

1 Einführung

1.1 Autoimmunität - eine allgemeine Betrachtung

Die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, eine gegen Bestandteile des eigenen Körpers gerichtete Immunreaktion, wird als multifaktoriell angesehen. Neben wichtigen Einflüssen wie der genetischen Disposition und Umweltfaktoren werden auch Infektionen in der Pathogenese als ursächlich angenommen. Zur Untersuchung der von vielen Autoren vermuteten Verbindung zwischen Infektionen und Autoimmunität werden in diesen Betrachtungen oftmals autoreaktive T-Lymphozyten (der Begriff T-Zellen wird im folgenden synonym verwendet) hervorgehoben. Da bekannt ist, dass autoreaktive T- und B-Zellen Bestandteile des normalen Zell-Repertoires sowohl bei Mäusen als auch bei Menschen sind (Kitze et al., 1988; Naquet et al., 1988), wird der Aktivierung von autoreaktiven T-Lymphozyten bei der Entstehung von Autoimmunität eine entscheidende Bedeutung beigemessen. Bis heute ist allerdings unbekannt, wie Infektionskrankheiten Autoimmunität verursachen können. Um die Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten näher zu beschreiben, lassen sich Antigen-spezifische und Antigen-unspezifische Immunantworten mit Aktivierung autoreaktiver T-Lymphozyten unterscheiden. In diesem Zusammenhang wird ein Antigen als ein Molekül bezeichnet, welches eine Antikörperproduktion und eine T-Zellantwort hervorzurufen vermag. Ein Mechanismus der Antigen-unspezifischen Aktivierung ist die sogenannte „Bystander-Aktivierung“, die beschreibt, wie normalerweise tolerante, auto-reaktive T-Lymphozyten in einem entzündlichen Milieu aktiviert werden können. Dies könnte einmal durch sezernierte Botenstoffe innerhalb von Zellverbänden (Zytokine), zum anderen durch die vermehrte Präsenz von sogenannten kostimulatorischen Molekülen (Moleküle, die neben der T-Zell-Rezeptor-Aktivierung in Wechselwirkungen treten) geschehen. In diesem Modell gibt es demnach kein spezifisches T-Zell Antigen. Als Beispiel sei die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen durch virus-induziertes Interferon (IFN)- α genannt (Tough et al., 1996; Ehl et al., 1997). Auch Lipopolysaccharide (Tough et al., 1997) und Lipoproteine (Infante-Duarte und Kamradt, 1997) können als potente Immunmodulatoren wirken. Zu den Antigen-spezifischen Mechanismen der Entstehung von Autoimmunität nach Infektionen zählen bakterielle und virale Superantigene sowie die immunologische Kreuzreaktivität zwischen mikrobiellen- und Selbstantigenen (molekulare Mimikry). Superantigene aktivieren einen großen Teil der T-Lymphozyten in der Körperperipherie, also T-Zellen, die nach den Selektionsvorgängen im Thymus (zentrale Toleranz) in die peripheren lymphatischen Organe gelangt sind. Statistisch besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass sich unter diesen T-Lymphozyten auch autoreaktive T-Zellen befinden,

die, wenn durch Selbstantigene aktiviert, Autoimmunität verursachen können. Allerdings wird ein großer Anteil der durch das Superantigen aktivierten T-Zellen anschließend durch Apoptose beseitigt beziehungsweise durch den Mechanismus der Anergie inaktiviert (Kawabe und Ochi, 1991). Der zweite Antigen-spezifische Mechanismus infektionsbedingter Autoimmunität ist die sogenannte molekulare Mimikry. Diese Hypothese besagt, dass durch Infektion dem Immunsystem des Wirtsorganismus antigene Peptide von Mikroorganismen präsentiert werden, deren Aminosäuren-Sequenz einem Selbstantigen des Wirtes so stark ähnelt, dass T-Zellen, die durch das mikrobielle Antigen aktiviert wurden, in der Lage sind, Zellen, die das homologe Selbstantigen präsentieren, zu erkennen und zu zerstören (Fujinami and Oldstone, 1985; Damian, 1964).

1.2 Träger der angeborenen und adaptiven Immunabwehr

Das Immunsystem hat die Aufgabe, den Organismus möglichst effektiv vor Infektionen aller Art wirksam zu schützen. Dazu tragen die Zellen der angeborenen und erworbenen Immunität bei, die in diesem System unterschiedliche Aufgabenbereiche haben. Angeborene Immunität dient der ersten Infektionsabwehr und ist unspezifisch, was bedeutet, dass kein gezielter Schutz gegen eine erneute Infektion derselben Art aufgebaut wird. Zelluläre Träger dieser Art der Immunität sind im wesentlichen Makrophagen, Granulozyten (Neutrophile, Basophile und Eosinophile), dendritische Zellen und natürliche Killerzellen. Weiterhin verschiedene Enzyme, Interferone und das Komplementsystem. Die Erkennung von Erregern erfolgt aufgrund allgemeiner, häufig wiederkehrender, pathogen-spezifischer Strukturmerkmale, den sogenannten PAMP (engl.: pathogen associated molecular patterns) über PRR (engl.: pattern recognition receptor). Die adaptive Immunantwort ist im Gegensatz dazu in ihrer Antwort spezifisch und wird von B- und T-Lymphozyten getragen. Mit Hilfe ihrer klonalen Oberflächenrezeptoren, die für jede Zelle durch somatische Rekombination aus verschiedenen Gensegmenten zufällig zusammengesetzt werden, sorgen sie für die große Variabilität bei der Erkennung antigener Strukturen. Außerdem sorgen die im Verlauf einer Immunreaktion gebildeten B- und T-Gedächtniszellen für eine schnellere und effektivere Immunreaktion bei erneuter Wechselwirkung mit demselben Antigen.

1.3 T-Lymphozyten im Immunsystem

Die unreifen Vorläuferzellen der T-Lymphozyten aus den pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark migrieren in den Thymus, wo weitere Reifungsschritte im speziellen Mikromilieu durchlaufen werden. Die unreifen Thymozyten (doppelt-negative Zellen), die weder den CD3/TZR-Komplex noch den CD4 oder CD8 Korezeptor exprimieren,

werden nach Umordnung der TZR- β -Gene positiv für CD3 und TZR ($CD3^+/TZR^+$) und exprimieren CD4 als auch CD8 an ihrer Oberfläche. Nach Umordnung der α -Kette des TZR und positiver sowie negativer Selektion mit thymischen Epithelzellen verlassen diese Zellen als $CD4^+ CD8^-$ oder $CD4^- CD8^+$ -Zellen den Thymus. Das Ziel der positiven Selektion durch das Thymusepithel ist das Sicherstellen, dass alle T-Zellen auf Fremdartigene antworten können, die in Form von Selbstpeptid-MHC-Komplexen präsentiert werden. Bei positiver Reaktion mit diesen erhalten die Zellen Überlebenssignale, nicht-reagierende Zellen sterben durch Apoptose. Durch negative Selektion wird erreicht, dass möglichst wenige T-Zellen mit hoher Affinität zu Selbstpeptid-MHC-Komplexen (MHC; Haupthistokompatibilitäts-Komplex, engl.: Major histocompatibility complex) im peripheren T-Zell-Pool erscheinen. T-Zellen erkennen ihr Antigen über einen monoklonalen Rezeptor, den T-Zell-Rezeptor (TZR). Der TZR ist wie das Fab-Fragment der Immunglobuline ein durch Disulfidbrücken verknüpftes Heterodimer, das aus einer α - und einer β -Kette (α/β -T-Zellen) beziehungsweise einer γ - und δ -Kette (γ/δ -T-Zellen) besteht. α/β -T-Zellen können aufgrund ihrer Expression verschiedener Oberflächenmoleküle in zwei Klassen unterteilt werden, die $CD8^+$ -T-Zellen und die $CD4^+$ -T-Zellen (Th-Zellen). Zur Klassifizierung von Oberflächenmolekülen wurden eine große Anzahl membranständiger Glykoproteine mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern bestimmt und nach einer konventionellen internationalen Nomenklatur CD (engl.: cluster of differentiation) systematisch nummeriert und benannt. T-Zellen lassen sich anhand der Zytokinsekretion verschiedenen Subpopulationen zuordnen. Th1-Zellen können CTL (Zytolytische T-Lymphozyten) und Makrophagen durch die Produktion von Interferon (IFN)- γ stimulieren (Dighe et al., 1995). Außerdem können sie die B-Zellen dazu anregen, stark opsonierende Antikörper (IgG2) zu bilden. Th1-Zellen sind für die Abwehr von intrazellulären Bakterien, Viren und Pilzen verantwortlich. Th2-Zellen regen B-Zellen dazu an, sich zu differenzieren und Immunglobuline zu sezernieren, daneben stimulieren sie naive B-Zellen zur Vermehrung. Sie fördern die Produktion von IgG1 und IgE und unterdrücken die Produktion von IgG2 α (Abbas et al., 1996). Ihr Zytokinprofil beinhaltet im wesentlichen die Interleukine IL-4, IL-5, IL-6 (Moosmann et al., 1989) und IL-10 (Fiorentino et al., 1989).

