

3 Ergebnisse

3.1 Verkürzungsanalysen OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischer Hybridome -Vorergebnisse

3.1.1 Identifizierung der 4 immundominanten Epitope im OspA-Molekül

In Vorarbeiten von B. Maier aus unserer Arbeitsgruppe wurden im Vorfeld 4 immundominante Epitope für OspA-spezifische HLA-DR4-restringierte T-Zell Hybridome im OspA-Molekül identifiziert. Diese Regionen (OspA₁₄₆₋₁₆₅, OspA₁₅₆₋₁₈₀, OspA₁₆₁₋₁₉₅ und OspA₂₃₁₋₂₅₀) sind in der C-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert. Zur Eingrenzung der Epitopbereiche, das heißt zur genauen Lagebestimmung dieser Epitopsequenzen innerhalb der HLA-Bindungsgrube, wurden 16-mer Peptide durch die Bereiche OspA₁₄₆₋₁₆₅, OspA₁₅₆₋₁₈₀ und OspA₂₃₁₋₂₅₀ gelegt und in folgenden Verkürzungsanalysen vom N- und C-terminalen Ende bis auf 6-mer Peptide reduziert. Die **Abbildung 4** zeigt schematisch das Prinzip der Verkürzungsanalyse für den Bereich OspA₁₆₄₋₁₇₅ mit dem N- und C-Terminus.

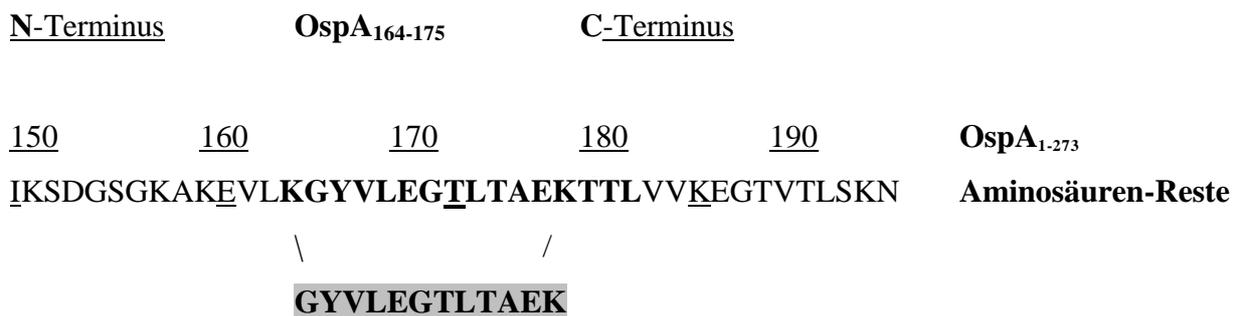


Abbildung 4: Prinzip der Verkürzungsanalyse eines 16-mer Ausgangspeptids im OspA₁₆₄₋₁₇₅-Bereich zur Eingrenzung des Bindungsepitops

Um den OspA₁₆₄₋₁₇₅-Bereich wurde ein 16-mer Ausgangspeptid der Position 163-178 gewählt, um durch systematische Verkürzungen am C- und N-Terminus ein möglichst kleines Bindungsepitop zu ermitteln (minimales Epitop), welches später in die Substitutionsanalyse eingegeben wurde. Die Erkennung durch die OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome wurde in einem IL-2-ELISA dokumentiert.

3.1.2 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome in der Verkürzungsanalyse

Für die Verkürzungsanalysen des Epitopbereichs OspA₁₆₄₋₁₇₅ wurden 5 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome aus einem Hybridom-Pool ausgewählt, der in den Vorarbeiten von B. Maier zur Identifizierung der immundominanten OspA-Epitope hergestellt worden war. Aus den insgesamt 982 hergestellten T-Zell Hybridomen erkannten 560 Hybridome das OspA spezifisch. Von diesen wurden 106 zufällig ausgewählte Hybridome auf die Erkennung von 20-mer Peptiden, die die gesamte OspA-Sequenz umfassten, in einem IL-2-ELISA getestet. Von diesen erkannten

insgesamt 32 Hybridome den Bereich OspA₁₆₄₋₁₇₅ spezifisch. Aus diesen 32 wurden 5 klonierte OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome zufällig ausgewählt und in den Verkürzungsanalysen eingesetzt. Ziel dieser Analysen war es, ein Minimalepitop zu bestimmen und über dieses die HLA-Bindungsregion in Kenntnis der HLA-DR4-Ankerpositionen (wesentliche Positionen für die Peptid-HLA-DR-Interaktionen) abzuleiten. Mit diesen Informationen sollte die Lage des Peptids in der HLA-Bindungsgrube abgeschätzt werden, um den für die folgenden Substitutionsanalysen wichtigen Bereich in die Mitte der substituierten Peptide legen zu können. In den folgenden Abbildungen sind die OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen klonierten Hybridome 376/5 und 170/1 gezeigt. Bei den folgenden Verkürzungsanalysen sowie den sich anschließenden Substitutionsanalysen werden die im Anhang unter Tabelle 8.1 beschriebenen Ein-Buchstabenkodes für Aminosäuren verwendet. Dabei wird der betreffende Aminosäuren-Rest mit der Positionsnummer des OspA-Abschnitts kombiniert (beispielsweise der Y165-Rest des OspA₁₆₄₋₁₇₅). Die Molekulargewichte der einzelnen Aminosäuren können der Tabelle ebenfalls entnommen werden. Abschließend werden alle minimalen Epitope der getesteten OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome tabellarisch zusammen-gefasst.

3.1.3 Verkürzungsanalyse: Hybridom 376/5

Für das Hybridom 376/5 in **Abbildung 5** waren folgende Bindungsmerkmale charakteristisch: Der erste Abbruch der Peptiderkennung wurde bei einem Verlust des N-terminalen Tyrosins (Y) an Position OspA₁₆₅ (Y165) deutlich, einer Aminosäure mit ungeladenem Rest. Den C-Terminus betreffend hing die Erkennung des Peptids auch von dem K175-Rest ab. Wenn die positiv geladene Aminosäure K am C-Terminus erschien, wurde das Peptid bis zum 10-mer erkannt. Bei Verlust des K-Rests wurde eine Peptiderkennung unabhängig der Reste am N-Terminus vereitelt. Durch Hinzunahme von K am C-Terminus konnte die trotz Y165-Rest vormals nicht erkannte Sequenz *YVLEGLTAE* als *VLEGLTAEK* wieder erkannt werden. Somit konnte der K-Rest ein Verlust des Y-Rest an vermuteter Position p1 kompensieren, was bei den 13- und 12-mer Peptiden, deren Sequenz mit V166 am N-Terminus begann, nicht der Fall war. Da der K175-Rest nicht im zentralen Epitopeteil, sondern am Rand des C-Terminus lag, ließ sich vermuten, dass nicht die Peptid-MHC-Interaktionen mit den Anker-Positionen p4, p6 und p9 für die Peptiderkennung entscheidend waren, sondern möglicherweise Seitenketteneffekte des K-Rests, der mit dem TZR durch ein Hervorwölben aus der MHC-Bindungsgrube interagiert haben könnte.

Als minimales Epitop für das Hybridom 170/1 konnte die Sequenz *VLEGTLT*₁₆₆₋₁₇₂ definiert werden. Es ist nicht sicher, wo hier die p1-Position zu liegen kommt. Wahrscheinlich befindet sich der Y165-Rest an p1. Auch hier wäre eine leere p1-Peptidbindungstasche denkbar. In diesem Fall blieben E168 und T170 an den Positionen p4 und p6. Die übrigen Hybridome mit ihren minimalen Epitopen werden im nächsten Abschnitt tabellarisch zusammengefasst.

3.2 Minimalepitope nach Verkürzungsanalysen OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischer Hybridome

Zusammengenommen ergaben sich für die Verkürzungsergebnisse der OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome eine relativ einheitliche Bindungscharakteristiken bei den längeren Peptiden (13- bis 10-mer Peptidlänge) und individuelle Erkennungsbedingungen bei den kürzeren Peptidlängen (10- bis 7-mer Peptidlänge). Mit Ausnahme des Hybridoms 170/1 brach bei allen anderen Hybridomen die Erkennung im 13-mer Peptid ab, sobald das N-terminale Y165 fehlte. Das Hybridom 170/1 benötigte zur Erkennung das N-terminale G164 vor dem Y165-Rest. Die gleiche Charakteristik ergab sich im 12- und 11-mer Peptid für deren Erkennung. Bei den 10-mer Peptiden ergaben sich Differenzen in den Erkennungsbedingungen der Hybridome. Im Fall der Hybridome 26/1, 170/1 und 257/4 bestätigte sich das Muster aus den längeren Peptidsequenzen (11-mer, 12-mer), bei den Hybridomen 169/5 und 376/5 zeigte sich keine bevorzugte Erkennung der Peptide mit Y165- Rest am Anfang, jedoch bei Wegfall des Y165 Rests und Hinzunahme des K175-Rests. Diese beiden Hybridome erkannten dann auch kein 9-, 8- oder 7-mer Peptid mehr. Im Gegensatz dazu waren die Hybridome aus der ersten Gruppe noch in der Lage, 9-mer Peptide und kürzere Sequenzen zu erkennen, wobei nur das Hybridom 170/1 ein 7-mer Peptid in OspA vergleichbarer Stärke erkannte. Den anderen Hybridomen 257/4 und 26/1 wurde jeweils ein 9-mer Peptid als minimales Epitop zugeordnet. **Tabelle 1** zeigt die 7- bis 10-mer Peptide für OspA₁₆₄₋₁₇₅:

Tabelle 1 : Sequenz der minimalen Epitope

Darstellung der gemeinsamen Aminosäuren-Reste in den minimalen Epitopen der Hybridome 26/1, 169/5, 170/1, 257/4 und 376/5. Die einheitliche Sequenz *VLEGTLT*₁₆₆₋₁₇₂ wurde von allen Hybridomen erkannt.

Minimales Epitop		Sequenzlänge	Hybridom
VLEGTLTAEK	(OspA ₁₆₆₋₁₇₅)	10-mer Peptid	# 376/5
VLEGTLT	(OspA ₁₆₆₋₁₇₂)	7-mer Peptid	# 170/1
YVLEGTLTA	(OspA ₁₆₅₋₁₇₃)	9-mer Peptid	# 169/5
YVLEGTLTA	(OspA ₁₆₅₋₁₇₃)	9-mer Peptid	# 257/4
YVLEGTLTA	(OspA ₁₆₅₋₁₇₃)	9-mer Peptid	# 26/1

Anhand der identifizierten minimalen Epitope wurden die Bindungsregionen der immundominanten Epitope des OspA abgeleitet. Es erfolgte eine Nummerierung der Aminosäuren-Reste vom N-Terminus aus, wobei die oben erwähnten Ankerpositionen beschrieben wurden. Die für das HLA-DR4-Molekül bekannten Ankerpositionen p1, p4, p6 und p9 wurden in Kenntnis der etwa 10 Aminosäuren-Reste umfassenden Bindungsgrube bei MHC-Klasse-II zugeordnet. Zusammen mit den bekannten klassischen Aminosäuren-Resten im HLA-DR4-Molekül (Southwood et al., 1998) ließ sich so die Lage des Peptids in die bekannte Kristallstruktur des DR4-Moleküls einrechnen. Klassische Reste sind aliphatische Aminosäuren wie Tyrosin (Y) oder Phenylalanin (F) an Position p1, Glutamat (E) an p4, Threonin (T) an p6 und Valin (V) an p9. In allen definierten minimalen Epitopbereichen ist die Sequenz des 7-mer Peptids *VLEGTLT* im Abschnitt V166-T172 des OspA-Moleküls enthalten, wobei die Bindungstasche der p1 Position leer geblieben sein könnte. Andererseits könnte die p1-Bindungstasche mit Resten besetzt sein, die das Peptid nicht an das MHC-Molekül fixieren, so dass flexible Interaktionen zwischen dem TZR und dem pMHC-Komplex an dieser Position stattfinden. Die abgeleiteten HLA-Bindungsregionen wurden nun für die Substitutionsanalyse genutzt, um zu ermitteln, welche Aminosäuren-Austausche innerhalb der Bindungsregionen toleriert werden.

