

4. Diskussion

Bei bekannten bakteriellen Auslösern und Assoziation zum HLA-Molekül B27 ist die Pathogenese der ReA ungeklärt.

Durch Infektion mit den Erregern *Shigella*, *Yersinia*, *Salmonella*, *Campylobacter* und *Chlamydia* ist bei prädisponierten Individuen eine Interaktion von bakteriellen Bestandteilen mit T-Zellen anzunehmen, welche die resultierende Gelenkentzündung bedingt. Hinweise für eine Präsentation immundominanter Epitope an T-Zellen als zugrundeliegender Pathomechanismus finden sich dabei sowohl in transgenen Tiersystemen^{140, 141}, als auch in Studien mit humanen Zellen^{103, 116, 142, 143}.

Untersuchungen zur Assoziation von HLA-B27-Subtypen zur ReA konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass die nicht krankheitsassoziierten HLA-B27-Subtypen HLA-B2706 und HLA-B2709 sich von den krankheitsassoziierten HLA-B27-Subtypen nur durch eine oder zwei Aminosäuren innerhalb der peptidbindenden Vertiefung des MHC-Moleküls unterscheiden^{144, 145}, was durchaus zugunsten der arthritogenen Peptid-Hypothese interpretiert werden kann.

Die Biologie von *Shigella* mit dem Zytosol als Ort der Vermehrung deutet darauf hin, dass dem MHC-I-Pfad bei der Abwehr von Shigellen eine wichtige Rolle zukommt. Darüber hinaus weist die *Shigella*-induzierte ReA im Vergleich zu den anderen ReA-assoziierten Bakterien eine höhere Assoziation zu HLA-B27 auf^{70, 71}.

Ob die CD4- oder CD8- T-Zell-Subpopulationen nach Infektion mit den ReA-assoziierten Bakterien dabei für die Initiierung der Immunreaktion und auch für die nachfolgende Gelenkschädigung hauptsächlich verantwortlich ist, kann gegenwärtig nicht eindeutig beantwortet werden. Bei hypothetischer Betonung der zytotoxischen T-Zell-Reaktion ist für eine solche die Interaktion mit CD4-Zellen jedoch zwingend erforderlich, da dies eine Optimierung der effektiven zytotoxischen T-Zell-Reaktion gewährleistet⁷⁶.

Um neue Erkenntnisse zur Pathogenese der ReA zu gewinnen, ist die Identifikation bakterieller, stimulierender T-Zell-Antigene essentiell.

Die vorliegende Arbeit beschreibt erstmalig T-Zell-Stimulation induzierende Antigene von *Shigella flexneri* bei HLA-B27-positiven Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA. Durch Analyse aller ribosomaler Proteine von *S. flexneri* im Lymphozytenproliferationsassay mit

synovialen MNZ konnte gezeigt werden, dass ribosomale Proteine eine Quelle immunogener Antigene mit interindividueller Immundominanz darstellen.

Drei der 39 ribosomalen Proteinfractionen, welche mittels FPLC gewonnen werden konnten, erfüllten übereinstimmend bei allen Patienten die geforderten Kriterien einer hohen T-Zell-Stimulationen und sind als immundominante Antigene von *Shigella* anzusehen. Die Analyse dieser Fraktionen mittels SDS-PAGE, 2-D-PAGE und RP-HPLC identifizierte folgende ribosomale Proteine aus über fünfzig als immundominante Antigene: L22/L3, L23 und S3 (Tabelle 2).

Weitere Proteine, die den geforderten Stimulationsindex bzw. die Übereinstimmung bei allen 3 Patienten verfehlt haben und dennoch höhere Stimulationen als der Durchschnitt aufweisen sind L15, L18, L21, S4 (Tabelle 3).

Die Analyse der humoralen Immunantwort erbrachte den Nachweis von gegen die ribosomalen Proteine von *Shigella* gerichteten Antikörperprofilen der Klasse IgG im Serum von Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA, aber auch im Serum von gesunden Probanden. Dabei wurden die auf T-Zell-Ebene eine besonders starke Stimulation induzierenden ribosomalen Proteine L22/L3, L23 und S3 sowohl in den Seren der Patienten, als auch bei den gesunden Kontrollen ohne deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen detektiert. Selbiges trifft auch für die Proteine L15, L18, L21 zu.

Das ribosomale Protein S13, welches zellulär keine erhöhte Stimulation induzierte, wurde auf humoraler Ebene als einziges der über 50 ribosomalen Proteine nur im Serum der ReA-Patienten, nicht jedoch im Serum der Kontrollen detektiert.

4.1 Immundominante ribosomale T-Zell-Antigene

Der hohe Grad an Konservierung, Homologien unter Prokaryonten, zwischen Prokaryonten und Eukaryonten mit der Möglichkeit eines molekularen Mimikry sowie die starke Expression während der floriden bakteriellen Infektion stellen neben dem Nachweis von gegen ribosomale Proteine gerichteten zellulären und humoralen Immunreaktionen bei rheumatischen Erkrankungen wie der *Yersinia*-getriggerten ReA^{117, 123, 124} oder dem systemischen Lupus erythematoses^{121, 122} nur einige Charakteristika dar, weshalb die ribosomalen Proteine als mögliche arthritogene Kandidatenproteine in Frage kommen.

Durch Analyse der ribosomalen Proteine von *Shigella flexneri* im Lymphozytenproliferationsassay und den Nachweis T-Zell-stimulatorischer ribosomaler Antigene konnte die Hypothese bestätigt werden, dass die ribosomalen Proteine eine Quelle immunogener Antigene mit interindividueller Immundominanz darstellen.

Dieses Ergebnis passt gut zu einer weiteren Hypothese, die – wenngleich auf extrazelluläre Proteine bezogen – besagt, dass sich unter stark exprimierten Proteinen mit höherer Wahrscheinlichkeit ein signifikantes Antigen findet¹¹⁰; eine Annahme, die auf Untersuchungen zu Immunreaktionen gegen Stressproteine wie Hitzeschockproteine nach Infektionen durch die intrazellulären Bakterien *Salmonella typhimurium*, *Coxiella burnetti* und *Legionella pneumophila* fußt¹¹⁰⁻¹¹⁴.

Im Rahmen der floriden Infektion mit sich exponentiell vermehrenden Bakterienzellen und hochregulierter Proteinbiosynthese repräsentieren die ribosomalen Proteine mit einem Anteil von über 30% an der Proteintrockenmasse äußerst stark exprimierte Proteine. Neben dem Vorkommen einzelner signifikanter Antigene als Induktoren der Pathogenese ist darüber hinaus zu diskutieren, ob das massive Anfluten der Proteine über eine Überexprimierung von HLA-Molekülen zu einer Durchbrechung der Selbsttoleranz führen könne; ein Mechanismus, der als Auslöser von Autoimmunität ebenfalls bekannt ist.