1.3.1 Der T-Zell-Rezeptor und Antigenerkennung

Jede der beiden Ketten des TZR ist ein integrales Membranprotein. Der Aufbau umfasst eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine hydrophobe Transmembrandomäne und zwei extrazelluläre Immunglobulin-Domänen, welche die MHC- und Peptidbindung mitbestimmen (**Abbildung 1**). Die Weiterleitung des Erkennungssignals wird über den TZR-CD3-Komplex

und die assoziierten Korezeptoren CD4 und CD8 vermittelt, wobei die Korezeptoren durch ihre zusätzliche Bindung an das MHC-Molekül stabilisierend wirken. Dabei wird das Signal über sogenannte ITAMS weitergeleitet (engl.: immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) (zytoplasmatische Domänen des CD3-Komplexes, die mit zytosolischen Proteintyrosinkinasen assoziiert sind) und kann durch den CD3-Komplex noch weiter verstärkt werden (Kersh et al., 1998). Der CD3-Komplex (Heterodimere aus γ -, δ - und 2 ϵ -Ketten und ein Homodimer aus 2 ζ -Ketten) ist in der **Abbildung 1** hervorgehoben. Das CD4-Monomer interagiert mit dem MHC-Klasse-II Molekül, CD8 bindet an MHC-Klasse-I Moleküle und stellt bei α/β -T-Zellen ein Heterodimer aus einer α - und einer β -Kette dar.

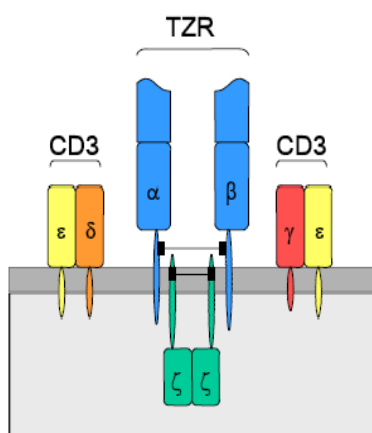


Abbildung 1: Darstellung des TZR mit CD3-Ketten-Komplexen

Der TZR (hier blau dargestellt) ist ein Heterodimer aus je einer hochvariablen α - und β -Kette, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden und im Komplex mit den CD3-Heterodimeren ϵ/δ sowie γ/ϵ und dem CD3-Homodimer ζ/ζ in die Zellmembran eingelagert sind. Die Antigenerkennung findet an den Domänen des α/β -TZR statt. Die sechs CD3-Ketten signalisieren die Antigenbindung ins Zellinnere zur weiteren Verarbeitung (nach Janeway und Travers, Immunologie, 2. Auflage, S. 161, Spektrum-Verlag, 1997).

1.3.2 T-Zellaktivierung

Der erste Zellkontakt zwischen naiver T-Zelle und professioneller antigenpräsentierender Zelle (APZ) wird durch die Adhäsionsmoleküle LFA-1, ICAM-3 und CD2 gesteuert. LFA-1 bindet an ICAM-1 und CD2 an LFA-3 (Dustin et al., 1989). Erkennt eine T-Zelle ihr spezifisches Antigen, bewirkt ein über den T-Zell-Rezeptor vermitteltes Signal eine Konformationsänderung von LFA-1, welches dann enger an die ICAM-Moleküle bindet. Um eine naive T-Zelle zur Effektorzelle zu aktivieren, werden zwei Signale benötigt. Zunächst muss die T-Zelle über ihren TZR/CD3-Komplex den Peptid-MHC-Komplex (folgend als pMHC-Komplex bezeichnet) im Kontext der Korezeptoren CD4 und CD8 erkennen (Signal 1). Auf molekularer Ebene muss neben dem ersten ein zweites Signal zur Aktivierung naiver T-Zellen erfolgen. Dafür werden auf APZ die

Moleküle B7-1 (CD80) und B7-2 (CD86), kurz „B7-Moleküle“, exprimiert, welche als Liganden für das kostimulatorische Molekül CD28 fungieren. Bei Bindung in Kontext der TZR-pMHC-Bindung erfolgt eine erhöhte Produktion von Interleukin 2 (IL-2), welches die klonale Expansion der T-Zellen ermöglicht (Coyle et al., 2000) (**Abbildung 2**).

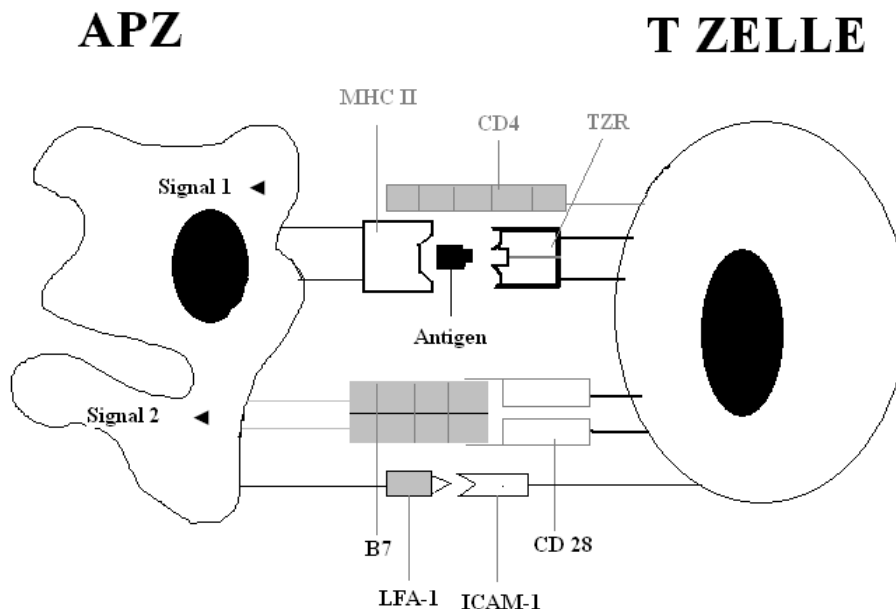


Abbildung 2: T-Zellaktivierung: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen bei der Aktivierung von CD4⁺-Klasse-II-restringierten T-Zellen. Die vollständige Aktivierung erfordert die Bindung des Antigen-MHC-Komplexes an den TZR (Signal 1) und die Interaktion von kostimulatorischen Molekülen (Signal 2), hier die Bindung von B7 auf einer APZ an CD28 auf der T-Zelle. Zur Vervollständigung wird die Wechselwirkung von LFA-1 und ICAM-1, die als Adhäsionsmoleküle den Zellkontakt zwischen APZ und T-Zelle einleiten, hervorgehoben.

Das zweite Signal ist für eine volle Aktivierung, Zell-Proliferation, Verhinderung von Anergie und Induktion der Zelldifferenzierung notwendig. Eine direkte Folge der CD28-B7-Interaktion ist die vermehrte Expression von CD40L (CD40 Ligand) auf der T-Zelle, welches durch Bindung an CD40 auf der APZ stimulierend auf die T-Zelle wirkt. Außerdem wird über CD28 das kürzlich entdeckte ICOS-Molekül (engl.: inducible costimulator molecules) auf der T-Zelle hochreguliert, welches an ICOSL (ICOS Ligand) bindet (Coyle et al., 2000). ICOS unterstützt die Bildung von IFN- γ , TNF- α , IL-4, -5, und IL-10. Ferner wirken Vertreter der TNFR (Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor)-Familie kostimulatorisch, wie CD40, OX-40, 4-1BB und CD30 (Watts et al., 1999). Etwa 24 h nach der ersten Aktivierung der T-Zelle wird die Expression von CTLA-4 (engl.: Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein-4; CD152) induziert, einem höher-affinen Liganden für die B7-Moleküle als CD28 (Chambers et al., 1999), welcher hemmende Signale an die T-Zelle sendet und die T-Zell-Proliferation und positive Kostimulation beendet

(Walunas et al., 1994). Auch die ICOS-Signalgebung kann durch CTLA-4 unterbrochen werden (Riley et al., 2001). Ein weiteres Mitglied der B7-Familie ist das B7-H3-Molekül, welches nicht mit einem der bekannten CD28-Moleküle kommuniziert (Chapoval et al., 2001).

