigene induzierten T-Zellproliferation gesprochen werden. Stellt man den Mittelwert von APE-20 über alle verwendeten Konzentrationen allerdings gegen den Mittelwert der Kontrollen, so ergibt sich nach Durchführung einer one way Anova-Analyse $p=0,2468$ (Konfidenzintervall=95%). Damit ist APE-20, bezogen auf die Mittelwerte aller verwendeten Konzentrationen, nicht signifikant in der Lage, die durch Superantigene hervorgerufene T-Zellstimulation zu inhibieren.

4.3.4 APE-S-T, in vitro

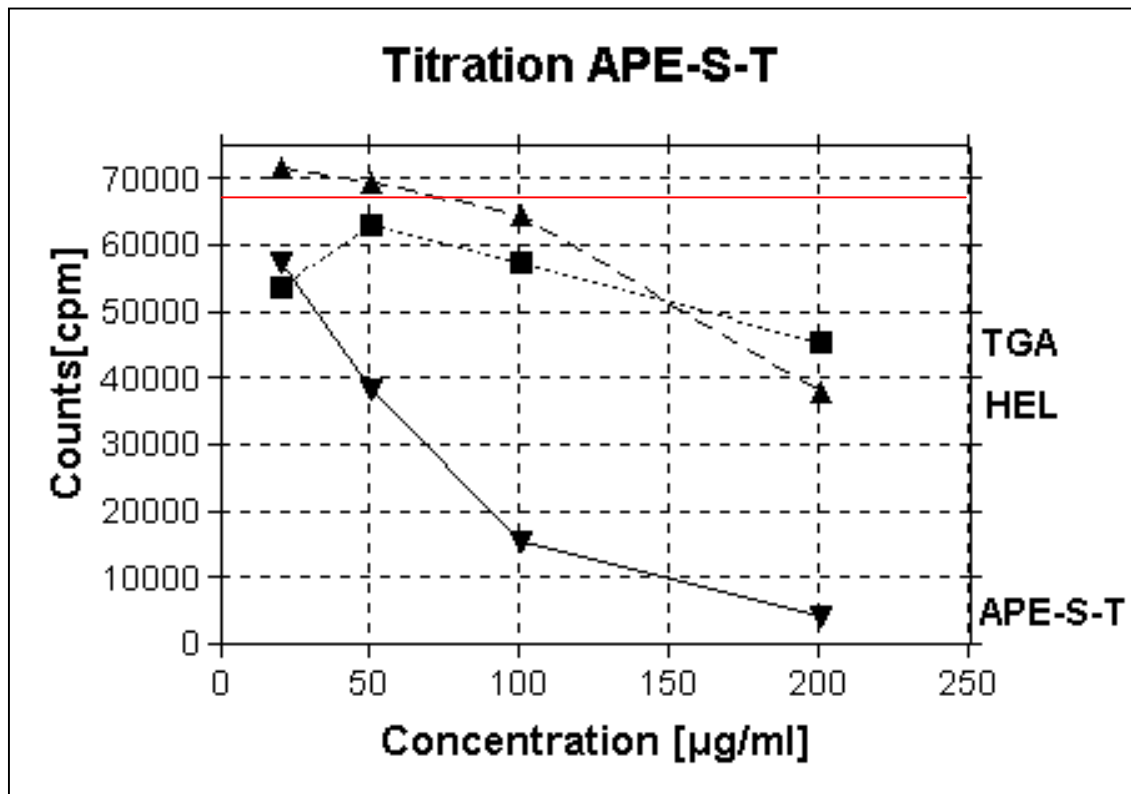


Abb.14: Titration des Peptides APE-S-T im Assay mit 1 µg/ml SEA als Stimulanz. Es wurde 10000 CD4⁺ T-Zellen und 25000 APC je Napf eingesetzt. Durch die Zugabe des Peptides APE-S-T zeigt sich ab einer Konzentration von 100 µg/ml bereits eine deutliche Inhibition der durch Superantigen vermittelten T-Zellproliferation. Bei 200 µg/ml ist fast keine T-Zellproliferation mehr zu beobachten. Die maximale Proliferation durch SEA betrug 67435 cpm (rote Linie).

Das verwendete Peptid APE-S-T zeigt eine hochsignifikante spezifische Reduktion der durch Superantigene vermittelten T-Zellproliferation gegenüber den verwendeten Kontrollen von $p=0,05$ (one way Anova-Analyse, Signifikanzniveau=95%). Bereits ab einer Konzentration von 100 µg/ml zeigt APE-S-T eine deutliche Wirkung, die sich bei 200 µg/ml noch deutlich verbessern ließ.

4.3.5 TRBP, in vitro

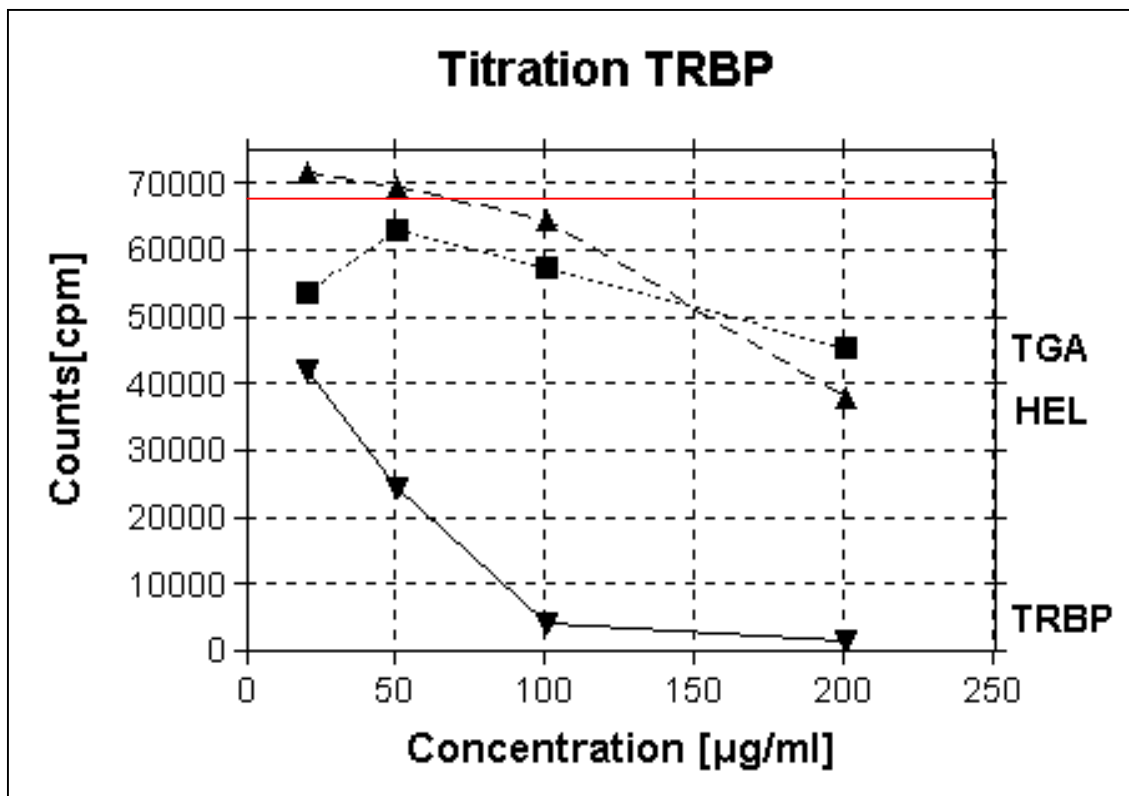


Abb.15: Titration des Peptides TRBP im Assay mit 1 µg/ml SEA als Stimulanz. Eingesetzt wurden 100000 CD4⁺ T-Zellen und 25000 APC je Napf. Durch die Zugabe des Peptides TRBP zeigt sich ab einer Konzentration von 50 µg/ml bereits eine deutliche Inhibition der durch Superantigen vermittelten T-Zellproliferation. Bei 200 µg/ml ist fast keine T-Zellproliferation mehr zu beobachten. Die maximale Proliferation durch SEA ohne Zugabe von Peptid betrug 67435 cpm (rote Linie).

Das T-Zell Rezeptor bindende Peptid TRBP zeigt in den durchgeführten Assays eine höchstsignifikante Wirkung (one way Anova-Analyse, Signifikanzniveau=95%, $p=0,0054$) verglichen mit den verwendeten Kontrollen (Newman Keuls Multiple Comparison Test, TRBP gegenüber HEL $p<0,01$; TRBP gegenüber TGA $p<0,01$; TGA gegenüber HEL $p>0,05$). Bereits ab einer eingesetzten Konzentration von 50 µg/ml zeigt sich eine deutlich inhibierende Wirkung, die sich über die eingesetzten Konzentrationen von 100 µg/ml bis 200 µg/ml noch weiter steigern ließ. Toxizitätsuntersuchungen mit dem verwendeten Peptid TRBP konnten zeigen, daß das Peptid in den eingesetzten Konzentrationen nicht toxisch wirkt.

4.4 Titrationsassay (SEA) zur Ermittlung des optimalen Zellzahl-Verhältniss von APC zu CD4

Um das optimale Verhältnis der Anzahl von antigenpräsentierenden Zellen zu CD4⁺ T-Zellen zu ermitteln, wurden in einer 96-Loch Platte verschiedene Verhältnisse getestet. Unter der Stimulation von 1µg/ml SEA zeigte sich, daß bei einem Verhältniss APC zu CD4 von 1:1 (1*10⁴/Napf), sowie von 1:2 (0,5*10⁴ APC zu 1*10⁴ CD4⁺) und 1:4 (0,25*10⁴ APC zu 1*10⁴ CD4⁺) sehr gute Ergebnisse erzielt wurden. Da die Generierung von APC den zeitlich limitierenden Faktor darstellt (t=7d), wurden im folgenden die Proliferationsassays in einer Konzentration von je 0,25*10⁴ APC und 1*10⁴ CD4⁺ T-Zellen je Napf angesetzt um möglichst viele Assays mit einer Charge der generierten APC durchführen zu können ohne auf eine gute Präsentation verzichten zu müssen.

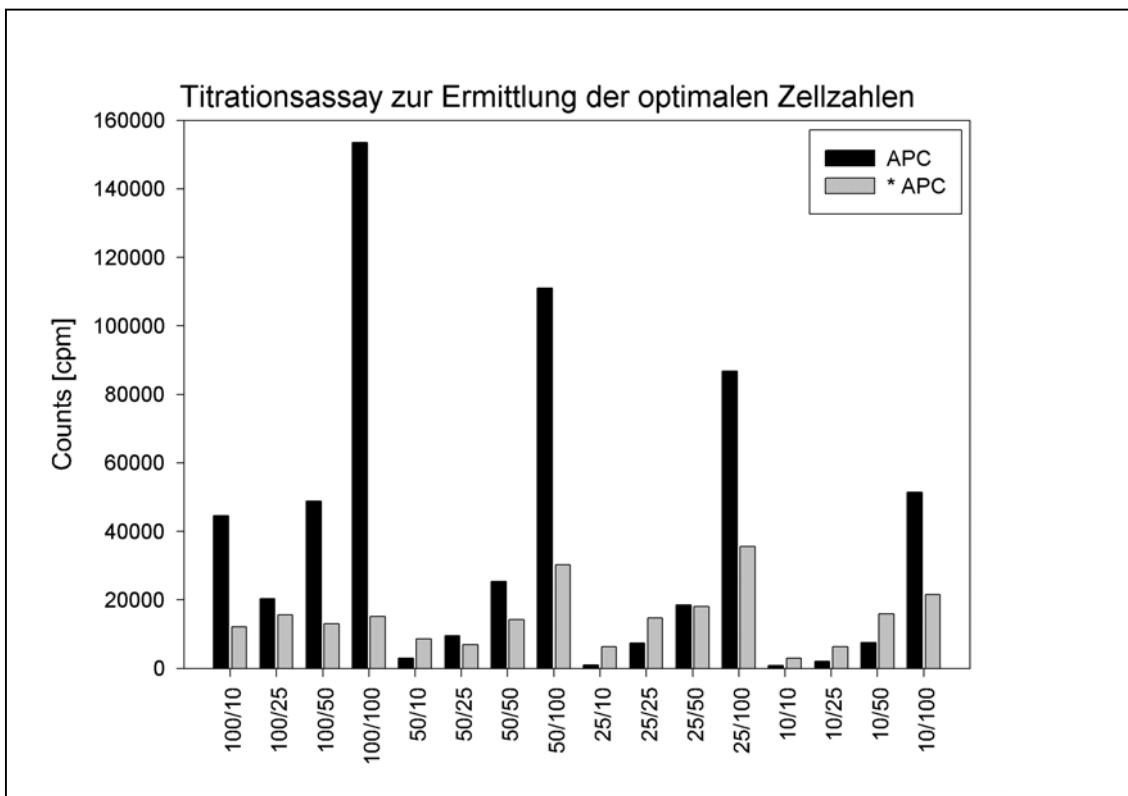


Abb.16: Titrationsassay zur Ermittlung des optimalen Zellzahl-Verhältnisses zwischen APC und CD4⁺ T-Zellen. Zur Durchführung wurden jeweils bestrahlte APC ■ und unbestrahlte APC ■ eingesetzt. Die erste der beiden Zahlen auf der x-Achse bezieht sich auf die Anzahl der APC (*1000), die zweite Zahl bezieht sich auf die CD4⁺ T-Zellen (*1000).

4.5 Schutz vor Superantigen-Schock durch Applikation der Peptide

Die Applikation von Superantigenen in vivo im Mausmodell ist durch das mögliche Nichtvorhandensein mancher respektiver V β - Subfamilien nicht immer letal. Um Letalität nach parenteraler Applikation von Superantigen sicher zu stellen, wurden die verwendeten Mäuse mittels intraperitonealer Injektion von je 20 mg D-Galactosamine Hydrochlorid/ Maus sensitiviert. Nach zwei Stunden wurden das zu untersuchende Peptid (30 μ g) intravenös in die Schwanzvene appliziert und nach weiteren 30 Minuten erfolgte die Gabe von 10 μ g SEA, ebenfalls intraperitoneal. Für jedes zu untersuchende Peptid wurden 5 weibliche BALB/cj- Mäuse gewählt, die in einen eigenen Käfig umgesetzt wurden. Der Versuch wurde nach 100 Stunden abgebrochen. Die maximale Überlebenszeit wird daher im folgenden mit 100 Stunden angegeben. Diese Zeitauswahl erfolgte in Anlehnung an die Publikation von Gila Arad et al., (Nature Medicine, Vol.6, Nr. 4, April 2000). Als Kontrollen wurden Mäuse ohne Peptid, jedoch mit Sensitivierung und Gabe von Superantigen gewählt. Diese Mäuse verstarben alle innerhalb eines Zeitraumes von 41 Stunden (Mittelwert: 24.4 h). Als zweite zusätzliche Kontrolle wurden Mäuse mit dem Protein HEL behandelt, das auch bereits in den in vitro Experimenten zum Einsatz kam. Aus dieser Gruppe überlebte ein Tier, die anderen Tiere verstarben nach 25,35,48 und 54 Stunden.

Die für die in vivo Untersuchungen ausgewählten Peptide werden im weiteren einzeln dargestellt.

4.5.1 CLIP, in vivo

Clip unterscheidet sich nach statistischer Analyse (Chi Quadrat=0.1857, $p=0.6666$) nicht signifikant von der Kontrolle, bei der in vivo keine Peptide verwendet worden sind. Die mediane Überlebenszeit betrug bei der Kontrolle 25 Stunden, bei intravenöser Gabe von CLIP 20 Stunden.

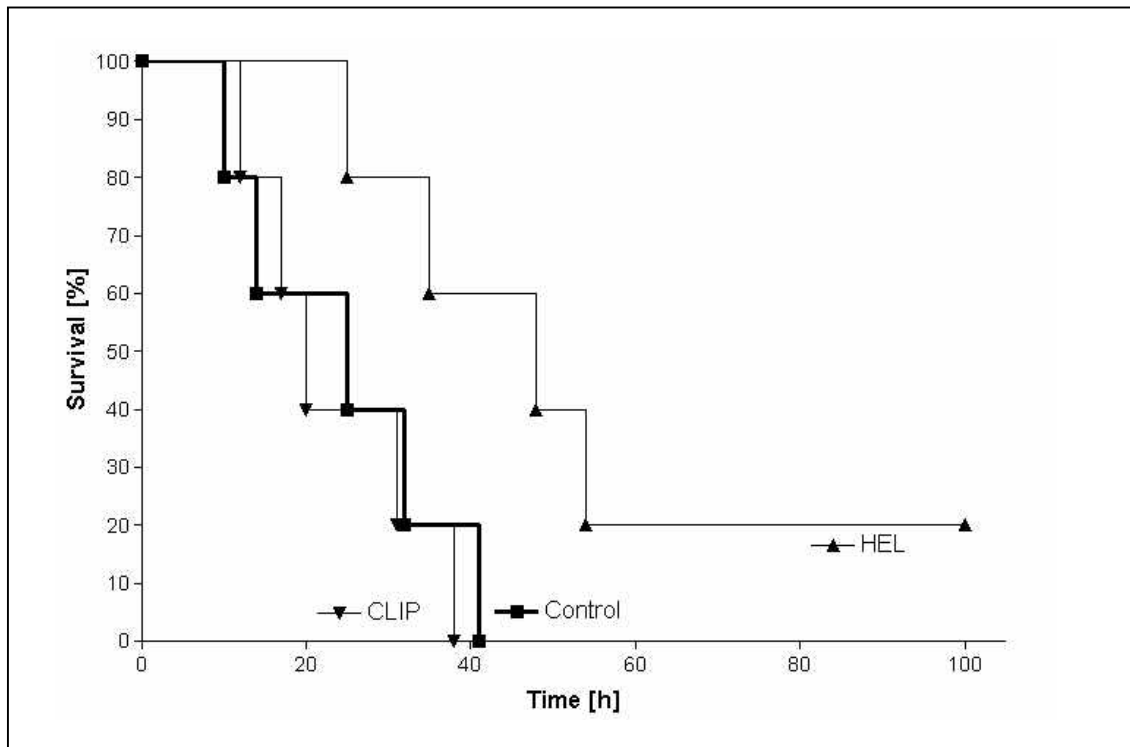


Abb.18: Kaplan-Meier Überlebenskurve der in vivo Versuche mit dem verwendeten Peptid CLIP, dem Protein HEL und der unbehandelten Kontrolle. Jedes Symbol definiert ein Versuchstier. Der Versuchsverlauf der Kontrolle ist nicht signifikant anders als der Verlauf mit CLIP ($p=0.66$).