4.1.1 Das immundominante ribosomale Antigen L23

In der hier erstmals identifizierten Gruppe T-Zell-Proliferation induzierender ribosomaler Antigene von *Shigella flexneri* befindet sich ein Protein, welches bereits als immundominantes Antigen bei einem weiteren ReA-assoziierten Erreger, *Yersinia enterocolitica* 0:3, beschrieben ist: Das 50S-Protein L23.

Auf der Suche nach immundominanten Antigenen von *Yersinia enterocolitica* waren in einem dieser Arbeit zugrunde liegenden Ansatz zunächst nach Desintegration der Bakterienzellen und konsekutiven Zentrifugationen die 3 erhaltenen Fraktionen Membranfraktion, zytoplasmatische Fraktion (= S100) und Ribosomenfraktion auf ihre Fähigkeit hin untersucht worden, synoviale MNZ von Patienten mit *Yersinia*-getriggelter ReA zu stimulieren. Die stärkste Proliferation löste die ribosomale Fraktion aus, die daraufhin flüssigkeitschromatographisch aufgetrennt, und die erhaltenen Proteinfractionen im Lymphozytenproliferationsassay untersucht wurden. Es ergab sich die Identifikation zweier

stimulierender, immundominanter Proteine, einerseits des 19 kD Proteins, welches der Urease- β 2-Untereinheit entspricht, und andererseits eines Proteins, welches als ribosomales Protein L23 identifiziert wurde¹²⁴.

Die übereinstimmende Identifikation des ribosomalen Proteins L23 als immundominant bei zwei ReA-assoziierten Bakterienspezies, *Y. enterocolitica* und *S. flexneri*, deutet auf die Relevanz dieses Proteins hin.

Darüber hinaus könnte das erzielte Ergebnis die These stützen, dass die eine ReA triggernden Bakterien eine antigene Struktur im Sinne eines „common antigen“ teilen, welche am ehesten unter stark konservierten Proteinen zu erwarten sei und über den Mechanismus eines molekularen Mimikry zu Autoimmunität führen könne.

Folgeexperimente mit fünf rekombinanten Proteinen von *Yersinia enterocolitica* (19 kD Protein, 13 kd Protein L23, 32 kd Protein L2, 18 kd outer membrane protein H sowie hsp60) konnten die bei dem nativen Protein L23 ausgeprägte T-Zell-Stimulation jedoch nicht reproduzieren¹¹⁷.

Eine mögliche Erklärung für die Diskrepanz zwischen nativ stimulierendem und rekombinant nicht stimulierendem Protein L23 könnte in der Applikation unterschiedlicher Proteinmengen im Lymphozytenproliferationsassay oder der differierenden Löslichkeit der nativen und rekombinanten Proteine bestehen. Darüber hinaus könnte auch spekuliert werden, dass ein nicht detektiertes Antigen, möglicher Weise sogar ein nicht-ribosomales Protein in der nativen, L23 enthaltenden Fraktion statt L23 ursächlich für die Stimulation verantwortlich war.

Die in der vorliegenden Untersuchung zu *Shigella* stark stimulierende Fraktion TP50-19 weist neben dem Hauptprotein L23 in sehr geringen Spuren L4 und L5 auf. Somit könnte analog gemutmaßt werden, dass nicht L23, sondern die geringfügigen Verunreinigungen durch L4 und L5 die tatsächlich immunogenen Proteine darstellen.

Gegen diese Annahme spricht, dass L23 nur in der stark stimulierenden Fraktion TP50-19 und in keiner weiteren stimulierenden Fraktion nachweisbar war, wohingegen L5 in FPLC-Referenzchromatographien in 3 verschiedenen Fraktionen in relevanten Mengen eluierte¹⁴⁶, keine der weiteren L5 enthaltenden Fraktionen jedoch eine erhöhte T-Zellproliferation induzierte.

Weiter ist anzuführen, dass L4 neben einem weiteren Protein zu ca. 50 % in der Fraktion

TP50-20 nach TP50-19 eluierte, diese Fraktion jedoch ebenfalls keine erhöhte Stimulation induzierte.

Es erscheint somit plausibel, dass L23 ein immundominantes Antigen darstellt, wogegen L4 und L5 keine ausgeprägte T-Zell-Stimulation induzieren.

Aufgrund der im Vergleich zu den Vorarbeiten von Mertz optimierten Methoden der Antigenpräparation mit u.a. der Einführung der Zonalzentrifugation über einen Sucrosegradienten und optimierten Verhältnissen der FPLC liegt darüber hinaus eine besonders reine Ribosomenpräparation vor.

Obleich eine mögliche Kontamination durch nicht-ribosomale Proteine nicht definitiv ausgeschlossen werden kann, ist eine solche wegen des bekannten Laufverhaltens der ribosomalen Proteine in der 2-D-PAGE problemlos nachweisbar. Die Analyse der L23 enthaltenden Fraktion TP50-19 erbrachte keine Hinweise auf eine solche Kontamination.

4.1.1.1 Strukturvergleich von L23 bei verschiedenen Bakterienspezies

Die vergleichende Proteinsequenzanalyse des ribosomalen Proteins L23 zeigt, wie in Abb. 27 demonstriert, bei den zu verschiedenen Spezies gehörenden Bakterien *Shigella* und *Yersinia* eine hohe Übereinstimmung mit lediglich 5 Sequenzsubstitutionen bei *Yersinia*.

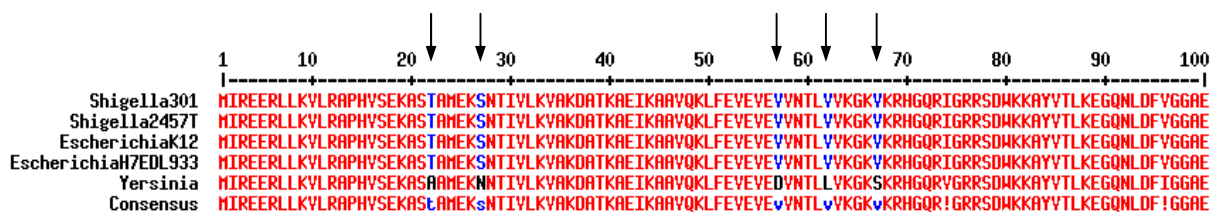


Abb. 27: Vergleichende Sequenzanalyse des Proteins L23 bei *Shigella*, *Yersinia* und *Escherichia*

Nach Prozessierung von L23 im Proteasom von MNZ sind somit viele Peptide mit übereinstimmender Sequenz zu erwarten, welche durch den TAP-Transporter in das ER zur Bindung an HLA-B27 transportiert werden. Bei bekanntem Bindungsmotiv von HLA-B27 mit bevorzugter Selektion von Nonameren mit einem Arginin an Position 2 ist somit eine Kreuzreaktion von aus L23 beider Spezies abgeleiteter Nonamere gut vorstellbar.

