

4 Diskussion

Ausgangspunkt unserer Untersuchungen der molekularen Mimikry als Antigen-spezifischer Mechanismus zur Entstehung von Autoimmunität waren Befunde, die vermuten ließen, dass die Immunantwort auf *Borrelia burgdorferi* an der Pathogenese der therapieresistenten LA beteiligt sein könnte. Vor dem Hintergrund der T-Zellantwort auf OspA bei Patienten mit therapieresistenter LA wurde die Arbeitshypothese entwickelt, dass *B. burgdorferi*-spezifische T-Zellen genetisch prädisponierter Patienten durch Kreuzerkennung eines Selbstantigens arthritogen wirken könnten. In unserer Arbeitsgruppe wurden daher die OspA-Epitope durch Arbeiten von B. Maier charakterisiert. Anschließend wurde in öffentlich zugänglichen Protein-Datenbanken nach Selbstantigenen gesucht, die von OspA-spezifischen HLA-DR4-restringierten Th-Zellen erkannt werden. Da sich in der Literatur zu Beginn unserer Untersuchungen die Hinweise verdichteten, dass Antigenerkennung durch den TZR flexibler sein müsse als bis dato angenommen (Mason et al., 1998 und Kersh et al., 1996), verließen wir die Strategie der Suche nach Sequenzhomologien zwischen Selbst- und Fremdantigen und entwickelten mit der Charakterisierung der Erkennungsmotive (Supertope) OspA-spezifischer Th-Zellen einen neuen Ansatz zur Suche nach kreuzreaktiven Peptidliganden.

4.1 Aussagen zu den bisherigen Befunden

Die Ergebnisse ergaben einerseits den wichtigen Befund, dass nicht die Sequenzhomologie, sondern strukturelle Kriterien für die kreuzreaktive Peptiderkennung durch T-Zellen entscheidend sind.

Weiterhin ergab sich der Befund, dass Kreuzreaktivität auf TZR-Ebene häufig vorkommt und insbesondere durch die große Variabilität in den TZR-pMHC-Wechselwirkungen bedingt ist.

Schließlich zeigte sich, dass mit den in dieser Arbeit beschriebenen und angewandten Methoden der Sequenzhomologie-Analyse, Supertop-Charakterisierung und Peptidmodellierung keine exakte Vorhersage über die Erkennung eines Peptides durch einen gegebenen TZR möglich ist, dass also das Ausmaß von Kreuzreaktivität mit genannten Methoden immer noch unterschätzt wird.

4.1.1 Identifizierung der kreuzreagierenden Selbstantigene

Um die kreuzreagierenden Selbstantigene zu erhalten, habe ich in beschriebenen Verkürzungsanalysen zunächst die minimale Epitoplänge von ausgewählten OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridomen bestimmt. Die Längenanalysen ergaben unterschiedlich lange

minimale Epitope der getesteten Hybridome, was als Ausdruck einer polyklonalen Expansion der aus den Mäusen hergestellten OspA-spezifischen T-Zellen gewertet wurde. Im Anschluss wurden die individuellen Supertope der Hybridome in den beschriebenen Substitutionsanalysen ermittelt. In den getesteten OspA-Bereichen OspA₁₄₅₋₁₅₆, OspA₁₄₉₋₁₆₀ und OspA₁₆₄₋₁₇₅ standen die gefundenen Epitope mit den bekannten HLA-DR4 Bindungsmotiven in Einklang (Southwood et al., 1998; Sette et al., 1993; Hammer et al., 1995). Tendenziell zeigte sich eine restringierte TZR-Erkennung im zentralen Epitopteil bei gleichzeitig großer Variabilität der Erkennung am C- und N-Terminus. Dies beschreibt den bekannten Befund, dass die wichtigen Merkmale für eine spezifische Antigenerkennung im zentralen Epitopteil liegen. Die Zahl der tolerierten Substitutionen zwischen den einzelnen Hybridomen schwankte erheblich, sowohl in den Einzelpositionen als auch im gesamten Epitop. Die im Ergebnisteil aufgeführten Beispiele für die Anzahl der Gesamtsubstitutionen (Hybridom 8/2 mit 83- und Hybridom 29/1 mit 134 Gesamtsubstitutionen bei vergleichbarer restringierter Erkennung der Aminosäuren-Reste im zentralen Epitopteil) sowie für die Einzelpositionen (L171 ist beim Hybridom 376/5 nur durch sich selbst substituierbar, beim Hybridom 170/6 sind 8 und bei den Hybridomen 224/2 und 257/4 jeweils 7 Substitutionen erlaubt) unterstreichen die in der Verkürzungsanalyse vermutete polyklonale T-Zellantwort auf OspA.

4.2 Strukturelle Kriterien zur kreuzreaktiven Peptiderkennung OspA-spezifischer T-Zellen

Von den für den Bereich OspA₁₆₄₋₁₇₅ identifizierten Selbstpeptiden durch Supertop- (387 Peptide) und Sequenzhomologie-Analyse (88 Peptide) konnten jeweils nur ca. 3% eine IL-2-Antwort in den Hybridomen induzieren. Ein ähnliches Bild ergab sich für den von B. Maier aus unserem Labor untersuchten OspA₂₃₆₋₂₄₅-Bereich. In unserer EAE-Arbeitsgruppe (engl.: experimental autoimmune encephalomyelitis) (Grogan et al., 1999) wurden von 353 Peptiden für den MBP_{AC1-11}-Bereich (myelins basisches Protein mit N-terminalem actetyliertem Rest 1-11) nur 18 Peptide erkannt (5%). Die Arbeitsgruppe um Wucherpfennig und Strominger (Wucherpfennig und Strominger, 1995a) fand ein ähnliches Verhältnis bei MBP₈₅₋₉₉-spezifischen humanen T-Zell-Klonen (5%). In dieser Arbeit, die ebenfalls die Aminosäuren-Substitutionen verwendete, wurden für einige HLA-DR2-restringierte MBP-spezifische T-Zellklone diejenigen Positionen des Peptids bestimmt, die entweder für die Bindung an HLA-DR2 oder für die TZR-Erkennung von Bedeutung waren. In durchgeführten Datenbanksuchen wurden Aminosäuren-Substitutionen nur an Positionen erlaubt, die nicht für die HLA-Bindung und die TZR-Erkennung von Bedeutung waren. Von den identifizierten 129 mikrobiellen Peptiden konnten 7

