

**HLA-Bw4 im humanen Thymus:
Unterschiede zwischen kortikalen
und medullären HLA-B-Komplexen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Schiemer, Moritz Emanuel

2015

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. Müller

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
β ₂ m	β ₂ -Mikroglobulin
BLAST	<i>Basic local alignment search tool</i>
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
c	Cortex
CD	Cluster of differentiation
CID	<i>collision induced dissociation</i>
cTEC	Kortikale Thymusepithelzelle (<i>cortical thymic epithelial cell</i>)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DN	Doppelt negativ (<i>double-negative</i>)
DP	Doppelt positiv (<i>double-positive</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
EMA	Ethidiummonoazidbromid
ESI	Elektrospray-Ionisation
et al.	und andere (Autoren) (<i>et alii/ et aliae</i>)
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence-activated cell sorting</i>)
FCS	Fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (<i>forward scatter</i>)
g	Gramm (<i>gramma</i>)
h	Stunde/n (<i>hora</i>)
HC	Heavy chain
HLA	Humanes Leukozytenantigen (<i>human leukocyte antigen</i>), humanes MHC Antigen
Ig	Immunglobulin
IP	Immunpräzipitation
k.A.	Keine Allelzuordnung
kDa	Kilodalton
LC/MS	<i>liquid chromatography / mass spectrometry</i>
LMPC	<i>Laser capture pressure catapulting</i>
m	Medulla
merge	Mischbild durch Übereinanderlagerung von Fluoreszenzabbildungen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute/n
mQ-H ₂ O	Steril filtriertes, weitgehend deionisiertes Wasser
mTEC	Medulläre Thymusepithelzelle (<i>medullary thymic epithelial cell</i>)
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle

PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (<i>phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEN	Polyethylen-Naphthalat
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
RPMI	Rosewell Park Memorial Institute (Medium)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SP	Einfach positiv (<i>single-positive</i>)
SSC	Seitwärtsstreulicht (<i>side scatter</i>)
TAP	Antigenpeptid-Transporter (<i>Transporter associated with antigen processing</i>)
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (<i>tris-buffered saline</i>)
TCR	T-Zell-Rezeptor (<i>T cell receptor</i>)
TEC	Thymusepithelzelle (<i>thymic epithelial cell</i>)
TFA	Trifluoressigsäure (<i>trifluoroacetic acid</i>)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tween®-20-TBS
vWF	von-Willebrand-Faktor
w/v	Gewichtseinheiten pro Volumen (<i>weight per volume</i>)
WB	Western Blot

Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	1
1.1	Der Thymus	1
1.2	Entwicklung und Selektion von $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor-positiven T-Zellen	3
1.3	Struktur und Funktion von HLA-Klasse-I-Molekülen	4
1.4	Besonderheiten kortikaler HLA-Komplexe und deren Interaktion mit dem $\alpha\beta$ -TCR reifender Thymozyten in der positiven Selektion	7
1.5	HLA-Bw4 und Bw6	9
1.6	Zielsetzung	10
2	Materialien und Methoden	11
2.1	Chemikalien	11
2.2	Geräte und Zubehör	11
2.3	Software	12
2.4	Thymusgewebe	13
2.5	Verarbeitung der Gewebeproben	13
2.6	Gewebetypisierung	13
2.7	Antikörper	16
2.8	Indirekte Immunperoxidase-Färbung von Gefrierschnitten	20
2.9	Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung	21
2.10	Durchflusszytometrie	23
2.10.1	Bestimmung der Zellzahl	23
2.10.2	Färbung der Zellen	23
2.10.3	Durchflusszytometrische Messung und Gating-Strategie	25
2.11	Immunpräzipitation	26
2.11.1	Herstellung von Lysaten	26
2.11.2	Präzipitation	27

2.12	Laser-Mikrodissektion von Thymusgewebe	29
2.12.1	Vorbereitung der Gewebeschnitte	30
2.12.2	LMPC (<i>Laser capture pressure catapulting</i>)	30
2.13	Isolierung und Sequenzierung HLA-gebundener Peptide aus dem Thymus	31
2.13.1	Verwendete Gewebeproben	31
2.13.2	Herstellung der Immunaффinitätssäulen	31
2.13.3	Aufreinigung von HLA-Liganden aus dem Thymus durch Affinitätschromatographie	32
2.13.4	HPLC-MS/MS	34
2.13.5	Datenanalyse	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Übersicht der verwendeten Thymusgewebeproben und Ergebnisse der HLA-Typisierung	37
3.2	Immunpräzipitation mit Tü109, TH4 und HC-10	39
3.3	Immunhistochemische Analyse der Expression von Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen im Thymus	40
3.3.1	Immunperoxidase-Einfachmarkierungen	41
3.3.1.1	Immunperoxidase-Färbungen mit HLA-Klasse I-spezifischen Antikörpern	41
3.3.1.2	Immunperoxidase-Markierung von Bw4 an HLA-B13-positiven Thymi	44
3.3.1.3	Immunperoxidase-Markierung von Bw4 an HLA-B27-positiven Thymi	48
3.3.1.4	Immunperoxidase-Markierung der HLA-Bw6-Determinante	52
3.3.1.5	Markierung von Bw4-positiven HLA-A-Molekülen	53

3.3.2	Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen	55
3.3.2.1	Doppelmarkierung von Thymusproben mit OKT6 und Anti-Bw4-Antikörpern	55
3.3.2.2	Doppelmarkierung von Bw4 und HLA-B-Molekülen	56
3.3.2.3	Identifizierung Bw4-positiver Zellen im Thymus	61
3.3.2.4	Einsatz anderer HLA-spezifischer Marker	64
3.3.3	Durchflusszytometrische Analyse von Thymozyten	66
3.3.4	Isolierung HLA-gebundener Peptide aus Thymusgewebe	69
3.3.4.1	Isolierung von HLA-Peptiden aus angereicherten Thymozyten	69
3.3.4.2	Isolierung von Cortexgewebe mittels Laser-Mikrodissektion und nachfolgende Bestimmung HLA-Klasse-I-präsentierter Peptide mit Hilfe der Massenspektrometrie	81
4	Diskussion	84
4.1	Verteilung von HLA-Klasse-I-Molekülen in Cortex und Medulla des humanen Thymus	85
4.2	Peptidabhängige HLA-Bw4-spezifische Antikörper binden im Cortex kaum an ihr Epitop	87
4.3	Identifikation von Zelltypen mit irregulären HLA-B-Komplexen	89
4.4	Direkte Charakterisierung HLA-gebundener Peptide auf kortikalen Thymozyten mittels Massenspektrometrie	92
4.5	Mögliche Einflussfaktoren auf die Bindung peptidabhängiger Antikörper an das Bw4-Epitop	95
4.6	Implikationen für den Prozess der positiven Selektion im Thymus	97
4.7	Ausblick	99

5	Zusammenfassung	100
6	Literatur	101
7	Erklärung zum Eigenanteil	112
8	Danksagung	113

1 Einführung

1.1 Der Thymus

Der Thymus ist ein primäres lymphatisches Organ, das mit der Reifung von T-Lymphozyten (Thymopoiese) eine entscheidende Aufgabe für die adaptive Immunität erfüllt (Miller, 1961; Zinkernagel et al., 1978). Es handelt sich beim Menschen um ein zwei- oder mehrlappiges, umkapseltes Organ, das im oberen Mediastinum vor Herz und Aortenbogen lokalisiert ist. Obwohl der Thymus nach Erreichen seiner maximalen Größe im Pubertätsalter involutiert, bleiben funktionsfähige Anteile bis ins hohe Alter bestehen (Lynch et al., 2009).

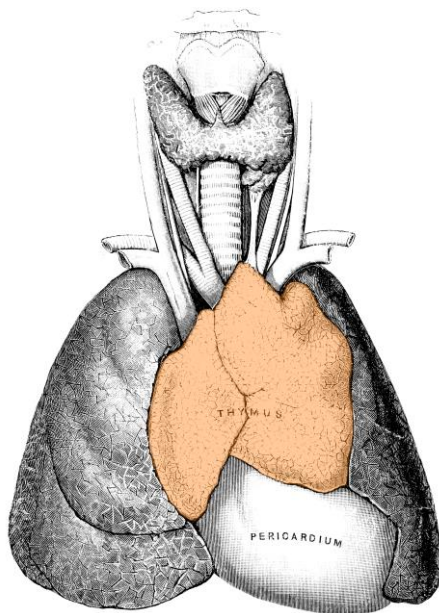


Abb. 1: Der humane Thymus

Kindlicher Thymus (orange), der in diesem Alter kräftig entwickelt ist und dem Herzbeutel direkt ventral aufliegt. Die Illustration wurde durch das FCIT bereitgestellt (aus Cunningham, 1903) und modifiziert.

Das Grundgerüst des Organs wird durch Thymusepithelzellen (TECs) gebildet, die mit ihren langen Ausläufern ein dreidimensionales Netzwerk bilden und zusammen mit anderen Stromazelltypen wie Makrophagen, dendritischen Zellen (DCs), Fibroblasten, Endothelzellen und Perizyten ein spezialisiertes Mikromilieu für die Thymopoiese bieten (Boyd et al., 1993; Rossi et al., 2005; Zachariah & Cyster, 2010). Mit einem Anteil von über 95 % sind die reifenden T-Zell-Vorläufer (Thymozyten) die dominante Zellpopulation im Thymus (Nowell et al., 2007). Ihr Bestand wird lebenslang von multipotenten hämatopoetischen Progenitorzellen gesichert, die periodisch aus dem Knochenmark mobilisiert werden und über die Blutbahn den Thymus erreichen (Le Douarin & Jotereau, 1975; Foss et al., 2001). Die

reifenden Thymozyten vollziehen eine dynamische Wanderungsbewegung durch das epitheliale Netzwerk und erreichen in Abhängigkeit ihres Entwicklungsstadiums typische Regionen des Thymus (Witt et al., 2005; Petrie, 2003). Die morphologisch am deutlichsten abgrenzbaren Regionen sind die zellreiche, periphere Rinde (Cortex), die unreife Thymozyten enthält, und das zentrale, relativ zellarme Mark (Medulla), in dem hauptsächlich reife Thymozyten zu finden sind. Der Cortex wird durch gefäßführende, bindegewebige Septen (Trabekulae), die von der Organkapsel bis zur kortikomedullären Grenzregion ziehen, unterteilt, während die Medulla ein Kontinuum bildet (Pearse, 2006). Die so gebildeten Funktionseinheiten werden Lobuli oder Läppchen genannt; streng genommen handelt es sich um sogenannte Pseudolobuli. Obwohl TECs auf gemeinsame, vom Endoderm der dritten Schlundtasche abstammende Progenitorzellen zurückgehen, unterscheiden sich TECs im Cortex (cTECs) phänotypisch und funktional von solchen in der Medulla (mTECs), was eine an die Reifestadien der Thymozyten angepasste Nischenbildung verdeutlicht (Blackburn & Manley, 2004; Bleul et al., 2006; Anderson et al., 2009). Zwischen Cortex und Medulla liegt die gefäßreiche kortikomedulläre Grenzregion, die den Zelltransfer zwischen Blut und Thymusparenchym durch postkapilläre Venolen ermöglicht und damit für die Besiedlung des Organs mit hämatopoetischen Progenitoren und den Austritt reifer T-Zellen aus dem Thymus in die Peripherie wichtig ist (Lind et al., 2001; Mori et al., 2007). Im Mausmodell wurden hochspezialisierte Mechanismen für die Vermittlung des Ein- und Austritts von Zellen gefunden. Dazu gehören die bedarfsabhängige Expression von P-Selektinen durch Endothelzellen zur selektiven Aufnahme von Vorläuferzellen aus dem Blut und der Besatz der Gefäße mit Perizyten, die die Extravasation reifer Thymozyten fördern (Rossi et al., 2005; Zachariah & Cyster, 2010). Die subkapsuläre Zone ist direkt an die Organkapsel angrenzend, beinhaltet große, mitotisch aktive Lymphoblasten und ist Hauptort der Proliferation unreifer Thymozyten (Pearse, 2006; Benz et al., 2004). Mittels Kartierung von Reifestadien der Thymozyten lassen sich die Thymusläppchen in funktionelle Zonen gliedern, von denen bis zu sieben unterschiedliche beschrieben werden (Petrie & Zúñiga-Pflücker, 2007).

1.2 Entwicklung und Selektion von $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor-positiven T-Zellen

Die Thymozyten durchlaufen in wechselseitiger Interaktion mit den Stromazellen schrittweise unterschiedliche Phasen der Differenzierung, Proliferation und Selektion, wobei am Ende nur 3 bis 5 % diesen Prozess überleben und als immunkompetente naive T-Zellen den Thymus verlassen (Takahama, 2006; Huesmann et al., 1991; Egerton et al., 1990). Zirkulierende hämatopoetische Progenitorzellen treten an der kortikomedullären Grenzregion in den Thymus ein und migrieren kapselwärts durch den Cortex (Petrie, 2003). Sie treffen hier auf cTECs, welche die Entwicklung dieser frühen Thymozyten entscheidend beeinflussen. Die multipotenten Progenitoren werden vorrangig durch Interaktion mit DL4-Notch1-Liganden der cTECs auf die T-Zell-Linie vorgeprägt, indem genetische Programme anderer Zelllinien (z. B. von DCs, NK-Zellen) reprimiert werden und die Expression T-Zell-spezifischer Gene gefördert wird (Carpenter & Bosselut, 2010; Koch et al., 2008). Weiterhin sezernieren cTECs Wachstumsfaktoren wie das Cytokin IL-7 und fördern damit die Proliferation der Zellen (Fry & Mackall, 2005). Die frühen Thymozyten besitzen keinen T-Zell-Rezeptor (TCR) und gehören zu den doppelt-negativen (DN) Thymozyten, da sie weder CD4 noch CD8 exprimieren. DN-Thymozyten durchlaufen vier Reifestadien, die anhand ihres CD25- und CD44-Phänotyps unterschieden werden: DN1 (CD44⁺/CD25⁻), DN2 (CD44⁺/CD25⁺), DN3 (CD44⁻/CD25⁺) und DN4 (CD44⁻/CD25⁻). Liniendifferenzierung und Proliferation sind Vorgänge die in den Stadien DN1 und DN2 stattfinden, während sich die Genumlagerung im TCR- β -Locus auf das DN3-Stadium konzentriert. Im Fall einer erfolgreichen, d. h. im Leseraster arrangierten β -Ketten-Genumlagerung, exprimieren die Zellen den sogenannten prä-TCR (bestehend aus der β -Kette, der invariablen prä-T- α -Kette und dem CD3-Korezeptor), der das Überleben der Zellen sichert und die weitere Differenzierung der Zellen über das DN4-Stadium zu CD4- und CD8-doppelt positiven (DP) Thymozyten vermittelt (Klein Wolterink et al., 2010). Dieser als β -Selektion bezeichnete Vorgang findet in der subkapsulären Zone statt und geht mit einer starken Proliferation einher (Ciofani & Zúñiga-Pflücker, 2007). Zellen im DP-Stadium sind mit einem Anteil von 80-85 % die mit Abstand größte Thymozytenpopulation. Sie besiedeln den gesamten Cortex. In ihrer relativ kurzen Lebensdauer von 3-4 Tagen wird der TCR- α -Ketten-Lokus kontinuierlich rearrangiert, bis eine der produzierten α -Ketten mit der β -Kette einen funktionellen, heterodimeren $\alpha\beta$ -TCR ausbildet, der im kortikalen Mikromilieu mit Peptid:MHC-Komplexen interagieren kann (Starr et al., 2003). Die TCR-abhängigen Signale verhindern zusammen mit

kostimulatorischen Einflüssen den programmierten Zelltod, führen zur Ausdifferenzierung in CD4 oder CD8 einfach positive (SP-) Thymozyten und initiieren die Expression des Chemokinrezeptors CCR7, einem Schlüsselmolekül für die Migration in die Medulla (Ueno et al., 2004). Dieser Vorgang der positiven Selektion trägt zum Aufbau eines funktionellen, auf die körpereigenen MHC-Moleküle restringierten T-Zell-Repertoires bei und hängt von einer niedrigen Avidität der TCR-Liganden-Bindungen ab. Keine oder nur unterschwellige Bindungsavidität führt zum Absterben durch Neglect („death by neglect“) und Zellen mit starker TCR-Avidität werden durch einen weiteren Prozess, der negativen Selektion, eliminiert (Ashton-Rickardt et al., 1994). Die negative Selektion findet vorrangig in der Medulla statt und dient als Mechanismus der zentralen Toleranz der klonalen Deletion potentiell autoreaktiver Thymozyten (Baldwin et al., 2005; Burnet, 1959). Unter Regulation des Transkriptionsfaktor AIRE (*autoimmune regulator*) exprimieren mTECs ein breites Spektrum körpereigener „gewebespezifischer Antigene“ (TRAs) wie das pankreasspezifische Insulin (Anderson et al., 2002). DCs können TRAs durch eine unidirektionale Transferoute von mTECs erwerben oder Antigene aus der Peripherie nach Einwanderung in den Thymus präsentieren und stellen die effektivsten Vermittler der negativen Selektion dar (Koble & Kyewski, 2009; Proietto et al., 2009; Griesemer et al., 2010). Manche autoreaktive Thymozyten werden nicht eliminiert, sondern gehen in das relativ kleine Repertoire der regulatorischen T-Zellen (Treg) ein, die immunsuppressive Aktivität besitzen und durch die Expression des Foxp3-Transkriptionsfaktor definiert werden (Jenkins et al., 2010). Während die Zellen während ihres etwa 12-tägigen Aufenthalts in der Medulla der negativen Selektion ausgesetzt sind, entwickeln sie einen vollständig ausgereiften Phänotyp und gelangen dann in die Zirkulation (Takahama, 2006).

1.3 Struktur und Funktion von HLA-Klasse-I-Molekülen

In den 1940er und -50er Jahren führten Gorer und Snell die Abstoßung von transplantiertem Gewebe auf Genprodukte des Haupthistokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) zurück. Beim Menschen wird dieser Genabschnitt HLA-Genkomplex (*human leukocyte antigen*) genannt und ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert. Eine besondere Rolle für solche Abstoßungsreaktionen, aber auch für andere teils fundamentale immunologische Prozesse, wie die Initiierung und Regulation einer Immunreaktion gegen Pathogene und Neoplasien, spielen die hauptsächlich hier kodierten MHC-Moleküle. Es handelt sich um hochgradig polymorphe Glykoproteine, die mit einem

Peptid beladen werden und auf der Zelloberfläche als Liganden für T- und NK-Zell-Rezeptoren dienen. Prinzipiell setzen körperfremde Peptid:MHC-Komplexe eine Immunreaktion in Gang, während körpereigene Peptid:MHC-Komplexe toleriert werden. Es werden zwei Klassen von MHC-Molekülen unterschieden (MHC Klasse I und II). Da sich diese Arbeit auf Klasse-I-Moleküle konzentriert, sollen diese im Folgenden genauer beschrieben werden. MHC-Klasse-I-Moleküle werden von fast allen kernhaltigen Zellen exprimiert und stellen in ihrer assemblierten Form Trimerkomplexe dar, die aus einer 44 kDa schweren, membrangebundenen α -Kette, dem nicht-kovalent assoziierten, monomorphen β_2 -Mikroglobulin (11,5 kDa) und einem an die α -Kette gebundenen Peptid bestehen. Humane MHC-Klasse-I-Moleküle werden HLA-Klasse-I-Moleküle genannt. Die α -Ketten der klassischen HLA-Klasse-I-Moleküle, die eine tragende Rolle bei der T-Zell-Selektion im Thymus spielen, werden von den drei Genloci HLA-A, -B und -C kodiert. Diese Polygenie und der ausgeprägte Polymorphismus der Genorte (5518 bekannte HLA-Klasse-I-Allele, IMGT/HLA-Database, Robinson et al., 2011) führt dazu, dass Individuen in der Regel sechs verschiedene HLA-Klasse-I-Allele besitzen und damit heterogene HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren, was eine effektive Bindung strukturell unterschiedlicher Peptide ermöglicht (Waßmuth, 2005). Das β_2 -Mikroglobulin-Gen liegt außerhalb des HLA-Komplexes auf Chromosom 15.

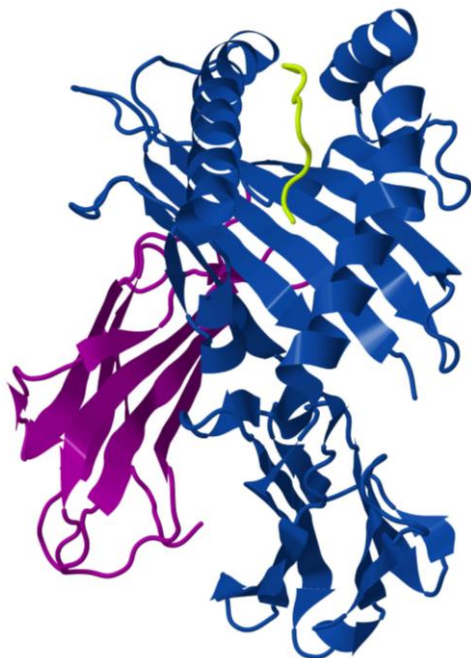


Abb. 2: Struktur eines HLA-Komplexes

HLA-Komplexe stellen Trimere dar, die aus einer schweren Kette (blau), dem monomorphen β_2 -Mikroglobulin (violett) und dem im Peptidbindungsspalt verankerten Peptid (grün) bestehen. Gezeigt ist ein HLA-A2-Molekül in Komplex mit einem Nonapeptid des Hepatitis-C-Virus. Abbildung erstellt unter Verwendung eines Datensatzes von Gras et al., 2011, PDB ID: 3MRL.

Erste röntgenkristallographische Messungen klärten die dreidimensionale Struktur des HLA-A2-Moleküls auf. Sie stimmen grundsätzlich mit den seither erstellten Strukturen überein (Bjorkman et al., 1987). Die α -Kette bildet mit ihren $\alpha 1$ - und $\alpha 2$ -Domänen eine aus acht β -Faltblattstrukturen bestehende Plattform mit zwei darüber platzierten, annähernd parallelen α -Helices, welche die dazwischen gelegene Peptidbindungsstelle wie eine Reling umgrenzen. Der so gebildete Peptidbindungsspalt vermag Peptide mit einer Länge von normalerweise 8 bis 10 Aminosäuren zu binden und besitzt typischerweise sechs sogenannte Taschen (*pockets*), die Seitenketten von Aminosäuren des Peptids (Ankerresiduen) aufnehmen können. Die unterschiedlichen HLA-Varianten bevorzugen bestimmte Aminosäurereste an definierten Positionen im Peptid (Sequenzmotive). Die Montage der HLA-Klasse-I-Moleküle findet im endoplasmatischen Retikulum (ER) statt und erfordert unter anderem die Präsenz spezialisierter Chaperone wie Calnexin, den Aufbau des MHC-I-Ladungskomplexes und die Bereitstellung von Peptidliganden, die vorwiegend dem proteasomalen Abbau von zytosolischen Proteinen entstammen und mit dem Transportermolekül TAP (*transporter associated with antigen processing*) in das Lumen des ERs gelangen. Nach Ablösung des Ladungskomplexes wird der vollständig zusammengesetzte HLA-Klasse-I:Peptid-Komplex an die Zelloberfläche transportiert. Eine gesunde Zelle präsentiert HLA-gebundene Peptide, die von zelleigenen Proteinen stammen. Eine infizierte oder mutierte Zelle präsentiert zusätzlich Fremdpeptide und kann dadurch zytotoxische T-Zellen aktivieren. Die verminderte Expression von HLA-Komplexen auf der Zelloberfläche („*missing-self*“) triggert die Aktivierung von NK-Zellen (Ljunggren & Karre, 1990).

1.4 Besonderheiten kortikaler HLA-Komplexe und deren Interaktion mit dem $\alpha\beta$ -TCR reifender Thymozyten in der positiven Selektion

Für den Aufbau eines immunkompetenten und gleichzeitig selbsttoleranten T-Zell-Repertoires unterliegt die Generierung von HLA-Komplexen im Thymus einzigartigen Mechanismen, die teilweise erst in den letzten Jahren entdeckt wurden. Dass die Bindung des TCR an körpereigene HLA-Komplexe ein Erfordernis für die positive Selektion darstellt, in der Medulla jedoch die negative Selektion stimuliert, wird als Thymus-Paradoxon (*thymic paradox*) bezeichnet (Reza & Ritter, 1998). Der Nachweis unterschiedlicher Bindungsaviditäten für diese Selektionsverfahren und die Entdeckung Cortex-spezifischer Prozessierungsmechanismen für HLA-Peptide, bestätigen gleich zwei Modellvorstellungen zur Auflösung dieses vermeintlichen Widerspruchs: das *differential-avidity*-Modell (Lo et al., 1986) und das *altered-ligand*-Modell (Marrack & Kappler, 1987).

Durch rege Bewegungen entlang des kortikalen Zellnetzwerks fördern DP-Thymozyten den Kontakt mit HLA-Komplexen (Sanos et al., 2011; Li et al., 2007; Witt et al., 2005; Bousso et al., 2002). Die variablen TCR-Regionen CDR1 und CDR2 besitzen eine inhärente Spezifität für MHC-/HLA-Moleküle, sodass die Aufgabe der positiven Selektion in der Anreicherung von Thymozyten mit funktionsfähigen, auf die körpereigenen MHC-Moleküle restringierten TCRs bestehen könnte (Garcia et al., 2009; Takahama et al., 2010). Nur Thymozyten, die mit ihrem TCR eine Interaktion mit niedriger Bindungsavidität an Selbst-HLA-Moleküle bewerkstelligen, erreichen durch positive Selektion das nächste Reifestadium (Ashton-Rickardt & Tonegawa, 1994; Palmer & Naeher, 2009). Durch eine besondere Proteasenausstattung kortikaler Zellen ist die Erzeugung von im Körper einzigartigen HLA-Peptiden im Cortex möglich. Das im Jahr 2007 entdeckte und auch beim Menschen nachgewiesene Thymoproteasom wird ausschließlich kortikal exprimiert und unterscheidet sich von konventionellen Proteasomen durch die $\beta 5t$ -Untereinheit (Murata et al., 2007; Tomaru et al., 2009). Proteasomen sind zylindrische, multikatalytische Proteasekomplexe, die zentrale Enzyme der zytosolischen Proteindegradation und Hauptquelle für HLA-Klasse-I-präsentierte Peptide darstellen (Sijts & Kloetzel, 2011). Das konstitutiv exprimierte Standardproteasom sowie das unter Immunstimulation generierte Immunproteasom weisen eine Chymotrypsin-artige Aktivität der $\beta 5$ -Untereinheit auf, die Peptide mit hydrophoben C-Termini hervorbringt. Für eine hoch-affine Bindung werden solche Peptide von einem Großteil der HLA-Spezifitäten bevorzugt (Takahama et al., 2008; Young et al., 1995; Fehling

et al., 1994). Da diese Aktivität beim Thymoproteasom stark reduziert ist, wird vermutet, dass Peptide für die positive Selektion im Cortex mit geringerer Affinität an HLA-Klasse-I-Moleküle gebunden sind und sich dadurch leicht partiell oder sogar ganz ablösen lassen. (Murata et al., 2008; Ziegler et al., 2009). Cathepsin L und das humane Homolog Cathepsin L2 sowie die Thymus-spezifische Serinprotease (TSSP) werden im lysosomalen und/oder endosomalen Kompartiment von cTECs, jedoch kaum bzw. überhaupt nicht von mTECs exprimiert (Derbinski & Kyewski, 2010; Gallegos & Bevan, 2004). Der Verlust ihrer essentiellen Funktion bei der Peptidprozessierung für die HLA-Klasse-II-Präsentation führt zur starken Beeinträchtigung der positiven Selektion durch cTECs (Moran & Hogquist, 2011; Sevenich et al., 2010; Bowlus et al., 1999; Nakagawa et al., 1998). Die um 70 % reduzierte CD4-Zellzahl in Cathepsin-L-Knockout-Mäusen wurde mit einer reduzierten Funktion des Enzyms in der Generierung positiv-selektierender HLA-Klasse-II-Peptide assoziiert (Honey et al., 2002). Obwohl hauptsächlich cTECs über diese Enzymausstattung verfügen, wurden auch Thymozyten, DCs, Fibroblasten und sogar in den Thymus zurückkehrende reife T-Zellen als Vermittler der positiven Selektion ausgemacht (Choi et al., 2005; Yasutomo et al., 2000; Hugo et al., 1993; Kirberg et al., 2008).

Es liegt nahe, dass Cortex-spezifische Protein-Prozessierungsmechanismen HLA-Komplexe hervorbringen, die für die Verwendung als positiv-selektierende Liganden speziell angepasst sind. Würden sich andernfalls kortikale und medulläre Peptid:HLA-Komplexe zu sehr ähneln, könnte die negative Selektion einen überproportional großen Verlust von initial positiv selektierten Thymozyten verursachen (Hogquist & Xing, 2010; Klein et al., 2009).

1.5 HLA-Bw4 und Bw6

Trotz ihrer strukturellen Heterogenität können HLA-Moleküle definierte Bereiche aufweisen, die bei unterschiedlichen HLA-Spezifitäten gleich oder sehr ähnlich ausgeprägt sind und daher supertypische Determinanten (*public epitopes*) genannt werden. Die serologisch als erstes identifizierten supertypischen HLA-Determinanten sind die Bw4- und Bw6-Epitope, die sich über die Aminosäuren 77, 80, 81, 82 und 83 der α 1-Helix erstrecken (Van Rood & Van Leeuwen, 1963; Müller et al., 1989). HLA-B-Moleküle tragen entweder das Bw4-Epitop (~33 %) oder das Bw6-Epitop (~67 %); die HLA-A-Moleküle A23, A24 und A32 sind Bw4-positiv (Wan et al., 1986). Innerhalb der Bw4-Determinante finden sich an den Positionen 82 und 83 konstant Leucin bzw. Arginin; die weiteren Positionen sind variabel besetzt, sodass acht Bw4-Varianten unterschieden werden (Sanjanwala et al., 2008). Als Liganden von NK-Zell-Rezeptoren spielen bestimmte Bw4-Epitope eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunabwehr und werden mit einem günstigen Verlauf von HIV-Infektionen und einer Resistenz gegenüber opportunistischen Keimen assoziiert (Qi et al., 2006).

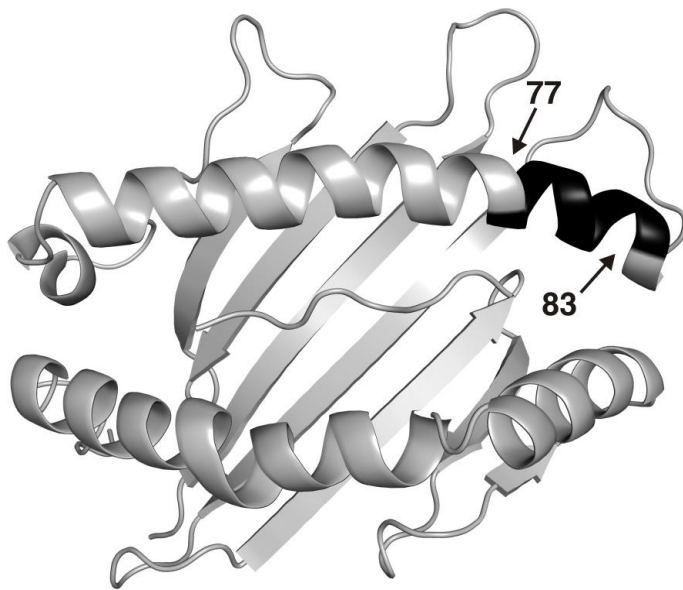


Abb. 3: Aufsicht auf die α 1 α 2-Domänen eines HLA-B51-Moleküls mit Markierung der Bw4-Determinante Bw4 ist eine Determinante auf der α 1-Helix von HLA-B- und HLA-A-Molekülen, die sich über die Aminosäuren 77, 80, 81, 82 und 83 erstreckt (schwarze Markierung). Ein Drittel der HLA-B-Moleküle sind Bw4-positiv. Abbildung aus Sanjanwala et al., 2008. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Libby Guethlein.

1.6 Zielsetzung

Während der T-Zell-Selektion im humanen Thymus stellen HLA-Komplexe die Hauptinteraktionspartner des TCRs dar. Diese werden durch außergewöhnliche Expressions- und Prozessierungsmechanismen generiert, die teilweise erst in den letzten Jahren entdeckt wurden. Diese Mechanismen sind wie auch die unterschiedlichen Selektionsprozesse im Thymus-Mikromilieu kompartimentiert, weshalb vermutet wird, dass sich kortikale und medulläre HLA-Komplexe voneinander – insbesondere durch die präsentierten Peptide – unterscheiden. Eine direkte Sequenzierung von HLA-gebundenen Peptiden aus einem isolierten Thymuskompartiment wie dem Cortex oder isolierten TECs war bislang technisch nicht möglich und wurde erst nach den praktischen Arbeiten für diese Arbeit publiziert. Peptidabhängige HLA-spezifische Antikörper stellen ein sensitives Werkzeug in der Charakterisierung von den Strukturverhältnissen der HLA-Komplexe dar. In dieser Arbeit wurden unterschiedliche humane, HLA-typisierte Thymusgewebeproben in der Immunhistochemie und der Durchflusszytometrie systematisch untersucht. Im Zentrum der Arbeit standen die HLA-Bw4-spezifischen Antikörper Tü48, Tü109, MARB3 und MARB7, deren Bindungsverhalten durch das präsentierte Peptid beeinflusst wird. Diese und andere HLA-spezifische Antikörper dienten der vergleichenden Untersuchung von Strukturverhältnissen und der Verteilung von HLA-Komplexen in Thymusrinde und –mark. Dass die immunhistochemische Markierung von Thymusgewebe mit den Bw4-spezifischen Antikörpern MARB3 und MARB7 auf beachtliche Verteilungsunterschiede von HLA-B-Molekülen zwischen Cortex und Medulla hinweist, wurde an HLA-B27-transgenen Ratten und in ersten Experimenten an humanen Thymi vielversprechend gezeigt (Rehm et al., 2000; Müller et al., 1983). Durchflusszytometrische Analysen von Thymozyten sollten daher zur isolierten Beurteilung dieser Zellen und zur Aufdeckung möglicher Unterschiede zwischen den HLA-Komplexen kortikaler oder medullärer Thymozyten herangezogen werden. Massenspektrometrische Analysen hatten zum Ziel, HLA-Klasse-I-gebundene Peptide aus kortikalen Elementen direkt zu sequenzieren. Dafür wurden isolierte kortikale Thymozyten sowie mit Laser-Mikrodissektion gewonnene Cortex-Areale eingesetzt. Der Vergleich zwischen HLA-Peptiden dieser Proben mit solchen eines unfraktionierten Gewebestücks desselben HLA-typisierten Thymus sollte besondere Charakteristiken von HLA-präsentierten Peptiden des Cortex im Unterschied zu medullären Peptiden aufdecken, die als Produkte einer ungewöhnlichen Enzymausstattung von positiv-selektierenden Zellen zustande kommen könnten.

2 Materialien und Methoden

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von der Firma Sigma-Aldrich, Taufkirchen, bezogen. Die verwendeten Lösungsmittel stammten von der Firma Merck, Darmstadt.

2.2 Geräte und Zubehör

Zentrifugen	Beckman Coulter GS-6R (Brea, USA) Eppendorf Centrifuge 5402 (Hamburg) Heraeus Megafuge® 1.0R, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) Heraeus Biofuge® fresco, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Sterilbank	Heraeus LaminAir HB 2448 (Hanau)
Mikroskope	Zeiss Axiophot mit AxioCam MRm (Oberkochen) Leica LEITZ DMRBE (Bensheim) Leitz LABORLUX S (Wetzlar)
Kryotom	Leica Microsystems CM3050S (Bensheim)
Durchflusszytometer	BD LSRII (Heidelberg)
Spektrophotometer	Peqlab Nanodrop ND-1000 (Erlangen)
Waage	Sartorius CP622-0CE (Göttingen)
Überkopfschüttler	MACSmix™ Tube Rotator, Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)
Elektrophoresekammer	XCell Sure Lock™, Invitrogen (Carlsbad, USA)
Transferapparatur	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
LMPC-System	PALM® MicroBeam, Carl Zeiss MicroImaging (Jena) Axiovert 200M, Carl Zeiss Lichtmikroskopie (Göttingen)
Massenspektrometer	LTQ-Orbitrap XL, Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

HPLC-System	NanoLC-2D™, Eksigent (Livermore, USA)
	Micro Autosampler, Spark (Emmen, Niederlande)
	C ₁₈ -Vorsäule, 200 µm, 10 mm, Dionex, Thermo Fisher Scientific (Sunnyvale, USA)
	Mikrokapillarsäule, RP C-18, Partikelgröße 5 µm, 75 µm Durchmesser x 250 mm, LC Packings, Thermo Fisher Scientific (Sunnyvale, USA)
	Quarzglaskapillare PicoTip®, 360/20 µm Durchmesser, 10 µm Spitze, 1P-4P Coating, New Objective (Woburn, USA)

2.3 Software

Mikroskopie	LeicaQWin Standard (Cambridge, UK)
	Zeiss AxioVision 4.8 (Jena)
Durchflusszytometrie	FlowJo 7 (Ashland, USA)
	BD FACS Diva (Heidelberg)
Laser-Mikrodissektion	Zeiss PALM® RoboSoftware 3.0 (Jena)

2.4 Thymusgewebe

Humanes Thymusgewebe fällt bei korrektiven kardiochirurgischen Operationen im Kindesalter an und wird normalerweise verworfen. Die in dieser Arbeit verwendeten Organresektate stammten von Kindern, bei denen eine korrektive Operation von angeborenen Herzfehlern durch die Abteilung für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie des Universitätsklinikums Tübingen vorgenommen werden musste. Alle Proben wurden uns nach entsprechender Aufklärung und schriftlicher Zustimmung der Eltern freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Dafür lag ein positives Votum der Ethikkommission vor (Nummer 348/2012B01).

2.5 Verarbeitung der Gewebeproben

Das Thymusgewebe wurde unter sterilen Bedingungen in einer Petrischale mit vorgelegtem Kulturmedium (RPMI-1640, PAA) mittels Skalpell und Pinzetten von größeren Gefäß- und Bindegewebsanteilen befreit, durch mehrmaliges Umspülen mit Kulturmedium gewaschen und in würfelförmige Gewebestücke von etwa 1 cm Kantenlänge zerteilt. Die Gewebestücke wurden in Kulturmedium oder Einbettmedium (Sakura Finetek) in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Übrige Gewebeanteile wurden für die Gewinnung von Thymozyten verwendet. Durch Zerkleinerung und Ausspülung mit einer mehrfach ins Gewebe eingestochenen Kanüle (24 Gauge) wurden Thymozyten in Kulturmedium suspendiert und direkt für durchflusszytometrische Analysen weiterverwendet. Übrige Zellmengen wurden 10 Minuten bei 100 x g zentrifugiert und danach als Pellet eingefroren.

2.6 Gewebetypisierung

Eine DNA-Extraktion aus den Thymusgeweben wurde mit dem QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen) durchgeführt, das auch die verwendeten Puffer enthält. Etwa 25 mg Thymusgewebe wurden am Kryotom durch Anfertigung von 50 µm dicken Kryostatschnitten disseziert und unter Verwendung von 180 µl ATL-Lysepuffer und 20 µl Proteinase K bei 56°C vollständig lysiert. Nach einminütiger Zentrifugation bei 14000 x g wurde 200 µl AL-Lysepuffer eingemischt und 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol (100 %) und erneutem Mischen wurde das Lysat auf die mitgelieferten, DNA-affinen Säulchen gegeben. Die Säulchen wurden bei 5200 x g in Sammelröhrchen abzentrifugiert und nicht-

bindende Bestandteile im Durchfluss verworfen. Zur Aufreinigung der an der Säule adhären DNA wurde 500 µl AW1-Waschpuffer auf die Säule gegeben, gleichzeitig abzentrifugiert und das Eluat verworfen. In einem zweiten Waschschrift wurde 500 µl AW2-Waschpuffer auf die Säule gegeben, für 3 Minuten bei 16000 x g und nach Wechseln des Sammelröhrchens erneut für 1 Minute bei 5200 x g zentrifugiert. Zur Gewinnung der DNA wurde 200 µl steriles Wasser (Ampuwa®, Fresenius) auf die Säule gegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die DNA durch einminütige Zentrifugation bei 5200 x g in ein Eppendorf-Sammelgefäß eluiert. Mit einem Spektrophotometer (Thermo Scientific, NanoDrop 1000) wurde die DNA-Konzentration der Probe bestimmt und die Reinheit auf Basis des 260/280-Quotienten kontrolliert. Die Proben wurden dann mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 20 ng/µl verdünnt. Die HLA-Klasse-I-Typisierung wurde im HLA-Labor des Universitätsklinikums Tübingen mit der Luminex-Technologie (Luminex) in Niedrigauflösung (*2-digit-level*) durchgeführt. Es erfolgte hierbei eine PCR-Amplifikation der HLA-Klasse-I-Exons 2 und 3 mit spezifischen Biotin-markierten Primern und eine Hybridisierung der Amplifikate an Bead-gekoppelte Oligonukleotid-Sonden, die spezifisch für polymorphe Sequenzmotive aus den analysierten Exons der HLA-Klasse-I-Loci waren und sich daher für eine Unterscheidung zwischen den Allelen eigneten (SSO-Technologie). An das Biotin der hybridisierten PCR-Produkte wurde zur Detektion ein Streptavidin-R-Phycoerythrin-Konjugat gebunden, sodass hybridisierte Sonden zusätzlich zu einer charakteristischen Farbkodierung der Beads eine Phycoerythrin-Fluoreszenz aufwiesen, die in einem Zytometer-ähnlichen Apparat (LABScan™ 100) nach Anregung durch einen spezifischen Laser detektiert werden konnte. Software-gesteuert wurde das Muster so erkannter Sonden auf den wahrscheinlichsten HLA-Typ zurückgeführt (Heinemann, 2009).

Tabelle 1: Bw4- und Bw6-positive HLA-Spezifitäten

Zuordnung der HLA-Bw4- und -Bw6-Determinanten zu serologisch definierten HLA-B- und einigen HLA-A-Spezifitäten (grau hinterlegt) nach IMGT (Robinson et al., 2013). Manche Suballele der genannten Spezifitäten können von der beschriebenen Zuordnung abweichen.

HLA-Bw4	HLA-Bw6
B5	B7
	B8
B13	B14
B17	B18
	B22
B27	B2708
	B35
B37	
B38 (16)	B39 (16)
	B40
	B41
	B42
B44 (12)	B45 (12)
	B46
B47	B48

HLA-Bw4	HLA-Bw6
B49	B50 (21)
B51 (5)	
B52 (5)	
B53	B54 (22)
	B55 (22)
B56 (22)	
B57 (17)	
B58 (17)	
B59	
	B60 (40)
	B61 (40)
	B62 (15)
B63 (15)	B64 (14)
	B65 (14)
	B67

HLA-Bw4	HLA-Bw6
	B70
	B71 (70)
	B72 (70)
	B73
	B75 (15)
	B76 (15)
B77	B78
	B81
	B82
A9	
A23 (9)	
A24 (9)	
A25 (10)	
A2403	
A32 (19)	

2.7 Antikörper

Im Fokus der Arbeit standen vier monoklonale Antikörper, Tü48, Tü109, MARB3 und MARB7, deren Spezifität für das Bw4-Epitop in früheren Analysen eindeutig definiert worden war (Müller et al., 1982; Takamiya et al., 1996; Rehm et al., 2000). Bei positiver Reaktivität der Antikörper Tü48 und MARB3 mit Zellen oder Geweben, konnte vom Vorliegen Bw4-positiver HLA-B- und/oder HLA-A-Spezifitäten beim Gewebespender ausgegangen werden. Für Tü109 und MARB7 war eine exklusive Reaktivität mit Bw4-positiven HLA-B-Molekülen bekannt. Diese Antikörper binden auch bei Bw4-Positivität nicht an HLA-A-Moleküle. Testungen mit entsprechenden HLA-Transfektanten zeigten, dass die Bindung aller vier Bw4-spezifischen Antikörper von einer Beladung der HLA-Moleküle mit Peptiden abhängig war. Während die Aminosäuresequenz der gebundenen Peptide auf die Reaktivität der Antikörper Tü48 und MARB3 keinen oder nur geringen Einfluss hatte, war ein sequenzabhängiges Reaktionsmuster der Antikörper Tü109 und MARB7 in unterschiedlichen Studien dokumentiert worden (Referenzen in diesem Kapitel). Der Antikörper TH4 wurde in der Studie zur Detektion von HLA-B-Molekülen allgemein eingesetzt, da er ein *Common epitope* auf allen HLA-B-Molekülen erkennt. Frühere Testungen der Spezifität dieses Antikörpers hatten gezeigt, dass eine Reaktion mit Maus-Transfektanten ausblieb, wenn sie nach Bestrahlung nur noch HLA-A oder HLA-DR exprimierten (zum Verfahren siehe Spring et al., 1986). In der isoelektrischen Fokussierung von mittels TH4 immunpräzipitierten HLA-Molekülen, hatte sich erwiesen, dass TH4 neben HLA-B- wahrscheinlich auch vereinzelt HLA-C-Moleküle detektierte. Zur Charakterisierung von strukturellen Unterschieden von HLA-Peptidkomplexen ein- und derselben Spezifität wurden auch Antikörper gegen Allelspezifische Epitope (wie beispielsweise Tü161 und Tü110 für HLA-B*13) verwendet. Alle eingesetzten Antikörper sind in Tabelle 2 aufgelistet. Alle Antikörper wurden als Hybridomüberstände unverdünnt in Konzentrationen zwischen 5 und 10 ng/ml eingesetzt.

