

Medizinische Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Klinik für Gastroenterologie, Infektiologie und Rheumatologie,
Bereich: Rheumatologie
geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Martin Zeitz

**Identifikation von immundominanten T-Zell-Antigenen aus der Gruppe
der ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* bei Patienten mit *Shigella*-
getriggelter reaktiver Arthritis**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Henning Christian Brandt
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. Joachim Sieper

Koreferent: PD Dr. Ralf Ignatius

Gedruckt mit Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

promoviert am: 23.09.2007

Vorbemerkung

Teilergebnisse aus der folgenden Promotionsarbeit wurden auf folgenden medizinischen Fachkongressen als Posterbeiträge vorgestellt: ACR 2000 (American College of Rheumatology), EWRR 2004 (European Workshop for Rheumatology Research).

INHALTSVERZEICHNIS

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.2	Der Haupt-Histokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex, MHC)	2
1.3	Generierung von Peptiden zur Präsentation durch MHC-I-Moleküle	3
1.4	Generierung von Peptiden zur Präsentation durch MHC-II-Moleküle	4
1.5	Entstehung von Autoimmunerkrankungen.....	4
1.6	Reaktive Arthritis	5
1.7	Biologie des Bakteriums <i>Shigella</i>	7
1.8	<i>Shigella</i> -induzierte ReA	9
1.9	Pathogenese der ReA	11
1.10	Charakterisierung möglicher T-Zell-stimulierender Antigene.....	13
1.11	Zielsetzung	16
2.	PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Patientenkollektiv und Kontrollen	18
2.2	Verwendete Bakterienstämme.....	19
2.3	Analytische Methoden.....	19
2.3.1	Photometrische Messungen.....	19
2.3.1.1	Konzentrationsbestimmung ribosomaler Partikel	19
2.3.1.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	19
2.3.2	Elektrophoresetechniken	20
2.3.2.1	Diskontinuierliche Elektrophorese	20
2.3.2.2	Zweidimensionale Gelelektrophorese (2-D-PAGE)	21
2.3.2.3	Mini-2-D-Page in Briefmarkengröße	23
2.3.3	Identifikation der ribosomalen Proteine von <i>Shigella</i>	25
2.3.4	Immunfärbung „Western Blot“	26
2.3.4.1	Western Blot der SDS-PAGE	26
2.3.4.2	Western Blot der 2-D-PAGE (Harnstoff-PAA-Gel)	27
2.3.4.3	Identifikation der im Western Blot detektierten Antikörper	28
2.3.5	Lymphozytenproliferationsassay (LPA)	29

2.4	Präparative Methoden	30
2.4.1	Fermentation von Bakterienzellen.....	30
2.4.2	Isolierung von 70S-Ribosomen („crude“ 70S).....	30
2.4.3	Präparation der S100 Enzymfraktion (zytoplasmatische Fraktion)	33
2.4.4	Analyse ribosomaler Partikel durch Ultrazentrifugation	33
2.4.5	Zonalzentrifugation zur Präparation ribosomaler Untereinheiten (30S und 50S)....	33
2.4.6	Gesamte Proteine der ribosomalen Untereinheiten: TP50 und TP30	34
2.4.7	Chromatographische Trennung ribosomaler Proteine.....	35
2.4.7.1	Ionenaustauschchromatographie (FPLC).....	35
2.4.7.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), Prinzip der Reversed-Phase- HPLC.....	36
2.4.8	Separation mononukleärer Zellen für den LPA	36
2.4.8.1	Separation mononukleärer Zellen aus Synovialflüssigkeit	36
2.4.8.2	Separation mononukleärer Zellen aus peripherem Blut.....	37
3.	ERGEBNISSE	38
3.1	Isolierung der 70S-Ribosomen („crude“ 70S)	39
3.2	Präparation ribosomaler Untereinheiten.....	39
3.3	Chromatographische Auftrennung der Proteinfractionen (TP30,TP50)	40
3.3.1	Chromatographie der TP30-Proteinfraction.....	41
3.3.2	Chromatographie der TP50-Proteinfraction.....	42
3.4	Identifikation T-Zell-Stimulation induzierender Proteinfractionen.....	43
3.4.1	Charakterisierung T-Zell-Stimulation induzierender Proteinfractionen	46
3.5	Humorale Immunantwort gegen die ribosomalen Proteine von <i>Shigella</i>	51
3.5.1	Charakterisierung der humoralen Immunantwort gegen die ribosomalen Proteine von <i>Shigella flexneri</i> mittels Western Blot	52
4.	DISKUSSION.....	61
4.1	Immundominante ribosomale T-Zell-Antigene	62
4.1.1	Das immundominante ribosomale Antigen L23	63
4.1.1.1	Strukturvergleich von L23 bei verschiedenen Bakterienspezies.....	65
4.1.1.2	Physiologische Funktion von L23	67
4.1.2	Das immundominante ribosomale Antigen L22/L3.....	67