Der Proteinsequenzvergleich der zur selben Spezies gehörenden Bakterien *Shigella* und *Escherichia* erbrachte erwartungsgemäß für L23 eine identische Sequenz.

Die übereinstimmende Identifikation des konservierten ribosomalen Proteins L23 als immundominant bei den beiden ReA-assoziierten Bakterien *Shigella* und *Yersinia* wirft die Frage auf, weshalb eine ReA nicht auch durch andere Bakterien getriggert wird, zum Beispiel durch *E. coli*, die immerhin über eine identische Sequenz für L23 verfügen. In der medizinischen Literatur finden sich keine Hinweise auf eine ReA-Assoziation von *E. coli*.

Eine mögliche Erklärung dieser zunächst widersprüchlich erscheinenden Daten ist in der Biologie der Bakterien, und hier insbesondere bei den differierenden Virulenzfaktoren der ReA-assoziierten Erreger zu suchen:

Es ist bekannt, dass reaktive Arthritiden nach Infektion mit *S. flexneri* auftreten. Allerdings sind nicht alle Stämme in der Lage, eine ReA zu induzieren. Zur Unterscheidung zwischen arthritogenen und nicht-arthritogenen *S. flexneri*-Stämmen kann eine Untersuchung angeführt werden, die ein 2 Md-Plasmid mit Namen pHS-2 beschreibt, welches nur bei den arthritogenen Stämmen nachweisbar ist^{80, 81}. Das pHS-2 kodiert über ein Gen einen Kettenlängendeterminator der O-Seitenkette des LPS, was einen wichtigen Virulenzfaktor darstellt. Eine aktuelle, umfassendere Untersuchung bestätigte diese Ergebnisse durch die Demonstration, dass pHS-2 bei den *S. flexneri*-Isolaten *1a*, *1b*, *2a* und *2b* nachweisbar war⁸², welche am häufigsten mit dem Auftreten einer ReA assoziiert sind^{54, 83-90}.

Bei *E. coli* ist dieses Plasmid bei fehlender ReA-Assoziation nicht nachweisbar.

Auch bei den als arthritogen bekannten Stämmen von *Yersinia* sind plasmidgebundene und chromosomale Virulenzfaktoren nachweisbar, die eine Modulation der zellulären Adhäsion und Invasion bewirken. Untersuchungen, die eine Korrelation zwischen arthritogenen Stämmen und vorhandenen Virulenzfaktoren nachzuweisen versuchen, existieren gegenwärtig weder für *Yersinia* noch für andere ReA-assoziierte Bakterien.

Bei der Pathogenese der ReA sind bei genetischer Prädisposition somit mutmaßlich neben immundominanten, arthritogenen Peptiden weitere Faktoren zur Induktion erforderlich.

Es spricht vieles dafür, dass die Virulenzfaktoren, mit deren Hilfe Bakterien Zugang zu ihren Zielzellen erhalten, hierbei eine wichtige Rolle spielen. Im Falle der *Shigella*-getriggerten ReA erscheint dies wie oben erläutert äußerst plausibel, zumal trotz einzelner gegenteiliger Berichte bisher keine überzeugende Arthritogenizität von *S. flexneri*-Stämmen ohne vorhandenes pHS-2 nachgewiesen werden konnte.

4.1.1.2 Physiologische Funktion von L23

Die physiologische Funktion des ribosomalen Proteins L23 auf molekularer Ebene besteht darin, den Trigger-Faktor an das Ribosom zu assoziieren.

Bei der Translation geraten die neu synthetisierten Polypeptide zunächst in Kontakt zu Ribosom-assoziierten Chaperonen, die bei dem Prozeß der Faltung mitwirken und ein Prinzip darstellen, welches entwicklungsgeschichtlich sehr konserviert zu sein scheint. Dabei dient L23 als Bindungsstelle für den Trigger-Faktor am Ribosom und stellt somit das Bindeglied zwischen Proteinbiosynthese und Chaperon-assistierter Proteinfaltung dar. Kommt es durch eine Mutation von L23 zu einer Strukturänderung, so kann der Trigger-Faktor nicht an das Ribosom binden, was zu einer Proteinaggregation führt und den Zelltod bei solchen Zellen bedeutet, die nicht über Reparaturmechanismen durch entsprechende Chaperone verfügen¹⁴⁷.

4.1.2 Das immundominante ribosomale Antigen L22/L3

Die ebenfalls eine deutliche Stimulation induzierende Fraktion TP50-18 enthält als Hauptbestandteil das 50S-Protein L22. In dieser Fraktion ließ sich als Spur auch L3 nachweisen, welches seinerseits als Bestandteil der Fraktion TP50-12 neben 2 nicht-ribosomalen Proteinen bei 2 von 3 Patienten eine leicht erhöhte Stimulation erzielte.

Ob sich daraus ergibt, dass neben L22 auch L3 als immundominantes Antigen anzusehen ist, kann momentan nicht definitiv beantwortet werden und erfordert weiterführende Untersuchungen mit dem separaten Einsatz beider Proteine im Lymphozytenproliferations-assay.

FPLC-Referenzprotokolle mit geringgradig veränderten Chromatographiebedingungen weisen jedoch die Elution von L22 in nur einer, von L3 dagegen in relevanten Mengen von 40 bzw. 50 % in weiteren 2 Fraktionen nach. Bei hypothetischer Immundominanz von L3 sollte dieses daher in weiteren zwei stimulierenden Fraktionen enthalten sein. Es findet sich jedoch nur in einer weiteren, welche ihrerseits zu den weniger stark stimulierenden zählt. Somit ist eher davon auszugehen, dass L22 im Gegensatz zu L3 das stimulierende Antigen darstellt.

Die physiologische Funktion von L22 scheint über eine Interaktion mit spezifischen entstehenden Polypeptidketten in der Regulation der Translation zu bestehen. Darüber hinaus verleiht die Deletion von drei Aminosäuren die Resistenz gegen Erythromycin, ohne dabei mit der Bindung des Antibiotikums zu interferieren¹⁴⁸. L3 ist ein wichtiger Initiator für die Zusammensetzung der ribosomalen 50S-Untereinheit¹⁴⁹. Entgegen früheren Annahmen ist L3

dabei nicht Teil der aktiven Bindungsstelle des Zentrums der Peptidyltransferase, sondern ist in enger Nachbarschaft dazu lokalisiert. Daher spielt L3 wahrscheinlich eine strukturelle Rolle bei der korrekten Faltung der rRNA¹⁵⁰.