4.5.2 HEL, in vivo

Das Protein HEL (Hühnerei-Lysozym) unterscheidet sich nach statistischer Analyse (Chi Quadrat=4.332, $p=0.0374$) signifikant von der Kontrolle, bei der in vivo keine Peptide verwendet worden sind. Die mediane Überlebenszeit betrug bei der Kontrolle 25 Stunden, bei intravenöser Gabe des Proteins HEL 48 Stunden.

4.5.3 APE-20, in vivo

APE-20 unterscheidet sich nach statistischer Analyse (Chi Quadrat=2.027, $p=0.1546$) nicht signifikant von der Kontrolle, bei der in vivo keine Peptide verwendet worden sind. Die mediane Überlebenszeit betrug bei der Kontrolle 25 Stunden, bei intravenöser Gabe von APE-20 39 Stunden. In der APE-20 Versuchsgruppe verstarben drei Tiere zu den Zeitpunkten 24h, 27h und 39h.

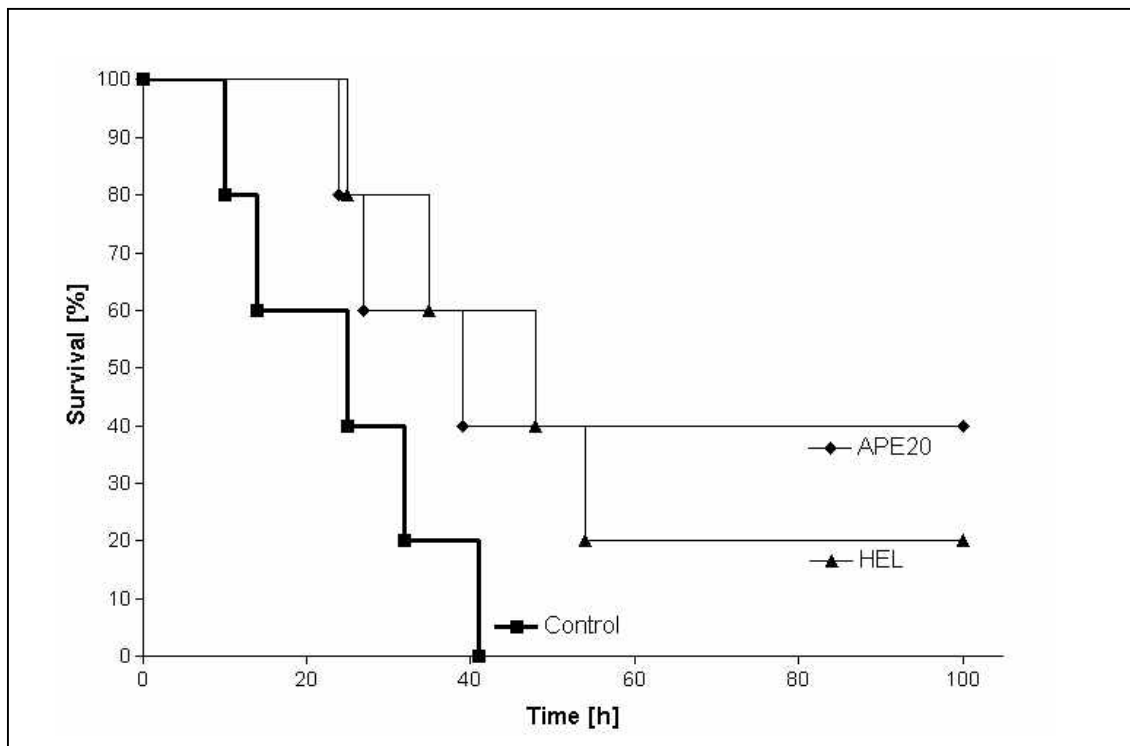


Abb.19: Kaplan-Meier Überlebenskurve der in vivo Versuche mit dem verwendeten Peptid APE-20, dem Protein HEL und der unbehandelten Kontrolle. Jedes Symbol definiert ein Versuchstier. Der Versuchsverlauf der Kontrolle ist nicht signifikant anders als der Verlauf mit APE-20 ($p=0.1546$).

4.5.4 APE-S-T, in vivo

APE-S-T unterscheidet sich nach statistischer Analyse (Chi Quadrat=5.441, $p=0.0197$) signifikant von der Kontrolle, bei der in vivo keine Peptide verwendet worden sind. In der APE-S-T Versuchsgruppe verstarb lediglich ein Tiere nach

18 Stunden. Damit ergibt sich für die Kaplan-Meier Überlebenskurven folgendes Bild:

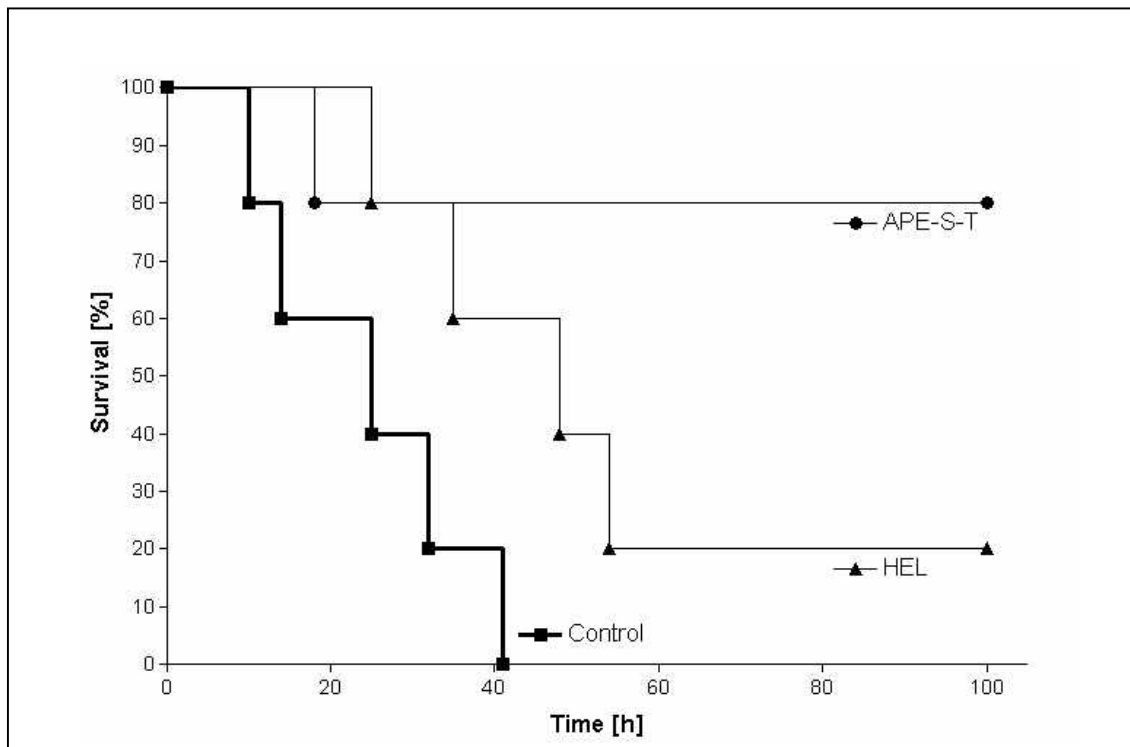


Abb.20: Kaplan-Meier Überlebenskurve der in vivo Versuche mit dem verwendeten Peptid APE-S-T, dem Protein HEL und der unbehandelten Kontrolle. Jedes Symbol definiert ein Versuchstier. Der Versuchsverlauf der Kontrolle ist signifikant anders als der Verlauf mit APE-S-T ($p=0.0197$). Während in der Kontrollgruppe alle Tiere nach 41 Stunden verstorben waren, ist nach der Behandlung mit APE-S-T nur ein Versuchstier nach einem Zeitraum von 18 Stunden verstorben.

4.5.5 TCRBP, in vivo

Das T-Zellrezeptor bindende Peptid (TCRBP) unterscheidet sich nach statistischer Analyse (Chi Quadrat=9.701, $p=0.0018$) hoch signifikant von der Kontrolle, bei der in vivo keine Peptide verwendet worden sind. Die mediane Überlebenszeit betrug bei der Kontrolle 25 Stunden, bei intravenöser Gabe vom T-Zellrezeptor bindenden Peptid verstarben keine Versuchstiere über den gesamten gemessenen Zeitraum von 100 Stunden.

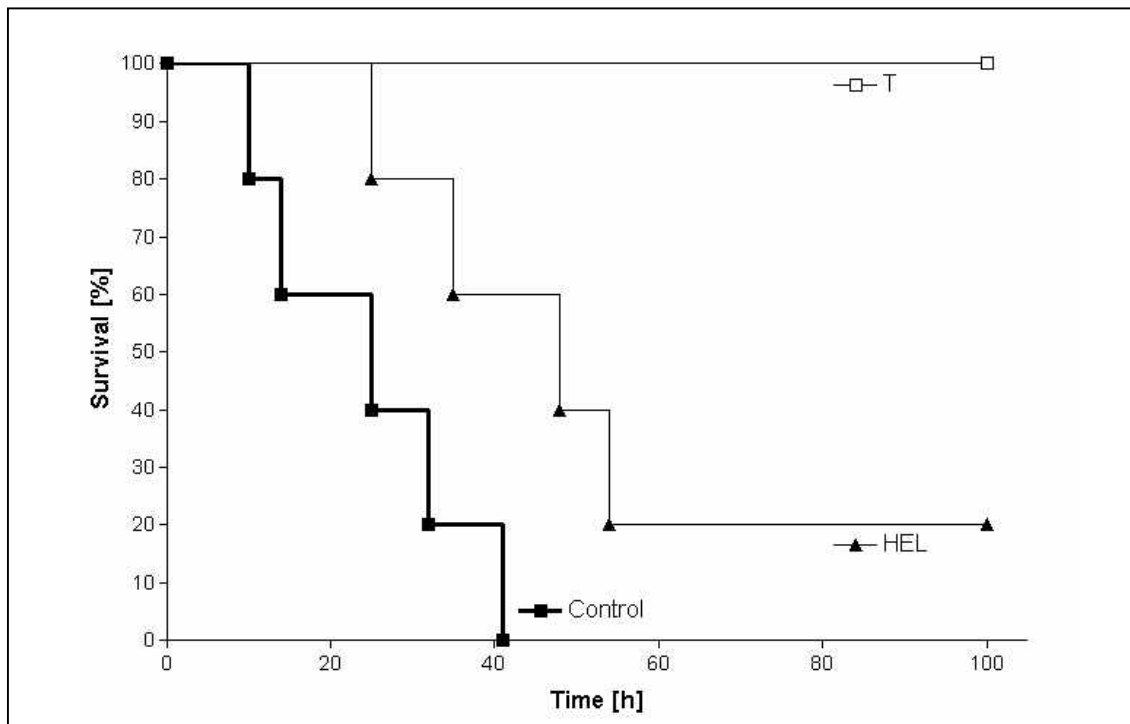


Abb.21: Kaplan-Meier Überlebenskurve der in vivo Versuche mit dem verwendeten Peptid TCRBP, dem Protein HEL und der unbehandelten Kontrolle. Jedes Symbol definiert ein Versuchstier. Der Versuchsverlauf der Kontrolle ist hoch signifikant anders als der Verlauf mit TCRBP ($p=0.0018$). Während in der Kontrollgruppe alle Tiere nach 41 Stunden verstorben waren, ist nach der Behandlung mit TCRBP kein Versuchstier verstorben.

4.5.6 GLAT, in vivo

GLAT unterscheidet sich nach statistischer Analyse (Chi Quadrat=5.068, $p=0.0244$) signifikant von der Kontrolle, bei der in vivo keine Peptide verwendet worden sind. In der mit GLAT behandelten Versuchsgruppe verstarben zwei Tiere zu den Zeitpunkten 28 und 41 Stunden. Damit ergibt sich für die Kaplan-Meier Überlebenskurven folgendes Bild:

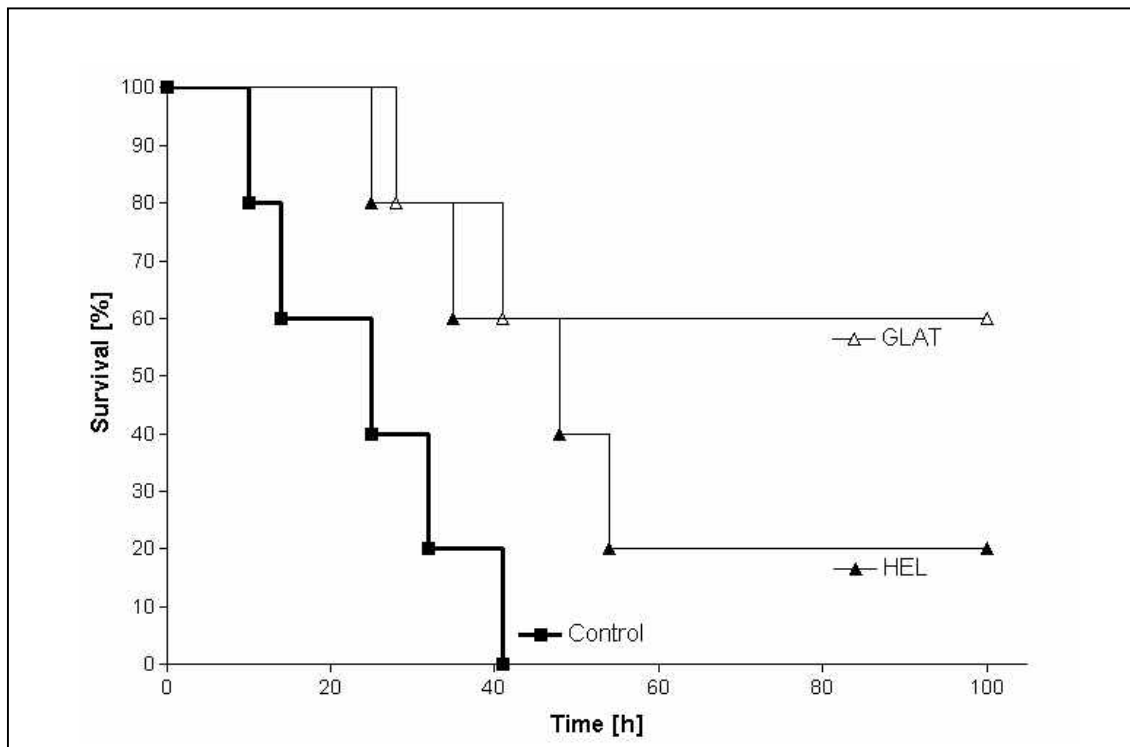


Abb.22: Kaplan-Meier Überlebenskurve der in vivo Versuche mit dem verwendeten Peptid GLAT, dem Protein HEL und der unbehandelten Kontrolle. Jedes Symbol definiert ein Versuchstier. Der Versuchsverlauf der Kontrolle ist signifikant anders als der Verlauf mit GLAT ($p=0.0244$). Während in der Kontrollgruppe alle Tiere nach 41 Stunden verstorben waren, verstarben nach der Behandlung mit GLAT zwei Versuchstiere zu den Zeitpunkten 28 und 41 Stunden.

4.6 Zusammenfassender Vergleich der in vivo eingesetzten Peptide

Verglichen mit den in vitro Experimenten lassen sich auf die in vivo Versuche folgenden Übereinstimmungen finden:

- Das T-Zellrezeptor-bindende Peptid TCRBM ist in vivo und in vitro in der Lage, hoch signifikant eine Superantigen-induzierte T-Zellproliferation zu verhindern.
- Das Peptid GLAT kann zwar in vitro sehr gute Ergebnisse erzielen, ist aber mit durch den Verlust von zwei Versuchstieren zu den Zeitpunkten 28 und 40 Stunden in den in vivo Untersuchungen nicht sehr effektiv.

- CLIP ist sowohl in den durchgeführten in vivo, wie auch in vitro Versuchen der Kontrolle ohne Peptid sehr ähnlich und zeigt keinen inhibierenden Effekt auf Superantigene.
- Das längste synthetisierte Peptid APE-S-T wirkt in vivo und in vitro hoch signifikant im Bezug auf die Inhibition der T-Zellproliferation nach Gabe von Superantigenen.

Eine zusammenfassende Darstellung der in vivo Versuche gibt folgende Abbildung:

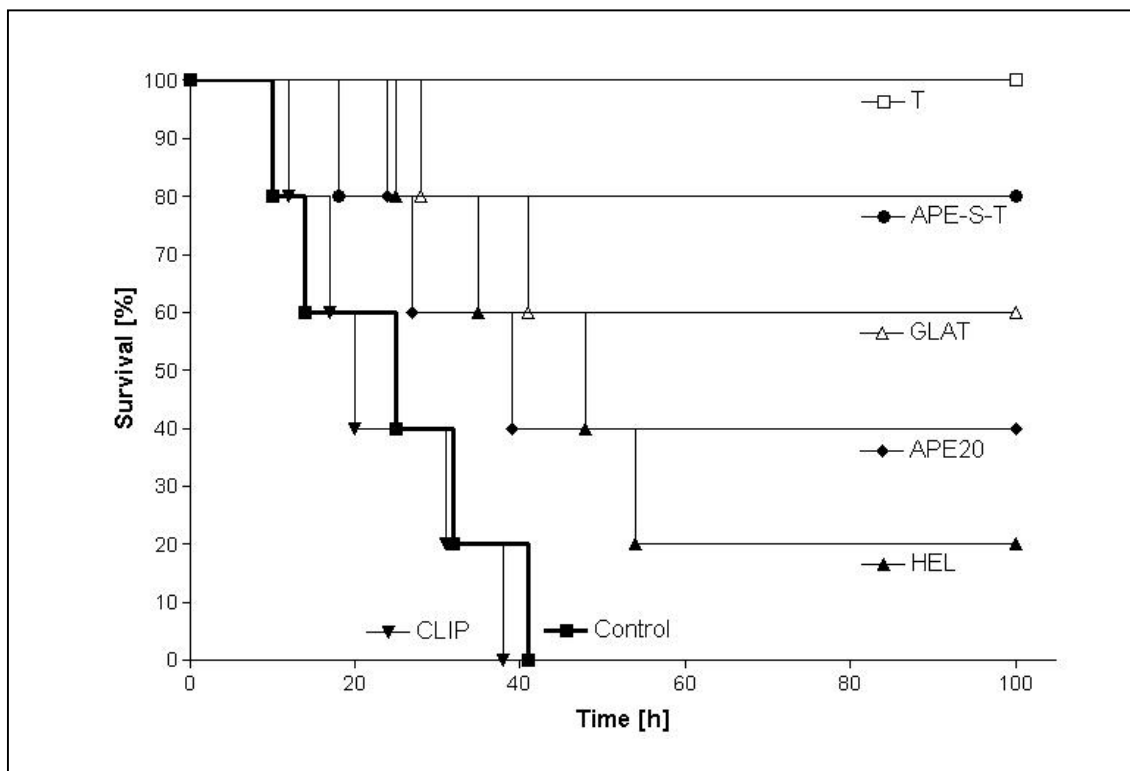


Abb.23: Kaplan-Meier Überlebenskurve der in vivo Versuche mit allen verwendeten Peptiden, sowie den Kontrollen. Jedes Symbol definiert ein Versuchstier. Der Versuchsverlauf der Kontrolle differiert hoch signifikant vom Verlauf Gruppe TCRBP, signifikant vom Verlauf der Gruppen APE-S-T, GLAT und HEL. Der Kontrollgruppenverlauf der Kaplan-Meier Kurven ist nicht signifikant gegenüber CLIP und APE-20.