3.3 Substitutionsanalysen und Supertope OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischer Hybridome

3.3.1 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome 170/1 und 376/5

7 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome, von denen 5 aus den vorhergehenden Verkürzungsanalysen stammten sowie 2 neu ausgewählte OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome, wurden untersucht. In den folgenden Substitutionsanalysen, in der alle Aminosäuren des 12-mer Ausgangspeptids *GYVLEGTLTAEK* sequentiell durch jede der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ausgetauscht wurden, sollten die TZR-Erkennungsmotive eines jeden Hybridoms für die anschließenden Datenbanksuchen definiert werden. Ein Set von 240 12-mer Peptiden wurde mittels Spotsynthese-Verfahren dafür bereitgestellt. Substitutionen galten dann als erlaubt (positiv), wenn die OD-Werte als Maß der IL-2-Produktion über dem Mittelwert plus der zweifachen Standardabweichung der Hintergrundkontrolle lag. Sie waren nicht erlaubt (negativ), wenn die OD-Werte kleiner oder gleich der Hintergrund-Proliferation plus zwei Standardabweichungen waren, das untersuchte Hybridom das modifizierte Peptid also zu schwach erkannte. Die Auswertung erfolgte mittels eines IL-2-ELISA der Hybridom-Testüberstände. Im folgenden werden 2 Substitutionsanalysen für den OspA₁₆₄₋₁₇₅-Bereich, daran

anschließend exemplarisch je 2 Analysen für die Epitopbereiche $\text{OspA}_{235-246}$ und $\text{OspA}_{145-156}$ besprochen. In **Abbildung 10** sind die Daten für das $\text{OspA}_{164-175}$ -spezifische Hybridom 170/1 gezeigt:

	G	Y	V	L	E	G	T	L	T	A	E	K
WT	961	943	950	1015	961	999	987	997	968	992	960	1023
A	988	894	916	611	424	964	876	412	600	944	961	994
C	1052	903	880	944	715	888	725	466	504	948	920	965
D	968	840	859	217	268	399	378	173	375	861	967	982
E	962	907	747	463	944	676	505	154	393	908	1001	1032
F	972	968	787	973	543	422	477	950	318	891	945	1060
G	937	912	826	406	226	932	562	212	277	988	1008	1020
H	937	1026	957	980	496	921	718	926	748	964	961	976
I	982	957	935	984	561	887	893	886	519	986	894	955
K	975	669	653	517	488	645	689	423	282	928	970	974
L	1002	959	792	969	281	429	769	984	454	992	1001	993
M	989	991	870	951	278	362	688	504	368	968	991	1002
N	1010	965	879	789	841	504	693	538	294	934	1000	1036
P	973	669	775	789	454	342	502	584	224	959	1160	1050
Q	985	1086	1248	754	1154	654	781	622	308	1205	1192	1180
R	980	1153	979	578	678	1036	1053	664	533	1263	1216	1189
S	1099	834	1049	1071	1006	315	1252	334	1032	1256	1232	1132
T	1220	1170	1262	356	381	378	1296	332	1273	1232	1154	1164
V	1219	1265	1259	1198	516	1000	1002	841	837	1296	1093	1116
W	1267	1261	741	1070	398	1011	839	1097	556	1174	1175	1115
Y	1176	1166	950	1104	400	763	588	1266	490	1094	1103	1073

Abbildung 7: Substitutionsanalyse für das $\text{OspA}_{164-175}$ -spezifische Hybridom 170/1

Die Konzentration der Peptide lag bei $3 \mu\text{M}$, die Hybridomkonzentration bei 1×10^6 Zellen / ml. Die APZ (Priess-Zellen) im Ansatz hatten eine Konzentration von $2,5 \times 10^6$ Zellen / ml. Alle Positionen im Epitop wurden durch alle 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ersetzt. Die Ergebnisse wurden als OD-Werte eines IL-2-ELISA in diese Matrix übernommen. In den schwarzen Boxen stehen die als positiv, in den weißen Boxen die als negativ definierten Werte. In der ersten Zeile mit WT abgekürzt stehen die Werte für das Ausgangspeptid *GYVLEGTLEAK*. Am linken Rand von oben nach unten sind die Aminosäuren-Austausche, horizontal am oberen Rand die AS des Original-Peptids aufgetragen

Für das $\text{OspA}_{164-175}$ -spezifische Hybridom 170/1 ergab sich folgendes Erkennungsmotiv, welches wir im weiteren Verlauf der Analysen als „Supertop“ bezeichneten. Dabei wurde jede Position des Peptids mit ihren erlaubten und nicht-erlaubten Substitutionen in folgender Form dargestellt (**Abbildung 8**):

164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
G	Y	V	L	E	G	T	L	T	A	E	K
X	{KP}	{K}	{ADEKRT}	[CENQRS]	[ACEGHRVEY]	{DEFGPY}	[FHILVWY]	[HSTV]	X	X	X

Abbildung 8: Individuelles Supertop für das $\text{OspA}_{164-175}$ -spezifische Hybridom 170/1

Symbolik: Die geraden Klammern [] beinhalten alle erlaubten Substitutionen, die geschwungenen Klammern { } beinhalten alle nicht-erlaubten Substitutionen und x steht für die Substitutionsmöglichkeiten mit allen 20 vorkommenden Aminosäuren. Diese Abbildung zeigt eine relativ degenerierte Peptiderkennung, bei der bis auf T172, L171 und E168 mehr als zehn Aminosäuren-Substitutionen erlaubt sind. Die restringierteste Erkennung liegt bei T172 mit 4 möglichen Substitutionen.

Die Substitutionsmöglichkeiten an Position Y165 sind bis auf 2 Aminosäuren unbegrenzt. An den Positionen E168 und T172 sind die Erkennungen relativ restringiert, bei E168 auf 6 Aminosäuren, bei T172 auf 4 Aminosäuren mit den Resten H, S, T und V. Alle anderen

Positionen erlauben noch weitere Substitutionen, beispielsweise Position L167 mit 13 Substitutionsmöglichkeiten. Der in der Verkürzungsanalyse erwähnte Threoninrest T172, der für die Erkennung des 9- und 7-mer Peptids entscheidend war, zeigte sich auch hier als die Aminosäure mit den wenigsten Substitutionsmöglichkeiten. Unter der Annahme, dass der Y-Rest an Position p1 liegt, wäre E168 an der p4-Position, T170 an Position p6 und T172 an der Position p8, was gut mit den klassischen Aminosäuren-Besetzungen im DRB*0401-Molekül übereinstimmt. Insgesamt gibt es keine Position im Epitopabschnitt, an der nur eine einzige Aminosäure erlaubt ist; das individuelle Erkennungsmuster ist somit relativ degeneriert und die Stabilität zwischen MHC und Peptid demnach nicht von einer bestimmten Aminosäure abhängig. Anhand der folgenden Abbildung soll das Hybridom 376/5 analysiert werden, welches sich vor allem durch fehlende Substitutionsmöglichkeiten an der Position L171 von den anderen Hybridomen unterscheidet (**Abbildung 9**).

	G	Y	V	L	E	G	T	L	T	A	E	K
WT	846	871	868	872	869	861	876	457	935	950	918	847
A	612	644	412	869	105	179	802	108	904	963	926	796
C	883	898	375	700	560	367	796	110	793	962	927	829
D	667	386	126	602	74	98	843	58	442	974	864	699
E	596	532	91	410	808	240	425	57	912	794	791	677
F	647	826	130	757	123	118	175	235	583	926	835	723
G	797	590	354	761	76	794	830	61	844	865	769	723
H	788	838	241	689	147	604	749	214	853	818	902	957
I	639	844	494	619	176	504	511	439	567	680	884	813
K	653	561	109	370	124	194	345	119	874	567	884	891
L	622	879	80	802	64	103	425	840	752	884	866	800
M	659	812	82	807	100	112	469	141	827	829	855	862
N	585	587	71	773	420	149	837	83	723	863	804	818
P	575	234	101	796	132	94	627	89	518	866	798	687
Q	467	581	98	692	618	216	437	175	1062	741	919	661
R	661	680	126	438	193	381	593	204	960	706	799	678
S	739	843	559	864	471	99	894	84	940	885	835	641
T	723	726	486	889	97	119	875	86	845	302	726	573
V	727	912	851	665	119	403	791	393	530	777	632	470
W	776	759	139	344	103	346	431	172	679	583	538	363
Y	637	739	235	472	152	312	234	121	538	644	432	346

Abbildung 9: Substitutionsanalyse für das OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridom 376/5

Die Konzentrationsverhältnisse von Peptiden, APZ und Hybridomen sowie der IL-2 ELISA wurden wie unter Abbildung 7 verwendet. Im zentralen Epitopabschnitt mit E168, G169 und L171 liegt eine restringiertere Erkennung als beim Hybridom 170/1 vor, charakterisiert durch die Einzelposition L171, die nur durch sich selbst substituierbar ist.

Bei Annahme des Y165 an Position p1 läge der L171-Rest an Position p7, deren Erkennung in DR1-Molekülen oft degeneriert ist (Rammensee et al., 1995). Alle anderen Positionen erlauben multiple Substitutionen, mindestens jedoch acht andere Aminosäuren an der Position T170, was in **Abbildung 10** zu erkennen ist:

164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175
G	Y	V	L	E	G	T	L	T	A	E	K
{Q}	{DEP}	{SV}	{EKRWY}	{CEQ}	{GH}	{EFIKLMQWY}	L	{DPVY}	{T}	{WY}	{VWY}

Abbildung 10: Supertop für das OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridom 376/5

Dies Supertop ist ein Beispiel für eine restringierte Peptiderkennung, vor allem im zentralen Epitopteil. Jeweils nur 2 Substitutionen sind erlaubt für V166 und G169. 3 Substitutionsmöglichkeiten ergeben sich für E168. L171 ist nur durch sich selbst substituierbar.

Die restringierten Positionen für die MHC-Bindung im Supertop liegen im zentralen Epitopteil und werden gebildet durch die V166- und G169-Reste mit je 2, durch den E168-Rest mit 3 Austausch-Möglichkeiten und den L171-Rest, der nur durch sich selbst substituierbar ist. Alle anderen Positionen erlauben multiple Substitutionen. Denkbar für die Position p1 als MHC-Ankerposition wären einmal Y165 und zum anderen V166.

Im folgenden sollen für die OspA₁₄₉₋₁₆₀- und OspA₁₄₅₋₁₅₆-Bereich exemplarisch je zwei Erkennungsmotive der Hybridome charakterisiert und den OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridom-Erkennungsmotiven gegenübergestellt werden. Bei der Auswertung wurden anstelle des IL-2-ELISA nun die unter Absatz 2.5 - Seite 36 - beschriebenen CTLL-2 Zellen in einem Proliferationstest verwendet, um die Unterschiede in der Stärke der IL-2-Produktion der Hybridome nach Peptiderkennung im Gegensatz zum konventionellen ELISA differenzierter zu beschreiben. Die Zahlwerte entsprechen den ermittelten Proliferationsdaten in cpm (engl.: counts per minute). Die positive Testkontrolle wurde durch einen rekombinanten IL-2-Standard gesichert, als Negativkontrolle diente weiterhin der Medium-Ansatz ohne Peptid. Zunächst folgt das OspA₁₄₅₋₁₅₆-spezifische Hybridom 149/40.

3.4 Substitutionsanalysen und Supertope OspA₁₄₅₋₁₅₆-spezifischer Hybridome

3.4.1 OspA₁₄₅₋₁₅₆-spezifische Hybridome 149/40 und 219/1

Dieses Hybridom zeigt eine insgesamt degenerierte Peptiderkennung (**Abbildung 11**). Strenge Bindungskriterien erfüllen nur die Positionen E149 mit 2 Austauschmöglichkeiten, I150 und S152 mit jeweils 4 sowie D153 mit 3 Substitutionen. Auch hier liegen die restringierten Positionen im zentralen Epitopteil. Im Vergleich zu den übrigen getesteten Hybridomen zeigt sich eine relativ restringierte Außenposition beim G156-Rest mit fünf erlaubten Substitutionen.

	L	E	Y	T	E	I	K	S	D	G	S	G
WT	88509	64675	66969	68830	52557	56429	62921	62805	61132	55877	51784	42924
A	89610	100442	63264	64209	47606	21447	44355	57733	28534	55079	36952	34658
C	76477	101346	77720	74562	35640	40780	51950	42900	40449	58298	39989	41654
D	69777	93829	34346	53008	69067	18563	26990	28036	69624	58791	30206	35622
E	80047	85370	35129	61490	39663	21044	39240	20010	71037	63081	47988	59310
F	80336	82367	65413	62142	40244	28683	28467	17822	24809	72026	49431	44694
G	86980	82317	40005	46965	24202	24806	28320	22569	23204	71288	48262	35496
H	82802	97602	55447	57720	43504	28190	32439	24190	39210	63321	46823	48085
I	81531	90089	69086	52051	20052	45152	49593	20243	44352	70439	52086	32043
K	88346	90309	52842	29704	13684	21799	68586	23822	21732	58001	47637	33807
L	91162	82013	69747	88871	25033	45971	43911	21368	22268	67902	51107	39278
M	91418	78320	65911	76524	21656	83784	79925	35278	23785	52049	61129	55819
N	78665	63187	62513	68123	18611	37383	27841	41742	47183	48721	53947	38676
P	88114	73720	33131	29121	31715	25038	34324	27856	18983	34956	54612	38907
Q	85791	78322	66719	55819	25385	29204	33038	40625	28288	48102	49558	44720
R	98305	75925	40665	31217	25002	36639	58113	41221	20597	31105	46111	44351
S	83685	74006	88834	65059	43220	27430	28225	56319	21157	44470	45360	39266
T	92335	75425	65530	82354	26040	51886	33680	64766	23789	43903	49658	37025
V	90310	67245	61986	71594	18641	87016	52998	76552	36646	50978	56556	58792
W	85579	60819	70375	76804	25133	31808	34459	32755	25087	37798	43897	52190
Y	95641	33973	66905	55762	31031	27530	32843	29806	30444	43415	45115	34202

Abbildung 11: Substitutionsanalyse für das OspA₁₄₅₋₁₅₆-spezifische Hybridom 149/40

Konzentrationsverhältnisse wie unter Abbildung 7 beschrieben. Die restringierten Positionen liegen mit Ausnahme des G156-Rests im zentralen Epitopteil. Wichtige Bindungspositionen werden repräsentiert durch E149, I150, S152 und D153. Restringierte Außenposition G156 mit 5 Substitutionsmöglichkeiten. Der Test wurde mittels CTLL-2 Proliferationsassay (Abschnitt 2.5.1, Seite 37) ausgewertet, die Zahlwerte entsprechen den ermittelten Proliferationsdaten in cpm (engl.: counts per minute).

Weiterhin sind keine Einzelpositionen vorhanden, und auch die restringierten Positionen bieten bis auf E149 mindestens 3 Substitutionsmöglichkeiten. Er ergibt sich folgendes Supertop für dieses Hybridom (**Abbildung 12**):

<i>145</i>	<i>146</i>	<i>147</i>	<i>148</i>	<i>149</i>	<i>150</i>	<i>151</i>	<i>152</i>	<i>153</i>	<i>154</i>	<i>155</i>	<i>156</i>
L	E	Y	T	E	I	K	S	D	G	S	G
X	{Y}	{DEGPR}	{KPR}	{AD}	{LMTV}	{CIKMRV}	{ASTV}	{DEN}	{PRSTWY}	{ACDSWY}	{EHMVW}

Abbildung 12: Supertop für das OspA₁₄₅₋₁₅₆-spezifische Hybridom 149/40

Die Abbildung zeigt eine relativ degenerierte Peptiderkennung für das Hybridom 149/40. Die restringierten Positionen ergaben sich für E149, I150, S152 und D153. Es waren keine Einzelpositionen im Motiv enthalten

Hier zeigten sich zwei wesentliche Befunde, die sich auch in den anderen Hybridomanalysen bestätigten. Einmal war eine große Differenz in der Anzahl der Substitutionen an einer Einzelposition zu beobachten, wie in den vorangegangenen Beispielen gezeigt, zum anderen ließ sich auch eine starke Variabilität in der Gesamtzahl der tolerierten Substitutionen der Hybridome untereinander zeigen. Diese Befunde sollen im folgenden auch in den anderen, untersuchten OspA-Bereichen veranschaulicht werden.

Der relativ degenerierten Erkennung auch im zentralen Epitopanteil für das Hybridom 149/40 soll nun mit Hybridom 219/1 eine restringiertere Erkennung für diesen OspA-Epitopabschnitt in **Abbildung 13** gegenübergestellt werden.

	L	E	Y	T	E	I	K	S	D	G	S	G
WT	82896	91885	73163	91981	76004	100874	72789	73537	81618	102344	87891	55731
A	68651	101425	98118	75685	40524	31976	26964	27635	34094	121331	78116	59534
C	80585	97481	54066	88514	44649	34442	29611	25031	35796	97180	88757	53314
D	81716	114977	33663	32833	107888	39737	22788	17225	87242	100730	67043	49622
E	96976	98935	48666	60148	81859	25068	29114	28457	59979	76910	51345	96624
F	92136	103100	85643	100349	82138	34949	33880	23058	33906	106122	93575	88943
G	69813	100968	42912	56206	24731	32555	35451	16629	32529	132402	88655	90147
H	88062	90984	64916	93976	41933	43082	36799	19759	46353	102264	99517	92453
I	91766	88977	95272	86193	22858	99111	45510	19509	58076	102992	92165	85755
K	97798	69246	64155	33249	21796	31682	85967	18406	26103	82485	104444	59524
L	87070	76515	62458	99144	32051	62630	40464	20350	24896	100711	104888	70300
M	104076	68937	56334	100789	23062	94718	31433	30037	32984	76532	94567	82401
N	103475	70702	96835	70501	29958	23049	33353	35136	85268	70720	89855	114322
P	83118	86828	35566	29927	27746	20231	33727	32186	30689	59732	86595	73426
Q	93915	76649	58923	83755	30064	25061	42182	30057	31468	75103	98128	94246
R	92635	87345	54799	34361	28237	18348	92516	46610	29807	69802	94686	96118
S	110088	89104	50772	103602	71687	16866	35340	105282	25300	74771	90331	94210
T	98329	95781	57994	97956	31221	18541	28456	113913	24947	88708	78365	89148
V	118015	82651	47880	99421	25495	67022	36859	33774	43117	64246	107496	83817
W	105792	105736	78098	99394	39527	29785	27508	29442	41084	75047	63584	105880
Y	102494	37704	88708	105107	38531	39424	32359	43296	64761	67413	64117	97040

Abbildung 13: Substitutionsanalyse für das OspA₁₄₅₋₁₅₆-spezifische Hybridom 219/1

Konzentrationsverhältnisse wie in Abbildung 7 beschrieben. Im Überblick sieht man eine sehr restringierte Erkennung mit den Positionen E149, I150, K151, S152 und D153 mit 2 oder mehr Substitutionsmöglichkeiten. Der Y147-Rest ist im Gegensatz zu allen anderen Hybridommotiven sehr restringiert. Der Test wurde mittels CTLL-2 Proliferationsassay (Abschnitt 2.5.1, Seite 37) ausgewertet, die Zahlenwerte entsprechen den ermittelten Proliferationsdaten in cpm (engl.: counts per minute).

Insgesamt waren 5 Positionen streng restringiert, wovon 4 Positionen jeweils nur 2 Substitutionen erlaubten. Diese Reste E149, I150, K151, S152 und D153 bilden die zentralen Anteile in den Erkennungspositionen des Motivs. Verglichen mit dem Hybridom 149/40, bei dem nur eine Position eine zweifache Substitution erlaubt, zeigt das Hybridom 219/1 auch an der wahrscheinlichen Position p1 im MHC-Molekül mit Y147 bei 6 möglichen Substitutionen eine restriktivere Erkennung. **Abbildung 14** fasst die Ergebnisse zusammen:

145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156
L	E	Y	T	E	I	K	S	D	G	S	G
X	{Y}	{AFINWY}	{DEGKPR}	{DEFS}	{IM}	{KR}	{ST}	{DN}	{PVY}	{DEWY}	{ACDK}

Abbildung 14: Supertop für das OspA₁₄₅₋₁₅₆-spezifische Hybridom 219/1

Die insgesamt restringierte Erkennung zeigt sich im zentralen Teil des Epitops von Position E149 bis zum D153-Rest, wobei immer maximal 2 Substitutionen erlaubt sind.

3.5 Substitutionsanalysen und Supertope OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifischer Hybridome

Im folgenden Teil werden OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifische Hybridome besprochen, denen keine Verkürzungsanalysen vorausgegangen waren (**Abbildung 15**). Zunächst folgt Hybridom 29/1, anschließend Hybridom 8/2.

3.5.1 OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifische Hybridome 29/1 und 8/2

	T	E	I	K	S	D	G	S	G	K	A	K
WT	97174	91812	96522	81278	82663	68791	59418	55288	46827	66143	51268	63074
A	93049	111222	21159	23367	34225	31998	23161	34925	51680	55630	58959	51600
C	82860	95738	79592	20094	29339	32249	14488	39319	23477	60544	57013	36004
D	115800	95663	35346	30750	26135	54013	20358	54841	17321	39147	26558	44664
E	105188	101691	36510	22296	16336	51577	23993	33857	23526	28253	45754	50088
F	106248	96842	36056	30028	18361	24515	28615	32762	27502	64727	44645	53079
G	92688	70470	24381	32060	31132	32770	56862	51644	60990	62096	72780	38083
H	109162	90112	29346	27684	29203	17109	27030	36176	38339	53987	70181	49451
I	106129	65415	53877	20128	30479	29452	27188	54957	29987	52059	56201	49522
K	91345	42998	45767	54438	25947	19289	23986	16856	26874	57330	47312	45016
L	87094	21426	70005	31579	19302	19811	20339	43251	35215	57930	38743	39207
M	102284	13911	53132	25545	20508	14870	20370	44657	24406	61956	65281	61937
N	103036	23921	21193	22786	18978	19605	19774	57324	32792	65768	71679	44839
P	106862	33877	21730	28386	28545	22126	19005	59717	31985	70317	69771	39495
Q	110937	66774	20062	31083	30240	35290	16447	49019	26398	60883	53748	57527
R	118693	75514	24491	23901	32447	30995	20383	19396	41601	61311	69003	59558
S	129517	51241	60574	28125	38215	22699	16899	26598	47665	60046	59158	48683
T	111808	60815	26106	23316	20493	17281	22421	51379	38070	58448	74484	47866
V	105712	58085	85166	26191	27708	21523	13456	49903	27533	60965	67678	86931
W	108427	50911	71674	30365	23546	16107	20677	25268	52299	68312	29575	56000
Y	105116	53546	79307	25143	21993	21010	33208	22740	40980	66516	44065	55248

Abbildung 15: Substitutionsanalyse für das OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifische Hybridom 29/1

Die restringierte Erkennung erkennt man an den 3 Einzelpositionen im Epitopmotiv. K151, S152 und G154 lassen nur diese eine Aminosäure zu. In diesem Bereich lassen sich die für die MHC-Peptid-Bindung wichtigen p4- und p6-Ankerpositionen vermuten. CTLL-2 Proliferationsassay wie unter Abbildung 11 beschrieben.

Auffallend sind die streng restringierten Positionen K151, S152 und D153, wobei diese Reste bei angenommener Position p1 für E150 in dem für die pMHC-Bindung wichtigen Bereichen von p3 bis p6 liegen würden. Die Position p5 (D154), klassischerweise dem TZR zugewandt, würde eine große Restriktion bei der TZR-Bindung an den pMHC-Komplex bedeuten. Auch hier liegen die restringierten Positionen im zentralen Epitopbereich (Abbildung 16).

149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
T	E	I	K	S	D	G	S	G	K	A	K
X	{LMNP}	{AGHNPQRT}	[K]	[S]	[DE]	[G]	{AEFKRSWY}	{AGHRSTWY}	{E}	{DW}	X

Abbildung 16: Supertop für das OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifische Hybridom 29/1

Strenge Restriktion im zentralen Epitopbereich mit K152, S 153, D154 und G155. Die äußeren Bereiche sind multipel substituierbar.

Andererseits ist der E150-Rest kein klassischer Rest für eine p1-Position im HLA-DRB1*0401-Molekül (Southwood et al., 1998). I151 bildet die wahrscheinlichste p1 Position, wobei D153 die Position p4 und S155 - multipel substituierbar - p6 einnehmen würde, was gut mit den HLA-DRB1*0401-Bindungs-Motiven übereinstimmt.

Noch restringierter als beim Hybridom 29/1 war das Erkennungsmotiv des Hybridoms 8/2 (Abbildung 17):

	T	E	I	K	S	D	G	S	G	K	A	K
WT	81729	72676	70542	72279	81589	78035	51263	52262	44692	73916	67660	46475
A	56423	81916	4319	4669	4792	4020	3533	53073	50795	3107	58107	37959
C	63174	60485	51167	5369	4122	7691	3263	34693	8720	3602	36968	35666
D	66368	82715	5644	4562	3029	59646	2794	38234	4463	2677	3801	20715
E	63039	68344	5383	3957	3798	4633	4352	8625	3055	3444	10360	40798
F	59489	55527	57984	4478	4395	3737	3205	4141	3715	3400	12763	35623
G	66360	41401	4984	5526	3624	5206	64974	19490	62071	2931	31171	31168
H	78606	60467	3857	4788	4682	4387	4141	4284	4690	3382	49604	40921
I	58814	87775	57416	4734	3547	3412	3369	18117	17437	4760	48295	35609
K	67873	49202	6692	68096	3111	3193	2778	4571	3875	46297	49154	61011
L	74666	70843	60761	4165	3413	3570	2359	28917	4647	3710	28032	35395
M	73257	80728	58051	4052	4268	4800	3943	29967	3445	3051	36706	49783
N	76382	68230	6284	4011	3607	19948	3781	26345	2955	3380	19505	29101
P	74812	51339	4805	4489	3925	3556	4147	13157	10531	3458	30531	7132
Q	77563	62485	4373	4086	4190	3238	3738	12403	2701	2966	27981	32890
R	55920	68639	5754	4081	3848	3389	3405	3985	3989	3572	18313	51084
S	67498	60851	38225	3575	68028	3543	5630	45083	23096	2959	41433	44711
T	69216	77487	7246	4258	5292	3019	3069	25815	4171	3102	34585	36019
V	66501	85689	50484	3546	4800	4470	4617	73191	7040	3294	8877	49783
W	84326	99580	68847	4146	4702	4686	3878	7318	6008	2684	24388	30411
Y	62596	69053	29224	4314	5146	4956	4227	6379	3233	3560	55550	30712

Abbildung 17: Substitutionsanalyse für das OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifische Hybridom 8/2

Streng restriktive Erkennung bei den Positionen K151, S152, D153, G156 und K157. In der Übersicht lassen die zentralen Epitopteile wieder die restringierten Positionen erkennen, flankiert von einer weiteren Einzelposition am Epitoprandbereich mit K157. CTLL-2 Proliferationsassay wie unter Abbildung 11 beschrieben.

Zusammengefasst in **Abbildung 18** ergibt sich für das Hybridom 8/2:

149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160
T	E	I	K	S	D	G	S	G	K	A	K
X	X	[CFILMSVW]	K	S	D	G	[ACDSV]	[AG]	K	[ACHIKMSTY]	{DGNPWY}

Abbildung 18: Supertop für das OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifisches Hybridom 8/2

Mit Ausnahme der Position S156 reicht die Restriktion von K152 bis K158 mit insgesamt 5 Einzelpositionen im zentralen Epitopteil.

Diese fünf Einzelpositionen sind K152, S153, D154, G155 und K158 liegen sämtlich im zentralen Epitopteil. Als Fazit der Substitutionsanalyse lässt sich sagen, dass am C- und N-Terminus bei allen untersuchten Hybridomen beliebig viele (mit Ausnahme des Hybridoms 149/40) Substitutionen gestattet werden und dass zwischen den Hybridomen eine große Variabilität in der Anzahl der tolerierten Einzel- und Gesamtsubstitutionen besteht. Beispielsweise ist die Position L171 beim Hybridom 376/5 nur durch sich selbst substituierbar, beim OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridom 170/6 sind 8 Substitutionen und bei den Hybridomen 224/2 und 257/4 jeweils 7 Substitutionen erlaubt. Hinsichtlich der Gesamtzahl der Substitutionen waren beim Hybridom 8/2 insgesamt 83 und beim Hybridom 29/1 134 Austausche im gleichen OspA-Bereich möglich. Für diese unterschiedliche Stringenz in der Peptiderkennung ließen sich viele Beispiele in den untersuchten Epitopen finden.

3.6 Auflistung der definierten Supertope für OspA₁₆₄₋₁₇₅, OspA₁₄₉₋₁₆₀, OspA₁₄₅₋₁₅₆.

In Tabelle 2 werden die identifizierten Supertope der Hybridome 170/1 und 376/5 für den Bereich OspA₁₆₄₋₁₇₅, der Hybridome 149/40 und 219/1 für den Bereich OspA₁₄₅₋₁₅₆ sowie der Hybridome 29/1 und 8/2 für den Bereich OspA₁₄₉₋₁₆₀ aufgelistet:

Tabelle 2a: Auflistung der individuellen Supertope für die Bereiche OspA₁₆₄₋₁₇₅, OspA₁₄₉₋₁₆₀ und OspA₁₄₅₋₁₅₆.

In Tab. 2a stehen links die getesteten Hybridome und deren zugehörige Supertope. Die geraden Klammern [] beinhalten alle erlaubten Substitutionen, die geschwungenen Klammern { } alle nicht-erlaubten Substitutionen, und x steht für die Substitutionsmöglichkeiten mit allen 20 vorkommenden Aminosäuren. Für jeden Epitopbereich wurden 2 spezifische Hybridome exemplarisch aus einem Pool von sieben ausgewählt.

Hybridom	Individuelles Supertop
170/1	X- {KP} - {K} - {ADEKRT} - [CENQRS] - [ACEGHRVEY] - {DEFGPY} - [FHILVWY] - [HSTV] -X-X-X
376/5	{Q} - {DEP} - [SV] - {EKRWY} - [CEQ] - [GH] - [EFIKLMQWY] -L- {DPVY} - {T} - {WY} - {VWY}
29/1	X- {LMNP} - {AGHNPQRT} - [K] - [S] - [DE] - [G] - {AEFKRSWY} {AGHRSTWY} - {E} - {DW} -X
8/2	X-X- [CFILMSVW] -K-S-D-G- [ACDSV] - [AG] -K- [ACHIKMSTY] - {DGNPWY}
149/40	X- {Y} - {DEGPR} - {KPR} - [AD] - [LMTV] - [CIKMRV] - [ASTV] - [DEN] - {PRSTWY} - {ACDSWY} - [EHMVW]
219/1	X- {Y} - [AFINWY] - {DEGKPR} - [DEFS] - [IM] - [KR] - [ST] - [DN] - {PVY} - {DEWY} - {ACDK}

Tabelle 2b: In Tab. 2b sind die getesteten OspA-Bereiche mit den dazugehörigen Hybridomen aufgelistet. OspA₁₄₅₋₁₅₆ mit den Hybridomen 149/40 und 219/1, OspA₁₄₉₋₁₆₀ mit 8/2 und 29/1 und OspA₁₆₄₋₁₇₅ mit 170/1 und 376/5.

OspA ₁₄₅₋₁₅₆	OspA ₁₄₉₋₁₆₀	OspA ₁₆₄₋₁₇₅
Hybridome 149/40 und 219/1	Hybridome 8/2 und 29/1	Hybridome 170/1 und 376/5

3.7 Identifikation der Selbstpeptide (Mimikry-Peptide)

3.7.1 Identifizierte Selbstpeptide für OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome durch Sequenzhomologie und Supertop-Analyse

Die Datenbanksuchen nach Selbstpeptiden, die den in den Supertopen zusammengefassten strukturellen Kriterien entsprachen, ergaben 387 humane oder murine Peptide. Diese Suche wurde in den Datenbanken SWISSPROT (Proteine) und TREMBL (Proteinfragmente) durchgeführt. Als Suchprogramm diente „Pattern“ von Prosite (www.expasy.ch). Zusätzlich ergaben sich weitere Peptide aus einer durchgeführten Sequenzhomologie-Suche, nämlich 57 humane und 31 murine, insgesamt also 88 sequenzhomologe Peptide. Bei der

Sequenzhomologie-Suche von Peptiden wurden öffentlich zugängliche Datenbanken wie SWISSPROT und TREMBL mit dem Programm blastp (www.expasy.org/tools/blast) auf Peptide hin durchsucht, die der Sequenz eines OspA-Peptids ähnlich waren. Auch hier wurde zur Synthese einer Auswahl an sequenzhomologen Peptiden die Spot-Synthesetechnik verwendet. Nach ihrer Synthese wurden diese auf ihre Erkennung durch die sieben OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome aus den Substitutionsanalysen getestet. Von den 387 Peptiden aus den Supertop-Suchen wurden von mindestens einem Hybridom im Test 13 Peptide (3,3%) kreuzerkannt, welche insgesamt 11 humane und 5 murine Proteine repräsentierten. Dabei stammten 3 Peptide aus einer humanen- und einer Mausquelle (**Abbildung 21**). Bei den sequenzhomologen Peptiden wurden von 88 Peptiden schließlich 3 (3,4 %) durch eines der sieben untersuchten Hybridome kreuzerkannt. Die genannten Peptide stammten von 2 humanen und 2 murinen Proteinen, wobei das Peptid *YYALEGSVAI* (Glycerolkinase) sowohl als Maus- als auch Human-Peptid vorkommt, also hier doppelt benannt wird (**Abbildung 20**). Eine Zusammenstellung der identifizierten Peptide zeigt **Abbildung 19**.

Supertop-Suche

Sequenzhomologie-Suche

<u>Epitope</u>	<u>Kandidaten</u>	<u>Selbst-Peptide</u>	<u>Epitope</u>	<u>Kandidaten</u>	<u>Selbst-Peptide</u>
OspA ₁₆₄₋₁₇₅	387	13 (3,36%)	OspA ₁₆₄₋₁₇₅	88	3 (3,4%)

Abbildung 19: Anzahl der Peptide durch Supertop- und Sequenzhomologie-Suche.

Gegenüberstellung der durch die Supertop-Analyse und Sequenzhomologie-Suche identifizierter Peptide für OspA₁₆₄₋₁₇₅. Die Daten entsprechen Ergebnissen aus 2 voneinander unabhängigen Experimenten. Kandidaten: Peptidzahl, die die Kriterien des Supertops erfüllten und mindestens von einem Hybridom erkannt wurden. Selbst-Peptide: Anzahl der Peptide, die mindestens von einem der getesteten Hybridome erkannt wurde.

3.7.2 Durch Sequenzhomologie-Suche identifizierte Selbstpeptide: OspA₁₆₄₋₁₇₅

In der Sequenzhomologie-Suche wurde aus chemisch-technischen Gründen das 12-mer Ausgangspeptid am C-Terminus um 2 Aminosäuren zur Sequenz *GYVLEGLTA* verkürzt und die Peptidsynthese der Sequenzhomologen als 10-mer Sequenz durchgeführt. Die gewonnenen Daten sind repräsentativ für zwei voneinander unabhängiger Experimente, bei denen die Ergebnisse exakt reproduziert werden konnten. **Abbildung 20** zeigt die Ergebnisse der Sequenzhomologie-Suche.