Tabelle 2: Primärantikörper

Antikörper	Spezifität, Beschreibung	Herkunft, Isotyp	Verdünnung	Referenz/Hersteller
Anti-HLA-Bw4-Antikörper				
Tü48	Bw4, A23, A24, A32 Peptidabhängigkeit +	Maus, IgM _κ	unverdünnt	Müller et al., 1982, Takamiya et al., 1996
Tü109	Bw4, keine HLA-A Peptidabhängigkeit ++	Maus, IgG2a _κ	unverdünnt	Müller et al., 1985 Takamiya et al., 1996
MARB3	Bw4, A23, A24, A32 Peptidabhängigkeit +	Maus, IgM _κ	unverdünnt	Rehm et al., 2000
MARB7	Bw4, keine HLA-A Ausnahme HLA-B13 Peptidabhängigkeit +++	Maus, IgM _κ	unverdünnt	Rehm et al., 2000
Andere HLA-spezifische Antikörper				
W6/32.HL auch W6/32	HLA Klasse I (nur als Komplex mit β2m)	Maus, IgG2a	unverdünnt	Barnstable et al., 1978 Parham et al., 1979
W6/32.HK	Inaktive W6/32.HL-Variante	Maus, IgG2a	unverdünnt	Ziegler & Milstein, 1979
B1.23.2	HLA-B und -C, HLA-A9, HLA-A32	Maus, IgG2a	unverdünnt	Rebai & Malissen, 1983 Drouet et al., 1995
OKT6	CD1	Maus, IgG1	unverdünnt	Reinherz et al., 1980
TH4	HLA-B, einzelne HLA-C	Maus, IgG2a	unverdünnt	Müller CA, Tübingen
Tü110	B13	Maus, IgG2b _κ	unverdünnt	Müller et al., 1983
Tü160	A2, A69	Maus, IgG2b _κ	unverdünnt	Spring et al., 1986
Tü161	B13	Maus, IgG2	unverdünnt	Spring et al., 1986
MARB4	B27, nur 5 – 20 %	Maus, IgG2a _κ	unverdünnt	Urban et al., 1994
ME1	B27, B7, B42, B54, B55, B56, B67, B73	Maus, IgG1 _κ	unverdünnt	Ellis et al., 1982 Vilches et al., 1994
SFR8B6	HLA-Bw6, einige HLA-C	Ratte, IgG2b	unverdünnt	Radka et al., 1982
HC-10	Schwere Kette von HLA-B und HLA-C, HLA-A3, A10, A28-33 (ohne β2m)	Maus, IgG2a	unverdünnt	Stam et al., 1986 Perosa et al., 2003 Gauster et al., 2007

Antikörper	Spezifität, Beschreibung	Herkunft, Isotyp	Verdünnung	Referenz/Hersteller
Marker unterschiedlicher Zelltypen				
CD68	Klon 298807 Monozyten, Makrophagen	Maus, IgG2b	1:100	R&D (Wiesbaden)
Tü25	TEC (Epithelialer Marker)	Maus, IgM	unverdünnt	Ziegler A, Berlin Müller CA, Tübingen
Tü106	TEC (Epithelialer Marker)	Maus, IgM	unverdünnt	Ziegler A, Berlin Müller CA, Tübingen
TE-3	cTEC	Maus, IgG2	unverdünnt	ATCC (USA) McFarland et al., 1984
TE-4	mTEC	Maus, IgM	unverdünnt	ATCC (USA) Haynes et al., 1984
CD83	Klon HB15e Reife dendritische Zellen	Maus, IgG1	1:500	AbD Serotec (USA)
vWF	Von-Willebrand-Faktor	Kaninchen, IgG	1:800	GeneTex (USA)
Tü93	CD7 (Pan-T-Zell-Marker)	Maus, IgG	unverdünnt	O'Hea et al., 1986
CD4	Klon MEM-241 T-Helfer-Zellen	Maus, IgG1 FITC-gekoppelt	1:20	Immunotools
CD8	Klon MEM-31 Zytotoxische T-Zellen	Maus, IgG2a FITC-gekoppelt	1:40	Immunotools
CD8	Klon SK1 Zytotoxische T-Zellen	Maus, IgG1 PerCP-gekoppelt	1:4	BD Biosciences

Tabelle 3: Sekundärantikörper

Antikörper/ Reagenz	Herkunft	Verdünnung	Referenz/Hersteller
Anti-Maus- μ -Kette-F(ab') ₂ -Biotin	Ziege	1:500	Jackson/Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG (H+L)-Biotin	Ziege	1:300	Jackson/Dianova, Hamburg
Anti-Maus-IgG (H+L)-Cy3	Ziege	1:500	Jackson/Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-IgG (H+L)-Cy3	Ziege	1:2000	Jackson/Dianova, Hamburg
Anti-Rat-IgG (IgG, IgM, H+L)-Peroxidase	Kaninchen	1:500	Jackson/Dianova, Hamburg
Anti-Maus-Ig-Polymer-Peroxidase	Ziege	vorverdünnt (Kit)	DAKO, Hamburg
Anti-Maus-Ig-Peroxidase (polyklonal)	Kaninchen	1:10000	DAKO, Hamburg

Tabelle 4: Fluoreszierende Reagenzien

Reagenz	Verdünnung	Referenz/Hersteller
Streptavidin-Alexa488	1:500	Invitrogen, Karlsruhe
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	1:2000	Roche, Mannheim

2.8 Indirekte Immunperoxidase-Färbung von Gefrierschnitten

Die Immunhistochemie mit Peroxidase-markierten Antikörpern und Gegenfärbung mit Hämatoxylin erlaubt die spezifische Detektion von Zielmolekülen über eine farbstoffbildende Enzymreaktion, bei gleichzeitig morphologisch deutlicher Gewebedarstellung ohne Verdeckung einer spezifischen histologischen Färbung.

Am Kryotom wurden aus den tiefgefrorenen Gewebsblöcken 5 µm dicke Gefrierschnitte angefertigt und auf Objektträger (R. Langenbrinck) aufgezogen. Die Schnitte wurden eine Stunde bei Raumtemperatur luftgetrocknet und durch zehnminütiges Eintauchen in Aceton fixiert. Nach Evaporation des Acetons für 30 Minuten wurden die Schnitte entweder direkt der immunhistochemischen Färbung zugeführt oder bei -20°C gelagert und vor Verwendung eine Stunde bei Raumtemperatur aufgetaut. Um eine auf das Gewebe begrenzte Auftragung von Reagenzien zu sichern, wurden die Gewebeschnitte mit einem Fettstift (Kisker PapPen) umrandet. Für die Peroxidase-Färbung mit Maus-Primärantikörpern wurde ein gebrauchsfertiges Detektionskit verwendet (Dako EnVision®). Durch fünfminütige Inkubation mit einem Peroxidase-Block-Reagenz (im Kit enthalten) wurden falsch-positive Färbungen durch endogene Peroxidaseaktivität vermieden. Das Reagenz wurde danach zweimalig durch Eintauchen in Waschpuffer (Zusammensetzung siehe unten) für 3 Minuten wieder abgespült. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen des Ziegen-Sekundärantikörpers wurden die Schnitte ferner mit verdünntem Ziegen-Normalserum (DAKO, 1:10 in Waschpuffer) bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Nasskammer inkubiert. Nach Abkippen des Normalserums wurde der Primärantikörper (siehe Tabelle 2) aufgebracht und in gleicher Weise inkubiert. Es folgten drei Waschschrte von je 5 Minuten in Waschpuffer. Als nächstes wurde der im Kit enthaltene Ziegen-Anti-Maus-Antikörper mit konjugiertem Peroxidase-haltigem Polymer zur Detektion der Primärantikörperbindung verwendet. Im Fall von Ratten-Primärantikörpern wurden Peroxidase-markierte Kaninchen-Anti-Ratten-Immunglobuline eingesetzt. Erneut wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Nasskammer inkubiert. Im Anschluss wurden ungebundene Sekundärantikörper durch 4 Waschschrte von je 5 Minuten in Waschpuffer abgespült. Zur Entwicklung der Färbung diente eine im Kit enthaltene Substratpufferlösung mit dem Chromogen DAB (3,3'-Diaminobenzidin), die für 10 Minuten in der abgedunkelten Nasskammer inkubiert wurde. Die DAB-Lösung wurde nach Herstellerangaben aus Chromogen- und Pufferlösung (pH 7,5) gemischt und zusätzlich mit 1 µl Wasserstoffperoxid

versetzt. Nach abgeschlossenem Färbungsprozess folgten zwei Waschschrirte von je 5 Minuten in Waschpuffer. Die Gegenfärbung der Gewebeschnitte erfolgte mit verdünntem Mayer-Hämalaun (Merck, Verdünnung 1:5) für 25 Sekunden. Nach Abspülen und Bläuen des Hämalauns mit Leitungswasser wurden die Schnitte in einer Ethanolreihe dehydriert (je 5 Minuten in 70 %, 96 % und 100 % Ethanol) und anschließend 5 Minuten in Xylol gegeben. Zuletzt wurden die Schnitte mit dem Einschlussmittel Entellan® (Merck) eingedeckelt.

Waschpuffer-Stammlösung (pH 7,4)

6 g Tris

17,4 g NaCl

1000 ml H₂O bidest

pH-Einstellung auf 7,4 mit HCl-Lösung (37 %)

Waschpuffer

Stammlösung 1:10 verdünnt in 0,9 % NaCl-Lösung

DAB-Lösung (Dako)

1 ml Puffersubstrat

1 Tropfen DAB + Chromogen-Lösung

1 µl H₂O₂

2.9 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung

Die Immunfluoreszenzmarkierung erlaubt die Lokalisation verschiedener Antigene an demselben Gewebeschnitt mit hoher Sensitivität bei Doppelmarkierungen. Da die polymorphen HLA-spezifischen Antikörper, die in dieser Studie zur Verfügung standen, fast alle aus der gleichen Wirtspezies (Maus) stammten, wurden für Doppelmarkierungen Primärantikörper unterschiedlicher Immunglobulin-Klassen mit Detektion durch Klassenspezifische Sekundärreagenzien verwendet. Bei den Bw4-spezifischen Antikörpern Tü48, MARB3 und MARB7 handelt es sich um IgM-Antikörper. Nach Bindung eines IgG-Primärantikörpers und erfolgter Inkubation mit einem Sekundärreagenz konnte bei Verwendung dieser Antikörper durch den Einsatz IgM-spezifischer Sekundärreagenzien eine Kreuzreaktion mit dem ersten Primärantikörper vermieden werden. Dazu wurden Biotin-gekoppelte F(ab)₂-Fragmente mit Spezifität für die schwere Kette von IgM-Immunglobulinen verwendet. Für jede Doppelmarkierung wurden Kontrollen unter Weglassen eines Primärantikörpers durchgeführt, die negative Reaktionen im jeweils zweiten alternativen

Fluoreszenzkanal ergeben mussten. Eine alternative Methode mit Isotypen-spezifischen Sekundärreagenzien musste aufgegeben werden, da trotz unterschiedlicher Anpassungsversuche falsch-positive Reaktionen in den Kontrollen nachgewiesen wurden, die am ehesten auf eine nicht ausreichende Spezifität der Sekundärreagenzien zurückzuführen waren.

Nach oben beschriebener Trocknung und Aceton-Fixierung wurden die Gefrierschnitte zweimalig für 5 Minuten in PBS (PAA) gewaschen und mit einem Streptavidin/Biotin-Blockierungsreagenz (Vector) nach Herstellerangaben vorbehandelt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen des Ziegen-Sekundärantikörpers wurden die Schnitte analog zur Peroxidasefärbung mit verdünntem Ziegen-Normalserum (Dako, 1:10 in PBS) bedeckt und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Nasskammer inkubiert. Es folgte die Inkubation des ersten Primärantikörpers für eine Stunde in einer Nasskammer. Zur Verdünnung von Antikörpern wurde 0,1 % BSA/PBS verwendet. Nach drei Waschschritten von je 5 Minuten in PBS wurde ein Fluorochrom-konjugierter Sekundärantikörper mit Spezifität für die Spezies des Primärantikörpers (Maus oder Kaninchen) für eine Stunde inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde mit 1 % BSA/PBS für 20 Minuten blockiert. Die Inkubation des zweiten Primärantikörpers fand über Nacht bei -4°C statt. Zur Vermeidung von Kreuzreaktionen des zweiten Sekundärantikörpers mit dem ersten Primärantikörper bei der Verwendung zweier Maus-Primärantikörper kam die Klassen-spezifische Markierung zum Einsatz. Die Verwendung von Primärantikörpern der Klasse IgM ermöglichte die selektive Bindung von biotinylierten Maus- μ -Ketten-spezifischen F(ab)_2 -Fragmenten. Diese wurden 30 Minuten inkubiert und nach dreimaligem Waschen von je 5 Minuten mit einem Streptavidin-konjugierten Fluorochrom (Alexa488) in einer Inkubationszeit von einer Stunde gekoppelt. Zur Anfärbung der Zellkerne wurde die Streptavidin-Lösung mit $1\ \mu\text{g/ml}$ des Nukleinsäurefarbstoffes DAPI (4',6'-Diamidino-2-Phenylindol, Roche) versetzt. Nach drei Waschschritten von je 5 Minuten wurden die Schnitte mit dem Einschlussmedium FluorPreserve Reagent (Merck) eingedeckelt. Für jede Färbung wurden parallel drei Kontrollen durchgeführt: In jedem Testansatz wurden Kontrollmarkierungen mit Weglassen beider Primärantikörper durchgeführt, um unspezifische Bindung der Sekundärreagenzien an das Gewebe beurteilen zu können. Diese Färbungen erlaubten auch die Unterscheidung zwischen gewebespezifischer Autofluoreszenz als Hintergrundfärbung und schwacher spezifischer Antikörpermarkierung. Durch Weglassen jeweils eines der Primärantikörper konnten Kreuzreaktionen der Sekundärantikörper ausgeschlossen werden.

2.10 Durchflusszytometrie

2.10.1 Bestimmung der Zellzahl

Die aus Thymusgewebe gewonnene Zellsuspension bestand hauptsächlich (über 90 %) aus CD1-positiven Thymozyten, die durchflusszytometrisch mit monoklonalen, überwiegend HLA-spezifischen Antikörpern untersucht wurden. Nach der Isolierung aus dem Thymusgewebe wurde die Zellzahl hierfür in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. 10 µl Zellsuspension wurde mit einem gleichen Volumen 0,4-prozentiger Trypanblaulösung (Gibco) versetzt und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermischt. Trypanblau dringt durch beschädigte Membranen in tote Zellen ein und färbt diese dunkelblau. Tote Zellen sowie die vereinzelt präsenten, rötlichen Erythrozyten wurden beim Zählvorgang gesondert gezählt bzw. für die durchflusszytometrische Analytik nicht berücksichtigt. In vier Gruppenquadraten wurden die intakten Zellen ausgezählt (Größenordnung zwischen 150 und 500 Stück) und die Gesamtzellzahl n_{gesamt} nach folgender Formel berechnet:

$$n_{\text{gesamt}} = n_z \times 4 \times f \times V \times 10000$$

n_z : Zählergebnis in 4 Gruppenquadraten

f : Verdünnung mit Trypanblau, hier 2

V : Gesamtvolumen der Suspension in ml

Der Faktor 4 ergab sich durch Hochrechnung der ermittelten Zellzahl auf 16 Gruppenquadrate (entsprechend einem Großquadrat). Der Multiplikationsfaktor 10000 diente zur Hochrechnung der Zellzahl im berücksichtigten Kammervolumen auf 1 ml.

2.10.2 Färbung der Zellen

Durch direkte und indirekte Immunfluoreszenzmarkierung wurden die interessierenden Antigene auf der Zelloberfläche der Thymozyten für die quantitative Erfassung in der Durchflusszytometrie vorbereitet. Die Färbeprozedur wurde ohne Verzögerung nach Gewinnung der Thymozyten aus dem Gewebe und unter kühlen Bedingungen auf Eis durchgeführt. Pro Färbeansatz wurden 1×10^6 Zellen eingesetzt. Die Zellsuspension wurde für 10 Minuten bei $100 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in Waschpuffer resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurden pro Ansatz 50 µl Polyglobin (Talecris) auf die Zellen gegeben, um die unspezifische Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren zu verhindern. Der Einsatz von Ethidiummonoazidbromid (EMA, Invitrogen, 1 µl

Lösung pro 10^6 Zellen) ermöglichte die Identifizierung toter Zellen bei der Fluoreszenzmessung. Dieser Farbstoff dringt durch Membrandefekte in tote Zellen ein und kann durch Photolyse kovalent an DNA gebunden werden. Die Inkubation erfolgte 10 Minuten unter abgedunkelten Verhältnissen, anschließend weitere 10 Minuten unter einem Leuchttisch zur Anregung der Fluoreszenz. Um bei der Datenanalyse die Auswahl lebendiger Zellen zu erleichtern, wurden die Zellen eines Ansatzes vorher durch 45-minütige Hitzeeinwirkung (56°C) abgetötet und in gleicher Weise behandelt. Nach Zugabe von 1 ml Waschpuffer (Zusammensetzung siehe unten) und Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und 20 μl Maus-Primärantikörper je Ansatz auf das Zellpellet gegeben. Es wurden monoklonale Antikörper mit Spezifität für HLA-Moleküle und T-Zell-Marker verwendet. Antikörper aus Hybridomüberstand wurden in einer Konzentration von 5-10 ng/ml eingesetzt. Sie stammten aus der Maus und waren IgG- oder IgM-Antikörper. Als Negativkontrollen dienten Testansätze ohne Primärantikörper und eine Isotypkontrolle mit dem inaktiven Maus-IgG-Antikörper W6.32/HK. Nach 20-minütiger Inkubation und einem Waschschrift wurden 20 μl eines fluoreszenzmarkierten Anti-Maus-Sekundärantikörpers eingesetzt und erneut 20 Minuten inkubiert. Nach der Zugabe fluoreszierender Farbstoffe wurden alle weiteren Schritte unter Abdunklung durchgeführt, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzintensität im Umgebungslicht zu vermeiden. Der Einsatz eines APC-gekoppelten Maus-Anti-CD1a-Antikörpers (20 μl pro Ansatz) ermöglichte die elektronische Auswahl kortikaler Thymozyten in der Durchflusszytometrie für die Beurteilung der Expression von HLA-Antigenen und anderen Zellmerkmalen. Freie Anti-Maus-Sekundärantikörper wurden vorher mit 10-prozentigem Maus-Normalserum (DAKO, 50 μl pro Ansatz) gebunden und durch einen weiteren Waschvorgang aus dem Ansatz entfernt. Nach einem abschließenden Waschvorgang wurden die Zellen in 200 μl Waschpuffer resuspendiert und in Messröhrchen überführt.

Waschpuffer (Durchflusszytometrie)

PBS (PAA)

2 % FCS (Biochrom)

0,01 % NaN_3

2.10.3 Durchflusszytometrische Messung und Gating-Strategie

Nach der Zellmarkierung wurde umgehend die durchflusszytometrische Messung durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung erfolgte am Durchflusszytometer LSRII (BD) mit der Software FACSDiva (BD). Routinemäßig wurden Beads (BD CompBeads) verwendet, um überlappende Emissionsspektren parallel verwendeter Fluoreszenzfarbstoffe Softwaregesteuert zu korrigieren (Kompensation). Zur Einstellung des Systems auf die zu analysierenden Zellen wurde ein Ansatz unmarkierter, naturbelassender Zellen gemessen und in einem Zweiparameterdiagramm (Dotplot) dargestellt, in welchem die Intensität des Vorwärtsstreulichts (*forward-scatter*, FSC) als Maß für die Zellgröße und des Seitwärtsstreulichts (*side-scatter*, SSC) als Maß für die Granularität der Zellen korreliert wurden. Um die Thymozytenpopulation in diesem Dotplot optimal zu positionieren und um die Autofluoreszenz der Zellen in allen verwendeten Farbkanälen auf einen Wert von etwa 10^2 zu normieren, wurde die Ausgangsspannung der Signalverstärkungseinheit der Photoröhren vor jeder Messung angepasst. Kleine Partikel wie Zelldebris wurden durch die Verwendung eines FSC-Schwellenwerts aus der Messung ausgeschlossen. Die einzelnen Testansätze wurden nachfolgend vermessen, wobei pro Ansatz die Daten von etwa 100 000 – 200 000 Zellen aufgenommen wurden. Für die Auswertung der Messdaten wurde FlowJo 7 (BD) verwendet. Thymozyten repräsentierten die mit Abstand größte Zellpopulation und konnten durch eine deutlich abgegrenzte Punktwolke für die weitere Analyse markiert werden. Um avitale Teilpopulationen aus der weiteren Auswertung auszuschließen, wurde in demjenigen Ansatz, der nach Erhitzung fast ausschließlich tote Zellen enthielt, ein „Lebend“-*Gate* gesetzt. Die große Masse toter, EMA-positiver Zellen ermöglichte eine sichere Abgrenzung des Intensitätsspektrums der EMA-negativen Thymozyten. Zur gezielten Auswahl kortikaler Thymozyten wurde ein weiteres *Gate* um die APC-markierte CD1a-positiv Teilpopulation gesetzt.

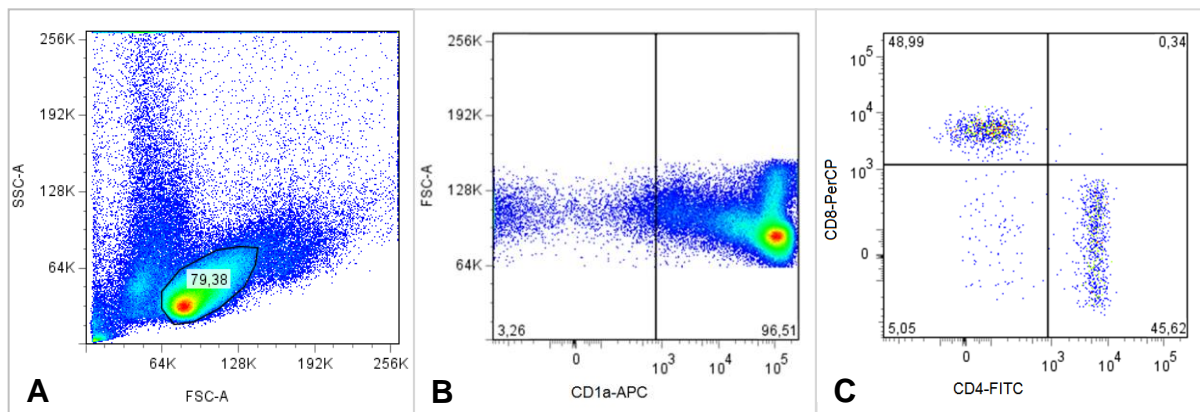


Abb. 4: Gating-Strategie zur Auswahl vitaler Thymozyten medullärer oder kortikaler Herkunft

Beispielhaft gezeigt anhand von Daten der Thymozyten aus Thymus S2598. Im *Scatterplot* (FSC gegen SSC) wurde die Thymozytenpopulation ausgewählt (A). Die Auswahl vitaler Zellen erfolgte durch ein „Lebend“-Gate (EMA gegen FSC, nicht abgebildet). Alle Thymozyten wurden mit einem APC-gekoppelten Anti-CD1a-Antikörper markiert. In jedem Versuch lag der gemessene Anteil CD1a-positiver Zellen über 90 % (Anti-CD1a-APC gegen FSC) (B). Bei CD1a-negativen Zellen handelt es sich zu über 90 % um CD4 oder CD8 einfach positive Thymozyten (C). Die CD1a-Expression stellt insofern ein ausreichend-spezifisches Merkmal zur Unterscheidung zwischen Thymozyten kortikaler und medullärer Herkunft dar.

2.11 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (mit nachfolgender Gelelektrophorese und Western-Blot) ermöglicht die Isolierung, Konzentrierung und Charakterisierung von nativen Proteinen aus Zelllysat nach dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Reaktion. Dabei bindet ein an Protein-A-Sepharose gekoppelter Antikörper das Zielprotein im Lysat, sodass der Gesamtkomplex inklusive Antigen im Anschluss mittels Zentrifugation aus der Lösung präzipitiert werden kann. Dieses Präzipitat wird dann gelelektrophoretisch aufgetrennt und mit der Western-Blot-Methode weiter untersucht.

2.11.1 Herstellung von Lysaten

Gewebeproben wurden am Kryotom durch Anfertigen von entsprechenden Gefrierschnitten disseziert und mit RIPA-Lysepuffer aufgeschlossen. Dabei wurden pro 100 mg Gewebe 1000 µl RIPA mit Proteaseinhibitoren eingesetzt. Nach einer einstündigen Inkubationszeit auf Eis wurde das Lysat durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren und 30-sekündiger Ultraschallbehandlung homogenisiert. Um Zelltrümmer und -organellen zu entfernen, wurde das Lysat für 10 Minuten bei 14 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -80°C gelagert.

RIPA-Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7.4

150 mM NaCl

1 mM EDTA

1 % Triton X-100

1 % Na-Deoxycholat

0.1 % SDS

Zu jeweils 10 ml RIPA wurde kurz vor Verwendung eine Proteaseinhibitor-Tablette (Complete Mini EDTA-free, Roche) und PMSF (1 mM, Sigma) zugegeben.

2.11.2 Präzipitation

Der Prozess der Präzipitation wurde unter gekühlten Bedingungen (Zieltemperatur 4°C) durchgeführt. Pro Ansatz (pro Antikörper) wurden 50 mg Protein-A-Sepharose (Rec Protein-A-Sepharose® 4B, Invitrogen) eingesetzt, die vor Verwendung durch dreimaliges Waschen gereinigt wurden. Das Lysat wurde einem *Pre-clearing* zugeführt, wobei Substanzen aus der Lösung entfernt wurden, die unspezifisch an Protein-A-Sepharose binden konnten. Zu 1 ml Lysat wurden dafür 50 mg Protein-A-Sepharose eingemischt und eine Stunde unter Rotation im Überkopfschüttler inkubiert. Gebundene Bestandteile des Lysats wurden abzentrifugiert (14000 x g, 30 Sekunden) und der Überstand mit dem gereinigten Lysat abgenommen und aliquotiert. Um die Antikörper an die Protein-A-Sepharose zu koppeln, wurden 900 µl PBS und 50 µl Protein-A-Sepharose mit 4 µg aufgereinigtem Antikörper (TH4, Tü109) oder 50 µl Überstand (HC-10) versetzt und für eine Stunde unter Rotation inkubiert. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert (14000 x g, 30 Sekunden). Die Antikörper-Protein-A-Sepharose-Komplexe bilden ein Pellet, das vorsichtig von Überstand befreit und dreimalig mit 500 µl PBS gewaschen wurde. Auf diese Pellets wurde je 300 µl vorgereinigtes Lysat gegeben und für eine Stunde unter Rotation inkubiert. In dieser Zeit binden die gekoppelten Antikörper an das Antigen im Lysat. Die Komplexe aus Antigen, Antikörper und Protein-A-Sepharose wurden durch Zentrifugation (14000 x g, 30 Sekunden) präzipitiert und dreimalig mit 500 µl PBS gewaschen. Die Überstände wurden jeweils verworfen. Nach dem Western-Blot-Prinzip wurden die präzipitierten Proteinfractionen nun mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran übertragen und mit Hilfe von Antikörpern und Chemilumineszenz detektiert. Dazu wurde in Vorbereitung der SDS-Gelelektrophorese das gebundene Protein-A-Sepharose-Pellet in 40 µl PBS, 20 µl *Sample*

buffer 4x (NuPAGE®, Invitrogen) und 6 µl *Reducing Agent 10x* (NuPAGE®, Invitrogen) aufgenommen. Als Positivkontrolle wurden 40 µl vorgereinigtes Lysat in ebenfalls 20 µl *Sample Buffer* und 6 µl *Reducing Agent* eingemischt. Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C inkubiert, abzentrifugiert (14000 x g, 1 Minute) und jeweils 15 µl der Überstände in die Geltaschen eines Polyacrylamidgels (NuPAGE® Novex® Bis-Tris Mini) eingebracht. Zur Erzeugung von Referenzbanden mit definiertem Molekulargewicht wurden 10 µl gefärbte Proteinstandards (Precision Plus Protein™ Dual Color, BioRad) eingesetzt. Nach Auftrennung der Proteinfractionen in einer Elektrophoresekammer (Invitrogen Xcell SureLock™ Mini-Cell mit NuPAGE® MES-Laufpuffer) wurden die Proteine nach dem Prinzip des Semi-Dry-Blots mit einer Transferapparatur (Peqlab) vom Gel auf die PVDF-Membran (Immobilon-P, Milipore) elektrophoretisch übertragen (Konditionen: 90 Minuten, 50 V, 144 mA pro Gel). Für den Transfer wurde die PVDF-Membran mit Methanol vorbehandelt und wie auch das Gel in Transferpuffer äquilibriert. In der Blottingapparatur wurden Gel und Membran zwischen zwei Lagen aus in Transferpuffer getränkten Filterpapieren luftblasenfrei aufgeschichtet. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die PVDF-Membran nun eine Stunde in einer 5-prozentigen Milchpulverlösung geschwenkt und anschließend mit der Lösung des Primärantikörpers zwischen zwei Plastikfolien luftblasenfrei verschweißt. Für die Antikörperlösung wurden 4 µg aufgereinigte Antikörper oder 50 µl Überstand mit Milchpulverlösung auf ein Volumen von 1 ml verdünnt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Es folgten drei Waschschrte in TTBS von je 10 Minuten. Für die Kopplung des Meerrettichperoxidase-konjugierten Sekundärantikörpers (Kaninchen-Anti-Maus-Ig-Peroxidase, DAKO), wurde die PVDF-Membran erneut luftblasenfrei in Plastikfolie eingeschweißt und mit der Antikörperlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei Waschschrten in TTBS von je 10 Minuten erfolgte die Auftragung einer Chemilumineszenz-Substratlösung (Merck RapidStep ECL Reagent) nach Herstellerangaben. Das in der Lösung enthaltene Luminol wurde in Anwesenheit von Meerrettichperoxidase in ein lumineszierendes Produkt oxidiert, das den in einer Röntgenfilmkassette auf die PVDF-Membran aufgelegten lichtsensitiven Film (Amersham Hyperfilm, GE Healthcare) färbte.

RIPA-Lysepuffer

50 mM Tris-HCl, pH 7,4
 150 mM NaCl
 1 mM EDTA
 1 % NP-40
 0,5 % Na-Deoxycholat
 0,1 % SDS

Transferpuffer

25 mM Tris base
 192 mM Glycin
 20 % Methanol

Milchpulverlösung

5 % (w/v) Magermilchpulver in TTBS

Zu jeweils 10 ml RIPA wurde kurz vor Verwendung eine Proteaseinhibitor-Tablette (Complete Mini EDTA-free, Roche) und PMSF (1 mM, Sigma) zugegeben.

10x TBS

25 mM Tris-HCl
 137 mM NaCl
 2,7 mM Kaliumchlorid
 pH 7,4

TTBS

900 ml dH₂O
 100 ml 10x TBS
 1 ml Tween® 20 (Merck)

2.12 Laser-Mikrodissektion von Thymusgewebe

Die im National Cancer Institute entwickelte Technik der *Laser-Capture-Microdissection* (LCM) ermöglicht es, einen unter mikroskopischer Kontrolle ausgewählten Bereich im Gewebeschnitt durch Laserimpulse auszuschneiden, an eine thermoplastische Transferfolie zu binden und damit für molekulare Analysen zu isolieren (Emmert-Buck et al., 1996). Das im Rahmen dieser Arbeit zur Verfügung stehende PALM® MicroBeam-System (Zeiss MicroImaging) kombiniert die *Laser-Microdissection* mit der Technik des *Pressure-Catapultings* (LMPC). Hierbei wird nach Software-gesteuerter Markierung ein Gewebeareal mit fokussiertem Laser ausgeschnitten und anschließend entgegen der Schwerkraft in ein überkopf platziertes Sammelgefäß katapultiert. Dies wird durch einen kurzen, leicht subfokalen Laserimpuls bewerkstelligt (Niyaz et al., 2005).

2.12.1 Vorbereitung der Gewebeschnitte

Thymusgewebe wurde am Kryotom in 20 µm dicke Gefrierschnitte disseziert und auf Objektträger mit Kunststoffmembran-Beschichtung (MembranSlide 1.0 PET, Zeiss MicroImaging) platziert. Die Objektträger wurden mit 30-minütiger UV-Licht-Bestrahlung vorbehandelt, was die Geweheadhäsion durch Reduktion der Membranhydrophobizität verbessern sollte. Die Schnitte wurden mit Hämalaun nach Mayer (Merck, Verdünnung 1:1 in dH₂O) gefärbt und nach kurzem Bläuen in Leitungswasser mit dH₂O gespült. Bei dieser Prozedur wurde Proteaseaktivität durch die Zugabe von Proteaseinhibitoren (0,2 mM PMSF, Sigma; 20 µM Leupeptin, Roche; 1 µM Pepstatin, Roche) gehemmt. Anschließend wurden die Schnitte lyophilisiert (1 Stunde, -60°C, 50 mTorr) und bis zur LCM in einem Exsikkator in Trockenvakuum aufbewahrt.

2.12.2 LMPC (*Laser capture pressure catapulting*)

Nach Bildeinstellung am inversen Lichtmikroskop des PALM® MicroBeam-Systems ermöglichte die Programmoberfläche (RoboSoftware) die Umrandung des zu isolierenden Gewebeareals mithilfe von digitalen Zeichenwerkzeugen am Monitor. Trotz Gefriertrocknung, der relativ großen Schnittdicke und dem Verzicht auf spezifische Anfärbung war die Gewebequalität und -morphologie ausreichend, um medulläre Anteile vom kortikalen Thymusgewebe zu unterscheiden. Mit optimierter Lasereinstellung (UV-Energie-Wert 66, Fokus-Wert 70-75, variierend nach Schnitt) wurden medulläre Areale von etwa 100 000 µm² ausgeschnitten. Diese Größe stellte einen Kompromiss zwischen möglichst zuverlässiger Laser-Katapultierung und größtmöglicher Gewebemenge dar. Kurze Laserimpulse mit Fokus knapp unterhalb der Gewebeebene bewirkten die Photovolatilisation des ausgeschnittenen Gewebes über mehrere Millimeter in den adhäsiv beschichteten Deckel eines speziellen Eppendorf-Sammelgefäßes (AdhesiveCap opaque, Zeiss MicroImaging). Das Gewebe wurde bis zur massenspektrometrischen Analyse sofort tiefgefroren.

2.13 Isolierung und Sequenzierung HLA-gebundener Peptide aus dem Thymus

Zur affinitätschromatographischen Aufreinigung von HLA-Klasse-I-Komplexen wurden Thymusgewebeprobe homogenisiert und in Lysepuffer aufgeschlossen. Währenddessen wurden HLA-Klasse-I-spezifische Antikörper an die Gelmatrix einer Affinitätssäule gekoppelt. Beim zyklischen Durchfluss des Lysats durch die Säule konnten HLA-Komplexe dann an die Antikörper binden und anschließend durch saure Elution freigesetzt werden. Hierbei wurden auch die nicht-kovalent gebundenen Peptide aus dem Bindungsspalt der HLA-Moleküle gelöst und konnten nach Ultrafiltration und weiterer Aufkonzentrierung mittels Lyophilisation der massenspektrometrischen Analyse zugeführt werden. Die massenspektrometrische Datenerhebung erfolgte in fachkundiger Bearbeitung durch Christian Hotz und Nico Trautwein und Supervision durch Prof. Dr. Stefan Stevanović der Abteilung Immunologie des Interfakultären Instituts für Zellbiologie des Universitätsklinikums Tübingen.

2.13.1 Verwendete Gewebeprobe

Für die HLA-Peptidisolierung wurde der Thymus S2585 verwendet, der das Einschlusskriterium von einem Alter unter vier Jahren erfüllte und von welchem Thymozyten in sehr ergiebiger Anzahl isoliert werden konnten. Thymozyten, die nach der in Kapitel 2.5 beschriebenen Methode aus Thymusgewebe isoliert worden waren, erwiesen sich in der durchflusszytometrischen Analyse konstant zu einem überwiegenden Anteil als CD1a-positive Thymozyten (90-96 % CD1a-positiv, im Mittel 94,4 %) und repräsentierten damit hauptsächlich kortikale Zellen (Kaymaz et al., 2003; Leong et al., 2003). Die in Kapitel 2.12 beschriebene Laser-Mikrodissektion ermöglichte die Entfernung von Markarealen am gleichen Thymus, sodass die zurückbleibenden Gewebsanteile ebenfalls für die Isolierung kortikaler HLA-Peptide eingesetzt werden konnten.

2.13.2 Herstellung der Immunaффinitätssäulen

Pro Gramm Gewebe wurde für jede Mikrosäule 1 mg Antikörper an 40 mg CNBr-aktivierte Sepharose 4B (GE Healthcare) gekoppelt. Die abgewogene Menge Sepharose wurde unter einstündiger Rotation in HCl-Lösung (1 mM) reaktiviert und von Zusatzstoffen befreit und anschließend für 4 Minuten bei 19 x g und deaktivierter Bremsfunktion abzentrifugiert. Nach

vorsichtigem Abpipettieren des Überstandes wurde der Antikörper auf das sedimentierte Gel gegeben und das Röhrchen zur Neutralisierung des sauren pH-Werts mit Kopplungspuffer aufgefüllt. Es folgte eine 2-stündige Inkubation unter langsamer Rotation bei Raumtemperatur. Die Kopplungseffizienz wurde photometrisch durch Bestimmung der Absorbanz des Sepharoseüberstandes bei 280 nm vor (t_0) und nach (t_1) der Inkubationszeit festgestellt. Der Quotient t_1/t_0 erreichte Werte unter 0,1, sodass auf eine Kopplungseffizienz von mindestens 90 % geschlossen werden konnte. Nach erneuter Zentrifugation (19 x g, 4 Minuten) und Entfernung des Überstandes wurden freie Bindungsstellen der aktivierten Sepharose durch einstündige Inkubation einer Glycinlösung (0,2 M) abgesättigt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Sepharose in die Mikrosäule überführt und vor Auftragen des Lysats 30 Minuten mit PBS durchspült (Flussrate 1-2 ml/min).

2.13.3 Aufreinigung von HLA-Liganden aus dem Thymus durch Affinitätschromatographie

Die Prozeduren des Probenaufschlusses und der HLA-Peptidisolierung wurden unter kühlen Bedingungen (Zieltemperatur 4°C) durchgeführt. Das gefrorene Thymusgewebe wurde in einer Petrischale mit Lysepuffer bedeckt, mit einem Skalpell zerkleinert, in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator unter Eiskühlung aufgeschlossen und anschließend für eine Stunde auf einem Magnetrührer gerührt. Das Thymozytenpellet sowie die auf PEN-Folien befindlichen Dissektate wurden ohne vorausgehende Homogenisierung in Lysepuffer aufgenommen und gleichermaßen durch einstündiges Rühren in Suspension gebracht. Es folgte eine Ultraschallbehandlung in Pulsintervallen von 3 x 20 Sekunden im Wechsel mit Eiskühlung und eine weitere Stunde Rühren bei 4°C. War die Überführung des Lysats in ein neues Gefäß notwendig, so wurde der Verlust von zurückbleibendem Lysat durch Nachspülen mit Lysepuffer begrenzt. Ein Gesamtvolumen von etwa 8 ml wurde nicht überschritten, um eine unnötige Verdünnung des Lysats zu vermeiden. Zur Beseitigung von Zelltrümmern wurde das Lysat für 20 Minuten bei 3020 x g und 4°C zentrifugiert. In diesem Schritt wurden auch die PEN-Folien vom Lysat der Dissektate getrennt. Die Überstände wurden in 2 ml-Eppendorf-Gefäße pipettiert und für 99 Minuten bei 16 060 x g und 4°C zentrifugiert, um kleinere Partikel abzutrennen. Im Anschluss daran wurde der Überstand durch einen Spritzenvorsatzfilter mit 0,22 µm Porengröße steril filtriert und über zwei Nächte zyklisch durch die Immunaффinitätssäulen geleitet (Flussrate 1-2 ml/min). In der ersten Nacht wurde zur Isolierung von HLA-B-Komplexen der Antikörper B1.23.2 verwendet, in der

darauffolgenden Nacht wurden restliche HLA-Klasse-I-Komplexe mit dem Antikörper W6/32.HL gebunden. Nach Bindung der HLA-Komplexe an die Gelmatrix wurden die Affinitätssäulen durch linearen Durchfluss von PBS für 30 Minuten und doppelt entionisiertem H₂O für eine Stunde gewaschen und anschließend trocken gepumpt. Zur Elution wurde 0,2-prozentige TFA (Trifluoressigsäure) verwendet. TFA wurde achtmal mit einem die Gelmatrix bedeckenden Volumen (etwa 50 µl) aufgetragen, unter kräftigem Schütteln 15-30 Minuten inkubiert und in einem mit 0,2-prozentiger TFA vorgewaschenem Zentrifugalfiltrerröhrchen (Amicon Ultra-0.5, 10K) gesammelt. Beim ersten Elutionsschritt kam zusätzlich 1 µl 10-prozentige TFA zum Einsatz, um einer Verdünnung durch Restflüssigkeit in der Säule entgegenzuwirken. Die sauren Bedingungen lösten die HLA-Komplexe von der Bindung an die Antikörper der Säulenmatrix und mobilisierten die Peptide aus ihrer Verankerung im Peptidbindungsspalt. Das Filtrerröhrchen wurde nun bei 16000 x g zentrifugiert bis das Eluat vollständig den Filter passiert hatte. Die nominale Molekülausschlussgröße des Zentrifugalfilters von 10 kDa hielt schwerere Moleküle wie die HLA- α -Kette (44 kDa), das β_2 -Mikroglobulin (12 kDa) oder Antikörperketten zurück; die zu isolierenden Peptide durchliefen den Filter ungehindert. Das Filtrat wurde nun lyophilisiert und bis zur massenspektrometrischen Analyse bei -80°C gelagert.