4.1.3 Das immundominante ribosomale Antigen S3

Mit einem Stimulationsindex von 4,7 bei Patient #1, 47,9 bei Patient #2 und 5,6 bei Patient #3 für die Fraktion TP30-16 zählt S3, welches als einziges der stärksten T-Zell-Stimulation induzierenden ribosomalen Proteinen aus der 30S-Untereinheit stammt, neben L23 und L22/L3 zu den immundominanten Antigenen von *Shigella*.

Innerhalb der 30S-Proteine erzielte die Fraktion TP30-16 übereinstimmend bei den Patienten #2 und #3 die höchste, und bei Patient #1 die zweithöchste Stimulation, gefolgt von der Fraktion TP30-15. Die gelelektrophoretische Analyse wies eine identische Zusammensetzung beider Fraktionen nach und identifizierte S3 als enthaltenes Protein, mit einer fraglichen, geringfügigen Verunreinigung durch S4.

S3 formt zusammen mit S4 und S5 die Eingangspore der mRNA und verfügt wahrscheinlich über Helikase-Aktivität, was die benötigte Streckung der mRNA bei der Translation bewirkt¹⁴⁸.

4.1.4 Weitere T-Zell stimulatorische Antigene

Neben dem von Mertz bei *Yersinia enterocolitica* beschriebenen immundominanten Antigen L23¹²⁴, welches wie bei *Shigella* zu den stärksten T- Zell-Proliferation induzierenden Proteinen gehört, zeigt sich auch bei einem weiteren ribosomalen Protein eine mögliche Übereinstimmung zwischen beiden Bakterien: Das Protein L2, welches Mertz wegen seiner häufigen Detektion im Western Blot im Serum von an Yersinien-getriggelter ReA leidenden Patienten auf seine Fähigkeit, eine T-Zell-Stimulation zu induzieren untersuchte, ist in der vorliegenden Arbeit in der Fraktion TP50-27 nachweisbar.

Auf zellulärer Ebene konnte Mertz keine hohe Proliferation durch L2 zeigen. In der vorliegenden Arbeit zu *Shigella* erzielt L2 eine höhere Stimulation als der Durchschnitt, verfehlt jedoch die Kriterien einer hohen Proliferation. Übereinstimmend zu den Western Blot Untersuchungen von Mertz wird L2 humoral bei 4 von 5 ReA-Patienten detektiert, allerdings ebenfalls bei 4 von 6 Kontrollen.

Die gelelektrophoretische Charakterisierung der ebenfalls eine leicht erhöhte T-Zell-Stimulation induzierenden Fraktion TP50-25 mittels SDS-Page erlaubte zunächst keine definitive Aufklärung der enthaltenen Proteine. Die 2-D-Page schließlich identifizierte 2 Hauptproteine, L15 und L18. Die nachgeschaltete flüssigkeitschromatographische Analyse durch RP-HPLC wies zusätzlich in geringfügiger Menge das Protein L27/28 nach, ein Ergebnis, das gut mit einem in der SDS-Page schwach detektierten kleinen Protein übereinstimmt, welches von seinem Laufverhalten her über ein geringeres Molekulargewicht als L23 verfügt.

4.1.5 T-Zell-stimulatorische Potenz: Ribosomenfraktion versus zytoplasmatische Fraktion (S100)

Die dieser Arbeit zugrundeliegende Untersuchung von Mertz verwendet ein Präparationsschema, welches auf der Suche nach immundominanten T-Zell-Antigenen von *Yersinia* den Vergleich von Ribosomenfraktion mit zytoplasmatischer Fraktion und Membranen ermöglicht.

Das vorliegende, optimierte Protokoll für die Präparation der 70S-Ribosomen aus *Shigella* scheidet die Membranen nach dem Zellaufschluß zusammen mit Alcoa ab, weshalb sie nicht für Stimulationsexperimente zur Verfügung stehen. Somit kann ein Vergleich von ribosomaler Fraktion, die alle ribosomalen Proteine enthält, und zytoplasmatischer Fraktion (S100), welche alle löslichen Proteine der Zelle außer Ribosomen und Membranen enthält, vorgenommen werden.

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation wird zudem ein weiterer Separationsschritt eingeführt, der die Auftrennung der 70S-Ribosomen in deren beide Untereinheiten bewirkt. Abweichend zu dem von Mertz vorgenommenen Vergleich T-Zell-stimulatorischer Potenz von ribosomaler Fraktion, zytoplasmatischer Fraktion und Membranen erfolgte in der vorliegenden Untersuchung der Vergleich zwischen den Proteinen der beiden ribosomalen Untereinheiten (TP50 und TP30) und der zytoplasmatischen Fraktion (S100).

Dabei zeigte Patient #1 definitionsgemäß hohe Proliferationen auf alle 3 Fraktionen mit der höchsten auf TP50, gefolgt von S100 und TP30. Patient #2 wies bei ebenfalls hohen Proliferationen auf alle Fraktionen die höchste Stimulation durch TP30 auf, gefolgt von S-100 und TP50. Patient #3 zeigte eine isolierte hohe Proliferation auf TP30, wohingegen TP50 und

S-100 definitionsgemäß sehr geringe Proliferationen auf Niveau von wenig stimulierenden, durch die FPLC gewonnenen Proteinfractionen erzielten (Abbildung 10).

Eine eindeutig höchste Proliferation auf die ribosomale im Vergleich zur zytoplasmatischen Fraktion ließ sich im Gegensatz zu den von Mertz bei *Yersinia* erzielten Ergebnissen nicht bestätigen.

Mögliche Ursache dieser Differenz bei geringer Patientenzahl ist die unterschiedliche Konzentration der einzelnen Proteine innerhalb der untersuchten Fraktion, bedingt durch variierende Präparationsprotokolle.

Es ist bekannt, dass bei Stimulationsexperimenten mit T-Zellen durch Variation der Konzentration des eingesetzten Antigens deutliche Unterschiede in deren stimulatorischer Potenz erzielt werden können und Konzentrationen definierbar sind, die optimale Stimulationen provozieren. Somit erscheint eine vergleichende Gegenüberstellung beider Untersuchungen bezüglich T-Zell-stimulatorischer Potenz von ribosomaler und zytoplasmatischer Fraktion problematisch; nicht zuletzt deshalb, da die Anzahl der Proteine innerhalb der zu vergleichenden Fraktionen deutlich differiert: die große Untereinheit enthält 33 Proteine, die kleine 21, das gesamte Ribosom 54; die zytoplasmatischen Fraktion dagegen alle übrigen löslichen Proteine der Zelle, also Hunderte von Proteinen.