mindestens einen der 5 untersuchten T-Zellklone aktivieren. Entscheidend war der zusätzliche Befund, dass nur eines der sieben Peptide durch eine Sequenzhomologie-Suche identifiziert worden wäre. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen meiner Analysen, bei denen sich 387 Peptide durch die Supertop-Analyse und nur 88 Sequenzhomologe aus den Datenbanksuchen für OspA₁₆₄₋₁₇₅ ergaben. Eine Vielzahl der durch die Hybridome erkannten Selbstpeptide, insbesondere jene mit wenig Homologie zum OspA-Ausgangspeptid, wären durch alleinige Sequenzhomologie-Suche nicht identifiziert worden. Im OspA₂₃₅₋₂₄₆-Bereich wurden Selbstpeptide erkannt, die keine einzige Aminosäure mit dem OspA-Peptid teilten. Auch im EAE-Modell in unserem Labor wurden 6 Peptide identifiziert, die nur zwei Aminosäuren aus dem MBP_{Ac1-11} konservierten. Insgesamt wird durch genannte Arbeiten die Theorie gestützt, dass strukturelle Kriterien entscheidender für die kreuzreaktive Peptiderkennung eines TZR sind als bloße Sequenzhomologie. Es stellte sich die Frage, warum nur ein relativ geringer Prozentsatz von Peptiden, die die strukturellen Bedingungen der Supertope erfüllten, die T-Zellen aktivieren konnte. Die naheliegendste Erklärung für diesen Befund liegt in der Annahme von kombinatorischen Effekten bei den Substitutionen, wobei zwei individuell verbotene Substitutionen in Kombination wieder eine Erkennung des Peptids bewirken können, die Erkennung durch den TZR also rekonstituieren. Für die vermuteten kombinatorischen Effekte gibt es in der Literatur sowie in dieser Arbeit direkte Hinweise (Ausubel et al., 1996; Hemmer et al., 2000). Beispiele in dieser Arbeit ließen sich sowohl bei den durch Supertop-Analysen identifizierten Selbstpeptiden als auch bei den sequenzhomologen Peptiden finden. Keines der drei durch Sequenzhomologie-Suche identifizierten Selbstpeptide entsprach den von uns definierten Hybridom-Supertopen. Trotzdem konnten die 3 Peptide mindestens eines der OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome aktivieren. In anderen Arbeiten wurde dieses Phänomen von einigen Autoren darauf zurückgeführt, dass jede Seitenkette jeder Aminosäure die Peptiderkennung relativ unabhängig voneinander zu beeinflussen vermag (Hemmer et al., 1998; Quarantino et al., 1995), unabhängig davon, ob die Position für die MHC-Bindung oder die TZR-Interaktion kritisch ist. Veränderungen in der Aminosäuren-Sequenz eines Peptids können sogar zum Verlust einiger Aktivierungsparameter (beispielsweise T-Zellproliferation) führen, was aus Agonist-Liganden partielle Agonisten oder auch Antagonisten machen kann (Übersicht in Kersh et al., 1996). Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der bis dato akzeptierten Annahme einer spezifischen TZR-Erkennung, in der allenfalls minimale konservative Änderungen der Peptidsequenz als „erlaubt“ galten (Germain, 1994). Auch andere Arbeiten zeigen Hinweise auf „kombinatorische Effekte“ in der Peptiderkennung (Reay et al., 1994; Hemmer et al., 1997; Wucherpfennig und Strominger, 1995b). Die Arbeitsgruppe um Reay

stellte fest, dass auch Aminosäuren-Substitutionen an scheinbar „unwichtigen“ Abschnitten des Peptids, also Positionen, die keine klassischen MHC-Ankerpositionen oder TZR-Kontaktpunkte bilden, dramatische Auswirkungen auf die Peptiderkennung hatten. Bei diesen Untersuchungen wurde ein antigenes Peptid, erkannt durch einen transgenen TZR, systematisch verändert, um Peptidpositionen, die wichtig für die MHC- und TZR-Bindung waren, zu charakterisieren. Offenbar vermag jede Aminosäure einer gegebenen Peptidsequenz die TZR-Erkennung entscheidend zu beeinflussen (Quarantino et al. 1995). In dieser Arbeit ergab die Analyse der 13 erkannten Peptide aus der Supertop-definierten Datenbanksuche, dass Peptide, die den Supertop-Kriterien eines Hybridoms an allen Positionen genügten, nicht von diesem erkannt wurden, sondern von Hybridomen, deren Supertop-Motive der erkannten Peptidsequenz in mindestens einer Position widersprachen. Diese Beobachtung konnte ebenfalls durch synergistische Effekte individuell verbotener Substitutionen gut erklärt werden.

Auch der gegenteilige Effekt wurde in dieser Arbeit beobachtet, nämlich dass individuell „erlaubte“ Substitutionen nicht mehr toleriert werden, wenn sie kombiniert in einer Sequenz vorkommen. Beispielsweise sei das Hybridom 170/1 genannt, welches das „carbonic anhydrase-related protein“ mit der Sequenz *YWVYEGSLTIPP* nicht erkannte, obwohl alle Positionen dem für das Hybridom definierten Supertop entsprachen. Dafür fanden sich bei den Hybridomen in allen untersuchten OspA-Bereichen zahlreiche Beispiele.