<u>OspA-Sequenz</u>	<u>Ursprung</u>	<u>Erkennung durch Hybridom</u>						
	Kreuzerkannte Peptide und Quellenangabe (Human, Maus)	376/5	169/5	170/1	26/1	257/4	224/2	170/6
GYVLEGTLTAEK OspA₁₆₄₋₁₇₅	Outer Surface Protein A ; <i>B. burgdorferi</i>	■	■	■	■	■	■	■
GYVLEGKELE	40s ribosomal protein S8 RS8; <i>Human</i>							
GYILEGNECV	Fibrillin 1 Precursor FBN 1; <i>Maus</i>							
GYMLEGSPQS	Complement Receptor type II precursor (CR2); <i>Human</i>							
IYVIEGTSKQ	Leukocyte adhesion glycoprotein LFA-1 α ; <i>Human</i>							
GYVPEDGLTA	Inosine-5-monophosphate dehydrogenase1; <i>Human + Maus</i>							
GYTLEGSPWS	Complement receptor type I precursor (CD35); <i>Human</i>							■
TPNLEGTLTG	Neuroblast differentiation- Associated protein AHNAK (Desmoyokin); <i>Human + Maus</i>							
GYTLEGSPQS	Complement receptor type II precursor (CD35); <i>Maus</i>						■	
LYMLVGTLAA	Multidrug resistance protein 3 MDR; <i>Maus</i>							
GYTLRGTSIF	Alkaline phosphatase-intestinal-precursor; <i>Maus</i>							
YYALEGSVAI	Glycerolkinase GLPK; <i>Human + Maus</i>						■	

Abbildung 20: Zusammenfassung der identifizierten kreuzerkannten humanen und murinen Peptide für OspA₁₆₄₋₁₇₅ aus der Sequenzhomologie-Suche. In Swissprot und TREMBL wurde mit dem Suchprogramm www.expasy.org/tools/blastp nach OspA₁₆₄₋₁₇₅-homologen Peptiden gesucht. Die passendsten Peptide, von denen 3 durch OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome erkannt wurden, sind hier aufgelistet. Das verwendete Symbol ■ markiert die Erkennung der Peptide durch das jeweilige Hybridom. Die Quellen der Peptide (Maus, Human) sind hervorgehoben. Hier fett markiert sind Aminosäuren-Reste aus der Ursprungssequenz GYVLEGTLTAEK. Aus chemisch-technischen Gründen wurde das 12-mer Ausgangspeptid am C-Terminus um 2 Aminosäuren auf ein 10-mer Peptid verkürzt.

Die Positionen in den Sequenzhomologie-Peptiden stimmten bis auf einen Aminosäuren-Rest mit dem Supertop-Motiv überein. Zwei der Peptide waren bis auf eine Aminosäure in ihrer Struktur identisch und behielten bis auf den Valinrest V166 die gemeinsame Sequenz GYTLEG bei. Die nachfolgenden vier Aminosäuren hatten keinen Rest mit dem Ausgangspeptid mehr gemein. Das durch das Hybridom 257/4 erkannte sequenzhomologe Peptid YYALEGSVAI konservierte 4 Aminosäuren (Y..LEG) des Ausgangspeptids, 2 Positionen wurden nicht durch die Supertop-Analyse vorausgesagt, nämlich der Valinrest V1172 und der Alaninrest A173. Es fiel auf, dass die „Ausbeute“ der Erkennung bei den Sequenzhomologie-Peptiden für den OspA₁₆₄₋

¹⁷⁵-Bereich (3,4%) fast genau im Bereich der Ergebnisse aus den Substitutions-Analysen lag (3,36%). Auf die geringe Erkennungsquote wird im Diskussionsteil noch näher eingegangen .

3.7.3 Durch Supertop-Suche identifizierte Selbst-Peptide: OspA₁₆₄₋₁₇₅

OspA-Sequenz	Ursprung	Erkennung durch Hybridom						
		376/5	169/5	170/6	170/1	26/1	257/4	224/2
	Kreuzerkannte Peptide und Quellenangabe (Human, Maus)							
GYVLEGLTAEK OspA₁₆₄₋₁₇₅	Outer Surface Protein A ; <i>B. burgdorferi</i>	■	■	■	■	■	■	■
ASVPEGNLHGQD	IL-2 Receptor β Chain Precursor (CD 122); <u>Maus</u>	■						
CWVLEGIIPNR	Macrophage-stimulating Protein Precursor; <u>Human</u>	■	■	■				
EFIMEGTLTRVG	Son of Sevenless Homolog (SOS1); <u>Human + Maus</u>	■		■	■			
GLVMEGHLFKRA	Hypothetical Protein KIAA0050; <u>Human</u>	■						
KLQLDGSLTMSS	Autoantigen (Q13025/ Q13826); <u>Human</u>				■			
LLGVEGTTLREA	Myosin I Beta; <u>Maus</u>		■					
LVGIEGSLKGST	Opa-Interacting Protein OIP5 (Fragment); <u>Human</u>			■		■		
PLALEGSLQKRG	Insulin precursor; <u>Human</u>	■						
QVGVEGTASLKA	Lak-1; <u>Human</u>			■				
RFVMEGGLDKP	Insulin-Like Growth Factor I Receptor Precursor; <u>Human + Maus</u>	■						
SFTIEGPLTSFG	Apolipoprotein B-100 Precursor (Apo B-100); <u>Human</u>			■				
SGRLQVRLVLGQ	Melanoma Ass. Chonr. Sulfate Proteo-Gl. (MCSP); <u>Human</u>	■						
YWVYEGSLTIPP	Carbonic Anhydrase-Rel. Protein; <u>Human + Maus</u>	■		■			■	■

Abbildung 21: Zusammenfassung der identifizierten kreuzerkannten humanen und murinen Peptide für OspA₁₆₄₋₁₇₅ aus der Supertop-definierten Suche. Von den durch die Supertopanalyse identifizierten Peptiden wurden dreizehn Peptide von mindestens einem der sieben OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome erkannt. Als Suchprogramm diente www.expasy.ch von Prosite. Das Symbol ■ markiert die Erkennung der Peptide durch das jeweilige Hybridom. Die Quellen der Peptide (Maus, Human) sind hervorgehoben. Fett markiert sind Aminosäuren-Reste aus der Ursprungssequenz GYVLEGLTAEK. Bei diesen Analysen wurden die im Vortest identifizierten 12-mer Peptide verwendet.

Die 13 erkannten Selbstpeptide teilten drei bis fünf Aminosäuren-Reste mit der OspA₁₆₄₋₁₇₅-Ausgangssequenz *GYVLEGTLTAEK*. In folgenden Betrachtungen wird der unter Tabelle 8.1 beschriebene „Ein-Buchstabenkode“ für Aminosäuren verwendet. Auffällig im Bereich OspA₁₆₄₋₁₇₅ war, dass 11 von 13 Peptiden E168 und 12 von 13 Peptiden G169 beibehielten. Eines der Peptide enthielt eine konservative Substitution mit einem D- an Stelle eines E-Rests. Beide Aminosäuren gehören zu den sauren, negativ geladenen Aminosäuren. Das Leuzin an Position 171 (L171) wurde ebenfalls sehr häufig, bei 10 von 13 Peptiden, beibehalten. In den 3 Abweichungen wurde es jeweils durch I, A und T - insgesamt Aminosäuren mit ungeladenem Rest - konservativ ersetzt. In Zusammenschau stimmte nur das „son of sevenless homolog protein“ (SOS1) in jeder Position mit dem Supertop des Hybridoms 170/1 überein, alle anderen erkannten Peptide hatten mindestens 1 Position, die nicht durch das Supertop des jeweiligen Hybridoms vorhergesagt wurde. Auffällig in dieser Hinsicht war vor allem das Hybridom 376/5, da von den acht erkannten Peptiden kein einziges in jeder Position mit dem Supertop übereinstimmte. Einige Peptide wurden also anhand der Supertop-Kriterien nicht vorhergesagt. Dies ließ sich an mehreren Positionen innerhalb eines der ausgewählten Peptide beobachten. Beispielsweise erkannte das Hybridom 376/5 die Sequenz *SGRLQVRLVLGQ* des „melanoma-associated chondroitin sulfate proteoglycan“ (MCSP), obwohl drei der zwölf Positionen nicht mit dem Supertop für dieses Hybridom übereinstimmten, nämlich der R166- und beide Valin-Reste V169 und V172. Auch fehlten hier der Y165-Rest, und von der Sequenz des Ausgangspeptids *GYVLEGTLTAEK* im OspA₁₆₄₋₁₇₅-Bereich blieben lediglich der L167- sowie der L171-Rest im zentralen Epitopbereich (Y165-T170) übrig. Auch beim Hybridom 170/6 zeigte sich die Peptiderkennung mit unerlaubten Aminosäuren-Substitutionen an bestimmten Positionen im Peptid. Dieses Hybridom erkannte die Sequenz *LLGVEGTTLREA* aus dem „myosin I β -protein“, obwohl drei Reste nicht im Supertop-Motiv enthalten waren. Dazu zählten die Positionen des V167-Rests, der zweite T171-Rest und L164. Y165 an wahrscheinlicher Position p1 war durch L164 ersetzt, die zentralen Epitopteile (E168-T170) aus dem Ausgangspeptid waren erhalten geblieben.

Auch bei den Peptiden aus der Sequenzhomologie-Suche war zu beobachten, dass Peptide trotz nicht dem Supertop entsprechender Substitutionen erkannt wurden. Das Hybridom 257/4 erkannte zum Beispiel die Sequenz *GYTLEGSPQS* im „complement receptor type II precursor-protein“ (CD35) der Maus, in dem drei Positionen nicht im abgeleiteten Supertop für dieses Hybridom vorkamen (P171, Q172 und S173 im äußeren Epitopbereich). Die große Mehrzahl der durch die Substitutionsanalysen gefundenen Peptide wurde jedoch vollständig durch das Bindungsmotiv vorhergesagt. Andererseits ergab sich die Beobachtung, dass Peptide von den

Hybridomen auch dann nicht erkannt werden konnten, wenn alle Positionen im Peptid mit dem Supertop übereinstimmten. Dies war zum Beispiel beim Hybridom 170/1 der Fall, welches die Peptidsequenz *YWVYEGSLTIPP* im „carbonic anhydrase-related protein“ nicht erkannte, obwohl alle Aminosäuren-Positionen im Supertop vorkamen. Auch das „IL-2R β -chain precursor-peptide“ mit der Sequenz *ASVPEGNLHGQD*, in dem alle Positionen mit dem Erkennungsmotiv des Hybridoms 376/5 übereinstimmten, konnte von diesem nicht erkannt werden. Sogar innerhalb eines Hybridoms war dieses Erkennungsverhalten zu beobachten. Das Hybridom 257/4 erkannte die Sequenz *YWVYEGSLTIPP* des „carbonic anhydrase-related protein“, wobei zwei Positionen hinsichtlich des Supertops differierten, konnte jedoch *PLALEGSLQKRG* im „insulin precursor protein“ nicht erkennen, obwohl alle Positionen aus dem Supertop mit denjenigen des Peptids übereinstimmten. Zusammenfassend lieferte der Vergleich der Supertop-definierten Peptide mit den sequenzhomologen Peptiden die wichtigen Befunde, dass mit alleiniger Sequenzhomologie-Suche viele Selbstpeptide nicht hätten identifiziert werden können und dass mit beiden Methoden keine exakte Vorhersage über die Erkennung von bestimmten Peptidsequenzen möglich ist. Im folgenden Diskussionsteil wird näher auf die Beobachtungen eingegangen, dass zwei individuell „nicht-erlaubte“ Substitutionen in einem nicht vorhersagbaren Muster dazu führen können, dass ein Peptid wieder erkannt wird. Andererseits wird analysiert, warum zwei individuell „erlaubte“ Substitutionen dazu führen können, dass ein Peptid nicht mehr erkannt wird.

3.8 Selbstpeptide aktivieren OspA₁₆₄₋₁₇₅ spezifische Hybridome dosisabhängig

Nachdem die erwähnten Selbstpeptide aus der Sequenzhomologie- und Supertop-Suche in einem zweiten unabhängigen Experiment bestätigt werden konnten, wurden die von den OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridomen kreuzreaktiv erkannten 16 Peptide wie unter 2.1.5.2 beschrieben synthetisiert und anschließend für die dosisabhängigen Erkennungstests benutzt. Ein Ziel dieser Experimente war die Klärung der Frage, ob es überhaupt kreuzreaktiv erkannte Peptide geben könne, die in der Lage sind, eine ähnliche oder gar stärkere IL-2-Produktion im Vergleich zu dem Ausgangspeptid OspA₁₆₄₋₁₇₅ in den Hybridomen zu induzieren? Zweitens ging es darum, aus diesen Ergebnissen Rückschlüsse auf die Immunantwort *in vivo* nach der Erkennung von Selbstpeptiden zu ziehen. Die Konzentrationen der Hybridome und APZ entsprachen denen in den Substitutionsanalysen; die Peptidkonzentrationen reichten von 0,06 μ M bis 200 μ M. Alle im folgenden genannten OD-Werte sind Mittelwerte aus drei Einzelwerten der Auswertung mittels CTLL-2 Proliferationsassay und repräsentieren Ergebnisse aus drei voneinander unabhängigen Experimenten. Exemplarisch werden drei OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome und ihre

dosisabhängige Aktivierung durch die Selbstpeptide besprochen. Die drei untersuchten $\text{OspA}_{164-175}$ -spezifischen Hybridome stammten aus der Gruppe der 7 Hybridome für die Substitutionsanalysen und wurden aus diesen zufällig ausgewählt.

3.8.1 Dosisabhängige Aktivierung der $\text{OspA}_{164-175}$ spezifischen Hybridome 257/4, 170/6 und 26/1 durch Selbstpeptide

Die Ergebnisse der dosisabhängigen Peptiderkennung insgesamt betrachtet, lässt sich vorwegnehmen, dass die Bandbreite von einer schwachen bis zu einer der durch OspA induzierten IL-2-Produktion reichte. Als erstes Beispiel dient das $\text{OspA}_{164-175}$ -spezifische Hybridom 257/4 (**Abbildung 22**), welches im Vergleich zum Ausgangspeptid *GYVLEGLTAEK* nur schwach durch die Selbst-Peptide aktiviert wurde. Es soll exemplarisch für ein Hybridom gezeigt werden, bei dem die Selbstpeptide weniger IL-2-Produktion als das OspA -Peptid induzierten.

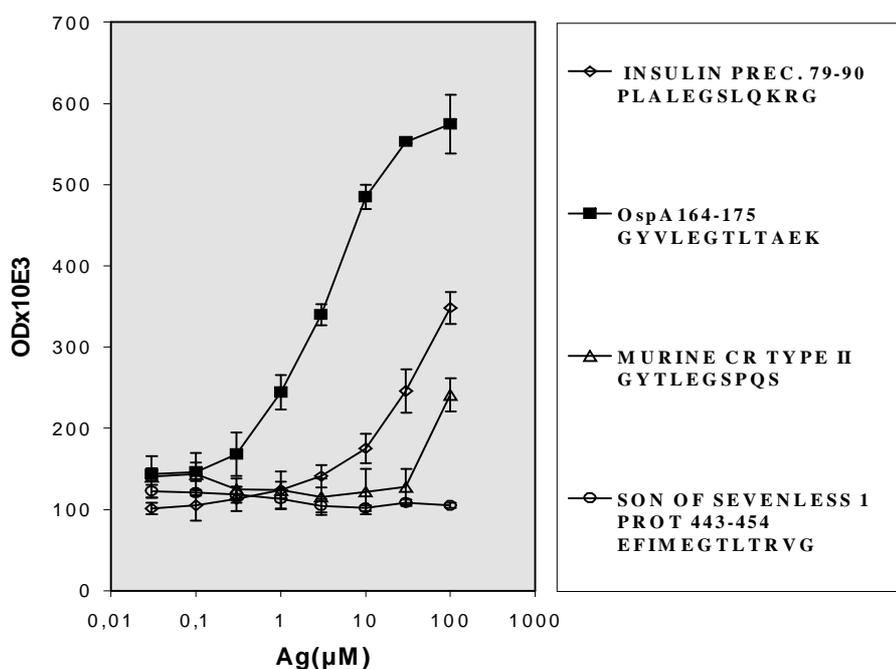


Abbildung 22: Dosisabhängige IL-2-Produktion durch das $\text{OspA}_{164-175}$ -spezifische Hybridom 257/4

Die geklonten Hybridome wurden wie unter 2.2.8 (Seite 34) beschrieben kultiviert und für den Test vorbereitet. Die Peptidkonzentration reichte von 0,06 μM bis 200 μM . Das APZ:Hybridom-Verhältnis lag bei 2,5:1. Nach 48 stündiger Inkubation wurden die IL-2-Überstände wie unter 2.5.1 (Seite 37) beschrieben mittels CTLL-2 Proliferationsassay ausgewertet. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte von dreifachen Einzelwerten berechnet und sind repräsentativ für drei voneinander unabhängige Experimente. Auf der X-Achse ist die Konzentration der Peptide in logarithmischer Darstellung symbolisiert. Die Stärke der IL-2-Produktion, angegeben in OD-Werten $\times 10^3$ ($10\text{E}3$) ist auf der y-Achse aufgetragen. Das „son of sevenless 1 protein“ induzierte keine IL-2-Antwort in den vorangegangenen Suchtests und diente als Negativkontrolle. Als Positivkontrolle diente *GYVLEGLTAEK*. Mittelstarke Erkennung durch das „insulin precursor protein“ *PLALEGSLQKRG*

Hier konnte erst ab Konzentrationen von 10 μM eine vermehrte IL-2-Produktion induziert werden. Das „son of sevenless 1 protein“, das in den Suchtests nicht vom Hybridom 257/4

erkannt wurde, diente als Negativ-Kontrolle. Bei diesem Hybridom zeigte sich keine Annäherung der IL-2-Produktion an die des OspA-Peptids in den Bereichen hoher Peptidkonzentrationen. Das Verhältnis im mittleren IL-2 Sekretionsbereich in Bezug auf das OspA-Peptid lag hier für die Selbstpeptide bei 1:100. Keines der Selbstpeptide erreichte den IL-2-Spitzenwert des OspA-Peptids. Das OspA-Peptid zeigte in dieser Konzentrationsreihe einen sigmoidalen Verlauf mit einer asymptotischen Annäherung bei $600 \text{ OD} \times 10^3$ (hier mit $10E3$ bezeichnet), die Selbstpeptide zeigten eine insgesamt schwache Proliferation bei hohen Peptiddosen von 50 bis $100 \mu\text{M}$. Interessanterweise erkannte das Hybridom 257/4 das „insulin precursor protein“ in konventioneller Form, obwohl es das gleiche Peptid in der Spot-Synthese Technik auf der Zellulosemembran nicht erkannte. Eine relativ hohe IL-2-Produktion durch die Selbstpeptide war beim Hybridom 170/6 sichtbar (**Abbildung 23**):

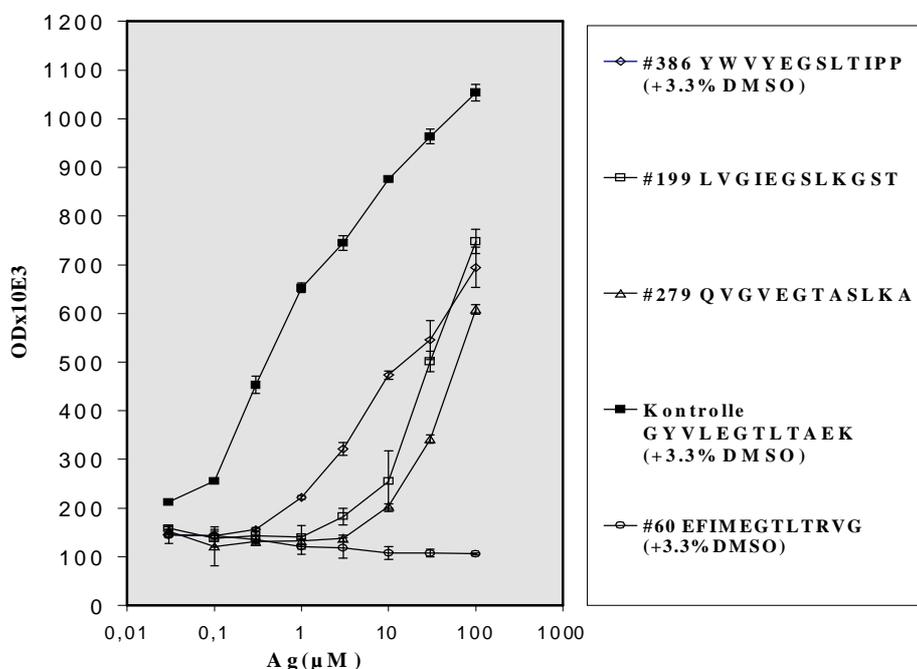


Abbildung 23: Dosisabhängige IL-2-Produktion durch das OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridom 170/6

Die geklonten Hybridome, APZ und Peptidkonzentrationen wurden wie unter Abbildung 22 beschrieben eingesetzt. Die Auswertung der IL-2-Überstände erfolgte mittels CTLL-2 Proliferationsassay wie in Abbildung 7 erwähnt. Ergebnisauswertung und Achsenbeschriftung wie unter Abbildung 22 beschrieben. Das „son of sevenless peptid“ *EFIMEGTLTRVG* diente als Negativkontrolle, Positivkontrolle *GYVLEGLTAEK*. Das „carbonic anhydrase-related protein“ induzierte die stärkste IL-2-Produktion.

Hier ergab sich eine signifikante IL-2-Produktion schon in einem Konzentrationsbereich von 30 bis $50 \mu\text{M}$. Die Spitzenwerte im Bereich der maximalen Peptidkonzentration lagen bei einem OD von 600×10^3 ($10E3$). Die Peptide zeigten einen annähernd parallelen Kurvenverlauf, wobei die Konzentration in folgender Reihenfolge zunahm: Im mittleren Konzentrationsbereich lagen

die Peptide in ihren Konzentrationen bezogen auf die jeweiligen OD-Werte etwa um den Faktor 1:25 auseinander. Die stärkste Proliferation wurde durch das „carbonic anhydrase-related protein“ erzielt, was schon bei 10 μM der Fall war. Im Bereich maximaler Peptidkonzentrationen näherten sich die durch die Selbstpeptide induzierten IL-2-Proliferationen einander an und erreichten bei Peptidkonzentrationen um 100 μM ähnliche OD-Werte um 600×10^3 . Im Vergleich dazu lag der OD-Wert für das OspA-Peptid bei ca. 1100×10^3 bei zehnfach kleinerer Peptiddosis als bei den Selbstpeptiden. Die aus chemischen Gründen notwendige Lösung einiger Peptide in 3,3% DMSO hatte keinen Einfluss auf die Testauswertung, was durch die Lösung des Kontrollpeptids in DMSO und ungelöstem Kontrollpeptid im gleichen Testansatz gezeigt wurde. Folgend wird das Aktivierungsverhalten des Hybridoms 26/1 in **Abbildung 24** gezeigt:

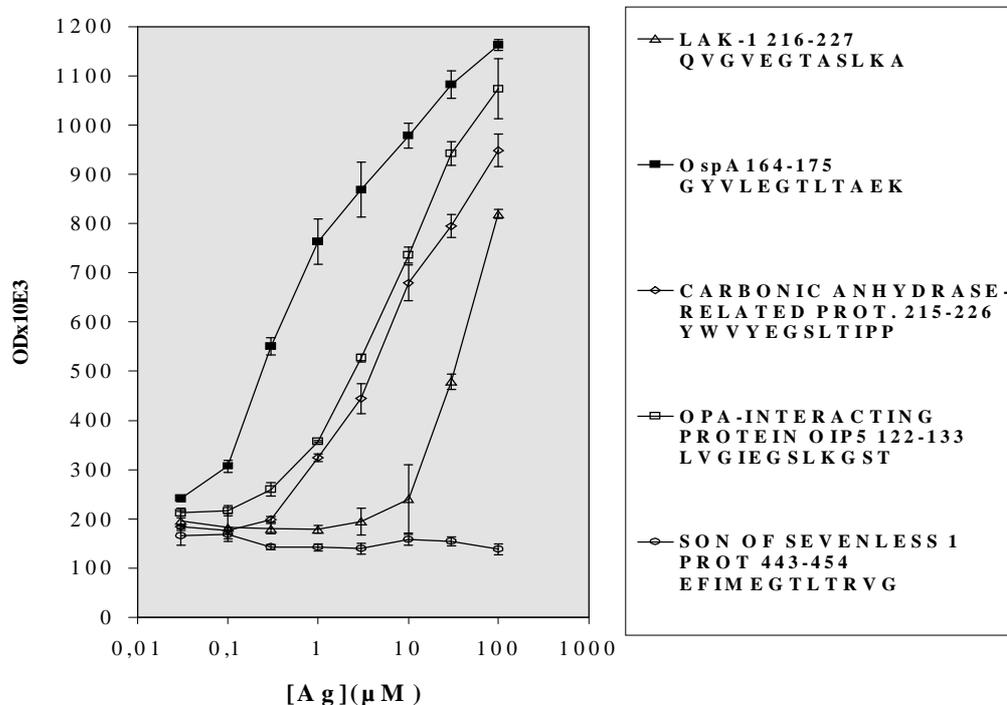


Abbildung 24: Dosisabhängige IL-2-Produktion durch das OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridom 26/1

Die geklonten Hybridome, APZ und Peptidkonzentrationen wurden wie unter Abbildung 22 beschrieben eingesetzt. Die Auswertung der Ergebnisse und die Achsenbeschriftung wie unter Abbildung 22. Das „son of sevenless peptid“ diente als Negativkontrolle, *GYVLEGLTAEK* als Positivkontrolle. Das „opa-interacting protein 5“ induzierte eine starke IL-2-Produktion, ähnlich dem „carbonic anhydrase-related protein“.

Hier fällt schon in der Übersicht ein relativ starkes Proliferationsverhalten durch die verschiedenen Peptide auf. Dieses Hybridom erreichte mit Ausnahme des „lak-1-protein“ eine starke IL-2-Produktion durch die Selbstpeptide. Insgesamt waren dazu allerdings höhere nötig als beim Kontrollpeptid. In bezug auf das OspA-Peptid *GYVLEGLTAEK* war im Konzentrationsbereich zwischen 1 bis 10 μM durchschnittlich eine zehnfach höhere Konzen-

tration der Selbstpeptide für vergleichbare OD-Werte nötig. Der dosisabhängige Graphenverlauf des OspA-Peptids und der Selbstpeptide war in diesem Konzentrationsbereich annähernd parallel. Im Bereich der IL-2 Spitzenwerte näherten sich die Kurven einander an, so dass die Selbstpeptide im Durchschnitt stärker auf eine erhöhte Peptidkonzentration ansprachen als das OspA-Peptid. Die Spitzenwerte der Selbstpeptide in OD lagen im Bereich zwischen 850 und 1150×10^3 . Im Gegensatz zu allen anderen getesteten Hybridomen war schon bei einer Peptidkonzentration von $1 \mu\text{M}$ eine Proliferation der CTLL-2 Zellen zu erkennen, allerdings zwei- bis dreifach geringer als beim OspA-Peptid in diesem Konzentrationsbereich. Speziell das „opa-interacting protein 5“ war in der Lage, OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome ähnlich intensiv wie das 12-mer Ausgangspeptid zu aktivieren. Damit konnte eine Frage der Zielsetzung beantwortet werden. Es gibt körpereigene Peptide, die OspA-spezifische Hybridome dem 12-mer OspA₁₆₄₋₁₇₅-Peptid vergleichbar aktivieren können, allerdings werden dazu durchweg höhere Peptiddosen benötigt. Zweitens kann geschlossen werden, dass dieses Experiment die *in vivo*-Situation nicht realistisch widerspiegelt, da hier solch hohe Peptiddosen nicht anzunehmen sind. Die meisten hier untersuchten Peptide führten zu einer wesentlich schwächeren TZR-Aktivierung und IL-2-Produktion als das OspA₁₆₄₋₁₇₅-Peptid selbst.

3.9 Verkürzungsanalysen vor Modellierung OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischer Hybridome

Hintergrund der Analyse war die Überlegung, dass mit den bisher beschriebenen Techniken der Supertop-Motive und der Sequenzhomologie von OspA- und Selbstpeptiden keine Vorhersage darüber möglich war, welches Hybridom welche Selbstpeptide erkennt. So sollten im folgenden Modellierungsexperimente durchgeführt werden, die die Wechselwirkungen der pMHC-Bindung anschaulicher herausheben und generelle Bindungscharakteristika der Peptide im MHC-Molekül graphisch darstellen sollten. Als Vorbereitung wurden dazu ähnlich der anfangs durchgeführten Verkürzungsanalysen die minimalen Epitope der zu untersuchenden OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome bestimmt. Die minimalen Epitope sollten dann im Rahmen der Modellierungsexperimente in ein bekanntes MHC-Kristallgerüst gerechnet werden. Entgegen den Verkürzungsanalysen vor den Substitutionsanalysen wurden hier die vorgegebenen 12-mer Peptide jeweils nur um eine Aminosäure am C-Terminus bis zu einem 6-mer Peptid verkürzt. Als Negativkontrolle diente PBS ohne Antigenzusatz. Als Positivkontrolle wurde die aus der Substitutionsanalyse für OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifische Hybridome bekannte 12-mer Sequenz *GYVLEGLTAEK* verwendet. Exemplarisch werden die zwei OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome 257/4 und 170/1 gezeigt, zunächst Hybridoms 257/4 in **Abbildung 25**.

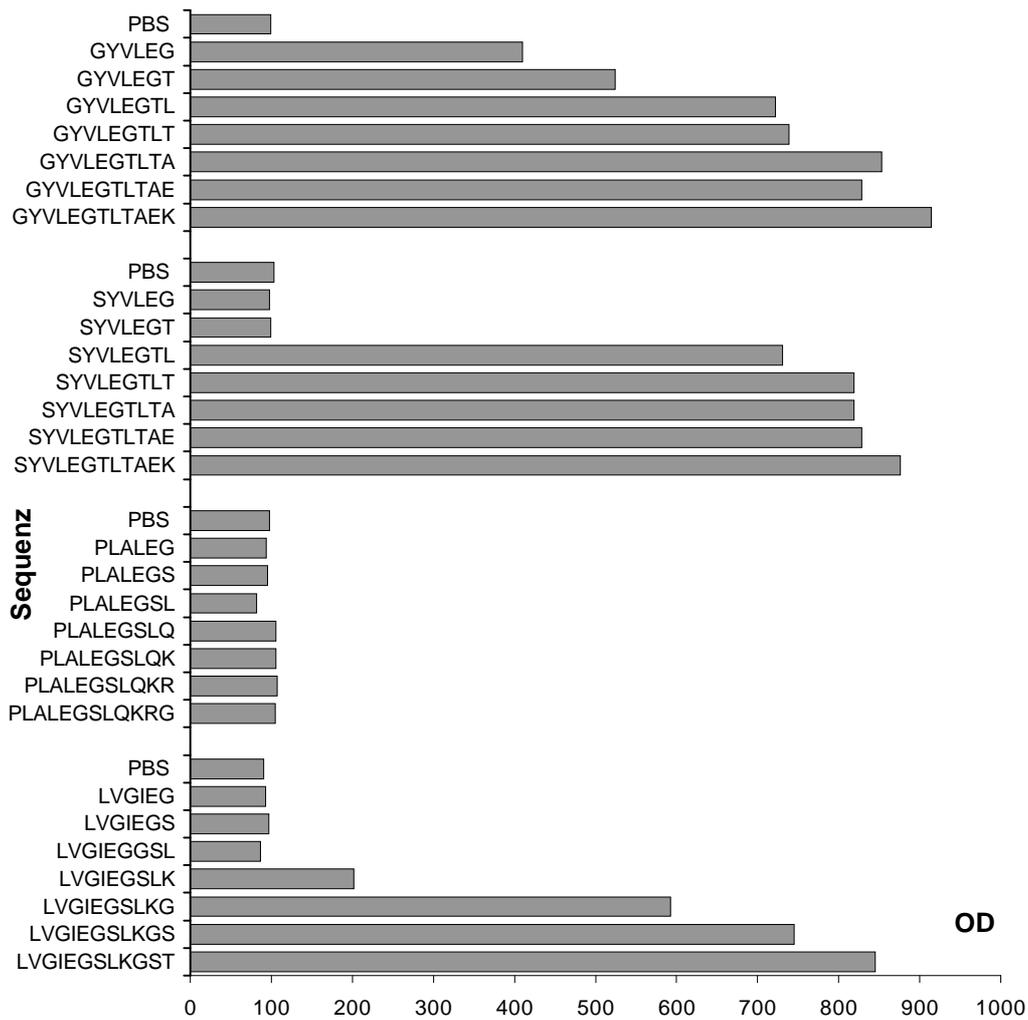


Abbildung 25: Verkürzungsanalyse zur „Modellierung“ des OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridoms 257/4

Am C-Terminus des 12-mer Ausgangspeptids wurde jeweils eine Aminosäure entfernt, um das minimale Epitop für das Hybridom zu bestimmen. Hier folgte die Erkennung des Ausgangspeptids bis zum 6-mer GYVLEG und bis zum 8-mer SYVLEGLT. Das „insulin precursor protein“ wurde nicht erkannt, was die Nichterkennung im Suchtest bestätigte. Das „opa-interacting protein“ wurde bis zum 9-mer Peptid erkannt. Die Peptide GYVLEGLTAEK und SYVLEGLTAEK fungierten als Positivkontrolle, PBS als Negativkontrolle. Die Zellkonzentrationen der Hybridome und APZ wurden wie bei den Substitutionsanalysen eingesetzt. Als Peptide wurden die konventionellen Peptide in Pulverform verwendet

Ab dem 6-mer Peptid *GYVLEG* brach die Erkennung ab, beim zweiten Kontrollpeptid *SYVLEGLTAEK* schon beim 8-mer Peptid *SYVLEGLT*, das „insulin precursor protein“ wurde nicht erkannt, wohl aber das „opa-interacting protein“. Dieses stimmte an 2 Positionen, T172 und K175, nicht mit den Positionen im Supertop überein. Für die anschließende Modellierungs-Untersuchung wurden die Peptid-Ankerpositionen Y165 an Position p1 und E168 an Position p4 gelegt. Das zweite Beispiel zeigt die Bindungscharakteristik des Hybridoms 170/1 in **Abbildung 26:**

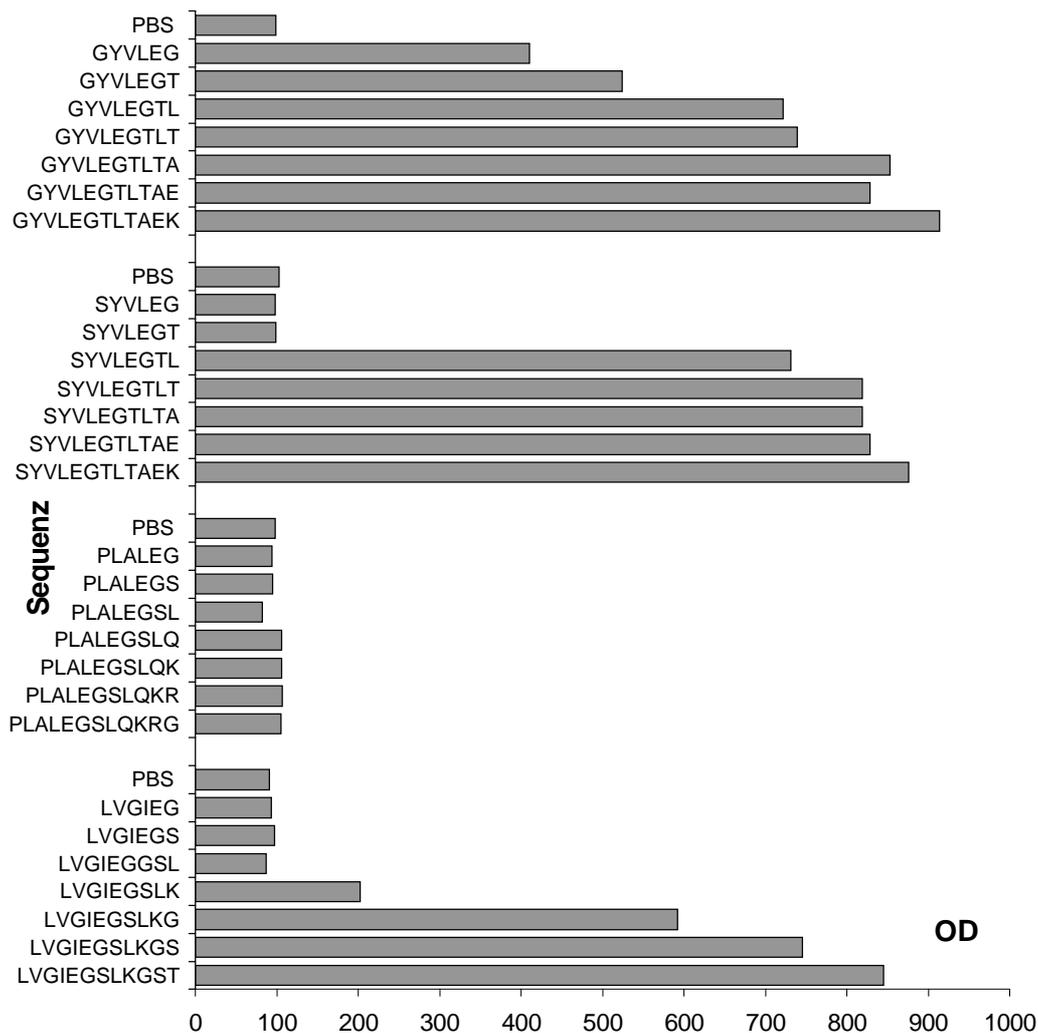


Abbildung 26: Verkürzungsanalyse zur „Modellierung“ des OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridoms 170/1

Am C-Terminus des 12-mer Ausgangs-peptids wurde jeweils eine Aminosäure entfernt, um das minimale Epitop für das Hybridom zu bestimmen. Hier folgte die Erkennung des Ausgangs-peptids bis zum 8-mer *GYVLEGTL* und zum 8-mer *SYVLEGTL*. Das „insulin-precursor protein“ wurde nicht erkannt. Das „opa-interacting protein“ wurde bis zum 10-mer Peptid erkannt. Die Peptide *GYVLEGTLTAEK* und *SYVLEGTLTAEK* dienen als Positivkontrolle, PBS als Negativkontrolle. Zellkonzentrationen, Hybridome und APZ wie unter Abbildung 25 beschrieben.

Hier werden die beiden Kontrollpeptide bis zum 8-mer Peptid erkannt. Wie in den Voruntersuchungen konnte auch hier das „insulin precursor peptide“ keine IL-2-Synthese induzieren, das „opa-interacting protein“ konnte bis zum 9-mer Peptid erkannt werden, wobei das Hybridom 170/1 dieses Protein erstmalig erkannte. Die Position T172 stimmte nicht mit dem Supertop überein, da ein K-Rest an dieser Stelle nicht erlaubt war. Interessanterweise wird bei der T-K (Threonin-Leuzin)-Substitution eine ungeladene (T) gegen eine positiv geladene, basische (K) Aminosäure ausgetauscht. Ferner geschieht dies an einer essentiellen Position (T172), die, wie die Verkürzungsanalyse gezeigt hat, bei Wegfall ein Nicht-Erkennen zur Folge hat. Einerseits könnte es sich um ein spezifisches Peptid-Bindungsrastrer des TZR handeln. Andererseits könnten die Seitenkettenreste die TZR-pMHC-Bindung beeinflusst haben.

3.9.1 Modellierung zur Bestimmung der DRB1*0401-Bindungsepitope

Für die Modellierungs-Methode (Abagyan et al., 1994a; Monte Carlo), (Conolly et al., 1983) und (Abagyan et al., 1994b; ICM) wurden zunächst die minimalen Epitope der Hybridome wie beschrieben bestimmt. Die analysierten Peptide wurden nun unter Abschätzung ihrer Ankerpositionen in das HLA-DR4-Kristallgerüst modelliert. Hierbei waren vor allem die Positionen der Seitenketten innerhalb der pMHC-Bindung von Bedeutung, die als freie Variablen im Monte-Carlo-Programm (Abschnitt 2.8) fungierten. Es wurden die Seitenketten-Dihedralwinkel und deren Konformationen durch eine globale Optimierung (zufälliges Durchsuchen nach energetisch günstigen Positionen der Seitenketten) analysiert, um ihre optimale Position innerhalb des pMHC-Bindung festzulegen. Eine Bedingung war, dass die Peptidrückgratstruktur des Ausgangspeptids im MHC-Kristallgerüst nach Optimierung ähnlich bleiben sollte. Am Ende stand ein Bild der Oberfläche des pMHC-Komplexes, in dem die elektrostatischen Eigenschaften durch verschiedene Einfärbungen (rot-sauer, weiß-neutral, blau-basisch) sichtbar gemacht werden konnte (**Abbildung 27**).

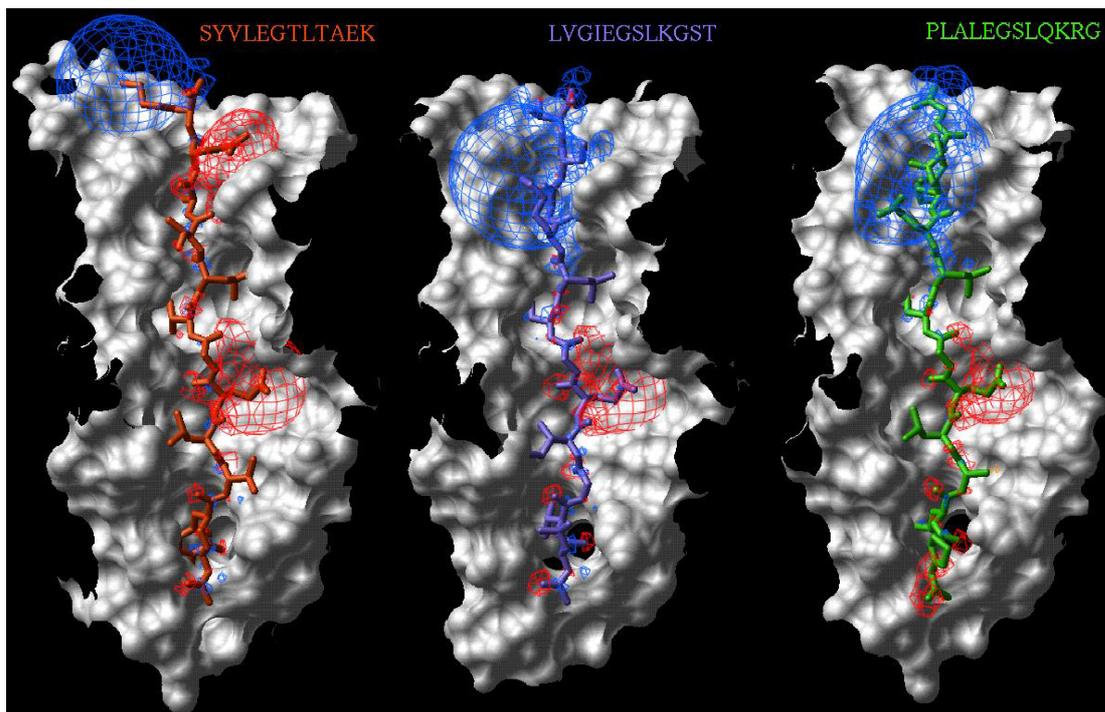


Abbildung 27: Modellierung: LVGIEGSLKGST, PLALEGSLQKRG, SYVLEGLTAEK und OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifisches Hybridom 376/5.

Dargestellt sind drei Peptidsequenzen: *LVGIEGSLKGST* (opa-interacting protein 5) als Negativkontrolle, *SYVLEGLTAEK* als Positivkontrolle und *PLALEGSLQKRG* (insulin precursor protein) als identifiziertes Selbstpeptid. Die Ankerpositionen der Peptide aus den Supertopen wurden festgelegt, die Peptide in die HLA-DR4-Kristallstruktur modelliert. Man erkennt das vertikal verlaufende Peptidgerüst, von dem aus die Peptidseitenketten in das Kristallgerüst ziehen. Die gestrichelten Wolken um die Seitenketten entsprechen Seitenkettenbindungen, die aus der Bildebene herausragen. Die elektrostatischen Eigenschaften wurden durch verschiedene Einfärbungen (rot-sauer, weiß-neutral, blaubasisch) sichtbar gemacht. Die Analyse der Seitenkettenanordnungen im Gerüst ergibt ein hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den Peptiden.

Es wurden ein Kontrollpeptid aus der Substitutionsanalyse *SYVLEGLTLAEK*, ein im Vortest durch das Hybridom 376/5 nicht erkanntes Selbstpeptid *LVGIEGSLKKGST* als Negativkontrolle sowie ein durch dieses Hybridom 257/4 in der Substitutionsanalyse erkanntes Selbstpeptid *PLALEGSLQKRG* als Positivkontrolle ausgewählt. Die Betrachtung der Seitenketten in der MHC-Kristallstruktur ergibt ein auffallend hohes Maß an Übereinstimmung zwischen den Peptiden. An den Positionen p2 und p5 ragen die Seitenketten bei allen Peptiden aus der Bildebene heraus, welche die TZR-Interaktion im TZR-pMHC-Komplex entscheidend modulieren könnten. Die beiden Selbstpeptide *PLALEGSLQJRG* und *LVGIEGSLKKGST* haben eine fast identische Lage im Gerüst. Hier fanden sich also keine gravierenden strukturellen Bindungsunterschiede, die eine eindeutige Zuordnung zur Vorhersage einer Peptiderkennung zuließen. Im Vergleich des Kontrollpeptids mit den Selbstpeptiden zeigten sich im Kontrollpeptid 2 Seitenkettenreste, die aus der Bildebene herausragten und sich entlang der seitlichen Achse des Peptidrückgrats ausbreiteten. Möglicherweise wird durch diese beiden Reste die TZR-Bindung an den pMHC-Komplex in derart stabilisiert, dass das Hybridom lange genug mit dem pMHC verbunden bleibt und aktiviert wird. Jedoch liefern dieser geringen Unterschiede in der Seitenkettenanordnung im Kontrollpeptid keine Erklärung dafür, dass in der Peptiderkennung eine so große Variabilität zu bemerken ist. Strukturelle Bedingungen eines individuellen Musters an Kreuzreaktivität scheinen nach diesem Ergebnis nur ein wichtiger Teil der Peptiderkennung zu sein, den andere Aspekte wie zum Beispiel Bindungszeit des TZR an den pMHC-Komplex, pH oder Temperaturbedingungen ergänzen müssen, um eine Aktivierung der Hybridome zu erreichen. Somit ist auch durch diese graphische Methode keine sichere Aussage über Vorhersage einer Peptiderkennung oder Nichterkennung möglich. Sie bietet jedoch wertvolle Aussagen über die Seitenkettenverteilung, die die pMHC-Interaktion wesentlich beeinflusst.