4.7 Das Internet-Programm EPIPREDICT

Eine zuverlässige Vorhersage und Identifikation von HLA Klasse I und II restringierter T-Zellepitope bildet die Grundlage in zahlreichen aktuellen Bereichen medizinisch-immunologischer Forschung. Für ein eingehendes Verständnis der Immunpathogenese bei malignen Tumoren, Autoimmunerkrankungen, sowie vielfältigen Infektionserkrankungen ist das exakte Verständnis der molekularen Wechselwirkungen innerhalb des MHC-Peptid-Komplexes eine unerlässliche Voraussetzung. In den letzten Jahren wurden daher zahlreiche Methoden zur Beschreibung des Peptid-MHC-Klasse I Komplexes entwickelt. Detaillierte und quantitative Aussagen zur Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen Peptid und MHC-Klasse-II-Molekülen gestalten sich vorwiegend aufgrund großer Längendifferenzen von MHC-Klasse-II Liganden (9-25 AS) als äußerst schwierig. Gleichfalls mangelt es nach wie vor an innovativen Methoden zur Charakterisierung der Antigenerkennung CD4 positiver T-Zellen, die am Anfang der spezifischen Immunantwort bei o.a. Erkrankungen stehen. Einen wesentlichen Beitrag zur Klärung dieser aufgeworfenen Fragen bieten heute moderne Methoden der kombinatorischen Chemie, wie sie ursprünglich auf dem Gebiet der Peptidchemie entwickelt wurden. So können binnen kürzester Zeit mit automatisierten Methoden kombinatorisch aufgebaute Peptidbibliotheken für das Studium zahlreicher biologisch-immunologischer Fragestellungen hergestellt werden. Eine besondere Bedeutung kommt diesen z.T. äußerst komplex aufgebauten Peptidmischungen beim Studium der degenerierten Peptid-MHC-Klasse-II Interaktion zu. Wie im folgenden gezeigt wird, bilden die hieraus gewonnen experimentellen Daten die Grundlage für das von mir neu entwickelte Vorhersageprogramm EPIPREDICT, mit dem sowohl Epitope von T-Helferzellen (CD4), als auch MHC-Klasse-II restringierte Peptidliganden aus jedem gewünschten Protein identifiziert werden können.

Synthetische Nona – und Undecapeptidbibliotheken im sogenannten „Positional-Scanning Format“ wurden mit der Fmoc- OtBu Strategie in der Abteilung

Organische Chemie, Universität Tübingen von Dr. Burkhard Fleckenstein synthetisiert und durch Massenspektrometrie und Edman- Abbau eingehend charakterisiert. Zum anderen wurden MHC-Klasse-II Moleküle aus der Plasmamembran EBV- transformierter Zellen durch Affinitätschromatografie aufgereinigt. Die Bindung der beschriebenen Teilbibliotheken konnte nun in Konkurrenzexperimenten unter Verwendung biotin- oder fluoreszenzmarkierter Indikatorpeptide quantitativ gemessen werden. Die Stärke der Interaktion hängt hierbei alleine von der Natur und der Sequenzposition des jeweiligen definierten AS- Restes ab. Die aus allen 180 (20*9 AS) Teilbibliotheken gewonnenen quantitativen Daten wurden nun in einer zweidimensionalen Matrix zusammengefasst und beschreiben detailliert die allelspezifische Wechselwirkung von Peptidliganden mit dem untersuchten MHC-Klasse-II Antigen. Sämtliche hierzu benötigten Methoden der Peptidchemie, sowie die benötigten Assaybedingungen sind etabliert und lassen sich problemlos auf MHC-Klasse-II Allele unterschiedlicher Spezies (bisher Mensch, Maus, Ratte) übertragen.

In Analogie zu dem geschilderten Vorgehen lassen sich ebenfalls zweidimensionale Matrizen generieren, die die Peptidantigenerkennung humaner CD4 positiver T-Zellen beschreiben. Dabei werden die beschriebenen Teilbibliotheken in Assays mit T-Zellklonen oder Linien eingesetzt und deren Proliferation und/oder Zytokinproduktion gemessen. Folglich liegen nun erstmals Datensätze vor, die sämtliche Wechselwirkungen innerhalb des MHC-Klasse-II Peptidkomplexes quantitativ berücksichtigen. Da sich die Gesamtaffinität eines Peptids zu einem gegebenen MHC-Klasse-II Antigen wahrscheinlich weitgehend aus den Einzelinteraktionen seiner AS-Seitenketten additiv zusammensetzt, kann die Affinität eines jeglichen Nonapeptides direkt aus den experimentell gewonnenen Matrizen ermittelt werden. Die im Kontext dieser Dissertation entwickelte Software EPIPREDICT schiebt, wie auch die Software SYFPEITHI, ein Fenster aus 9 AS über die gesamte AS-Sequenz (< 3000 AS) und ermittelt für jedes daraus ergebene Nonapeptid die Affinität aus den zugrundeliegenden Matrizen. Dazu werden die einzelnen darin

festgehaltenen Beiträge der AS- Seitenketten addiert und dem jeweiligen Peptid zugeordnet. EPIPREDICT listet im folgenden die Peptide entsprechend ihrer vorhergesagten Affinität in absteigender Reihenfolge auf und gibt sie zusammen mit einer grafischen Darstellung der zugehörigen allelspezifischen Matrix aus. Der Anwender wird beim Öffnen des Programms aufgefordert, das der Vorhersage zugrundeliegende MHC-Klasse-II Molekül auszuwählen. Im folgenden wird die Sequenz des Proteins im Einbuchstaben-Code aus einer gängigen Proteindatenbank in EPIPREDICT übernommen. Die Vorhersage wird durch das Bestätigen der gewählten Sequenz automatisch gestartet und das Ergebnis auf Bildschirm oder Drucker ausgegeben. Die Liste der momentan für eine Vorhersage zur Verfügung stehenden MHC-Klasse-II Allele wird von der Abteilung Prof. Jung, Organische Chemie der Universität Tübingen, ständig erweitert und die neuen Datensätze dem Programm zugeführt. Eine Internetversion des Programme EPIPREDICT ist von mir bereits erstellt worden und ist seit Mai 2001 unter der Internetadresse <http://www.epipredict.de> verfügbar. Die Validierung der Vorhersage-Effizienz von EPIPREDICT wurde bisher auf mehreren Wegen vorgenommen. Beim Vergleich der vorhergesagten HLA DR1-Peptidliganden aus dem Nukleoprotein des Masernvirus mit experimentellen Bindungsdaten überlappender Peptide, die die gesamte Sequenz des Proteins umspannten, zeigte sich, dass alle Liganden mit mittlerer und hoher Affinität zum DR1-Molekül von EPIPREDICT vorhergesagt werden. Die Effizienz des neuen Programms wird vor allem deutlich, wenn man die Vorhersage bereits bekannter MHC Klasse II-restringierter T-Zellepitope und Liganden, wie sie z.B. in der SYFPEITHI-Datenbank zusammengefasst sind (<http://www.syfpeithi.de>), als Maßstab setzt. Legt man hierzu die entsprechenden Proteinsequenzen EPIPREDICT zugrunde, zeigt sich, dass mehr als 88% dieser bekannten Epitope und Liganden vorhergesagt werden. Von besonderem Interesse ist, dass für autoreaktive T-Zellklone aus Multiple Sklerose-Patienten nicht nur das bekannte Epitope aus dem basischen Myelinprotein identifiziert wird (MBP 87-99), sondern durch EPIPREDICT eine Reihe weiterer erkannter Peptidantigene vorhergesagt wurde. Diese Peptide,

die nicht nur humanen Ursprungs sind, sondern auch aus bakteriellen und viralen Proteinen stammen, zeigen im T-Zellassay eine bis zu 100 000-fach höhere Aktivität als MBP 87-99. Mit einer unter Visual Basic programmierten Workstation-Version und einer reduzierten Zahl an allelspezifischen Datensätzen wurden bisher zahlreiche Vorhersagen von neuen T-Zellepitopen und MHC Klasse II-Liganden durchgeführt. Die hierbei, oft im Rahmen von Kooperationen, bearbeiteten Fragestellungen ergaben sich nicht nur aus der Grundlagenforschung, wo neben der Identifizierung autoreaktiver Peptide die Vorhersage von Epitopen viralen oder bakteriellen Ursprungs im Vordergrund stand. Dabei kann die Anzahl der in unterschiedlichen Assays zu testenden Peptiden auf bis zu 5% reduziert werden, was sich vor allem signifikant auf die damit verbundenen Kosten niederschlägt. Dies verdeutlicht die Bedeutung von EPIPREDICT auch in ganz unterschiedlichen, anwendungsbezogenen Forschungsgebieten. Der Einsatz der definierten Epitope zu diagnostischen Zwecken sowie als MHC-Blocker oder Antagonisten bei heutigen Ansätzen zu immunspezifischen Therapieformen ist dabei ebenso zu nennen, wie die Entwicklung neuer peptidbasierter Vaccine auf dem Gebiet der Infektionskrankheiten. Die rege Nachfrage nach einer zuverlässigen Methode zur Vorhersage insbesondere von MHC Klasse II-restringierten Epitopen und Liganden unterstreicht die Bedeutung des präsentierten Programms sowohl für die immunologische Grundlagenforschung als auch für anwendungsorientierte Entwicklungen.

4.8 Die Software *Epipredict* – Eine kurze Einführung

Das Softwareprogramm EPIPREDICT wurde sowohl als Version für den Arbeitsplatz unter Visual Basic als EXCEL- Modul programmiert, als auch unter der Internet-Entwicklungssprache ASP (Active Server Pages) für die Verwendung auf einem in erster Linie dafür eingerichteten Internetserver programmiert. Im folgenden sei hier die Internetversion des Programms vorgestellt. Die in der Internet- Version dargestellten zweidimensionalen Matrizen der bereits ermittelten HLA- Daten wurden mittels dem Workstation-

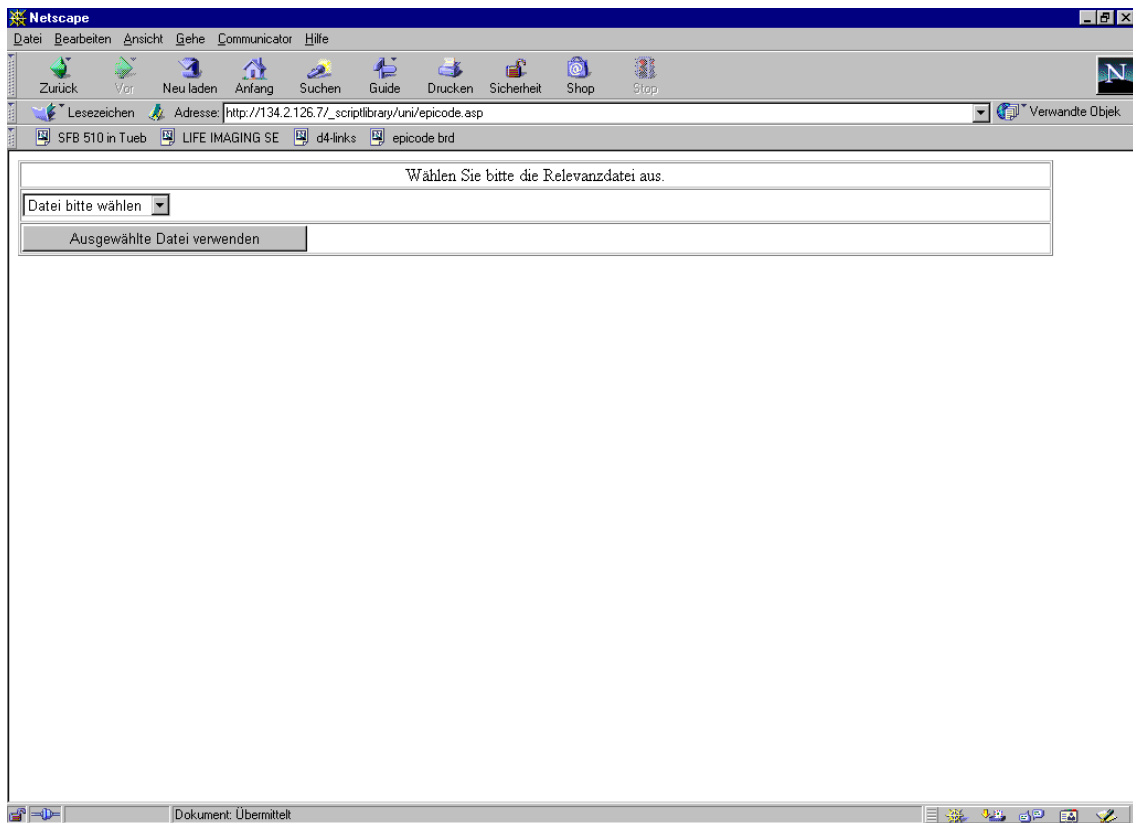
Programm unter EXCEL erstellt und dann als GIF- Datei gespeichert. Es werden im Internet derzeit nur exemplarische Matrizen dargestellt, um einen Schutz der im Hintergrund gegebenen Informationen über die Bindungsaffinitäten der einzelnen Aminosäuren weitestgehend zu gewährleisten.

In der Universitätskinderklinik wurde ein Microsoft NT 4.0 – Internet Information Server installiert, der unter der Internetadresse <http://134.2.126.7/scriptlibrary/uni/epicode.asp> eine deutsche Version und unter http://134.2.126.7/sriptlibrary/uni/epicode_eng.asp eine englische Version des Programms Epipredict Browser-unabhängig weltweit zur Verfügung stellt. Beide Versionen sind als dynamische WEB- Seiten in ASP programmiert und können auf jedem internetfähigen PC unter der Adresse <http://www.epipredict.de> oder über o.a. Adressen abgerufen werden. Getestet wurde die Version unter den Browsern Internet Explorer 5.0, Opera und Netscape Navigator 4.75. Active Server Pages (ASP) wurde deshalb gewählt, da die Scripte auf dem Webserver selbst ausgeführt werden und der Benutzer nur das Ergebnis der Programmbefehle zu Gesicht bekommt und nicht die Programmbefehle selber. Damit ist, in der Kombination mit einem speziellen Verschlüsselungsmodus, der Originalcode des Programms nicht über das Internet abrufbar. Nach dem Aufruf der Epipredict-Seite erscheint folgendes Bild:

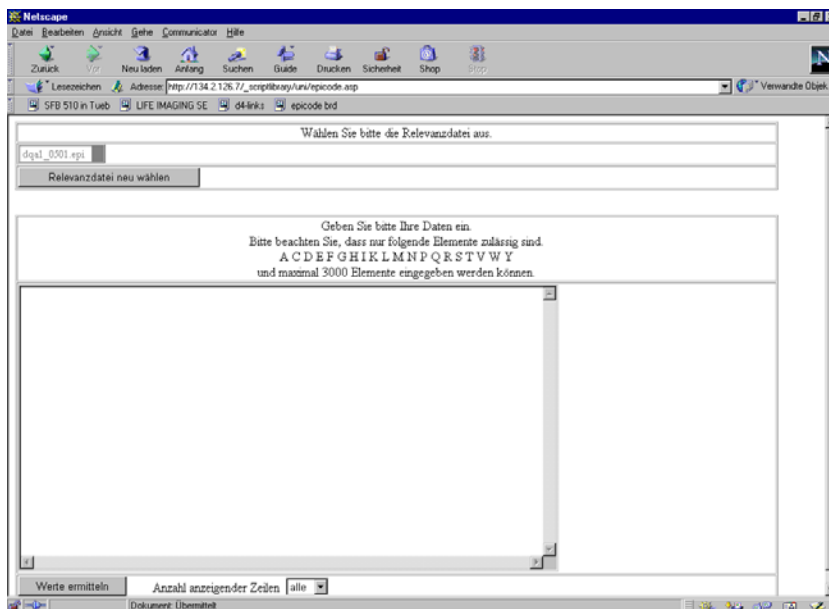


Abb. 17: Die Internetseite <http://www.epipredict.de> als zweisprachige Oberfläche zum Aufruf des Programms EPIPREDICT. Auf der linken Seite kann der Menüpunkt PREDICTION gewählt werden.