Ein anderes Phänomen von Kreuzreaktivität sei am K160-Rest aus der Substitutionsanalyse der hier analysierten OspA₁₄₉₋₁₆₀-spezifischen Hybridome gezeigt, der in Verkürzungsanalysen für die Erkennung unverzichtbar, in der Substitutionsanalyse eine degenerierte Erkennung bewirkte, also vielfach ersetzbar war. Dieser Befund kann möglicherweise zwei wesentliche Ursachen haben. Einmal könnte es sich um eine Verschiebung in ein anderes TZR-Bindungsraaster handeln, so dass der TZR keinen oder einen anderen Kontaktpunkt mit dem pMHC-Komplex ausbildet. Andererseits könnte durch eine andere Lage des Peptids im MHC-Molekül indirekt die Konformation des MHC und damit die Bindungsqualität des TZR-pMHC-Komplexes verändert worden sein. Es konnte gezeigt werden, dass bereits kleinste Änderungen in der MHC-Konformation die TZR-Erkennung wesentlich beeinflussen (Madrenas et al., 1996). Beispielsweise stimmte das vom Hybridom 376/5 erkannte "melanoma associated chondroitin sulfate proteoglycan" mit der Sequenz *SGRLQVRLVLGQ* nur in 3 von 12 Positionen mit dem Supertop-Motiv für dieses Hybridom überein. Aus der Sequenz des OspA₁₆₄₋₁₇₅ Ausgangspeptids *GYVLEGLTIAEK* waren nur der L167- und der L171-Rest übrig geblieben, was eine Erkennung nicht hätte vermuten lassen. Für dieses Phänomen wurden in dieser Arbeit zahlreiche Beispiele gefunden. Die Art der Peptiderkennung, in der verschiedene Abschnitte (Raster) von

Kontaktpunkten eines TZR für verschiedene pMHC-Liganden postuliert werden, so dass mehrere überlappende Sequenzen eines Peptids im gleichen MHC-Kontext erkannt werden können, wurde von der Arbeitsgruppe um Nanda (Nanda et al., 1995) beschrieben. Einerseits wäre ein Raster denkbar, in dem in der oben beschriebenen Sequenz *SGRLQVRLVLGQ*₁₆₄₋₁₇₅ L167 an Position p1, R170 an p4 und V172 an Position p6 mit zwei klassischen Resten an p1 und p6 läge. Andererseits könnte ein zweites Raster bei V172 an Position p1 und Q175 an p4 liegen, so dass die zwei Raster um 5 Aminosäuren verschoben wären. Wenn, wie vermutet, das Peptid im MHC-II-Molekül seine Orientierung nicht verändern kann (Brown et al., 1993), ist es vorstellbar, dass bei Lageveränderung des positiv geladenen K-Rests der TZR eine andere Orientierung einnehmen muss, um auch mit diesem Rest im pMHC-Komplex zu interagieren. Einen weiteren Hinweis auf kombinatorische Effekte im Rahmen von Aminosäuren-Substitutionen zur Untersuchung von T-Zell-Kreuzreaktivität gaben randomisierte Peptidbibliotheken, die in der Arbeitsgruppe um Hemmer und Martin (Übersicht in Hemmer et al., 1998) entwickelt wurden.

4.3 Randomisierte Peptidbibliotheken

Bei dieser Technik werden die TZR zur gleichen Zeit mit einem Peptidgemisch aus vielen Millionen Peptiden in einer Probe konfrontiert, die sich jeweils nur an einer einzigen Position in ihrer Sequenz gleichen. Konjugiert man nun alle natürlichen AS an allen Positionen eines 10-mer Peptids, so erhält man bei 20 Aminosäuren und 10 Positionen 200 Peptidproben, welche den Peptidpool bilden. Diese Proben werden nun zu den zu untersuchenden Zellkulturen gegeben. Die Gruppe um Hemmer untersuchten MBP (86-96)-spezifische CD4⁺-T-Zell Klone hinsichtlich ihrer Antigenerkennung mittels 220 11-mer Peptidbibliotheken (Hemmer et al., 1997). Diese Peptidbibliotheken enthielten ca. 20¹¹ verschiedene Peptide mit Einzelkonzentrationen von ca. 5 x10¹⁹ g/ml. Es ergaben sich die Befunde, dass bestimmte CD4⁺-T-Zellklone durch das Peptidgemisch aktiviert werden können, woraus gefolgert wurde, dass dieser Klon mit vielen verschiedenen Liganden reagieren kann und dass seine Peptiderkennung stark degeneriert ist. Degeneriertheit in der Peptiderkennung wurde weiterhin durch den Befund gestützt, dass nicht-konservative Veränderungen an den primären und sekundären TZR-Kontaktpunkten, die die Peptiderkennung normalerweise vereiteln, durch sogenannte Superagonisten-Modifikationen an anderen Peptidpositionen ausgeglichen wurden. In der Arbeitsgruppe um Allen wurden primäre TZR-Kontaktpunkte als Aminosäuren-Reste definiert, die weder konservative noch nicht-konservative Substitutionen zulassen, sekundäre TZR-Kontaktpunkte als Aminosäuren-Reste, die konservative, jedoch keine nicht-konservativen Substitutionen erlauben (Kersh et al., 1996).