Auch der von Mertz gezogene Schluß, die zytoplasmatische Fraktion von *Yersinia* sei hinsichtlich T-Zell-stimulatorischer Potenz deutlich schwächer als die ribosomale Fraktion einzuschätzen, erscheint unter diesen Bedingungen kritisch. Es ist gut vorstellbar, dass bei einer solchen Fülle von Proteinen, wie sie die zytoplasmatische Fraktion enthält, immundominante Antigene in verschwindend geringer Menge vorliegen, die in Stimulationsexperimenten durch die verwendeten Methoden nicht detektiert werden können. Zusätzlich ist zu erwähnen, dass sich das Hitzeschockprotein hsp60, welches von mehreren Autoren als mögliches immundominantes T-Zell-Antigen bei der *Yersinia*-getriggerten ReA diskutiert wird^{116, 117}, bei Präparation in der zytoplasmatischen und nicht der ribosomalen Fraktion befindet.

Darüber hinaus besteht bei der vergleichenden Untersuchung der durch ribosomale Fraktion, zytoplasmatische Fraktion und Membranen induzierten zellulären Immunantwort ein weiteres, methodisches Problem: Die Proteine der beiden erstgenannten Fraktionen können in wässrigen Lösungen gelöst werden, um dann in Kulturmedium im Lymphozytenproliferationsassay eingesetzt zu werden, Membranen hingegen nicht. Um sie in

Lösung zu bringen ist der Einsatz von Detergentien erforderlich, welche über toxische Effekte auf die Lymphozyten und veränderte Kulturbedingungen Einfluss auf die Proliferation nehmen.

Zusammengefasst erscheint es fraglich, wie aussagekräftig die von Mertz vorgenommene Einschätzung hinsichtlich einer höheren T-Zell-stimulatorischen Potenz der ribosomalen gegenüber der zytoplasmatischen Fraktion ist.

4.1.6 T-Zell-stimulatorische Potenz: Ganze, desintegrierte Zellen von *S. flexneri* versus *E. coli*

Der Einsatz von ganzen, desintegrierten Bakterienzellen von *Shigella flexneri* und *Escherichia coli* im Lymphozytenproliferationsassay mit synovialen MNZ von Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA erbrachte bei allen Patienten eine deutliche höhere Stimulation durch *Shigella*. Bei Patient #1 betrug der SI für *S. flexneri* 9,1, für *E. coli* 2,1; bei Patient #2 117,7, was einer noch höheren Stimulation als durch den unspezifischen Stimulator PWM entspricht, versus 22,7 durch *E. coli* und bei Patient #3 7,1 für *S. flexneri* versus 3,6 für *E. coli*.

Somit erscheint bei in der vorliegenden Untersuchung geringer Patientenzahl eine Unterscheidung auf T-Zell-Ebene hinsichtlich eines stattgehabten Infekts zwischen *S. flexneri* und *E. coli* möglich. Dies ist umso interessanter, da *Shigella* als gramnegatives, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterien zur Familie der Enterobacteriaceae zählt^{52, 53} und im Jahr 2000 der Nachweis erbracht werden konnte, dass es sich bei den bisher als *Shigella*-`Spezies` bezeichneten Isolaten um Klone von *E. coli* handelt^{54, 55}.

Interessanterweise wiesen dabei 2 der 3 Patienten auch höhere Proliferationen durch die kompletten ribosomalen Untereinheiten TP30 und TP50 sowie die ganze cytoplasmatische Fraktion (S100) von *Shigella* im Gegensatz zu ganzen, desintegrierten Zellen von *E. coli* auf. Die Ursache für die differierende T-Zell-Reaktion auf *Shigella* und *Escherichia* könnte in der unterschiedlichen Eindringtiefe in das Gewebe durch die pathogenen Shigellen im Gegensatz zu kommensalen intestinalen *E. coli* und damit einer unterschiedlichen Antigenprozessierung beruhen (siehe auch 4.2.1).

4.1.7 Arthritogene Antigene in der Pathogenese der ReA: „sauer oder basisch“?

In der Literatur finden sich viele Untersuchungen, die ribosomale Proteine als immunogene Antigene ausweisen.

In Bezug auf saure Proteine sind die drei ribosomalen P-Proteine P₀ (L11), P₁ (L10) und P₂ (L7/L12) als IgG-Antikörper induzierende Antigene beim systemischen Lupus erythematodes, dem Prototyp einer systemischen Autoimmunerkrankung, bekannt^{121, 122}. Bei der chronischen *Aspergillus-fumigatus*-Allergie lassen sich gegen das saure ribosomale Protein P₂ humorale und zelluläre Autoimmunreaktionen im Lymphozytenproliferationsassay nachweisen¹²⁵.

Daten über basische immunogene Proteine finden sich vor allem im Zusammenhang mit Spondyloarthritis-assoziierten Erkrankungen:

Zu den immundominanten Antigenen der durch *Yersinia* getriggelter ReA gehören wie zuvor genannt zwei stark basische Proteine: das ribosomale Protein L23, und das 19kD-Protein (β -Urease-Untereinheit), welches in vorimmunisierten Wistar-Ratten nach intraartikulärer Applikation eine Arthritis induziert. Letzteres Protein wurde in diesem Zusammenhang in zwei unterschiedlichen Ansätzen unabhängig voneinander als relevantes Antigen identifiziert^{123, 151}.

Darüber hinaus deuten auch die in der vorliegenden Untersuchung erzielten Ergebnisse mit der Identifikation von L23, L22/L3 und S3 als immundominante Antigene von *Shigella* daraufhin, dass mögliche arthritogene Proteine eher unter basischen Proteinen zu finden seien. In Übereinstimmung mit den von Mertz erhobenen Daten induzierten die sauren ribosomalen Proteine keine überdurchschnittliche T-Zell-Stimulation.

Die Ursache hierfür sei, wie von einigen Autoren postuliert, in den negativ geladenen („sauen“) Gruppen des Gelenkknorpels zu suchen: Aufgrund der negativen Ladung werde die Bindung basischer Gruppen gefördert, folglich sei ein potentiell arthritogenes Antigen, welches an die Gelenkstruktur bindet, eher unter basischen denn sauren Peptiden zu vermuten¹²⁹⁻¹³¹. Diese physikochemischen Charakteristika zeichnen alle ribosomalen Proteine aus, abgesehen von den drei sauren Proteinen L11, L10 und L7/L12.

Auf der Suche nach arthritogenen Antigenen wurde in einem weiteren Ansatz das durch HLA-B27-Moleküle präsentierte Spektrum an Peptiden zwischen mit *Shigella* und *Salmonella* infizierten sowie nicht-infizierten Zellen verglichen. Die Analyse der

präsentierten Peptide erbrachte deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen und wies nach, dass die Infektion der Zelle eine veränderte Antigenpräsentation bewirken kann¹⁵². Sowohl bei den mit *Shigella flexneri*, als auch mit *Salmonella typhimurium* infizierten Zellen wurde die Präsentation eines Peptids mit Homologie zum humanen ribosomalen Protein S17 nachgewiesen. Dieses Resultat ließe sich gegebenenfalls zugunsten der arthritogenen Peptid-Hypothese interpretieren und würde darüber hinaus auch gut erklären, weshalb in transgenen Tiermodellen Arthritiden nur bei Tieren mit normaler bakterieller Umgebung induzierbar sind, nicht jedoch bei in keimfreier Umgebung gehaltenen¹⁰².