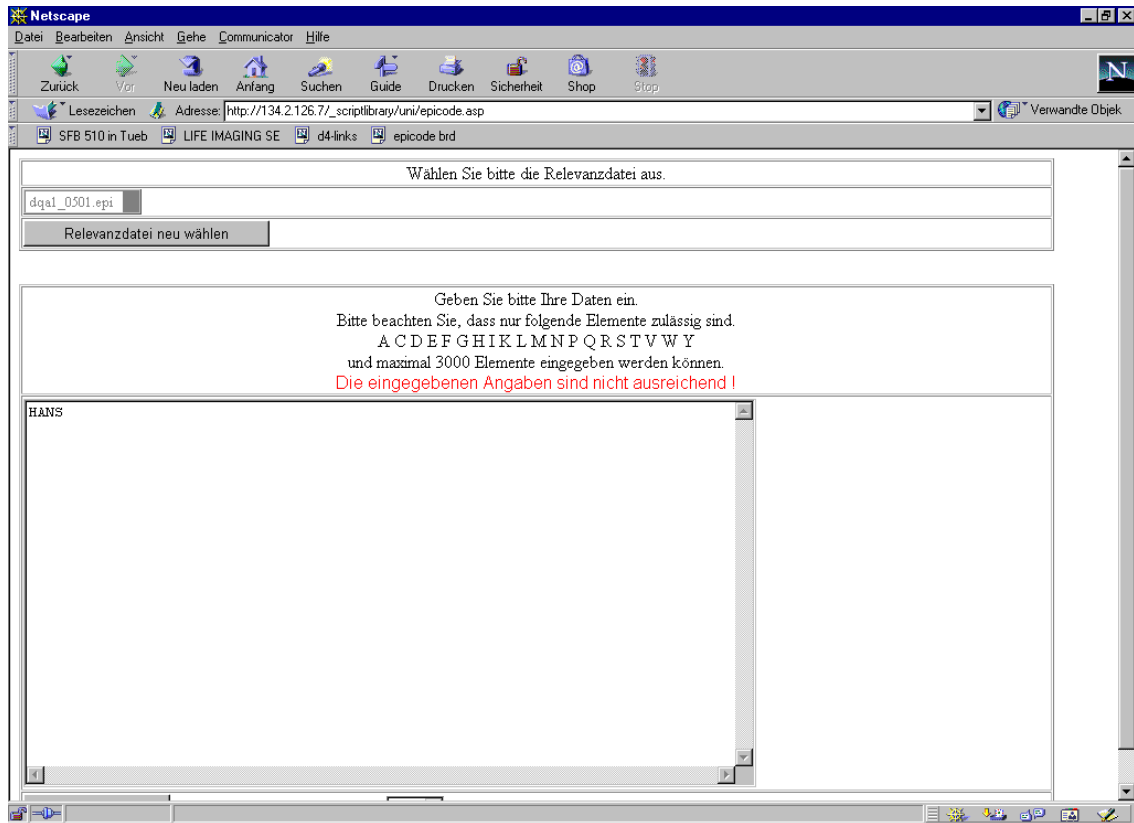
Durch das Wählen der Option PREDICTION in der linken Menüleiste gelangt der Anwender auf eine neue Seite und kann dort neben der englischen Version die deutsche Version von EPIPREDICT wählen. Nach der Wahl wird der Anwender aufgefordert, die entsprechenden HLA- Datei zu wählen:



Nach der Wahl der gewünschten HLA-Datei kann der Anwender jetzt im neuen Fenster die gewünschte zu untersuchende Sequenz eingeben. Dabei erfolgt die Eingabe mittels Grossbuchstaben im Single-Letter-Code.

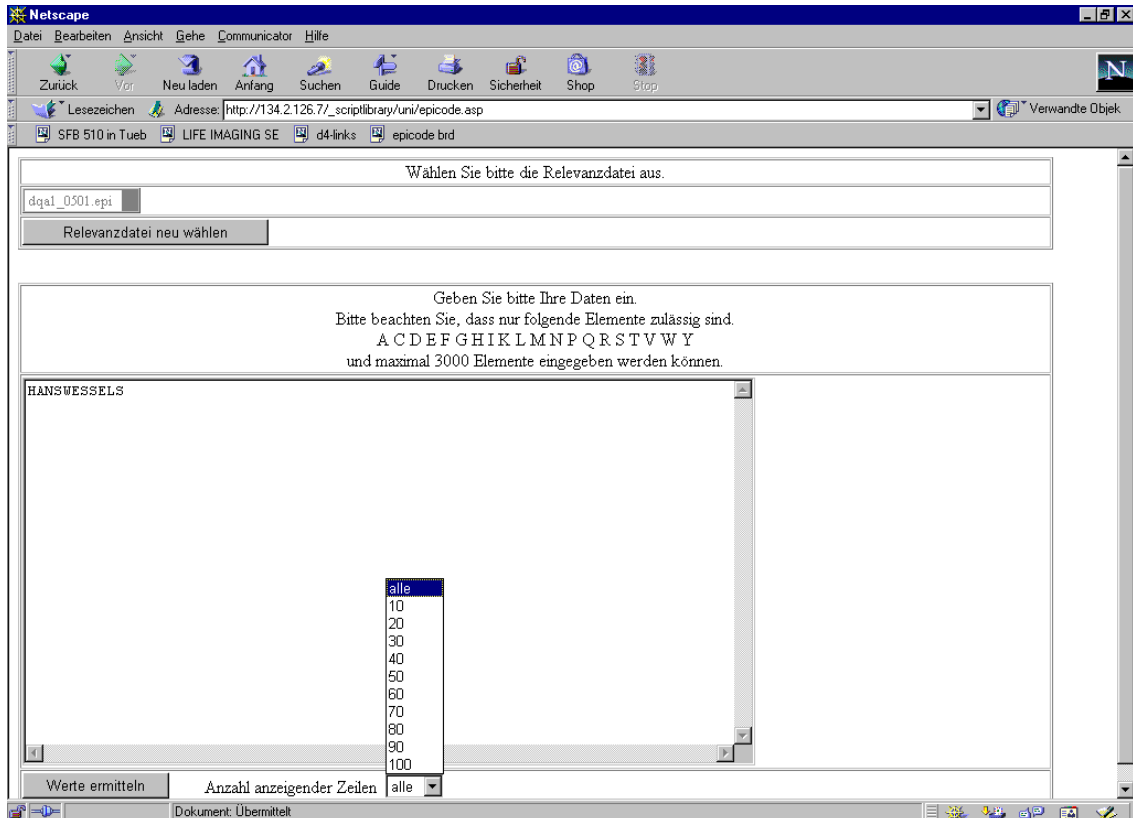


Fehler in der Sequenz durch versehentlich eingegebene Buchstaben quittiert das Programm der Ausgabe der Position innerhalb der Sequenz, an der das falsche Zeichen eingegeben wurde. Ist die Sequenz kleiner als 9 oder größer als 3000 AS, so erfolgt ebenfalls eine Fehlermeldung.

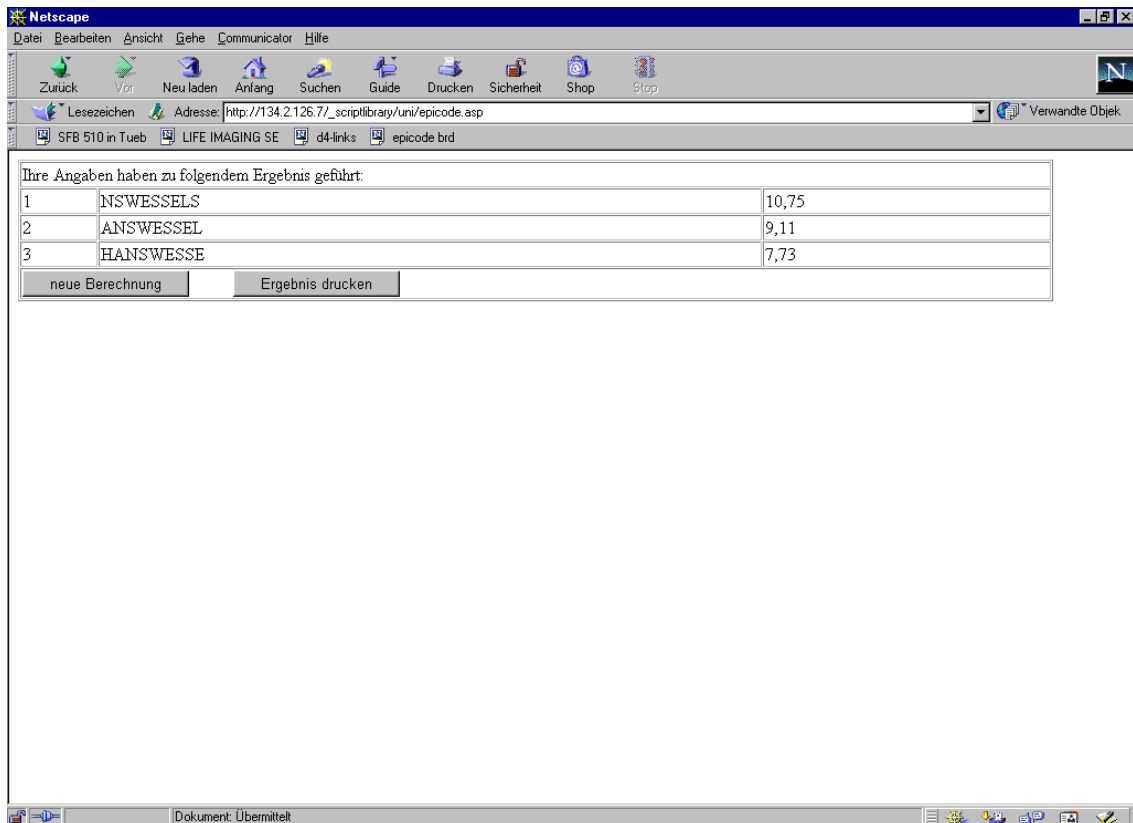


Ist die Sequenz richtig eingegeben worden, kann jetzt die Berechnung der einzelnen 9 Aminosäuren langen Motive gestartet werden. Dazu kann bei längeren Ursprungssequenzen die Wahl zwischen einer Darstellung aller Sequenzen oder der Darstellung von 10-100 Sequenzen, jeweils in 10er Schritten getroffen werden.

Ergebnisse



Nach dieser Wahl werden die Sequenzen in geordneter Reihenfolge auf dem Monitor ausgegeben.



Diese Liste kann jetzt durch die Option „Ergebnis Drucken“ auf dem Drucker des Anwenders ausgegeben werden. Der Internet-Information Server (IIS) in der Universitätskinderklinik ist so ausgelegt, dass ca. 10.000 Besucher gleichzeitig eine Abfrage mit einer mittleren Sequenzlänge von ca. 500 AS simultan durchführen können, ohne dass es zu längeren Wartezeiten (>30 sec.) kommt. Im weiteren werden die Nutzer der Abfragen in einer Datenbank mit Ihren IP-Adressen gespeichert um gegebenenfalls nach einer derzeit angestrebten Patentanmeldung mittels Passwort einen kostenpflichtigen Zugriff auf das Programm zu ermöglichen. Eine Erweiterung des Programms auf MHC-Klasse I- Allele, sowie weiteren MHC-Klasse-II- Allelen ist in der derzeitigen Version des Programms jederzeit möglich. Es ist dazu lediglich die Tabelle mit den Bindungsaffinitäten der einzelnen AS in einem speziellen Format (*.epi) zu erzeugen. Diese Datei braucht dann nur noch in ein bestimmtes Verzeichnis auf die Festplatte des Servers kopiert zu werden und erscheint dann bereits für den Anwender in der Anzeige der auszuwählenden HLA- Motive.

5. Diskussion

5.1 *Molekulare Wechselwirkungen von Superantigenen*

5.1.2 Superantigen und die Bindung an MHC-Klasse-II- Moleküle

Für die Präsentation der Superantigene an T-Zellen ist die Existenz von MHC-Klasse-II- Molekülen auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen von Notwendigkeit.

Jedoch binden Superantigene, im Gegensatz zu herkömmlichen Peptidantigenen außerhalb der Bindungsgrube als vollständiges Protein. Eine initiale Spaltung des Superantigens durch intrazelluläre Prozessierung in Peptidfragmente in den Antigenpräsentierenden Zellen unterbleibt, des weiteren zeigen Superantigene keine MHC-Restriktion. Superantigene besitzen eine unterschiedliche Affinität zu humanen und Maus MHC-Klasse-II- Molekülen mit folgender Hierarchie für humane MHC-Klasse-II- Haplotypen: HLA-DR > HLA-DQ > HLA-DP ⁵⁰.

Eine Unterteilung der Staphylococcus aureus Enterotoxine, die zwischen 40-90% Proteinsequenzhomologie aufweisen, ist in zwei Gruppen möglich.

Die erste Gruppe, bestehend aus SEA, SED, SEE und SEH, benötigen zur erfolgreichen Bindung an MHC-Klasse-II- Moleküle Zn^{2+} - Ionen. Die zweite Gruppe, bestehend aus SEB und SEC1, SEC2 und SEC3 bindet unabhängig von Metallionen.

Die Superantigenbindung zum MHC-Klasse-II- Molekül ist bei den o.a. Typen different. Durch die Auflösung der Kristallstrukturen von SEA und SEB in den letzten Jahren konnten weitere Einsichten in das Bindungsverhalten der Superantigene an das MHC-Klasse-II Molekül gewonnen werden. SEA bindet bivalent an die α - und β -Kette, während SEB monovalent nur mit der α -Kette wechselwirkt ⁵¹. Die Präsenz zweier differenter SEA- Bindungsstellen an MHC-Klasse-II wurde von verschiedenen Gruppen beschrieben ^{52;53}. Dabei wird die erste Bindung über ein Zn^{2+} -Ion vermittelt, das mit hoher Affinität an die

β -Kette des DRB1*0101 Moleküls bindet. Die zweite, niedriger affine Bindungsstelle liegt auf der Kette des gleichen Moleküls. Dabei verstärkt und unterstützt die Bindung eines SEA an die DR1 β -Kette die Bindung eines zweiten SEA-Moleküls an die DR1 α -Kette^{52;53}.

5.1.3 Superantigen und die Bindung an den T-Zell-Rezeptor

Die T-Zell-Erkennung von Superantigenen differiert, wie unter 5.1.1 beschrieben, in zwei wesentlichen Punkten von der Erkennung konventioneller Peptidantigene. Es gibt zum einen keine klassische MHC-Restriktion, zum anderen ist die T-Zell-Spezifität gegenüber Superantigenen bestimmt durch die Existenz des $V\beta$ -Elementes innerhalb des T-Zell-Rezeptors und damit im wesentlichen unabhängig von der α -Kette des T-Zell-Rezeptors.

Hingegen erfolgt die Erkennung der meisten konventionellen Peptidantigene unter Beteiligung beider variablen Regionen des T-Zell-Rezeptors. Dadurch wird in der Regel weniger als eine von 10.000 T-Zellen stimuliert. Im starken Gegensatz dazu binden die Superantigene an die nichtpolymorphe Region innerhalb der $V\beta$ -Domäne. Die wesentlich höhere Zahl reagierender T-Zellen (bis zu 25-30%) auf Superantigene hat ihre Ursache darin, dass beim Menschen nur ca. 60 verschiedene $V\beta$ -Regionen genetisch determiniert sind. Verschiedene Superantigene reagieren dabei im humanen und murinen System mit für sie spezifischen $V\beta$ -Regionen, die in nachfolgender Tabelle aufgeführt sind.

(Dabei reagieren nur die T-Zellen auf ein entsprechendes Superantigen, die auch die respektive $V\beta$ -Region auf ihrer Oberfläche tragen.)

Tabelle 2: Vβ- Spezifitäten verschiedener konventioneller Superantigene entnommen Kotzin et al. ^{54;55}

Toxin	Mensch	Maus
SEA	1.1,5,6,7.3,7.4,9.1,22	1,3,10,11,17
SEB	3,12,14,15,17,20	7,8.1,8.2,8.3
SEC1	3,6.4,6.9,12,15	3,8.2,8.3,11
SEC2	12,13.2,14,15,17,20	3,8.2,10,17
SEC3	3,5,12,13.2	7,8.2
SED	5,12	3,11,17
SEE	5.1,6,8,18	11,15,17
TSST-1	2	15,16

5.1.3 Superantigene und die Interaktion zwischen MHC-Klasse-II und TCR

Während ursprünglich Unsicherheit darüber bestand, ob bei der Superantigen-induzierten T-Zellaktivierung eine Interaktion zwischen TCR und MHC-Klasse-II Molekül stattfindet, konnte dies in neueren Publikationen durch Röntgenstruktur-Analysen des trimolekularen Komplexes bestätigt werden.

5.1.4 Superantigene und die Bedeutung kostimulatorischer Moleküle.

Durch die Bindung des Superantigenes an den trimolekularen Komplex, bestehend aus MHC-Klasse-II, Peptid und TCR kommt es zu einer Reihe von immunologischen Reaktionen. Proliferation von Lymphozyten, gesteigerte Zelladhäsion, Zytokintranskription und Zytokinfreisetzung werden dabei vornehmlich durch die Aktivierung zweier intrazellulärer Proteinkinasen, PTK scr (scr-type Protein Tyrosin Kinase) und PKC (Proteinkinase C) ⁵⁶ hervorgerufen. Eine Quantifizierung der Zytokin-Transkription mit Hilfe der RT-PCR zeigte in SEA aktivierten mononukleären Zellen eine extrem starke Induktion der mRNA die für die Zytokine IL-1 α , IL-1 β , IL2, IL-6, TNF- α , TNF- β , sowie IFN- γ kodieren ⁵⁷. Einer proliferativen Antwort in vivo folgt häufig eine antigenspezifische

Toleranz. Diese Toleranz beinhaltet dabei entweder Anergie oder klonale Elimination (Deletion) der reagierenden Lymphozyten.

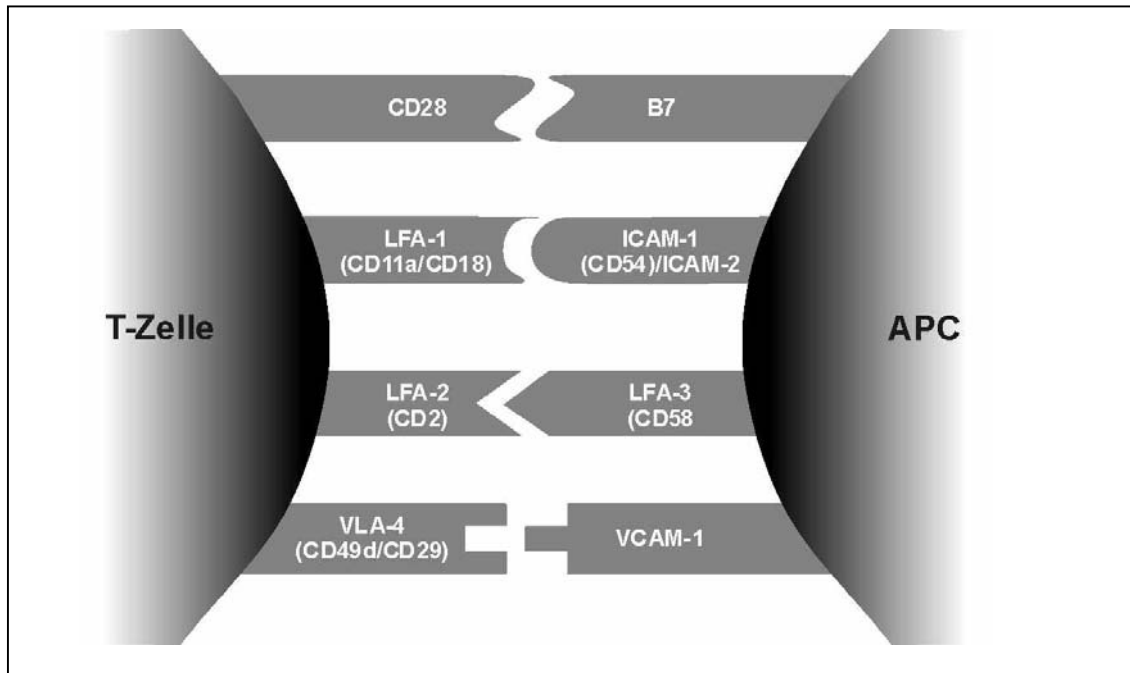


Abb.18: schematische Darstellung der kostimulatorischen Mechanismen zwischen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) und T-Zellen.

Im Gegensatz zu konventionellen Antigenen, die zusätzlich zur Bindung an den TZR weitere kostimulatorische Signale benötigen, ist die Beteiligung dieser Moleküle an der durch Superantigene induzierten T-Zell Antwort noch nicht geklärt und hat besonders im Hinblick auf die mögliche Verwendung von Superantigen-Antikörper-Konjugaten als Tumortheraeutika besondere Bedeutung. Die Mehrzahl der Tumoren trägt keine entsprechenden Adhäsionsmoleküle auf Ihrer Oberfläche. Widersprüchliche Ergebnisse zeigen, dass die Proliferation von T-Zellen durch immobilisiertes SEA ohne zusätzliche Präsentation von Adhäsionsmolekülen erreicht werden konnte ⁵⁸, während andere Arbeitsgruppen auf eine starke Abhängigkeit der T-Zellstimulation von der Interaktion mit LFA-1 und ICAM-1 hinweisen ^{59;60}. Andere Thesen, vertreten v.a. durch die Arbeit von Nickoloff et al. zeigen, dass IFN- γ behandelte, MHC-Klasse-II positive Keratinozyten eine starke T-Zellstimulation nach Gabe von Superantigen zeigen, diese T-Zellstimulation jedoch nicht nach Präsentation

eines konventionellen Antigens hervorgerufen werden konnte und damit zur T-Zellaktivierung durch Superantigene wahrscheinlich andere kostimulatorische Signale benötigt werden, als bei herkömmlicher Stimulation durch Antigene. Die Beteiligung verschiedener kostimulatorischer Moleküle bei der T-Zellaktivierung durch Superantigene ist somit noch unklar, jedoch weisen viele Untersuchungen auf eine Beteiligung von CD28-B7 und LFA1-ICAM1 hin.

5.2 Klinische Anwendung von Peptiden als pharmakologische wirksame Substanzen.

Bei der Generierung der Peptide zur Inhibition einer möglichen ersten Welle oligoklonaler T-Zellstimulation durch endogene Superantigene im Kontext einer Knochenmarktransplantation oder der notwendigen Gabe von sogenannten „T-cell ad back's“ nach erfolgter Stammzelltransplantation stellt sich die Frage nach der Rechtfertigung hier randomisierte Peptidstrukturen wie GLAT (COP-I) einzusetzen, deren eigentlicher Wirkungsmechanismus bis heute ungeklärt ist. COP-I ist als randomisiertes Peptid bereits in mehreren klinischen Anwendungen im Test. Nach einem Bericht von Lisak et al. 1983 zur erfolgreichen Behandlung im murinen Modell der Multiplen Sklerose EAE (experimentelle allergische Encephalomyelitis) ⁶¹ berichteten Baumhefner et al. bereits 1988 vom Einsatz des Copolymers bei humaner multipler Sklerose ⁶². In dieser klinische Studie mit nur fünf Patienten wurde 20 mg/ Tag (3 Patienten) intramuskulär oder 15 mg/ Tag (2 Patienten) subkutan verabreicht. Ziel der Autoren war es über die Blut-Hirnschranke hinweg die IgG- Synthese herunterzufahren. Dieses Ziel konnte nach zweimonatiger Gabe von o.a. Dosen COP-I weder im Hinblick auf neurologische Parameter noch auf endzündliche Parameter der Multiplen Sklerose erreicht werden. Eine erneute klinische Studie aus dem Jahr 1998 am Multiple Sclerosis Center und dem Lady Davis Carmel Medical Center in Haifa, Israel, vorgestellt von der Arbeitsgruppe um Miller ⁶³ zeigt erstaunlicherweise andere Ergebnisse. In dieser zwölf Monate dauernden Studie an zehn Patienten konnten Miller et al. zeigen, dass die mittlere jährliche Rückfallrate von 1.4 vor Behandlung signifikant auf 0.6 während der Behandlung reduziert werden konnte und es zu einer Stabilisierung der Behinderung kam. Hinsichtlich immunologischer Parameter beschreiben die Autoren einen Anstieg der Interleukin-10 Werte im Serum, sowie einer reduzierten Ausschüttung des proinflammatorischen Zytokines TNF- α und einer gesteigerten Produktion des antiinflammatorischen Zytokines IL-4 durch eine Aktivierung von T-Zell Subpopulationen mit einer Verschiebung des T_H1 Profiles in Richtung T_H2. 1995 beschreiben Milo et al. hinsichtlich der Multiplen Sklerose

einen additiven Effekt von Interferon β -1b und GLAT (COP-I) besonders bei HLA-DR^{pos.} und HLA-DQ^{pos.} Zelllinien ⁶⁴. Im letzten Jahr erschien eine Publikation von Kipnis et al. die eine Wirkung des Copolymers sogar bei optischen Neuropathien beschreiben. Die Arbeitsgruppe um Kipnis hatten dabei am Weizmann Institut in Rehovot, Israel, Ratten aktiv mit GLAT immunisiert (add. Adjuvants) oder über adoptiven Transfer COP-I reaktiver T-Zellen behandelt und dabei beschrieben, dass die durch Quetschung der optischen Nerven hervorgerufene sekundäre Degeneration gehemmt werden kann ⁶⁵. Hier spielt die Wechselwirkung zwischen Myelin Basic Protein (Aminosäureposition 84-102) und der Assoziation von GLAT zu HLA-DRB1*1501, wie von Fridkis-Hareli beschrieben, sicher ebenfalls eine entscheidende Rolle.

Um einen Ansatz zur Definition der Wirkung von GLAT im trimolekularen Komplex zu geben, habe ich mich in dieser Arbeit entschieden, die randomisierte Aminosäurestruktur durch definierte Strukturen zu ersetzen. Dabei gibt es im Ansatz zwei Möglichkeiten der Generierung. Der sogenannte irrationale Ansatz ist die kombinatorische Peptidchemie. Hierbei handelt es sich um eine moderne aber etablierte Methode zum Auffinden biologisch immunmodulatorisch wirksamer Peptide, wie sie auch bei der Generierung des Copolymer GLAT zum Einsatz kam. Im irrationalen Ansatz durch die kombinatorische Peptidchemie können heute durch die guten Screeningsysteme mit hohem Durchsatz gute Ergebnisse erzielt werden. Diesem irrationalen Ansatz steht ein rationaler Ansatz durch gezielte Wirkstoffentwicklung gegenüber. Hierbei wird 3D-Modelling am Bildschirm genutzt um über die Rezeptor-Ligand-Interaktion für die jeweilige Fragestellung passende Peptidometika zu erstellen. In der hier vorliegenden Arbeit wurden der irrationale Ansatz mit dem rationalen Ansatz kombiniert. So wurden die vorher als gute Liganden von der SYFPEITHI und EPIPREDICT vorhergesagten Anker CLIP (AS Position 85-101) und Apolipoprotein E (AS Position 268-283) als Binder für das murine H2-A^d gewählt. Mittels der dann erfolgten C- und N-terminalen Verlängerung über den irrationalen Ansatz der Zufallssynthese wurden diese Anker verlängert und schließlich ab der Länge von 10 AS auf C- und N-terminaler Seite gegen definierte Aminosäuren ersetzt.

Bei den so erstellten Peptiden handelt es sich um günstige Wirkstoffe mit guter Reproduzierbarkeit. Das grenzt die hier verwendeten Peptide deutlich gegenüber mittels mikrobiologischen oder zellkulturtechnischen Verfahren erstellten Wirkstoffen ab. So sind die Peptide weitestgehend rein und z.B. frei von Lipopolysaccharin (LPS). Zudem sind die Peptide moderner Analytik gut zugänglich. Eine Analyse erfolgt per Massenspektroskopie und HPLC. Ein weiterer Vorteil ist die schnelle Herstellung an modernen Syntheseautomaten. Bei diesen Peptiden ist keine Notwendigkeit einer permanenten Kühlung vorhanden. Dieses macht Peptide als geeignete und günstige immunmodulatorische Wirksubstanzen auch für die Länder der dritten Welt zugänglich, da eine funktionierende Kühlkette derzeit hier nur schwer vorstellbar ist.

5.3 Synthese von Peptiden mit einer Länge von >35 AS; Probleme mit der Reinheit ?

Die hier vorgestellten Peptide wurden unter linearen Synthesebedingungen hergestellt und nicht mittels Fragmentkondensation gekoppelt. Das wirft die Frage nach der Reinheit der eingesetzten Peptide gerade dann auf, wenn die Peptide eine Länge von mehr als ca. 35 AS überschreiten. Bei einigen der erstellten Peptide liegt die Länge zwischen den limitierenden Faktoren Länge auf der einen Seite und dem damit entstehenden Problem der Reinheit auf der anderen Seite. Da aber die längeren Peptide, wie APE-20 das bindende Motiv mittig nach 20 AS tragen und eine Änderung in der Sequenz der flankierten Seitenketten keine Auswirkung auf die Bindungsaffinität des zentralen Motivs hat, habe ich mich gegen das aufwendigere Verfahren der Fragmentkondensation für das lineare Syntheseverfahren entschieden. Um jedoch einer möglichst hohen Reinheit Rechnung zu tragen, wurden ab der Aminosäureposition 21 doppelte Kupplungszeiten verwendet, ab der Position 35 wurde zudem mit doppelter Kupplung und höheren Überschüssen synthetisiert.

Durch dieses Verfahren zeigten nichtrandomisierte Peptide einheitlich eine Reinheit über 90%. Bei den mit randomisierten Flanken versehenen Peptiden eignen sich herkömmliche Verfahren zur Charakterisierung der Reinheit in der Peptidchemie nicht um diese Ligandengemische (kein HPLC charakteristischer Peak zu erwarten) zu untersuchen. Eine leichte Verunreinigung (mögliche nichtspezifische Peptidsequenzen) sind bei diesen längeren Peptiden nicht problematisch, da die Aktivitäten der Peptide logarithmisch zu betrachten sind, und es somit kaum ins Gewicht fällt, ob ein Peptid eine Reinheit von 90% oder 95% aufweist. So wurde bei diesen längeren Peptiden nur mittels MALDI-TOF und Elektrospray-Analyse der Massenbereich der enthaltenen Produkte kontrolliert.

5.4 Bindung der unterschiedlichen Peptide an das definierte MHC-Klasse-II.

Durch die Verwendung der Aminosäuren E, K, A und Y beim randomisierten synthetisch erstellten Copolymer „GLAT“ wird eine Promiskuität für verschiedene MHC-Moleküle, sowohl bei der Maus als auch beim Menschen, erreicht. Da aber die Bindungssequenzen dieses Peptides immer anders aussehen und eine Röntgenstrukturanalyse dieses Peptides aufgrund seiner Randomisierung nicht möglich ist, kann eine Bindung an MHC-Klasse-II zwar mit einer hohen Wahrscheinlichkeit angenommen werden, doch es ist nicht klar an welcher Position dieses Peptid nun am gegebenen MHC bindet. Da mit zunehmender Länge der verwendeten Peptide auch die Inhibierung der Superantigen –induzierten T-Zellproliferation zunahm, kann bei GLAT davon ausgegangen werden, dass neben der eigentlichen Bindung des Peptides in die MHC-Klasse-II Grube zudem von einem Effekt durch die „Überhänge“ ausgegangen werden kann. Zudem könnte der Effekt durch eine zusätzliche Bindung von GLAT- Überhängen an die T-Zelle verstärkt werden. Betrachtet man sich das T-Zellrezeptor bindende Peptid **YNK-KKA-TVQ-ELD**, so könnte durch die randomisierte Bindung der Aminosäuren E, K, A und Y im GLAT auch eine hypothetische Sequenz **Yxx-KKA-xxx-Exx** möglich sein und damit bereits

50% der im T-Zellrezeptor bindenden Motive vorhandenen Aminosäuren gegeben sein. Bei GLAT als synthetischem Copolymer kommen daher verschiedene Inhibitionsmöglichkeiten zusammen:

- Bindung an das gegebene MHC-Klasse-II durch geeignete Aminosäuren, die randomisiert vorliegen.
- Behinderung der Bindung des Superantigenes an den Trimolekularen Komplex aus T-Zelle, Peptid und MHC-Klasse-II durch sterische Hinderung mittels langer C- und/oder N- terminaler Überhänge.
- Verhinderung der Bindung des Superantigenes an die T-Zelle durch Blockade der dafür notwendigen Bindungsstelle mittels randomisierter, ebenfalls bindender Sequenzen.

Diese Möglichkeiten zusammen könnten erklären, warum GLAT derart gute Ergebnisse sowohl in der Reduktion der Superantigen- induzierten T-Zellproliferation, als auch in der Behandlung einer induzierten GVHD im murinen Transplantationssystem (B10.D2 -> BALB/cj) zeigt ². Jedoch ist nach Kenntnis der HLA- Bindungsmotive und Liganden durch Programme wie SYFPEITHI oder EPIPREDICT heute eine Frage zu stellen, ob die Promiskuität zu verschiedenen Allelen oder die spezifische HLA- Bindung im Vordergrund stehen sollten. Für einen möglichen pharmakologischen Ansatz im Rahmen der Prävention einer GVHD am Patienten ist sicher die Erstellung HLA spezifischer Motive anstelle promiskuitiv bindender randomisierter Sequenzen von Vorteil. Eine Mischung definierter kurzer Peptide mit Spezifität für bestimmte HLA- Gruppen (gesichert durch die Wahl definierter, HLA-spezifischer Anker innerhalb der Peptide) würde meines Erachtens spezifischere Effekte erzielen. Zudem sind die in GLAT eingesetzten Aminosäuren nicht für jedes HLA besonders geeignet. Zwar mag die Verwendung von E, K, A und Y für die Bindung an HLA-DRB1*0101 (oder dessen murinem Verwandten H2-A^d) als Ligand günstig erscheinen, da

sowohl ein Y, als auch ein E an Position 1 als recht günstig erscheinen, doch K scheint an keiner der Positionen innerhalb des Motives geeignet zu sein und könnte z.B. gegen Methionin (M) ausgetauscht werden. Jedoch sieht die Verwendung der Aminosäuren bei anderen HLA-Motiven ungünstiger aus.

5.5 Dosis und Wirkung; sind die Peptide im humanen System einzusetzen?

Wie Studien mit Peptiden im Kontext der Multiplen Sklerose, durchgeführt von Baumhefner et al. 1988 und von Bornstein et al. 1988, zeigen konnten sind sowohl subkutan verabreichte tägliche Dosen von 15 mg als auch intramuskulär verabreichte Dosen von 20 mg/Tag COP-I über einen zweimonatigen Zeitraum ohne nennenswerte Nebenwirkungen am Menschen vertragen worden ^{62;66}. Die hier vorgestellten Peptide sind in den in vivo-Studien an Mäusen in Konzentrationen von bis zu 500 µg als tägliche intraperitoneale Injektion ebenfalls ohne sichtbare Nebenwirkungen gut vertragen worden. Eine geringere Konzentration sollte aufgrund der hohen Peptidaseempfindlichkeit von Peptiden zugunsten einer besseren Bioverfügbarkeit nicht appliziert werden.

5.6 CLIP, ein Stabilisator des Trimolekularen Komplexes mit Superantigenen?

Besonders interessant war die Beobachtung, dass das verwendete Peptid CLIP mit einer Länge von nur 17 AS und einer vorhergesagten guten Eigenschaft als Ligand zum gegebenen H2-A^d (siehe SYFPEITHI-Datenbank, H2-A^d Liganden und Epitope) in allen verwendeten Konzentrationen im Superantigen-Surrogatassay einen proliferativen Effekt auf die T-Zellen ausübte. In manchen Assays konnte durch die Zugabe von CLIP in einer Konzentration von 100- 200 µg/ml eine Steigerung der T-Zellproliferation von hochsignifikanten 25% gegenüber der reinen Applikation von Superantigen erzielt werden (siehe Ergebnisse). Wahrscheinlich spricht CLIP mehr T-Zellen aus dem Pool der

eingesetzten T-Zellen an und es kommt zu einem zusätzlichen „Signaling“ durch die Bindung an das Motiv der Invarianten Kette (85-101), CLIP. Möglicherweise stabilisiert die Sequenz in diesem Falle auch den Komplex aus MHC, T-Zelle und Superantigen zusätzlich. Dieser zusätzlich steigernde Effekt scheint jedoch nur auf die Sequenz von CLIP beschränkt zu sein, denn bei Verwendung des ebenfalls von der SYFPEITHI-Datenbank vorhergesagten Peptides Apolipoprotein E (268-283) WANLMEKIQASVATNP trat dieser Effekt nicht auf (unpublizierte Beobachtung). Wird das CLIP-Motiv an beiden Seiten um je 10 AS (randomisiert, verwendete AS: E, K, A und Y) verlängert, so tritt ebenfalls bei allen verwendeten Konzentrationen noch kein inhibierender Effekt ein (der jedoch bei den verwendeten Kontrollen HEL als unspezifischem natürlichem Kontrollpeptid, sowie dem nichtbindenden Polymer TGA von Sigma bereits ab Konzentrationen von 100µg/ml zu beobachten ist). Da dieser Superantigen steigernde Effekt noch nicht beschrieben ist und es sich um ein interessantes Phänomen handelt, sind weitere Untersuchungen in dieser Richtung angestrebt.