Superagonisten-Modifikationen sind Austausch von Aminosäuren, die eine stärkere Agonistenreaktion hervorrufen können als das Ausgangspeptid, ohne die Peptid-MHC-Bindung zu verstärken. Auch in unserer Arbeit fanden wir eine große Degeneriertheit der Peptiderkennung durch die Hybridom-TZR, allerdings keine stärkeren Agonisten als unser Ausgangspeptid OspA₁₆₄₋₁₇₅ selbst, was in den Analysen zur dosisabhängigen Aktivierung der OspA-spezifischen Hybridome deutlich wurde. Die Vorteile der Peptidbibliotheken gegenüber unserer Methode der Aminosäuren-Substitutionsanalyse liegen in der Möglichkeit der Untersuchung von kombinatorischen und kompensatorischen Effekten an verschiedenen Positionen auf die Peptiderkennung. Ein weiterer Vorteil ist die Relativierung der TZR- und pMHC-Kontaktpositionen und die unvoreingenommene Berücksichtigung jeder Position in einer gegebenen Sequenz (unabhängig von Sequenzhomologie und strukturellen TZR-Eigenschaften). Letztlich können mit Peptidbibliotheken eine enorme Vielzahl von kreuzreaktiven Peptidliganden identifiziert werden (Hemmer et al., 1999), die stärker agonistisch als das Ausgangspeptid auf den jeweiligen TZR wirken. Hauptnachteile der Peptidbibliotheken sind die fehlende Stimulierbarkeit einiger T-Zellklone durch das Peptidgemisch und agonistisch-antagonistische Effekte der Peptide im Gemisch. Antagonisten sind Peptide, die T-Zellen nicht aktivieren oder gar eine spätere Aktivierung derselben verhindern können. Dieses Phänomen der unterschiedlichen Peptidwirkung am TZR wurde bei der Suche nach einer möglichen Therapieform der Multiplen Sklerose mittels Peptidbibliotheken ausgenutzt (Bielekova et al., 2000). Weiterhin ist kritisch zu bemerken, dass nur ein kleiner Teil der Aminosäuren-Sequenzen aus natürlichen Proteinen prozessiert und präsentiert wird, und schließlich die niedrige Peptidkonzentration in der Probe. Da ein T-Zellklon zur messbaren Stimulation eine Konzentration von ca. 10^{-2} μM benötigt, müssten 30 Millionen verschiedene Peptide zur Erkennung agonistisch wirken (Wilson et al., 1999). Hauptnachteile unserer Aminosäuren-Substitutionsanalyse ist wie erwähnt die fehlende Möglichkeit der Untersuchung kombinatorischer Substitutionseffekte; weiterhin werden viele Liganden nicht gefunden oder mittels Supertop falsch-positiv vorhergesagt, das heißt nicht durch den jeweiligen Hybridom-TZR erkannt. Dies bedeutet, dass mit der Substitutionsmethode und Supertop-Definition das Potential des TZR zur kreuzreaktiven Peptiderkennung weit unterschätzt wird. Diese Befunde zeigen weiterhin, dass weder die genaue Kenntnis der TZR- und MHC-Kontaktpunkte mit dem Peptid noch strukturelle Definitionen der Bindungskriterien durch systematische Substitutionsanalysen, wie in dieser Arbeit durchgeführt, eine genaue Vorhersage über die Erkennung von mikrobiellen- oder Selbstpeptiden durch einen TZR erlauben. In der Arbeitsgruppe um Hemmer wurde anhand bestimmter randomisierter Peptidbibliotheken, der „positional scanning synthetic

combinatorial peptide library“ (PS-SCL), beobachtet, dass bestimmte Aminosäuren-Kombinationen die Stärke der Peptiderkennung synergistisch beeinflussen, unabhängig vom schon diskutierten individuellen Beitrag jeder Aminosäure zur TZR-pMHC-Bindung. Diese synergistischen Effekte waren stärker als die erwarteten additiven Effekte der individuellen Beiträge, was in Einklang mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen steht (Ausubel et al., 1996). Die genaue Ursache für dieses Phänomen konnte jedoch mit der verwendeten Methode der PS-SCL nicht ausreichend untersucht werden, die keine Aussagen zu physikalisch-chemischen Effekten erlaubte. Ein Ansatz zur Erklärung bot die Analyse der Wechselwirkungen zwischen dem TZR und dem pMHC-Komplex in Kristallstrukturen.

4.4 Rolle von TZR- und pMHC-Interaktionen in der Peptiderkennung

Der genaue Mechanismus dieser beobachteten synergistischen Effekte in der Peptiderkennung wird letztlich durch flexible Interaktionen zwischen TZR und pMHC-Ligand (engl.: induced fit) vermutet (Garcia et al., 1998). Diese sind hauptsächlich durch die TZR-CDR-Schleifen bedingt und lassen einen gewissen Spielraum für TZR-Peptid-Interaktionen, wobei leichte Änderungen in der Sequenz des MHC-Moleküls und des pMHC-Komplexes durch die TZR-CDR3-Schleifenregionen kompensiert werden können (Ding et al., 1999). Die in der Einleitung erwähnten dreidimensionalen TZR-pMHC-Strukturen gaben Hinweise für die beobachtete degenerierte Peptiderkennung eines gegebenen TZR. Hauptverantwortlich für die Begründung der TZR-Degeneriertheit ist einerseits, dass TZR und pMHC-Liganden wenig komplementär sind, was eine enorme Anpassung an eine große Zahl von unterschiedlichen Peptidsequenzen erlaubt und die Flexibilität des TZR (Garboczi et al., 1999) erhöht. Andererseits sind weitreichende Konformationsänderungen in den TZR-CDR-Schleifen bei Bindung eines pMHC-I-Liganden beobachtet worden, besonders in den peptidkontaktierenden CDR-3 α - und β -Schleifen. Die Autoren vermuteten eine erhöhte Plastizität in der Peptiderkennung (Garcia et al., 1998). Letztlich können auch große Leerräume zwischen TZR und pMHC-Ligand die Variabilität in der Peptiderkennung über Wasserstoffbindungen erhöhen (Garcia et al., 1998). Dies zeigt, dass selbst mit der Methode der randomisierten Peptidbibliotheken das Ausmaß von Kreuzreaktivität in der Peptiderkennung eines gegebenen TZR noch unterschätzt wird und steht in Einklang zu den Ergebnissen unserer Untersuchungen mittels Supertop-Analyse.

4.5 TZR- und pMHC-Kontaktpunkte und Häufigkeit von T-Zell-Kreuzreaktivität

Trotz der beobachteten Befunde additiver Beiträge jeder Aminosäure (neutral, positiv und negativ) in einer Sequenz sowie synergistischer Effekte durch Superagonisten-Modifikationen,

die wie unsere Ergebnisse auf viele mögliche stimulatorische Liganden für autoreaktive Th-Zellen hinweisen, wird ein bestimmtes Maß an Spezifität in der Peptiderkennung beibehalten. Beispielsweise wurde ein hohes Maß an Spezifität im Hämoglobin (Hb)-System beschrieben. Dort wurde ein Peptid, welches nur die p5 Position als primären TZR-Kontaktpunkt mit dem nativen Peptid gemein hatte, von einem Hb-spezifischen T-Zellklon erkannt (Evavold et al., 1995). Ergebnisse einer anderen Gruppe zeigten drastische Verminderungen der Erkennungsstärken von Peptiden bei Substitutionen im Bereich des primären TZR-Kontaktpunktes an Position p5 (Kersh et al., 1996). Diese wurden durch unterschiedliche Wechselwirkungen der Peptidseitenketten mit dem TZR an dieser Position erklärt. Diese Ergebnisse stehen jedoch nicht im Widerspruch zu einer stark degenerierten TZR-Peptiderkennung, da in erwähnter Arbeit nur Aminosäuren-Substitutionen am primären TZR-Kontakt (Position p5) untersucht wurden, nicht jedoch synergistische oder kombinatorische Effekte von Mehrfachsubstitutionen. Auch in meinen Ergebnissen zeigte sich eine insgesamt degenerierte Peptiderkennung mit Identifizierung vieler stimulatorischer Peptidliganden der untersuchten TZR bei erhaltener restringierter Erkennung im zentralen Epitopteil. Diese Restriktion zeigte sich in allen untersuchten OspA-Bereichen, variierte jedoch zwischen den untersuchten Hybridomen.

In Einklang mit den beschriebenen Ergebnissen der Peptidbibliotheken-Analysen ergab sich in dieser Arbeit der Befund, dass Kreuzreaktivität von Th-Zellen ein häufig auftretendes Ereignis ist. Dies zeigte sich daran, dass einzelne Hybridom-TZR bis zu 10 kreuzreaktive Selbstpeptide erkennen konnten. Auch in den Untersuchungen im MBP-System unseres Labors ließ sich dieser Befund stützen. Dort konnte ein autoreaktiver TZR identifiziert werden, der 61 kreuzreaktive mikrobielle- (Grogan et al., 1999) und 36 kreuzreaktive Selbstpeptide erkannte. Auch in anderen Arbeitsgruppen mit verschiedenen experimentellen Ansätzen zeigten sich ähnliche Ergebnisse. Beispielsweise wurde im murinen Modell durch ein im Thymus präsentiertes Peptid ein funktionsfähiges T-Zell-Repertoire selektioniert (Ignatowicz et al., 1997). In der Arbeitsgruppe um Hemmer konnte im Rahmen der Identifizierung von T-Zellepitopen ein T-Zellklon charakterisiert werden, der einige hundert verschiedene Peptide erkennt (Hemmer et al., 1999). Was bedeuten die Aspekte einer degenerierten Peptiderkennung und die Häufigkeit von Kreuzreaktivität für die Hypothese der molekularen Mimikry?

4.6 Konsequenz der T-Zell-Kreuzreaktivität für die molekulare Mimikry-Hypothese

Die Beobachtung, dass Kreuzreaktivität im Rahmen einer polyklonalen Immunantwort häufig ist, lässt sich aus meinen Untersuchungen als auch in anderen Arbeiten feststellen (Wucherpennig und Strominger, 1995a; Grogan et al., 1999; Hemmer et al., 1999; Brehm et al., 2002).

Allerdings treten Autoimmunität und Autoimmunerkrankungen sehr selten auf, so dass die Kreuzerkennung zwischen bakteriellem- und Selbstpeptid allein keine hinreichende Bedingung zur Entstehung von Autoimmunität sein kann. Zwar konnte durch Immunisierungen mit Selbstpeptiden die untersuchte Autoimmunerkrankung induziert werden (Grogan et al., 1999; Van Eden et al., 1985), jedoch waren Inzidenz und Schweregrad reduziert (Bachmaier et al., 1999). Weiterhin müssten zur Induktion von Autoimmunität durch kreuzreaktive Peptide *in vivo* die vielfältigen Mechanismen der peripheren Toleranz überwunden werden und zusätzlich die schon beschriebenen Bedingungen wie Präsentation und Prozessierung von Peptiden in ausreichender Dichte, genügende Aktivierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen vor Ort durch hohe Konzentrationen sowohl des mikrobiellen- als auch des Selbstpeptides, kostimulatorische Signale durch professionelle APZ und ein pathogenes Zytokin-Milieu gegeben sein. Neben diesen vielfältigen Aspekten ergeben sich durch die Methoden der Substitutions-Analyse und randomisierter Peptidbibliotheken weitere Unklarheiten. Durchgeführte Untersuchungen sind im Prinzip nur für T-Zellklone sinnvoll. Dies wird dann verständlich, wenn das individuelle Muster von Kreuzreaktivität jedes Klon-TZR in einer polyklonalen T-Zellpopulation dazu führt, dass an allen Epitop-Positionen alle Substitutionen erlaubt sind. Mit den genannten Methoden lassen sich also T-Zellklone sehr detailliert beschreiben, jedoch kann so nur ein Bruchteil der Antigen-spezifischen Klone tatsächlich erfasst werden. T-Zell-Populationen hingegen lassen sich nur über Sequenzhomologien sinnvoll untersuchen, was den Nachteil hat, dass nur ein kleiner Ausschnitt der tatsächlich vorhandenen Kreuzreaktivität erfasst wird. Das bedeutet, dass die wichtigen strukturellen Kriterien zur Peptiderkennung mit genannten Methoden nur auf T-Zellklone, nicht aber auf T-Zell-Populationen anwendbar sind. Ein interessantes Beispiel zur Schwierigkeit der Beschreibung von Th-Zell-Kreuzreaktivität ist das 9-mer Peptid hLFA-1 α ₃₂₆₋₃₄₅ des „leukocyte function-associated antigen-1 α “, welches in der Pathogenese der therapieresistenten LA von OspA-spezifischen, HLA-DR4-restringierten T-Zellklonen der Patienten erkannt wird (Trollmo et al., 2001). Obwohl es eine hohe Sequenzhomologie zum OspA₁₆₄₋₁₇₅-Bereich aufweist, wurde es durch keines der hier untersuchten 7 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridome in 2 voneinander unabhängigen Experimenten erkannt. Ein entscheidender Grund für die Nichterkennung könnte die kleine Anzahl an untersuchten Hybridomen sein, um auch diese Sequenz zu erfassen. Andererseits könnten die Substitutionen an Positionen, die keinen direkten TZR- oder MHC-Kontaktpunkt repräsentieren, den TZR-pMHC-Komplex nachhaltig verändert und zur Nichterkennung geführt haben. Ferner könnte der Austausch des hydrophoben Seitenkettentyps L171 im *GYVLEGLTAEK*₁₆₄₋₁₇₅ durch den hydrophilen Seitenkettentyp S172 in *IYVIEGTSKQ*₁₆₄₋₁₇₃ sowie der Austausch der

ungeladenen Seitenkette T172 durch die positiv geladene Kette im S-Rest eine wesentliche Beeinflussung der TZR-pMHC-Interaktion bewirkt haben. Diese Beobachtungen unterstreichen die Annahme eines individuellen Musters von Kreuzreaktivität der untersuchten T-Zellklone, welche mit den bisher erwähnten Methoden nicht umfassend beschrieben werden kann.