Lysepuffer (2x)

400 mg CHAPS (Roche)

1 Tablette Proteaseninhibitor¹

660 µl Phosphataseninhibitorcocktail²

33 ml PBS

Kopplungspuffer

0,5 M NaCl

0,1 M NaHCO₂

NaOH bis pH 8,3

Lösungsmittel A

H₂O

2 % Acetonitril

0,1 % Ameisensäure

Lösungsmittel B

H₂O

80 % Acetonitril

0,1 % Ameisensäure

¹ Complete Mini EDTA-free, Roche

² Phosphataseninhibitorcocktail (100x)

200 mM Imidazol

100 mM Na

115 mM Na₂MoO₄

100 mM Na₃VO₄

400 mM Na₂C₄H₄O₆

200 mM β -Glycerophosphat

200 mM NaH₂P₂O₇

Zugabe von 37 % HCl bis zur vollständigen Lösung der Inhaltsstoffe

2.13.4 HPLC-MS/MS

Massenspektren der eluierten Peptide wurden am LTQ-Orbitrap XL-Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) aufgezeichnet, das mit einer Elektrospray-Einheit an ein nano-HPLC-System (Eksigent) gekoppelt war. Dafür wurden die gefriergetrockneten Peptidproben durch wiederholtes Vortexen in 25 µl Lösungsmittel A resuspendiert, zentrifugiert (16000 x g, 5 Minuten, 4°C) und 6 µl des Überstands in ein Autosampler-Gefäß pipettiert. Es folgte die automatische Injektion in eine 10 µl-Probenschleife und die Beladung einer C₁₈-Vorsäule (Dionex) mit einer Flussrate von 20 µl/min zur Entsalzung und Aufkonzentrierung der Probe. In der nachgeschalteten Mikrokapillartrennsäule (LC Packings) wurden die Peptidproben nach dem *Reverse-phase*-Prinzip mittels eines linearen Gradienten von 0 bis 55 % Lösungsmittel B bei einer Flussrate von 300 nl/min über 120 Minuten aufgetrennt. Dabei wurden die unterschiedlich starken hydrophoben Wechselwirkungen zwischen den Peptiden in der polaren Phase und dem unpolaren Packmaterial der Säule durch den steigenden Anteil des unpolaren Lösungsmittels zu verschiedenen Zeitpunkten überwunden, sodass die Peptide nach unterschiedlichen Retentionszeiten die Trennsäule verließen. Eine metallbeschichtete Quarzglaskapillare (PicoTip®, New Objective) diente zur Einleitung der *on-line*-Elektrosprayionisation (ESI) bei einer kontinuierlichen Flussrate von 300 nl/min. Die ESI stellt eine schonende Ionisationsmethode dar, bei der die Probenlösung in einem starken elektrischen Feld in zunehmend kleiner werdende, geladene Flüssigkeitströpfchen vernebelt wird, von denen ionisierte Peptide in die Gasphase überführt werden. Ob dies durch direkte Emission der Solventen aus dem Tröpfchen in die Gasphase (*ion evaporation model*) oder durch vollständige Desolvation des Lösungsmittels von einem einzigen Ion, das die Ladung des Tröpfchens annimmt (*charge residue model*), geschieht, ist bislang umstritten (Kearle & Verkerk, 2009). Von der ESI-Quelle bewegen sich die Analytionen entlang des elektrischen Feldes zur Transferkapillare und gelangen über Radiofrequenz-geführte Multipole in die lineare Ionenfalle (LTQ), wo sie schnell und hochsensitiv detektiert werden können (Scigelova & Makarov, 2006). Über ein Transfer-Oktopol-System gelangen die Ionen in die *C-trap*, einer bogenförmigen Quadrupol-Ionenfalle, die Ionen akkumuliert und speichert. Die *C-trap* enthält ein Stickstoffvakuum von etwa 1 mTorr, das die Ionen abbremst und die gepulste Ejektion von komprimierten Ionenpaketen durch kurzfristige Applikation hoher Spannungen ermöglicht. Es folgt die Messung in der hochauflösenden und massegenauen Orbitrap, einem Massenspektrometer neuerer Generation mit Markteinführung im Jahr 2005 (Hu et al., 2005). Die Ionen erreichen die Öffnung der orthogonal platzierten Orbitrap und treten tangential in

Kreisbahnen um die zentrale Spindelelektrode ein. Im elektrostatischen Feld der Orbitrap rotieren die Ionen mit einer axialen Oszillation, die durch die Injektion der Ionen abseits des Spindeläquators initiiert wird und deren Frequenz durch äußere Detektorplatten ermittelt wird. Aus dem mittels Fourier-Transformation erstellten Frequenzspektrum lässt sich das Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) der Ionen bestimmen (Makarov et al., 2006). Zur Erzeugung von Fragmentspektren für die MS/MS-Massenspektrometrie können Ionen entweder durch *collision-induced dissociation* (CID) in der LTQ oder durch *high-energy collisional dissociation* (HCD) in der an die *C-trap* angeschlossene Oktopol-Stoßzelle fragmentiert werden (Olsen et al., 2007). Bei einer Aquisitions geschwindigkeit von 1 Hz wurden Übersichtsspektren im Bereich von 400–800 m/z mit einer Auflösung von 60 000 im Orbitrap-Massenanalysator aufgezeichnet. Der Peak von Polysiloxan-Ionen ($m/z = 445.12003$) als *lock mass* ermöglichte dabei die interne Echtzeit-Kalibrierung (Olsen et al., 2005). Von den fünf intensivsten Ionen des Übersichtsscans wurden in der LTQ-Ionenfalle Fragmentspektren aufgenommen und die Vorläufermassen im Anschluss für 90 Sekunden von der weiteren Sequenzierung ausgeschlossen.

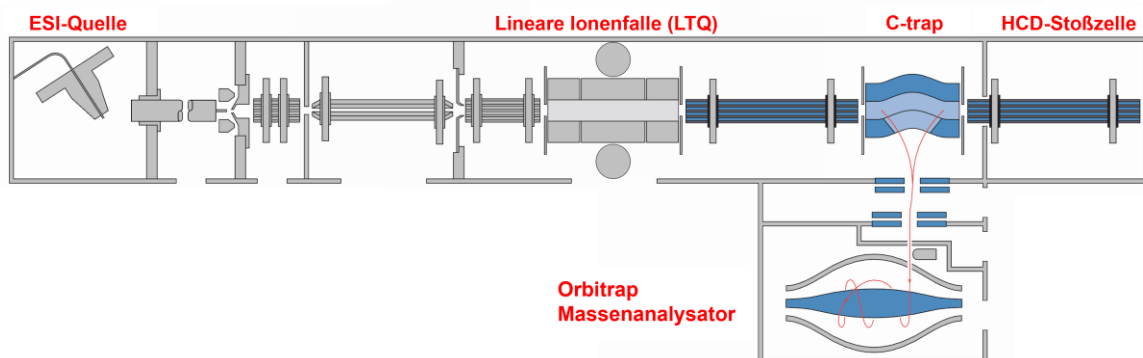


Abb. 5: Aufbau der LTQ Orbitrap XL

Die LTQ Orbitrap ist ein Hybrid-Massenspektrometer, bestehend aus einer linearen Ionenfalle in der die Analytione akkumuliert, isoliert und fragmentiert werden können, und der hochsensitiven und masse genauen Orbitrap. Die *C-trap* vermittelt zwischen beiden Systemen, indem sie Ionen zwischenspeichert und die gepulste, orthogonale Injektion von komprimierten Ionenpaketen in die Orbitrap bewerkstelligt.

Abbildung nach Vereinbarung übernommen aus der Produktbeschreibung von Thermo Fisher Scientific.

2.13.5 Datenanalyse

Die vom Massenspektrometer aufgezeichneten Rohdaten wurden mit der Software *Proteome Discoverer 1.1* (Thermo Fisher Scientific) unter Verwendung des Mascot-Algorithmus (Matrix Science, Perkins et al., 1999) weiterverarbeitet. Hierbei erfolgte eine probabilistische Zuordnung von Peptidvorschlägen aus der humanen Datenbank des *International Protein Index* zu den Fragmentspektren. Fragmentspektren wurden softwaregesteuert gruppiert, wenn deren Vorläufermassen um weniger als 3 ppm voneinander abwichen und die Spektren innerhalb des gleichen 90-Sekunden-Zeitfensters aufgenommen wurden. Jedes Fragmentspektrum lieferte bis zu 10 Peptidvorschläge mit Rangordnung nach zugehörigem *ion score* (*IS*). Dieser Punktwert ist mit der absoluten Wahrscheinlichkeit P eines nur zufällig zustande gekommenen Treffers über die Formel $IS = -10 \cdot \log_{10} P$ invers korreliert: Ein hoher *ion score* zeigt eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine falsch-positive Zuordnung an. Für die Eingrenzung plausibler Vorschläge wurden intern validierte Filterkriterien eingesetzt: Peptidvorschläge mit einem *ion score* unter 20, einem niedrigeren Rang als 3, einem Ladungszustand des Vorläuferions ungleich zwei und mehr als 3 ppm Massenabweichung zur gemessenen Masse des Vorläuferions wurden aussortiert. Es folgte ein Abgleich mit einer internen Datenbank zur Identifikation bereits bekannter Peptide und deren HLA-Zuordnung. Die Online-Datenbank SYFPEITHI (www.syfpeithi.de) erlaubte eine auf typische Sequenzmotive gestützte Suche nach passenden HLA-Allelen für unbekannte Peptide (Rammensee et al., 1999). Da die HLA-Klasse-I-Allele durch vorausgegangene Typisierung der Thymusproben (siehe Kapitel 2.6) bereits bekannt waren, konnten die Ergebnisse direkt verglichen und validiert werden.

3 Ergebnisse

3.1 Übersicht der verwendeten Thymusgewebeproben und Ergebnisse der HLA-Typisierung

Nach Resektion im Rahmen von korrektiven Herzoperationen wurde das Thymusgewebe entweder umgehend durch Schockgefrieren konserviert oder direkt analysiert. Die Typisierung des Gewebes erfolgte auf DNA-Ebene in Niedrigauflösung (*2-digit-level*) mit der Luminex-Technologie. Um altersabhängige Veränderungen, die die Stärke der HLA-Expression oder das Ausmaß der Involution betreffen konnten, zu minimieren, wurden nur Gewebeproben von Patienten unter vier Jahren in die Arbeit einbezogen.

Tabelle 5: Bezeichnung, Alter der Spender und HLA-Genotypen der analysierten Thymi

Thymus	Alter Patient/in	HLA-Typisierung	Bw4/Bw6	Methode
S2580	1 Jahr	A*02, A*02 B*15:01, B*57	heterozygot	Immunhistochemie
S2585	14 Tage	A*01, A*24 B*15:01, B*57	heterozygot	HPLC-MS/MS, Immunhistochemie
S2594	1 Monat	A*02, A*24 B*38, B*51	Bw4 homozygot	Durchflusszytometrie Immunhistochemie
S2596	8 Monate	A*01, A*26 B*08, B*15	heterozygot	Durchflusszytometrie
S2598	2 Monate	A*30:01, A*32:01, B*18:01, B*39:01	Bw6 homozygot	Durchflusszytometrie Immunhistochemie
S2584	6 Monate	B*38, B*40:01	heterozygot	Immunpräzipitation
S2580	1 Jahr	A*02, A*02 B*15, B*57	heterozygot	Immunhistochemie
T354	4 Monate	A*03, A*24 B*18, B*18	Bw6 homozygot	Immunhistochemie
T361	3 Jahre	A*02, A*30 B*13, B*49	Bw4 homozygot	Immunhistochemie
T372	1 Jahr	A*01, A*26 B*13, B*44	Bw4 homozygot	Immunhistochemie

Thymus	Alter Patient/in	HLA-Typisierung	Bw4/Bw6	Methode
T375	5 Monate	A*02, A*26 B*13, B*15:01	heterozygot	Immunhistochemie
T378	11 Tage	A*24, A*30 B*13, B*18	heterozygot	Immunhistochemie
T387	3 Monate	A*01:01, A*24:02 B*08:01, B*27:05	heterozygot	Immunhistochemie
T389	4 Monate	A*26, A*29 B*07, B*38	heterozygot	Immunhistochemie
T395	4 Monate	A*02, A*11 B*35, B*52	heterozygot	Immunhistochemie
T408	1 Jahr	A*03, A*11, B*07, B*51	heterozygot	Immunhistochemie
T419	2 Wochen	A*03:01, A*24:02 B*27:05, B*44:02	Bw4 homozygot	Immunhistochemie

3.2 Immunpräzipitation mit Tü109, TH4 und HC-10

Um die schwere Kette des HLA-B-Moleküls als gemeinsames Antigen der Antikörper Tü109, TH4 und HC-10 zu verifizieren, wurde Gewebelysat des Thymus S2584 einer Immunpräzipitation zugeführt. Die jeweiligen mit Tü109 bzw. TH4 präzipitierten Produkte wurden in einem nachfolgenden Western Blot mit HC-10 detektiert (Co-Immunpräzipitation). Dieses Verfahren wurde als Alternative zum direkten Western Blot gewählt, da Tü109 und TH4 hier wiederholt nur unspezifische Bandenmuster lieferten. Dies war wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass die angewandten Western-Blot-Protokolle die Nativstruktur der HLA-Peptidkomplexe in der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zerstörten, sodass es zu einem Verlust der Bindungsepitope beider Antikörper kam. Die mit TH4, Tü109 präzipitierten Proteinfraktionen aus dem Thymuslysat zeigten in der nachfolgenden Detektion mit HC-10 ein Produkt, das knapp unterhalb des 50 kDa-Proteinstandard eine Bande bildete, vereinbar mit der schweren Kette von HLA-Klasse-I-Komplexen (44 kDa). Der Anti-Maus-Ig-Sekundärantikörper band auch Antikörper (bzw. -fragmente), die aus den Präzipitaten stammten, nicht aber die schwere Kette der präzipitierten HLA-Moleküle.

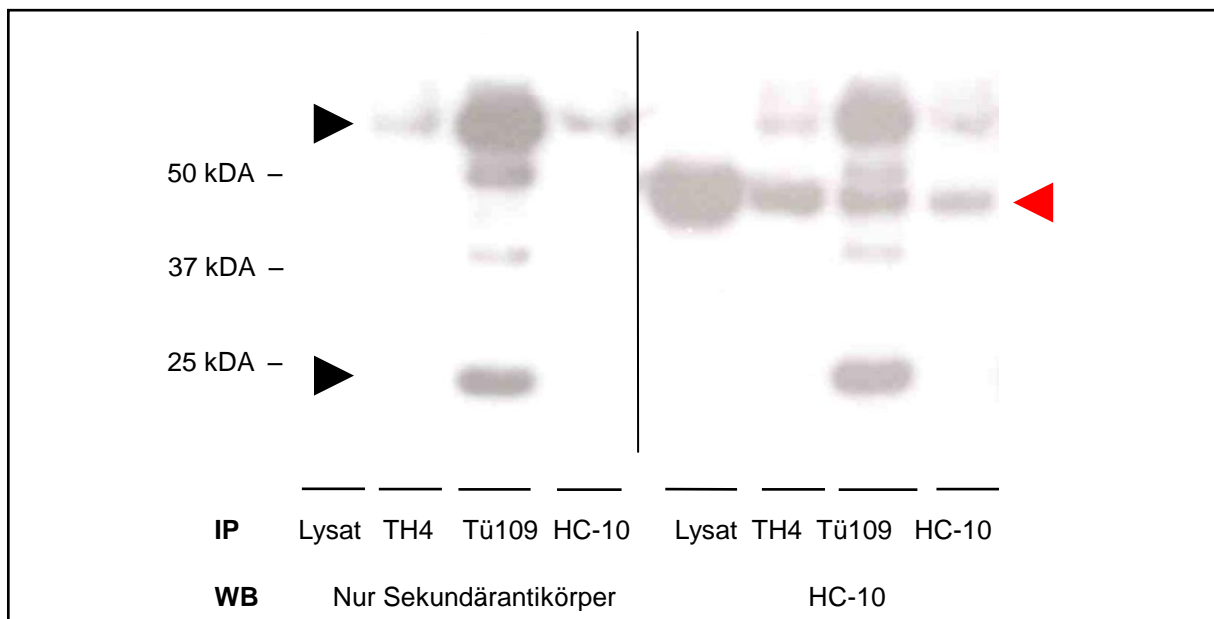


Abb. 6: Vergleichende Immunpräzipitation von HLA-B-Molekülen aus dem Gewebelysat des Thymus S2584 und Detektion mit dem Antikörper HC-10 gegen HLA-B/C schwere Ketten

Nach Immunpräzipitation (IP) mit den Antikörpern TH4, Tü109 und HC-10 wurden die gebundenen Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und ein Western Blot (WB) mit HC-10 durchgeführt. Wurde nur der Sekundärantikörper verwendet, zeigten sich die Antikörper (-fragmente), die technisch bedingt immer im Präzipitat nachzuweisen waren; darunter befanden sich schwere und leichte IgG-Ketten (53 kDa bzw. 22 kDa) (**schwarze Pfeile**). Der Sekundärantikörper band hier nur an die Antikörper der präzipitierten Komplexe. Alle im rechten Teilbild zusätzlich entstandenen Banden wurden durch die spezifische Bindung von HC-10 verursacht. HC-10 erkannte die schwere Kette von HLA-B (44 kDa), die durch Tü109 und TH4 präzipitiert wurde (**roter Pfeil**). Als Positivkontrolle dienten Lysat und das Präzipitat von HC-10.

3.3 Immunhistochemische Analyse der Expression von Peptid:HLA-Klasse-I-Komplexen im Thymus

Monoklonale Antikörper, deren Epitope und Bindungseigenschaften bekannt sind, können nicht nur der Lokalisation eines Antigens in dem immunhistochemisch untersuchten Gewebe dienen, sondern auch auf quantitative oder qualitative strukturelle Besonderheiten des Zielproteins hinweisen. So lässt sich auf eine fehlende oder abweichende Struktur schließen, wenn mit einem Antikörper ein Epitop in einem Kompartiment eines Gewebes erkannt wird, in einer zweiten Region des gleichen Gewebes - bei gesicherter Präsenz des gesamten Zielmoleküls - aber unentdeckt bleibt. In diesem Teil der Arbeit wurden humane Thymi der immunhistochemischen Analyse mit unterschiedlichen monoklonalen Anti-HLA-Klasse-I-Antikörpern gegen verschiedene Epitope unterzogen, um über strukturelle Unterschiede in der Expression von Peptid:HLA-Komplexen derselben HLA-Spezifität im Cortex und in der Medulla Aufschluss zu erhalten. Dazu wurden gegen die gleichen HLA-Spezifitäten verschiedene Antikörper gegen monomorphe und polymorphe Epitope eingesetzt.

Für einen Teil dieser Antikörper war bekannt, dass sie ihr Epitop unabhängig von der Peptidbeladung des HLA-Moleküls erkennen konnten. Für einen anderen Teil der Reagenzien gab es Hinweise, dass ihre Bindung an das jeweilige HLA-Molekül durch Unterschiede in der Peptidbeladung beeinflusst werden konnte. So reagierte der Antikörper Tü161 nur mit einem monomorphen Epitop, das nur bei Peptid:HLA-Komplexen der Spezifität B13 vorkam. Aus diesem Grund wurden die eingesetzten Thymusgewebe HLA-typisiert, um danach für die vorhandenen Antikörper Thymi mit Expression der bindenden HLA-Spezifitäten selektieren zu können. Auch die Bw4-Determinante, die die Zielstruktur von vier der verwendeten Anti-HLA-Klasse-I-Antikörper darstellte, ist nur auf einem Teil der bekannten HLA-B-Moleküle und nur sehr wenigen HLA-A-Molekülen in der deutschen Bevölkerung zu finden. Die Typisierung von beiden HLA-B- und -A-Allelen war für die Selektion der Thymi nach ihrer Expression der Bw4-Determinante wichtig. So konnten HLA-B/Bw4 heterozygote Thymi, welche die Bw4-Determinante nur auf einem der beiden HLA-B-Moleküle trugen, mit HLA-B/Bw4-homozygoten, bei denen beide HLA-B-Moleküle Bw4-positiv waren, verglichen bzw. von HLA-A/Bw4-positiven und HLA-B/Bw4-negativen unterschieden werden.

Tabelle 1 im Kapitel 2.6 informiert darüber, welche bekannten HLA-Spezifitäten Bw4 als supertypische Determinante aufweisen. Genaue Angaben zu verwendeten Thymi sind im Kapitel 3.1 aufgelistet. Unter den analysierten Thymi waren 14 positiv für das Bw4-Epitop,

von denen hier vier repräsentativ gezeigt werden. Diese vier Thymi sind HLA-B13 oder HLA-B27 positiv, sodass auch die Antikörper Tü161 und ME1 mit monomorpher Spezifität für diese Allele zur Detektion der HLA-Komplexe eingesetzt werden konnten.

3.3.1 Immunperoxidase-Einfachmarkierungen

3.3.1.1 *Immunperoxidase-Färbungen mit HLA-Klasse I-spezifischen Antikörpern*

Die hier verwendeten monoklonalen Antikörper lieferten ein Bild über die quantitative Verteilung von HLA-Klasse-I-Komplexen in unterschiedlichen Regionen des Thymus. Zur Detektion von HLA-B-Molekülen wurden die Antikörper TH4, Tü161 und ME1 eingesetzt. TH4 reagiert mit einem gemeinsamen Epitop von HLA-B-Molekülen und konnte daher unabhängig von der Typisierung eingesetzt werden. Für die Analyse der Reaktivität von Tü161 und ME1 wurden HLA-B13- bzw. HLA-B27-positive Thymi verwendet.

TH4: Unter den drei Antikörpern zeigte TH4 in der Regel die stärkste Färbung im Thymusgewebe. Die Medulla band dabei im Vergleich zum Cortex an allen zellulären Strukturen diesen Antikörper mit verstärkter und einheitlicher Intensität. Unter den markierten Zellen konnten Thymozyten, Epithelzellen, Hassall-Körperchen und Gefäße differenziert werden. Im Cortex wurde die Färbeintensität betreffend ein weniger einheitliches Bindungsverhalten des Antikörpers deutlich. Hier wurden sowohl interindividuelle Variationen beim Vergleich verschiedener Thymi, als auch Unterschiede zwischen verschiedenen kortikalen Zelltypen beobachtet. Der Cortex zeigte bei allen untersuchten Thymi eine ungleichmäßige Anfärbung in Waben aus zusammenhängenden, stark positiven zellulären Strukturen, die schwächer oder gar nicht angefärbte Thymozytengruppen umgrenzten. Diese wie in Nestern eingebetteten Zellgruppen waren in unterschiedlichen Thymi verschieden stark angefärbt, sodass das Wabenmuster unterschiedlich deutlich kontrastiert in Erscheinung trat. Neben schwächer oder gar nicht angefärbten Thymozyten wurde eine weitere Thymozytenpopulation beobachtet, die als Teil der stark gefärbten Strukturen im Cortex eine größere Menge an HLA-B-Molekülen zu exprimieren schien.

Tü161 Der HLA-B13-spezifische Antikörper zeigte eine einheitliche starke Färbung im Thymusmark. Im Cortex markierte der Antikörper viele zelluläre Strukturen, die in ihrer Anordnung analog zur Färbung mit dem Antikörper TH4 ein Wabenmuster abzeichneten. Da Tü161 im Gegensatz zu TH4 nur eines der beiden HLA-B-Moleküle im Gewebe HLA-B13-

heterozygoter Thymi markierte, war eine etwas geringere Färbeintensität wie erwartet zu beobachten.

ME1 Dieser Antikörper gilt als spezifisch für ein gemeinsames Epitop auf einigen wenigen HLA-B-Spezifitäten, darunter HLA-B27 (siehe Kapitel 2.7). HLA-B27-positive Thymi zeigten eine Markierungsverteilung, die mit dem Muster von Tü161 vergleichbar war.

W6/32.HL ist ein Pan-HLA-Klasse-I-Marker, der nur mit nativen Peptid:HLA-Komplexen reagiert und die klassischen HLA-A, -B, -C-Moleküle (HLA-Klasse Ia), aber auch HLA-Klasse-Ib-Moleküle bindet. Die Färbung mit diesem Antikörper zeigte, dass - abgesehen von einer Minderheit kortikaler Thymozyten – nahezu alle Zellen im Thymus HLA-Klasse-I-Produkte exprimierten.

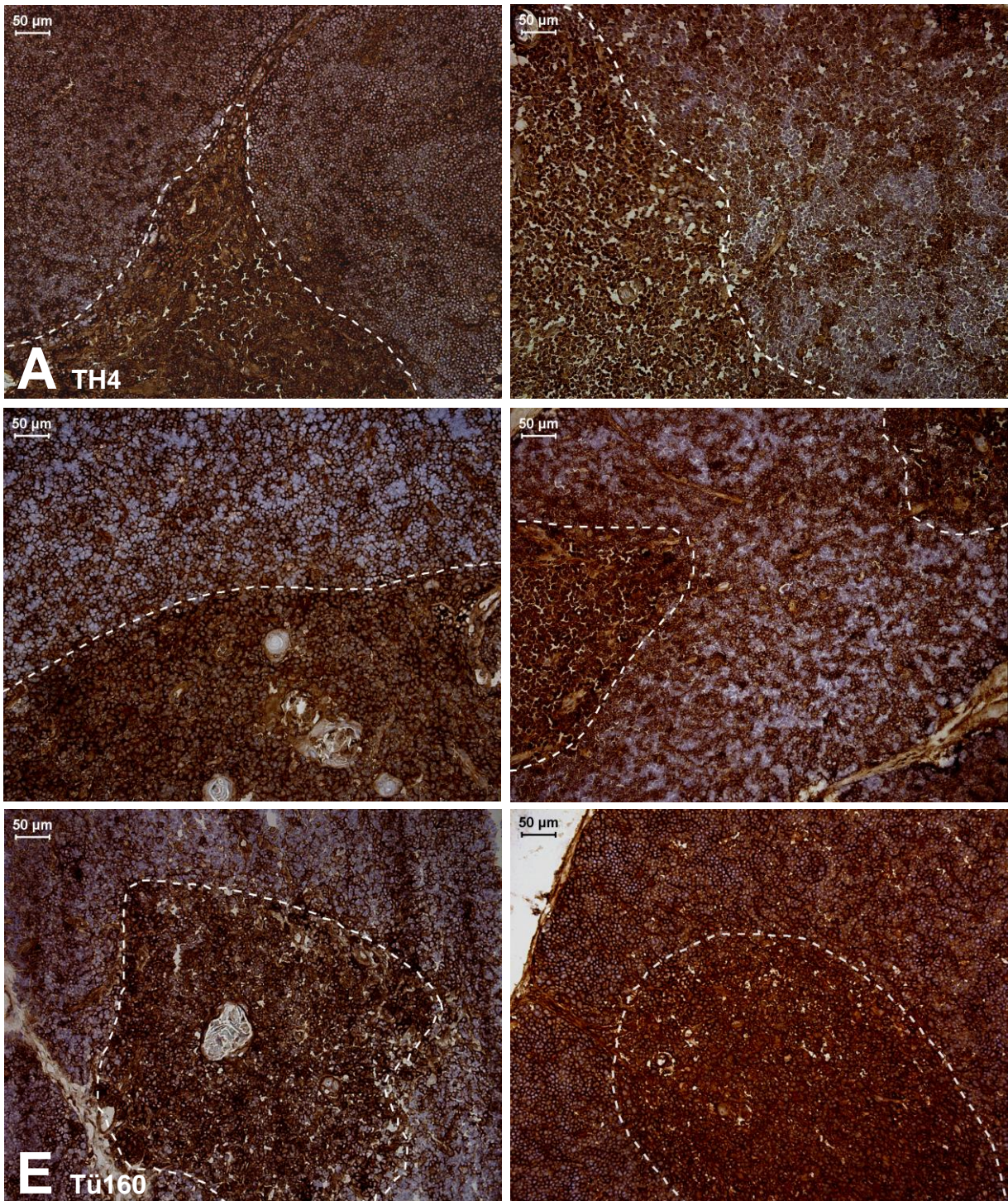


Abb. 7: Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen im Thymus

Eine Expression von HLA-Klasse-I-Molekülen wurde auf Zellen der Medulla (Begrenzung durch gestrichelte Linien) wie auch – obgleich weniger dicht – auf Zellen im Cortex lokalisiert. **(A)** Nahezu einheitliche kortikale Färbung mit dem Anti-HLA-B-Antikörper TH4 am Thymus T361. **(B)** Im Vergleich zu (A) heterogenere Färbung mit TH4 im Cortex des Thymus S2580. **(C)** Wabige Markierung im Cortex: Bindung des Anti-HLA-B27-Antikörpers ME1 am Thymus T387 und **(D)** des Anti-HLA-B13-Antikörpers Tü161 am Thymus T361. **(E)** Beispielhaft die vergleichbare Verteilung von HLA-A-Molekülen, detektiert mit dem Antikörper Tü160 (Anti-HLA-A2, -A28) am Thymus S2594. **(F)** Der Pan-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32.HL zeigt, dass nahezu alle Zellen im Thymus HLA-Klasse-I-Moleküle exprimieren.

3.3.1.2 Immunperoxidase-Markierung von Bw4 an HLA-B13-positiven Thymi

Für diese Untersuchung wurden zwei HLA-B13-positive Thymi ausgewählt. Der Thymus T372 erwies sich als HLA-Bw4-homozygot; beide HLA-B-Moleküle (HLA-B13 und HLA-B44) trugen das Bw4-Epitop. Beim Thymus T375 war nur das HLA-B13-Molekül Bw4-positiv. Das zweite HLA-B-Molekül dieses Thymus trug anstelle von Bw4- das Bw6-Epitop (Bw4-/Bw6-heterozygot).

Tabelle 6: Typisierung der verwendeten Thymi

Thymus	Typisierung	Bw4/Bw6
T372	HLA-A*01, HLA-A*26 HLA-B*13, HLA-B*44	HLA-Bw4-homozygot
T375	HLA-A*02, HLA-A*26 HLA-B*13, HLA-B*15:01	HLA-Bw4/HLA-Bw6-heterozygot

Bei Verwendung der Antikörper TH4 und Tü161 (Anti-HLA-B13) wurde das in Kapitel 3.3.1.1 beschriebene Bild der Verteilung von HLA-B-Komplexen für beide Thymi reproduziert. Die Präsenz von HLA-B-Produkten in Medulla und Cortex ließ eine identische Verteilung auch des Bw4-Epitops erwarten; schließlich handelt es sich um eine Determinante der schweren Kette. Die vorgestellten Bilder zeigen jedoch, dass mit den hier eingesetzten Anti-HLA-Bw4-Antikörpern nur oder zumindest hauptsächlich HLA-B-Komplexe in der Medulla nachgewiesen werden konnten. Die Antikörper banden kaum an HLA-B-Komplexe im Cortex. Die starke Färbung von Zellen in der Medulla mit den Bw4-spezifischen Antikörpern konnte als gewebinterne Positivkontrolle angesehen werden, die die Funktionsfähigkeit der Antikörper belegte und auf eine deutlich geringere bzw. verhinderte Bindung der Antikörper im Cortex schließen ließ. Medulläre Anteile wurden anhand der geringeren Zelldichte sowie dem Vorkommen von Hassall-Körperchen identifiziert.

Thymus T375: Die Färbung dieses HLA-Bw4-heterozygoten Thymus mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern Tü48 und MARB3 ergab eine selektive Reaktion in der Medulla. Eine Markierung durch Tü48 und MARB3 im Cortex konnte im Lichtmikroskop nicht festgestellt werden. Tü109 markierte neben einer ähnlichen Bindung in der Medulla auch einzelne zelluläre Elemente im Cortex. Im Unterschied dazu konnte mit den Antikörpern Tü161 (Anti-HLA-B13) und TH4 (Anti-HLA-B) gezeigt werden, dass auch im Cortex HLA-B-Komplexe eindeutig auf nahezu allen Zellen exprimiert wurden. Der Bw4-spezifische

Antikörper MARB7 band, wie bereits publiziert (Rehm et al., 2000; Seitz, 2003), nicht HLA-B13-Moleküle. Die fehlende Reaktion dieses Antikörpers am HLA-B13/Bw4-positiven Thymus T375 entsprach somit den erwarteten Ergebnissen und bestätigte die bekannte Spezifität dieses Antikörpers. Am Thymus T372 war eine Markierung mit MARB7 dennoch möglich, da der Antikörper hier an das Bw4-Epitop von HLA-B44 binden konnte.

Thymus T372: Die Anti-Bw4-Färbungen zeigten an diesem HLA-Bw4-homozygoten Thymus ein deutlich zwischen Medulla und Cortex kontrastiertes Bild: Die Medulla war deutlich markiert und scharf abgegrenzt vom Cortex, der sich unter Verwendung der Antikörper Tü48, MARB3 und MARB7 kaum anders darstellte als die Negativkontrolle. Tü109 band an einzelne Zellen und Strukturen im Cortex. Bei Bw4-homozygoten Thymi (wie dem hier verwendeten T372) war das Bw4-Epitop in doppelter Menge für die spezifische Antikörperbindung auf beiden HLA-B-Molekülen im Gewebe vorhanden. Im Vergleich zu heterozygoten Thymi konnte daher eine quantitative Vermehrung bzw. Verstärkung der kortikalen Färbung erwartet werden. Solche von Bw4-Homo- oder Heterozygotie abhängigen Unterschiede der Markierungsintensität wurden in den Bw4-spezifischen Färbungen nicht beobachtet. Vielmehr schien die kontrastierende Markierung der Bw4-spezifischen Antikörper an medullären und kortikalen Zellen von der Menge an kortikalen HLA-B-Komplexen mit Bw4-Epitop unabhängig zu sein und auf strukturelle Unterschiede der HLA-B-Komplexe im Cortex im Vergleich zu denjenigen in der Medulla hinzuweisen.

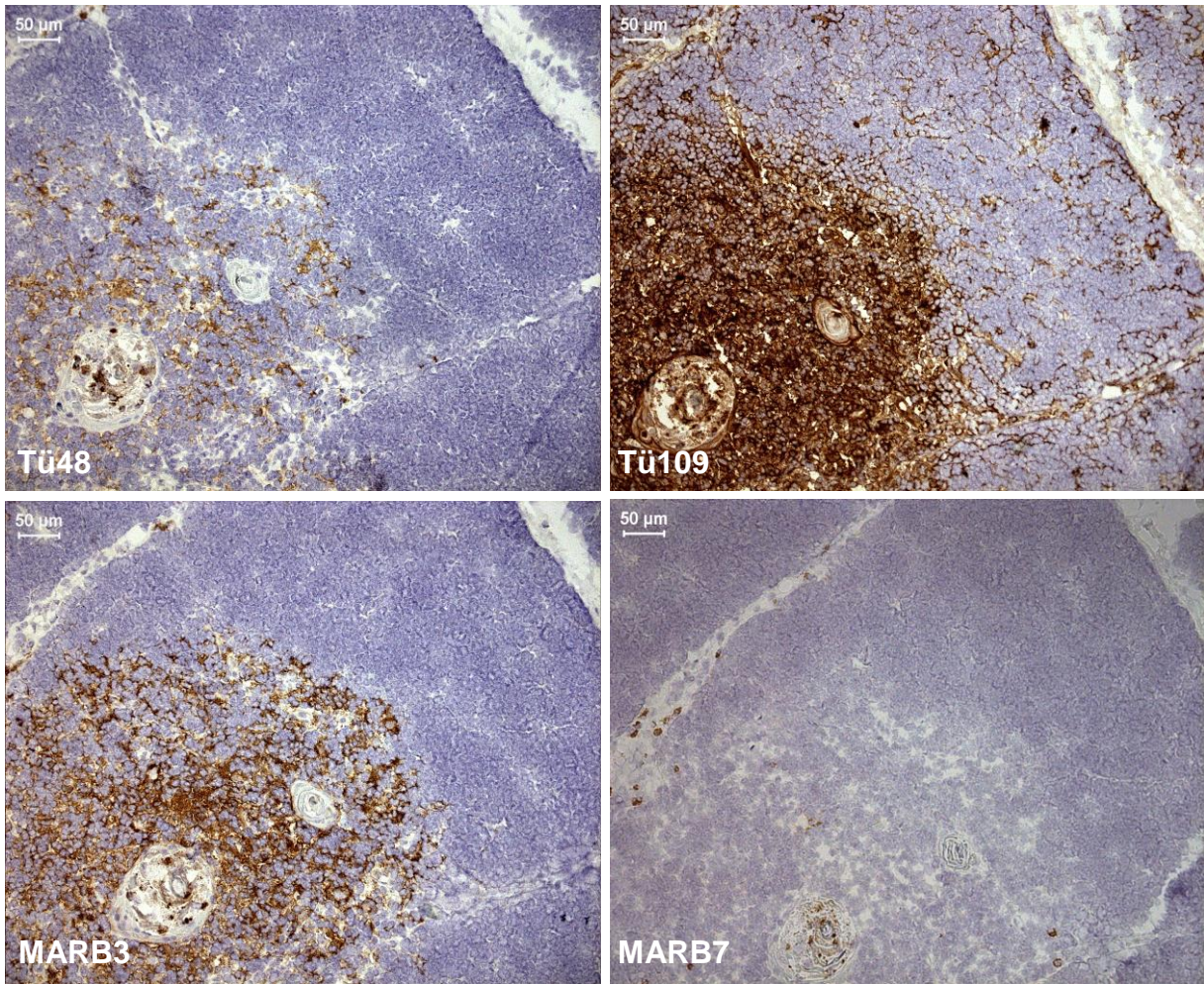
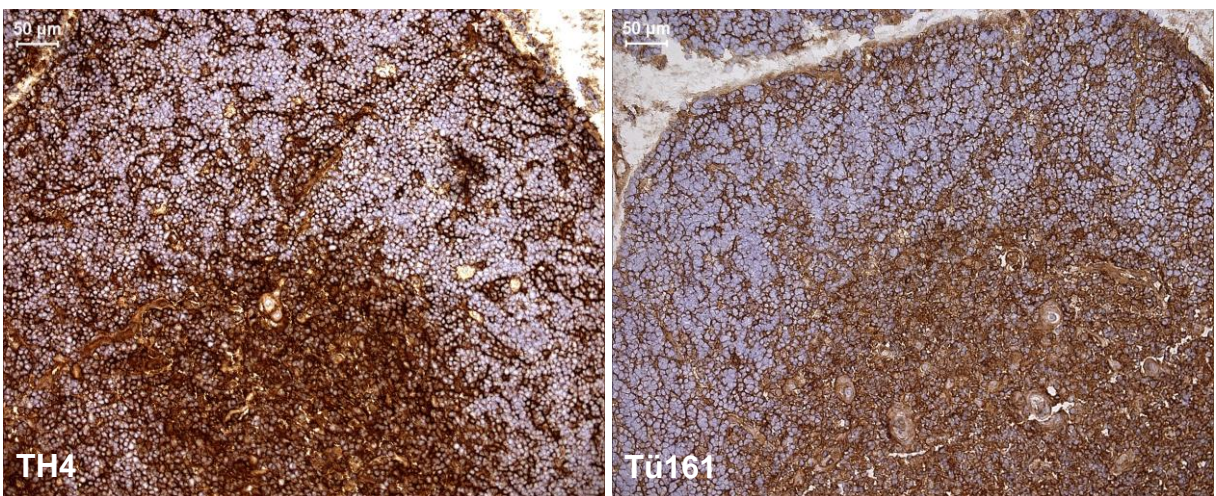


Abb. 8: Immunperoxidasefärbung eines Bw4-heterozygoten Thymus (T375)

Das Bw4-Epitop wurde fast ausschließlich (**Tü48**, **MARB3**) oder zumindest hauptsächlich (**Tü109**) in der Medulla detektiert. Bereits vorbekannt war, dass **MARB7** nicht an HLA-B13-Moleküle bindet (Erläuterungen im Text). Anhand des Bildes können unspezifisch-positive Strukturen im Bereich der Trabekulae, wie die zwischen den Läppchen liegenden Granulozyten, und Hassall-Körperchen in der Medulla demonstriert werden. Sie fanden sich auch in der Negativkontrolle (nicht gezeigt). **TH4** und **Tü161** markierten auch den Cortex deutlich (unten).



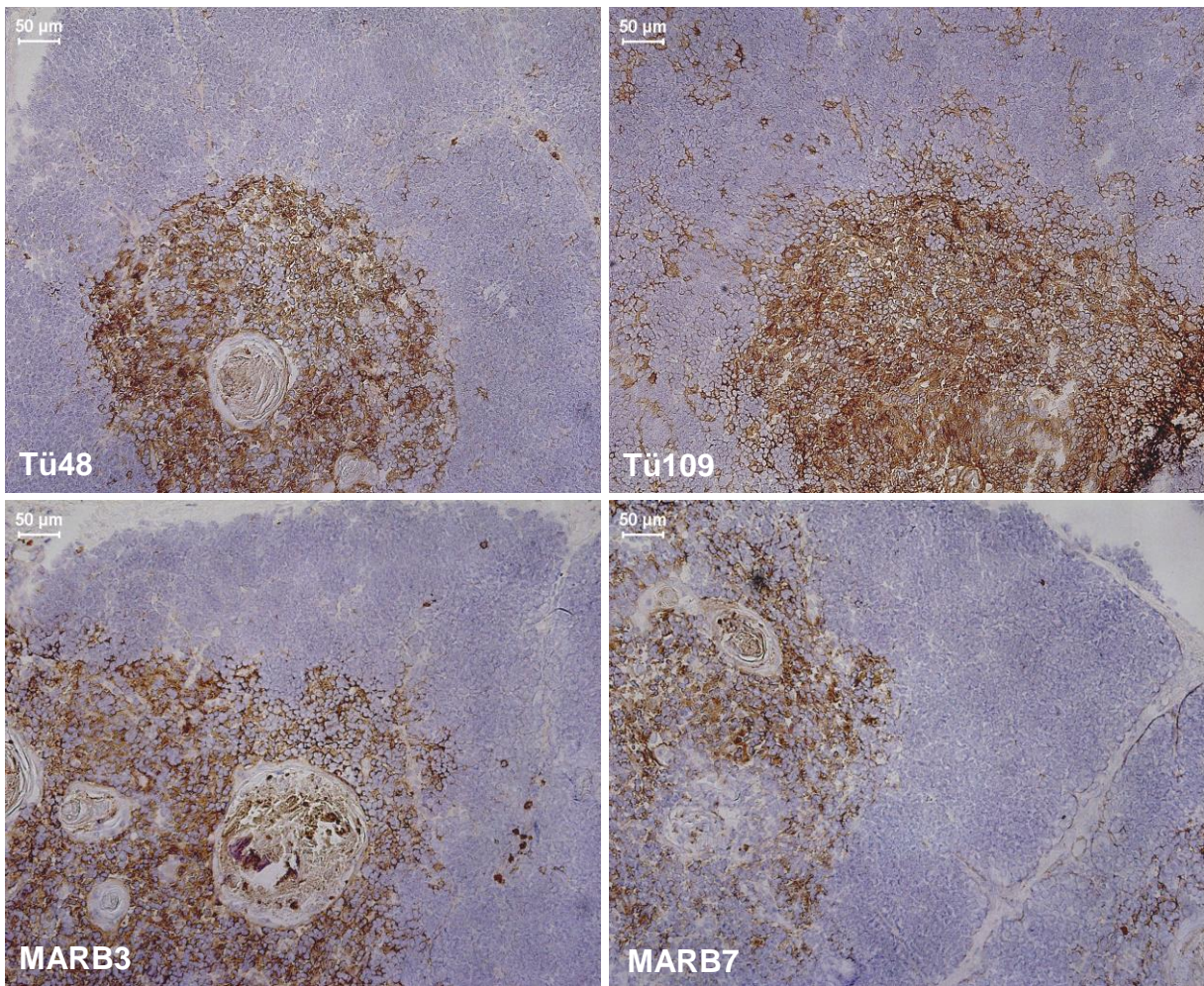
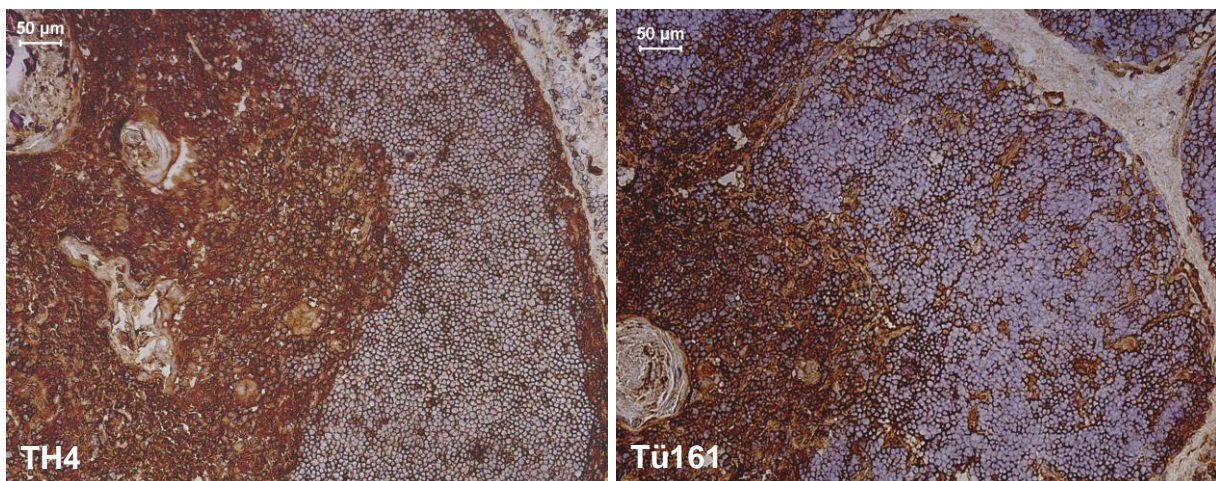


Abb. 9: Immunperoxidasefärbung eines Bw4-homozygoten Thymus (T372)

Die Anti-Bw4-Antikörper **Tü48**, **Tü109**, **MARB3** und **MARB7** (oben) zeigten im Gegensatz zu Anti-HLA-B-Antikörpern **TH4** und **Tü161** (unten) keine oder nur schwache Präsenz im Cortex. Da **MARB7** nicht an HLA-B13-Moleküle bindet, entstand die Markierung im Bild durch Reaktion mit dem Bw4-Epitop des zweiten HLA-B-Moleküls (HLA-B44). Zur besseren Orientierung wurden medulläre Anteile entweder am unteren oder am linken Bildrand positioniert.



3.3.1.3 Immunperoxidase-Markierung von Bw4 an HLA-B27-positiven Thymi

Für diese Untersuchung lagen zwei HLA-B27-positive Thymi vor. Der Thymus T387 trug das Bw4-Epitop nur auf einem der exprimierten HLA-B-Moleküle. Der Thymus T419 war Bw4-homozygot. Beide Thymi stellten Spezialfälle dar, weil sie zusätzlich ein Bw4-positives HLA-A-Allel besaßen. Mit der Bw4-Homozygotie des HLA-B-Gens und dem Bw4-positiven HLA-A-Allel besaß der Thymus T419 das Bw4-Epitop in dreifacher Ausführung. Mit den Antikörpern Tü109 und MARB7 wurden nur HLA-B-, nicht HLA-A-assozierte Bw4-Epitope erfasst. Daher ließ sich mit diesen Reagenzien dennoch eine isolierte Betrachtung der Bw4-Epitope auf HLA-B-Molekülen durchführen. Sie eigneten sich auch zum Vergleich der Bw4-Präsenz mit den Färbungen der HLA-B13-positiven Thymi, die kein Bw4-positives HLA-A-Allel aufwiesen. Die Antikörper Tü48 und MARB3 banden dagegen auch an die Bw4-positiven HLA-A-Moleküle des Gewebes.

Tabelle 7: Typisierung der verwendeten Thymi

Thymus	Typisierung	Bw4/Bw6
T387	HLA-A*01, HLA-A*24 HLA-B*08, HLA-B*27	HLA-Bw4/HLA-Bw6-heterozygot HLA-A*24 ist zusätzlich Bw4-positiv
T419	HLA-A*03, HLA-A*24 HLA-B*27, HLA-B*44	HLA-Bw4-homozygot HLA-A*24 ist zusätzlich Bw4-positiv

Thymus T387: Die Färbungen des Thymus T387 mit den verschiedenen Anti-Bw4-Antikörpern ergaben ein gleichartiges Bild wie die bereits gezeigten Aufnahmen der HLA-B13-positiven Thymi. Bw4-positive HLA-A-Moleküle schienen bei Verwendung der Antikörper Tü48 und MARB3 nicht zu einer verstärkten Markierung oder zu einer Abweichung der HLA-B-spezifischen Färbungsverteilung beizutragen. Bei allen Anti-Bw4-Markierungen zeigte sich in der Medulla eine sehr viel stärkere Färbung als im Cortex. Schwach-gefärbte kortikale Strukturen zeigten sich zwischen den der Medulla nahegelegenen Thymozyten. Einzelne positive, tubuläre Strukturen ließen sich insbesondere bei der Färbung mit dem Antikörper MARB7 erkennen. Nach ihrer Morphologie und dem radiären Verlauf durch die Thymusrinde handelt es sich dabei am ehesten um Gefäßformationen. Die Strukturen wurden im Kapitel 3.3.2.3 genauer betrachtet. Im Vergleich zu den Färbungen mit TH4 und ME1 (Anti-HLA-B27) war das Signal im Cortex auch hier stark dezimiert.

Thymus T419: Im Fall des Thymus T419 ergaben sich je nach verwendetem Anti-Bw4-Antikörper Unterschiede in der kortikalen Färbung. Insbesondere Tü48 zeigte hier eine sehr deutliche Markierung. Diese Färbung kam dem retikulären Felderungsmuster nahe, das bei der TH4- bzw. ME1-Färbung im Cortex beobachtet wurde. Auch MARB3 zeigte ein intensives Färbungsmuster im Cortex. Die Färbungen mit MARB7 und Tü109 wiesen hingegen eine deutlich erkennbare Mark-Rinden-Grenze auf. Einige kortikale Strukturen zeigten sich zwar angefärbt, waren aber insgesamt deutlich weniger strukturiert und schwächer kontrastiert. Eine Erklärungsmöglichkeit lag darin, dass Tü48 und MARB3 mit dem Bw4-positiven HLA-A24-Molekül eine zusätzliche Bindungsmöglichkeit im Gewebe dieses Thymus besaß. Die Möglichkeit, dass Bw4-positive HLA-A-Moleküle im Cortex vermehrt exprimiert und detektiert werden konnten, wurde in Kapitel 3.3.1.5 untersucht. Da Tü109 und MARB7 nur an HLA-B-Moleküle banden, konnte durch diese Antikörper, unabhängig von HLA-A-assoziierten Bw4-Epitopen, gezeigt werden, dass auch Bw4-homozygote, HLA-B27-positive Thymi ins Bild des bisher beschriebenen primär medullären Verteilungsmusters der Bw4-Epitope passten.

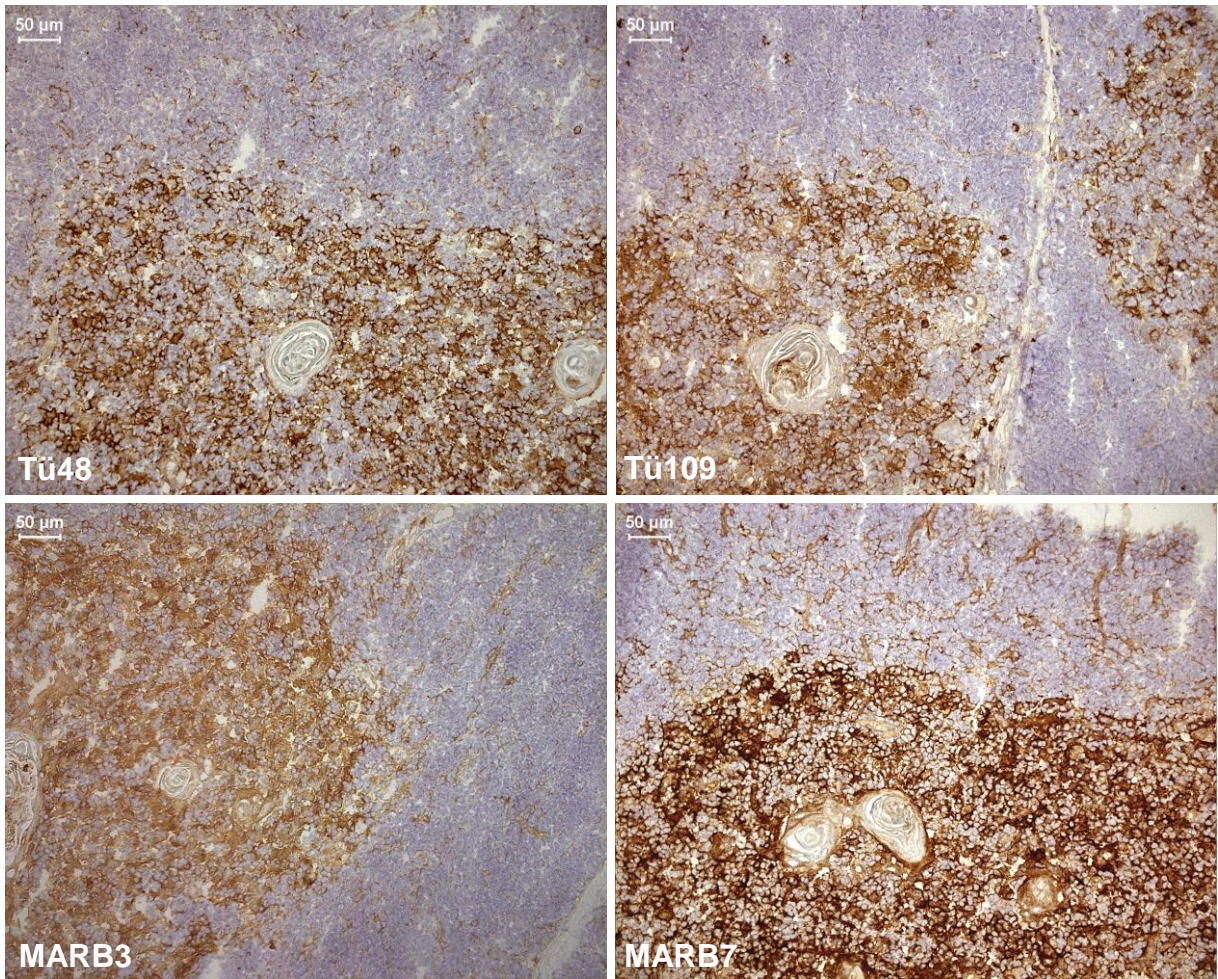
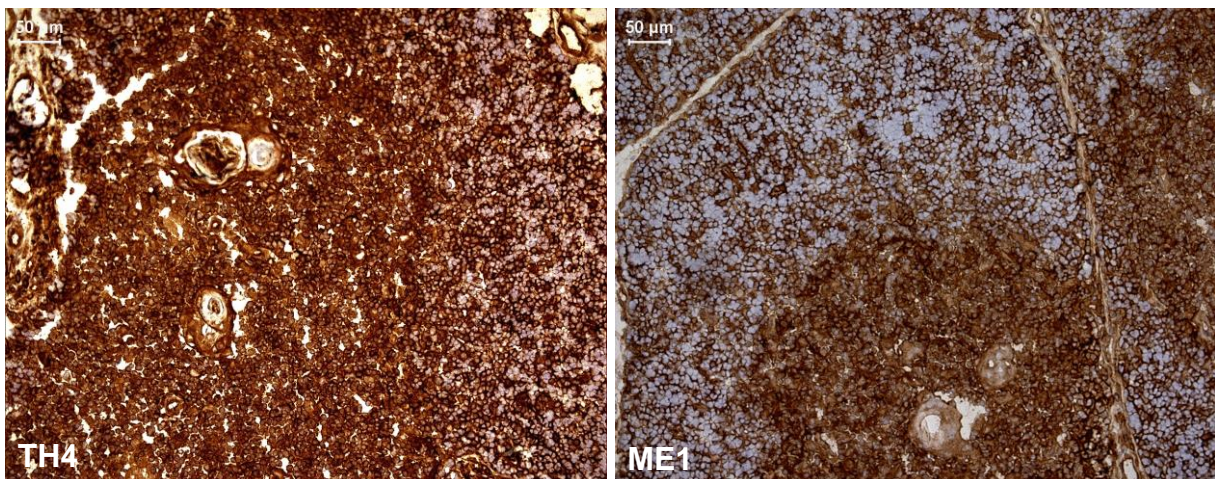


Abb. 10: Immunperoxidasefärbung eines Bw4-heterozygoten Thymus (T387)

Unabhängig vom zusätzlich vorhandenen Bw4-positiven HLA-A-Molekül, zeigt sich das bekannte Muster einer überwiegend medullären Färbung mit allen Anti-Bw4-Antikörpern **Tü48**, **Tü109**, **MARB3** und **MARB7** (oben). Neben **TH4** wurde zur Markierung von HLA-B27-Molekülen der Antikörper **ME1** eingesetzt (unten). Sie zeigen, dass HLA-B-Moleküle grundsätzlich im Cortex vorhanden waren.



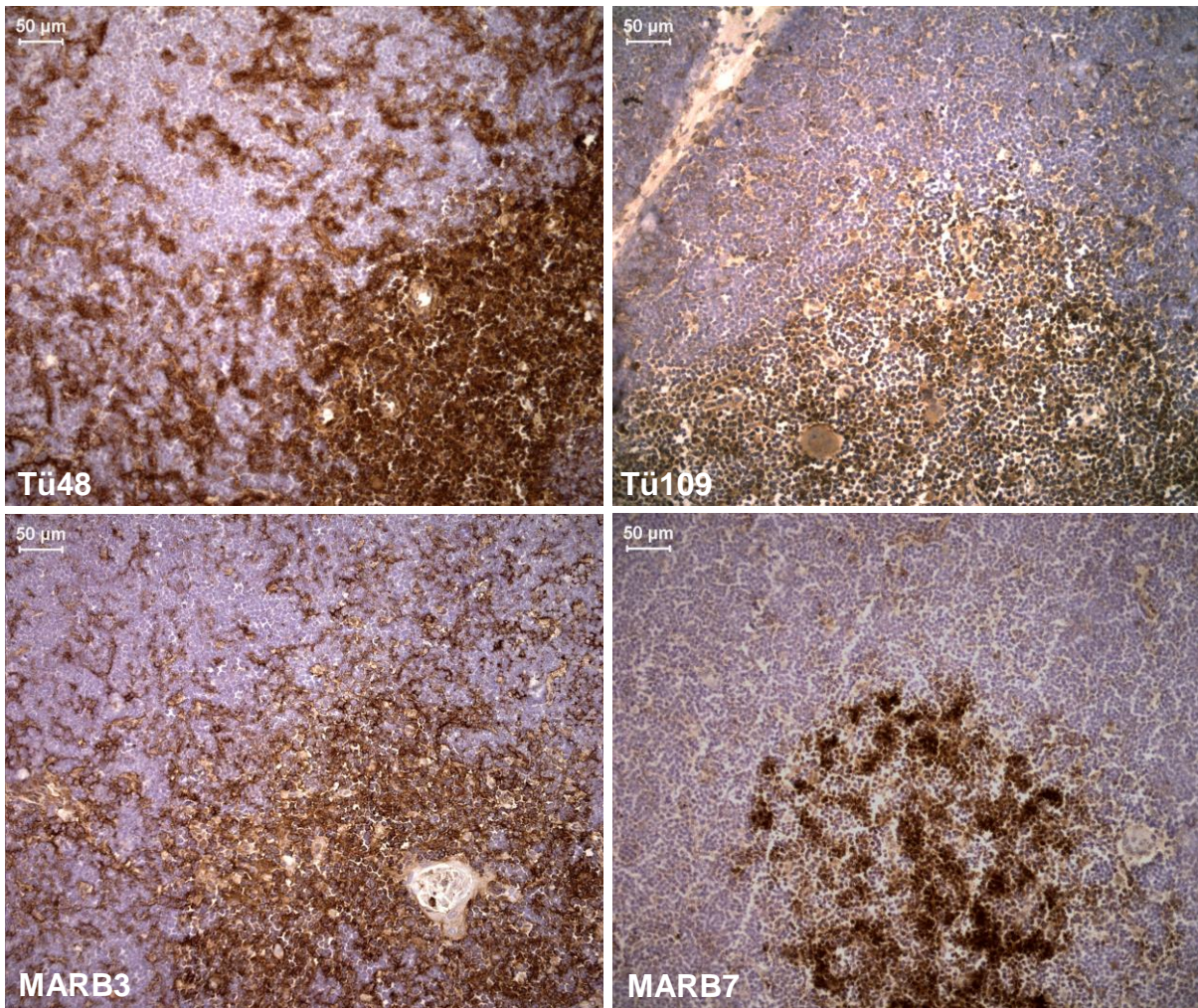
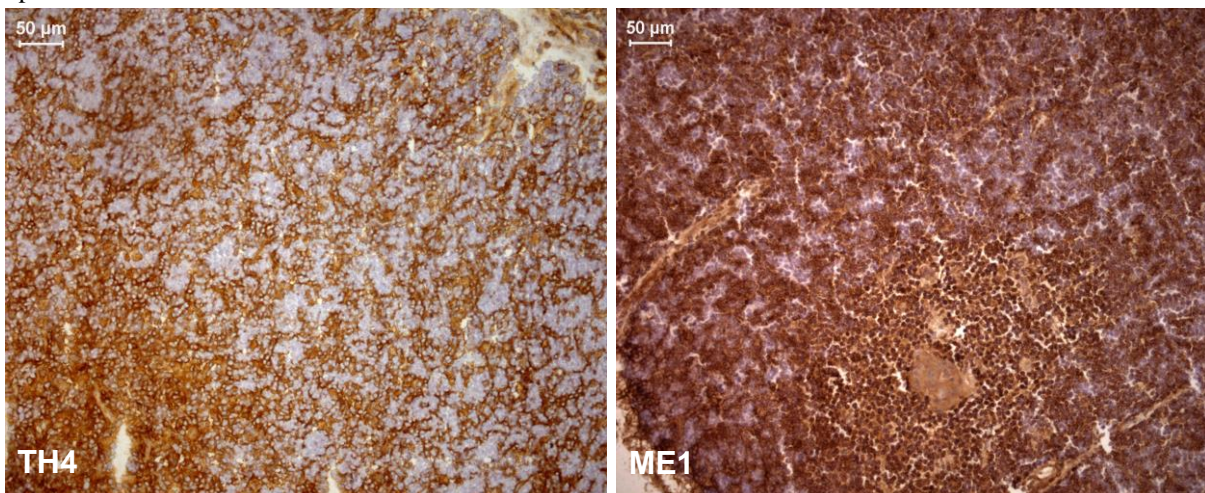


Abb. 11: Immunperoxidasefärbung eines Bw4-homozygoten Thymus (T419)

Bei der Färbung mit **Tü48** und **MARB3** zeigte sich eine kortikale Zeichnung, die deutlicher als bei anderen Bw4-Markierungen in Erscheinung trat. Insbesondere Tü48 markierte kräftig. **Tü109** und **MARB7** passten hingegen ins regelmäßig beobachtete Bild einer hauptsächlich medullären Färbung mit Anti-Bw4-Antikörpern. Markierungen unter Verwendung von **TH4** und **ME1** (unten) sind in Medulla und auch im Cortex stark vertreten. Dieses Gewebe stellt mit drei Bindungsstellen für HLA-Bw4 bei Bw4-positiven HLA-A-Allelen einen Spezialfall dar.



3.3.1.4 Immunperoxidase-Markierung der HLA-Bw6-Determinante

Als allotypisches Gegenstück zur Bw4-Determinante ist Bw6 auf allen Bw4-negativen HLA-Molekülen exprimiert und befindet sich dort gleichermaßen am distalen Ende der α 1-Helix. Die immunhistochemische Markierung der Bw6-Determinante wurde unter Verwendung des Antikörpers SFR8B6 durchgeführt und sollte klären, ob ein ähnlich medullär betontes Verteilungsmuster wie bei den Bw4-Markierungen im Thymus zu finden war.

Insgesamt wurden sechs Bw6-positive Thymi getestet. Die deutliche medulläre Betonung der Bw4-Markierung zeigte sich nicht, stattdessen durchzog das kortikale Kompartiment eine netzartige, dichte Markierung des Antikörpers SFR8B6. Auffällig blieb allerdings, dass die Bindung dieses Antikörpers an kortikale Zellen im Unterschied zu den medullären Zellen deutliche Variationen aufwies, die von „sehr stark“ bis „negativ“ reichen konnten.

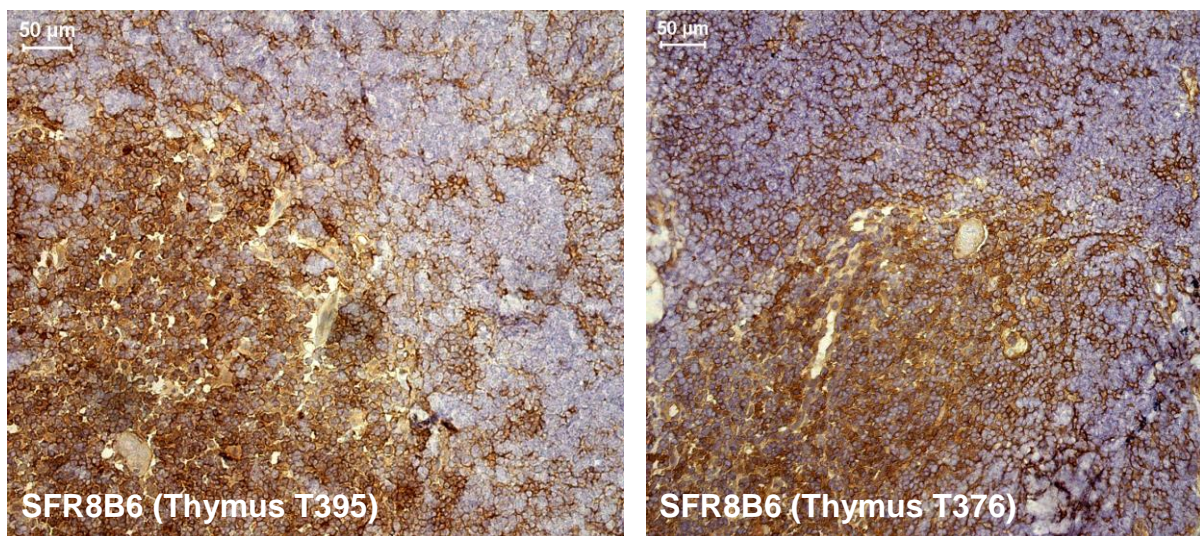


Abb. 12: Die Markierung der Bw6-Determinante mit SFR8B6 führt in Medulla und Cortex zur deutlichen Anfärbung

Gezeigt sind die Bw6-positiven Thymi T395 (**links**) und T376 (**rechts**). Eine hauptsächlich auf das medulläre Kompartiment beschränkte Färbung, wie sie im Regelfall unter Verwendung der Bw4-spezifischen Antikörper entstand, wurde mit der Bw6-Markierung durch SFR8B6 nicht gesehen.

3.3.1.5 Markierung von Bw4-positiven HLA-A-Molekülen

Am Bw4-homozygoten, HLA-B27-positiven Thymus T419 zeigte sich bei Markierung mit den Antikörpern Tü48 und MARB3 eine unerwartet deutliche Anfärbung des Cortex, die zuvor bei keiner Bw4-spezifischen Markierung beobachtet worden war. Dieses Gewebe wies, zusätzlich zur Bw4-Homozygotie der HLA-B-Allele, eine Expression Bw4-positiver HLA-A-Moleküle auf, die von Tü48 und MARB3 ebenfalls gebunden werden konnten. Um den Effekt dieser Bw4-positiven HLA-A-Moleküle auf die Markierung im Cortex selektiv zu studieren, wurde der Thymus S2598 herangezogen. Dieser exprimierte die Bw4-Determinante lediglich auf HLA-A32-Molekülen; alle weiteren HLA-Klasse-I-Moleküle waren Bw4-negativ. Die immunhistochemische Analyse dieses Gewebes erlaubte somit die spezifische Untersuchung der Verteilung von HLA-A-ständigen Bw4-Epitopen.

Die Ergebnisse bestätigten die fehlende Reaktivität der Antikörper Tü109 und MARB7 gegenüber HLA-A-assoziierten Bw4-Epitopen. Tü48 und MARB3 banden an die Bw4-Determinante von HLA-A-Molekülen und führten auch zu einer Anfärbung im Cortex. Im Vergleich zum Thymus T419 fiel die kortikale Färbung jedoch weniger kräftig aus. Dieser Unterschied ließe sich eventuell dadurch erklären, dass die beiden Thymi in den Bw4-tragenden HLA-A-Spezifitäten differierten (HLA-A24 bzw. HLA-A32). Möglicherweise zeigten HLA-A32- und -A24-Moleküle geringe Konformationsunterschiede der Bw4-Epitope, die zu schwächerer bzw. stärkerer Bindung der Antikörper Tü48 und MARB3 führte und in entsprechenden Variationen der Markierungsintensität erkennbar wurde. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit für diesen Unterschied konnte darin bestehen, dass beim Thymus T419 auch HLA-B-assoziierte Bw4-Determinanten zu einer additiven Signalverstärkung im Cortex beitragen (dreifach exprimierte Bw4-Determinante auf beiden HLA-B-Molekülen, sowie dem Bw4-positiven HLA-A-Molekül).

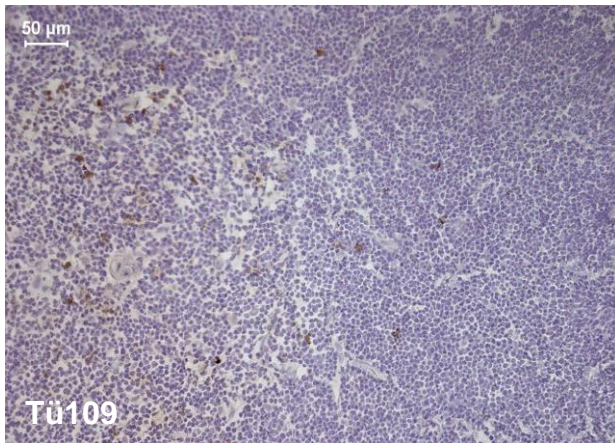
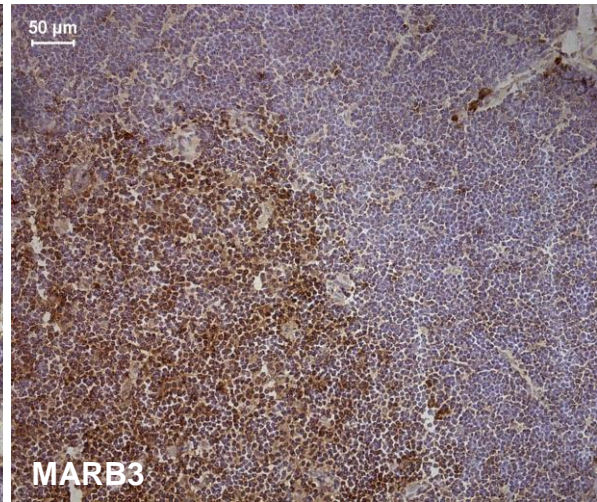
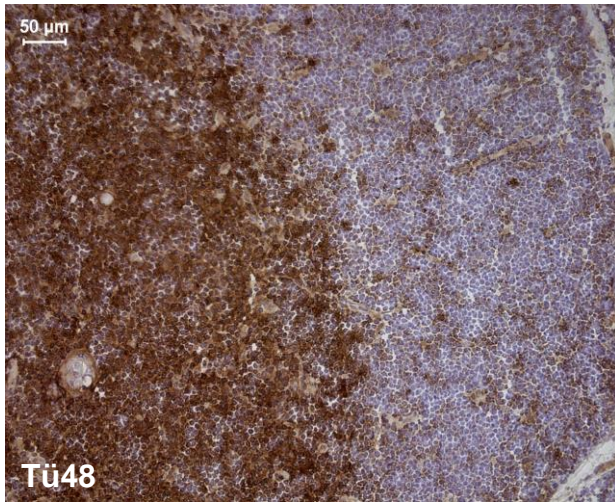


Abb. 13: Verteilung der Bw4-Determinante auf HLA-A-Molekülen am Thymus S2598

Tü48 und MARB3, nicht jedoch Tü109 und MARB7 (nicht gezeigt), erkannten Bw4 auf HLA-A32-Molekülen. Stärkere Präsenz der Tü48/MARB3 positiven HLA-A-assoziierten Bw4-Determinante in der Medulla bei retikulärer Reaktion vor allem des Antikörpers Tü48 auch im Cortex.

3.3.2 Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen

Die immunhistochemische Doppelmarkierung mit Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Analyse von zellulärer Koexpression und Kolo-kalisation von Antigenen im Gewebe und bietet eine Vergleichsmöglichkeit der Färbung an unterschiedlichen Zellen in gleicher Schnittebene und -region. Im Gegensatz zur Immunperoxidase-markierung konnte die Gegenfärbung des Gewebes zur Zelldifferenzierung (Hämalaun in der Immunperoxidasefärbung, DNA-Marker DAPI zur Kernmarkierung in der Fluoreszenz) in der Immunfluoreszenzmikroskopie ausgeblendet werden, sodass auch schwache spezifische Signale nicht von Gewebestrukturen überlagert wurden. Da auch zwischen einzelnen Thymusläppchen Unterschiede im Hinblick auf die HLA-Klasse-I-Verteilung vorhanden sein konnten, wurde mit der Doppelmarkierung einer Region im Schnitt eine bessere Vergleichbarkeit der Lokalisierung von Antikörperbindungen erreicht. Kompartiment-spezifische Marker wie OKT6 oder TE-4 ermöglichten eine Abgrenzung von Thymusrinde und -mark, zusätzlich zu den morphologischen Kriterien.

3.3.2.1 Doppelmarkierung von Thymusproben mit OKT6 und Anti-Bw4-Antikörpern

Der Antikörper OKT6 ist gegen CD1 gerichtet. Dabei handelt es sich um ein MHC-Klasse-Ib-Molekül, welches unter anderem auf unreifen, größtenteils kortikal lokalisierten Thymozyten zu finden ist und eines der ersten Lymphozytenantigene darstellt, die mit monoklonalen Antikörpern identifiziert werden konnten (Reinherz et al., 1980; Strominger, 2010).

In der Anti-Bw4-/Anti-CD1-Doppelfärbung von Thymusgewebe konnte demonstriert werden, dass die Expression des Bw4-Epitops vor allem medullär lokalisiert war. So wurde ein inverses Färbungsmuster für den Anti-CD1- und die Anti-Bw4-Antikörper beobachtet (siehe Abbildung 14). Die Markierung des mit dem Fluorochrom Cy3 (rot) markierten Anti-CD1-Antikörpers zeigte sich vor allem kortikal, die Markierung des mit Alexa488 (grün) gekoppelten Anti-Bw4-Antikörpers war hauptsächlich medullär sichtbar. Durch die CD1-/Bw4-Doppelmarkierung konnten die medullären Anteile des Thymus im Gewebeschnitt zusätzlich zur Beurteilung morphologischer Kennzeichen (Hassall-Körperchen, niedrigere Zelldichte) eindeutig abgegrenzt werden und die bevorzugt medulläre Verteilung der Bw4-spezifischen Markierung bestätigt werden. Eine Koexpression von Bw4 auf CD1-positiven Zellen wurde nicht beobachtet. Auch auf den wenigen CD1-positiven Thymozyten, die im Schnitt in morphologisch medullären Anteilen des Thymus vorkamen, war HLA-Bw4 nicht koexprimiert zu finden.

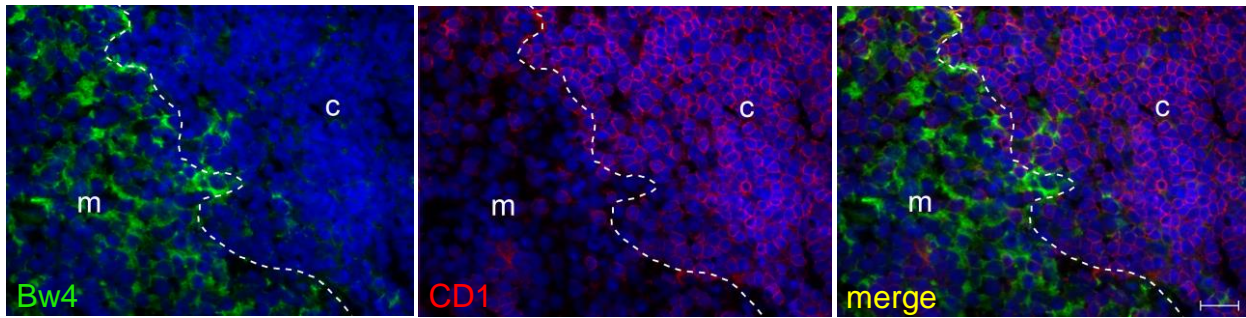


Abb. 14: Doppelmarkierung von Gefrierschnitten von Thymusgewebe mit OKT6 (Anti-CD1, Cy3-konjugiert, rot) und Bw4-spezifischen Antikörpern (Tü48, Alexa488-konjugiert, grün)

CD1 wird überwiegend auf kortikalen Thymozyten nachgewiesen, nur einzelne medulläre Thymozyten sind ebenfalls CD1-positiv. Umgekehrt ist die Bw4-Markierung (Tü48) vor allem auf medullären Zellen zu sehen. Das inverse Färbungsmuster konnte als zusätzliches Kriterium dafür eingesetzt werden, um medulläre von kortikalen Bereichen abzugrenzen und die bevorzugt medulläre Bindung Bw4-spezifischer Antikörper an HLA-Klasse-I-Komplexe zu bestätigen. Färbung am Thymus T378. Die Kernfärbung der Zellen erfolgte mit DAPI (blau). Vergrößerung 400x, Maßstab 20 µm.

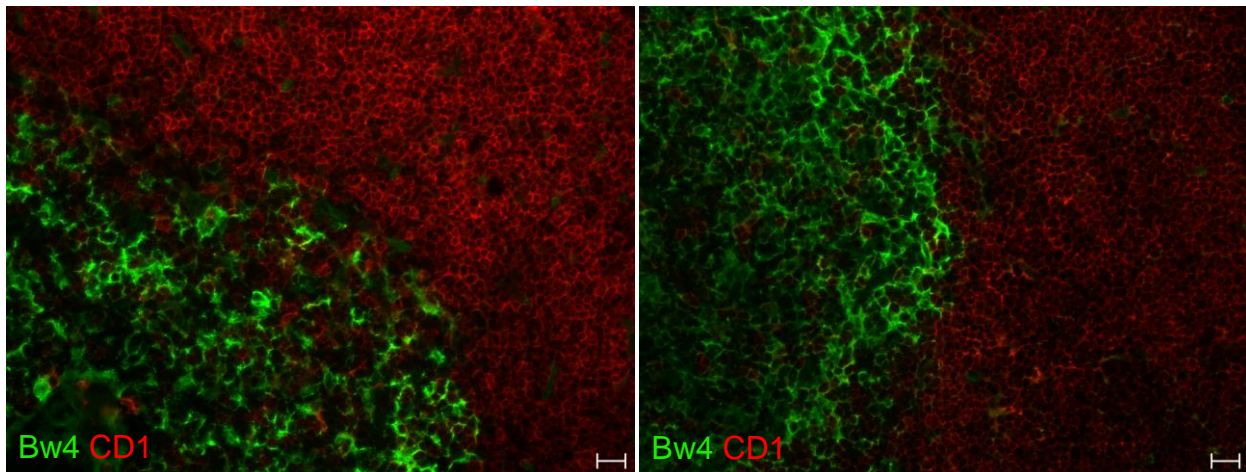


Abb. 15: Doppelmarkierung von Gefrierschnitten der Thymi T387 (links) und T372 (rechts) mit OKT6 (Anti-CD1, Cy3-konjugiert, rot) und Bw4-spezifischen Antikörpern (MARB7 bzw. Tü48, Alexa488-konjugiert, grün)

Gezeigt ist die Doppelmarkierung am Thymus T387 mit MARB7 (Anti-Bw4) und OKT6 (links) und die Markierung mit Tü48 (Anti-Bw4) und OKT6 am Thymus T372 (rechts). Da CD1-Moleküle hauptsächlich auf kortikalen Thymozyten exprimiert werden, entsteht ein kaum überlappendes Färbungsmuster. Vergrößerung 200x, Maßstab 20 µm.

3.3.2.2 Doppelmarkierung von Bw4 und HLA-B-Molekülen

Mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung wurde die Verteilung des Bw4-Epitops in Relation zu nachweisbaren HLA-B-Molekülen in identischen Lappchenregionen und Schnittebenen verglichen. Zuerst wurde eine indirekte Markierung des Gewebes mit einem monoklonalen Reagenz der IgG-Klasse durchgeführt. Anschließend wurden Bw4-Epitope mit Tü48 (IgM), MARB3 (IgM) und MARB7 (IgM) markiert und über die Reaktion der gebunden Primärantikörper mit µ-Ketten-spezifischen Sekundärantikörperfragmenten

detektiert. Die Klassen-spezifische Detektion der beiden eingesetzten Primärantikörper stellte sicher, dass überlappende Signale nicht durch Kreuzreaktionen der jeweiligen Sekundärreagenzien entstanden. Falsch-positive Signale wurden in jedem Experiment durch entsprechende negative Kontrollen, in denen die jeweiligen spezifischen monoklonalen Reagenzien weggelassen wurden, kontrolliert. Repräsentativ wurden Bilder derjenigen Thymi ausgewählt, die bereits unter den Immunperoxidase-Bildern im Kapitel 3.3.1.2 bzw. 3.3.1.3 gezeigt wurden.

Tabelle 8: HLA-Genotypen der verwendeten Thymusgewebsproben

Thymus	Typisierung	Bw4/Bw6
T372	HLA-A*01, HLA-A*26 HLA-B*13, HLA-B*44	HLA-Bw4-homozygot
T375	HLA-A*02, HLA-A*26 HLA-B*13, HLA-B*1501	HLA-Bw4/HLA-Bw6-heterozygot
T387	HLA-A*01, HLA-A*24 HLA-B*08, HLA-B*27	HLA-Bw4/HLA-Bw6-heterozygot HLA-A*24 ist zusätzlich Bw4-positiv
T419	HLA-A*03, HLA-A*24 HLA-B*27, HLA-B*44	HLA-Bw4-homozygot HLA-A*24 ist zusätzlich Bw4-positiv

Medullär ergaben die Anti-Bw4-Antikörper ein Fluoreszenzsignal, das mit der Reaktion der HLA-B-spezifischen Antikörper komplett überlappte. Die Deckungsgleichheit war erwartet worden, da das Bw4-Epitop auf den HLA-B-Molekülen der untersuchten Thymi entsprechend der Vortypisierung vorhanden war. Obwohl dies prinzipiell auch für den Cortex galt, wurden hier kaum Bw4-Epitope detektiert. Die Signalstärke war kortikal so drastisch reduziert, dass sie sich kaum von unspezifischer Autofluoreszenz des Gewebes bzw. der Hintergrundfärbung der Negativkontrolle unterschied. Die Antikörper Tü161, ME1 und TH4, mit denen alle bzw. Allel-spezifisch HLA-B-Moleküle detektiert wurden, führten hingegen auch im Cortex zur Anfärbung. Obwohl also kortikale HLA-B-Komplexe im Gewebe nachgewiesen werden konnten, wurden sie von den Anti-Bw4-Antikörpern überwiegend nicht erkannt. Verstreut im Cortex wurden nur einzelne Bw4-positive Zellen oder Strukturelemente beobachtet. Dies wurde im Kapitel 3.3.2.3 genauer untersucht. Zu diesen gehörten Gefäßstrukturen und sehr wenige cTECs der kortikomedullären Grenzregion.

Für die Detektion des Bw4-Epitops bildete der Thymus T419 mit der Expression dreier Bw4-positiver HLA-Allele eine Ausnahme. Zusätzlich zur Bw4-Homozygotie der HLA-B-Allele trugen Zellen dieses Thymus ein Bw4-positives HLA-A-Allel. Analog zur Immunperoxidase-Markierung (Kapitel 3.3.1.3) zeigte sich an diesem Gewebe eine verstärkte kortikale

Fluoreszenz, wenn die Antikörper Tü48 und MARB3 verwendet wurden, die das Bw4-Epitop nicht nur auf HLA-B-, sondern auch auf HLA-A-Molekülen erkannten. Die Markierung mit MARB7 führte hingegen zur vielfach beobachteten, medullär betonten Färbung mit deutlich erkennbarer Rinden-Mark-Grenze und fehlender bzw. stark abgeschwächter Bindung im Cortex.

Die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigten das mit der Immunperoxidase-Markierung erhobene Bild. Im Cortex existieren HLA-B-Komplexe, die strukturell so alteriert sein müssen, dass eine Bindung der Antikörper an das Bw4-Epitop quantitativ reduziert ist oder ganz unterbleibt.

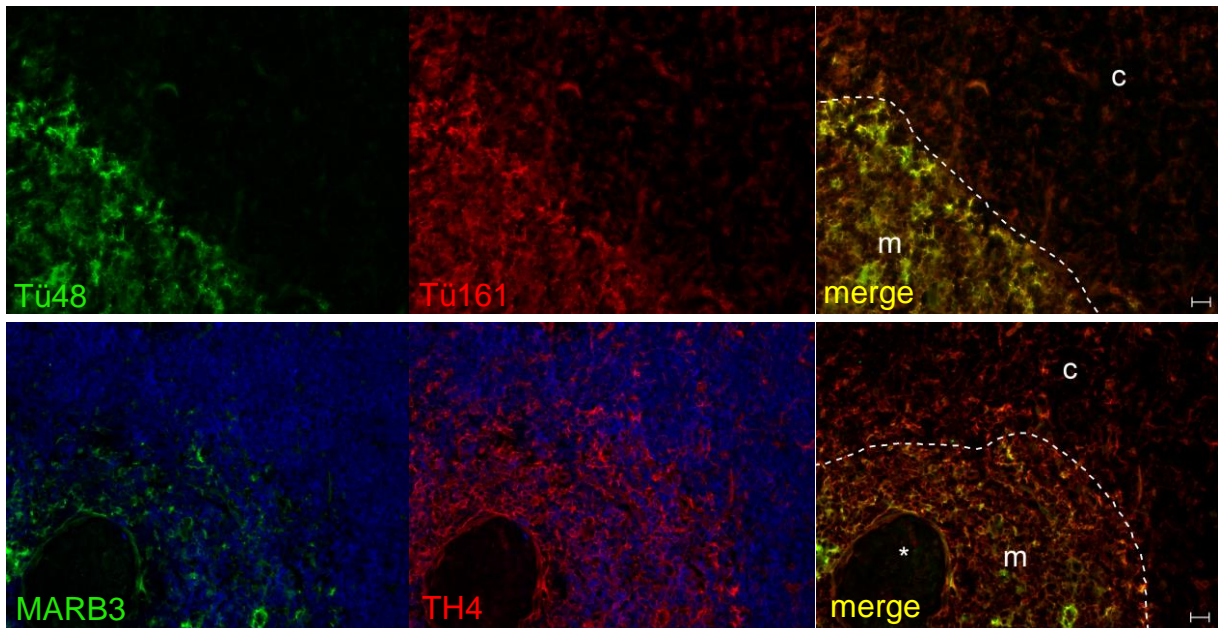


Abb. 16: Doppelmarkierung von HLA-Komplexen am Thymus T375 in der Immunfluoreszenz

Während Tü161 und TH4 die Präsenz von HLA-B-Komplexen im Cortex demonstrieren (rot), binden die Anti-Bw4-Antikörper Tü48 und MARB3 fast nur in der Medulla (grün). MARB3- und TH4-Markierung sind mit DAPI-Zellkern-Färbung abgebildet. Die Überlagerung der Bilder zeigt eine deckungsgleiche Färbung in der Medulla. Im Cortex verliert sich das Signal der grünen Bw4-spezifischen Färbung weitgehend. c Cortex, m Medulla, * Hassall-Körperchen, Maßstab 20µm.

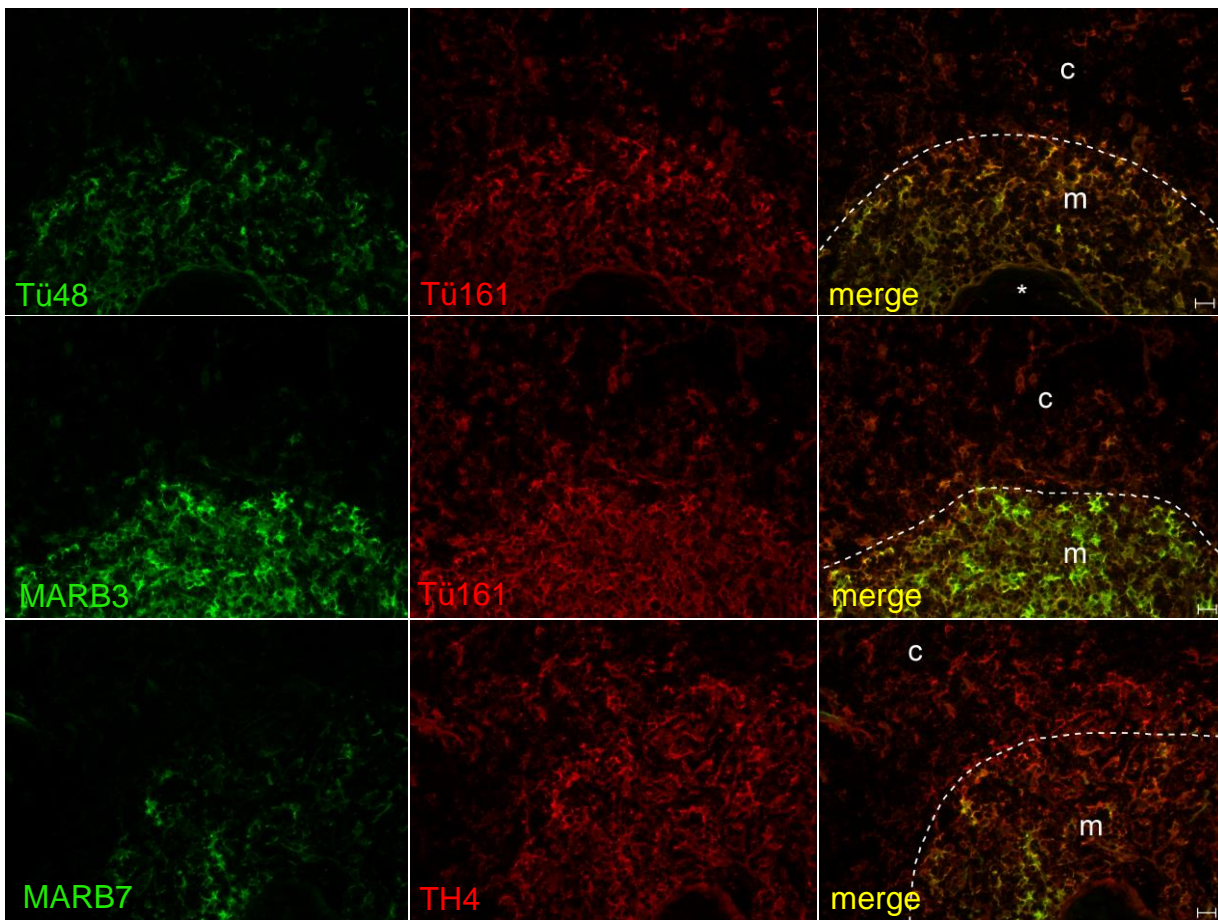


Abb. 17: Doppelmarkierung von HLA-Komplexen am Thymus T372 in der Immunfluoreszenz

Eine deutliche Koexpression zeigt sich nur medullär. c Cortex, m Medulla, * Hassall-Körperchen, Maßstab 20 µm.

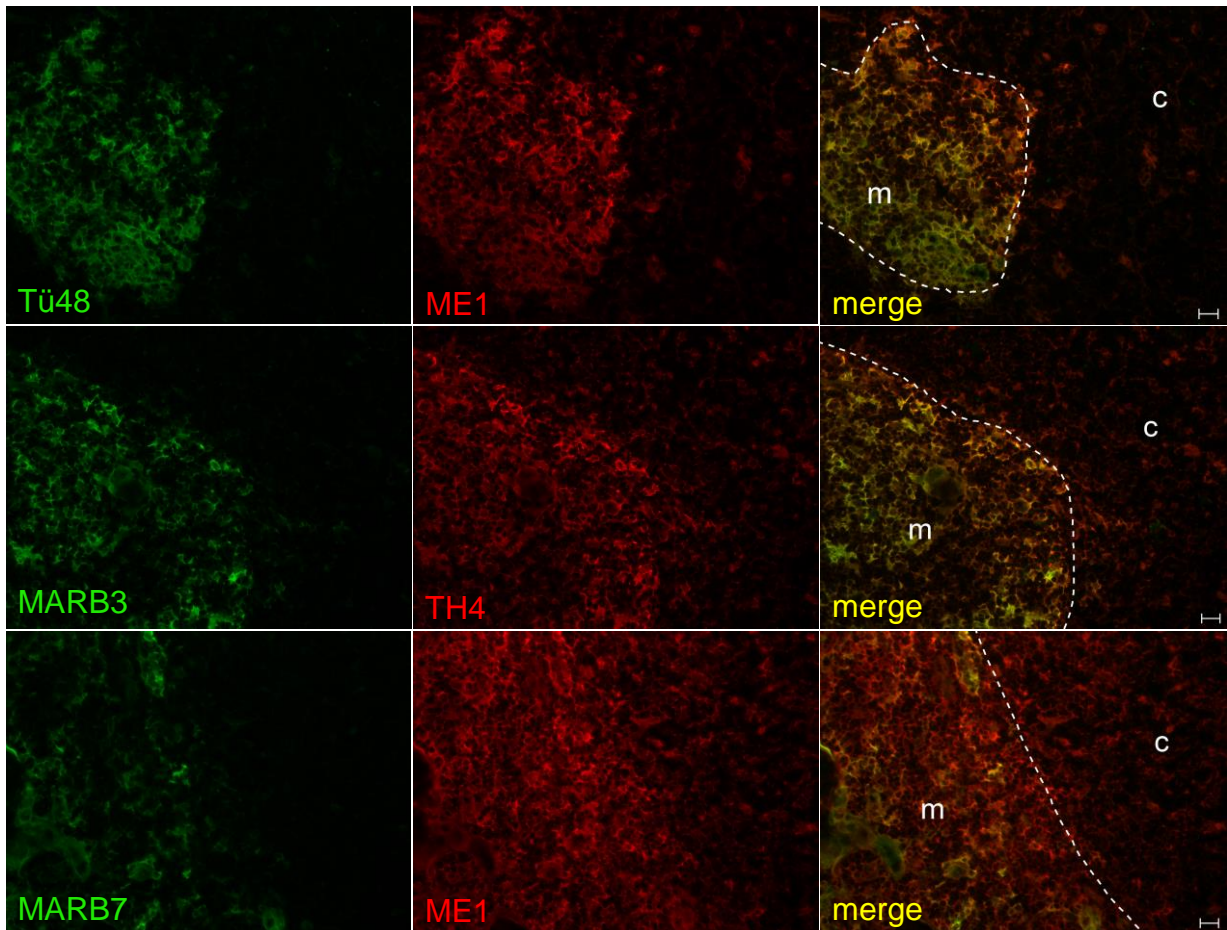


Abb. 18: Doppelmarkierung von HLA-Komplexen am Thymus T387 in der Immunfluoreszenz

Die Markierung der Bw4-spezifischen Antikörper Tü48, MARB3, MARB7 konzentriert sich auf das medulläre Kompartiment, kortikal sind nur wenige Elemente positiv. Mit den Antikörpern ME1 (Anti-HLA-B27) und TH4 (Anti-HLA-B) wurden HLA-B-Komplexe im Cortex hingegen erkannt. c Cortex, m Medulla, * Hassall-Körperchen, Maßstab 20 µm.

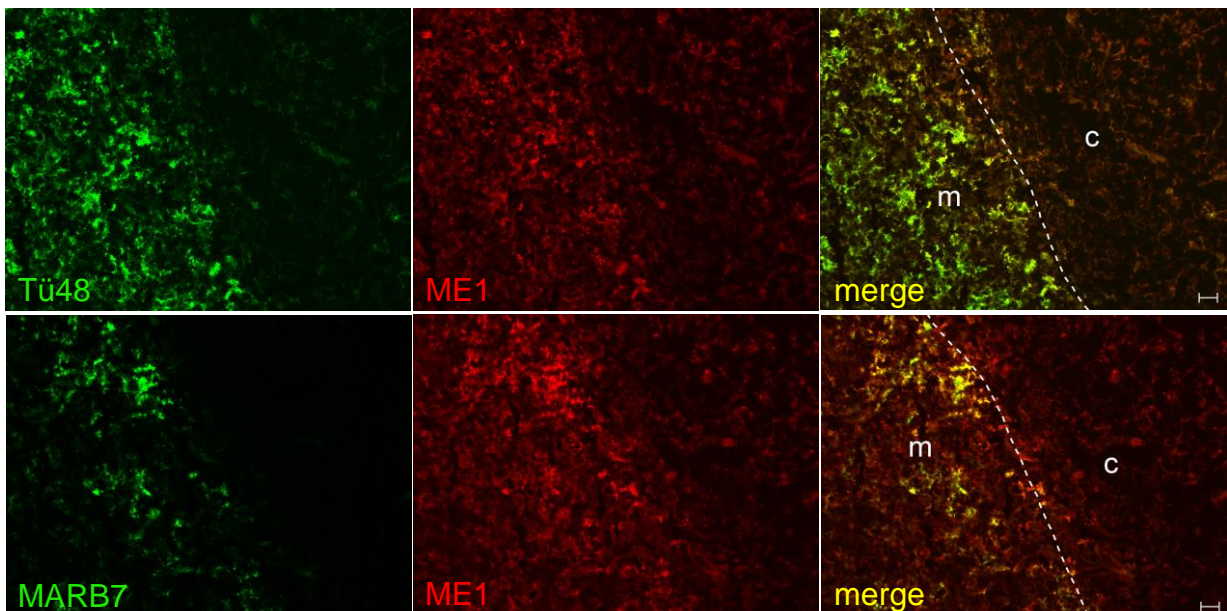


Abb. 19: Doppelmarkierung von HLA-Komplexen am Thymus T419 in der Immunfluoreszenz

Bei diesem Thymus besteht mit der Expression dreier Bw4-positiver HLA-Allele ein Spezialfall. Bei diesem Thymus zeigte sich eine sonst nicht beobachtete Färbung von Tü48. Auch die MARB3-Markierung führte zu einer stärkeren kortikalen Zeichnung (nicht gezeigt). MARB7 markiert hingegen fast ausschließlich das medulläre Kompartiment. c Cortex, m Medulla, Maßstab 20 µm.

3.3.2.3 Identifizierung Bw4-positiver Zellen im Thymus

Durch die Verwendung von zell- und strukturspezifischen Markern in der Doppelmarkierung mit Anti-HLA-Antikörpern konnte eine differenzierte Aussage darüber getroffen werden, welche zellulären Elemente im Thymus HLA-Klasse-I-Komplexe mit detektierbarem Bw4 exprimierten. Dazu wurden unterschiedliche Oberflächenmerkmale auf medullären Zelltypen wie Epithelzellen (mTECs) und dendritischen Zellen (DC) nachgewiesen. Vorausgegangene Färbungsserien hatten bereits gezeigt, dass sich auch im Cortex einzelne Strukturen mit stärkerer Bw4-Reaktivität vom dort generell niedrig-intensiven Bw4-spezifischen Signal abhoben. Hierunter fielen insbesondere Gefäße und cTECs, die im marknahen Cortex lokalisiert waren.

Die Antikörper TE-3 und TE-4 sind seit den 1980er-Jahren als Marker für medulläre bzw. kortikale TECs etabliert.

mTEC: Durch Doppelmarkierung mit TE-4 und Tü109 (Anti-Bw4) konnte gezeigt werden, dass mTECs zu den Bw4-positiven Strukturen in der Medulla gehören. Das TE-4-Antigen wurde in Bw4-positiven Zellen nachgewiesen. Das beobachtete Verteilungsmuster des TE-4-Antigens ließ auf eine intrazelluläre Lokalisation schließen. Die intrazelluläre Markierung widersprach Angaben in der Originalpublikation, stand aber in Einklang mit Angaben der ATCC (Haynes et al., 1984, ATCC Katalog Nr. HB-209) zur Reaktivität des TE-4 Antikörpers.

DC: Die breite Reaktivität der Anti-Bw4-Antikörper in der Medulla legte nahe, dass auch DCs als überwiegend der Medulla zuzuordnende Zellen Bw4-positiv waren. Dies bestätigte sich durch den Nachweis von Zellen, die neben Bw4 auch den DC-Marker CD83 in der Doppelmarkierung exprimierten.

cTEC: TE-3 markiert ein intrazelluläres Antigen, das von cTECs und hämatopoetischen Zellen wie Makrophagen exprimiert wird, jedoch nicht von mTECs (McFarland et al., 1984). Im Cortex und der subkapsulären Zone markierte TE-3 überwiegend cTECs mit Zellfortsätzen. Die Bw4-Markierung lieferte für diese Zellen entweder gar kein Signal oder eine sehr schwache Färbung knapp über der Nachweisgrenze. Marknahe Zellen waren vergleichsweise häufiger als Bw4-positiv nachweisbar. Eine parallel durchgeführte Färbung mit Antikörpern gegen HLA-B-Komplexe zeigte, dass dies nicht auf einer reduzierten HLA-B-Expression dieser Zellen beruhte: Der Anti-HLA-B27-Antikörper ME1 markierte diese Zellen deutlich. Bei den beobachteten medullären Bw4⁺/TE-3⁺-Zellen mit rundlichen, fortsatzfreien Zellkörpern handelte es sich vermutlich um Makrophagen.

Endothel: Die Expression des Von-Willebrand-Faktors (vWF) ist *in vivo* auf Endothel und

Megakaryozyten beschränkt (Peyvandi et al., 2011). Mit Ausnahme der Lokalisation im Knochenmark ist der vWF ein gefäßspezifisches Protein, dessen Markierung insbesondere Endothelien kennzeichnet, die den vWF in intrazellulären Vesikeln (Weibel-Palade-Körperchen) speichern. Der spezifische Antikörper führte zur Anfärbung von Gefäßen im Bereich der Kapsel, der Trabekel und der kortikomedullären Grenzregion und detektierte auch Kapillaren in Cortex und Medulla. Die vWF-positiven Gefäßstrukturen waren alle deutlich Bw4-positiv und stimmten nach Morphologie und Verteilungsmuster mit den tubulären Formationen überein, die bereits mit der Immunperoxidasefärbung detektiert worden waren (siehe Kapitel 3.3.1.3). Kapillaren gehörten damit zu den wenigen Strukturen, die im Cortex vergleichsweise deutliche Bw4-Reaktivität zeigten.

Makrophagen: CD68 bezeichnet einen *Scavenger*-Rezeptor (SR-D1), der fast ausschließlich von mononukleären Phagozyten exprimiert wird (Song et al., 2011). Die Markierung stellte Makrophagen dar, deren Verteilung sich hauptsächlich auf das kortikale Kompartiment beschränkte. Diese Makrophagen waren Bw4-negativ (nicht gezeigt).

Tabelle 9: Übersicht zu den untersuchten Zelltypen in der Dopplermarkierung mit Antikörpern gegen HLA-Bw4 und zellspezifischen Merkmalen

Zelle/Struktur	Marker/Antikörper*	Beziehung zur Bw4-Markierung	Thymus
mTEC	TE-4, Tü106	Überlappend (Medulla)	T372
cTEC	TE-3	Nur im marknahen Cortex überlappend	T372, T387, T419
DC	CD83	Überlappend (Medulla)	T361
Endothel	vWF	Überlappung in Cortex und Medulla	T361
Makrophagen	CD68	Markierte Makrophagen sind Bw4-negativ	T419

* Spezifikationen in Tabelle 2

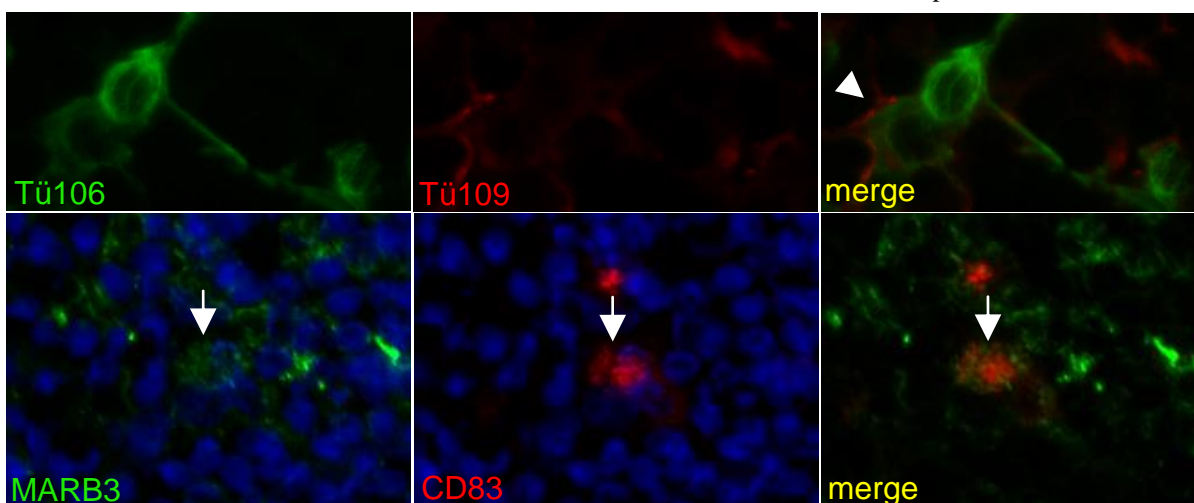


Abb. 20: Medullär angesiedelte TECs und DCs waren HLA-Bw4-positiv

Der Epithelien-spezifische Antikörper Tü106 markierte eine Bw4-positive mTEC. Als Anti-Bw4-Antikörper wurde Tü109 eingesetzt (**obere Reihe, Pfeilkopf**). Der Zellkörper einer DC zeigte eine assoziierte Markierung von Bw4 (detektiert mit MARB3) und CD83 (**untere Reihe, Pfeile**).

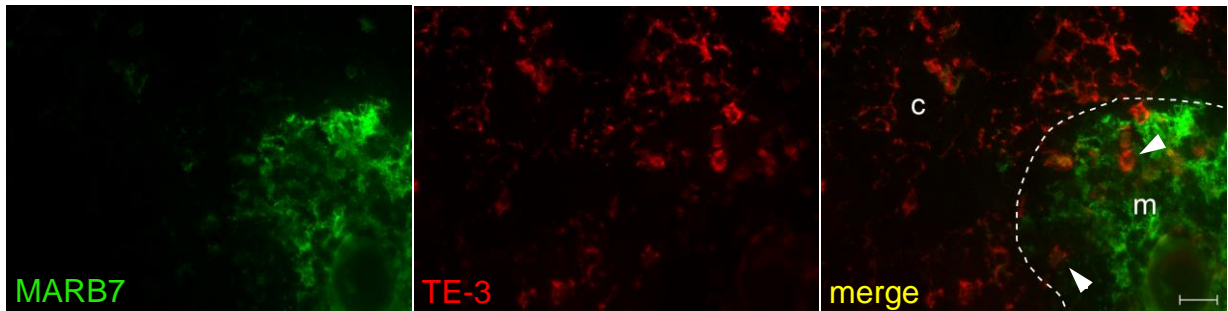


Abb. 21: Doppelmarkierung mit MARB7 (Anti-Bw4) und TE-3 (cTECs)

Die Bw4-Markierung lieferte auf TE-3 positiven cTECs entweder gar kein Signal oder eine sehr schwache Färbung. Marknahe Zellen waren vergleichsweise häufiger Bw4-positiv. Es war bekannt, dass der Antikörper TE-3 mit Makrophagen-ähnlichen Zellen in der Medulla reagierte (**Pfeilspitzen**). Maßstab 20 μ m.

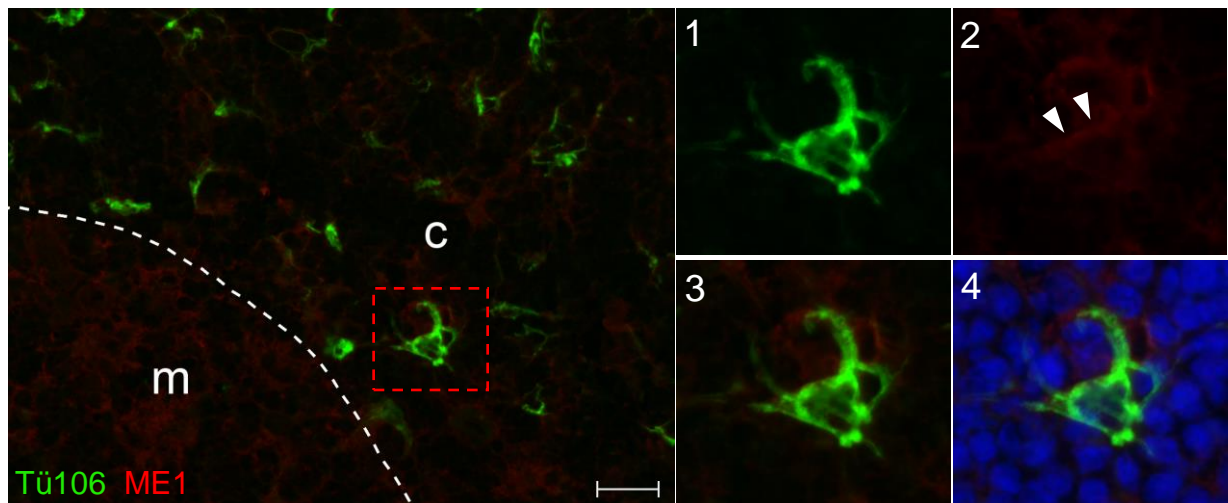


Abb. 22: Expression von HLA-B27 durch cTECs

Tü106 ist ein Marker für epitheliale Zellen, der in diesem Bildausschnitt nur cTECs markierte. Die Doppelfärbung mit ME1 (Anti-HLA-B27) zeigte, dass diese Zellen HLA-B exprimierten. Die Abbildungen 1-4 stellen den rot markierten Ausschnitt vergrößert dar. Die **Pfeilspitzen** weisen auf die HLA-Expression der im Ausschnitt gezeigten cTEC hin. Gegenfärbung mit DAPI (4). Maßstab 20 μ m.

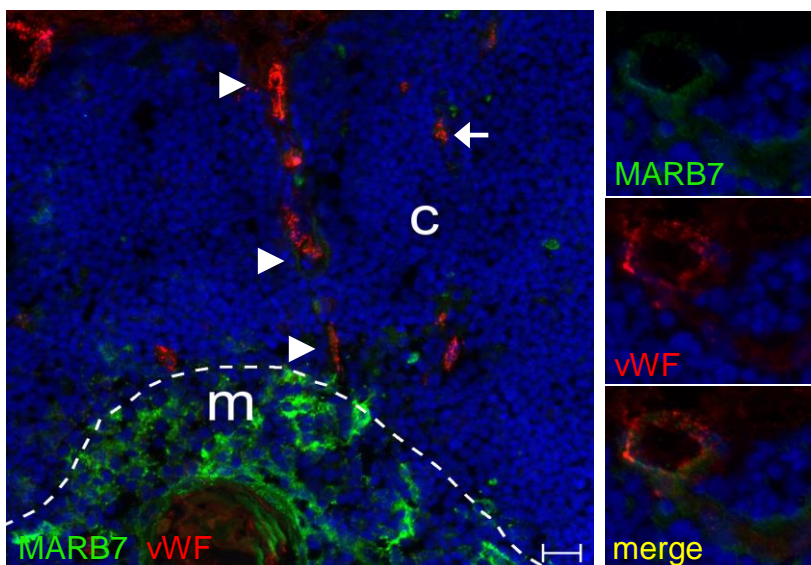


Abb. 23: Gefäßstrukturen zeigen Koexpression von Bw4 (MARB7) und vWF

Das Bild **links** zeigt die Verteilung von vWF: Größere Gefäße der Kapsel und Trabekel (**Pfeilspitzen**) sowie kortikale Kapillarschlingen sind gefärbt (**Pfeil**). Maßstab 20 μ m. Alle Gefäßstrukturen sind deutlich erkennbar HLA-Bw4-positiv. Die vWF-Markierung zeigt auch die länglichen Weibel-Palade-Körperchen.

3.3.2.4 Einsatz anderer HLA-spezifischer Marker

MARB4 ist ein HLA-B27-spezifischer Antikörper, der lediglich an eine Unterfraktion von etwa 5 – 20 % der an der Zelloberfläche befindlichen HLA-B27-Komplexe bindet. Die durch diese Komplexe gebundenen Peptide können die Standardlänge von 8 – 10 Aminosäuren wesentlich überschreiten: Die Peptide bestehen aus bis zu 33 verknüpften Aminosäuren (Urban et al., 1994). MARB4 unterscheidet sich dadurch von den Antikörpern MARB3 und MARB7, deren Bindungsvermögen an HLA-B27 mit zunehmender Kettenlänge des gebundenen Peptids abnimmt (Seitz, 2003; Urban et al., 1994). MARB4 wurde daher eingesetzt, um zu überprüfen, ob die verringerte Bindungsfähigkeit von MARB3 und MARB7 im Cortex durch eine Kompartiment-spezifische Präsentation besonders langer Peptidliganden zustande kam. Wenn solche Peptide für die herabgesetzte Bindung von MARB3 und MARB7 im Cortex hervorgerufen wurde, hätte umgekehrt eine verstärkte Bindung von MARB4 an kortikale HLA-Komplexe beobachtbar sein müssen.

Die Färbung des HLA-B27-positiven Thymus T419 sprach gegen die Spezialisierung des kortikalen Kompartiments auf die Produktion überdurchschnittlich langer Peptidliganden. Stattdessen entsprach das Färbungsmuster von MARB4 am Thymus der quantitativen Verteilung von HLA-B27-Molekülen mit einer stärkeren Anfärbung des medullären Kompartiments.

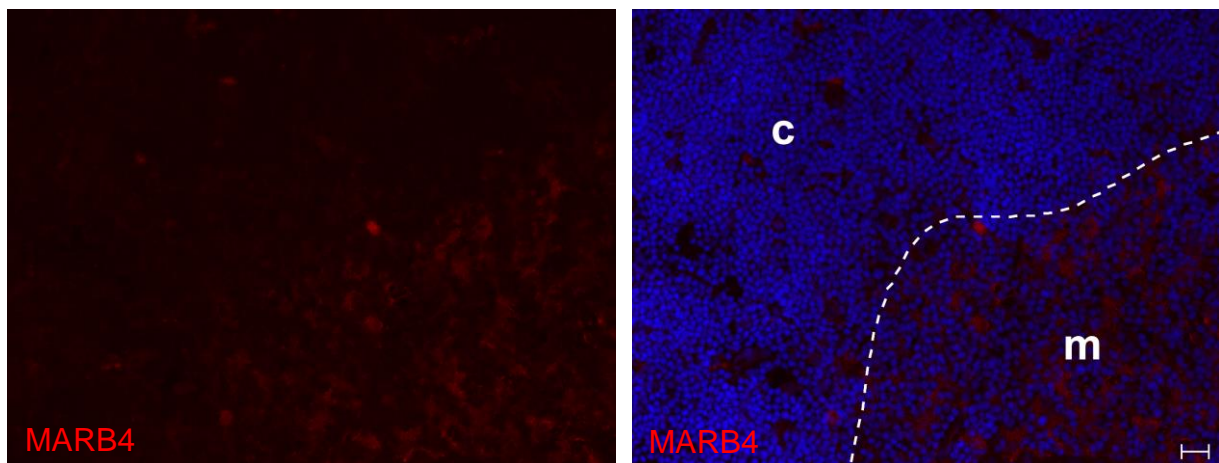


Abb. 24: Immunfluoreszenzfärbung mit dem HLA-B27-spezifischen Antikörper MARB4

Beim verwendeten Gewebe handelt es sich um den HLA-B27-positiven Thymus T419. Die geringe Färbeintensität lag in der Eigenschaft des Antikörpers MARB4 begründet, bevorzugt an HLA-B27-Moleküle zu binden, die ein überlanges Peptid komplexiert hatten. Dabei handelte es sich nur um eine Minderheit der HLA-Komplexe. Die Verteilung der Markierung entsprach im Wesentlichen der quantitativen Verteilung von HLA-B27-Komplexen ohne Bevorzugung des Cortex (Erläuterungen im Text). Maßstab 20 µm.

HC-10 ist ein Antikörper mit Spezifität für freie schwere Ketten unterschiedlicher HLA-Klasse-I-Moleküle (HC steht für *heavy chain*). Der Antikörper wurde ursprünglich als Reagenz gegen denaturierte HLA-B-Produkte entwickelt. Zusätzlich bindet HC-10 aber auch an schwere Ketten bestimmter HLA-C- und einzelner HLA-A-Moleküle. Erst die Dissoziation des β_2 -Mikroglobulins von der schweren Kette ermöglicht die Reaktion mit HC-10 (Carreno & Hansen, 1994). Die immunhistochemische Färbung mit HC-10 zeigte die Präsenz freier schwerer Ketten in Thymusmark und -cortex. In der Medulla zeigte sich flächendeckend eine Koexpression mit dem verwendeten HLA-Bw4-spezifischen Antikörper MARB3. Im Cortex war die HC-10-Reaktivität gegenüber dem schwachen MARB3-Signal etwas erhöht. Die Verteilung der HC-10-Markierung sprach damit nicht für eine vermehrte Ansammlung bzw. Bildung freier schwerer HLA-B-Ketten im Cortex im Vergleich zur Medulla. Der Cortex wird durch HC-10 deutlich schwächer markiert, als in HLA-B-spezifischen Färbungen mit den Antikörpern TH4, ME1 oder Tü161.

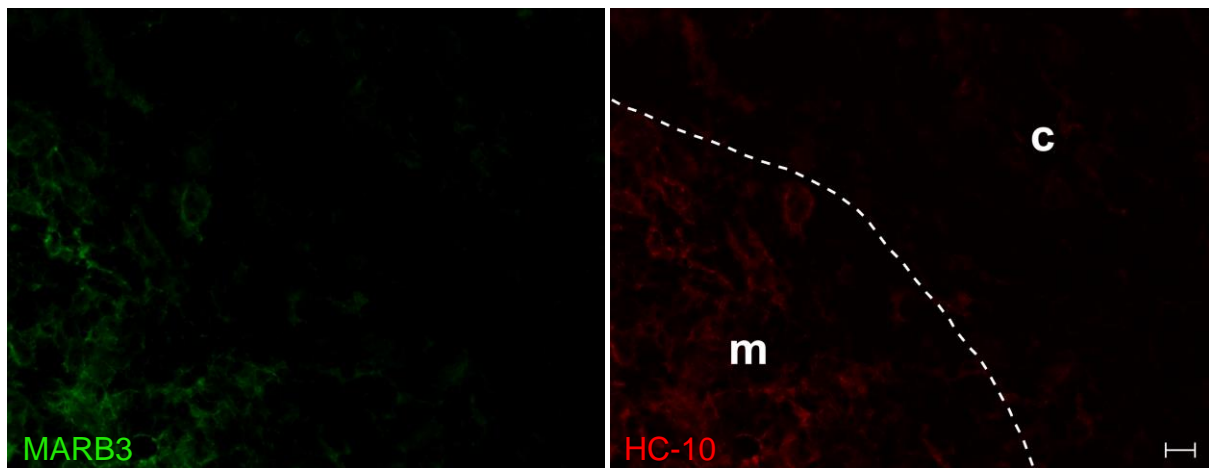


Abb. 25: Doppelmarkierung am Thymus T361 mit HC-10 und MARB3

Freie schwere Ketten wurden mit dem Antikörper HC-10 sowohl in der Medulla als auch im Cortex detektiert. Im Cortex war die HC-10-Reaktivität gegenüber dem schwachen MARB3-Signal etwas erhöht. Die Bilder ließen nicht auf die Entstehung exzessiver Mengen dissoziierter HLA-Komplexe im Cortex schließen. Maßstab 10 μm .

3.3.3 Durchflusszytometrische Analyse von Thymozyten

Vorausgegangene immunhistochemische Untersuchungen mit HLA-spezifischen Antikörpern wiesen auf unterschiedliche Thymozytenpopulationen im Cortex hin. Ein Großteil der Thymozyten zeigte kaum HLA-Klasse-I-Expression auf, andere Zellen waren jedoch deutlich gefärbt. Die Durchflusszytometrie erlaubte die genauere Analyse dieser Subpopulationen und die Quantifizierung der HLA-Klasse-I-Expression sowie die gezielte Untersuchung des Bw4-Epitops auf HLA-Molekülen von Thymozyten. Zwischen der operativen Entnahme des Thymusgewebes, über die Isolierung der Thymozyten bis hin zum Abschluss der durchflusszytometrischen Analyse vergingen nur wenige Stunden. Die Thymozyten wurden ohne Verdauung aus dem Gewebe extrahiert und nicht kultiviert. Durch die kurz gehaltene *ex vivo*-Phase erwarteten wir, artifizielle Veränderungen minimieren zu können, die durch die Entfernung der Thymozyten aus dem Mikromilieu des Organs entstehen könnten.

Eine Probe jeden Experiments wurde mit dem Pan-T-Zell-Marker Tü93 analysiert, der die T-zelluläre Abstammung für nahezu 100 % der isolierten Zellen bestätigte. Abgesehen von den Negativkontrollen wurden alle gemessenen Thymozyten mit einem APC-gekoppelten Anti-CD1a-Antikörper markiert. CD1a-positive Zellen sind nach immunhistologischen Voruntersuchungen überwiegend im Cortex verteilt. Dies wird durch die eigenen Analysen (Kapitel 3.3.2.1) und Angaben in der Literatur belegt (Kaymaz et al., 2003; Leong et al., 2003). Wie im Kapitel zur *Gating*-Strategie (2.10.3) bereits ausgeführt und dokumentiert wurde, waren CD1a-negative Zellen zu über 90 % CD4- oder CD8-positive SP-Thymozyten. Der Antikörper W6/32.HL kam als Positivkontrolle zur Anwendung und bestätigte frühere Publikationen, wonach durchflusszytometrisch zwei große Thymozyten-Populationen unterschieden werden können: eine reife, reichlich HLA exprimierende und eine größere unreife Population mit reduzierter HLA-Expression (Blue et al., 1989; Park et al., 1988).

Da der Antikörper TH4 mit beiden HLA-B-Molekülen der Zellen reagierte, mussten die Thymozyten von einem Bw4-homozygoten Thymus stammen, damit ein Vergleich zwischen den Fluoreszenzintensitäten der Markierungen mit *common*-HLA-B-Antikörpern und Bw4-spezifischen Antikörpern erfolgen konnte. Die Typisierung des Thymus S2594 zeigte, dass dieses Gewebe das Bw4-Epitop auf beiden HLA-B-Molekülen exprimierte und sich damit für die Untersuchung eignete. An diesem Thymus erwies sich, dass alle CD1a-negativen (medullären) Thymozyten deutlich nachweisbare Mengen an HLA-B-Komplexen trugen. Die gesamte medulläre Population war TH4-positiv und zeigte gleichzeitig eine hohe Bw4-Nachweisbarkeit. CD1a-positive (kortikale) Thymozyten erwiesen sich ebenfalls zu rund

98 % als TH4-positiv, was auf eine deutliche HLA-B-Expression auch dieser Zellen schließen ließ. Die Markierung der CD1a-positiven Thymozyten mit Anti-Bw4-Antikörpern näherte sich hingegen der Negativkontrolle an, im Fall von MARB7 und Tü109 war sogar nur eine kleine Population von rund 7 bzw. 8 % positiv. Die gegenüber diesen Antikörpern etwas gesteigerte Fluoreszenz bei der Markierung mit Tü48 und MARB3 ergab sich wahrscheinlich durch die gleichzeitige Expression eines Bw4-positiven HLA-A-Allels in diesem Thymus.

Der Thymus S2596 war Bw6-homozygot und zeigte beim Einsatz von Anti-Bw4-Antikörpern eine der Negativkontrolle entsprechende Fluoreszenz. Dies bestätigte, dass die Bw4-spezifischen Antikörper nicht mit Bw6-Epitopen reagierten.

Am Thymus S2598 konnte der Einfluss eines Bw4-positiven HLA-A-Allels untersucht werden. Dieser Thymus war Bw6-homozygot, trug also kein Bw4-Epitop auf den exprimierten HLA-B-Molekülen, sodass mit Anti-Bw4-Antikörpern nur das HLA-A-Molekül gebunden werden konnte. Entsprechend der Charakterisierung der vier Bw4-spezifischen Antikörper wurde nur bei Verwendung von Tü48 und MARB3 ein positives Fluoreszenzsignal gemessen. Tü109 und MARB7 banden nicht an HLA-A-Moleküle und zeigten somit an diesem Thymus keine Fluoreszenzreaktion.

Tabelle 10: Typisierung der durchflusszytometrisch untersuchten Thymi

Thymus	Typisierung	Bw4/Bw6
S2594	HLA-A*02, HLA-A*24 HLA-B*38, HLA-B*51	HLA-Bw4-homozygot HLA-A*24 ist zusätzlich Bw4-positiv
S2596	HLA-A*01, HLA-A*26 HLA-B*08, HLA-B*15	HLA-Bw6-homozygot
S2598	HLA-A*30:01, HLA-A*32:01 HLA-B*18:01, HLA-B*39:01	HLA-Bw6-homozygot HLA-A*32:01 ist zusätzlich Bw4-positiv

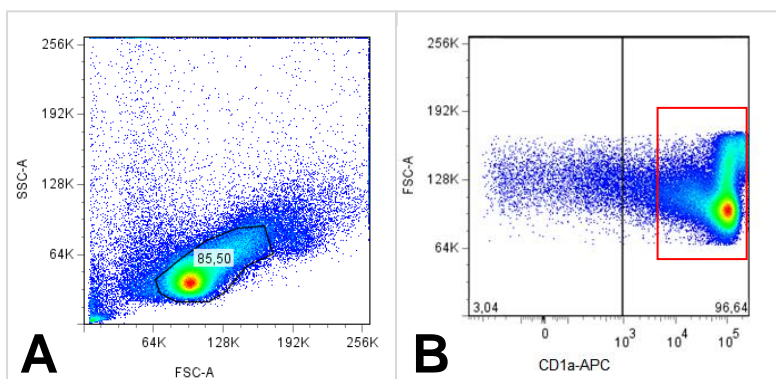


Abb. 26: Gating-Strategie am Beispiel des Thymus S2594

Zuerst erfolgte die Auswahl der Thymozytenpopulation im *Scatterplot* (A), anschließend wurde ein „Lebend“-Gate gesetzt (nicht dargestellt) und schließlich die Auswahl CD1-positiver kortikaler Thymozyten (im roten Kasten) vorgenommen (B).

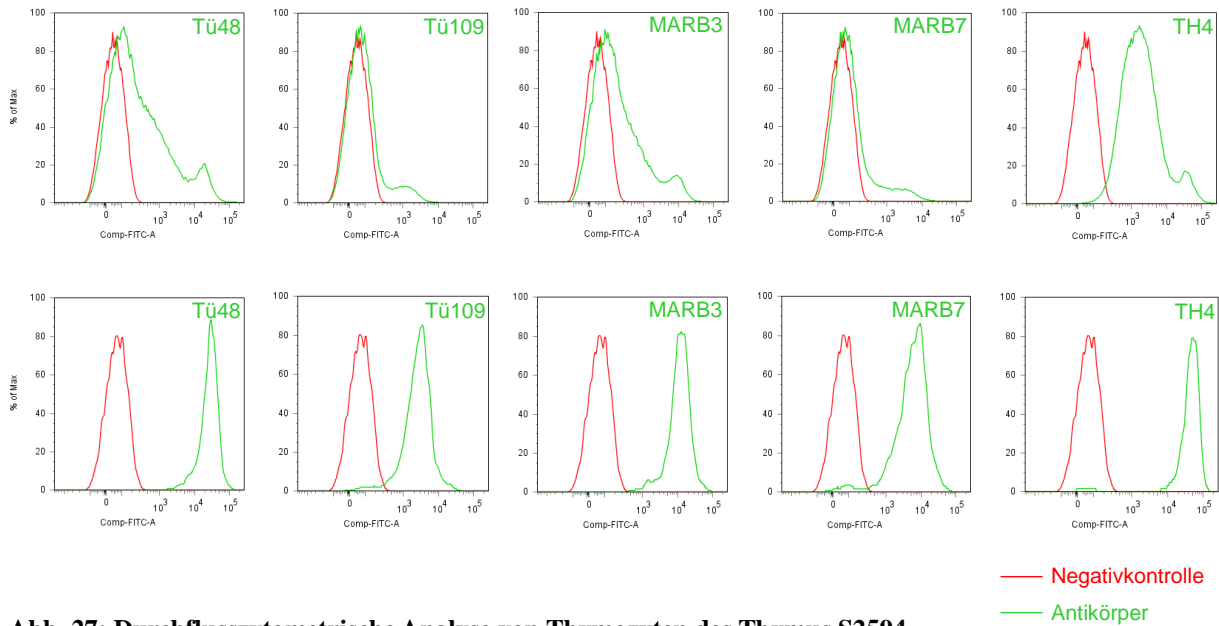


Abb. 27: Durchflusszytometrische Analyse von Thymozyten des Thymus S2594

Gezeigt ist die Reaktivität von Anti-Bw4-Antikörpern (Tü48, Tü109, MARB3, MARB7) und TH4 an CD1a-positiven (kortikalen) Thymozyten (**obere Reihe**) und CD1a-negativen (medullären) Thymozyten (**untere Reihe**). Trotz der Bw4-Homozygotie des Gewebes wurde auf kortikalen Thymozyten nur wenig Bw4 detektiert. Tü48 und MARB3 können neben HLA-B- auch an HLA-A24 binden, womit die etwas gesteigerte Fluoreszenz erklärt werden kann. Wurde in der Markierung mit Tü109 und MARB7 nur die Reaktivität mit Bw4 auf HLA-B-Molekülen betrachtet, so zeigte nur eine kleine Minderheit der Zellen überhaupt nachweisbares Bw4. Nahezu alle Thymozyten exprimierten HLA-B-Moleküle (rund 98 % der Zellen sind TH4-positiv). Medulläre Thymozyten waren stark HLA-B- und Bw4-positiv.

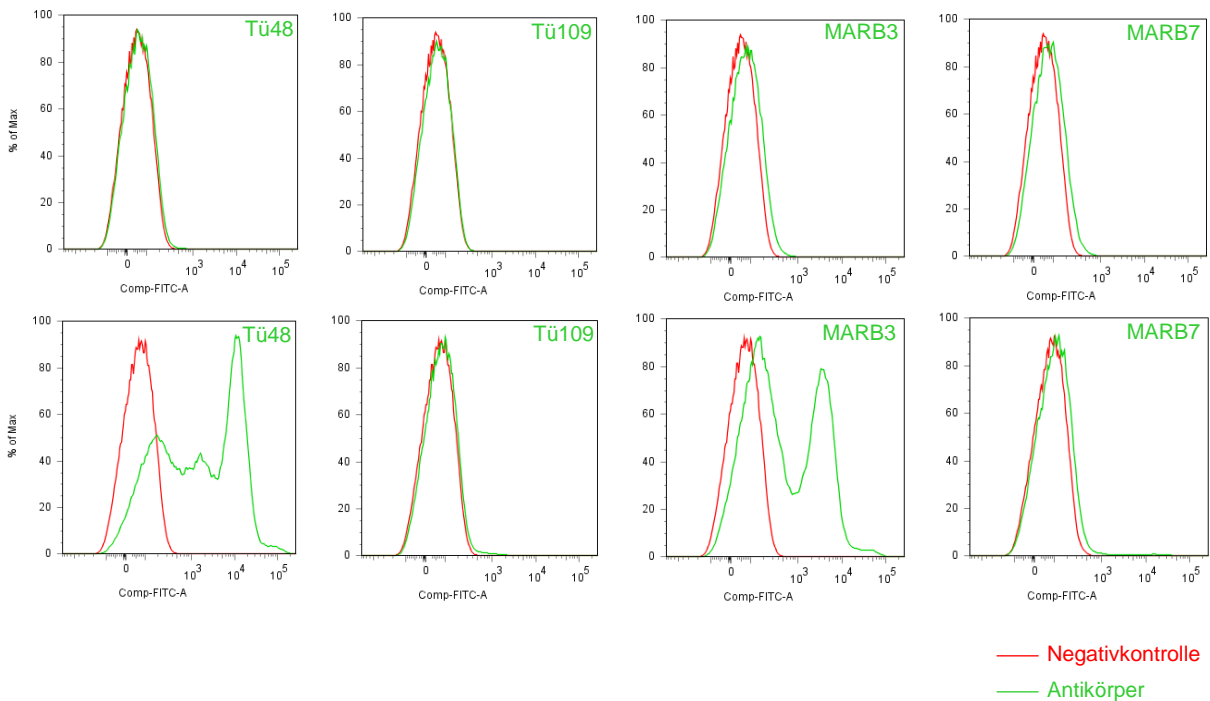


Abb. 28: Bw4-Markierung bei den Thymi S2596 und S2598

Die Bw4-spezifischen Antikörper (Tü48, Tü109, MARB3, MARB7) reagierten nicht mit Thymozyten des Bw6-homozygoten Thymus S2596 (**obere Reihe**). Der ebenfalls Bw6-homozygote Thymus S2598 trug das Bw4-positive HLA-A24, an das nur Tü48 und MARB3 banden (**untere Reihe**).

3.3.4 Isolierung HLA-gebundener Peptide aus Thymusgewebe

Es wurde vermutet, dass HLA-gebundene Peptide die Bindung der vier verwendeten Bw4-spezifischen Antikörper Tü48, Tü109, MARB3 und MARB7 beeinflussen könnten. Die Ergebnisse aus den durchgeführten immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen zeigten, dass die Bindung der Antikörper an kortikale HLA-Komplexe unmöglich oder gemindert war. Hierauf gründete sich der Verdacht, dass Cortex-spezifische Strukturvariationen von HLA-Komplexen existierten, die möglicherweise auf Eigenschaften des Peptids oder der Peptidverankerung zurückgeführt werden könnten. Die Isolierung HLA-gebundener Peptide und die massenspektrometrische Prozessierung wurden in den letzten Jahren technisch soweit verfeinert, dass heute häufig auch von weniger als einer Milliarde eingesetzter Zellen eine Anzahl sequenzierter Peptide im dreistelligen Bereich gewonnen werden kann. Um vor allem kortikale HLA-Peptide zu untersuchen, wurden zwei unterschiedliche Herangehensweisen gewählt. Zum einen wurden isolierte Thymozyten, zum anderen mit der LMPC gewonnenes kortikales Gewebe eingesetzt, und mit unfraktioniertem Thymusgewebe verglichen.

3.3.4.1 Isolierung von HLA-Peptiden aus angereicherten Thymozyten

Wie die durchflusszytometrischen Analysen zeigten, bestanden isolierte Thymozyten zu über 90 % aus CD1a-positiven Zellen, die damit fast ausschließlich dem Cortex entstammen mussten. Der Thymus S2585 lieferte eine relativ große Menge an Thymozyten ($1,13 \times 10^9$ Zellen) mit einem Gewicht von 0,6 g (pelletiert). Diese wurden parallel zu Untersuchungen an einem Gewebewürfel des gleichen Thymus mit einem Gewicht von 0,9 g für die Peptidisolierung eingesetzt. Die Lysate wurden zuerst über Affinitätssäulen geleitet, die mit dem Anti-HLA-B/C-Antikörper B1.23.2 gebunden waren. Darauf folgend wurden Affinitätssäulen mit dem Pan-HLA-Klasse-I-spezifischen Antikörper W6/32.HL verwendet, welche die restlichen, noch im Lysat befindlichen HLA-Klasse-I-Moleküle binden sollten (erfahrungsgemäß überwiegend HLA-A-Moleküle). Durch die primäre Affinitätsaufreinigung mit B1.23.2 wurde angestrebt, zuerst und selektiv HLA-B/C-Moleküle und daran gebundene Peptide zu erhalten. Nach saurer Elution und Aufreinigung wurden die aus den HLA-Komplexen isolierten Peptide der Massenspektrometrie zugeführt. Die Interpretation der gemessenen Rohdaten erfolgte mit der Software „Proteome Discoverer“ (Thermo Scientific), die für jedes Fragmentspektrum eine probabilistische Zuordnung zu einer Reihe möglicher

Peptidsequenzen lieferte. Nach Filtration unspezifischer Resultate und manueller Verifikation der Massenspektren wurden insgesamt 215 mögliche HLA-gebundene Peptide in ihrer Sequenz identifiziert, von denen 160 Peptide ein bekanntes Bindungsmotiv entsprechend der HLA-Typisierung des Gewebes besaßen.

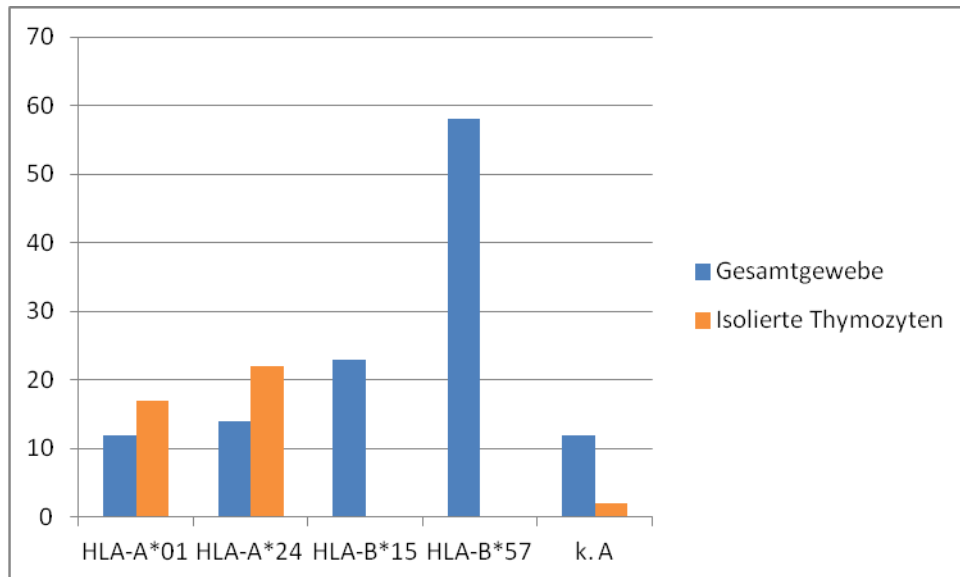


Abb. 29: Anzahl sequenzierter Peptide und Zuordnung zu HLA-Allelen/Antigenen nach Bindungsmotiv

Insgesamt 160 Motivpeptide wurden identifiziert und wenn möglich nach Bindungsmotiv passenden HLA-Allelen zugeordnet. Zugeordnete Peptide von HLA-Molekülen des Gewebewürfels stammten zu rund 76 % von HLA-B-Molekülen. Dagegen wurde kein einziges HLA-B-Peptid aus den isolierten Thymozyten nachgewiesen. Bei insgesamt 14 Peptiden war ein Motiv vorhanden, ohne dass eine eindeutige Zuordnung zu einem HLA-Allel möglich war („k.A.“).

Tabelle 11: Anzahl isolierter und identifizierter HLA-präsentierter Peptide nach eingesetztem Gewebe und Zuordnung zu HLA-Allelen nach ihrem bekannten Bindungsmotiv

		Anzahl isolierter Peptide und ihre HLA-Allel-Zuordnung				
		A*01	A*24	B*15	B*57	k.A.
Gesamtgewebe	B1.23.2*		4	17	56	11
	↓ W6/32.HL†	12	10	6	2	1
Isolierte Thymozyten	B1.23.2			0	0	0
	↓ W6/32.HL	17	22	0	0	2

* B1.23.2: Monoklonaler Antikörper mit Spezifität für HLA-B- und -C-Antigene

† W6/32.HL: Monoklonaler Antikörper gegen HLA-A, -B, -C-Antigene

Um über die Proteinherkunft der isolierten Peptide Aufschluss zu erhalten, wurden die Aminosäuresequenzen mit einer Proteindatenbank abgeglichen. Dazu diente der BLAST-Algorithmus (*Basic Local Alignment Search Tool*, BLAST¹). Diese Software sucht nach Ähnlichkeiten oder Übereinstimmungen der Peptidsequenzen mit bereits bekannten Aminosäuresequenzen von Proteinen und bewertet die Ähnlichkeit und statistische Signifikanz der Zuordnung. Ein niedriger Erwartungswert (*e-Value*) bzw. ein hoher Punktwert (*Score*) zeigten eine geringe Wahrscheinlichkeit für eine nur zufällige Übereinstimmung an. Bei der Bestimmung der Quellproteine wurden nur die Einträge mit den höchsten *Scores* berücksichtigt.

Insgesamt 12 unterschiedliche Peptide konnten sowohl aus der Thymozytenprobe als auch aus dem unfraktionierten Gewebestück isoliert und sequenziert werden. Diese Peptide wurden in Tabelle 12 hellgrau hervorgehoben. Alle Peptide trugen ein eindeutiges, HLA-Allel-typisches Bindungsmotiv, das zur Typisierung des verwendeten Thymus passte, und stammten ausschließlich aus HLA-A:Peptid-Komplexen. Die Sequenzen dieser Peptide enthielten Bindungsmotive für die HLA-Allele A*01 und A*24, die in diesem Thymusgewebe exprimiert wurden (Kubo et al., 1994). Bei den insgesamt 55 Peptiden ohne bekanntes HLA-Klasse-I-Bindungsmotiv handelte es sich zu rund 80 % um Fragmente der schweren Kette von HLA-Klasse-I-Molekülen, Bestandteile von β_2 -Mikroglobulin oder um Bruchstücke von Keratinen. Diese mussten als überwiegend technisch bedingte und kaum vermeidbare Artefakte der Aufreinigung von Peptid:HLA-Komplexen betrachtet werden. Die restlichen Peptide fanden sich ohne auffällige Verteilungsunterschiede in allen Proben und stammten zum Beispiel aus konstitutiv exprimierten Quellproteinen wie Vimentin oder Dynein.

¹ Zu erreichen unter: www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi

Tabelle 12: Auflistung aller sequenzierten Peptide mit HLA-Klasse-I-Bindungsmotiven

Quellprotein und Gen ID wurden als Ergebnisse des *Sequenzalignments* mit dem BLAST-Algorithmus und damit verbundener humaner Proteindatenbanken angeführt. Die Probenbezeichnung setzt sich zusammen aus der Angabe G oder Z für Gewebe bzw. Zellen (unfraktioniertes Gewebestück oder Thymozytenpellet) und dem Namen des Antikörpers, der an die Affinitätssäule gebunden war (B1.23.2 oder W6/32.HL). Wenn keine eindeutige Zuordnung zu einem HLA-Allotyp erfolgen konnte, wurde dies durch die Angabe „k.A.“ gekennzeichnet. Hellgrau markiert sind Peptide, die sowohl im Gewebestück als auch aus der Thymozytenprobe isoliert wurden.

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
AAADSAVRLW	B*57	55250	<i>Elongator complex protein 2 isoform 6</i>	ELP2	G/B1.23.2
ALKDLAKQY	B*15	51667	<i>NEDD8 ultimate buster 1</i>	NUB1	G/W6/32
AQKVIYTLM	B*15	5996	<i>Regulator of G-protein signaling 1</i>	RGS1	G/B1.23.2
AYVHMTVTHF	A*24	7009	<i>Bax inhibitor 1</i>	TMBIM6	G/B1.23.2
AYVHMTVTHF	A*24	7009	<i>Bax inhibitor 1</i>	TMBIM6	G/W6/32
DTDHYFLRY	A*01	51604	<i>GPI transamidase component PIG-T isoform 4 precursor</i>	PIGT	G/W6/32
DYSSILQKF	A*24	23048	<i>Formin-binding protein 1</i>	FNBP1	Z/W6/32
ESLRIQAQF	B*57	6777	<i>Signal transducer and activator of transcription 5B</i>	STAT5B	G/B1.23.2
EYATKISRF	k.A.	57095	<i>PITH domain-containing protein 1</i>	PITHD1	G/B1.23.2
FLDASGAKLDY	A*01	9689	<i>Basic leucine zipper and W2 domain-containing protein 1</i>	BZW1	Z/W6/32
FLDQNLQKY	A*01	1832	<i>Unnamed protein product</i>	DSP	G/W6/32
FLEQVHQLY	A*01	6772	<i>Signal transducer and activator of transcription 1 variant a</i>	STAT1	Z/W6/32
FQKVITEY	B*15	27044	<i>Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1</i>	SND1	G/W6/32
FRVGNVQEL	k.A.	1293	<i>Collagen alpha-3(VI) chain isoform 4 precursor</i>	COL6A3	G/B1.23.2

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
FTDVNSILRY	A*01	2058	<i>Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase</i>	EPRS	Z/W6/32
FVKGWGAEY	k.A.	4088	<i>Mothers against decapentaplegic</i>	SMAD	Z/W6/32
GAKAFKDIDI	k.A.	8661	<i>Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A</i>	EIF3A	Z/W6/32
GQKLEPLAY	B*15	79365	<i>Class E basic helix-loop-helix protein 41</i>	BHLHE41	G/W6/32
GSHSmRYFFTSV SRPG	B*15	3105	<i>HLA class I histocompatibility antigen, A-1 alpha chain precursor</i>	HLA-A	G/B1.23.2
GSMGLRSLW	B*57	27013	<i>Protein CNPPD1</i>	CNPPD1	G/B1.23.2
GSSDGTIRLW	B*57	57599	<i>WD repeat-containing protein 48</i>	WDR48	G/B1.23.2
GTDRNAYVW	B*57	10095	<i>Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B</i>	ARPC1B	G/B1.23.2
GTYGVRAAW	B*57	3384	<i>Intercellular adhesion molecule 2 precursor</i>	ICAM2	G/B1.23.2
HQITVLHVY	B*15	60481	<i>Elongation of very long chain fatty acids protein 5</i>	ELOVL5	G/W6/32
IADMGHLKY	A*01	5111	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>	PCNA	Z/W6/32
IAKIPNFW	B*57	6418	<i>Protein SET</i>	SET	G/W6/32
IARVTNVEW	B*57	29108	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD</i>	PYCARD	G/W6/32
IIAEVKAQY	B*15	div.	<i>Keratin, type II</i>	KRT	G/W6/32
IQNPDITSSRY	B*15	7454	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>	WAS	G/W6/32
ISAIPEQRW	B*57	23030	<i>Lysine-specific demethylase 4B</i>	KDM4B	G/W6/32
ISKALVAYY	B*57	6217	<i>40S ribosomal protein S16</i>	RPS16	G/W6/32
ISVPIFKQF	B*57	3069	<i>Vigilin</i>	HDLBP	G/W6/32
ITAGAHRLW	B*57	6319	<i>Acyl-CoA desaturase</i>	SCD	G/W6/32
ITDSAGHILY	A*01	10972	<i>Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 precursor</i>	TMED10	G/W6/32

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
ITDSAGHILY	A*01	10972	<i>Transmembrane emp24 domain-containing protein 10 precursor</i>	TMED10	Z/W6/32
ITIKSESTF	B*57	2167	<i>Fatty acid-binding protein, adipocyte</i>	FABP4	G/B1.23.2
ITKADAAEFW	B*57	867	<i>E3 ubiquitin-protein ligase CBL</i>	CBL	G/B1.23.2
ITKDVLQW	B*57	9448	<i>Mitogen-activated protein kinase 4</i>	MAP4K4	G/B1.23.2
ITNLTQGEEY	k.A.	7272	<i>Titin</i>	TTN	G/W6/32
ITQGTPLKY	B*57	9612	<i>Nuclear receptor corepressor 2</i>	NCOR2	G/W6/32
ITSQDVLHSW	B*57	4513	<i>Cytochrome c oxidase subunit II</i>	COX2	G/B1.23.2
ITTKAISRW	B*57	7203	<i>T-complex protein 1 subunit gamma</i>	CCT3	G/B1.23.2
IYIKQIKTF	A*24	5934	<i>Retinoblastoma-like protein 2</i>	RBL2	Z/W6/32
IYQWVRDEL	A*24	6304	<i>DNA-binding protein SATB1</i>	SATB1	Z/W6/32
IYTSSVNRL	A*24	9276	<i>Coatomer subunit beta'</i>	COPB2	G/W6/32
KAGIIQDTW	B*57	6238	<i>Ribosome-binding protein 1</i>	RRBP1	G/B1.23.2
KAIEKNVLF	B*57	5573	<i>cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit</i>	PRKAR1A	G/B1.23.2
KAKQIYEEF	B*57	8490	<i>Regulator of G-protein signaling 5</i>	RGS5	G/B1.23.2
KFIDTTSKF	A*24	6122	<i>60S ribosomal protein L3</i>	RPL3	G/W6/32
KFIDTTSKF	A*24	6122	<i>60S ribosomal protein L3</i>	RPL3	Z/W6/32
KIIPKTLTW	B*57	4065	<i>Lymphocyte antigen 75 precursor</i>	LY75	G/B1.23.2
KIKSFEVVF	k.A.	10628	<i>Thioredoxin-interacting protein</i>	TXNIP	G/B1.23.2
KIKVPVDW	B*57	3936	<i>Plastin-2</i>	LCP1	G/B1.23.2
KLADPDEVARW	B*57	2114	<i>Protein C-ets-2</i>	ETS2	G/B1.23.2
KQTQIFTTY	B*15	3004 /5	<i>Heat shock 70 kDa protein 1 (-like)</i>	HSPA1(L)	G/B1.23.2
KSADWVSDW	B*57	665	<i>BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-interacting protein 3-like</i>	BNIP3L	G/B1.23.2
KSFDNIKNW	B*57	51762	<i>Ras-related protein Rab-8B</i>	RAB8B	G/B1.23.2

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
KSFENISKW	B*57	10890	<i>Ras-related protein Rab-10</i>	RAB10	G/B1.23.2
KSGPVVSLGW	B*57	64601	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 16 homolog</i>	VPS16	G/B1.23.2
KSIDLIQKW	B*57	5130	<i>Choline-phosphate cytidyltransferase A</i>	PCYT1A	G/B1.23.2
KSKLDAEVSKW	B*57	1495	<i>Catenin alpha-1</i>	CTNNA1	G/B1.23.2
KSVTLGYLF	B*57	103	<i>Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase</i>	ADAR	G/B1.23.2
KTIGLREVVW	B*57	4478/ 7430	<i>Moesin /Ezrin</i>	MSN/EZR	G/B1.23.2
KTRIIDVVY	B*57	6202	<i>40S ribosomal protein S8</i>	RPS8	G/B1.23.2
KTRVFAVVI	k.A.	1292	<i>Collagen alpha-2(VI) chain isoform 2C2 precursor</i>	COL6A2	G/B1.23.2
KTVAIHTLW	B*57	3635	<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 1</i>	INPP5D	G/B1.23.2
KVLDTKWTL	k.A.	div.	<i>Keratin, type II</i>	KRT	G/B1.23.2
KVTELLRTF	k.A.	6813	<i>Syntaxin-binding protein 2</i>	STXBP2	G/B1.23.2
KYITQGQLLQF	A*24	60481	<i>Elongation of very long chain fatty acids protein 5</i>	ELOVL5	Z/W6/32
KYPDRVPVI	A*24	11337	<i>Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein</i>	GABARAP	G/W6/32
KYPENFFLL	A*24	div.	<i>Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit</i>	PPP1C	Z/W6/32
KYPSPFFVF	A*24	1660	<i>ATP-dependent RNA helicase A</i>	DHX9	Z/W6/32
KYSLIKGNF	A*24	6279	<i>Protein S100-A8</i>	S100A8	G/W6/32
KYSLIKGNF	A*24	6279	<i>Protein S100-A8</i>	S100A8	Z/W6/32
LGRPDAEYW	B*57	div.	<i>Major histocompatibility complex, class II, DR beta</i>	HLA-DRB	G/B1.23.2

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
LLDIRSEY	A*01	311	<i>Annexin A11</i>	ANXA11	G/W6/32
LLDIRSEY	A*01	311	<i>Annexin A11</i>	ANXA11	Z/W6/32
LLDQGQLNKY	A*01	1213	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	CLTC	G/W6/32
LLDQGQLNKY	A*01	1213	<i>Clathrin heavy chain 1</i>	CLTC	Z/W6/32
LQHPNIVGY	B*15	27102	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 1</i>	EIF2AK1	G/B1.23.2
LRNQLQSVY	k.A.	84759	<i>Polycomb group RING finger protein 1</i>	PCGF1	G/B1.23.2
LSDKNIEQY	A*01	84248	<i>Unnamed protein product</i>	FYTTD1	G/W6/32
LSDLGRLSY	A*01	7994	<i>MYST3 protein</i>	KAT6A	Z/W6/32
LSRLVGTEW	B*57	55193	<i>Polybromo 1</i>	PBRM1	G/B1.23.2
LTDRELEEY	A*01	118	<i>Alpha-adducin</i>	ADD1	G/W6/32
LYQDGVFKF	k.A.	64400	<i>AKT-interacting protein</i>	AKTIP	G/B1.23.2
NYIDKVRFL	A*24	7431	<i>Vimentin</i>	VIM	G/B1.23.2
NYIDKVRFL	A*24	7431	<i>Vimentin</i>	VIM	Z/W6/32
PTDPKVVVY	A*01	202	<i>Absent in melanoma 1 protein</i>	AIM1	G/W6/32
PTDPKVVVY	A*01	202	<i>Absent in melanoma 1 protein</i>	AIM1	Z/W6/32
PYDAAKDSIL	A*24	9296	<i>Vacuolar ATPase</i>	ATP6V1F	G/W6/32
RFEEAHFTF	k.A.	10401	<i>Protein inhibitor of activated STAT, 3</i>	PIAS3	G/B1.23.2
RLAAAAAQSVY	B*15	2876	<i>Glutathione peroxidase</i>	GPX1	G/B1.23.2
RSAPPGPFAW	B*57	1545	<i>cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1</i>	CYP1B1	G/B1.23.2
RTILVDNNTW	B*57	3703	<i>Subunit of the oligosaccharyl transferase complex, homolog A</i>	STT3A	G/B1.23.2
RTLRDIETF	B*57	1973	<i>Unnamed protein product</i>	EIF4A1	G/B1.23.2
RTVIIQSW	B*57	3329	<i>Heat shock 60kDa protein 1</i>	HSPD1	G/B1.23.2

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
RVFPHEVNW	B*57	2975	<i>General transcription factor III C, polypeptide 1</i>	GTF3C1	G/B1.23.2
RVIDVGSEW	B*57	2959	<i>General transcription factor IIB</i>	GTF2B	G/B1.23.2
RVKSVNLDQW	B*57	60682	<i>SMAP1 protein</i>	SMAP1	G/B1.23.2
RYLTVAAVF	A*24	203068	<i>Tubulin beta 2C</i>	TUBB	Z/W6/32
RYQDIIHSI	A*24	9031	<i>Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B</i>	BAZ1B	Z/W6/32
SAVDFIRTL	k.A.	9263	<i>Serine/threonine-protein kinase 17A</i>	STK17A	G/B1.23.2
SQFGTVTRF	B*15	84365	<i>MKI67 (FHA domain) interacting nucleolar phosphoprotein</i>	MKI67IP	G/B1.23.2
SQRSPSELF	B*15	9967	<i>Thyroid hormone receptor associated protein 3</i>	THRAP3	G/W6/32
SSATDAAIRVW	B*57	10607	<i>Transducin (beta)-like 3</i>	TBL3	G/B1.23.2
STDPSVLGKY	A*01	3280	<i>Hairy and enhancer of split 1 protein</i>	HES1	Z/W6/32
SVSKDHALRLW	B*57	8726	<i>Embryonic ectoderm development protein</i>	EED	G/B1.23.2
SYmGHFDLL	A*24	83443	<i>Splicing factor 3B subunit 5</i>	SF3B5	Z/W6/32
TADHNLLLY	A*01	10607	<i>Transducin (beta)-like 3</i>	TBL3	G/W6/32
TAKISDFSW	B*57	5928/ 5931	<i>Retinoblastoma binding protein 4/7</i>	RBBP4/7	G/B1.23.2
TQMPDPKTF	B*15	51123	<i>Zinc finger protein 706</i>	ZNF706	G/B1.23.2
TSQDVLHSW	B*57	4513	<i>Cytochrome c oxidase subunit II</i>	COX2	G/B1.23.2
TSYRIGDTW	B*57	2335	<i>Fibronectin 1</i>	FN1	G/B1.23.2
TTRELQQYW	B*57	124460	<i>Sorting nexin 20 protein</i>	SNX20	G/B1.23.2
TVKTETISF	B*57	23136	<i>Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3</i>	EPB441L3	G/W6/32
tWKKGPLY	k.A.	2559	<i>Gamma-aminobutyric acid type A receptor alpha 6</i>	GABRA6	G/B1.23.2

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
TYGEIFEKF	A*24	4718	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2</i>	NDUFC2	G/W6/32
TYGEIFEKF	A*24	4718	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 subunit C2</i>	NDUFC2	Z/W6/32
TYLEKAIKI	A*24	7874	<i>Ubiquitin specific peptidase 7</i>	USP7	G/W6/32
VAKKLGEMW	B*57	3146	<i>High mobility group box 1</i>	HMGB1	G/B1.23.2
VAKPNIGENW	B*57	9716	<i>Aquarius homolog</i>	AQR	G/B1.23.2
VGLPAAGKTTW	B*57	11100	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like 1</i>	HNRNPUL1	G/B1.23.2
VLKPNIIISY	B*15	23075	<i>SWAP switching B-cell complex 70kDa subunit</i>	SWAP70	G/W6/32
VMKSLTQTF	B*15	30836	<i>DNTTIP2 protein</i>	DNTTIP2	G/B1.23.2
VQGIFVEKY	B*15	5908	<i>Ras-related protein Rap-1b</i>	RAP1B	G/B1.23.2
VQILIDGKY	B*15	667	<i>Dystonin</i>	DST	G/B1.23.2
VQKAIPMY	B*15	529	<i>V-type proton ATPase subunit E 1</i>	ATP6V1E1	G/B1.23.2
VSAEGVLHVW	B*57	3459	<i>Interferon gamma receptor 1</i>	IFNGR1	G/B1.23.2
VSDSGAHVLNW	B*57	55726	<i>Cell cycle regulator Mat89Bb homolog</i>	ASUN	G/B1.23.2
VSKPDLITW	B*57	168374	<i>Zinc finger protein 92</i>	ZNF92	G/B1.23.2
VTELHVISY	A*01	57674	<i>Ring finger protein 213</i>	RNF213	G/W6/32
VTELHVISY	A*01	57674	<i>Ring finger protein 213</i>	RNF213	Z/W6/32
VTKKTYEIW	B*57	1108	<i>Chromodomain helicase DNA binding protein 4</i>	CHD4	G/B1.23.2
VYAQVARLF	A*24	25942	<i>Transcriptional co-repressor Sin3A</i>	SIN3A	Z/W6/32
VYGFMMMLVL	A*24	56889	<i>Transmembrane 9 superfamily member 3 protein</i>	TM9SF3	Z/W6/32
VYIHFDRI	A*24	126308	<i>MOB kinase activator 3A</i>	MOB3A	Z/W6/32
VYIKHPVSL	A*24	441806	<i>Proteasome 26S subunit</i>	LOC441806	G/W6/32

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
VYVQHPITF	A*24	9516	<i>Lipopolysaccharide-induced TNF factor</i>	LITAF	G/B1.23.2
VYVQHPITF	A*24	9516	<i>Lipopolysaccharide-induced TNF factor</i>	LITAF	G/W6/32
VYVQHPITF	A*24	9516	<i>Lipopolysaccharide-induced TNF factor</i>	LITAF	Z/W6/32
VYVQNVVKL	A*24	8943	<i>AP3D1 protein</i>	AP3D1	Z/W6/32
VYVVGTAHF	A*24	80305	<i>TRABD protein</i>	TRABD	Z/W6/32
YADPVNAHY	A*01	9991	<i>Regulator of differentiation 1</i>	PTBP1	G/W6/32
YADPVNAHY	A*01	9991	<i>Regulator of differentiation 1</i>	PTBP1	Z/W6/32
YIDEQFERY	A*01	4753	<i>Septin 2</i>	SEPT2	Z/W6/32
YLDDPDLKY	A*01	1786	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase</i>	DNMT1	G/W6/32
YLDDPDLKY	A*01	1786	<i>DNA (cytosine-5)-methyltransferase</i>	DNMT1	Z/W6/32
YLEQLHQLY	A*01	6774	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>	STAT3	Z/W6/32
YLNEKAVSY	B*15	8301	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>	PICALM	G/B1.23.2
YLNEKAVSY	B*15	8301	<i>Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein</i>	PICALM	G/W6/32
YNRVNLT	k.A.	3909	<i>Laminin alpha 3</i>	LAMA3	G/B1.23.2
YQFTGIKKY	B*15	84833	<i>Up-regulated during skeletal muscle growth protein 5</i>	USMG5	G/B1.23.2
YQVGINQRF	B*15	55917	<i>CTTNBP2 N-terminal like</i>	CTTNBP2NL	G/B1.23.2
YRPGTVAL	k.A.	3020	<i>H3 histone</i>	H3F3A	G/B1.23.2
YSEYPPFSHRY	A*01	51669	<i>Transmembrane protein 66</i>	TMEM66	Z/W6/32
YTDFDGTRVY	A*01	11040	<i>Serine/threonine-protein kinase pim-2</i>	PIM2	Z/W6/32
YTDNLVRVW	B*57	10399	<i>Guanine nucleotide binding protein beta polypeptide 2-like 1</i>	GNB2L1	G/B1.23.2

Sequenz	HLA	Gene ID	Quellprotein	Abkürzung	Probe
YYIFPSKF	A*24	51202	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 47</i>	DDX47	Z/W6/32
YYLNDLERI	A*24	2771	<i>Guanine nucleotide binding protein alpha inhibiting activity polypeptide 2</i>	GNAI2	Z/W6/32

3.3.4.2 Isolierung von Cortexgewebe mittels Laser-Mikrodissektion und nachfolgende Bestimmung HLA-Klasse-I-präsentierter Peptide mit Hilfe der Massenspektrometrie

Die Isolierung und Charakterisierung von HLA-gebundenen Peptiden aus verschiedenen, nur mikroskopisch unterscheidbaren Kompartimenten eines Organs ist methodisch weiterhin eine experimentelle Herausforderung. Obwohl technische Fortschritte in der massenspektrometrischen Analyse in den letzten Jahren zu einer verbesserten Sensitivität in der Detektion und Bestimmung von Proteinen und Peptiden geführt haben, sind für zufriedenstellende Ergebnisse in der Charakterisierung von HLA-gebundenen Peptiden im Allgemeinen Zellzahlen in einer Größenordnung von mindestens 1×10^8 notwendig, vorausgesetzt die Zellen exprimieren durchschnittliche Mengen an Peptid:HLA-Komplexen (Prof. Stefan Stevanović, persönliche Kommunikation). Eine Herausforderung bestand deshalb in der Gewinnung ausreichender Gewebemengen. Dabei musste darauf geachtet werden, dass die nativen Peptid:HLA-Komplexe in ihrer Struktur erhalten blieben, um für die spätere Immunaffinitätsaufreinigung die notwendige Bindung spezifischer Anti-HLA-Antikörper noch zu ermöglichen. Standardprotokolle für die Vorbereitung von Gefrierschnitten für die Laser-Mikrodissektion, auch für die Kombination mit der Massenspektrometrie in der *Proteomics*-Forschung, sehen eine Dehydrierung des Gewebes mit Ethanol, zusätzlich eventuell Xylol, vor (u.a. Mustafa et al., 2008). Für den Erhalt der nativen Peptid:HLA-Komplexe wurde in dieser Arbeit von diesen Protokollen zugunsten schonenderer Methoden abgewichen.

Am Kryotom wurden relativ dicke Gefrierschnitte von 20 μm auf die PEN-beschichteten Objektträger aufgezogen. Auf eine Alkoholfixierung des Gewebes wurde verzichtet, um eine Denaturierung zu vermeiden und um die Solubilisierung der Dissektate während der Affinitätschromatographie zu erleichtern. Die unter Proteaseinhibition durchgeführte Hämalaunfärbung führte nicht zur Abschwemmung des Gewebes von den PEN-Folien. Direkt anschließend wurde eine Gefriertrocknung der Schnitte durchgeführt. Diese Methode wurde als schonendere Alternative zur Alkoholdenaturierung gewählt. Die Aufbewahrung in Trockenvakuum bis zur Laser-Mikrodissektion sollte eine erneute Anfeuchtung und die damit einhergehenden Aktivierung von Proteasen verhindern. Am LMPC-Gerät war die Unterscheidung zwischen Cortex und Medulla auch ohne spezifische immunhistochemische Anfärbung aufgrund der deutlich erkennbaren höheren Zelldichte im Cortex ausreichend möglich. Bei optimierter Laser-Einstellung ließ sich der selektierte Gewebeausschnitt bei der

gewählten Schnittdicke in das Eppendorf-Gefäß katapultieren, allerdings mussten medulläre Areale in der Regel mehrfach in kleinere Stücke unterteilt werden, um das Gewebe sicher ins Sammelbehältnis zu befördern. Das nach theoretischer Berechnung einer ausreichenden Zellzahl formulierte Ziel, ein Gewebestück von etwa 130 mm^3 in Medulla und (auf der PEN-Folie verbleibenden) Cortex aufzuteilen, war einer Hochrechnung nach erst nach einigen Wochen, wenn nicht Monaten der täglichen Dissektion zu erreichen. Deswegen entschieden wir uns für ein Vorexperiment, das nicht die zeitintensive Sammlung von medullärem Gewebe, sondern nur dessen Entfernung aus Thymusschnitten vorsah. Dabei wurden medulläre Areale mit der Laser-Mikrodissektion ausgeschnitten und durch zugefächerte Luft oder Invertieren des Objektträgers vom restlichen Gewebe entfernt. Die Ablösung war leicht möglich und konnte bereits makroskopisch gesichtet werden. Mikroskopisch wurde durch Abgleich mit den gespeicherten Schnittbahnen die vollständige Entfernung aller medullären Areale bestätigt. Die im Schnitt verbliebenen kortikalen Anteile wurden durch Abtragung der PEN-Folie in Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur massenspektrometrischen Analyse tiefgefroren.

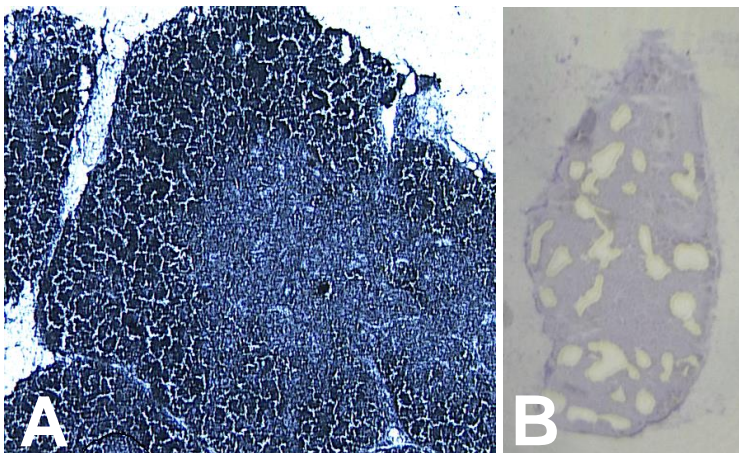


Abb. 30: Lyophilisiertes Thymusgewebe in der LMPC-Bearbeitung

(A) Nach der Gefriertrocknung waren, auch bei relativ dicken Schnitten von $20 \mu\text{m}$, Mark und Rinde mikroskopisch deutlich voneinander abgrenzbar. Vergrößerung 20x. (B) Makroskopische Ansicht eines Gewebeschnitts nach Entfernung medullärer Anteile.

Die massenspektrometrische Analyse der extrahierten Peptid:HLA-Komplexe bzw. der isolierten Peptide lieferte kein optimales Ergebnis. Es wurde kein Motivpeptid sequenziert und nur sehr wenige Ergebnisse erreichten einen befriedigend hohen IonScore über 30, der eine Unterscheidung von Artefakten und Hintergrundsignalen ermöglichte. Die isolierten Peptide der Eluate der B1.23.2-Säule und der W6/32.HL-Säule unterschieden sich kaum im Ergebnis. Bei den sequenzierten Peptiden handelt es sich zum größten Teil um Artefakte. Da von den isolierten Thymozyten durchaus HLA-Peptide definiert werden konnten, ließ sich daraus nur schließen, dass das beschriebene Vorgehen keinen erfolgreichen Weg darstellte, die Laser-Mikrodissektion zur HLA-Peptid-Isolierung mit nachfolgender massenspektrometrischer Analytik verwenden zu können. Wir gehen davon aus, dass ein kritischer Schritt in der Entwässerung des Gewebes bestand, der zur Denaturierung von Peptid:HLA-Komplexen und damit zum Verlust der Peptide aus der Verankerung führte. Die Bindung an spezifische HLA-Antikörper in der Affinitätssäule ist dann unmöglich. Prinzipiell bestand mit der Gefriertrocknung unter Optimalbedingungen die Möglichkeit zur Erhaltung der nativen dreidimensionalen Proteinstruktur. Eine derartige Optimierung des gesamten Prozedere, das wiederholte Testungen verschiedener Bedingungen erforderte, war in dieser Studie nicht zu erreichen. So konnte vor allem auf Trocknung oder Dehydrierung in Anbetracht der zu sammelnden Gewebemenge bei dem vorhandenen Laserdissektionsgerät mit Katapultieren zur Probengewinnung nicht verzichtet werden. Das Katapultieren erfolgte beim PALM® MicroBeam-System entgegen der Schwerkraft und wurde durch Gewichtsverlust des Gewebes infolge von Wasserentzug erleichtert. Bei Konkurrenzfirmen erfolgt das Sammeln des Gewebes mit der Schwerkraft oder zum Beispiel über ein Ankleben des ausgewählten Gewebes an Trägermaterialien. Solche Systeme sind für den hier gewünschten Zweck möglicherweise besser geeignet, weil große Gewebemengen je nach Gerät auch unter Verzicht auf Entwässerung gesammelt werden können.

4 Diskussion

Als Hauptinteraktionspartner von TCRs reifender Thymozyten sind HLA-Komplexe im humanen Thymus sowohl für die positive Selektion im Cortex, als auch für die negative Selektion in der Medulla von zentraler Bedeutung. Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse liefern deutliche Hinweise dafür, dass sich kortikale HLA-Komplexe nicht nur quantitativ, sondern auch strukturell von solchen in der Medulla unterscheiden. Peptidabhängige HLA-Antikörper mit Spezifität für die Bw4-Determinante zeigten regelhaft eine stark reduzierte oder sogar nicht mehr nachweisbare Reaktivität mit kortikalen HLA-Komplexen, während solche aus der Medulla gebunden werden konnten. Immunhistochemische und durchflusszytometrische Analysen ließen darauf schließen, dass die HLA-Komplexe von cTECs und von kortikalen Thymozyten für diese Antikörper keine oder schlecht bindende Liganden darstellten, während ihre grundsätzliche Präsenz durch die Bindung anderer HLA-spezifischer Reagenzien demonstriert werden konnte. Forschungsergebnisse der letzten Jahre zeigten auf, dass Peptide für die HLA-gebundene Präsentation im Cortex durch besondere Prozessierungsmechanismen generiert werden. Dies führte zur Hypothese der Bildung Cortex-spezifischer, möglicherweise sogar Peptid-freier HLA-Komplexe (Murata et al., 2007; Tomaru et al., 2009; Ziegler et al., 2009). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit untermauern solche Vorstellungen und stützen sich dabei auch auf eingehende Antikörper-Charakterisierungen anderer Arbeitsgruppen (unter anderen Rehm et al., 2000; Takamiya et al., 1996). Somit könnte im Cortex nicht nur eine besondere Enzymausstattung für die Antigenprozessierung von HLA-Peptidliganden, sondern auch eine abweichende Struktur der präsentierten Peptid:HLA-Komplexe im Vergleich zu denjenigen in der Medulla vorliegen. Dies würde Unterstützung für eine Selektion der Thymozyten nach dem *altered-ligand*-Modell (Marrack & Kappler, 1987) zur Generierung eines immunkompetenten und selbsttoleranten T-Zell-Repertoire im humanen Thymus liefern.

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Analyse von HLA-B:Peptid-Komplexen mit Hilfe von Immunperoxidase- und Immunfluoreszenzdoppelmarkierungen von humanem Thymusgewebe unter Verwendung HLA-spezifischer Antikörper, deren Spezifität und Bindungseigenschaften genau charakterisiert worden war. Während HLA-B-Komplexe in den beiden großen Kompartimenten des Organs, Medulla und Cortex, durch die Markierung mit verschiedenen polymorphen und monomorphen Antikörpern, darunter ein Anti-HLA-B13-Antikörper (Tü161) und ein Anti-HLA-B27-Antikörper (ME1), bei entsprechendem Genotyp nachgewiesen werden konnten, war die Bindung von Antikörpern mit Spezifität für die HLA-

Bw4-Determinante hauptsächlich auf das medulläre Kompartiment beschränkt. Die beobachtete vollständig fehlende oder herabgesetzte Bindung an kortikale HLA-B-Komplexe war am ehesten durch eine veränderte Struktur oder Konformation dieser Moleküle unter Einbeziehung der antigenen Determinante der Bw4-spezifischen Antikörper erklärbar. Am deutlichsten war dieses Phänomen bei cTECs auszumachen, doch auch die zusätzlich durchflusszytometrisch analysierten kortikalen Thymozyten wiesen HLA-B-Komplexe mit dieser Eigenschaft auf. Antikörper-Charakterisierungsstudien anderer Arbeitsgruppen hatten ergeben, dass die eingesetzten Bw4-spezifischen Antikörper in ihrer Bindung an HLA-Komplexe peptidabhängig waren. Im Extremfall von Peptid-freien HLA-Komplexen banden sie schwächer oder gar nicht (Rehm et al., 2000; Takamiya et al., 1996). Die Isolierung vornehmlich kortikaler CD1-positiver, meist HLA-Bw4-negativer Thymozyten aus Thymusgewebe ermöglichte eine nähere Untersuchung der exprimierten Peptid:HLA-Komplexe durch eine immunaffinitätschromatographische Aufreinigung und nachfolgende massenspektrometrische Analyse der gelösten Peptide. Die Ergebnisse dieses Teils der Arbeit untermauern die Hypothese, dass diese Zellen HLA-B-Komplexe mit instabil gebundenen Peptiden tragen.

4.1 Verteilung von HLA-Klasse-I-Molekülen in Cortex und Medulla des humanen Thymus

HLA-Klasse-I-Produkte, wie sie in Gewebeschnitten mit spezifischen monoklonalen Antikörpern nachgewiesen werden können, finden sich im Thymus nahezu auf allen Zellen, jedoch mit deutlichen quantitativen Unterschieden. Während im Thymusmark HLA-Moleküle auf allen Zellen sehr stark exprimiert werden, scheint der Cortex ein Kompartiment mit verhältnismäßig reduzierter HLA-Expression zu sein. Es wurde vermutet, dass die unterschiedlichen HLA-Expressionsstärken von kortikalen und medullären Zelltypen zur Generierung unterschiedlicher Schwellenwerte der TCR-Aviditäten für positive bzw. negative Selektion beisteuern (Delaney et al., 1998).

Immunhistochemische Studien zur Distribution von HLA-Molekülen im Thymus wurden bereits in den 1980er Jahren publiziert (Rouse et al., 1982; Müller et al., 1983). Da die Ergebnisse mit verschiedenen Protokollen und Antikörpern variieren könnten, wurden auch mitunter bereits bekannte Färbungen - zur besseren Vergleichbarkeit mit eigenen neuen Färbungen - wiederholt. Immunhistochemische Markierungen mit dem Pan-HLA-Klasse-I-Antikörper W6/32.HL zeigten eine alle Zellen betreffende, starke Anfärbung in der Medulla,

während das Schnittbild des Cortex auf deutliche Variationen in der zellulären HLA-Klasse-I-Expressionstärke hinwies. Für die Subpopulation der DP-Thymozyten im Cortex war im Vergleich zu medullären Zellen von einer reduzierten Expression der HLA-Klasse-I-Moleküle berichtet worden (Kovalev et al., 1999; Blue et al., 1989). Im Schnittbild der Immunperoxidase-/Immunfluoreszenzfärbung zeigten sie sich in dieser Arbeit als schwach angefärbte oder sogar negative, grüppchenweise zwischen den Epithelzellen gelagerte Zellen. In der sensitiveren durchflusszytometrischen Analyse wiesen alle isolierten kortikalen CD1-positiven Thymozyten eine Expression von HLA-Klasse-I-Komplexen auf. Wie histologisch in der Immunperoxidasefärbung deutlich wurde, exprimierten cTECs deutlich mehr HLA-Klasse-I-Moleküle als Thymozyten. Entgegen früheren Beschreibungen war allerdings ihre Expression von HLA/MHC-Klasse-I-Produkten im Vergleich zu mTECs und medullären DCs nicht reduziert (Yang et al., 2006; Delaney et al., 1998). Vielmehr erschienen cTECs nach Reaktion mit dem Antikörper W6/32.HL ebenso intensiv HLA-Klasse-I-positiv zu sein wie die Zellen der Medulla.

Mit den Antikörpern TH4, Tü161 und ME1 wurde vergleichend die Verteilung von HLA-B-assoziierten polymorphen und monomorphen HLA-Klasse-I-Epitopen im Thymus untersucht, um damit auf Heterogenität und Distribution von HLA-B:Peptid-Komplexen schließen zu können. Der Antikörper TH4 erkennt ein gemeinsames Epitop von HLA-B- und HLA-C-Molekülen ähnlich wie das monoklonale Reagenz 4E (Müller CA, persönliche Mitteilung, Yang et al., 1984; Knittler et al., 1999). Als Antikörper für ein monomorphes HLA-B-Epitop erkannte TH4 damit beide vom jeweiligen Gewebe exprimierten HLA-B-Serotypen, sodass die resultierende Reaktionsstärke mit der von Anti-Bw4-Antikörpern in Bw4-homozygoten Geweben verglichen werden konnte. Die Reaktion des Antikörpers mit HLA-C-Antigenen erschien vernachlässigbar zu sein, da die HLA-B-Expression im Gewebe diejenige von HLA-C nach früheren Berichten um das Zehnfache übersteigt (Lawlor et al., 1990). Tü161 und ME1 sind Antikörper mit Spezifität für polymorphe Epitope der HLA-B13- bzw. HLA-B27-Moleküle. Mit allen drei genannten Antikörpern wurde die Präsenz und Struktur von HLA-B-Molekülen in Cortex und Medulla untersucht. Dazu erfolgte für die Bindung von Tü161 und ME1 die Auswahl von Gewebe mit passendem HLA-B-Genotyp. Im Cortex wurde eine retikuläre Felderung beobachtet, wobei das kortikale Färbungsmuster von ME1 bereits beschrieben worden war (Rehm et al., 2000; Müller et al., 1983). Eine starke Färbung korrelierte im Wesentlichen mit der Verteilung von cTECs, während schwächere Reaktionen auf Thymozyten zu finden waren.

4.2 Peptidabhängige HLA-Bw4-spezifische Antikörper binden im Cortex kaum an ihr Epitop

HLA-gebundene Peptide stellen nicht nur antigene Zielstrukturen von TCRs dar, sie bedingen auch die Heterogenität von HLA:Peptid-Komplexen einer HLA-Spezifität und führen so vermutlich zur variablen Bindung von definierten monoklonalen HLA-spezifischen Antikörpern. Die Peptide sind über ihre Ankerresiduen tief im Peptidbindungsspalt des HLA-Moleküls fixiert, während andere Seitenketten an die Oberfläche ragen können (Falk et al., 1991; Madden et al., 1992). Peptidabhängige HLA-Antikörper können für ihre Bindung auf solche exponierten Peptidseitenketten als Bestandteil ihres Epitops direkt angewiesen sein und damit Aufschluss über die Expression und Verteilung von HLA-Komplexen mit spezifischer Peptidbeladung geben. Alternativ könnten manche Peptide durch ihre Verankerung oder Struktur serologische Determinanten an der Oberfläche der schweren Kette beeinflussen (Zhang et al., 1996), und so die Bindung von HLA-spezifischen Antikörpern indirekt modulieren. Die Peptidabhängigkeit der in dieser Arbeit eingesetzten Bw4-spezifischen Antikörper war in verschiedenen Studien bereits untersucht und gezeigt worden. An HLA-B27-positiven, TAP-defizienten Zellen wurde gezeigt, dass MARB3 und MARB7 Peptid-freie Komplexe überhaupt nicht binden konnten (Rehm et al., 2000). Studien mit HLA-B51- und HLA-B44-Komplexen zeigten, dass Tü48 und Tü109 ohne HLA-gebundenes Peptid deutlich reduzierte Reaktivitäten aufwiesen, wobei Tü109 stärker als Tü48 peptidabhängig reagierte (Tan et al., 2002; Takamiya et al., 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Bw4-spezifischen Antikörper erstmalig für die Analyse humanen Thymusgewebes eingesetzt. Die Thymi waren HLA-typisiert und Kindern mit einheitlich frühkindlichem Alter unter vier Jahren entnommen worden. Die immunhistochemische Markierung von zwölf Bw4-positiven Thymusproben zeigte, dass die Antikörper kaum an HLA-B-Komplexe im Cortex banden, teilweise war kortikal überhaupt keine Reaktion nachweisbar. Im Kontrast dazu stand die deutliche Markierung medullärer HLA-B-Komplexe in den Schnittbildern. Hier stimmte die Markierung der Bw4-spezifischen Antikörper mit dem regionalen Verteilungsmuster der Antikörper überein, die ein gemeinsames HLA-B-Epitop (TH4) oder nur bestimmte HLA-B-Spezifitäten (Tü161, ME1) erkannten, war jedoch in der Färbungsintensität häufig weniger kräftig. Die HLA-B-Genotypen der verschiedenen untersuchten Thymusproben repräsentierten etwa 50 % der häufigen, in Tabelle 1 aufgelisteten HLA-B-Spezifitäten. Die hierunter vertretenen Serotypen HLA-B13 und HLA-B27 gehören zu den häufigsten in Deutschland. So tragen ca. 15 % der

Bevölkerung mindestens eines dieser Allele (IMGT/HLA-Database, Robinson et al., 2013).

HLA-B13- und HLA-B27-Moleküle wurden mit spezifischen polymorphen monoklonalen Reagenzien detektiert, die in verschiedenen Vorarbeiten in ihrer Spezifität eindeutig definiert worden waren, sodass bei geeigneter Typisierung eine ausschließliche Markierung dieser Antigene erfolgen konnte. Im Vergleich zur Reaktivität der Antikörper TH4 und W6/32.HL konnte daher eine noch selektivere Bindung erwartet werden, mit der sich die Verteilung von HLA-B13- bzw. -B27-Komplexen darstellen ließ.

Am Bw4-heterozygoten, B13-positiven Thymus T375 blieb eine Reaktivität des Antikörpers MARB7 aus. Diesem Reaktionsmuster lag eine molekulare Variation in der Aminosäuresequenz der $\alpha 2$ -Domäne des HLA-B13-Moleküls selbst zugrunde. An Position 145 unterscheidet sich HLA-B13 von anderen HLA-B-Molekülen durch die Substitution der Aminosäure Arginin mit Leucin. Hierdurch wird eine Bindung von MARB7 an das Molekül verhindert (Ziegler A, Berlin, persönliche Mitteilung). Da die Aminosäureposition 145 selbst nicht Teil der Bw4-Determinante ist, könnte eine Änderung der dreidimensionalen Molekülstruktur der schweren Kette für dieses Phänomen verantwortlich sein.

Zwei weitere, Bw4-homozygote Thymi exprimierten zusätzlich ein Bw4-positives HLA-A-Allel, was zu einer Steigerung der kortikalen Anfärbung bei Verwendung der Antikörper Tü48 und MARB3 führte. Die Antikörper Tü109 und MARB7, die nicht mit HLA-A-Komplexen reagierten, zeigten diese verstärkte Markierung im Cortex nicht. Dies ließ darauf schließen, dass die Ergebnisse von Bw4-positiven HLA-B-Molekülen nicht ohne Weiteres auf Bw4- positive HLA-A-Komplexe übertragbar waren. Für diese Beobachtungen sind verschiedene Ursachen denkbar: Kortikale HLA-A-Komplexe könnten quantitativ stärker als HLA-B-Komplexe exprimiert werden oder eine Struktur aufweisen, die eine stärkere Bindung der Bw4-spezifischen Antikörper begünstigt. Außerdem könnte eine Bindung der Bw4-spezifischen Antikörper an HLA-A-Komplexe weniger peptidabhängig erfolgen. Um diesbezüglich weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurde der HLA-A2- positive Thymus S2594 mit dem HLA-A2-spezifischen Antikörper Tü160 markiert und mit HLA-B13- und HLA-B27- spezifischen Färbungen verglichen. In Hinblick auf Verteilung und Färbungsintensität waren die Markierungen vergleichbar, sodass eine erhebliche Mehrexpression von HLA-A-Molekülen nicht wahrscheinlich erschien. Obwohl HLA-Locus-spezifische Genexpressionsanalysen an Thymusgewebe noch nicht publiziert wurden, war eine differentielle Expression von HLA-A- und HLA-B-Antigenen, ähnlich wie sie in verschiedenen anderen Normalgeweben berichtet worden war (Garcia-Ruano et al., 2010), dennoch nicht völlig ausgeschlossen. Zur isolierten Betrachtung Bw4-markierter HLA-A-

Moleküle wurde daher der Thymus S2598 als Bw6-homozygotes Gewebe ausgewählt, das ein Bw4-positives HLA-A-Allel exprimiert. MARB7 und Tü109, die nach früheren Berichten generell nicht an HLA-A-Komplexe banden, zeigten keine Reaktion an den entsprechenden Gewebeschnitten (Seitz, 2003; Rehm et al., 2000; Müller et al., 1985). Auch die durchflusszytometrische Analyse von isolierten Thymozyten aus diesem Thymus ergab keine Bindungsaktivität dieser Antikörper. Mit Tü48 und MARB3 markierte Bw4-positiv HLA-A-Komplexe wurden aber auf medullären und kortikalen Zellen detektiert. Sie glichen in Verbreitung und Intensität der Markierung derjenigen von HLA-B-spezifischen Färbungen, waren jedoch durch eine vermehrte Nachweisbarkeit des Bw4-Epitops im Cortex gekennzeichnet. In dieser Hinsicht lassen sich die primär an HLA-B-Komplexen beobachteten Befunde nicht ohne Weiteres auf HLA-A-Komplexe übertragen.

4.3 Identifikation von Zelltypen mit irregulären HLA-B-Komplexen

Zur Bestimmung einzelner kortikaler und medullärer Zelltypen und ihrer Bw4-Positivität wurden Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen Zellmarker und HLA-Moleküle durchgeführt. Auf die Präsenz von HLA-B-Komplexen wurde geschlossen, wenn sich HLA-B-Komplexe auf der Zelloberfläche mit polymorphen Allel-spezifischen und/oder monomorphen HLA-B-spezifischen Antikörpern detektieren ließen, auch wenn eine Reaktion mit Bw4-spezifischen Antikörpern ausblieb. In der immunhistochemischen Analyse zeigte sich dieses Markierungsmuster an cTECs besonders augenfällig. Während epitheliale Antigene von cTECs mit den Antikörpern TE-3 und Tü106 erfasst wurden und im Cortex zu HLA-B-Komplexen koexprimiert waren, führte die Markierung mit den Bw4-spezifischen Antikörpern nicht zur Anfärbung dieser Zellen in der kortikalen Lappchenperipherie. In der kortikomedullären Grenzregion und in der Medulla wurden dagegen Bw4-markierte TE-3-positiv Zellen nachgewiesen. Da TE-3 außer cTECs keine epithelialen Zellen markiert, handelte es sich hier höchstwahrscheinlich um Zelltypen hämatopoetischen Ursprungs, die der Antikörper gemäß seiner Erstcharakterisierung zusätzlich bindet (McFarland et al., 1984). Eine wichtige Rolle von cTECs in der positiven Selektion von reifenden Thymozyten, insbesondere durch die Bereitstellung von HLA-Komplexen als TCR-Liganden, wird durch eine Vielzahl von Studien in Tiermodellen begründet. In den letzten Jahren wurde ihre Bedeutung für die positive Selektion durch die Entdeckung exklusiver Antigenprozessierungsmechanismen weiter untermauert (Murata et al., 2007; Jameson et al.,

1995; Anderson et al., 1994). Obwohl es bisher keinen direkten Beweis gibt, könnte die Ausstattung mit besonderen Prozessierungsenzymen, wie dem Thymoproteasom, einen Einfluss auf die Peptidbeladung und die antigenen Eigenschaften der HLA-Komplexe dieser Zellen besitzen. Bei Anwendung von Antikörpern mit TCR-ähnlichen Bindungseigenschaften zeigten sich immunhistochemische Expressionsunterschiede der kortikalen Zellen in Thymi von $\beta 5t$ -defizienten und Wildtyp-Mäusen (Nitta et al., 2010).

Im Schnittbild der immunhistochemischen Analysen dieser Arbeit zeigte sich eine Subpopulation kortikaler Thymozyten, die bei HLA-B-spezifischer Färbung markiert wurde, jedoch bei Bw4-spezifischer Markierung annähernd negativ blieb. Vergleichbares wurde in einer anderen Studie an Thymi von HLA-B27-transgenen Ratten beschrieben, bei der die Antikörper MARB3 und MARB7 eingesetzt wurden (Rehm et al., 2000). Da Thymozyten in das feinmaschige Netzwerk von cTECs und anderen Stromazellen im Cortex eingebettet sind und mit diesen Zellen in engem Kontakt stehen (Sanos et al., 2011), war es prinzipiell möglich, dass Thymozyten selbst kaum HLA-B-Komplexe exprimierten, jedoch durch die direkte Nähe zu HLA-B-positiven Stromazellen ebenfalls positiv markiert erschienen. Kortikale Thymozyten waren bereits früher als Zellen mit schwacher HLA-Klasse-I-Expression beschrieben worden (Zachow & Orr, 1989).

In dieser Studie konnte nach Isolierung der Thymozyten aus dem Gewebe eine anschließende durchflusszytometrische Analyse an einzelnen Zellen mit vergleichender Markierung mit HLA-B- und Bw4-spezifischen Antikörpern ohne den Einfluss der umgebenden Stromazellen durchgeführt werden. Zur Differenzierung zwischen kortikalen und medullären Thymozyten wurde der Marker CD1a eingesetzt. Nach Angaben in der Literatur handelte es sich bei CD1a-positiven Zellen überwiegend um unreife DP-Thymozyten aus dem Cortex (Kaymaz et al., 2003; Leong et al., 2003). CD1a-negative Zellen repräsentierten erwartungsgemäß überwiegend reife SP-Thymozyten, die bevorzugt in der Medulla vorkamen (siehe Kapitel 2.10.3). Auf der Zelloberfläche CD1a-positiver (kortikaler) Thymozyten wurden sehr viel höhere Fluoreszenzintensitäten bei Markierung mit dem Anti-HLA-B-Antikörper TH4 als bei Testung mit Bw4-spezifischen Reagenzien gemessen. Das Bw4-spezifische Fluoreszenzsignal auf CD1a-negativen (medullären Zellen) war gegenüber demjenigen CD1-positiver (kortikaler) Zellen deutlich höher und entsprach damit den Ergebnissen der immunhistochemischen Färbungen.

Dieser Befund legte damit nahe, dass kortikale Thymozyten im Vergleich zu medullären Zellen unterschiedliche HLA-B-Komplexe aufwiesen, die in der räumlichen Struktur des Bw4-Epitops differierten. Die Thymozyten wurden für diese Studien ohne enzymatischen

Verdau lediglich durch Ausspülen aus dem Gewebe mit Medium isoliert und sofort nach ihrer Freisetzung untersucht, sodass in Bezug auf ihre HLA-Expression artifizielle Veränderungen weitestgehend reduziert bzw. ausgeschlossen erschienen. Allerdings musste für die Bewertung der HLA-Bw4-Positivität im Vergleich zur Expression von HLA-B-Molekülen eine HLA-Typisierung durchgeführt werden, deren Ergebnis erst nachträglich nach der durchflusszytometrischen Analyse zur Verfügung stand. Somit konnten erst retrospektiv diejenigen Thymusproben definiert werden, die sich aufgrund ihrer Homozygotie für Bw4-positive HLA-B-Moleküle für weitere Analysen in dieser Studie eigneten. Bw6-homozygote Gewebe oder Bw4-heterozygote Gewebe waren hier für einen Vergleich zwischen den Markierungen von Bw4-spezifischen Antikörpern mit allgemeinen HLA-B-Markern nicht verwendbar, weil zu erwarten war, dass der Antikörper TH4 bei diesen Proben Bw4- wie auch Bw6-positive HLA-B-Moleküle erkennen konnte und damit die selektive Beurteilung der Bw4-positiven HLA-Komplexe unmöglich machte. Nach bekannten HLA-Frequenzen bei Kaukasiern konnte man davon ausgehen, dass nur bei ca. 30-35 % gesunder Individuen Bw4-Homozygotie vorliegen würde. Inwieweit bei den aus der klinischen Versorgung erhaltenen Thymusproben eine Präselektion stattfand, konnte nicht beurteilt werden. Der Thymus S2594 zählte zu den wenigen Bw4-homozygoten Thymi. Für eine garantierte Repräsentativität der getesteten Proben ist eine größer angelegte Studie mit weiteren Bw4-homozygoten Thymi notwendig. Es kann jedoch festgestellt werden, dass bei Verwendung mit geeignetem Thymusgewebe eine durchflusszytometrische Bestätigung der immunhistochemischen Befunde erfolgt ist, wonach das Bw4-Epitop von HLA-B-Komplexen isolierter kortikaler Thymozyten ähnlich schwer zugänglich für die Bw4-spezifische Antikörper war wie auf cTECs. Im direkten Vergleich dazu zeigten dagegen CD1-negative, und damit überwiegend medulläre Zellen eine ähnlich starke Bindung zu Anti-Bw4-Antikörpern wie zu HLA-B/Klasse-I-Reagenzien mit Spezifität für monomorphe Epitope (TH4, W6/32.HL).

Mehrere frühere Studien wiesen darauf hin, dass neben cTECs auch hämatopoetische Zellen, wenn auch weniger effizient, an der Vermittlung der positiven Selektion beteiligt sein könnten (Zinkernagel & Althage, 1999; Bix & Raulet, 1992). Auch eine Peptid:HLA-Komplex-TCR-Interaktion zwischen den Thymozyten selbst wurde als unabhängiger Mechanismus in der positiven Selektion und Reifung CD4-positiver T-Zellen beschrieben (Choi et al., 2005). Es ist daher theoretisch denkbar, dass HLA-/MHC-Klasse-I-abhängige Interaktionen von Thymozyten untereinander einen Alternativweg zur positiven Selektion durch cTECs darstellen könnten. Offen ist auch, ob bei der Selektion und Generierung von verschiedenen

T-Zell-Subpopulationen Unterschiede in der „Feinstruktur“ spezifischer Determinanten wie Bw4 auf HLA-Klasse-I-Liganden eine Rolle spielen könnten.

4.4 Direkte Charakterisierung HLA-gebundener Peptide auf kortikalen Thymozyten mittels Massenspektrometrie

Über die Spezifität der Anti-Bw4-Antikörper Tü109, MARB3 und MARB7 ist bekannt, dass ihre Bindung an HLA-Komplexe besonders durch die Variation C-terminaler Aminosäuren des gebundenen Peptids beeinflusst wird (Takamiya et al., 1996; Seitz, 2003). Die Eigenschaften von C-Termini werden hauptsächlich durch die katalytische Aktivität von Proteasomen generiert (Sijts & Kloetzel, 2011). Die besondere Proteasom-Untereinheit $\beta 5t$ wird im murinen wie auch im menschlichen Thymus ausschließlich im Cortex exprimiert. Sie soll die Chymotrypsin-artige Funktion des sogenannten Thymoproteasoms reduzieren und so zu einem C-terminal veränderten Peptidpool führen (Murata et al., 2007; Tomaru et al., 2009; Takahama et al., 2012). Zwischen der stark herabgesetzten Bindung von Bw4-spezifischen Antikörpern an HLA-Komplexe im Cortex und der ungewöhnlichen Prozessierung der HLA-Peptidliganden in diesem Kompartiment könnte ein Zusammenhang bestehen.

Der Kontakt mit $\beta 5t$ -positiven cTECs soll die positive Selektion für eine Mehrheit des Repertoires CD8-positiver T-Zellen vermitteln (Nitta et al., 2010). Die in diesen Prozess involvierten HLA-Peptidliganden können derzeit nicht direkt massenspektrometrisch sequenziert werden, da cTECs aus einem Thymus üblicherweise nur in einer weit geringeren Anzahl isoliert werden können, als es die derzeitigen Analysetechniken erfordern (Anderson & Takahama, 2012; Nitta et al., 2010). Hierzu tragen auch der physiologisch geringe Anteil von epithelialen Stromazellen an der Zellmasse im Thymus (unter 1 %), die Verluste von Zellen durch den Isolationsprozess (mehr als 90 %, Gray et al., 2008) und das Fehlen eines spezifischen, membranständigen Markers für cTECs bei.

Die immunhistochemischen und durchflusszytometrischen Untersuchungen hatten aufgezeigt, dass neben den cTECs auch eine größere Subpopulation kortikaler Thymozyten HLA-Komplexe präsentiert, die im Vergleich zu den medullären Zellen und anderen CD1-negativen Zellen veränderte Bw4-negative HLA-B:Peptid-Komplexe exprimierten. Im humanen Thymus war die spezielle $\beta 5t$ -Untereinheit nur bei cTECs und kortikalen DCs beschrieben worden (Tomaru et al., 2009). Es war jedoch andererseits auch denkbar, dass Thymozyten über $\beta 5t$ -unabhängige Prozessierungsmechanismen verfügten, die ähnliche antigene Eigenschaften der präsentierten Peptid:HLA-Komplexe bedingten, wie sie durch das

Thymoproteasom generiert wurden, oder, dass Thymozyten HLA-Peptidliganden von cTECs akquirierten.

Um solche Hypothesen weiter zu überprüfen, wurden HLA-gebundene Peptide aus einem unfraktionierten Gewebestück sowie aus Thymozyten und mikrodissidierten kortikalen Anteilen des gleichen Thymus getrennt voneinander immunaffinitätschromatographisch angereichert, isoliert und massenspektrometrisch analysiert, um die Aminosäuresequenzen der Peptide direkt vergleichen zu können. Theoretisch konnten die sequenzierte Peptidliganden aus dem vollständigen Gewebe von allen im Thymus vorhandenen Zelltypen stammen, wohingegen Peptidsequenzen, die aus den beiden anderen Proben (isolierte Thymozyten, mikrodissidiertes Thymusgewebe) gewonnen wurden, mit hoher Wahrscheinlichkeit Liganden aus kortikalen Thymozyten repräsentierten.

Rund drei Viertel der 160 sequenzierten und verifizierten Peptide konnten publizierten Bindungsmotiven von HLA-A1, -A24, -B15 und B57, entsprechend der HLA-Klasse-I-Typisierung des eingesetzten Gewebes, zugerechnet werden (Kubo et al., 1994; Prilliman et al., 1999; Barber et al., 1997; Rammensee et al., 1999). Zehn Peptide, die übereinstimmend aus dem unfraktionierten Gewebe und aus der Thymozytenprobe gewonnen wurden, besaßen herkömmliche Bindungsmotive mit hydrophoben C-Termini und unauffällige Kettenlängen von 8 bis 10 Aminosäuren. Die Prozessierung durch das β 5t-Proteasom ließ durch eine reduzierte Chymotrypsin-artige Aktivität basische C-Termini der gebundenen HLA-Peptide erwarten (Sijts & Kloetzel, 2011; Nitta et al., 2010; Ziegler et al., 2009). Unter allen sequenzierten Peptiden fanden sich nur fünf Peptide mit basischen C-Termini. Mit Ausnahme eines Peptids handelte es sich allerdings um Fragmente von Keratin- oder HLA-Klasse-I-Molekülen ohne Bindungsmotiv, bei welchen in aller Regel von einem Artefakt ausgegangen werden muss.

Auffällig war, dass weder mit der HLA-B-spezifischen noch mit der danach eingesetzten Pan-HLA-Klasse-I-spezifischen Immunaffinitätssäule HLA-B-gebundene Peptidliganden von Thymozyten isoliert werden konnten. Die Isolierung HLA-A-gebundener Peptide von Thymozyten der gleichen Thymusprobe war dagegen erfolgreich und sogar noch ergiebiger als die Anzahl identifizierter Peptide aus dem unfraktionierten Gewebestück. Es ist möglich, dass dieser Befund lediglich durch methodische Unzulänglichkeiten entstanden ist, zwei Aspekte sprechen jedoch dagegen: Zum einen erfolgte die Kopplung der HLA-B-spezifischen Antikörper an das Trägermaterial der Säulen in einer Probe (mit kontrollierter Effizienz) und die zweite HLA-B-spezifische Säule wurde erfolgreich zur Isolierung von HLA-B-Peptidliganden aus dem unfraktionierten Gewebe verwendet. Zum anderen hätten die nach

dem ersten Durchlauf im Lysat verbliebenen HLA-B-Komplexe mit der zweiten, Pan-HLA-Klasse I-spezifischen Immunaффinitätssäule gebunden werden können. Doch auch mit dieser Säule gelang keine Isolierung von HLA-B-Peptidliganden.

Das Ergebnis beweist zwar nicht die Abwesenheit von Peptiden auf HLA-B-Komplexen, es widerspricht jedoch auch nicht der Hypothese einer Präsentation Peptid-freier HLA-Komplexe durch kortikale Thymozyten. Vorausgesetzt weitere Experimente konsolidieren dieses Ergebnis, so könnten auch kortikale Thymozyten als Kandidaten für die Präsentation außergewöhnlicher HLA-Komplexe in Betracht gezogen werden. Immerhin deuten einige Studien darauf hin, dass nicht nur TECs Vermittler der positiven Selektion sind, sondern auch hämatopoetische Zellen wie Thymozyten einen Beitrag leisten (Zinkernagel & Althage, 1999; Choi et al., 2005).

Im Rahmen der Arbeit wurde versucht, Cortex und Medulla aus Thymusgewebeschnitten mittels Laser-Mikrodissektion getrennt herauszuschneiden und aufzusammeln, um nachfolgend Kompartiment-spezifische HLA-Peptidliganden sequenzieren zu können. Die insgesamt geringe Ausbeute an Peptiden führten wir hauptsächlich auf die Denaturierung der HLA-Komplexe im Rahmen der Vorbereitung des Gewebes auf die Laser-Mikrodissektion zurück. Die Kombination der Laser-Mikrodissektion, die unter Erhalt der nativen Proteinstuktur die Sammlung großer Mengen an Gewebe erlauben würde, mit der Isolierung von HLA-Peptidliganden und deren massenspektrometrische Sequenzierung, würde eine regionspezifische Charakterisierung von HLA-Liganden erlauben, die nicht nur für die Forschung am Thymus interessant wäre, sondern auch bei Krebs- oder Autoimmunerkrankungen eine vielversprechende Anwendungsmöglichkeit finden könnte. In Anbetracht des Potentials dieser Kombinationstechnik sollten weitere Versuche zur Etablierung und Weiterentwicklung dieser Analytik nicht unversucht gelassen werden.

4.5 Mögliche Einflussfaktoren auf die Bindung peptidabhängiger Antikörper an das Bw4-Epitop

Für die unterschiedliche Reaktivität der peptidabhängigen Bw4-spezifischen Antikörper in Cortex und Medulla des Thymus sind verschiedene Erklärungsansätze denkbar. Dazu zählen I.) peptidabhängige oder –unabhängige Konformationsveränderungen der schweren Kette (HC), II.) eine Behinderung der Antikörperbindung durch im Bindungsspalt gebundene oder partiell abgelöste Peptide, sowie III.) die Präsentation Peptid-freier HLA-Komplexe.

Strukturveränderungen von HLA-Komplexen durch eine Dissoziation von β_2 -Mikroglobulin von der schweren Kette führen zur Offenlegung des Epitops des Antikörpers HC-10 und zur Zerstörung der Bindungsdeterminante für W6/32.HL (Perosa et al., 2003; Barnstable et al., 1978). Die Ablösung von β_2 -Mikroglobulin muss dabei nicht zwangsläufig mit einem Verlust des Peptids aus dem Bindungsspalt verbunden sein, da die schwere Kette allein spezifische Peptide ähnlich stark zu binden vermag wie der komplette HC/ β_2 m-Heterodimer-Komplex (Binz et al., 2003). In dieser Studie zeigten die starke Reaktivität von W6/32.HL und die relativ schwache Markierung von HC-10 im Cortex keine Veränderung der HLA-B/C Peptidkomplexe mit Dissoziation von β_2 -Mikroglobulin an.

Schwere Ketten von HLA-Komplexen sollen bei der Verankerung von Peptidliganden durch adaptive Konformationsänderungen eine optimale Anpassung des Peptidbindungsspalts an das zu verankernde Peptid bewirken können (Binz et al., 2003; Madden et al., 1993; Fremont et al., 1992). Obwohl es sich hierbei meist nur um sehr kleine Molekülveränderungen handelt, wäre es potentiell möglich, dass dadurch auch antigene Eigenschaften des HLA-B-Komplexes verändert werden. So könnten ungewöhnliche HLA-Peptidliganden im Cortex indirekt die Integrität des Bw4-Epitops stören.

Für Bw4 als Ligand für NK-Zell-Rezeptoren wurde gezeigt, dass mit Variation der Aminosäuresequenz der HLA-B-gebundenen Peptide die Interaktion zwischen KIR3DL und dem Bw4-Epitop gefördert oder gehemmt werden kann (Fadda et al., 2011; Sanjanwala et al., 2008; Peruzzi et al., 1996). Hier könnten Analogien zur Bindungsspezifität der eingesetzten Bw4-spezifischen Antikörper und ihrer Reaktion im Thymus vorliegen. Die Bw4-Determinante der α 1-Helix liegt in enger Nachbarschaft zum C-Terminus des Peptids und der *F-pocket* des Peptidbindungsspalts. Es ist daher denkbar, dass sowohl exponierte Seitenketten des Peptids als auch die Konformation des Peptid-Rückgrats im Bindungsspalt die Zugänglichkeit des Bw4-Epitops beeinflussen könnten. Ebenso plausibel kann angenommen werden, dass C-terminal abgelöste Peptide, wie sie von Ziegler et al. (2009) bei HLA-B-

Komplexen beschrieben wurden, mit der Antikörperbindung interferieren könnten.

Auch eine überdurchschnittliche Kettenlänge des assoziierten Peptids kann möglicherweise die Bindung Bw4-spezifischer Antikörper an bestimmte HLA-B-Komplexe sterisch hindern. Dafür spricht, dass das Bindungsvermögen von MARB3 und MARB7 an HLA-B27 Transfektanten mit zunehmender Länge des assoziierten Peptids abnahm (Seitz, 2003). Sollten im Cortex vermehrt HLA-Komplexe mit überlangen Peptiden generiert werden, wäre dies eine Erklärung für das beobachtete reduzierte Markierungsmuster. Der Antikörper MARB4, der präferentiell HLA-B27-Komplexe mit überdurchschnittlich langen Peptiden erkannte (Urban et al., 1994), zeigte aber am HLA-B27-positiven Thymus nur eine schwache kortikale Reaktion. Eine Spezialisierung des Cortex auf die Produktion von Peptidliganden mit Überlänge, die mit einer Bindung der Bw4-spezifischen Antikörpern an die HLA-Komplexe interferieren würden, ist in Anbetracht der schwachen kortikalen Markierung mit MARB4 zweifelhaft.

In vitro war gezeigt worden, dass die eingesetzten Bw4-spezifischen Antikörper an unbeladene, Peptid-freie HLA-Komplexe entweder signifikant reduziert, wie im Fall von Tü48 und Tü109, oder überhaupt nicht banden, wie bei MARB3 und MARB7 (Tan et al., 2002; Rehm et al., 2000; Takamiya et al., 1996). Damit ließe sich für die reduzierte Reaktivität der Bw4-Antikörper im Cortex auch eine Präsentation von HLA-Komplexen mit unbesetztem Peptidbindungsspalt als plausible Erklärung annehmen. Normalerweise gelangt nur der vollständig assemblierte HLA-Klasse-I-Trimerkomplex vom endoplasmatischen Retikulum an die Zelloberfläche (Raghavan et al., 2008; Vyas et al., 2008). Über das Vorkommen von Peptid-freien HLA-Komplexen auf verschiedenen Zellen *in vivo* wurde dennoch in verschiedenen Publikationen berichtet (Wei & Cresswell, 1992; Benjamin et al., 1991; Ziegler et al., 2009). Rund 80 % der hoch-affin gebundenen HLA-Peptidliganden sind mit hydrophoben C-Termini ausgestattet. Die dafür notwendige Chymotrypsin-artige Aktivität des Proteasoms soll jedoch im kortikal exprimierten Thymoproteasom reduziert sein. Dies könnte zur bevorzugten Generierung niedrig-affiner Peptidliganden im Thymuskortex führen, wie sie als Voraussetzung für die positive Selektion der Thymozyten postuliert wurden (Crites & Varma, 2010; Hogquist & Xing, 2010; Takahama et al., 2008; Murata et al., 2007). Biophysikalische Untersuchungen der Wechselwirkung solcher niedrig-affiner Peptide im Bindungsspalt von HLA-Komplexen deuteten darauf hin, dass sich initial verankerte Peptide partiell oder ganz ablösen und „leere“ HLA-Komplexe hinterlassen könnten (Ziegler et al., 2009; Winkler et al., 2007).

4.6 Implikationen für den Prozess der positiven Selektion im Thymus

Eine gegenüber der Medulla distinkte Enzymausstattung und die Präsentation von HLA-Komplexen mit außergewöhnlichen antigenen Eigenschaften könnten Grundlage der Befähigung des Thymuscortex zur positiven Selektion von Thymozyten sein und damit eine Notwendigkeit für den Aufbau eines immunkompetenten T-Zell-Repertoires darstellen (Takahama et al., 2012; Nitta et al., 2008; Rehm et al., 2000; Murphy et al., 1989). Cortex-spezifisch angepasste HLA-Komplexe könnten eine niedrig-affine Interaktion mit dem TCR reifender Thymozyten begünstigen, was als Voraussetzung für eine erfolgreiche positive Selektion angenommen wird (Hogquist & Xing, 2010). Dafür könnten sich locker im Bindungsspalt verankerte Peptide besonders eignen, da sie eine erhöhte Beweglichkeit der schweren Kette zuließen und dadurch möglicherweise einen niedrig-affinen Kontakt zum TCR fördern würden (Pöhlmann et al., 2004). Die positive Selektion mit atypischen HLA-Peptidliganden könnte zudem nötig sein, um einem übermäßigen Verlust von Thymozyten bei der negativen Selektion in der Medulla entgegen zu wirken: Je ähnlicher sich kortikal und medullär präsentierte Selbst-Peptide wären, desto eher würden SP-Thymozyten, die sich durch die Interaktion mit HLA-Komplexen im Cortex ihr Überleben sichern konnten, auch an medulläre HLA-Komplexe binden, was bei überschweiliger Bindungsaffinität zur negativen Selektion dieser Zellen führen würde (Derbinski & Kyewski, 2010; Klein et al., 2009).

Die Vermutung, dass die positive Selektion von Thymozyten bevorzugt an Peptid-freien HLA-Komplexen erfolgen könnte, ist fast genauso alt wie die Erkenntnis, dass HLA-/MHC-Moleküle ein Peptid präsentieren (Bjorkman & M.M., 1989; Fahnestock et al., 1992; Babbitt et al., 1985). Die mittlerweile fundierten Kenntnisse über die Voraussetzungen einer stabilen Verankerung von Peptiden in HLA-Komplexen verschiedenster Spezifität und die Entdeckung des Thymoproteasoms im Jahr 2007, das vornehmlich Peptidliganden produziert, die diese Voraussetzungen nicht erfüllen, haben dazu geführt, dass die Hypothese in den letzten Jahren wieder aufgegriffen wurde (Crites & Varma, 2010; Hogquist & Xing, 2010; Murata et al., 2007). Heute wie damals werden sowohl Studien veröffentlicht, die für beladene HLA-Komplexe im Thymuskortex sprechen (z. B. Nitta et al., 2010; Stefanski et al., 2001; Barton & Rudensky, 1999; Kisielow et al., 1988), als auch solche, die „leere“ HLA-Komplexe für die positive Selektion vorsehen (z. B. Uchanska-Ziegler et al., 2012; Ziegler et al., 2009; Rehm et al., 2000; Fahnestock et al., 1992). Die in dieser Arbeit vorgestellten Befunde unterstützen die Vorstellungen der zweitgenannten Gruppe von Publikationen.

Eine Stärke des *peptide-independent*-Modells (positive Selektion mit Peptid-freien HLA-Komplexen, Jameson et al., 1995), besteht auch darin, Ungereimtheiten und Widersprüche in der Vorstellung von den Selektionsprozessen im Thymus mit bestechender Einfachheit aufzulösen. Zu den unterschiedlichen Konsequenzen von positiver und negativer Selektion, die mit der Induktion von Überlebens- bzw. Apoptosesignalen nicht gegensätzlicher sein könnten, würden demnach HLA-Komplexe als TCR-Liganden beitragen, die sich durch die vorhandene oder fehlende Beladung des Peptidbindungsspalts wesentlich unterscheiden (Ziegler et al., 2009). Für die Aufgabe der positiven Selektion, eine Anreicherung derjenigen Thymozyten zu bewerkstelligen, deren TCR auf die körpereigenen HLA-Moleküle „zugeschnitten“ bzw. geprägt ist, könnten Peptid-freie Moleküle ideal sein, weil aus dem Bindungsspalt herausragende Peptidresiduen diesen Erkennungsprozess stören würden (Uchanska-Ziegler et al., 2012; Schumacher & Ploegh, 1994). Ferner könnten „leere“ HLA-Komplexe eine niedrig-affine Bindung des TCRs für die Induktion der positiven Selektion deshalb vorgeben, weil der Kontakt zwischen der TCR-CDR3-Schleife und einem gegenüberliegenden Peptid nicht erfolgen kann (Garcia et al., 2009; Ziegler et al., 2009).

Solche Überlegungen zu den Selektionsprozessen im Thymus könnten auch entscheidende Hinweise für ein besseres Verständnis von Autoimmunerkrankungen liefern, die mit HLA-Klasse-I-Allelen assoziiert sind. Das mit Morbus Bechterew (*Spondylitis ankylosans*) assoziierte B*27:05-Allel sowie das mit Multipler Sklerose (*Encephalomyelitis disseminata*) assoziierte A*03:01-Allel bringen HLA-Moleküle hervor, die präferentiell Peptide mit basischen C-Termini binden, wie sie vom Cortex-spezifischen Thymoproteasom für die positive Selektion generiert werden. Diese HLA-Komplexe könnten damit Peptide stabil verankern, die nur für eine Minderheit der übrigen HLA-Spezifitäten geeignete Liganden im Thymus darstellen (Reche et al., 2005). Unter Annahme des *peptide-independent*-Modells der positiven Selektion könnte folglich eine Neigung zur Bildung autoaggressiver T-Zellen entstehen, weil die positive Selektion von Thymozyten nicht ohne die Präsentation körpereigener Peptide erfolgen könnte (Uchanska-Ziegler et al., 2012).

4.7 Ausblick

Viele der genannten Vorstellungen über den Prozess der positiven Selektion im Thymus sind so schlüssig wie spekulativ. Es sind nicht zuletzt die unüberschaubaren Einflussfaktoren und die Komplexität immunologischer Prozesse, die dazu führen, dass Ergebnisse experimenteller Untersuchungen auf diesem Gebiet häufig mehr als nur eine Interpretation zulassen. Definitive Aussagen über die Eigenschaften positiv-selektierender HLA-Komplexe, werden von der direkten Sequenzierung von HLA-Peptidliganden erwartet, die von cTECs präsentiert werden. Dies ist derzeit noch unmöglich, weil die Zellausbeute verschiedener Isolierungsmethoden nicht annähernd ausreichend für eine massenspektrometrische Charakterisierung ist. Zur weiteren Untersuchung HLA-gebundener Peptidliganden von kortikalen Thymozyten müssen die massenspektrometrischen Charakterisierungen wiederholt durchgeführt werden. Was die Präsentation „leerer“ HLA-B-Komplexe durch Thymozyten angeht, bleibt jedoch auch bei mehrfacher Reproduktion des vorgestellten Ergebnisses eine Restunsicherheit. Für den Beweis der Abwesenheit von gebundenen Peptiden in kortikalen HLA-Komplexen, wie sie in dieser Studie postuliert wird, stellt sich die Frage, ob die gewählte Analysemethode geeignet und sensitiv genug ist. Um die Wahrscheinlichkeit falsch-negativer Befunde zu verringern, ist es deshalb sinnvoll, die Zellzahl zu vergrößern und die Menge isolierter HLA-B-Komplexe aus dem Zelllysats zu quantifizieren, um die Suffizienz der Aufreinigungsphase bewerten zu können. Dass HLA-F als *nicht-klassisches* HLA-Klasse-I-Molekül an *klassische* HLA-Komplexe bindet, die in der Peptid-freien Form vorliegen, ist ein relativ neues Forschungsergebnis (Goodridge et al., 2010). Eine Co-Immunpräzipitation mit geeigneten Antikörpern könnte Erkenntnisse darüber liefern, ob diese Moleküle an HLA-Komplexe im Cortex des Thymus gebunden sind und dort die Bindung der eingesetzten Bw4-spezifischen Antikörper beeinflussen. Im Mikromilieu des Thymus reifen auch NK-Zellen, die sich phänotypisch und möglicherweise auch funktionell von konventionellen NK-Zellen aus Milz und Knochenmark unterscheiden (Ribeiro et al., 2010). Ähnliches gilt auch für die Bedeutung des Thymus in der Generierung verschiedener T-Zell-Subpopulationen, wie z. B. regulatorischer T-Zellen. Inwieweit hier spezifische HLA-Komplexe eine Rolle spielen, müssen weitere Untersuchungen zeigen. Der in dieser Studie gezeigte Unterschied zwischen HLA-B-Komplexen in Cortex und Medulla im Bereich des Bw4-Epitops könnte in Beziehung zur Generierung von NK-Zellen mit dem HLA-Klasse-I-Rezeptor KIR3DL1/S1 stehen. Die immunhistochemische Lokalisation von Rezeptoren der KIR-Familie im Thymus könnte damit einen ersten Schritt zur Klärung solcher Fragen darstellen.

5 Zusammenfassung

Die Selektion von T-Zellen im humanen Thymus dient dem Aufbau eines zur Immunabwehr befähigten, jedoch nicht autoaggressiven T-Zell-Repertoires. Die Interaktion zwischen T-Zell-Rezeptoren reifender Thymozyten und HLA-Komplexen im Mikromilieu des Thymus spielt hierbei eine entscheidende Rolle. Im Rahmen der „positiven Selektion“ im Cortex des Thymus wird der programmierte Zelltod funktionsfähiger T-Zellen verhindert. Publikationen der letzten Jahre weisen darauf hin, dass hierfür Cortex-spezifische Prozessierungsmechanismen existieren, die im menschlichen Körper einzigartige HLA-Komplexe hervorbringen könnten. Es besteht die Möglichkeit, dass diese HLA-Komplexe niedrig-affine Peptide präsentieren, die nach ihrer Ablösung eine leere Bindungstasche hinterlassen. In dieser Arbeit wurden eingehend charakterisierte monoklonale Antikörper mit Spezifität für die supertypische HLA-B-Determinante Bw4 und *common*-HLA-B-Antikörper verwendet, um strukturelle Unterschiede zwischen HLA-B-Komplexen in Cortex und Medulla des Thymus serologisch zu erfassen. Immunhistochemische Analysen von humanen Thymi mit Immunperoxidase-Einfachmarkierungen und Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen zeigten hierbei eine besondere Verteilung der jeweiligen Antigene auf: Erwartungsgemäß wurden Bw4- und HLA-B-Komplexe in der Medulla gleichermaßen detektiert; Zellen wie medulläre Epithelien zeigten eine simultane Expression der Antigene. Demgegenüber waren Bw4-Antigene im Cortex im Vergleich zu HLA-B-Komplexen wider Erwarten kaum oder nur relativ schwach nachweisbar. Zu den wenigen Bw4-positiven Strukturen gehören Endothelzellen, sowie nahe an der Medulla gelegene Epithelzellen. Auch auf durchflusszytometrisch analysierten CD1-positiven kortikalen Thymozyten war die Bw4-Determinante auf HLA-B-Komplexen kaum nachzuweisen. Da die Bindung der Bw4-spezifischen Antikörper an ihr Epitop von der Präsenz eines Peptids in der Peptidbindungstasche des HLA-Moleküls abhängig ist, liefert dieser Befund einen Hinweis auf das Vorhandensein von Peptid-freien HLA-Komplexen im Cortex des menschlichen Thymus. Nach dieser Hypothese würde die hier stattfindende positive Selektion heranreifender Thymozyten unabhängig von HLA-gebundenen Peptiden, den eigentlichen immunogenen Zielobjekten des T-Zell-Rezeptors, stattfinden.

6 Literatur

- Anderson, G.; Jenkinson, E. J. und Rodewald, H. R. (2009): A roadmap for thymic epithelial cell development, *Eur J Immunol* (Band 39), Nr. 7, S. 1694-9.
- Anderson, G.; Owen, J. J.; Moore, N. C. und Jenkinson, E. J. (1994): Thymic epithelial cells provide unique signals for positive selection of CD4+CD8+ thymocytes in vitro, *J Exp Med* (Band 179), Nr. 6, S. 2027-31.
- Anderson, G. und Takahama, Y. (2012): Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection, *Trends Immunol* (Band 33), Nr. 6, S. 256-63.
- Anderson, M. S.; Venanzi, E. S.; Klein, L.; Chen, Z.; Berzins, S. P.; Turley, S. J.; von Boehmer, H.; Bronson, R.; Dierich, A.; Benoist, C. und Mathis, D. (2002): Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein, *Science* (Band 298), Nr. 5597, S. 1395-401.
- Ashton-Rickardt, P. G.; Bandeira, A.; Delaney, J. R.; Van Kaer, L.; Pircher, H. P.; Zinkernagel, R. M. und Tonegawa, S. (1994): Evidence for a differential avidity model of T cell selection in the thymus, *Cell* (Band 76), Nr. 4, S. 651-63.
- Ashton-Rickardt, P. G. und Tonegawa, S. (1994): A differential-avidity model for T-cell selection, *Immunology today* (Band 15), Nr. 8, S. 362-6.
- Babbitt, B. P.; Allen, P. M.; Matsueda, G.; Haber, E. und Unanue, E. R. (1985): Binding of immunogenic peptides to Ia histocompatibility molecules, *Nature* (Band 317), Nr. 6035, S. 359-61.
- Baldwin, T. A.; Sandau, M. M.; Jameson, S. C. und Hogquist, K. A. (2005): The timing of TCR alpha expression critically influences T cell development and selection, *The Journal of experimental medicine* (Band 202), Nr. 1, S. 111-21.
- Barber, L. D.; Percival, L.; Arnett, K. L.; Gumperz, J. E.; Chen, L. und Parham, P. (1997): Polymorphism in the alpha 1 helix of the HLA-B heavy chain can have an overriding influence on peptide-binding specificity, *J Immunol* (Band 158), Nr. 4, S. 1660-9.
- Barnstable, C. J.; Bodmer, W. F.; Brown, G.; Galfre, G.; Milstein, C.; Williams, A. F. und Ziegler, A. (1978): Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis, *Cell* (Band 14), Nr. 1, S. 9-20.
- Barton, G. M. und Rudensky, A. Y. (1999): Evaluating peptide repertoires within the context of thymocyte development, *Semin Immunol* (Band 11), Nr. 6, S. 417-22.
- Benjamin, R. J.; Madrigal, J. A. und Parham, P. (1991): Peptide binding to empty HLA-B27 molecules of viable human cells, *Nature* (Band 351), Nr. 6321, S. 74-7.
- Benz, C.; Heinzl, K. und Bleul, C. C. (2004): Homing of immature thymocytes to the subcapsular microenvironment within the thymus is not an absolute requirement for T cell development, *European journal of immunology* (Band 34), Nr. 12, S. 3652-63.
- Binz, A. K.; Rodriguez, R. C.; Biddison, W. E. und Baker, B. M. (2003): Thermodynamic and kinetic analysis of a peptide-class I MHC interaction highlights the noncovalent nature and conformational dynamics of the class I heterotrimer, *Biochemistry* (Band 42), Nr. 17, S. 4954-61.
- Bix, M. und Raulat, D. (1992): Inefficient positive selection of T cells directed by haematopoietic cells, *Nature* (Band 359), Nr. 6393, S. 330-3.
- Bjorkman, P. J. und M.M., Davis (1989). A model for the interaction of a T cell receptor with a peptide-MHC complex. *Immunological Recognition*, (S. 119-128).

- Bjorkman, P. J.; Saper, M. A.; Samraoui, B.; Bennett, W. S.; Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1987): Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2, *Nature* (Band 329), Nr. 6139, S. 506-12.
- Blackburn, C. C. und Manley, N. R. (2004): Developing a new paradigm for thymus organogenesis, *Nat Rev Immunol* (Band 4), Nr. 4, S. 278-89.
- Bleul, C. C.; Corbeaux, T.; Reuter, A.; Fisch, P.; Monting, J. S. und Boehm, T. (2006): Formation of a functional thymus initiated by a postnatal epithelial progenitor cell, *Nature* (Band 441), Nr. 7096, S. 992-6.
- Blue, M. L.; Levine, H.; Daley, J. F.; Branton, K. R., Jr. und Schlossman, S. F. (1989): Expression of CD1 and class I MHC antigens by human thymocytes, *J Immunol* (Band 142), Nr. 8, S. 2714-20.
- Bouso, P.; Bhakta, N. R.; Lewis, R. S. und Robey, E. (2002): Dynamics of thymocyte-stromal cell interactions visualized by two-photon microscopy, *Science* (Band 296), Nr. 5574, S. 1876-80.
- Bowlus, C. L.; Ahn, J.; Chu, T. und Gruen, J. R. (1999): Cloning of a novel MHC-encoded serine peptidase highly expressed by cortical epithelial cells of the thymus, *Cell Immunol* (Band 196), Nr. 2, S. 80-6.
- Boyd, R. L.; Tucek, C. L.; Godfrey, D. I.; Izon, D. J.; Wilson, T. J.; Davidson, N. J.; Bean, A. G.; Ladyman, H. M.; Ritter, M. A. und Hugo, P. (1993): The thymic microenvironment, *Immunol Today* (Band 14), Nr. 9, S. 445-59.
- Burnet, F. M. (1959): *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Carpenter, A. C. und Bosselut, R. (2010): Decision checkpoints in the thymus, *Nature immunology* (Band 11), Nr. 8, S. 666-73.
- Carreno, B. M. und Hansen, T. H. (1994): Exogenous peptide ligand influences the expression and half-life of free HLA class I heavy chains ubiquitously detected at the cell surface, *Eur J Immunol* (Band 24), Nr. 6, S. 1285-92.
- Choi, E. Y.; Jung, K. C.; Park, H. J.; Chung, D. H.; Song, J. S.; Yang, S. D.; Simpson, E. und Park, S. H. (2005): Thymocyte-thymocyte interaction for efficient positive selection and maturation of CD4 T cells, *Immunity* (Band 23), Nr. 4, S. 387-96.
- Ciofani, M. und Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007): The thymus as an inductive site for T lymphopoiesis, *Annual review of cell and developmental biology* (Band 23), S. 463-93.
- Crites, T. J. und Varma, R. (2010): On the issue of peptide recognition in T cell development, *Self Nonself* (Band 1), Nr. 1, S. 55-61.
- Cunningham, D.J. (1903): *Textbook of Anatomy*, William Wood and Co., New York.
- Delaney, J. R.; Sykulev, Y.; Eisen, H. N. und Tonegawa, S. (1998): Differences in the level of expression of class I major histocompatibility complex proteins on thymic epithelial and dendritic cells influence the decision of immature thymocytes between positive and negative selection, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 95), Nr. 9, S. 5235-40.
- Derbinski, J. und Kyewski, B. (2010): How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens, *Current opinion in immunology* (Band 22), Nr. 5, S. 592-600.
- Drouet, M.; Aussel, L.; Drenou, B. und Fauchet, R. (1995): Quantification and molecular analysis of plasmatic HLA-BCw molecules with a locus B and Cw HLA specific mAb (B1.23.2 mAb), *Eur J Immunogenet* (Band 22), Nr. 5, S. 363-70.
- Egerton, M.; Scollay, R. und Shortman, K. (1990): Kinetics of mature T-cell development in the thymus, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 7, S. 2579-82.

- Ellis, Shirley A.; Taylor, Craig und McMichael, Andrew (1982): Recognition of HLA-B27 and related antigen by a monoclonal antibody, *Human Immunology* (Band 5), Nr. 1, S. 49-59.
- Emmert-Buck, M. R.; Bonner, R. F.; Smith, P. D.; Chuaqui, R. F.; Zhuang, Z.; Goldstein, S. R.; Weiss, R. A. und Liotta, L. A. (1996): Laser capture microdissection, *Science* (Band 274), Nr. 5289, S. 998-1001.
- Fadda, L.; O'Connor, G. M.; Kumar, S.; Piechocka-Trocha, A.; Gardiner, C. M.; Carrington, M.; McVicar, D. W. und Altfeld, M. (2011): Common HIV-1 peptide variants mediate differential binding of KIR3DL1 to HLA-Bw4 molecules, *J Virol* (Band 85), Nr. 12, S. 5970-4.
- Fahnestock, M. L.; Tamir, I.; Narhi, L. und Bjorkman, P. J. (1992): Thermal stability comparison of purified empty and peptide-filled forms of a class I MHC molecule, *Science* (Band 258), Nr. 5088, S. 1658-62.
- Falk, K.; Rotzschke, O.; Stevanovic, S.; Jung, G. und Rammensee, H. G. (1991): Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules, *Nature* (Band 351), Nr. 6324, S. 290-6.
- Fehling, H. J.; Swat, W.; Laplace, C.; Kuhn, R.; Rajewsky, K.; Muller, U. und von Boehmer, H. (1994): MHC class I expression in mice lacking the proteasome subunit LMP-7, *Science* (Band 265), Nr. 5176, S. 1234-7.
- Foss, D. L.; Donskoy, E. und Goldschneider, I. (2001): The importation of hematogenous precursors by the thymus is a gated phenomenon in normal adult mice, *J Exp Med* (Band 193), Nr. 3, S. 365-74.
- Fremont, D. H.; Matsumura, M.; Stura, E. A.; Peterson, P. A. und Wilson, I. A. (1992): Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2Kb, *Science* (Band 257), Nr. 5072, S. 919-27.
- Fry, T. J. und Mackall, C. L. (2005): The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance, *Journal of immunology* (Band 174), Nr. 11, S. 6571-6.
- Gallegos, A. M. und Bevan, M. J. (2004): Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation, *J Exp Med* (Band 200), Nr. 8, S. 1039-49.
- Garcia-Ruano, A. B.; Mendez, R.; Romero, J. M.; Cabrera, T.; Ruiz-Cabello, F. und Garrido, F. (2010): Analysis of HLA-ABC locus-specific transcription in normal tissues, *Immunogenetics* (Band 62), Nr. 11-12, S. 711-9.
- Garcia, K. C.; Adams, J. J.; Feng, D. und Ely, L. K. (2009): The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple, *Nature immunology* (Band 10), Nr. 2, S. 143-7.
- Gauster, M.; Blaschitz, A. und Dohr, G. (2007): Monoclonal antibody HC10 does not bind HLA-G, *Rheumatology (Oxford)* (Band 46), Nr. 5, S. 892-3; author reply 893-4.
- Goodridge, J. P.; Burian, A.; Lee, N. und Geraghty, D. E. (2010): HLA-F complex without peptide binds to MHC class I protein in the open conformer form, *J Immunol* (Band 184), Nr. 11, S. 6199-208.
- Gras, S.; Reiser, J-B; Chouquet, A; Le Gorrec, M; Debeaupuis, E; Echasserieau, K; Saulquin, X; Bonneville, M und D, Housset (2011): Crystal Structure of MHC class I HLA-A2 molecule complexed with HCV NS3-1073-1081 nonapeptide C6V variant, www.rcsb.org.
- Gray, D. H.; Fletcher, A. L.; Hammett, M.; Seach, N.; Ueno, T.; Young, L. F.; Barbuto, J.; Boyd, R. L. und Chidgey, A. P. (2008): Unbiased analysis, enrichment and purification

- of thymic stromal cells, *Journal of immunological methods* (Band 329), Nr. 1-2, S. 56-66.
- Griesemer, A. D.; Sorenson, E. C. und Hardy, M. A. (2010): The role of the thymus in tolerance, *Transplantation* (Band 90), Nr. 5, S. 465-74.
- Haynes, B. F.; Scearce, R. M.; Lobach, D. F. und Hensley, L. L. (1984): Phenotypic characterization and ontogeny of mesodermal-derived and endocrine epithelial components of the human thymic microenvironment, *J Exp Med* (Band 159), Nr. 4, S. 1149-68.
- Heinemann, F. M. (2009): HLA Genotyping and Antibody Characterization Using the Luminex Multiplex Technology, *Transfusion medicine and hemotherapy : offzielles Organ der Deutschen Gesellschaft fur Transfusionsmedizin und Immunhamatologie* (Band 36), Nr. 4, S. 273-278.
- Hogquist, K. A. und Xing, Y. (2010): Why CD8+ T cells need diversity when growing up, *Immunity* (Band 32), Nr. 1, S. 5-6.
- Honey, K.; Nakagawa, T.; Peters, C. und Rudensky, A. (2002): Cathepsin L regulates CD4+ T cell selection independently of its effect on invariant chain: a role in the generation of positively selecting peptide ligands, *J Exp Med* (Band 195), Nr. 10, S. 1349-58.
- Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M. und Graham Cooks, R. (2005): The Orbitrap: a new mass spectrometer, *Journal of mass spectrometry : JMS* (Band 40), Nr. 4, S. 430-43.
- Huesmann, M.; Scott, B.; Kisielow, P. und von Boehmer, H. (1991): Kinetics and efficacy of positive selection in the thymus of normal and T cell receptor transgenic mice, *Cell* (Band 66), Nr. 3, S. 533-40.
- Hugo, P.; Kappler, J. W.; McCormack, J. E. und Marrack, P. (1993): Fibroblasts can induce thymocyte positive selection in vivo, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 90), Nr. 21, S. 10335-9.
- Jameson, S. C.; Hogquist, K. A. und Bevan, M. J. (1995): Positive selection of thymocytes, *Annual review of immunology* (Band 13), S. 93-126.
- Jenkins, M. K.; Chu, H. H.; McLachlan, J. B. und Moon, J. J. (2010): On the composition of the preimmune repertoire of T cells specific for Peptide-major histocompatibility complex ligands, *Annual review of immunology* (Band 28), S. 275-94.
- Kaymaz, F. F.; Dagdeviren, A. und Asan, E. (2003): Antigenic profile of human thymus in concurrence with "Clusters of Thymic Epithelial Staining" classification, *Ann Anat* (Band 185), Nr. 2, S. 163-71.
- Kebarle, P. und Verkerk, U. H. (2009): Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now, *Mass spectrometry reviews* (Band 28), Nr. 6, S. 898-917.
- Kirberg, J.; Bosco, N.; Deloulme, J. C.; Ceredig, R. und Agenes, F. (2008): Peripheral T lymphocytes recirculating back into the thymus can mediate thymocyte positive selection, *J Immunol* (Band 181), Nr. 2, S. 1207-14.
- Kisielow, P.; Teh, H. S.; Bluthmann, H. und von Boehmer, H. (1988): Positive selection of antigen-specific T cells in thymus by restricting MHC molecules, *Nature* (Band 335), Nr. 6192, S. 730-3.
- Klein, L.; Hinterberger, M.; Wirnsberger, G. und Kyewski, B. (2009): Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction, *Nature reviews. Immunology* (Band 9), Nr. 12, S. 833-44.

- Klein Wolterink, R. G.; Garcia-Ojeda, M. E.; Vosshenrich, C. A.; Hendriks, R. W. und Di Santo, J. P. (2010): The intrathymic crossroads of T and NK cell differentiation, *Immunological reviews* (Band 238), Nr. 1, S. 126-37.
- Knittler, M. R.; Alberts, P.; Deverson, E. V. und Howard, L. C. (1999): Nucleotide binding by TAP mediates association with peptide and release of assembled MHC class I molecules, *Current Biology* (Band 9), Nr. 18, S. 999-1008.
- Koble, C. und Kyewski, B. (2009): The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer, *The Journal of experimental medicine* (Band 206), Nr. 7, S. 1505-13.
- Koch, U.; Fiorini, E.; Benedito, R.; Besseyrias, V.; Schuster-Gossler, K.; Pierres, M.; Manley, N. R.; Duarte, A.; Macdonald, H. R. und Radtke, F. (2008): Delta-like 4 is the essential, nonredundant ligand for Notch1 during thymic T cell lineage commitment, *The Journal of experimental medicine* (Band 205), Nr. 11, S. 2515-23.
- Kovalev, G.; Duus, K.; Wang, L.; Lee, R.; Bonyhadi, M.; Ho, D.; McCune, J. M.; Kaneshima, H. und Su, L. (1999): Induction of MHC class I expression on immature thymocytes in HIV-1-infected SCID-hu Thy/Liv mice: evidence of indirect mechanisms, *J Immunol* (Band 162), Nr. 12, S. 7555-62.
- Kubo, R. T.; Sette, A.; Grey, H. M.; Appella, E.; Sakaguchi, K.; Zhu, N. Z.; Arnott, D.; Sherman, N.; Shabanowitz, J.; Michel, H. und et al. (1994): Definition of specific peptide motifs for four major HLA-A alleles, *J Immunol* (Band 152), Nr. 8, S. 3913-24.
- Lawlor, D. A.; Zemmour, J.; Ennis, P. D. und Parham, P. (1990): Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection, *Annu Rev Immunol* (Band 8), S. 23-63.
- Le Douarin, N. M. und Jotereau, F. V. (1975): Tracing of cells of the avian thymus through embryonic life in interspecific chimeras, *J Exp Med* (Band 142), Nr. 1, S. 17-40.
- Leong, Anthony S-Y; Cooper, Kumarasen und Leong, F Joel W-M (2003): Manual of Diagnostic Antibodies For Immunohistology (Band 2nd Edition), Greenwich Medical Media Ltd, London.
- Li, J.; Iwanami, N.; Hoa, V. Q.; Furutani-Seiki, M. und Takahama, Y. (2007): Noninvasive intravital imaging of thymocyte dynamics in medaka, *J Immunol* (Band 179), Nr. 3, S. 1605-15.
- Lind, E. F.; Prockop, S. E.; Porritt, H. E. und Petrie, H. T. (2001): Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development, *The Journal of experimental medicine* (Band 194), Nr. 2, S. 127-34.
- Ljunggren, H. G. und Karre, K. (1990): In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition, *Immunology today* (Band 11), Nr. 7, S. 237-44.
- Lo, D.; Ron, Y. und Sprent, J. (1986): Induction of MHC-restricted specificity and tolerance in the thymus, *Immunol Res* (Band 5), Nr. 3, S. 221-32.
- Lynch, H. E.; Goldberg, G. L.; Chidgey, A.; Van den Brink, M. R.; Boyd, R. und Sempowski, G. D. (2009): Thymic involution and immune reconstitution, *Trends in immunology* (Band 30), Nr. 7, S. 366-73.
- Madden, D. R.; Garboczi, D. N. und Wiley, D. C. (1993): The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2, *Cell* (Band 75), Nr. 4, S. 693-708.

- Madden, D. R.; Gorga, J. C.; Strominger, J. L. und Wiley, D. C. (1992): The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC, *Cell* (Band 70), Nr. 6, S. 1035-48.
- Makarov, A.; Denisov, E.; Kholomeev, A.; Balschun, W.; Lange, O.; Strupat, K. und Horning, S. (2006): Performance evaluation of a hybrid linear ion trap/orbitrap mass spectrometer, *Analytical chemistry* (Band 78), Nr. 7, S. 2113-20.
- Marrack, P. und Kappler, J. (1987): The T cell receptor, *Science* (Band 238), Nr. 4830, S. 1073-9.
- McFarland, E. J.; Scarce, R. M. und Haynes, B. F. (1984): The human thymic microenvironment: cortical thymic epithelium is an antigenically distinct region of the thymic microenvironment, *J Immunol* (Band 133), Nr. 3, S. 1241-9.
- Miller, J. F. (1961): Immunological function of the thymus, *Lancet* (Band 2), Nr. 7205, S. 748-9.
- Moran, A. E. und Hogquist, K. A. (2011): TCR affinity in thymic development, *Immunology*.
- Mori, K.; Itoi, M.; Tsukamoto, N.; Kubo, H. und Amagai, T. (2007): The perivascular space as a path of hematopoietic progenitor cells and mature T cells between the blood circulation and the thymic parenchyma, *International immunology* (Band 19), Nr. 6, S. 745-53.
- Müller, C. A.; Engler-Blum, G.; Gekeler, V.; Steiert, I.; Weiss, E. und Schmidt, H. (1989): Genetic and serological heterogeneity of the supertypic HLA-B locus specificities Bw4 and Bw6, *Immunogenetics* (Band 30), Nr. 3, S. 200-7.
- Müller, C.; Herbst, H.; Löffler, G.; Ziegler, A. und Wernet, P. (1983): A cytotoxic monoclonal antibody specific for the private alloantigenic determinant of the HLA-B 13 molecule, *Hum Immunol* (Band 7), Nr. 4, S. 229-37.
- Müller, C.; Herbst, H.; Uchanska-Ziegler, B.; Ziegler, A.; Schunter, F.; Steiert, I. und Wernet, P. (1985): Characterization of a monoclonal anti-Bw4 antibody (Tu109): evidence for similar epitopes on the Bw4 and Bw6 antigens, *Hum Immunol* (Band 14), Nr. 4, S. 333-49.
- Müller, C.; Stein, H.; Ziegler, A. und Wernet, P. (1983): Quantitative and qualitative differences in the distribution of HLA class I antigenic determinants in the human thymic compartments, *Eur J Immunol* (Band 13), Nr. 5, S. 414-8.
- Müller, C.; Ziegler, A.; Muller, G.; Schunter, F. und Wernet, P. (1982): Monoclonal antibody (Tu48) defining alloantigenic class I determinants specific for HLA-Bw4 and HLA-Aw23,-Aw24 as well as -Aw32, *Hum Immunol* (Band 5), Nr. 4, S. 269-81.
- Murata, S.; Sasaki, K.; Kishimoto, T.; Niwa, S.; Hayashi, H.; Takahama, Y. und Tanaka, K. (2007): Regulation of CD8+ T cell development by thymus-specific proteasomes, *Science* (Band 316), Nr. 5829, S. 1349-53.
- Murata, S.; Takahama, Y. und Tanaka, K. (2008): Thymoproteasome: probable role in generating positively selecting peptides, *Curr Opin Immunol* (Band 20), Nr. 2, S. 192-6.
- Murphy, D. B.; Lo, D.; Rath, S.; Brinster, R. L.; Flavell, R. A.; Slanetz, A. und Janeway, C. A., Jr. (1989): A novel MHC class II epitope expressed in thymic medulla but not cortex, *Nature* (Band 338), Nr. 6218, S. 765-8.
- Mustafa, D.; Kros, J. M. und Luider, T. (2008): Combining laser capture microdissection and proteomics techniques, *Methods Mol Biol* (Band 428), S. 159-78.
- Nakagawa, T.; Roth, W.; Wong, P.; Nelson, A.; Farr, A.; Deussing, J.; Villadangos, J. A.; Ploegh, H.; Peters, C. und Rudensky, A. Y. (1998): Cathepsin L: critical role in Ii

- degradation and CD4 T cell selection in the thymus, *Science* (Band 280), Nr. 5362, S. 450-3.
- Nitta, T.; Murata, S.; Sasaki, K.; Fujii, H.; Ripen, A. M.; Ishimaru, N.; Koyasu, S.; Tanaka, K. und Takahama, Y. (2010): Thymoproteasome shapes immunocompetent repertoire of CD8+ T cells, *Immunity* (Band 32), Nr. 1, S. 29-40.
- Nitta, T.; Murata, S.; Ueno, T.; Tanaka, K. und Takahama, Y. (2008): Thymic microenvironments for T-cell repertoire formation, *Adv Immunol* (Band 99), S. 59-94.
- Niyaz, Y.; Stich, M.; Sagmuller, B.; Burgemeister, R.; Friedemann, G.; Sauer, U.; Gangnus, R. und Schutze, K. (2005): Noncontact laser microdissection and pressure catapulting: sample preparation for genomic, transcriptomic, and proteomic analysis, *Methods Mol Med* (Band 114), S. 1-24.
- Nowell, C. S.; Farley, A. M. und Blackburn, C. C. (2007): Thymus organogenesis and development of the thymic stroma (Band 380), 2007/09/19. Auflage, *Methods Mol Biol*.
- O'Hea, A. M.; Erber, W.; O'Connor, N. T. und Bunch, C. (1986): Acute transformation of essential thrombocythaemia: report of two cases, *J Clin Pathol* (Band 39), Nr. 12, S. 1296-8.
- Olsen, J. V.; de Godoy, L. M.; Li, G.; Macek, B.; Mortensen, P.; Pesch, R.; Makarov, A.; Lange, O.; Horning, S. und Mann, M. (2005): Parts per million mass accuracy on an Orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap, *Molecular & cellular proteomics : MCP* (Band 4), Nr. 12, S. 2010-21.
- Olsen, J. V.; Macek, B.; Lange, O.; Makarov, A.; Horning, S. und Mann, M. (2007): Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis, *Nature methods* (Band 4), Nr. 9, S. 709-12.
- Palmer, E. und Naeher, D. (2009): Affinity threshold for thymic selection through a T-cell receptor-co-receptor zipper, *Nat Rev Immunol* (Band 9), Nr. 3, S. 207-13.
- Parham, P.; Barnstable, C. J. und Bodmer, W. F. (1979): Use of a monoclonal antibody (W6/32) in structural studies of HLA-A,B,C, antigens, *J Immunol* (Band 123), Nr. 1, S. 342-9.
- Park, S.; Mahoney, R. J.; Given, S. R.; Fajardo, M. A.; Dubey, D. P. und Yunis, E. J. (1988): Serological identification of thymocyte differentiation antigens, *Hum Immunol* (Band 22), Nr. 3, S. 151-62.
- Pearse, G. (2006): Normal structure, function and histology of the thymus, *Toxicol Pathol* (Band 34), Nr. 5, S. 504-14.
- Perkins, D. N.; Pappin, D. J.; Creasy, D. M. und Cottrell, J. S. (1999): Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data, *Electrophoresis* (Band 20), Nr. 18, S. 3551-67.
- Perosa, F.; Luccarelli, G.; Prete, M.; Favoino, E.; Ferrone, S. und Dammacco, F. (2003): Beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chain epitope mimicry by monoclonal antibody HC-10-specific peptide, *J Immunol* (Band 171), Nr. 4, S. 1918-26.
- Peruzzi, M.; Parker, K. C.; Long, E. O. und Malnati, M. S. (1996): Peptide sequence requirements for the recognition of HLA-B*2705 by specific natural killer cells, *J Immunol* (Band 157), Nr. 8, S. 3350-6.
- Petrie, H. T. (2003): Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus, *Nat Rev Immunol* (Band 3), Nr. 11, S. 859-66.
- Petrie, H. T. und Zúñiga-Pflücker, J. C. (2007): Zoned out: functional mapping of stromal signaling microenvironments in the thymus, *Annu Rev Immunol* (Band 25), S. 649-79.

- Peyvandi, F.; Garagiola, I. und Baronciani, L. (2011): Role of von Willebrand factor in the haemostasis, *Blood Transfus* (Band 9 Suppl 2), S. s3-8.
- Pöhlmann, T.; Böckmann, R. A.; Grubmüller, H.; Uchanska-Ziegler, B.; Ziegler, A. und Alexiev, U. (2004): Differential peptide dynamics is linked to major histocompatibility complex polymorphism, *J Biol Chem* (Band 279), Nr. 27, S. 28197-201.
- Prilliman, K. R.; Jackson, K. W.; Lindsey, M.; Wang, J.; Crawford, D. und Hildebrand, W. H. (1999): HLA-B15 peptide ligands are preferentially anchored at their C termini, *J Immunol* (Band 162), Nr. 12, S. 7277-84.
- Proietto, A. I.; van Dommelen, S. und Wu, L. (2009): The impact of circulating dendritic cells on the development and differentiation of thymocytes, *Immunology and cell biology* (Band 87), Nr. 1, S. 39-45.
- Qi, Y.; Martin, M. P.; Gao, X.; Jacobson, L.; Goedert, J. J.; Buchbinder, S.; Kirk, G. D.; O'Brien, S. J.; Trowsdale, J. und Carrington, M. (2006): KIR/HLA pleiotropism: protection against both HIV and opportunistic infections, *PLoS pathogens* (Band 2), Nr. 8, S. e79.
- Radka, S. F.; Kostyu, D. D. und Amos, D. B. (1982): A monoclonal antibody directed against the HLA-Bw6 epitope, *Journal of immunology* (Band 128), Nr. 6, S. 2804-6.
- Raghavan, M.; Del Cid, N.; Rizvi, S. M. und Peters, L. R. (2008): MHC class I assembly: out and about, *Trends Immunol* (Band 29), Nr. 9, S. 436-43.
- Rammensee, H.; Bachmann, J.; Emmerich, N. P.; Bachor, O. A. und Stevanovic, S. (1999): SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs, *Immunogenetics* (Band 50), Nr. 3-4, S. 213-9.
- Rebai, N. und Malissen, B. (1983): Structural and genetic analyses of HLA class I molecules using monoclonal xenoantibodies, *Tissue Antigens* (Band 22), Nr. 2, S. 107-17.
- Reche, P. A.; Zhang, H.; Glutting, J. P. und Reinherz, E. L. (2005): EPIMHC: a curated database of MHC-binding peptides for customized computational vaccinology, *Bioinformatics* (Band 21), Nr. 9, S. 2140-1.
- Rehm, Armin; Rohr, Axel; Seitz, Christian; Wonigeit, Kurt; Ziegler, Andreas und Uchanska-Ziegler, Barbara (2000): Structurally diverse forms of HLA-B27 molecules are displayed in vivo in a cell type-dependent manner, *Human Immunology* (Band 61), Nr. 4, S. 408-418.
- Reinherz, E. L.; Kung, P. C.; Goldstein, G.; Levey, R. H. und Schlossman, S. F. (1980): Discrete stages of human intrathymic differentiation: analysis of normal thymocytes and leukemic lymphoblasts of T-cell lineage, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 77), Nr. 3, S. 1588-92.
- Reza, J. N. und Ritter, M. A. (1998): Positive and negative selection in the thymus and the thymic paradox, *Dev Immunol* (Band 5), Nr. 3, S. 161-8.
- Ribeiro, V. S.; Hasan, M.; Wilson, A.; Boucontet, L.; Pereira, P.; Lesjean-Pottier, S.; Satoh-Takayama, N.; Di Santo, J. P. und Vosshenrich, C. A. (2010): Cutting edge: Thymic NK cells develop independently from T cell precursors, *J Immunol* (Band 185), Nr. 9, S. 4993-7.
- Robinson, J.; Mistry, K.; McWilliam, H.; Lopez, R.; Parham, P. und Marsh, SGE (2011): The IMGT/HLA Database, *Nucleic Acids Research* (Band 39 Suppl:D1171-6).
- Robinson, J.; Halliwell, J. A.; McWilliam, H.; Lopez, R.; Parham, P. und Marsh, S. G. (2013): The IMGT/HLA database, *Nucleic Acids Res* (Band 41), Nr. Database issue, S. D1222-7.

- Rossi, F. M.; Corbel, S. Y.; Merzaban, J. S.; Carlow, D. A.; Gossens, K.; Duenas, J.; So, L.; Yi, L. und Ziltener, H. J. (2005): Recruitment of adult thymic progenitors is regulated by P-selectin and its ligand PSGL-1, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 6, S. 626-34.
- Rouse, R. V.; Parham, P.; Grumet, F. C. und Weissman, I. L. (1982): Expression of HLA antigens by human thymic epithelial cells, *Hum Immunol* (Band 5), Nr. 1, S. 21-34.
- Sanjanwala, B.; Draghi, M.; Norman, P. J.; Guethlein, L. A. und Parham, P. (2008): Polymorphic sites away from the Bw4 epitope that affect interaction of Bw4+ HLA-B with KIR3DL1, *Journal of immunology* (Band 181), Nr. 9, S. 6293-300.
- Sanos, S. L.; Nowak, J.; Fallet, M. und Bajenoff, M. (2011): Stromal cell networks regulate thymocyte migration and dendritic cell behavior in the thymus, *J Immunol* (Band 186), Nr. 5, S. 2835-41.
- Schumacher, T. N. und Ploegh, H. L. (1994): Are MHC-bound peptides a nuisance for positive selection?, *Immunity* (Band 1), Nr. 9, S. 721-3.
- Scigelova, M. und Makarov, A. (2006): Orbitrap mass analyzer--overview and applications in proteomics, *Proteomics* (Band 6 Suppl 2), S. 16-21.
- Seitz, Christian (2003): Charakterisierung dreier monoklonaler Antikörper gegen HLA-B27/Peptid-Komplexe, Medizinische Dissertation, Medizinische Fakultät der Charité, Universitätsmedizin Berlin.
- Sevenich, L.; Hagemann, S.; Stoeckle, C.; Tolosa, E.; Peters, C. und Reinheckel, T. (2010): Expression of human cathepsin L or human cathepsin V in mouse thymus mediates positive selection of T helper cells in cathepsin L knock-out mice, *Biochimie* (Band 92), Nr. 11, S. 1674-80.
- Sijts, E. J. und Kloetzel, P. M. (2011): The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses, *Cell Mol Life Sci* (Band 68), Nr. 9, S. 1491-502.
- Song, L.; Lee, C. und Schindler, C. (2011): Deletion of the murine scavenger receptor CD68, *J Lipid Res* (Band 52), Nr. 8, S. 1542-50.
- Spring, B.; Pawelec, G. und Ziegler, A. (1986): Gamma ray-induced mutants as a tool for the production and characterisation of monoclonal antibodies against HLA-alloantigens, *Tissue antigens* (Band 27), Nr. 4, S. 201-8.
- Stam, N. J.; Spits, H. und Ploegh, H. L. (1986): Monoclonal antibodies raised against denatured HLA-B locus heavy chains permit biochemical characterization of certain HLA-C locus products, *J Immunol* (Band 137), Nr. 7, S. 2299-306.
- Starr, T. K.; Jameson, S. C. und Hogquist, K. A. (2003): Positive and negative selection of T cells, *Annual review of immunology* (Band 21), S. 139-76.
- Stefanski, H. E.; Mayerova, D.; Jameson, S. C. und Hogquist, K. A. (2001): A low affinity TCR ligand restores positive selection of CD8+ T cells in vivo, *J Immunol* (Band 166), Nr. 11, S. 6602-7.
- Strominger, J. L. (2010): An alternative path for antigen presentation: group 1 CD1 proteins, *J Immunol* (Band 184), Nr. 7, S. 3303-5.
- Takahama, Y. (2006): Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection, *Nat Rev Immunol* (Band 6), Nr. 2, S. 127-35.
- Takahama, Y.; Nitta, T.; Mat Ripen, A.; Nitta, S.; Murata, S. und Tanaka, K. (2010): Role of thymic cortex-specific self-peptides in positive selection of T cells, *Seminars in immunology* (Band 22), Nr. 5, S. 287-93.
- Takahama, Y.; Takada, K.; Murata, S. und Tanaka, K. (2012): beta5t-containing thymoproteasome: specific expression in thymic cortical epithelial cells and role in positive selection of CD8+ T cells, *Curr Opin Immunol* (Band 24), Nr. 1, S. 92-8.

- Takahama, Y.; Tanaka, K. und Murata, S. (2008): Modest cortex and promiscuous medulla for thymic repertoire formation, *Trends Immunol* (Band 29), Nr. 6, S. 251-5.
- Takamiya, Y.; Sakaguchi, T.; Miwa, K. und Takiguchi, M. (1996): Role of HLA-B*5101 binding nonamer peptides in formation of the HLA-Bw4 public epitope, *International immunology* (Band 8), Nr. 7, S. 1027-34.
- Tan, P.; Kropshofer, H.; Mandelboim, O.; Bulbuc, N.; Hammerling, G. J. und Momburg, F. (2002): Recruitment of MHC class I molecules by tapasin into the transporter associated with antigen processing-associated complex is essential for optimal peptide loading, *Journal of immunology* (Band 168), Nr. 4, S. 1950-60.
- Tomaru, U.; Ishizu, A.; Murata, S.; Miyatake, Y.; Suzuki, S.; Takahashi, S.; Kazamaki, T.; Ohara, J.; Baba, T.; Iwasaki, S.; Fugo, K.; Otsuka, N.; Tanaka, K. und Kasahara, M. (2009): Exclusive expression of proteasome subunit $\beta 5t$ in the human thymic cortex, *Blood* (Band 113), Nr. 21, S. 5186-91.
- Uchanska-Ziegler, B.; Loll, B.; Fabian, H.; Hee, C. S.; Saenger, W. und Ziegler, A. (2012): HLA class I-associated diseases with a suspected autoimmune etiology: HLA-B27 subtypes as a model system, *Eur J Cell Biol* (Band 91), Nr. 4, S. 274-86.
- Ueno, T.; Saito, F.; Gray, D. H.; Kuse, S.; Hieshima, K.; Nakano, H.; Kakiuchi, T.; Lipp, M.; Boyd, R. L. und Takahama, Y. (2004): CCR7 signals are essential for cortex-medulla migration of developing thymocytes, *The Journal of experimental medicine* (Band 200), Nr. 4, S. 493-505.
- Urban, R. G.; Chicz, R. M.; Lane, W. S.; Strominger, J. L.; Rehm, A.; Kenter, M. J.; UytdeHaag, F. G.; Ploegh, H.; Uchanska-Ziegler, B. und Ziegler, A. (1994): A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 4, S. 1534-8.
- Van Rood, J. J. und Van Leeuwen, A. (1963): Leukocyte Grouping. A Method and Its Application, *The Journal of clinical investigation* (Band 42), S. 1382-90.
- Vilches, C.; de Pablo, R.; Herrero, M. J.; Moreno, M. E. und Kreisler, M. (1994): HLA-B73: an atypical HLA-B molecule carrying a Bw6-epitope motif variant and a B pocket identical to HLA-B27, *Immunogenetics* (Band 40), Nr. 2, S. 166.
- Vyas, J. M.; Van der Veen, A. G. und Ploegh, H. L. (2008): The known unknowns of antigen processing and presentation, *Nat Rev Immunol* (Band 8), Nr. 8, S. 607-18.
- Wan, A. M.; Ennis, P.; Parham, P. und Holmes, N. (1986): The primary structure of HLA-A32 suggests a region involved in formation of the Bw4/Bw6 epitopes, *Journal of immunology* (Band 137), Nr. 11, S. 3671-4.
- Waßmuth, R. (2005): Einführung in das HLA-System (Band 2), Ecomed-Verlag, Landberg/Lech, ISBN: ISBN 3-609-16332-1.
- Wei, M. L. und Cresswell, P. (1992): HLA-A2 molecules in an antigen-processing mutant cell contain signal sequence-derived peptides, *Nature* (Band 356), Nr. 6368, S. 443-6.
- Winkler, K.; Winter, A.; Rueckert, C.; Uchanska-Ziegler, B. und Alexiev, U. (2007): Natural MHC class I polymorphism controls the pathway of peptide dissociation from HLA-B27 complexes, *Biophys J* (Band 93), Nr. 8, S. 2743-55.
- Witt, C. M.; Raychaudhuri, S.; Schaefer, B.; Chakraborty, A. K. und Robey, E. A. (2005): Directed migration of positively selected thymocytes visualized in real time, *PLoS biology* (Band 3), Nr. 6, S. e160.
- Yang, S. J.; Ahn, S.; Park, C. S.; Holmes, K. L.; Westrup, J.; Chang, C. H. und Kim, M. G. (2006): The quantitative assessment of MHC II on thymic epithelium: implications in cortical thymocyte development, *Int Immunol* (Band 18), Nr. 5, S. 729-39.

- Yang, S. Y.; Morishima, Y.; Collins, N. H.; Alton, T.; Pollack, M. S.; Yunis, E. J. und Dupont, B. (1984): Comparison of one-dimensional IEF patterns for serologically detectable HLA-A and B allotypes, *Immunogenetics* (Band 19), Nr. 3, S. 217-31.
- Yasutomo, K.; Lucas, B. und Germain, R. N. (2000): TCR signaling for initiation and completion of thymocyte positive selection has distinct requirements for ligand quality and presenting cell type, *J Immunol* (Band 165), Nr. 6, S. 3015-22.
- Young, A. C.; Nathenson, S. G. und Sacchettini, J. C. (1995): Structural studies of class I major histocompatibility complex proteins: insights into antigen presentation, *FASEB J* (Band 9), Nr. 1, S. 26-36.
- Zachariah, M. A. und Cyster, J. G. (2010): Neural crest-derived pericytes promote egress of mature thymocytes at the corticomedullary junction, *Science* (Band 328), Nr. 5982, S. 1129-35.
- Zachow, K. R. und Orr, H. T. (1989): Regulation of HLA class I transcription in T cells, *J Immunol* (Band 143), Nr. 10, S. 3385-9.
- Zhang, Q. J.; Lindquist, Y.; Levitsky, V. und Masucci, M. G. (1996): Solvent exposed side chains of peptides bound to HLA A*1101 have similar effects on the reactivity of alloantibodies and specific TCR, *Int Immunol* (Band 8), Nr. 6, S. 927-38.
- Ziegler, A. und Milstein, C. (1979): A small polypeptide different from beta2-microglobulin associated with a human cell surface antigen, *Nature* (Band 279), Nr. 5710, S. 243-4.
- Ziegler, A.; Müller, C. A.; Bockmann, R. A. und Uchanska-Ziegler, B. (2009): Low-affinity peptides and T-cell selection, *Trends Immunol* (Band 30), Nr. 2, S. 53-60.
- Zinkernagel, R. M. und Althage, A. (1999): On the role of thymic epithelium vs. bone marrow-derived cells in repertoire selection of T cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* (Band 96), Nr. 14, S. 8092-7.
- Zinkernagel, R. M.; Callahan, G. N.; Althage, A.; Cooper, S.; Klein, P. A. und Klein, J. (1978): On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition?, *J Exp Med* (Band 147), Nr. 3, S. 882-96.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Sehr geehrte Damen und Herren,

hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt habe. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Die dargestellten Ergebnisse stammten, abgesehen von den unten angeführten Ausnahmen, aus Versuchen, die ich nach Einweisung durch fachkundiges Personal selbst durchgeführt habe.

- Die HLA-Klasse-I-Typisierung mittels Luminex-Technologie wurde durch Personal des HLA-Labors des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt.
- Massenspektrometrische Messungen und die weitere Datenauswertung erfolgten durch Christian Hotz und Niko Trautwein von der AG Stevanović.

Ich versichere außerdem, dass ich die beigefügte Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und, dass diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

8 Danksagung

Bei Prof. Claudia Müller möchte ich mich für die Überlassung eines faszinierenden Dissertationsthemas, eine stete Präsenz und die Unterstützung über die Entstehung dieser Arbeit hinaus bedanken. Sanja Ćirović gebührt mein Dank für unzählige Hilfestellungen und Tipps bei technischen Fragen im Labor und die angenehme und gleichzeitig produktive Zeit, die wir nebeneinander an der Laborbank verbracht haben. Vielen Dank an Prof. Dr. Stefan Stevanović zusammen mit Christian Hotz und Nico Trautwein für die freundliche Aufnahme und Unterstützung während meines Projekts in der Abteilung für Immunologie sowie an Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee und Dr. Hubert Kalbacher für die Aufnahme in den Sonderforschungsbereich 685. Weiterhin möchte ich mich bedanken bei Dr. Monika Schütz, Dr. Martin Deeg, Inge Steiert, Jutta Gamper-Tsigaras sowie bei den Arbeitsgruppen um Prof. Gerd Klein und Prof. Graham Pawelec.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mir mit festem Rückhalt und großzügiger Unterstützung eine unermessliche Hilfe auf allen Wegstrecken waren.