5.7 Vorteile und Nachteile der neuen Internetsoftware EPIPREDICT

Epipredict stellt neben verschiedenen bereits etablierten Programmen ein neues Werkzeug zur Vorhersage von T-Zellepitopen und Liganden über das Internet zur Verfügung. Dabei ist bei Epipredict hinsichtlich der Generierung der Bindungsdaten ein Unterschied zu fast allen bekannten Programmen vorhanden. So wurden zur Erstellung der Datensätze synthetische Nona- und Undecapeptidbibliotheken im „Positional-Scanning Format“ mittels Fmoc-OtBu Strategie synthetisiert und charakterisiert. In einem zweiten Schritt konnte die Stärke der Interaktion der AS an definierten Positionen mittels Verwendung biotin- oder fluoreszenzmarkierter Indikatorpeptide kompetitiv gemessen werden. Damit sind die in Epipredict vorgestellten Datensätze jederzeit wissenschaftlich exakt reproduzierbar und aufgrund der Wertung der Bindungsaffinitäten sind einzelne Epitope und Liganden auch untereinander

direkt vergleichbar. Dieses Verfahren und der damit verbundenen Vorteil der guten Reproduzierbarkeit bringt den Nachteil der arbeits- und kostenintensiven Erstellung der Teilbibliotheken mit sich. Ein derzeitiger großer Nachteil des Programms EPIPREDICT ist somit sicher die geringe Auswahl an HLA-Klasse II Motiven. Es ist daher dringend geplant weitere humane und murine MHC-Klasse-II Datensätze zu erstellen und vorhandenen humane MHC-Klasse I Datensätze in eine Erweiterung von EPIPREDICT zu integrieren. Die „offene“ Programmierung lässt die Integration neuer Datensätze in das vorhandene Programm allerdings schnell und weitere Programmierung zu, denn diese Datensätze müssen lediglich in einem festen bestimmten Format in ein Verzeichnis auf dem Server kopiert werden um dann sofort im Internet zur Verfügung zu stehen. Derzeit werden von EPIPREDICT folgende sechs MHC-Typen unterstützt:

- | | |
|-------------------|-------------------|
| 1. HLA-DQ A1*0201 | 2. HLA-DQ A1*0501 |
| 3. HLA-DQ B1*0201 | 4. HLA-DQ B1*0202 |
| 5. HLA-DR B1*0101 | 6. HLA-DR B1*1501 |

Ein zügiger Ausbau des Angebotes ist geplant.

Im direkten Vergleich zwischen SYFPEITHI und EPIPREDICT zeigt sich, daß z.B. bei der Sequenz des humanen Myelin-Basic-Proteins (Swiss Prot Eintrag P02686) aus den 197 Aminosäuren beide Programme in den höchsten Rängen annähernd gleiche Ergebnisse erzielen. Das durch SYFPEITHI ermittelte beste Epitop wird mit der Aminosäuresequenz SKIFKLGGR angegeben. Die gleiche Sequenz errechnet EPIPREDICT für Rang vier. Die von SYFPEITHI auf Rang zwei ausgegebene Sequenz KVPWLKPGR wird auch von EPIPREDICT auf Platz eins vorhergesagt. EPIPREDICT gibt jedoch zwischen Rang eins und vier zwei von SYFPEITHI nicht ermittelte Sequenzen aus, die mit RFSWGAEGQ und TASTMDHAR angegeben werden. Die von SYFPEITHI ermittelten besten 10 Epitope werden jedoch auch bei EPIPREDICT unter den ersten 80 Epitopen gelistet. EPIPREDICT kann daher hinsichtlich der MHC-Klasse II Epitop Vorhersage als sinnvolle Ergänzung zu SYFPEITHI verstanden werden.

6. Epipredict Quellcode (ASP)

```
<%@ Language=VBScript %>
<SCRIPT id=DebugDirectives runat=server language=javascript>
// Set these to true to enable debugging or tracing
@set @debug=false
@set @trace=false
</SCRIPT>

<% ' VI 6.0 Skript-Objektmodell aktiviert %>
<!--#include file=" ../_ScriptLibrary/pm.asp"-->
<% if StartPageProcessing() Then Response.End() %>
<FORM name=thisForm METHOD=post>
<HTML>
<HEAD>
<!-- #INCLUDE FILE="epicfg.inc" -->
<OBJECT RUNAT=server PROGID=Scripting.FileSystemObject id=apiobject>
</OBJECT>
<META NAME="GENERATOR" Content="Johannes Wessels">
<SCRIPT LANGUAGE=vbscript RUNAT=Server>
function fu_startpage()
if apilistbox.getCount() = 0 then
    ' bei dieser Funktion muss die Datei epicfg angepasst werden
    ' Vorteil hier, man kann einen Namen unabhängig vom
    ' Dateinamen angeben.
    fu_hole_dateien(apilistbox)
    *****
    ' bei dieser Function werden die Dateien aus dem Unterverzeichnis
    ' gelesen
    fu_DateiausVerz()
end if
end function

function fu_DateiausVerz()
Dim i
SET folder = apiobject.GetFolder(epipfad)
i=1
apilistbox.addItem "Datei bitte wählen", "--leer--",0
for each datei in folder.files
    if right(datei.Name,4) = ".epi" then
        apilistbox.addItem datei.Name,datei.Name,i
        i=i+1
    end if
next
end function

function fu_apidatei_zerlegen()
```

```
DIM strPfad
DIM I
DIM Y
DIM strHalter
DIM strGelesen
strPfad=epipfad & apilistbox.getValue(apilistbox.selectedIndex)
I = 0
SET apitext = apiobject.OpenTextFile(strPfad)
if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
  'Debug Möglichkeit
  Response.Write("Eingelesene Dateizeilen</br>")
end if
while not apitext.AtEndOfStream
  strGelesen=apitext.ReadLine
  if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
    'Debug Möglichkeit
    Response.Write(strGelesen & "</br>")
  end if
  'zerteilt den gelesenen String
  ' mit dem Trenner ";"
  strHalter=split(strGelesen, ";")
  ' übergibt das Ergebnis in epiInhalt
  for y = 1 to 10
    epiInhalt(I,Y)=strHalter(y)
  next
  i = i +1
wend
apitext.close
end function

function fu_werte_pruefen()
' Hier wird geprüft ob die eingegeben Zeichen
' stimmen. Wenn nicht wird ein Infotext gebracht
DIM strWerte ' Inhalt der textbox
DIM prfChar ' wird zur Prüfung des einzelnen Zeichens benötigt
DIM prfZeichen ' beinhaltet die möglichen Zeichen
DIM i ' zähler
DIM iFehler ' wird für den fehlertext benötigt
DIM strInfo ' Infotext
DIM zBruch ' damit zeilenumbruch eingefügt wird
iFehler=""
prfZeichen="ACDEFGHIKLMNPQRSTVWY"
strWerte=txtdaten.value
if strWerte="" then
  strFehler="Es wurden keine Angaben gemacht !</br>"
  lblInfotext.show
  lblInfotext.setCaption(strFehler)
  thisPage.setState "fmepicode_formmode","datenblock"
exit function
```

```
elseif len(strWerte) < 9 then
    strFehler="Die eingegebenen Angaben sind nicht ausreichend !</br>"
    lblInfotext.show
    lblInfotext.setCaption(strFehler)
    thisPage.setState "fmepicode_formmode","datenblock"
    exit function
end if
zBruch=1
for i = 1 to len(strWerte)
    prfChar = mid(strWerte,i,1)
    if instr(1,prfZeichen,prfChar)= 0 then
        iFehler=iFehler & i & ";"
        zBruch=zBruch+1
        ' Bei vielen Fehlern, wird die Zeile sonst zu lang
        ' daher Zeilenumbruch einfügen.
        if zBruch=20 then
            iFehler=iFehler & "</BR>"
            zBruch = 1
        end if
    end if
end if
next
if not iFehler = "" then
    strFehler="An folgenden Stellen sind fehlerhafte Zeichen:</br>"
    strFehler=strFehler & iFehler
    lblInfotext.show
    lblInfotext.setCaption(strFehler)
    thisPage.setState "fmepicode_formmode","datenblock"
else
    'Setze nun das Datei auswahlfeld
    ' auf inaktiv
    lblInfotext.hide
    ' zerlege nun in Datenblöcke
    fu_werte_datenblock()
end if
end function

function fu_werte_datenblock()
DIM i ' zähler
DIM iAnzahl ' wieviele Datenblöcke
DIM iLaenge
DIM strWerte
DIM abwo
strWerte=txtdaten.value
' hier wird berechnet und geprüft wie viele
' Datenblöcke genommen werden
iAnzahl=(len(strWerte)/9)
iAnzahl=cint(iAnzahl) ' damit ein ganzer Wert entsteht
' jetzt wird geprüft ob der ganze Wert
' aufgerundet oder abgerundet wurde
```

```
if (iAnzahl*9) > len(strWerte) then
    iAnzahl=(iAnzahl-1)
end if
' Die maximale Anzahl ist 3000 Zeichen
' somit kann der ganze Wert nicht grösser
' als 333*9 = 2997 Zeichen sein.
' sind mehr vorhanden wird das ganze auf 333 gekürzt
' und der rest ignoriert
if iAnzahl > 333 then
    iAnzahl=333
end if
if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
    'Debug Möglichkeit
    Response.Write("Folgende Blöcke wurden eingelesen</br>")
end if
' jetzt teile das ganze in 9er Blöcke
for i = 1 to iAnzahl
    if i = 1 then
        strDBlock(i,0)= left(strWerte,9)
        abwo=(10)
    else
        strDBlock(i,0)=mid(strWerte,abwo,9)
        abwo=(i*9)+1
    end if
    if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
        'Debug Möglichkeit
        Response.Write(strDBlock(i,0) & "</br>")
    end if
next
fu_werte_ermitteln()
end function

function fu_werte_ermitteln()
    DIM i 'zähler
    DIM y ' zähler
    DIM dblWert
    DIM dblErg
    fu_apidatei_zerlegen()
    i=1
    ' mach das ganze solange bis du auf einen leeren
    ' Eintrag kommst
    do while not strDBlock(i,0)=""
        ' setze die Ergebnisvariable auf 0
        dblErg = 0
        if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
            'Debug Möglichkeit
            Response.Write("Errechne Wert</br>")
        end if
        for y = 1 to 9
```



```
' hier wird jeder einzelnen Buchstabe
' durch die Funktion fu_holewert
' mit dem dazugehörigen Wert ermittelt
dblWert=cdbl(fu_holewert(mid(strDBlock(i,0),y,1),y))
' Werte zusammenzählen
dblErg = dblErg + dblWert
if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
  'Debug Möglichkeit
  Response.Write("+ Wert:" & dblWert )
  Response.Write(" ergibt Zwischenwert:" & dblErg & "<br>")
end if
next
' Schreibe nun das Ergebnis in StrDBlock rein
strDBlock(i,1)=dblErg
if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
  'Debug Möglichkeit
  Response.Write("Blocksumme:" & dblErg & "<br>")
  Response.Write("Block Ergebnis:" & strDBlock(i,0) & " " &
strDBlock(i,1) & "<br><br>")
end if
i = i+1
loop

fu_erg_tabelle

end function

function fu_holewert(strChar,iStelle)
DIM x
for x = 0 to 20
  if epiInhalt(x,1) = strChar then ' wert gefunden
    if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
      'Debug Möglichkeit
      Response.Write("Gesucht: " & strChar & " Gefunden: " &
epiInhalt(x,1) & "<br>")
      Response.Write("Stelle: " & iStelle & " Wert: " &
epiInhalt(x,iStelle+1) & "<br>")
    end if
    fu_holewert = epiInhalt(x,iStelle+1)
  exit for
end if
next
end function

function fu_erg_tabelle()
dim i
DIM iPlatz
DIM iZeilen
' Zuerst doppelte bestimmen
```

```
fu_doppelte_bestimmen()
' jetzt sortieren
fu_sortieren()
i=1
' Tabelle aufbauen
Response.Write("<TABLE border=1 cellPadding=1 cellSpacing=1 width=95%
align=left>")
Response.Write("<TR>")
Response.Write("<TD colspan=3>Ihre Angaben haben zu folgendem Ergebnis
geführt:")
Response.Write("</TD>")
Response.Write("</TR>")
' Werte ausgeben
' und zwar rückwärts
' höchster wert zuerst
iPlatz =1
iZeilen=blzeilen.getValue(blzeilen.selectedIndex)
for i = ubound(strDBlock,1) to 1 step -1
    if strDBlock(i,1) = "doppelt" then
        ' Keine mit dem Wert doppelt nehmen
    elseif strDBlock(i,1) = "" then
        ' Keine nehmen die leer sind
    else
        Response.Write("<TR>")
        Response.Write("<TD>" & iPlatz)
        iPlatz=iPlatz +1
        Response.Write("</TD>")
        Response.Write("<TD>")
        Response.Write(strDBlock(i,0))
        Response.Write("</TD>")
        Response.Write("<TD>" & strDBlock(i,1))
        Response.Write("</TD>")
        Response.Write("</TR>")
    end if
    if not iZeilen = "alle" then
        if cint(iPlatz) > cint(iZeilen) then exit for
    end if
next
end function

function fu_doppelte_bestimmen()
DIM prfWert
DIM i
DIM y
' zuerst doppelte raus
' hier wird einfach in feld x,1 ein
' fehlwert geschrieben
i=1
do while not strDBlock(i,0) = ""
```

```
y=i+1 ' damit er nicht von vorne anfängt
do while not strDBlock(y,0) = ""
    If strDBlock(y,0) = strDBlock(i,0) then
        if Request.QueryString("test") = "1234567890" then
            'Debug Möglichkeit
            Response.Write("Doppelt: Stelle" & y & " erkannter
Wert:" & strDBlock(y,0) & " wurde auf doppelt gesetzt<br>")
        end if
        strDBlock(y,1) = "doppelt"
    end if
    y=y+1
loop
i=i+1
loop
end function
```

```
function fu_sortieren()
DIM strTemp(1,1)
DIM i
DIM y
DIM x
y=1
for i = 1 to ubound(strDBlock,1) ' mache solange bis leeres Array
    for y = i+1 to ubound(strDBlock,1)
        if not strDBlock(y,1) = "" then
            if strDBlock(i,1) > strDBlock(y,1) then
                strTemp(1,0) =strDBlock(i,0)
                strTemp(1,1) =strDBlock(i,1)
                '*****
                strDBlock(i,0) =strDBlock(y,0)
                strDBlock(i,1) =strDBlock(y,1)
                '*****
                strDBlock(y,0)=strTemp(1,0)
                strDBlock(y,1)=strTemp(1,1)
                x=x+1
            '
                if x = 50000 then Response.End
            end if
        end if
        if strDBlock(y,0)="" then y = ubound(strDBlock,1)
    next
    '
    if x = 80000 then Response.End
    if strDBlock(i,0)="" then i = ubound(strDBlock,1)
next
end function
```

```
</SCRIPT>
<SCRIPT ID=clientEventHandlersJS LANGUAGE=javascript>
<!--
```

```
function btndruck_onclick() {
    window.print();
}

//-->
</SCRIPT>
</HEAD>
<BODY topMargin=2 leftMargin=2 rightMargin=2 bottomMargin=2>
<%if thisPage.getState("fmepicode_formmode") = "basis" then
    fu_startpage()
elseif thisPage.getState("fmepicode_formmode") = "datenblock" then
    if apilistbox.getValue(apilistbox.selectedIndex) = "--leer--" then
        thisPage.setState "fmepicode_formmode", "basis"
        apilistbox.disabled=false
        btnneuauswahl.hide
        btnauswahl.show
        Response.Write("Sie müssen zuerst eine Relevanzdatei auswählen")
    end if
elseif thisPage.getState("fmepicode_formmode") = "werte" then
    fu_werte_pruefen ()
end if
%>
<%if not thisPage.getState("fmepicode_formmode") = "werte" then %>
<P>
<TABLE align=left border=1 cellPadding=1 cellSpacing=1 width="95%">

<TR>
<TD>
<P align=center>Wählen Sie bitte die Relevanzdatei aus.</P></TD></TR>
<TR>
<TD>
<P align=center>
<!--METADATA TYPE="DesignerControl" startspan
<OBJECT classid="clsid:B5F0E450-DC5F-11D0-9846-0000F8027CA0"
id=apilistbox>
    <PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="1826">
    <PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="556">
    <PARAM NAME="id" VALUE="apilistbox">
    <PARAM NAME="DataSource" VALUE="">
    <PARAM NAME="DataField" VALUE="">
    <PARAM NAME="ControlStyle" VALUE="0">
    <PARAM NAME="Enabled" VALUE="-1">
    <PARAM NAME="Visible" VALUE="-1">
    <PARAM NAME="Platform" VALUE="256">
    <PARAM NAME="UsesStaticList" VALUE="-1">
    <PARAM NAME="CLSize" VALUE="0">
    <PARAM NAME="LocalPath" VALUE="../../">
```

```
</OBJECT>
-->
<!--#INCLUDE FILE="../../../_ScriptLibrary/ListBox.ASP"-->
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript RUNAT=Server>
function _apilistbox_ctor()
{
    CreateListbox('apilistbox', null, null);
}
</script>
<% apilistbox.display %>

<!--METADATA TYPE="DesignerControl" ends-->
</P></TD></TR>
<TR>
<TD>
<P align=center>
<!--METADATA TYPE="DesignerControl" starts-->
<OBJECT classid="clsid:B6FC3A14-F837-11D0-9CC8-006008058731" height=27
id=bttauswahl style="HEIGHT: 27px; LEFT: 0px; TOP: 0px; WIDTH: 224px"
width=224>
    <PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="5927">
    <PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="714">
    <PARAM NAME="id" VALUE="bttauswahl">
    <PARAM NAME="Caption" VALUE="Ausgewählte Datei verwenden">
    <PARAM NAME="Image" VALUE="">
    <PARAM NAME="AltText" VALUE="">
    <PARAM NAME="Visible" VALUE="-1">
    <PARAM NAME="Platform" VALUE="256">
    <PARAM NAME="LocalPath" VALUE="../../../">

</OBJECT>
-->
<!--#INCLUDE FILE="../../../_ScriptLibrary/Button.ASP"-->
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript RUNAT=Server>
function _initbttauswahl()
{
    bttauswahl.value = 'Ausgewählte Datei verwenden';
    bttauswahl.setStyle(0);
}
function _bttauswahl_ctor()
{
    CreateButton('bttauswahl', _initbttauswahl, null);
}
</script>
<% bttauswahl.display %>
```

```
<!--METADATA TYPE="DesignerControl" ends-->
  <!--METADATA TYPE="DesignerControl" startspan
<OBJECT classid="clsid:B6FC3A14-F837-11D0-9CC8-006008058731" height=27
  id=btnneuauswahl style="HEIGHT: 27px; LEFT: 0px; TOP: 0px; WIDTH: 197px"
  width=197>
  <PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="5212">
  <PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="714">
  <PARAM NAME="id" VALUE="btnneuauswahl">
  <PARAM NAME="Caption" VALUE="Relevanzdatei neu wählen">
  <PARAM NAME="Image" VALUE="">
  <PARAM NAME="AltText" VALUE="">
  <PARAM NAME="Visible" VALUE="0">
  <PARAM NAME="Platform" VALUE="256">
  <PARAM NAME="LocalPath" VALUE="../..">

  </OBJECT>
-->
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript RUNAT=Server>
function _initbtnneuauswahl()
{
  btnneuauswahl.value = 'Relevanzdatei neu wählen';
  btnneuauswahl.setStyle(0);
  btnneuauswahl.hide();
}
function _btnneuauswahl_ctor()
{
  CreateButton('btnneuauswahl', _initbtnneuauswahl, null);
}
</script>
<% btnneuauswahl.display %>

<!--METADATA TYPE="DesignerControl" ends-->
&nbsp;
</P></TD></TR></TABLE></P>
<%end if%>
<%if thisPage.getState("fmepicode_formmode") = "datenblock" then%>
<P>&nbsp;</P>
<P>&nbsp;</P>
<P>&nbsp;</P>
<TABLE border=1 cellPadding=1 cellSpacing=1 width="95%" align=left>

<TR>
<TD>
  <P align=center>Geben Sie bitte Ihre Daten ein.<BR>Bitte beachten Sie,
  dass nur folgende Elemente zulässig sind.<BR>A C D E F G H I K L M N P Q R S
T V
```

```
W Y<BR>und maximal 3000 Elemente eingegeben werden können.<BR>
<!--METADATA TYPE="DesignerControl" startspan
<OBJECT classid="clsid:B5F0E460-DC5F-11D0-9846-0000F8027CA0" height=22
id=lblInfotext style="HEIGHT: 22px; LEFT: 0px; TOP: 0px; WIDTH: 52px"
width=52>
  <PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="1376">
  <PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="582">
  <PARAM NAME="id" VALUE="lblInfotext">
  <PARAM NAME="DataSource" VALUE="">
  <PARAM NAME="DataField" VALUE="Label1">
  <PARAM NAME="FontFace" VALUE="Arial">
  <PARAM NAME="FontSize" VALUE="3">
  <PARAM NAME="FontColor" VALUE="Red">
  <PARAM NAME="FontBold" VALUE="0">
  <PARAM NAME="FontItalic" VALUE="0">
  <PARAM NAME="Visible" VALUE="0">
  <PARAM NAME="FormatAsHTML" VALUE="-1">
  <PARAM NAME="Platform" VALUE="256">
  <PARAM NAME="LocalPath" VALUE="../../">

</OBJECT>
-->
<!--#INCLUDE FILE="../../_ScriptLibrary/Label.ASP"-->
<FONT FACE="Arial" SIZE="3" COLOR="Red">
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript RUNAT=Server>
function _initlblInfotext()
{
    lblInfotext.hide();
    lblInfotext.setDataFormatAs('html');
    lblInfotext.setCaption('Label1');
}
function _lblInfotext_ctor()
{
    CreateLabel('lblInfotext', _initlblInfotext, null);
}
</script>
<% lblInfotext.display %>
</FONT>

<!--METADATA TYPE="DesignerControl" endspan-->
  </P></TD></TR>
<TR>
  <TD>
    <!--METADATA TYPE="DesignerControl" startspan
<OBJECT classid="clsid:B5F0E469-DC5F-11D0-9846-0000F8027CA0" height=260
id=txtdaten style="HEIGHT: 260px; LEFT: 0px; TOP: 0px; WIDTH: 480px"