1.4 MHC und Antigenerkennung

Für die Antigenerkennung durch T-Zellen werden die MHC-Moleküle mit dem präsentierten Peptid benötigt. Es handelt sich um Glykoproteine und Heterodimere, die aus vier extrazellulären Domänen bestehen, im Falle des MHC-Klasse-I aus 3 α -Ketten und einem nicht-kovalent an die α 3-Kette gebundenen β 2-Mikroglobulin (Bjorkmann et al., 1987). Die antigene Bindungsstelle wird von der α 1- und der α 2-Kette gebildet. MHC-Klasse-I Moleküle werden auf nahezu allen kernhaltigen Zellen exprimiert und präsentieren zytosolische Peptide (in der Regel 8 bis 10 Aminosäuren lang), die von CD8⁺-T-Zellen erkannt werden. MHC-Klasse-II Moleküle bestehen aus jeweils einer α - und β -Kette, wobei die α 1- und β 1-Ketten die Bindungsgrube für das Peptid bilden. MHC-Klasse-II Moleküle werden konstitutiv nur auf professionellen APZ (B-Zellen, Makrophagen und dendritische Zellen) exprimiert und präsentieren in der Regel Peptide extrazellulärer Antigene, die durch Phagozytose aufgenommen wurden. CD4⁺-T-Helfer-Zellen erkennen diese Peptide von etwa 10-26 Aminosäuren Länge. Ein wesentlicher Unterschied zwischen MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II ist, dass der peptidbindende Spalt beim MHC-Klasse-II Molekül zu beiden Seiten hin offen ist, die Peptidenden somit nicht wie beim MHC-Klasse-I im Zentrum des Moleküls liegen. Auch die Länge der gebundenen Peptide ist wie oben erwähnt unterschiedlich (Chicz et al., 1992). Die MHC-Gene sind hochpolymorph. Die kodierenden *hla*-Gene (engl.: human leucocyte antigens) liegen beim Menschen auf Chromosom 6, die des β 2-Mikroglobulins auf Chromosom 15. Man unterscheidet generell 2 Klassen der HLA-Moleküle, HLA-I mit HLA-A, -B und -C sowie HLA-II mit HLA-DR, -DQ und -DP.

1.5 TZR-pMHC-Bindungskomplex

Auf die MHC-Peptidbindung soll hier näher eingegangen werden, da sie für die Beschreibung meiner Ergebnisse wichtig ist. Bei MHC-Klasse-II Molekülen werden im Gegensatz zu den MHC-Klasse-I Molekülen die Enden der Peptide nicht notwendigerweise gebunden, das Peptid liegt ausgestreckt in der Bindungsgrube vor. Zum einen ragen Peptidseitenketten in flache und tiefe MHC-Bindungstaschen und zum anderen wird das Peptidrückgrat durch Seitengruppen konservierter Aminosäurenreste verankert. Die Bindungstaschen des MHC-Klasse-II Moleküls formen viele Wasserstoff-Bindungen mit der Peptid-Hauptkette, so dass das gebundene Peptid eine definierte Position einnehmen kann. Des Weiteren werden im MHC-Klasse-II Molekül viele

Kontakte mit Peptid-Seitenketten eingegangen, welche die Spezifität der Peptidsequenz für jedes Allel entscheidend mitbestimmen (Hammer et al., 1994). Die für meine Studien wichtigen HLA-DR4-Haplotypen werden hier speziell erwähnt. In vielen Untersuchungen werden aromatische bzw. langkettige aliphatische Aminosäuren für die Haplotypen HLA-DRB1*0101 und DRB1*0401 an der 1. Position (Position p1) der MHC-Bindungsgrube bevorzugt gebunden. Bei Bindung an Position p6 überwiegen kurze und/oder hydrophobe Aminosäurenreste (Hammer et al., 1994; Sette et al., 1993). Die hydrophoben Reste interagieren mit einer tiefen Bindungstasche in der HLA-DR-Bindungsgrube, die aus der invarianten DR- α - und DR- β -Kette geformt wird (Brown et al., 1993; Stern et al., 1994). Eine weitere wichtige Position ist die p4-Bindungsposition, die bei bestimmten HLA-Haplotypen mit der Entwicklung einer Rheumatoiden Arthritis assoziiert ist (Wucherpfennig et al., 1995b). Insgesamt werden an der Position p1 im HLA-DRB1*0401 bevorzugt folgende Aminosäurenreste gebunden (Ein-Buchstabenkode für Aminosäuren im Anhang der Tabelle 8.1): F, I, M, V, W, Y, L; an Position p4: M, I, A, Q, D, E; an Position p6: S, T, N, V und an Position p9: P, H, I, und M (Southwood et al., 1998). Interessanterweise wurden in dieser Arbeit auch Peptide erkannt, die wenig oder keine Sequenzübereinstimmungen mit den bekannten HLA-DRB1*0401-Motiven aufwiesen. Einen Ansatz zur Erklärung dieses Phänomens geben Kristallstrukturen von TZR mit pMHC-Komplexen. Wesentlich sind unter anderem 3 TZR-pMHC-Klasse-I-Komplexe (Garboczi et al., 1996; Ding et al., 1998; Reiser et al., 2000) sowie 2 TZR-pMHC-Klasse-II-Komplexe (Reinherz et al., 1999; Hennecke et al., 2002). Die Interaktion des TZR mit dem pMHC-Komplex kann mit Hilfe der Kristallstrukturen in einzelne Interaktionen unterteilt werden. Neben einer bestimmten Neigungsform - diagonal oder orthogonal - (Garcia et al., 1996; Reinherz et al., 1999) kann sich der TZR auch drehen und kippen (Teng et al., 1998). In den meisten MHC-II-Modellen beträgt der Winkel zwischen Peptidrichtung und TZR-Längsachse 70° bis 80° , wobei eine Grenzfläche zwischen TZR und pMHC-Komplex (engl.: buried surface area) definiert werden kann, die die Analyse einzelner Beiträge zur Gesamtbindung erlaubt. Der Beitrag des Peptids in der pMHC-Seite liegt durchschnittlich bei 28%, während die V α -Domäne des TZR im Durchschnitt 57% einbringt, die V β -Domäne etwa 43% (Rudolph und Wilson, 2002). Die Ansicht der TZR-Oberfläche ist meistens homogen und flach, wohingegen in der MHC-Oberfläche 2 Ausstülpungen (engl.: peaks) aus der Ebene herausragen, zwischen denen der TZR an die pMHC-Oberfläche bindet (**Abbildung 3**).

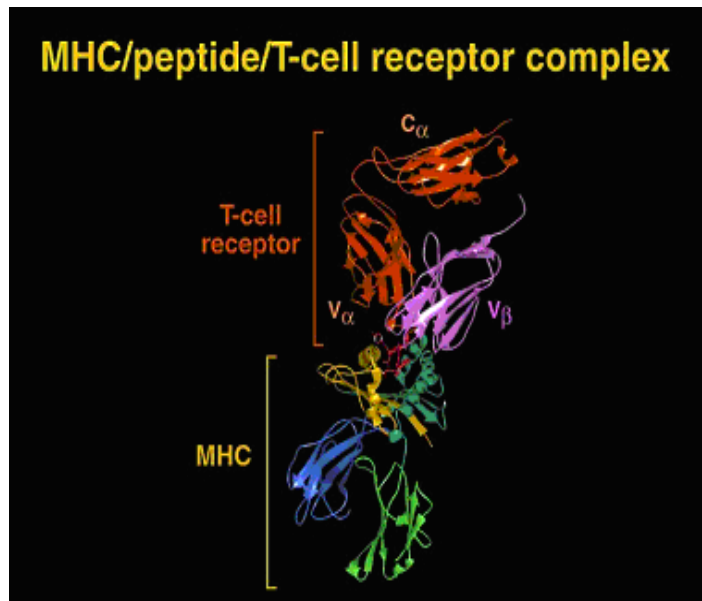


Abbildung 3: Darstellung eines TZR-pMHC-Komplexes (vereinfacht) aus der Bildergalerie der Homepage: www.bmb.psu.edu/faculty/tan/lab/gallery/mhc_ribbon1.jpg. Der T-Zell-Rezeptor bindet an die Oberseite des pMHC-Komplexes, hier an MHC-Klasse-I. Die α -Kette des TZR ($V\alpha$) ist rot, die β -Kette in violett dargestellt ($C\alpha$ für die konstante Region). Die CDR-Schleifen werden hier nicht dargestellt. Die $\alpha 1$ -Domäne des MHC-I ist gelblich, die $\alpha 2$ -Domäne in grün dargestellt, die $\alpha 3$ - und $\beta 2$ -Mikroglobulin-Kette in blau und grün. Zwischen den beiden Domänen ($\alpha 1$ und $\alpha 2$ des MHC) liegt das Peptid (rot). Der TZR liegt diagonal über dem pMHC-Komplex.

Der TZR greift zwischen den MHC-Domänen in diagonaler Orientierung über das Peptid und neigt sich um die Längsachse (Bjorkmann et al., 1997). Der Beitrag des Peptids zur Interaktion besteht vor allem in den Peptidseitenketten, die aus der pMHC-Ebene herausragen und die Spezifität der TZR-pMHC-Interaktion mitbestimmen (Fremont et al., 1992; Silver et al., 1992). Zusammenfassend lässt sich für die MHC-Klasse-I-Modelle sagen, dass sich die Seitenketten der Peptide aus der Ebene der Peptidbindungsgrube herauswölben und mit den Bindungstaschen des TZR (geformt aus CDR3 α , 3 β und 1 β) einen sogenannten „Hot-Spot“ bilden. Funktionelle Hot-Spots für MHC-Klasse-I sind die Positionen p5, p7 und p8 (Rudolph und Wilson, 2002). Die MHC-Klasse-II-Peptide mit ihren Seitenketten sind wegen der starken Wechselwirkungen des Peptidrückgrats mit der Bindungsgrube im Gegensatz zu den MHC-I-Peptiden eher über die TZR-pMHC-Interaktionsfläche verteilt (Stern et al., 1994). Das heißt, dass das Peptid in der TZR-pMHC-I-Bindung die Interaktionsfläche stärker mitbestimmt als in der TZR-pMHC-II-Bindung. Dies geschieht je nach Länge des Peptids und Ladungen der Peptidbindungsgrube, welche aus den polymorphen Aminosäuren-Resten des MHC gebildet wird (Speir et al., 1998). Ausbuchtungen im MHC können ein Herauswölben des Peptids verstärken und so modulierend auf den Kontakt zum TZR wirken (Young et al., 1994). Im Gegensatz zu den Seitenketten ist der Beitrag des Peptidrückgrats zur TZR-Bindung geringer, da das tief in der Bindungsgrube liegende Peptid nur wenige Kontaktpunkte zum TZR herstellen kann. Im HA1.7/HLA-DR4/HA-System (der TZR HA1.7 ist spezifisch für das „hemagglutinin antigen peptide“ des Influenza A-

Virus) (Hennecke und Wiley, 2002) wurde gezeigt, dass lediglich an 3 Positionen Kontakte mit dem TZR ausgebildet werden (Positionen p5 bis p8). In anderen Modellen bildet die Position p5 auch Kontaktpunkte mit dem TZR. Für die Position p2 wird eine Interaktion des Peptidrückgrats mit MHC-Klasse-II-Resten diskutiert (Rudolph und Wilson, 2002). Die übrigen Positionen, insbesondere p1, p4 und p6 bilden wichtige Ankerpositionen (Verankerung des Peptids im MHC-Molekül an Orten starker Peptid-MHC-Wechselwirkungen) für das Peptid im pMHC-Komplex. Peptide können demnach durch ihre Sequenz über Konformationsänderungen im MHC-Molekül zu einer veränderten TZR-Antwort führen. Zusammengefasst trägt das Peptid einerseits über Seitenketten und andererseits über HLA-DR-Konformationsänderungen zur TZR-pMHC-Bindung bei. Da die Kontakte zwischen TZR und Peptid bis auf 2-3 Reste begrenzt sind, können eine Vielzahl von Peptidsequenzen von einem TZR-MHC-Paar gebunden werden. Hinzu kommt, dass Änderungen der Peptidsequenz durch kleine Anpassungen in der TZR-Peptid-Interphase (engl.: induced-fit) kompensiert werden können (Ding et al, 1999).

1.6 Lyme Borreliose - der Erreger

Die Lyme Borreliose ist eine Multi-Systemerkrankung, die durch eine Infektion mit der von Zecken übertragenen Gram-negativen Spirochäte *Borrelia burgdorferi* (*B. burgdorferi*) verursacht wird. Der Erreger wurde 1982 von Willy Burgdorfer entdeckt, nachdem 1975 im Bezirk Lyme (Connecticut, USA) ein gehäuftes Vorkommen von Arthritiden bei Kindern als Manifestation einer Lyme Arthritis beschrieben wurde (Steere et al., 1977). Die Lyme Borreliose ist in den USA mit einer Inzidenz von 20 bis 100 Fällen auf 100.000 Einwohner pro Jahr die am häufigsten durch Arthropoden übertragene Infektionskrankheit. In Europa wird die Inzidenz auf etwa 50.000 Erkrankungen pro Jahr geschätzt (O'Connell et al., 1998). Humanpathogen sind zumindest drei *Borrelia*-Spezies: *B. burgdorferi sensu stricto*, *B. garinii* und *B. afzelii* (Wang et al., 1999), wobei *B. burgdorferi sensu stricto* vornehmlich in Europa und Nordamerika, *B. garinii* in Europa und gemäßigten Regionen Asiens und *B. afzelii* in Europa vorkommen. Es wird vermutet, dass verschiedene klinische Manifestationen der Lyme Borreliose mit bestimmten Spezies von *B. burgdorferi sensu lato* zusammenhängen. Dieser relative Organotropismus könnte das unterschiedliche Erscheinungsbild der Lyme Borreliose in Europa und Amerika erklären (Kamradt, 2002). So wird die späte Hautmanifestation Acrodermatitis chronica atrophicans vor allem mit *B. afzelii* assoziiert (Picken et al., 1998), die Neuroborreliose dagegen mit *B. garinii* (Busch et al., 1996).

1.6.1 Lyme Borreliose - klinische Manifestationen

Vereinfacht lassen sich drei Krankheitsstadien unterscheiden (Steere, 2001). Im 1. Stadium (lokalisierte Infektion) kann sich ein bis vier Wochen nach Zeckenstich ein Erythema migrans (EM), eine ringförmige sich zentrifugal ausbreitende Hautrötung mit zentraler Abblassung, ausbilden. Diese ist in über 90% der Fälle unter Antibiotikatherapie oder unbehandelt innerhalb weniger Tage bis Wochen rückläufig. Durch hämatogene und lymphogene Ausbreitung des Erregers entwickelt sich etwa 2 bis 10 Wochen nach Infektion das 2. Stadium (akute Organmanifestation), das in ca. 50% der Fälle biphasisch verläuft. Typisch sind in dieser Phase wandernde Arthralgien wechselnder Intensität. Unter den neurologischen Krankheitsbildern werden zusammengefasst: Meningitis, Enzephalitis, Hirnnervenlähmungen (vor allem Nervus facialis) und Radikuloneuropathien. Kardiale Manifestationen umfassen Karditiden mit AV-Blöcken. Veränderungen der Haut zeigen sekundäre EM-Läsionen sowie das Bild der Lymphadenosis cutis benigna (Lymphozytom). Rheumatologische Manifestationen sind Myalgien, Arthralgien und Arthritiden. Weiterhin können eine Chorioretinitis, eine Neuritis nervi optici und Uveitis (Panophthalmitis) entstehen. Ohne Therapie kommt es nach monatelangem Verlauf in über 95% der Fälle zur spontanen Remission. Im 3. Stadium (chronische Organmanifestation) treten Myositiden und Arthritiden auf. Etwa 60% der unbehandelten Patienten mit EM erkranken an einer Lyme-Arthritis (Steere 2001), einer rezidivierenden Mono- oder Oligoarthritis, die hauptsächlich große Gelenke der unteren Extremitäten sowie typischerweise ein Kniegelenk betrifft. Weitere Manifestationsformen in diesem Stadium sind: Periphere Neuropathien, subakute Enzephalopathien und progressive Enzephalomyelitiden, ferner die dermatologische Spätmanifestation der Acrodermatitis chronica atrophicans. Die Spätform manifestiert sich im Mittel sechs Monate nach der Infektion. Durch antibiotische Therapie mit Tetrazyklinen bzw. Cephalosporinen werden im Durchschnitt 90 % der Patienten geheilt. Bei ca. 10% der Patienten dauert die Arthritis trotz Behandlung jedoch über ein Jahr an, welche dann als chronische Lyme Arthritis bezeichnet wird. Diese heilt meist im Verlauf mehrerer Jahre aus, kann aber in seltenen Fällen zu radiologischen Erosionen und Gelenkschäden führen (Steere 2001). Sie wird dann als therapieresistent bezeichnet (im folgenden als therapieresistente LA), wenn sie länger als 3 Monate nach antibiotischer Therapie anhält.