Aufgrund dieser Annahmen suchten wir in sogenannten Modellierungsexperimenten durch Untersuchung der räumlichen Lage der Peptide im HLA-DR4-Molekül nach Hinweisen für Bindungscharakteristiken von OspA-Peptiden und Selbstpeptiden. Dies sollte uns dazu verhelfen, das beschriebene individuelle Muster von Kreuzreaktivität näher zu beschreiben. Die Untersuchung von Kontrollpeptiden und Selbstpeptiden mit 3 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridomen ergab keine wesentlichen Unterschiede in der Anordnung der Seitenketten und des Peptidrückgrads, die eine Vorhersage über Erkennung oder Nichterkennung eines Peptids erlaubt hätten. Nur zwei Seitenkettenäste des Kontrollpeptids mit der Sequenz *SYVLEGLTAEK* ragten aus der pMHC-Bindungsebene hinaus und breiteten sich entlang des Peptidrückgrads aus, wobei sie möglicherweise Kontaktpunkte zum TZR und damit zu einer Stabilisierung des TZR-pMHC-Komplexes beigetragen haben könnten. Da wie erwähnt der Beitrag des Peptids zur TZR-pMHC-Bindung gering ist (Garboczi et al., 1999), würden sich durch die 2 Seitenkettenäste allenfalls sehr geringe Modifikationen in der Bindung zwischen Kontroll- und Selbstpeptid ergeben. Somit zeigte sich auch durch diese Methode bei einer allerdings geringen Anzahl an getesteten Hybridom keine Vorhersagemöglichkeit über die Erkennung von Selbst- und Fremdpeptiden und keine weiteren Hinweise zur Erklärung des individuellen Musters von Kreuzreaktivität. Viele Selbstpeptide blieben mit den genannten Methoden also im Verborgenen und die Analyse von 7 OspA₁₆₄₋₁₇₅-spezifischen Hybridomen konnte die während einer polyklonalen Immunantwort *in vivo* auftretende Kreuzreaktivität für ein bestimmtes Epitop nur unvollständig erfassen. Angesichts der Häufigkeit von kreuzreaktiver Erkennung mikrobieller- und Selbstpeptide ist es gut vorstellbar, dass molekulare Mimikry *in vivo* bisher nicht als Auslöser von Autoimmunerkrankungen bewiesen werden konnte. Welche Rolle könnte molekulare Mimikry aufgrund der bisherigen Ergebnisse einnehmen?

4.7 Rezidivierende Infektionen in der Pathogenese von Autoimmunität

Wie könnten Infektionen Autoimmunität begünstigen? Dazu soll ein hypothetisches Modell zur Entstehung von Autoimmunität aus den Eingangs vorgestellten Mechanismen Antigen-spezifischer (molekulare Mimikry) und Antigen-Unspezifischer Immunantworten (Bystander-Aktivierung) entwickelt werden. Zunächst werden Leukozyten durch eine infektionsbedingte Entzündungsreaktion an den Ort des Entzündungsgeschehens geleitet. Entzündungsvorgänge

könnten Bystander-T-Zellen polyklonal und Antigen-unspezifisch aktivieren. Daraus könnten direkte Gewebeschäden entstehen, welche zur Präsentation von sequestrierten Selbstantigenen und zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen im Kontext des inflammatorischen Milieus beitragen würden. Dieser Ansatz wurde im Modell der NOD-Maus und Infektion mit *Coxsackievirus B4* (Horwitz et al., 2002) vorgestellt. Die Hypothese der Bystander-Aktivierung besagt, dass unbeteiligte T-Zellen im Entzündungsmilieu durch hochregulierte kostimulatorische Moleküle aktiviert werden könnten. Aus unserer Arbeitsgruppe konnte A. Nogai am murinen EAE-Modell nachweisen, dass durch den Bystander-Mechanismus autoreaktive T-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aktiviert werden können (Nogai et al., 2005). Auch bei der Bystander-Aktivierung stellte sich jedoch die Frage, warum Autoimmunität nicht häufiger vorkommt, wenn im Experiment Autoimmunität derart unspezifisch auslösbar ist. Als alleiniger Mechanismus zur Auslösung von Autoimmunerkrankungen erscheint die Bystander-Aktivierung also auch unwahrscheinlich. Betrachten wir jedoch einen Zustand, in dem sich Autoimmunität durch Akkumulation von T-Zellen im Gefolge rezidivierender Infektionen bei genetischer Disposition (HLA-Typ) gerade bildet, könnte durch genannte Mechanismen ein entscheidender Faktor zur Autoimmunität hinzukommen. Rezidivierende Infektionen könnten durch wiederholte oder kontinuierliche Stimulation und Expansion kreuzreaktiver T-Zellklone dazu beitragen, dass die Zahl der kreuzreaktiven T-Zellklone, die ein mikrobielles- und Selbstpeptid erkennen, eine kritische Schwelle überschreitet. Dass das Überschreiten einer bestimmten Anzahl von kreuzreaktiven T-Zellen im Gefolge einer Infektion zur Autoimmunität führen kann, wurde in einem Modell für EAE demonstriert. Dort wurde zwei MHC-identischen Mausstämmen (SJL und B10.S), die beide das gleiche Epitop eines Autoantigen im ZNS erkennen, das Autoantigen injiziert. Die SJL-Mäuse entwickelten EAE, die B10.S Mäuse nicht. Der entscheidende Unterschied in der Analyse war eine höhere Anzahl von Autoantigen-erkennenden Th-Zellen im Repertoire der SJL-Maus (Anderson et al., 2000). Die Überschreitung einer kritischen Dichte an aktivierten autoreaktiven T-Zellen nach Akkumulation im Gefolge rezidivierender Infektionen scheint eine notwendige Bedingung bei der Entwicklung von Autoimmunität zu sein. In der Arbeitsgruppe um D. Mathis konnte gezeigt werden, dass eine gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen gerichtete T-Zellantwort innerhalb weniger Wochen zu einer schweren Arthritis führt (Kouskoff et al., 1996).