```

```
width=480>
  <PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="12700">
  <PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="6879">
  <PARAM NAME="id" VALUE="txtdaten">
  <PARAM NAME="ControlType" VALUE="1">
  <PARAM NAME="Lines" VALUE="20">
  <PARAM NAME="DataSource" VALUE="">
  <PARAM NAME="DataField" VALUE="">
  <PARAM NAME="Enabled" VALUE="-1">
  <PARAM NAME="Visible" VALUE="-1">
  <PARAM NAME="MaxChars" VALUE="20">
  <PARAM NAME="DisplayWidth" VALUE="80">
  <PARAM NAME="Platform" VALUE="256">
  <PARAM NAME="LocalPath" VALUE="../..">

                                </OBJECT>

-->
<!--#INCLUDE FILE="../../_ScriptLibrary/TextBox.ASP"-->
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript RUNAT=Server>
function _inittxtdaten()
{
    txtdaten.setStyle(TXT_TEXTAREA);
    txtdaten.setRowCount(20);
    txtdaten.setColumnCount(80);
}
function _txtdaten_ctor()
{
    CreateTextbox('txtdaten', _inittxtdaten, null);
}
</script>
<% txtdaten.display %>

<!--METADATA TYPE="DesignerControl" ends-->
</TD></TR>
<TR>
  <TD>
    <P align=center>
      <!--METADATA TYPE="DesignerControl" startspan
<OBJECT classid="clsid:B6FC3A14-F837-11D0-9CC8-006008058731" height=27
id=btnwerte
  style="HEIGHT: 27px; LEFT: 0px; TOP: 0px; WIDTH: 120px" width=120>
  <PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="3175">
  <PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="714">
  <PARAM NAME="id" VALUE="btnwerte">
  <PARAM NAME="Caption" VALUE="Werte ermitteln">
  <PARAM NAME="Image" VALUE="">
  <PARAM NAME="AltText" VALUE="">
  <PARAM NAME="Visible" VALUE="-1">
```



```

    <PARAM NAME="Platform" VALUE="256">
    <PARAM NAME="LocalPath" VALUE="../../../../"></OBJECT>
-->
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript RUNAT=Server>
function _initbtnwerte()
{
    btnwerte.value = 'Werte ermitteln';
    btnwerte.setStyle(0);
}
function _btnwerte_ctor()
{
    CreateButton('btnwerte', _initbtnwerte, null);
}
</script>
<% btnwerte.display %>

<!--METADATA TYPE="DesignerControl" ends-->
                                        Anzahl anzeigender
    Zeilen     
    <!--METADATA TYPE="DesignerControl" startspan
<OBJECT classid="clsid:B5F0E450-DC5F-11D0-9846-0000F8027CA0" height=21
id=blzeilen
    style="HEIGHT: 21px; LEFT: 0px; TOP: 0px; WIDTH: 60px" width=60>
    <PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="1588">
    <PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="556">
    <PARAM NAME="id" VALUE="blzeilen">
    <PARAM NAME="DataSource" VALUE="">
    <PARAM NAME="DataField" VALUE="">
    <PARAM NAME="ControlStyle" VALUE="0">
    <PARAM NAME="Enabled" VALUE="-1">
    <PARAM NAME="Visible" VALUE="-1">
    <PARAM NAME="Platform" VALUE="256">
    <PARAM NAME="UsesStaticList" VALUE="-1">
    <PARAM NAME="CLSize" VALUE="11">
    <PARAM NAME="CLED1" VALUE="alle">
    <PARAM NAME="CLEV1" VALUE="alle">
    <PARAM NAME="CLED2" VALUE="10">
    <PARAM NAME="CLEV2" VALUE="10">
    <PARAM NAME="CLED3" VALUE="20">
    <PARAM NAME="CLEV3" VALUE="20">
    <PARAM NAME="CLED4" VALUE="30">
    <PARAM NAME="CLEV4" VALUE="30">
    <PARAM NAME="CLED5" VALUE="40">
    <PARAM NAME="CLEV5" VALUE="40">
    <PARAM NAME="CLED6" VALUE="50">
    <PARAM NAME="CLEV6" VALUE="50">
    <PARAM NAME="CLED7" VALUE="60">
    <PARAM NAME="CLEV7" VALUE="60">
    <PARAM NAME="CLED8" VALUE="70">

```

```
<PARAM NAME="CLEV8" VALUE="70">
<PARAM NAME="CLED9" VALUE="80">
<PARAM NAME="CLEV9" VALUE="80">
<PARAM NAME="CLED10" VALUE="90">
<PARAM NAME="CLEV10" VALUE="90">
<PARAM NAME="CLED11" VALUE="100">
<PARAM NAME="CLEV11" VALUE="100">
<PARAM NAME="LocalPath" VALUE="../../"/></OBJECT>
-->
<SCRIPT LANGUAGE=JavaScript RUNAT=Server>
function _initblzeilen()
{
    blzeilen.addItem('alle', 'alle');
    blzeilen.addItem('10', '10');
    blzeilen.addItem('20', '20');
    blzeilen.addItem('30', '30');
    blzeilen.addItem('40', '40');
    blzeilen.addItem('50', '50');
    blzeilen.addItem('60', '60');
    blzeilen.addItem('70', '70');
    blzeilen.addItem('80', '80');
    blzeilen.addItem('90', '90');
    blzeilen.addItem('100', '100');
}
function _blzeilen_ctor()
{
    CreateListbox('blzeilen', _initblzeilen, null);
}
</script>
<% blzeilen.display %>

<!--METADATA TYPE="DesignerControl" ends-->
</P></TD></TR></TABLE>
<%end if%>
<P>
</P>
<%if thisPage.getState("fmepicode_formmode") = "werte" then%>
<tr>
<td colspan="3">
<P align=center>
<!--METADATA TYPE="DesignerControl" startspan
<OBJECT classid="clsid:B6FC3A14-F837-11D0-9CC8-006008058731" height=27
id=btnneu style="HEIGHT: 27px; LEFT: 0px; TOP: 0px; WIDTH: 136px"
width=136>
<PARAM NAME="_ExtentX" VALUE="3598">
<PARAM NAME="_ExtentY" VALUE="714">
<PARAM NAME="id" VALUE="btnneu">
<PARAM NAME="Caption" VALUE="neue Berechnung">
<PARAM NAME="Image" VALUE="">
```



```
xtAction_Unmatched=\qshow\q,txtValue_Unmatched=\q()\q),Row5=(txtName_Unmat
hed=\q2\q,txtControl_Unmatched=\qbtnneuauswahl\q,txtAction_Unmatched=\qhide\q,t
xtValue_Unmatched=\q()\q),Row6=(txtName_Unmatched=\q2\q,txtControl_Unmatc
hed=\qapilistbox\q,txtAction_Unmatched=\qdisabled\q,txtValue_Unmatched=\qfalse\q),R
ow7=(txtName_Unmatched=\q3\q),Row8=(txtName_Unmatched=\q4\q)))"></OBJECT
>
-->
<SCRIPT RUNAT=SERVER LANGUAGE="JavaScript">
function _fmepicode_ctor()
{
    thisPage.advise(PAGE_ONINIT, _fmepicode_init);
}
function _fmepicode_init()
{
    if (thisPage.getState("fmepicode_formmode") == null)
        _fmepicode_SetMode("basis");
    btnauswahl.advise("onclick", "_fmepicode_btnauswahl_onclick()");
    btnneuauswahl.advise("onclick", "_fmepicode_btnneuauswahl_onclick()");
    btnwerte.advise("onclick", "_fmepicode_btnwerte_onclick()");
    btnneu.advise("onclick", "_fmepicode_btnneu_onclick()");
}
function _fmepicode_SetMode(formmode)
{
    thisPage.setState("fmepicode_formmode", formmode);
    if (formmode == "basis")
    {
    }
    if (formmode == "datenblock")
    {
    }
    if (formmode == "werte")
    {
    }
}
function _fmepicode_btnauswahl_onclick()
{
    if (thisPage.getState("fmepicode_formmode") == "basis")
    {
        btnauswahl.hide();
        btnneuauswahl.show();
        apilistbox.disabled = true;
        _fmepicode_SetMode("datenblock");
    }
    else _fmepicode_SetMode(thisPage.getState("fmepicode_formmode"))
}
function _fmepicode_btnneuauswahl_onclick()
{
    if (thisPage.getState("fmepicode_formmode") == "datenblock")
    {
```

```
        btnauswahl.show();
        btnneuauswahl.hide();
        apilistbox.disabled = false;
        _fmepicode_SetMode("basis");
    }
    else _fmepicode_SetMode(thisPage.getState("fmepicode_formmode"))
}
function _fmepicode_btnwerte_onclick()
{
    if (thisPage.getState("fmepicode_formmode") == "datenblock")
    {
        _fmepicode_SetMode("werte");
    }
    else _fmepicode_SetMode(thisPage.getState("fmepicode_formmode"))
}
function _fmepicode_btnneu_onclick()
{
    if (thisPage.getState("fmepicode_formmode") == "werte")
    {
        _fmepicode_SetMode("basis");
    }
    else _fmepicode_SetMode(thisPage.getState("fmepicode_formmode"))
}
</SCRIPT>
```

<!--METADATA TYPE="DesignerControl" ends-->

</P>

</BODY>

<% ' VI 6.0 Skript-Objektmodell aktiviert %>

<% EndPageProcessing() %>

</FORM>

</HTML>

7. Literaturverzeichnis

1. Aharoni,R., Schlegel,P.G., Teitelbaum,D., Roikhel,K.O., Chen,Y., Arnon,R., Sela,M., and Chao,N.J.: Studies on the mechanism and specificity of the effect of the synthetic random copolymer GLAT on graft-versus-host disease. *Immunol.Lett.* **58**:79-87, 1997.
2. Schlegel,P.G., Aharoni,R., Chen,Y., Chen,J., Teitelbaum,D., Arnon,R., Sela,M., and Chao,N.J.: A synthetic random basic copolymer with promiscuous binding to class II major histocompatibility complex molecules inhibits T-cell proliferative responses to major and minor histocompatibility antigens in vitro and confers the capacity to prevent murine graft-versus-host disease in vivo [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1996 aUG 6;93(16):8796]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:5061-5066, 1996.
3. Miconnet,I., Roger,T., Seman,M., and Bruley,R.M.: Critical role of endogenous Mtv in acute letal graft-versus-host disease. *Eur.J.Immunol.* **25**:364-368, 1995.
4. Rammensee,H.G., Kroschewski,R., and Frangoulis,B.: Clonal anergy induced in mature V beta 6+ T lymphocytes on immunizing Mls-1b mice with Mls-1a expressing cells. *Nature* **339**:541-544, 1989.
5. Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C.: Immunological surveillance against altered self components by sensitised T lymphocytes in lymphocytic choriomeningitis. *Nature* **251** :547-548, 1974.

6. Zinkernagel,R.M. and Doherty,P.C.: Characteristics of the interaction in vitro between cytotoxic thymus-derived lymphocytes and target monolayers infected with lymphocytic choriomeningitis virus. *Scand.J.Immunol.* **3**:287-294, 1974.
7. Whetsell,M., Mosley,R.L., Whetsell,L., Schaefer,F.V., Miller,K.S., and Klein,J.R.: Rearrangement and junctional-site sequence analyses of T-cell receptor gamma genes in intestinal intraepithelial lymphocytes from murine athymic chimeras. *Mol.Cell Biol.* **11**:5902-5909, 1991.
8. Wood,C. and Tonegawa,S.: Diversity and joining segments of mouse immunoglobulin heavy chain genes are closely linked and in the same orientation: implications for the joining mechanism. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **80**:3030-3034, 1983.
9. Davis,M.M. and Bjorkman,P.J.: T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition [published erratum appears in Nature 1988 Oct 20;335(6192):744]. *Nature* **334**:395-402, 1988.
10. Littman,D.R.: The structure of the CD4 and CD8 genes. *Annu.Rev.Immunol.* **5**:561-584, 1987.
11. Gabert,J., Langlet,C., Zamoyska,R., Parnes,J.R., Schmitt-Verhulst,A.M., and Malissen,B.: Reconstitution of MHC class I specificity by transfer of the T cell receptor and Lyt-2 genes. *Cell* **50**:545-554, 1987.

12. Fisch,P., Meuer,E., Pende,D., Rothenfusser,S., Viale,O., Kock,S., Ferrone,S., Fradelizi,D., Klein,G., Moretta,L., Rammensee,H.G., Boon,T., Coulie,P., and van der,B.P.: Control of B cell lymphoma recognition via natural killer inhibitory receptors implies a role for human Vgamma9/Vdelta2 T cells in tumor immunity. *Eur.J.Immunol.* **27**:3368-3379, 1997.
13. White,J., Herman,A., Pullen,A.M., Kubo,R., Kappler,J.W., and Marrack,P.: The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* **56**:27-35, 1989.
14. Bohley,P.: Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins. *Biol.Chem.* **377**:425-435, 1996.
15. Niedermann,G., Butz,S., Ihlenfeldt,H.G., Grimm,R., Lucchiari,M., Hoschutzky,H., Jung,G., Maier,B., and Eichmann,K.: Contribution of proteasome-mediated proteolysis to the hierarchy of epitopes presented by major histocompatibility complex class I molecules. *Immunity.* **2**:289-299, 1995.
16. Song,R. and Harding,C.V.: Roles of proteasomes, transporter for antigen presentation (TAP), and beta 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigens via an alternate class I MHC processing pathway. *J.Immunol.* **156**:4182-4190, 1996.
17. Uebel,S., Meyer,T.H., Kraas,W., Kienle,S., Jung,G., Wiesmuller,K.H., and Tampe,R.: Requirements for peptide binding to the human transporter associated with antigen processing revealed by peptide scans and complex peptide libraries. *J.Biol.Chem.* **270**:18512-18516, 1995.

18. Gordon,P.B. and Seglen,P.O.: Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **151**:40-47, 1988.
19. Chicz,R.M., Urban,R.G., Gorga,J.C., Vignali,D.A., Lane,W.S., and Strominger,J.L.: Specificity and promiscuity among naturally processed peptides bound to HLA-DR alleles. *J.Exp.Med.* **178**:27-47, 1993.
20. Koppelman,B., Zimmerman,D.L., Walter,P., and Brodsky,F.M.: Evidence for peptide transport across microsomal membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **89**:3908-3912, 1992.
21. Knight,S.C., Stagg,A., Hill,S., Fryer,P., and Griffiths,S.: Development and function of dendritic cells in health and disease. *J.Invest Dermatol.* **99**:33S-38S, 1992.
22. Chesnut,R.W., Colon,S.M., and Grey,H.M.: Antigen presentation by normal B cells, B cell tumors, and macrophages: functional and biochemical comparison. *J.Immunol.* **128**:1764-1768, 1982.
23. Stingl,G., Katz,S.I., Shevach,E.M., Wolff,S.E., and Green,I.: Detection of Ia antigens on Langerhans cells in guinea pig skin. *J.Immunol.* **120**:570-578, 1978.
24. Stingl,G., Katz,S.I., Abelson,L.D., and Mann,D.L.: Immunofluorescent detection of human B cell alloantigens on S-Ig-positive lymphocytes and epidermal Langerhans cells. *J.Immunol.* **120**:661-664, 1978.
25. Hirschberg,H., Braathen,L.R., and Thorsby,E.: Antigen presentation by vascular endothelial cells and epidermal Langerhans cells: the role of HLA-DR. *Immunol.Rev.* **66** :57-77, 1982.

26. Fontana,A. and Grob,P.J.: Lymphokines and the brain. *Springer Semin.Immunopathol.* **7**:375-386, 1984.
27. Fontana,A., Fierz,W., and Wekerle,H.: Astrocytes present myelin basic protein to encephalitogenic T-cell lines. *Nature* **307**:273-276, 1984.
28. Gosselin,E.J. and Parker,D.C.: Class II MHC molecules and antigen enter the same vesicles during internalization by resting B lymphocytes. *Cell Immunol.* **129**:404-413, 1990.
29. Pinet,V., Vergelli,M., Martin,R., Bakke,O., and Long,E.O.: Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules. *Nature* **375**:603-606, 1995.
30. Inaba,K., Metlay,J.P., Crowley,M.T., Witmer,P.M., and Steinman,R.M.: Dendritic cells as antigen presenting cells in vivo. *Int.Rev.Immunol.* **6**:197-206, 1990.
31. Pure,E., Inaba,K., Crowley,M.T., Tardelli,L., Witmer,P., Ruberti,G., Fathman,G., and Steinman,R.M.: Antigen processing by epidermal Langerhans cells correlates with the level of biosynthesis of major histocompatibility complex class II molecules and expression of invariant chain. *J.Exp.Med.* **172**:1459-1469, 1990.
32. Cresswell,P.: Chemistry and functional role of the invariant chain. *Curr.Opin.Immunol.* **4**:87-92, 1992.
33. Cresswell,P.: Invariant chain structure and MHC class II function. *Cell* **84**:505-507, 1996.
34. Roche,P.A., Marks,M.S., and Cresswell,P.: Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain. *Nature* **354**:392-394, 1991.

35. Romagnoli,P. and Germain,R.N.: The CLIP region of invariant chain plays a critical role in regulating major histocompatibility complex class II folding, transport, and peptide occupancy. *J.Exp.Med.* **180**:1107-1113, 1994.
36. Germain,R.N. and Hendrix,L.R.: MHC class II structure, occupancy and surface expression determined by post-endoplasmic reticulum antigen binding. *Nature* **353**:134-139, 1991.
37. Bevec,T., Stoka,V., Pungercic,G., Dolenc,I., and Turk,V.: Major histocompatibility complex class II-associated p41 invariant chain fragment is a strong inhibitor of lysosomal cathepsin L. *JOURNAL OF EXPERIMENTAL.MEDICINE* **183**:1331-1338, 1996.
38. Viville,S., Neefjes,J., Lotteau,V., Dierich,A., Lemeur,M., Ploegh,H., Benoist,C., and Mathis,D.: Mice lacking the MHC class II-associated invariant chain. *Cell* **72**:635-648, 1993.
39. Barber,L.D. and Parham,P.: Peptide binding to major histocompatibility complex molecules. *Annu.Rev.Cell Biol.* **9**:163-206, 1993.
40. Engelhard,V.H.: Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules. *Annu.Rev.Immunol.* **12**:181-207, 1994.
41. Engelhard,V.H.: Structure of peptides associated with MHC class I molecules. *Curr.Opin.Immunol.* **6**:13-23, 1994.
42. Rammensee,H.G., Falk,K., and Rotzschke,O.: Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Annu.Rev.Immunol.* **11**:213-244, 1993.

43. Falk,K., Rotzschke,O., Deres,K., Metzger,J., Jung,G., and Rammensee,H.G.: Identification of naturally processed viral nonapeptides allows their quantification in infected cells and suggests an allele-specific T cell epitope forecast. *J.Exp.Med.* **174**:425-434, 1991.
44. Falk,K., Rotzschke,O., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G.: Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules. *Immunogenetics* **39**:230-242, 1994.
45. Madden,D.R., Gorga,J.C., Strominger,J.L., and Wiley,D.C.: The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**:1035-1048, 1992.
46. Stevanovic,S. and Jung,G.: Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries. *Anal.Biochem.* **212**:212-220, 1993.
47. Rotzschke,O., Falk,K., Stevanovic,S., Jung,G., and Rammensee,H.G.: Peptide motifs of closely related HLA class I molecules encompass substantial differences. *Eur.J.Immunol.* **22**:2453-2456, 1992.
48. Huleatt,J.W. and Lefrancois,L.: Antigen-driven induction of CD11c on intestinal intraepithelial lymphocytes and CD8+ T cells in vivo. *J.Immunol.* **154**:5684-5693, 1995.
49. Metlay,J.P., Witmer,P., Agger,R., Crowley,M.T., Lawless,D., and Steinman,R.M.: The distinct leukocyte integrins of mouse spleen dendritic cells as identified with new hamster monoclonal antibodies. *J.Exp.Med.* **171**:1753-1771, 1990.

50. Scholl,P.R., Diez,A., Karr,R., Sekaly,R.P., Trowsdale,J., and Geha,R.S.: Effect of isotypes and allelic polymorphism on the binding of staphylococcal exotoxins to MHC class II molecules. *J.Immunol.* **144**:226-230, 1990.
51. Sundstrom,M., Hallen,D., Svensson,A., Schad,E., Dohlsten,M., and Abrahmsen,L.: The Co-crystal structure of staphylococcal enterotoxin type A with Zn²⁺ at 2.7 A resolution. Implications for major histocompatibility complex class II binding. *J.Biol.Chem.* **271**:32212-32216, 1996.
52. Abrahmsen,L., Dohlsten,M., Segren,S., Bjork,P., Jonsson,E., and Kalland,T.: Characterization of two distinct MHC class II binding sites in the superantigen staphylococcal enterotoxin A. *EMBO J.* **14**:2978-2986, 1995.
53. Hudson,K.R., Tiedemann,R.E., Urban,R.G., Lowe,S.C., Strominger,J.L., and Fraser,J.D.: Staphylococcal enterotoxin A has two cooperative binding sites on major histocompatibility complex class II. *J.Exp.Med.* **182**:711-720, 1995.
54. Kotzin,B.L.: Superantigens and their role in disease. *Hosp.Pract.(Off Ed)* **29**:59-70, 1994.
55. Kotzin,B.L., Leung,D.Y., Kappler,J., and Marrack,P.: Superantigens and their potential role in human disease. *Adv.Immunol.* **54**:99-166 *LHM: 1993.
56. Chatila,T. and Geha,R.S.: Signal transduction by microbial superantigens via MHC class II molecules. *Immunol.Rev.* **131**:43-59 *LHM: 1993.
57. Dohlsten,M., Sundstedt,A., Bjorklund,M., Hedlund,G., and Kalland,T.: Superantigen-induced cytokines suppress growth of human colon-carcinoma cells. *Int.J.Cancer* **54**:482-488, 1993.

58. Rust,C.J., Koning,F., and van Schooten,W.C.: Immobilized staphylococcal enterotoxin A is sufficient to induce T cell proliferation. *Cell Immunol.* **151**:467-473, 1993.
59. Damle,N.K., Klussman,K., Leytze,G., and Linsley,P.S.: Proliferation of human T lymphocytes induced with superantigens is not dependent on costimulation by the CD28 counter-receptor B7. *J.Immunol.* **150**:726-735, 1993.
60. Dohlsten,M., Hedlund,G., Lando,P.A., Trowsdale,J., Altmann,D., Patarroyo,M., Fischer,H., and Kalland,T.: Role of the adhesion molecule ICAM-1 (CD54) in staphylococcal enterotoxin-mediated cytotoxicity. *Eur.J.Immunol.* **21**:131-135, 1991.
61. Lisak,R.P., Zweiman,B., Blanchard,N., and Rorke,L.B.: Effect of treatment with Copolymer 1 (Cop-1) on the in vivo and in vitro manifestations of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). *J.Neurol.Sci.* **62**:281-293, 1983.
62. Baumhefner,R.W., Tourtellotte,W.W., Syndulko,K., Shapshak,P., Osborne,M., and Rubinshtein,G.: Copolymer 1 as therapy for multiple sclerosis: the cons. *Neurology* **38**:69-72, 1988.
63. Miller,A., Shapiro,S., Gershtein,R., Kinarty,A., Rawashdeh,H., Honigman,S., and Lahat,N.: Treatment of multiple sclerosis with copolymer-1 (Copaxone): implicating mechanisms of Th1 to Th2/Th3 immune-deviation. *J.Neuroimmunol.* **92**:113-121, 1998.
64. Milo,R. and Panitch,H.: Additive effects of copolymer-1 and interferon beta-1b on the immune response to myelin basic protein. *J.Neuroimmunol.* **61**:185-193, 1995.

65. Kipnis,J., Yoles,E., Porat,Z., Cohen,A., Mor,F., Sela,M., Cohen,I.R., and Schwartz,M.: T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies.
Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A **97**:7446-7451, 2000.
66. Bornstein,M.B., Miller,A., Slagle,S., Weitzman,M., Crystal,H., Drexler,E., Keilson,M., Merriam,A., Wassertheil,S.S., Spada,V., and et,a.: Clinical experience with COP-1 in multiple sclerosis. *Neurology* **38**:66-69, 1988.

8. Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Synthese neuer Peptide, und deren Vergleich mit dem von Schlegel et al. beschriebenen GLAT und Kontrollen in einem Surrogatassay unter Zusatz von exogenen Superantigenen. Diese exogenen Superantigene ersetzen dabei quasi die für eine erste Welle der oligoklonalen T-Zellstimulation im Rahmen der GVHD verantwortlich scheinenden endogenen Superantigene. Dazu wurden in einem ersten Schritt die Peptide mit Hilfe der Datenbankprogramme Syfpeithi und EpiPredict in ihrer Aminosäuresequenz definiert, über Fmoc-Festphasenpeptidsynthese erstellt und mittels HPLC gereinigt. Für die Verwendung dieser Peptide in in vitro Assays wurden im weiteren hochaufgereinigte T-Zellen, sowie dendritische Zellen aus *Mus musculus* gewonnen. In in vitro-Versuchen wurden diese Peptide unter Zugabe von Superantigenen im Assay getestet. Einige dieser definierten Peptide konnten die durch Superantigene normalerweise hervorgerufene T-Zellproliferation auf ein Minimum reduzieren und konzentrationsabhängig teilweise sogar ganz verhindern. Im Vergleich mit dem randomisierten Peptid GLAT zeigten zwei definierte Peptide bessere Inhibition. Diese Peptide besitzen beide eine an den T-Zellrezeptor bindende Sequenz mit dem Motiv **YNK-KKA-TVQ-ELD**. In einer bereits von G. Arad et al. (*Nature Med.*, 2000) beschriebenen Arbeit zeigte sich ebenfalls, daß es möglich ist durch dieses Peptid eine starke Inhibition der Superantigen induzierten T-Zellproliferation in vitro zu erzielen. In in vivo Untersuchungen an Mäusen, die aufgrund einiger fehlender V_{β} -Subfamilien nicht letal auf Superantigen reagieren und daher vorher sensitiviert wurden, konnte das Ergebnis der in vitro-Daten bestätigt werden. In der Gruppe, die mit dem Peptid TCRBP (basierend auf dem von Arad et al. publizierten Motiv) behandelt wurden, verstarb kein Tier, während in der Kontrollgruppe ohne Peptidgabe alle Tiere verstarben. Anhand dieser in vitro und in vivo Ergebnisse ist eine weitere Entwicklung der Peptide zur möglichen späteren Prävention der GvHD im Kontext der Stammzelltransplantation bei Leukämie im Kindesalter geplant. In weiteren Untersuchungen konnte durch die Dissertation von cand.med. Barbara Röllinghoff (Universitätskinderklinik Tübingen) gezeigt werden, dass eine durch Transplantation von T-Zellen und Knochenmark ausgelöste GvHD durch den Einsatz einiger dieser Peptide im Mausmodell völlig unterdrückt werden kann.

9. Danksagung

Vor allen möchte ich meiner Frau für die unermüdliche und stetige Aufmunterung, Unterstützung und Geduld danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr.med. Dietrich Niethammer als Leiter der Universitätskinderklinik Tübingen und Betreuer dieser Arbeit. Prof. Niethammer war mir zu jeder Zeit sowohl in der Art seiner Betreuung, als auch durch sein immenses fundiertes wissenschaftliches Wissen ein Vorbild für meine weitere Arbeit. Die Möglichkeit nahezu uneingeschränkt wissenschaftlich arbeiten zu können, die Bereitschaft mich im Ausbau der Mikroskopie finanziell zu unterstützen und die Möglichkeit auch an weltweit stattfindenden Tagungen und Kursen teilzunehmen hat meine weitere Berufsplanung entscheidend mitgeprägt.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr.rer.nat. Hans-Georg Rammensee, der als zweiter Betreuer für den Fachbereich Biologie diese Arbeit ermöglicht hat. Prof. Rammensee möchte ich besonders für die tolle und fruchtbare Atmosphäre in seiner Abteilung im Verfügungsgebäude danken. Die Seminare und Kurse in seiner Abteilung haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Desweiteren danke ich PD Dr.med. Paul-Gerhardt Schlegel. Paul-Gerhardt hat durch seine frühere Tätigkeit an der Stanford-Universität in Palo-Alto, Californien das Peptid GLAT mit nach Tübingen gebracht und mich damals mit der Thematik bekannt gemacht. Viele fruchtbare Diskussionen über Immunologie, Superantigene und Peptide haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Herrn Dr. Burkhard Fleckenstein und danke ich für die Einführung in die Peptidsynthese und die Zusammenarbeit beim „EPIPREDICT- Projekt“, dass nur durch seine hervorragenden Vorarbeiten technisch so schnell als Internetprogramm umzusetzen war.

Herrn Dr. Selim Kuçi möchte ich für die lehrreiche Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Stammzellforschung danken.

Herrn Peter-Michael Weber danke ich für die vielen endlosen Stunden nicht nur in der Kinderklinik. Peter-Michael Weber war oftmals in vielen Belangen rund ums „Poster“ oder um Grafiken die letzte Instanz. Auch blieb durch die Freundschaft zu Peter diese Arbeit nicht auf die Kinderklinik beschränkt (Frankreich, Wein & Kamin!).

Herrn Rainer König, der als Leiter der EDV-Abteilung immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und die Umsetzung des Programmes EPIPREDICT auf den eigenen Server mitgestaltet hat, danke ich hierfür.

Bisher aus in Auszügen aus dieser Dissertationsschrift veröffentlichte Arbeiten:

- **Wessels J.T.**, Schilbach K., Eyrich M., Lal S., Kalbacher H., Niethammer D., Schlegel P.G.
First evidence for inhibition of staphylococcal superantigen induced T-cell proliferation by the copolymer GLAT. Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Hannover, September 1999, accepted *08/99* for oral and poster presentation., *Immunobiology, Vol.200, Nr.3-5, 9/1999 pp.353*
- **Wessels J.T.**, Schilbach K., Kalbacher H., Lal S., Eyrich M, Niethammer D., Schlegel P.G.
First evidence for inhibition of staphylococcal superantigen induced T-cell proliferation by the copolymer GLAT. American Society for Hematology (ASH), New Orleans, USA, December 1999, accepted, *Blood, Vol.11/99*
- **Wessels J.T.**, Fugunt R, Röllinghoff B., Schilbach K., Kalbacher H., Niethammer D., and Schlegel P.G.
Inhibition of superantigen induced T-cell proliferation by the synthetic copolymer GLAT Kind Philipp-Stiftung für Leukämieforschung, Wilsede June 2000, accepted, *Klinische Pädiatrie*
- **Wessels J.T.**, Niethammer D, Jung G, and Fleckenstein B.
EPIPREDICT - A new and reliable software to predict HLA class II-restricted T cell epitopes ;*Accepted* for Annual meeting of the American Society for Hematology (ASH), San Francisco, USA, December 2000; *Blood, Vol. 96/11, Nov. 2000, p.239a*
- **Wessels J.T.**, Niethammer D, Jung G, and Fleckenstein B.
EPIPREDICT - A new and reliable software to predict HLA class II-restricted T cell epitopes ; *Immunobiology* 203, 1-3, Nov.2000, p.61; *Accepted* for Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie Dgfi, Düsseldorf, 11/2000
- Jung G, Fleckenstein B, von der Mulbe F, **Wessels J.T.**, Niethammer D, and Wiesmüller KH
From combinatorial libraries to MHC-ligand motifs, T-cell antagonists and antagonists. *Biologicals*, 2001, 29 (3-4), pp. 179-181

10. Lebenslauf

Persönliche Angaben:	Familienstand: Staatsangehörigkeit: Geboren am: Geburtsort: Eltern:	verheiratet seit 18.08.2000 mit Dr. med. Kathrin Tepper-Wessels deutsch 27.01.1967 Meppen/ Emsland Dr. Johannes Wessels und Christa Wessels, geb. Knipper
Schulweg:	1974-1979 1979-1986	Grundschule Marienschule, Meppen Gymnasium Marianum Meppen, Abschluß: Abitur
Wehr-/Ersatzdienst	1986-1987	Wehrdienst an der Sanitätsakademie der Bundeswehr München mit Abschluß zum exam. Krankenpflegehelfer, danach Einsatz im Bundeswehrkrankenhaus Osnabrück
Ausbildung:	1986-1988 1987-1989	Ausbildung zum Krankenpfleger Ausbildung zum Rettungsassistenten an der Landesrettungsschule in Goslar, danach Einsatz als Rettungsassistent in Meppen/ Ems
Studium	1989-1993 1993-1997 Diplomarbeit Dissertation zum Dr.rer.nat. 1998-2002	Studium der Zahnmedizin Studium der Biologie/ Informatik Abschluß: Diplombiologe, Note: 1,5 Institut für Experimentelle Immunologie, Prof. Dr. Dr. K. Hartmann, Marburg, Thema: „Beobachtung der Entwicklung primordialer lymphatischer Organe im murinen System mit Hilfe der konfokalen Lasermikroskopie“ Universitätskinderklinik Tübingen, Prof. Dr. D. Niethammer, Prof. Dr. H. Rammensee, Thema: „Synthetische Peptide – Möglichkeit der Inhibierung von Superantigenen“
Universitätstätigkeit	1998 1999 Seit 06.2000	Aufnahme ins Graduiertenkolleg Zellbiologie der Universität Tübingen Gründung und Leitung der Arbeitsgruppe "Mikroskopie in der Medizin" an der Universität Tübingen. Förderung durch die DFG im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 510, „Stammzelltransplantation und Antigenprozessierung“ bis 06.2003
Mitgliedschaften	Seit 1998 Seit 1999 Seit 2001	Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGFI) Amerikanische Gesellschaft für Immunologie (AAI) Amerikanische Gesellschaft für Zellbiologie (ASCB)

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Johannes T. Wessels
Neckarhalde 59
D- 72070 Tübingen