Interessanter Weise waren neben S17 auch ein Peptid mit einer Sequenz der schweren Kette des HLA-B27-Moleküls selbst und ein Peptid mit identischer Sequenz zum humanen Histon H3 nachweisbar. Dabei sind S17 und Histon H3 durch ihre Basizität charakterisiert.

In der vorliegenden Arbeit zu *Shigella* ließ sich keine erhöhte T-Zell-Proliferation gegen das prokaryontische S17 nachweisen. Von den ribosomalen Proteinen der kleinen Untereinheit erzielte nur ein Antigen eine definierte hohe Stimulation, das Protein S3, welches einen der stärksten Stimulatoren in der vorliegenden Untersuchung repräsentiert.

4.1.8 Identifikation arthritogener Antigene: Neue Therapiekonzepte

Die Fahndung nach arthritogenen Antigenen dient neben der Suche nach Hinweisen auf die Pathogenese der ReA auch der Eröffnung neuer Therapieoptionen: Über eine Identifikation pathogenetisch relevanter Peptide könnten diese mit Hilfe verschiedener Ansätze eliminiert, und so im günstigsten Fall der Ausbruch der Erkrankung verhindert werden.

Als Beispiel für ein solches Therapieprinzip könnte die anteriore Uveitis angeführt werden: Es handelt sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmunerkrankung, bei der einige Autoren ein molekulares Mimikry zwischen einem Peptid des HLA-B27-Moleküls und einem retinalen Peptid postulieren. Die T-Zell vermittelte Entzündung kann über vermindertes Sehvermögen bis zur Blindheit führen¹⁵³. In einer Therapiestudie mit geringer Patientenzahl wurde nach Identifikation des postulierten, kreuzreagierenden Peptids über eine orale Applikation desselben der Versuch unternommen, eine T-Suppressor-Zell vermittelte Toleranzentwicklung zu induzieren. Die Autoren berichten von einem guten Ansprechen auf die Therapie mit Rückgang der Entzündung ohne relevante unerwünschte Wirkungen, Reduktion der immunsuppressiven Medikation¹⁵⁴ und anhaltendem Effekt bei einer 5 Jahre später durchgeführten Nachbeobachtung¹⁵⁵.

Ein weiteres Therapieprinzip könnte in der gezielten Ausschaltung pathogenetisch relevanter, kreuzreagierender Peptide bestehen. Ansatzpunkt hierfür wäre die kompetitive Blockierung des für das Peptid spezifischen Rezeptors, bei der HLA-B27-assoziierten ReA also höchstwahrscheinlich die Blockierung des HLA-B27-Moleküls.

In einem transgenen Tiersystem konnte diese Möglichkeit bereits in etabliert werden: Um zu untersuchen, ob für das Auftreten der Arthritis die Bindung eines spezifischen Peptids an HLA-B27 nötig ist, wurde ein Minigen in B27-transgene Ratten eingebracht, welches ein Peptid des Influenza-Nukleoproteins kodiert, das mit hoher Affinität an HLA-B27-Moleküle bindet und etwa 90 % der endogenen Peptide verdrängt.

Die Gruppe der Ratten, die über dieses Minigen verfügte, erkrankte signifikant seltener an Arthritis als die Kontrollgruppe. Es lässt sich folgern, dass über die Besetzung des HLA-B27-Moleküls durch das eingeschleuste Peptid die Präsentation arthritogener Peptide verhindert und die Pathogenese unterbrochen wird.

Die entzündlichen Veränderungen des Darmes waren in der mit dem Minigen versehenen Gruppe und der Kontrollgruppe gleichermaßen ausgeprägt, was für eine geringere Bedeutung spezifischer Peptide bei der Entwicklung der Kolitis im Gegensatz zur Entwicklung der Arthritis spricht¹⁴⁰.

4.1.9 Reaktive Arthritis - chronische Infektion oder Autoimmunreaktion?

Bei bekannter genetischer Prädisposition mit Positivität für HLA-B27, Assoziation zu den bakteriellen Erregern *Shigella*, *Yersinia*, *Campylobacter*, *Salmonella* und *Chlamydia*, Identifikation der pathogenetisch beteiligten Lymphozytenpopulationen und bekanntem klinischen Bild ist die Pathogenese der ReA nach wie vor ungeklärt.

Neben Untersuchungen, welche über die Identifikation arthritogener Peptide eine Aufklärung der Pathogenese zum Ziel haben, stellt sich die Frage, ob die ReA, und insbesondere die chronische ReA, welche bevorzugt HLA-B27-positive Patienten betrifft³⁶, Folge einer chronischen, persistierenden Infektion, oder aber einer Autoimmunreaktion ist.

Die existierenden Daten erlauben diesbezüglich gegenwärtig keine definitive Antwort:

Einerseits besteht durch den Nachweis von Chlamydien-DNA und -RNA in arthritischen Gelenken der hochgradige Verdacht auf eine chronische Infektion mit Vorhandensein lebender Bakterien im Gelenk^{44, 92}, welche von der Immunabwehr und diagnostischen

Instrumenten nicht zugänglichen Reservoirs aus immer wieder über das Blut in die Gelenke streuen könnten. In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass z. B. die Peyerschen Plaques im Kolon bakteriellen Erregern als Nische dienen können.

Andererseits hat der Einsatz von Antibiotika in kontrollierten Studien keine positiven Effekte auf die akute Arthritis nachweisen können^{35, 156, 157} und die Therapie einer ReA, die sich nicht spontan nach 4-6 Monaten zurückbildet, besteht neben der Gabe von nichtsteroidalen Antirheumatika sowohl in einer immunsuppressiven Therapie mit Kortisol als auch in der immunmodulierenden Therapie mit Basistherapeutika wie Sulfasalazin, Methotrexat oder Leflunomid.

Bei postulierter kausal zu Grunde liegender chronischer Infektion sollte unter immunsuppressiver Therapie ein Aufflammen derselben mit konsekutiver Verschlechterung des Allgemeinzustandes des Patienten zu erwarten sein. Dies lässt sich jedoch klinisch nicht beobachten: Trotz fehlender Studien mit größeren Patientenzahlen, die das Ansprechen von Patienten mit chronischer ReA auf Immunsuppressiva untersuchen, zeigt die klinische Erfahrung und auch Fallberichte in der medizinischen Literatur, dass immunsuppressive Therapie eine wenn auch häufig nicht suffiziente Verbesserung, so jedoch kein Aufflammen der möglicherweise zugrunde liegenden Infektion bewirkt.