Eine andere Variante von molekularer Mimikry im Rahmen rezidivierender oder chronischer Infektionen ist der folgende Ansatz: Im Rahmen der Akkumulation autoreaktiver T-Zellen durch kreuzreaktiv erkannte Antigene ist vorstellbar, dass verschiedene Infektionserreger Kreuzreaktivität mit dem gleichen Autoantigen hervorrufen können. Im EAE-Modell unserer

Arbeitsgruppe wurde eine Vielzahl von verschiedenen Bakterien stammenden Peptiden durch enzephalitogene T-Zellen erkannt (Grogan et al., 1999). Nun könnten Infektionen mit verschiedenen Erregern T-Zellen aktivieren und expandieren, die das gleiche Autoantigen erkennen. Auch hier könnte durch rezidivierende Infektionen schließlich eine kritische Zahl dieser T-Zellklone überschritten werden. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von akuten Krankheitsschüben bei Multipler Sklerose im Gefolge von Infektionsgeschehen (Rutschmann et al., 2002) gestützt. Auch die Arbeitsgruppe um Brehm konnte zeigen, dass ein individueller TZR durch viele verschiedene Erreger-Epitope potentiell aktivierbar ist (Brehm et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch Infektion mit heterologen Viren der Gedächtnis-Pool der peripheren T-Zellen entscheidend beeinflusst wird, nämlich in der Weise, dass speziell die Frequenz von CD8⁺-T-Zellen steigt, die spezifisch für kreuzreaktive Epitope sind, welche im Gefolge der Infektionen präsentiert werden (Selin et al., 1999 und Brehm et al., 2002). Diese Verlagerung des Gleichgewichts im peripheren T-Zell-Pool könnte erklären, wie molekulare Mimikry den Pool der TZR mitformt und für anhaltend hohe Zahlen an autoreaktiven T-Zellklonen sorgt. Von hier an sind zwei Hypothesen denkbar: Einmal, dass im Sinne einer direkten Antigen-spezifischen Kreuzreaktivität das Epitop immundominant erkannt wird, also mittels hoher Avidität eine starke Effektorantwort und Autoimmunität auslöst. Jedoch scheint es plausibel, dass bei der Häufigkeit von molekularer Mimikry und der Seltenheit von Autoimmunerkrankungen viele kreuzreaktive TZR-pMHC-Interaktionen im Sinne einer niedrig-affinen Wechselwirkung stattfinden und keine direkte Aktivierung zur zerstörerischen Effektorfunktion der autoreaktiven T-Zellen hervorrufen. Hier setzt eine zweite denkbare Hypothese an, nämlich, dass molekulare Mimikry bei einem schon geformten autoreaktiven T-Zell-Pool über niedrig-affine TZR-pMHC-Wechselwirkungen zu autoimmunen Reaktionen führen kann (Christen et al., 2004). Bei Beobachtungen zu rezidivierenden Infektionen am Modell der TMEV (engl.: Theilers murine encephalomyelitis virus) in der Gruppe um Olson (Olson et al., 2002) entwickelten Mäuse, die mit HI-TMEV (Haemophilus influenzae-exprimiertes Virus) re-infiziert wurden, einen stärkeren Krankheitsverlauf als einfach infizierte Tiere. Auch OVA (Ovalbumin)-TMEV-infizierte Tiere entwickelten einen schwereren Krankheitsverlauf. Somit ist denkbar, dass es über molekulare Mimikry im Rahmen von rezidivierenden Infektionen entweder zu einer Anreicherung von autoreaktiven T-Zellen mit nachfolgender Krankheit oder zur Reaktivierung eines bereits geformten Pools an autoreaktiven T-Zellen mit nachfolgender Krankheitsentwicklung kommt. Bei dieser Hypothese ist die Verschiebung des peripheren T-Zell-Pools in Richtung der TZR, die eine Vielzahl der Erregerantigene erkennen, gut nachvollziehbar. Zusammenfassend ist molekulare Mimikry bei

einem präformierten autoreaktiven T-Zell-Pool im Gefolge von Infektion wahrscheinlicher als im Sinne einer primär direkten Kreuzreaktivität und nachfolgender Autoimmunität. Von entscheidender Wichtigkeit ist auch die Funktion der APZ, die im entzündeten Gewebe eher in professioneller Weise Antigen präsentieren als im nicht-entzündeten Gewebe, was die Wahrscheinlichkeit der Aktivierung naiver sowie potentiell autoreaktiver T-Zellen durch molekulare Mimikry in Entzündungsgebieten erhöht. Generell würde Autoimmunität eher im infizierten als in benachbarten Organen entstehen können. Auch die eventuelle Freilegung von Selbstantigenen oder die ständige Präsentation immundominanter Epitope durch infektiöse Vorgänge macht molekulare Mimikry in Entzündungsgebieten wahrscheinlicher als in intakten Geweben. Anschauliches Beispiel dafür ist wiederum das Modell der TMEV, in dem die Injektion von TMEV in das ZNS der Maus eine persistierende ZNS-Infektion auslöst (Lipton, 1975). Neuere Befunde zeigen, dass auch intraperitoneale, i.v. oder s.c.-Injektionen von PLP-TMEV (eine Sequenz von 30-mer Länge, welche das immundominante enzephalogene PLP₁₃₉₋₁₅₁-Peptid enthält) eine demyelisierende ZNS-Krankheit hervorrufen können (Olson et al., 2002), wobei niedrig-positive PLP-TMEV-Titer im ZNS detektiert werden. Prinzipiell spricht dies für die Möglichkeit, dass kreuzreaktive T-Zellen durch molekulare Mimikry eine autoreaktive Immunreaktion in primär nicht-entzündetem Gewebe hervorrufen können und weiterhin für eine kreuzreaktive Erkennung von Selbstpeptiden, die nicht unmittelbar mit der Pathogenese der zu untersuchenden autoimmunen Erkrankung zusammenhängen. Diese Problematik wird auch durch in dieser Arbeit identifizierte Selbstpeptide deutlich, beispielsweise anhand des humanen Pro-Insulins *PLALEGSLQKRG*, das von HLA-DR4-positiven Patienten mit Diabetes mellitus Typ-I erkannt wird (Congia et al., 1998). Die Erkennung des Peptids schließt zwei Mechanismen der Toleranzerhaltung weitgehend aus, nämlich die Sequestration von Antigen, da das Peptid ubiquitär T-Zellen zugänglich ist und weiterhin die proteolytische Destruktion, da das kreuzreaktiv erkannte Selbstpeptid *in vivo* offensichtlich prozessiert und präsentiert wird. Ein pathologischer Zusammenhang ist jedoch unwahrscheinlich, da bis jetzt keine Assoziation zwischen Diabetes mellitus und Borreliose bekannt ist. Andererseits gibt es auch zumindest ein Beispiel dafür, dass eine Immunantwort gegen ubiquitär exprimierte Selbstantigene zu einer Immunkrankheit führen kann. Erwähnt sei hier die autoimmune Arthritis in einem murinen Modell mit Reaktion gegen Glukose-6-Phosphat-Isomerase (Matsumoto et al., 1999). Nach neueren Befunden kommt auch der Aktivierung des angeborenen Immunsystems durch das Agens (Olson et al., 2004) eine wichtige Bedeutung zu, wobei die Aktivierung über die Erkennung von sogenannte Gefahrensignalen „pathogen associated molecular patterns“ (PAMP) durch nicht-klonale Toll-Like-Rezeptoren (TLR) vermittelt (Medzhitov and Janeway, 1997)

wird. Eine intensive Signaltransduktion über die TLR führt dabei zur Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen (CD 80 oder CD 86), die die Entzündungsreaktion weiter aufrecht erhalten und die naiven T-Zellen aktivieren können. Das Muster der T-Zellantworten kann dabei von Anergie bis zur vollen Effektorfunktion reichen (Barnett et al., 1996).

Mitentscheidend für das Auslösen einer Autoimmunerkrankung im Rahmen einer Infektion könnte weiterhin eine genetische determinierte Suszeptibilität durch bestimmte MHC-Haplotypen oder MHC-Defekte sein, in deren Rahmen eine andauernde Präsentation von kreuzreaktiv erkannten Epitopen denkbar wäre. Auch andere genetische Defekte wie CTLA-4-Mutationen oder abgeschwächte Suppressor-Zell Funktionen könnten zu protrahierten autoimmunen Reaktionen führen.

4.8 Rolle von niedrig-affinen Wechselwirkungen und Erweiterung der molekularen Mimikry-Hypothese um protektive Aspekte

In Anbetracht der Seltenheit von Autoimmunerkrankungen und der Häufigkeit von molekularer Mimikry und Bystander-Aktivierung bleibt die Frage offen, welche Funktionen niedrig-affinen Wechselwirkungen einnehmen könnten, wenn kein Infektions-Kontext bzw. keine professionellen APZ vorhanden sind? Wie angedeutet, sind hoch-, mäßig- und niedrig-affine Wechselwirkungen des TZR mit dem pMHC-Komplex und somit agonistische, antagonistische und partiell agonistische Wirkungen möglich. Dies könnte auch protektive Wirkungen bedingen. Beispielsweise sei die tolerogene Wirkung von mikrobiellen Epitopen als alternierende Peptidliganden zur Verhinderung von EAE im Tiermodell genannt (Ruiz et al., 1999). Möglicherweise sorgt die vermehrte Expression von selektierenden MHC-Molekülen auf APZ und deren niedrig-affine Interaktionen mit dem TZR für einen stabilen Pool von reifen, naiven α/β -T-Zellen (Kirberg et al., 1997) beziehungsweise Gedächtniszellen in den peripheren lymphatischen Organen (Ahmed and Gray, 1996). Eine andere physiologische Funktion einer niedrig-affinen TZR-Erkennung ist die positive Selektion, die eine weniger hohe Affinität als die T-Zell-Aktivierung benötigt (Hogquist et al., 1995). Der Begriff molekulare Mimikry, der diese niedrig-affinen Wechselwirkungen beinhaltet, sollte also weiter gefasst werden als der einer bloßen Induktion von Autoimmunität durch Kreuzerkennung zweier Peptidsequenzen. Zusammenfassend lässt sich schließen, dass das Ausmaß einer Wechselwirkung von TZR und pMHC und somit das Ergebnis von molekularer Mimikry entscheidend vom immunologischen Kontext (APZ, Infektionsgeschehen) abhängt. Somit könnte molekulare Mimikry einen flexiblen Prozess darstellen, dessen Folgen von den jeweiligen lokalen Gegebenheiten (Infektion, APZ,

aktivierte angeborene Immunität, kostimulatorische Moleküle) bestimmt werden. Die Hypothese einer einzelnen kreuzreaktiven Erkennung zwischen einem mikrobiellen- und Selbstantigen mit nachfolgender Autoimmunität durch molekulare Mimikry ist nach beschriebenen Befunden eindeutig abzulehnen. Auch die kurz angesprochene Bystander-Aktivierung ist als alleinige Erklärung von Autoimmunität nicht ausreichend. Beide Mechanismen könnten sich allerdings ergänzen, so dass bei genetischer Prädisposition im Rahmen von Infektionen durch molekulare Mimikry eine kritische Schwelle autoreaktiver T-Zellen expandiert und durch Bystander-Aktivierung aktiviert werden könnte.