4.1.3	Das immundominante ribosomale Antigen S3.....	68
4.1.4	Weitere T-Zell stimulatorische Antigene	68
4.1.5	T-Zell-stimulatorische Potenz: Ribosomenfraktion versus zytoplasmatische Fraktion (S100)	69
4.1.6	T-Zell-stimulatorische Potenz: Ganze, desintegrierte Zellen von <i>S. flexneri</i> versus <i>E. coli</i>	71
4.1.7	Arthritogene Antigene in der Pathogenese der ReA: „sauer oder basisch“?	72
4.1.8	Identifikation arthritogener Antigene: Neue Therapiekonzepte.....	73
4.1.9	Reaktive Arthritis - chronische Infektion oder Autoimmunreaktion?	74
4.1.10	Neue Methoden zur Diagnostik der ReA - Möglichkeit eines Screenings auf T-Zell-Ebene für immundominante ribosomale Proteine bei der <i>Shigella</i> -getriggerten ReA?	76
4.2	Humorale Immunantwort	77
4.2.1	Humorale Immunantwort gegen ribosomale Proteine und immundominante T-Zell-Antigene	77
4.2.2	Detektion weiterer Proteine im Western Blot	79
4.3	Methodik	80
4.4	Ausblick	83
5.	ZUSAMMENFASSUNG	85
6.	LITERATURVERZEICHNIS	88
7.	ABKÜRZUNGEN	102
8.	CHEMIKALIEN.....	105
9.	PUFFER UND LÖSUNGEN	106
10.	DANKSAGUNG	108
11.	LEBENS LAUF	109

6. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
A_x	diejenige Menge einer Substanz, die gelöst in 1 ml Solvens bei der Wellenlänge x eine Extinktion von 1,0 hervorruft (gemessen in einer Küvette der Schichtdicke 1 cm)
A_x/ml	Konzentration in A_x -Einheiten pro 1 ml Lösung
APZ	Antigen präsentierende Zelle
AS	Ankylosierende Spondylitis, Morbus Bechterew
BASDAI	bath ankylosing spondylitis activity index; Krankheitsaktivitätsmessinstrument für AS
BASFI	bath ankylosing spondylitis functional index, Funktionsindex für AS
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CD8-Zelle	cluster of differentiation 8 positive Zelle, siehe CTL
CD4-Zelle	cluster of differentiation 4 positive Zelle
cld	Kettenlängendeterminator (chain length determinator)
CLIP-Fragment	blockiert vor Austausch durch ein Antigenprozessierungs-Hilfsmolekül die Peptidbindungsstelle bei MHC-II-Molekülen (Class-II-associated Invariant chain Peptide)
cpm	Zählereignisse pro Minute (counts per minute)
CRP	C-reaktives Protein
„crude“70S	70S-Ribosomen, die nicht über Dichtegradientenzentrifugation gereinigt wurden
CTL	Zytotoxische T-Zellen (cytotoxic T cells), CD8-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
30S	kleine ribosomale Untereinheit ($s = 30S$)
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohämorrhagische <i>E.coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E.coli</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum

FPLC	Flüssigkeitschromatographie (Fast Performance Liquid Chromatography)
50S	große ribosomale Untereinheit (s =50S)
g	Erdbeschleunigung ($g = 9,81 \text{ m s}^{-1}$)
h	Stunde (hora; lat.)
HLA-B27	humanes Leukozyten Antigen B27 (genetischer Marker)
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (High Performance/Pressure Liquid Chromatography)
hsp	Hitzeschockprotein
IFN- γ	Interferon- γ
IgA, IgG, IgM	Immunglobuline der Klassen A, G, M
Kd	Kilodalton
L1 – L36	ribosomale Proteine der großen bakteriellen Untereinheit (L für 'large')
LPA	Lymphozytenproliferationsassay
LPS	Lipopolysaccharid
Md	Megadalton
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (Major Histocompatibility Complex), Glykoproteine, die durch Bindung und Präsentation von Peptiden die Antigenerkennung ermöglichen
min	Minute
MNZ	mononukleäre Zellen
MQ	salzfreies, steriles, RNase freies Wasser (Milli Pore Aufbereitungsanlage)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBMNZ	mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PCR	Polymerasekettenreaktion
pHS-2	2 Md Plasmid bei arthritogenen Shigellenstämmen
P ₀ , P ₁ , P ₂	„saure“ ribosomale Proteine (L11, L10, L7/L12)
%-(v/v)	Konzentration in ml pro 100 ml Lösung
%-(w/v)	Konzentration in g pro 100 ml Lösung

PWM	Pokeweed-Mitogen, unspezifischer T- und B-Zell-Stimulator
ReA	reaktive Arthritis
RP-HPLC	Umkehrphasen-HPLC (Reversed Phase)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute; engl.)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
S	Svedberg, Einheit des Sedimentationskoeffizienten ($1\text{ S} = 10^{-13}\text{ s}$)
SI	Stimulationsindex
70S	prokaryontisches Ribosom (Sedimentationskoeffizient $s = 70\text{S}$)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
<i>S.flexneri</i>	<i>Shigella flexneri</i>
S1 – S21	ribosomale Proteine der kleinen bakteriellen Untereinheit (S für 'small')
S-32	Lysat der bakteriellen Zellen nach Abzentrifugation der Zelltrümmer mit 32000 g
S-100	Überstand nach Zentrifugation des S-32 Lysates mit 100000 g zur Pelletierung der 70S-Ribosomen (entspricht der zytoplasmatischen oder Enzymfraktion)
SFMNZ	mononukleäre Zellen aus Synovia (synovial fluid)
SpA	Spondyloarthritis
TAP-Transporter	transportiert die generierten Peptide in das ER zum MHC-I-Molekül (Transporters associated with Antigen Processing)
T _H -Zellen	T-Helfer-Zellen
TNF α	Tumornekrosefaktor Alpha, proinflammatorisches Zytokin
TP30	Gesamtprotein der 30S-Untereinheit nach Abtrennung der rRNA (total protein)
TP50	Gesamtprotein der 50S-Untereinheit nach Abtrennung der rRNA (total protein)
TP30-X	durch Auftrennung der Gesamtproteine der 30S-Untereinheit mittels FPLC erhaltene Proteinfraction X

TP50-X	durch Auftrennung der Gesamtproteine der 50S-Untereinheit mittels FPLC erhaltene Proteinfraktion X
TZR	T-Zell-Rezeptor
U	Einheit der Enzymaktivität (1 U ist die Menge eines Enzyms, die 1µmol Substrat in einer Minute umsetzt)
UPEC	Uropathogene <i>E.coli</i>
VAS	visuelle Analogskala
WM	Gewichtsmarker (weight marker)

7. Chemikalien

AA	Acrylamid
AcOH	Essigsäure
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BAA (Bis)	N,N'-Methylen-Bisacrylamid
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethan-Sulfonsäure
KCl	Kaliumchlorid
KOH	Kaliumhydroxid
MgAc ₂	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
NH ₄ Cl	Ammoniumchlorid
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphat Buffered Saline)
PAA	Polyacrylamid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-Hydroxymethyl-Aminoethan
TBS	Trisgepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
Urea	Harnstoff