Darüber hinaus existieren einzelne Fallberichte, die den erfolgreichen Einsatz von sehr potenten Immunsuppressiva wie TNF α -blockierenden Substanzen in der Therapie der ReA beschreiben:

In einer finnischen Untersuchung an zwei Patienten mit *Yersinia*-getriggelter akuter ReA führte die Behandlung mit Infliximab zu einer deutlichen Verbesserung der Beschwerden¹⁵⁸. Auch eine in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Untersuchung, in der drei Patienten mit chronischer enteral-getriggelter ReA mit Infliximab behandelt wurden, zeigte ein hoch effektives Ansprechen und erzielte bei allen Patienten Remissionen ohne Hinweise auf eine Reaktivierung der initialen Infektion¹⁵⁹.

4.1.10 Neue Methoden zur Diagnostik der ReA - Möglichkeit eines Screenings auf T-Zell-Ebene für immundominante ribosomale Proteine bei der *Shigella*-getriggerten ReA?

Im klinischen Alltag ist es eher selten, dass Patienten, die an einer akuten Mon- oder Oligoarthritis erkrankt sind, einen eindeutigen gastrointestinalen oder urogenitalen Infekt einige Tage bis Wochen vor Beginn der Gelenksymptomatik angeben können bzw. weitere typische Manifestationen aufweisen und somit die klinische Diagnosestellung einer ReA erlauben.

Daher ist es von großer Bedeutung, mit Hilfe unterschiedlicher Methoden nach Hinweisen auf eine stattgehabte Infektion zu fahnden.

Serologisch ist bei fehlenden Hinweisen auf einen klinischen Infekt bzw. bei negativer Stuhlkultur der alleinige Nachweis von IgG-Antikörpern als nicht ausreichend zu betrachten; es sollten entweder zusätzlich IgM-Antikörper als Zeichen der frischen Infektion, und/oder IgA-Antikörper als Ausdruck der Persistenz der Erreger in den Schleimhäuten positiv bestimmt werden, da die ReA-assoziierten Bakterien alle zu einer Infektion der Schleimhäute führen und dort lange persistieren können¹⁶⁰.

Da für die *Shigella*-getriggerte ReA bisher kein verlässliches serologisches Verfahren existiert, besteht ein hoher Bedarf an der Entwicklung weiterer diagnostischer Werkzeuge. In diesem Zusammenhang konnte aktuell eine nested-PCR zum Nachweis von *Shigella*-DNA etabliert werden (T. Adam, persönliche Mitteilung).

In spezialisierten Zentren kommt darüber hinaus der Lymphozytenproliferationsassay zum Einsatz, der die Proliferation der bei der Pathogenese verantwortlichen T-Zellen auf relevante Bakterien bzw. Bakterienbestandteile misst und so Rückschlüsse auf vorangegangene Infektionen erlaubt. Besonderes Interesse gilt dabei der Identifikation von immundominanten Antigenen oder T-Zell-Mustern, die möglicherweise erregerspezifisch sind und somit nicht nur eine Erweiterung der Diagnostik darstellen, sondern auch, wie oben erläutert, zukünftige therapeutische Möglichkeiten eröffnen könnten.

In diesem Zusammenhang wird von einigen Autoren angemerkt, dass durch Kreuzreaktionen zwischen allgemein vorkommenden Epitopen bei verschiedenen Bakterien der Test eine verminderte Spezifität besitzen könne¹⁶¹.

Durch Hinzufügen weiterer gereinigter, spezifischer Antigene kann die Aussagekraft jedoch erhöht werden. So konnte demonstriert werden, dass durch den zusätzlichen Einsatz des

immundominanten T-Zell-Antigens 19kd von *Yersinia* im Lymphozytenproliferationsassay neben dem Einsatz von ganzen Bakterienzellen eine deutliche Differenzierung von anderen ReA-assoziierten Erregern möglich ist und eine verbesserte Diagnostik erlaubt¹⁶². Analog ist es denkbar, durch die in dieser Untersuchung identifizierten immundominanten T-Zell-Antigene ein für die *Shigella*-getriggerte ReA typisches Muster zu definieren, welches die Diagnostik verfeinert.

Über weiterführende Analysen, die die Identifikation immunogener T-Zell-Antigene auch der anderen ReA-assoziierten Erreger zum Ziel haben, sollten dann vergleichende Untersuchungen erfolgen, die schließlich Aussagen erlauben, wie spezifisch ein definiertes T-Zell-Muster für den jeweiligen Erreger ist.

4.2 Humorale Immunantwort

4.2.1 Humorale Immunantwort gegen ribosomale Proteine und immundominante T-Zell-Antigene

Die Untersuchung der humoralen Immunantwort mittels Western Blot charakterisierte erstmals gegen ribosomale Proteine von *Shigella* gerichtete Antikörperprofile sowohl im Serum von Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA, als auch bei gesunden Probanden.

Die eine starke T-Zell-Stimulation induzierenden ribosomalen Proteine L22/L3, L23 und S3 und auch weitere T-Zell-Proliferation induzierende Proteine wie L15, L18 und L21 wurden auf humoraler Ebene dabei sowohl in den Seren der Patienten, als auch bei den gesunden Kontrollen mit ähnlicher Häufigkeit und ohne deutliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen detektiert.

Somit scheint keines der immundominanten T-Zell-Antigene für ein Screening auf humoraler Ebene mit Frage nach stattgehabter Infektion sinnvoll einsetzbar zu sein.

Das ribosomale Protein S13 allerdings, welches zellulär keine erhöhte Stimulation induzierte, wurde auf humoraler Ebene als einziges der über 50 ribosomalen Proteine nur im Serum der Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA, nicht jedoch im Serum der Kontrollen erkannt (Tabelle 4a). In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass in Vorversuchen mit den ribosomalen Proteinen von *E. coli* und deren Inkubation mit Seren von Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA und gesunden Kontrollen eine Kreuzreaktivität zwischen *Shigella* und

E. coli nachgewiesen werden konnte. Die Sequenzanalyse von S13 zeigt darüber hinaus identische Sequenzen bei *Shigella* und *E. coli*^{55, 163}.

Die Detektion von S13 nur im Serum der Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA ist aus oben genannten Gründen umso interessanter, wobei die Erklärung darin bestehen könnte, dass pathogene Shigellen tief in das Gewebe und sogar ins Zytoplasma von Makrophagen und Epithelzellen vordringen können, wodurch es erst zu einer effizienten Antigenpräsentation dieses Proteins kommt im Gegensatz zu kommensalen intestinalen *E. coli*. So könnte der fakultativ intrazelluläre Lebensstil der Shigellen etwa durch eine im Vergleich zu den extrazellulären kommensalen *E. coli* unterschiedliche Prozessierung von S13 zu dessen stärkerer Antigenität bei Shigellen führen. Dieser Hypothese folgend wäre es zu erwarten, dass auch nach Infektion mit enteroinvasiven *E. coli* eine humorale Immunantwort gegen S13 auftreten kann.