1.6.2 Immunantwort auf *Borrelia burgdorferi*

Borrelia burgdorferi vermag das Komplementsystem *in vitro* sowohl über den klassischen als auch über den alternativen Weg zu aktivieren. Neben einer gesteigerten Sekretion von TNF- α

kommt es zu einer Erhöhung der IL6-Spiegel, vor allem durch Makrophagen (Radolf et al., 1995). In den meisten Fällen wird eine Antikörperproduktion durch *B. burgdorferi* hervorgerufen, im Mittel drei bis acht Wochen nach der Infektion, wobei zunächst IgM-Antikörper gegen das 41 kDa Flagellin (Craft et al., 1984) und später Antikörper gegen OspC (Fung et al., 1994) nachweisbar werden. Nach Wochen kommt es dann zur Produktion von Antikörpern gegen p39, OspE und OspF. OspA- und OspB-Antikörper werden oft erst nach Monaten im Serum von Patienten mit chronischer Lyme Arthritis nachweisbar (Craft et al., 1986). Die Oberflächenproteine wirken als Lipoproteine mitogen auf das angeborene Immunsystem (Hirschfeld et al., 1999) und humane B-Zellen (Tai et al., 1994; Radolf et al., 1995). Auch die zelluläre Immunantwort gegen *B. burgdorferi* richtet sich im wesentlichen gegen die Oberflächenproteine des Erregers. Aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit chronischer Lyme Arthritis isolierte humane T-Zellklone produzieren Th1-Zytokine, unter anderem IL-2, GM-CSF, IFN- γ , jedoch kein IL-4 oder IL-5 (Gross et al., 1998a und 1998b). Eine der wichtigsten antigenen Determinanten ist das OspA. Es wird hauptsächlich von Patienten mit therapieresistenter LA erkannt, OspB und in seltenen Fällen OspC sowie p39 eher im Rahmen einer akuten LA (Lengl-Janßen et al., 1994).

1.6.3 Therapie der Lyme Borreliose

Die amerikanische Gesellschaft für Infektionskrankheiten empfiehlt als Therapie der Wahl eine zwei- bis dreiwöchige Gabe von Doxycyclin 2 x 100 mg p.o. pro Tag. Frühe und späte neurologische Manifestationen sollten mit Ceftriaxon (2 g täglich i.v. über 2 bis 4 Wochen) behandelt werden. Die Lyme Arthritis sollte über 30 bis 60 Tage mit Doxycyclin (200 mg p.o. täglich) oder Ceftriaxon (2 g täglich i.v. über 2 bis 4 Wochen) therapiert werden (Wormser et al., 2000). Cephalosporine der 3. Generation wie Ceftriaxon werden oft bei Patienten mit persistierender Symptomatik nach initial erfolgloser Therapie mit Doxycyclin oder Amoxicillin eingesetzt.

1.6.4 Prävention der Lyme Borreliose

Im wesentlichen unterscheidet man rein physikalisch-protective Maßnahmen und die Immunisierung mit einem rekombinanten, lipidierten OspA-Impfstoff. Unter physikalischen Maßnahmen versteht man unter anderem das Meiden wäldlicher Regionen bei Freizeitaktivitäten oder beruflicher Exposition. Weiterhin werden Kleidungsstücke zur Bedeckung freier Hautareale empfohlen. Letztlich ist ein regelmäßiges Überprüfen der exponierten Hautareale auf mögliche Zeckenstiche eine sinnvolle und praktikable Maßnahme, insbesondere vor dem Hintergrund der Beobachtung, dass Zecken 24 bis über 50 Stunden am Wirt persistieren müssen, um *B.*

burgdorferi übertragen zu können (Übersicht in Kamradt 2002). Rekombinant hergestelltes, lipidiertes OspA (LYMErix[®]) wurde 1998 in Amerika als Humanvakzine von der Food and Drug Administration (FDA) zugelassen (Steere et al., 1998). Die Wirkung des Impfstoffes wird derart beschrieben, dass Zecken während der Blutmahlzeit an OspA-immunisierten Wirten Serum-Antikörper gegen OspA aufnehmen, die die Spirochäte im Darm der Zecke abtöten und außerdem die Migration der Spirochäte vom Darm zu den Speicheldrüsen der Zecke blockieren können (de Silva et al., 1996). Zwei Impfstoffe wurden in klinischen Studien analysiert (Steere et al., 1998; Sigal et al., 1998). Dabei wurden keine Unterschiede in der Häufigkeit von spät auftretenden systemischen Nebenwirkungen in der Kontroll- und Placebogruppe beobachtet, und beide Stoffe wurden als sicher und effektiv in der Prävention der Lyme Borreliose eingestuft. Im Jahre 2002 wurde die weitere Herstellung des Impfstoffes LYMErix[®] wieder eingestellt.

1.6.5 Persistenz von *Borrelia burgdorferi*

Wie könnte nun eine chronisch verlaufende Lyme Arthritis entstehen? Einmal wird eine persistierende Infektion mit *B. burgdorferi* diskutiert, wofür eine Persistenz des Erregers notwendige Bedingung ist. Eine Antikörper-Produktion gegen *B. burgdorferi* im Liquor ohne serologisch nachweisbare Aktivität könnte ein Verweilen an immunologisch nicht zugänglichen Orten bedeuten (Hansen et al., 1988). Vorliegende Daten berichten weiterhin über noch Jahre nach Infektion nachweisbare Antikörper gegen *B. burgdorferi* (Kalish et al., 1995), die Hypothese einer Erregerpersistenz unterstützend. Schließlich konnte gezeigt werden, dass *Borrelien* in Makrophagen überleben können (Montgomery et al., 1993). Allerdings gelang bei der therapieresistenten Form der Lyme Arthritis bislang kein Erregernachweis durch Anzucht oder PCR, was jedoch eine Erregerpersistenz nicht ausschließt (Priem et al., 1998). Die erfolglose Therapie mit i.v.-Antibiotika spricht stark gegen eine Erregerpersistenz; hier rückt die infektinduzierte Immunpathologie in den Vordergrund.

1.7 Die Hypothese der infektinduzierten Immunpathologie

Genetische Anfälligkeiten für bestimmte Autoimmunerkrankungen sind in der Literatur hinreichend beschrieben. Auch im Falle der therapieresistenten LA besteht eine klare Korrelation zwischen MHC-Allelen und eben jener Verlaufsform. Dabei handelt es sich um die Haplotypen HLA-DRB1*0401 und HLA-DRB1*0101, die auch mit der Rheumatoiden Arthritis assoziiert sind (Steere et al., 1990). Eine Anfälligkeit für Lyme Arthritis ist auch im Tiermodell mit bestimmten HLA-Haplotypen assoziiert. Balb/c oder DBA/1 Mäuse mit dem Haplotyp H-2d erkranken nicht, C57BL/6 Mäuse (Haplotyp H-2b) haben einen milden Krankheitsverlauf, C3H

Mäuse vom Haplotyp H-2k hingegen erleben nach Borrelieninfektion einen schweren Krankheitsverlauf (Schaible et al., 1991). Weitere Hinweise für eine autoimmune Genese der therapieresistenten LA kommen aus Immunisierungsexperimenten mit Hamstern. Dort entwickelten Hamster, die einige Tage vor Borrelieninfektion mit Borrelienlysat immunisiert wurden, eine chronisch-destruierende Verlaufsform der Lyme Arthritis, nicht jedoch Hamster der nicht-immunisierten Gruppe (Lim et al., 1994). Sogar eine Immunisierung mit OspA vor Borrelieninfektion konnte den schweren Krankheitsverlauf der Lyme Arthritis hervorrufen (Croke et al., 2000). Weitere Untersuchungen an sogenannten scid-Mäusen (engl.: severe combined immune deficiency), denen genetisch bedingt B- und T-Zellen fehlen, zeigten, dass jene eine schwere Verlaufsform der Lyme Arthritis entwickeln (Brown and Reiner, 1999) und dass Zellen der angeborenen Immunabwehr ausreichen, um eine Lyme Arthritis zu bewirken (Schaible et al., 1990). Auch im scid-Maussytem hatten Mäuse auf dem C3H-Hintergrund eine schwerere Verlaufsform der Lyme Arthritis als Mäuse auf dem BALB/c-Hintergrund. Wie erwähnt tritt die Antikörper- und T-Zell-Antwort gegen OspA bei Patienten mit therapieresistenter Form der LA in den Vordergrund. Ein starker Indikator für eine autoimmune Genese und Kreuzreaktivität auf T-Zell-Rezeptor-Ebene ist der Befund, dass T-Zellen von Patienten mit therapieresistenter LA isoliert werden konnten, die OspA₁₆₅₋₁₇₃ und gleichzeitig humanes LFA-1₃₃₂₋₃₄₀ (Leukozyten Funktion assoziiertes Antigen-1) im Kontext des Haplotyps HLA-DRB1 erkennen können (Gross et al., 1998; Gross und Huber, 2000). Die Hypothese der molekularen Mimikry legt das Augenmerk auf die Immunpathologie im Sinne einer immunologischen Kreuzreaktivität zwischen Erreger- und Selbstantigenen.