8. Puffer und Lösungen

H ₂₀ M ₆ N ₃₀ SH ₄ (tico-Puffer)	Hepes-KOH, pH 7,5 (4°C) 20 mM; MgAc ₂ 6mM; NH ₄ CL 30 mM; β-Mercaptoethanol 4 mM
H ₂₀ M ₁ N ₂₀₀ SH ₄ (Dissoziationspuffer)	Hepes-KOH, pH 7,5 (4°C) 20 mM; MgAc ₂ 1mM; NH ₄ CL 200 mM; β-Mercaptoethanol 4 mM
Rek-4	Hepes-KOH, pH 7,5 (4°C) 20 mM; MgAc ₂ 4 mM, NH ₄ CL 400 mM; EDTA 0,2 mM; β-Mercaptoethanol 4 mM
Rek-4-6U	Hepes-KOH, pH 7,5 (4°C) 20 mM; MgAc ₂ 4 mM NH ₄ Cl 400 mM; EDTA 0.2 mM; β-Mercaptoethanol 4 mM; Urea 6 M
BT ₁₀ AC ₁₀ Met ₂ -6U	BisTris HCL, pH 6,0 (4°C) 10 mM; Acetat 10 mM; Methylamin 2 mM; Urea 6M
BT ₁₀ AC ₁₀ Met ₂ K ₅₀₀ -6U	BisTris HCL, pH 6,0 (4°C) 10 mM; Acetat 10 mM; Methylamin 2 mM; KCL 500 mM; Urea 6M
BT ₁₀ AC ₁₀ Met ₂ K ₁₀₀₀ -6U	BisTris HCL, pH 6,0 (4°C) 10 mM; Acetat 10 mM; Methylamin 2 mM; KCL 1000 mM; Urea 6M
Transferpuffer (Western Blot)	Tris HCl 25mM, Glycin 190mM mit 20% v/v Methanol
Blockierungspuffer (Western Blot)	10 % Milchpulverlösung in PBS

Medien für die Zellkultur

Kulturmedium	10 % Humanes AB Serum, 0,3 mg/ml Glutamin, 1000 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin in RPMI 1640
Auftaumedium	20 % FCS, 0,3 mg/ml Glutamin, 1000 U/ml Penicillin, 0,1 mg/ml Streptomycin in RPMI 1640

9. Danksagung

Ermöglicht wurde die Arbeit durch ein Doktorandenstipendium der Sonnenfeldstiftung e. V. Berlin, welches mir für den experimentellen Teil der Arbeit zur Verfügung gestellt wurde. Mein Dank gilt insbesondere dem Vorsitzenden der Sonnenfeldstiftung, Herrn Prof. Dr. Freiherr von Villier, für das Interesse an der Arbeit und sein großartiges Engagement.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Joachim Sieper für die Überlassung des hochinteressanten Themas, die Betreuung, sein außerordentliches Engagement und seine fachliche Hilfe bei der Durchführung des Projekts.

Ebenso herzlich danken möchte ich Herrn Prof. Dr. Knud H. Nierhaus, MPI für molekulare Genetik, Berlin, für die Möglichkeit, in seiner Gruppe die für die Untersuchung benötigten Methoden (Ribosomenpräparation, flüssigkeitschromatographische Verfahren, Gelelektrophoretetechniken und Western Blot) zu erlernen und durchzuführen. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Ulrich Stelzl, Herrn Dr. Daniel Wilson und Herrn Dr. Sean Connell für die exzellente Betreuung sowie allen Mitarbeitern und dem Gästelabor der Gruppe Nierhaus, insbesondere auch Herrn Detlev Kamp und Frau Edda Einfeld.

Herzlicher Dank auch an Herrn PD Dr. Thomas Adam, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Charité Berlin, Campus Mitte, für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe zur Durchführung von Zellaufschluß und Ribosomenpräparation aus *Shigella* und für die hilfreichen Diskussionen zum methodischen Vorgehen.

Herzlicher Dank auch an Herrn Dr. Wolfgang Kuon, seinerzeit Rheumatologie, Charité Campus Benjamin Franklin, für die Unterstützung und Vermittlung immunologischer Grundlagen und Arbeitstechniken sowie Frau Peihua Wu und Frau Martina Grolms.

Ich möchte diese Arbeit meinen Eltern, Frau Barbara Brandt und Herrn Dr. Klaus Brandt, meinem Bruder, Herrn Dirk Brandt sowie meiner Tante Frau Lilo Pichert und meinem Onkel, Herrn Dr. Martin Pichert widmen.

10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht mit veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Henning Christian Brandt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Identifikation von immundominanten T-Zell-Antigenen aus der Gruppe der ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* bei Patienten mit *Shigella*-getriggelter reaktiver Arthritis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum:

Unterschrift: