



Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Fakultät für Klinische Medizin Mannheim
Dissertations-Kurzfassung

**Etablierung eines ELISPOT-basierten ex vivo Analysesystems zur
Charakterisierung antiinfektiöser T-Zellantworten am Modellsystem
der murinen *Listeria monocytogenes*-Infektion**

Autor: Christian Philipp Kamm
Institut / Klinik: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. G. Geginat

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neues Versuchsverfahren zur ex vivo Analyse und Charakterisierung von T-Zellantworten auf der Grundlage des ELISPOT-Testverfahrens entwickelt. Die Anwendung dieser Technik zur Untersuchung der murinen T-Zellantwort gegen *L. monocytogenes* ermöglichte die direkte ex vivo Charakterisierung von der *L. monocytogenes*-spezifischen T-Zellantwort in verschiedenen Mausstämmen.

Mit diesen Versuchsverfahren konnten die bisher bekannten dominanten CD8 T-Zellepitope von *L. monocytogenes* ex vivo nachgewiesen werden. Des Weiteren gelang erstmalig der Nachweis einer immundominanten MHC-Klasse-I-restringierten *L. monocytogenes*-spezifischen T-Zellantwort in C57BL/6-Mäusen. Die Restriktion der unbekanntes T-Zellspezifität konnte ebenfalls aufgeklärt werden.

Aufgrund der ex vivo Gewinnung von T-Zellen und Peptiden konnten über die Stärke der T-Zellreaktion im ELISPOT Rückschlüsse auf die Immunogenität der Peptide gezogen werden. So wurden LLO₉₁₋₉₉ und p60₂₁₇₋₂₂₅ als immundominante Peptide und p60₄₄₉₋₄₅₇ als subdominantes Peptid bestätigt.

Durch den Restimulations-ELISPOT, einer Weiterentwicklung des ELISPOT bei der die Responderzellen zusätzlich in vitro restimuliert und expandiert wurden, konnte die Sensitivität des Tests erhöht werden. Mit dem modifizierten ELISPOT konnten antigene Peptide detektiert werden, die im konventionellen ELISPOT nicht nachgewiesen wurden.

Die direkte ex vivo Analyse der MHC-Klasse-I-Restriktion natürlich-prozessierter Peptide gelang durch die Verwendung transfizierter Zelllinien der APC, die selektiv MHC-Klasse-I-Moleküle exprimieren. Dieses Verfahren ermöglicht somit ohne jegliche Vorkenntnisse die ex vivo Restriktionsanalyse aller auf eine Infektion prozessierten CD8-T-Zellepitope. Auf diese Art und Weise wurden in *L. monocytogenes*-infizierten P388D₁-Zellextrakten die bekannten K^d-restringierten antigenen Peptide festgestellt, sowie in Organextrakten aus *L. monocytogenes*-infizierten C57BL/6-Mäusen die Existenz eines bisher unbekanntes K^b-restringierten antigenen Peptids nachgewiesen.

Grundsätzlich ermöglicht das hier vorgestellte Versuchsverfahren die direkte ex vivo Identifikation und Charakterisierung von T-Zellepitopen. Vorkenntnisse über T-Zellspezifitäten oder antigene Peptide sind hierbei nicht erforderlich, so daß diese Methodik generell zur Analyse von nicht weiter charakterisierten T-Zellantworten eingesetzt werden kann. Die T-Zellepitope können prinzipiell von infektiösen Mikroorganismen, Tumoren und, im Falle von Autoimmunerkrankungen, von körpereigenem Gewebe abstammen. Das für das Modell der murinen *L. monocytogenes*-Infektion entwickelte Versuchsverfahren ist auf die Identifikation und Charakterisierung von humanen T-Zellepitopen übertragbar und könnte für die Erforschung und Diagnostik verschiedenster Krankheiten eingesetzt werden, bei denen T-Zellreaktionen eine Rolle spielen.