1.7.1 Molekulare Mimikry - Begriff und immunologischer Mechanismus

Der Begriff molekulare Mimikry beinhaltet übersetzt ein Nachahmen oder Imitieren. Was soll nun imitiert werden? Früher stand die Ansicht im Vordergrund, dass Pathogene der Immunabwehr des Wirts dadurch entgehen, dass sie Ähnlichkeiten zu wirtseigenen Strukturen (beispielsweise Aminosäuren-Sequenzen in Proteinen) vorweisen beziehungsweise entwickeln und dadurch ihre Herkunft tarnen können, so dass das wirtseigene Immunsystem sie nicht als fremdartig erkennt und toleriert. R. T. Damian beschreibt eine ausbleibende Immunreaktion aufgrund einer starken Ähnlichkeit zwischen Erreger- und Wirtsantigenen und fasst dieses Phänomen als molekulare Mimikry zusammen (Damian, 1964). Im weiteren Verlauf der Forschungen wurden Protein-Datenbanken auf homologe Aminosäuren-Sequenzen zwischen viralen, bakteriellen und parasitären Proteinen sowie körpereigenen antigenen Strukturen untersucht, um die als wesentlich für Kreuzreaktivität postulierte Sequenzhomologie näher zu

analysieren und krankheitsrelevante Autoantigene zu identifizieren. Verschiedene virale Sequenzhomologe wurden identifiziert, so auch ein Peptid der Hepatitis B-Virus-Polymerase, das sechs Aminosäuren mit einem immundominanten Epitop des basischen Myelinproteins (engl.: myelin basic protein; MBP) teilt (Fujinami und Oldstone, 1985). Nach Immunisierung von Kaninchen mit diesem Peptid konnte eine B- und T-Zell-Immunantwort gegen MBP beobachtet werden, die zu ZNS-Läsionen führte, jedoch nicht das Vollbild der EAE (engl.: experimental autoimmune encephalomyelitis) hervorrief. Hier wurde molekulare Mimikry als möglicher Mechanismus herangezogen. M. B. Oldstone formulierte kurze Zeit später in der Zeitschrift „Cell“ ausführlich die Grundlagen des Mechanismus der molekularen Mimikry. Molekulare Mimikry kann Autoimmunität nur dann auslösen, wenn Erreger- und Wirtsantigene ähnlich genug sind, um kreuzreaktiv erkannt zu werden, und gleichzeitig verschieden genug, um eine Immunantwort hervorzurufen (Oldstone, 1987). Wie erwähnt wurde dem Aspekt der „Ähnlichkeit“ als Bedingung für Kreuzreaktivität zunächst durch Suche nach Sequenzhomologien zwischen Erreger- und Selbstantigenen Rechnung getragen. Allerdings hatten viele der Peptide keine nachvollziehbare Korrelation mehr zur untersuchten Krankheit. Zusammenfassend beschreibt die Hypothese der molekularen Mimikry einen immunologischen Mechanismus, durch den sich über kreuzreaktive T-Zellen bei Vorliegen einer Infektion eine Reaktion gegen körpereigenes Gewebe entwickelt (Oldstone, 1987). Dazu lässt sich folgendes Szenario aufstellen: Im Verlauf einer Infektion werden mikrobielle Proteine von APZ aufgenommen, prozessiert und im Kontext von MHC-Klasse-II Molekülen auf der Zelloberfläche präsentiert. Wenn eine T-Zelle, potentiell zur Selbstantigen-Erkennung befähigt, durch Peptiderkennung und durch weitere Signale wie kostimulatorische Moleküle in der Peripherie aktiviert wird, kann diese aus der Toleranz in einen Zustand gelangen, in dem sie auch Selbstantigene kreuzreaktiv erkennt. Dadurch könnte es zu folgenschweren Gewebeschäden kommen. Werden nun die entsprechenden Autoantigene im Rahmen einer Autoimmunreaktion fortlaufend präsentiert, ist die Anwesenheit eines Erregerantigens, welches bis dahin für die T-Zell-Aktivierung sorgte, nicht mehr nötig. Die autoimmune Reaktion würde durch fortgesetzte Präsentation der Autoantigene unabhängig von der Präsenz des Erregers unterhalten werden. Trotz der Plausibilität der Hypothese ist bislang kein schlüssiger Beweis erbracht worden, dass dieser Mechanismus *in vivo* zur Autoimmunität oder gar zu einer Autoimmun-erkrankung führt. Daher wird im Diskussionsteil unter anderem diskutiert, welche weitergehenden Funktionen der Mechanismus der molekularen Mimikry haben könnte.

1.7.2 Bedingungen zur Entstehung von Autoimmunität durch molekulare Mimikry

Zur Entstehung von Autoimmunität durch molekulare Mimikry müssen einige Schutzfunktionen der Immunregulation überwunden werden:

- Mikrobielles- und Selbstpeptid müssen prozessiert und präsentiert werden
- das Selbstpeptid muss in genügend hoher Konzentration vorliegen und die kreuzreaktiven T-Zellen in ausreichender Anzahl
- T-Zellen bedürfen kostimulatorischer Signale von professionellen APZ, um proinflammatorische Zytokine zu produzieren, die zu einem Gewebeschaden führen
- T-Zellen müssen Zugang zum Gewebe haben, in dem das kreuzreaktiv zu erkennende Selbst-Antigen exprimiert wird, der Immunregulation entkommend (Kamradt et al., 2001)

Auch wenn alle genannten Punkte erfüllt werden, können Mechanismen der peripheren Toleranz die Entwicklung von Autoimmunität verhindern. Daher sollen nun die wichtigen Toleranzmechanismen als Regulatoren der Immunhomöostase besprochen werden.

1.8 Immunologische Toleranz - zentral und peripher

Durch Rekombination der Gene, die für die antigenen Bindungsstellen des TZR kodieren, ist es möglich bis zu 10^9 verschiedene T-Zellrezeptoren zu kreieren (Delves et al., 2000). Einige von diesen TZR sind in der Lage, Autoantigene zu binden und so an der Einleitung einer Autoimmunreaktion mitzuwirken. Immunologische Toleranz ist der Prozess, welcher diese autoreaktiven Zellen eliminiert oder zumindest ohne Folgen für den Organismus duldet und dessen Verlust zum Auftreten von Autoimmunerkrankungen führen kann. Der wesentliche Mechanismus der zentralen Toleranz ist die Deletion selbstreaktiver T-Zellen im Thymus. Unreife, aus dem Knochenmark eingewanderte, T-Zellen begegnen endogenen Peptiden, die an MHC gebunden präsentiert werden. Über Wechselwirkungen mit Thymusepithelzellen und nicht-lymphatischen Zellen findet hier die Selektion von T-Lymphozyten für den peripheren T-Zell-Pool statt (Sprent et al., 1988; Schwartz 1989). T-Zellen mit geringer Affinität für diese pMHC-Komplexe erhalten keine Überlebenssignale und sterben durch programmierten Zelltod (Apoptose). Die verbleibenden T-Zellen mit mittelstarker Affinität für diese Komplexe reifen im Thymus heran (Von Böhmer und Kisielow, 1993) und gelangen anschließend in den peripheren T-Zell-Pool. Da nicht alle Autoantigene im Thymus präsentiert werden, sind auch periphere Mechanismen der Toleranzerhaltung nötig. Die Effizienz der zentralen Toleranz hängt vom Grad des durch Stromazellen präsentierten Antigens ab (Akkaraju et al., 1997). Einige T-Zellen entgehen der negativen Selektion, da erstens nicht alle Autoantigene im Thymus präsentiert, und

sie zweitens nicht in ausreichender Menge oder geeigneter Form (nicht-membrangebunden) dargeboten werden (Vafiadis et al., 1997). Für die periphere Toleranz sorgen im wesentlichen zwei Mechanismen: Klonale Deletion und Anergie.

1.8.1 Klonale Deletion

Sie reguliert die überschießende Immunantwort, wobei Effektorzellen nach klonaler Expansion und Reaktion mit dem Antigen wieder eliminiert werden. Fehlende kostimulatorische Signale in der Peripherie bewirken, dass T-Zellen nicht aktiviert oder deletiert werden (Akkarayu et al., 1997). Ein weiterer Mechanismus der Deletion ist die Konkurrenz von T-Zellen um die Zytokine (Wachstumsfaktoren), wobei ein Mangel an diesen (Förster et al., 1995) das Absterben der Zelle bewirkt. Der wohl wichtigste Mechanismus ist der sogenannte AICD (engl.: activation induced cell death) über Fas/Fas-Ligand (FasL), wobei Fas (CD95) in nahezu allen Zellen, die den Fas-Liganden (CD95L) exprimieren, Apoptose induziert (Suda et al., 1993). Das verdeutlicht die Tatsache, dass eine Korrelation zwischen Patienten mit defektem Fas-System und der Manifestation eines lymphoproliferativen Syndroms beobachtet wurde (Rieux-Laucat et al., 1995). T-Zellen können nach Aktivierung Fas/FasL auf ihrer Oberfläche hochregulieren, so dass eine weitreichende Interaktion zwischen den Zellen möglich ist (Dhein et al., 1995). AICD ist vom sogenannten passiven Zelltod durch zu geringe Stimulation der T-Zelle mit nachfolgender Apoptose abzugrenzen.

1.8.2 Anergie

Zellen, die weder IL-2 produzieren noch deletiert werden, nachdem sie Selbstantigene erkannt haben, treten in den Zustand der Anergie (engl.: functional unresponsiveness) (Lamb et al., 1983). Bekannt ist, dass naive T-Zellen ohne kostimulatorische Signale anerg werden (Schwartz et al., 1996). Dies konnte sowohl *in vitro* (Jenkins und Schwartz, 1987) als auch *in vivo* gezeigt werden (Falb et al., 1996). Über die Mechanismen der Aufrechterhaltung des anergen Zustandes herrscht weiterhin Unklarheit. Weiterhin ist bekannt, dass antigenspezifische T-Zellen durch eine nicht-immunogene Antigenapplikation zwar noch vorhanden sind, jedoch durch IL-2-Mangel weder expandieren noch systemische Immunantworten auslösen (Jenkins et al., 1991). Auch ist die Rolle, die anerge Zellen für die Aufrechterhaltung der Toleranz spielen, nicht geklärt, ebenso wenig das Ausmaß, das dieser Mechanismus der peripheren Toleranz *in vivo* einnimmt. Auf molekularer Ebene kann Anergie durch eine negative Regulation der IL-2-Gentranskription bedingt sein (DeSilva et al., 1996). Auch können Peptide mit minimal veränderter Sequenz einen Zustand der Anergie erzeugen (Sloan-Lancaster et al., 1993).

1.8.3 Ignoranz

Die Beobachtung, daß genetisch unveränderte Tiere durch Immunisierung mit Selbstantigenen in Adjuvans Autoimmunkrankheiten entwickeln können, legt den Schluß nahe, daß diese potentiell autoreaktive T-Zellen innehaben. Dies gilt auch für menschliche B- und T-Zellen, die nach ihrer Isolierung myelins basisches Protein (MBP) erkennen, obwohl diese Personen weder an Diabetes noch an Multipler Sklerose erkrankt sind (Naquet et al., 1988). Ein anschauliches Experiment verdeutlicht diesen Mechanismus: Mäuse, transgen für einen T-Zell-Rezeptor, der ein bestimmtes virales Peptid des Lymphozytischen Choriomeningitis-Virus (LCMV) erkennt, wurden mit Mäusen, die dieses virale Peptid unter der Kontrolle des Insulinpromoters auf der Oberfläche von pankreatischen Inselzellen exprimieren, gekreuzt. Virus-Protein wurde somit zum Selbst-Protein umfunktioniert. Ihre Nachkommen entwickelten keinen Diabetes (Oldstone et al., 1991; Ohashi et al., 1991), obwohl die isolierten T-Zellen der Mäuse die das virale Peptid präsentierenden Zellen *in vitro* eliminieren konnten. Erst nach Infektion mit dem LCMV entwickelten über 95% der Mäuse eine zytotoxische T-Zell-Antwort mit folgendem Diabetes mellitus. Dies bedeutet, daß die potentiell autoreaktiven T-Zellen ihr verwandtes Antigen ignorieren, solange keine systemische Infektion für ihre Aktivierung sorgt. Immunologische Ignoranz kann durch verschiedene Mechanismen in Kraft treten: Fehlende Kostimulation bei der Präsentation von Selbstantigenen (Janeway CA, Jr, 1992); Separation des T-Zell-Antigens (Barker et al., 1977); zu niedrige Antigen-Konzentrationen; Anergie oder Deletion (Ferber et al., 1994); eine vermehrte FasL-Expression mit folgender Apoptose (Badley et al., 1997); Hilflosigkeit der CD8⁺-T-Zellen ohne CD4⁺-T-Zell Hilfe (Lanzavecchia et al., 1998).

1.8.4 Immundeviation

Mäuse, die einen transgenen TZR für MBP besitzen, bleiben für gewöhnlich gesund, da ihre T-Zellen das spezifische Antigen ignorieren (Lafaille et al., 1994), doch kann EAE durch Injektion von MBP in Adjuvanslösung bei den Mäusen ausgelöst werden. Werden diese Mäuse genetisch so verändert, dass alle T-Zellen nur den MBP-transgenen Rezeptor exprimieren, entwickeln alle Mäuse EAE ohne Remission. Die Zellen, die dies bei den unveränderten Mäusen verhindern, sind CD4⁺-T-Zellen (Van de Keere et al., 1998). Die molekularen Mechanismen dieser Regulation sind unbekannt, wobei angenommen wird, dass Zytokine eine entscheidende Rolle spielen, beispielsweise TGF- β und IL-10 (Powrie et al., 1996). Diese durch regulatorische Zytokine bewirkte Suppression nennt man Immundeviation (Röcken et al., 1996).

1.8.5 Hemmende Rezeptoren

CTLA-4 (CD152) bindet mit vielfach höherer Affinität an CD80 und CD86 als CD28 und sendet hemmende Signale an die T-Zelle. Dadurch werden überschießende T-Zellantworten nach Elimination des Pathogens verhindert und die mögliche Gefahr einer Autoimmunität herabgesetzt (Chambers et al., 1999). Ein Beispiel dafür ist die Blockade von CD152 in Mäusen, welche die Progression eines autoimmunen Diabetes noch beschleunigen kann (Lühder et al., 2000). Einer anderen Familie zugehörig sind die hemmenden Rezeptoren, die auf humanen T-Zellen exprimiert werden und T-Zell-Aktivität durch die Rekrutierung von Phosphatasen blockieren können (Long et al., 1994).

1.8.6 Verlust der T-Zell Toleranz

Trotz der vielfältigen extrathymischen Toleranzmechanismen können Autoimmunkrankheiten entstehen. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Deletion potentiell autoreaktiver T-Zellen im Thymus durch negative Selektion nicht immer zuverlässig effektiv ist (Klein et al., 2000). Ein Hinweis darauf findet sich beim Autoimmundiabetes, bei dem Gene für eine gesteigerte Anfälligkeit gegenüber der Erkrankung sorgen, die unter anderem den Level der Insulinexpression im Thymus mitbestimmen. Es existiert also eine erblich bedingte Differenz in der Expression von endogenen Antigenen im Thymus (Vafiadis et al., 1997). Ein weiterer Grund für den Verlust von Toleranz könnte darin begründet liegen, dass etwa ein Drittel der peripheren T-Zellen zwei unterschiedliche T-Zell-Rezeptoren exprimiert. Dies liegt an der unterschiedlichen Rearrangierung der Gene für die α - bzw. β -Kette des TZR. Zunächst wird das Gen für die β -Kette im Reifeprozess auf einem der beiden Chromosomen rearrangiert. Sobald eine β -Kette produziert wurde, stoppt dieser Prozess; die Gene für die α -Kette werden auf beiden Chromosomen umgelagert, können also zwei α -Ketten bilden und mit der β -Kette kombiniert werden, so daß zwei verschiedene TZR mit derselben β -Kette entstehen (Malissen et al., 1988) und einen potentiell autoreaktiven TZR bilden könnten. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anfälligkeit für Autoimmunerkrankungen und bestimmten Genorten im menschlichen Genom wird für Multiple Sklerose, Typ-I Diabetes, systemischen Lupus erythematodes und für Morbus Crohn angenommen. Die entdeckten Regionen umfassen unter anderem Gene für Zytokine, Zytokin-Rezeptoren und andere immunregulatorische Proteine (Becker et al., 1998). Eine Hypothese des Toleranzverlusts ist die der Infektion mit folgender Autoimmunreaktion durch molekulare Mimikry, die nun am Beispiel der therapieresistenten Lyme Arthritis abschließend beschrieben wird.

1.8.7 Von der Infektion zur Autoimmunität

Wie anfangs erwähnt, werden Infektionen als mögliche Auslöser von Autoimmunreaktionen diskutiert (Kamradt et al., 2001). In vielen Fällen finden sich Antikörper oder T-Zellen, die Selbstantigene und mikrobielle Antigene erkennen können. Werden die oben beschriebenen Mechanismen der Selbst-Toleranz überwunden, kann sich eine B- und T-Zell vermittelte Immunantwort entwickeln, die gegen körpereigenes Gewebe gerichtet ist. Ein klassisches Beispiel ist das rheumatische Fieber, welches nach Infektion mit *β-hämolyisierenden A-Streptokokken* auftritt (Guilherme et al., 2001). Im Serum der Patienten findet man Antikörper gegen das M5-Protein der Streptokokkenmembran, die mit dem myokardialen Myosin-Protein kreuzreagieren. Weitere Beispiele für eine Verbindung zwischen Infektion und Autoimmunität sind das *B3 Coxsackievirus* und Myokarditis (Lawson, 2000) sowie *Borrelia burgdorferi* und Lyme Arthritis (Steere et al., 2001). Im Falle des Typ-I Diabetes werden die humane Glutamat-Decarboxylase und das P2-C-Protein des humanen *Coxsackievirus* von T-Zellen kreuzerkannt (Atkinson et al., 1994). Zahlreiche Modelle und Mechanismen sind für die Entstehung bzw. Aufrechterhaltung eines solchen „gegen sich selbst“ gerichteten Prozesses aufgestellt worden. Sind diese Befunde von kreuzreaktiven T-Zellen sowie Antikörpern auch krankheitsrelevant?

1.9 Kreuzreaktivität und Entwicklung eines transgenen Mausmodells

In Immunisierungsexperimenten an Tieren mit kreuzreaktiv erkannten Peptiden konnte in einigen Fällen Autoimmunität ausgelöst werden (van Eden et al., 1985). Beispielsweise führte die Gabe von Hepatitis B-Polymerase-Peptid₅₈₉₋₅₉₈ unter Kreuzerkennung von MBP bei Kaninchen zu histologischen Anzeichen von EAE (Fujinami and Oldstone, 1985). Welche Hinweise auf eine Immunpathologie durch Kreuzreaktivität gibt es bei der therapieresistenten LA? Wie erwähnt, sind HLA-DR4-Haplotyp und T-Zell-Antwort gegen OspA von *B. burgdorferi* mit der therapieresistenten LA assoziiert (Steere et al., 1990). Weiterhin wird die HLA-DR4-restringierte T-Zell-Reaktivität gegen OspA als Ursache einer chronischen Synovitis durch molekulare Mimikry angesehen. Kürzlich konnten T-Zellen aus der Synovialflüssigkeit von Patienten mit therapieresistenter LA isoliert werden, die ein immundominantes Epitop von OspA und ein homologes Peptid von LFA-1 (Gross et al., 1998) kreuzerkannten. All dies weist auf die mögliche Existenz eines arthritogenen OspA-Epitops hin. Daher wurde, um die HLA-DR4-restringierte TZR-vermittelte Erkennung des OspA von *B. burgdorferi* zu studieren, ein humanisiertes Mausmodell entwickelt, in dem die Mäuse transgen für HLA-DRA*0101/HLA-DRB*0401 (folgend DR4) sowie für das humane CD4 (huCD4) sind und keine murinen MHC-II-Moleküle tragen (I-Ab^{-/-}) (Fugger et al., 1994). Somit konnten unsere Untersuchungen zur

Kreuzreaktivität HLA-DR4-restringierter T-Zellen eng an die menschliche Situation angepasst werden. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, dass HLA-transgene Mäuse ein geeignetes Modellsystem sind, um die menschliche Immunantwort zu studieren, und weiterhin, die murinen Befunde im menschlichen System zu reproduzieren (Übersicht in Parry et al., 1998).

1.9.1 OspA und potentiell kreuzreaktive Selbstpeptide

Bei meinen Untersuchungen suchte ich ausgehend von OspA nach kreuzreaktiven Selbstliganden (Selbstpeptiden). Dabei versuchte ich, die individuellen Erkennungseigenschaften eines jeden OspA-spezifischen TZR hinsichtlich der erkannten Peptidsequenzen zu ermitteln. Die Methode der Substitutionsanalyse gegebener Peptidsequenzen erlaubte die Definition eines Erkennungsmotivs für jeden TZR (Supertop). Mit den Erkennungsmotiven wurden öffentliche Proteindatenbanken durchsucht, um murine und humane Peptide zu definieren, die die OspA-spezifischen TZR aktivieren können. Die Methode der Aminosäuren-Substitution berücksichtigt die kürzlich erfasste Tatsache, dass Peptidliganden auch ohne Sequenzhomologie zum Ausgangspeptid, von spezifischen T-Zellen erkannt werden können (Hemmer et al., 1998) und geht somit auf die Annahme einer großen Flexibilität in der Peptiderkennung durch T-Zellen ein (Mason, 1998).

1.9.2 Ziele der vorliegenden Arbeit

Aufgrund verschiedener experimenteller, klinischer und epidemiologischer Daten, die auf eine Immunantwort des Wirtes gegen *B. burgdorferi* im Rahmen der Pathogenese der therapieresistenten LA hinweisen, formulierten wir die Hypothese, dass *B. burgdorferi*-spezifische T-Zellen genetisch prädisponierter Patienten durch Kreuzerkennung eines Selbstantigens arthritogen wirken könnten. Daher sollte zunächst die HLA-DR4-restringierte T-Zell-Antwort gegen OspA und OspA-Peptide näher charakterisiert werden. Mit Hilfe der durch die Substitutionsanalysen gewonnenen Erkennungsmotive (Supertope) sollten in öffentlichen Proteindatenbanken Selbstpeptide identifiziert werden, die von OspA-spezifischen T-Zellen erkannt werden. Diese Untersuchungen sollten uns dazu verhelfen, die Hypothese der molekularen Mimikry im Hinblick auf Kreuzreaktivität zwischen OspA und erkannten Selbstpeptiden genau zu untersuchen. Im Einzelnen sollte dabei folgendermaßen vorgegangen werden:

1. Charakterisierung der jeweiligen Hybridom-TZR-Erkennungsmotive (Supertope) durch Aminosäuren-Substitutionen. Hierbei sollte jeweils an einer Position der Peptide OspA₁₄₅₋₁₅₆, OspA₁₄₉₋₁₆₀ und OspA₁₆₄₋₁₇₅ eine Aminosäure ausgetauscht werden. An jede Position wurde jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren gesetzt. Durch „erlaubte“ und

- „nicht-erlaubte“ Substitutionen sollte eine Charakterisierung der Supertope der Hybridom-TZR erreicht werden.
2. Definition von Selbstpeptiden, die von OspA-spezifischen HLA-DR4-restringierten T-Zellen kreuzerkannt werden. Ausgehend von den definierten Erkennungsmotiven der getesteten Hybridom-TZR sollten aus öffentlichen Proteindatenbanken Selbstantigene bestimmt werden, die von den OspA-spezifischen Hybridomen kreuzerkannt werden. Anschließend sollten diese Selbstantigene nach Synthese mittels beschriebener Spot-Synthesetechnik auf ihre Erkennung durch die jeweiligen OspA-spezifischen Hybridome getestet werden.
 3. Entwicklung einer dosisabhängigen Erkennung OspA-spezifischer Hybridome auf nachweislich kreuzerkannte Selbstpeptide. Hierbei war die Frage, ob es Selbstpeptide gibt, die die OspA-spezifischen Hybridome stärker aktivieren können als OspA.
 4. Schließlich sollte durch sogenannte Modellierungsexperimente eine Charakterisierung der Bindung von OspA-Peptiden und Selbstpeptiden durch Variation der Seitenkettenwinkel in der pMHC-Bindung erreicht werden. Dazu sollte nach Festlegung abgeleiteter Ankerpositionen im MHC-Molekül ein Peptid minimaler Länge auf bekannte Positionen in eine HLA-DR4-Kristallstruktur modelliert (eingerechnet) werden.