Sollten Folgeuntersuchungen mit größeren Patientenzahlen die in der vorliegenden Analyse erzielten Ergebnisse reproduzieren und ebenfalls eine eindeutige Differenzierung zwischen mit *Shigella* infizierten und nichtinfizierten Patienten anhand von S13 bestätigen, könnte dies ein wertvolles diagnostisches Werkzeug zum Nachweis einer stattgehabten Infektion darstellen. Dazu sollten serielle Untersuchungen von Patienten mit sicherer Shigellose, Patienten, bei denen sicher keine Shigellose bestanden hat, Patienten mit durch *E. coli* ausgelösten Harnwegsinfekt (UPEC), mit enterohämorrhagischen *E. coli* (EHEC) oder mit enteroinvasiven *E. coli* (EIEC) vorgenommen werden, wobei bei Patienten mit Infektion mit EIEC eine ähnliche immunologische Reaktion wie bei *Shigella* zu erwarten wäre.

Erbringen diese Analysen weitere Hinweise auf die Relevanz von S13 als mögliches Screening-Werkzeug, so bieten sich in der Folge vergleichende Analysen mit Patienten an, die durch weitere ReA-assoziierte Erreger infiziert wurden.

Zusammengefasst gilt es durch Folgeuntersuchungen zu spezifizieren, ob und wie effektiv das in der vorliegenden Untersuchung erzielte Ergebnis mit einem Nachweis von Antikörpern gegen S13 nur im Serum von Patienten mit *Shigella*-getriggelter ReA, nicht jedoch im Serum von gesunden Kontrollen als diagnostisches Werkzeug einsetzbar ist.

In der medizinischen Literatur finden sich keine wegweisenden Daten hinsichtlich einer möglichen Immunogenität von S13 bei Autoimmunerkrankungen oder Infektionen.

Eine Arbeit aus den frühen neunziger Jahren beschreibt B- und T-Zell-Reaktionen gegen das ribosomale Protein S13 des Nematoden *Brugia pahangi* in durch den Parasiten infizierten Mäusen. Welchen Effekt diese Beobachtung hat und ob die gemessene Immunreaktion dabei als Induktor von möglicher protektiver Immunität gegen die parasitäre Infektion anzusehen sei, war unklar¹⁶⁴.

Eine jüngere Arbeit aus dem Jahr 2004 sieht eine Funktion von S13 bei der Resistenzentwicklung einer gastrischen Krebszelllinie gegen Zytostatika. Die ribosomalen Proteine S13 oder L23 hemmen demnach die durch Zytostatika induzierte Apoptose und können so eine „Multidrug-Resistenz“ hervorrufen¹⁶⁵.

4.2.2 Detektion weiterer Proteine im Western Blot

Interessanter Weise waren auf den Western Blots von TP30 von *Shigella* neben gegen die transferierten ribosomalen Proteine gerichteten Antikörperprofilen auch Antikörper gegen weitere Proteine nachweisbar, die in der vorgeschalteten Transferkontrolle mit Ponceau S nicht detektiert worden waren und keinem S-Protein zugeordnet werden konnten. Selbiges traf auf die Proteine von TP50 zu, wo neben dem Nachweis von IgG-Antikörpern gegen L-Proteine ebenfalls weitere Signale detektiert wurden.

Zunächst musste angenommen werden, dass es sich bei den zusätzlichen Signalen hauptsächlich um nicht-ribosomale Proteine handelt, die sich im Rahmen der Proteinpräparation in diesen Fraktionen sammeln und in zu geringer Menge vorhanden sind, um durch die vorhergehende Ponceau S-Anfärbung detektiert zu werden.

Bei genauerer Betrachtung der jeweils nicht als S- oder L-Protein zuzuordnenden Signale fiel dann jedoch auf, dass ein großer Anteil der zusätzlich detektierten Signale dem Muster der jeweils anderen ribosomalen Untereinheit zugeordnet werden kann. Wurden z. B. bei Patient X im Western Blot von TP30 Antikörper gegen die Proteine S3 und S4 detektiert, so waren diese auch im Western Blot von TP50 zwischen den L-Proteinen nachweisbar, obgleich sie formal gar nicht auf die Membran transferiert worden waren.

Daraus kann geschlossen werden, dass sowohl S-, als auch L-Proteine in sehr geringer Menge im Rahmen der Proteinpräparation jeweils auch in der Fraktion der anderen Untereinheit vorhanden sind. Die jeweiligen Proteinmengen bewegen sich dabei unterhalb der Nachweisgrenze der Ponceau S-Färbung.

Es kann weiter gefolgert werden, dass die jeweils in der anderen Fraktion zusätzlich detektierten ribosomalen Proteine über eine besonders ausgeprägte Immunogenität verfügen, da sie bei deutlich geringerer Antigenmenge eine gleiche oder sogar höher ausgeprägte humorale Reaktion provozieren.

Neben der Identifikation dieser Signale wurden weitere Signale im Western Blot detektiert, die keine Zuordnung zu einem ribosomalen Protein zuließen. Über das Laufverhalten in der 2-D-PAGE konnte eine grobe Abschätzung über Größe und isoelektrische Punkte dieser nicht-ribosomalen Proteine vorgenommen werden.

Vorversuche mit *E. coli* und dem Serum gesunder Kontrollen zur Etablierung des Western Blot hatten gezeigt, dass im Serum gesunder Probanden Antikörperprofile gegen ribosomale Proteine von *E. coli* nachweisbar sind.

Die Analyse der gegen die ribosomalen Proteine von *S. flexneri* und *E. coli* gerichteten Antikörper im Serum von an *Shigella*-getriggelter ReA leidender Patienten wies annähernd identische Antikörperprofile auf, und somit eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen die ribosomalen Proteine von *S. flexneri* und *E. coli* nach. (Western Blots von *E. coli* nicht gezeigt).

4.3 Methodik

Das etablierte Protokoll zur Präparation von ribosomalen Proteinfractionen, die jeweils nur noch ein bis wenige Proteine pro Fraktion erhalten, erlaubt die sehr gezielte Untersuchung einer sehr großen Anzahl von ribosomalen Proteinfractionen mit hoher Auflösung im Lymphozytenproliferationsassay. Es eröffnet dabei die Möglichkeit, die Gesamtheit der ribosomalen Proteine zu untersuchen, nach interindividueller T-Zell-stimulatorischer Potenz zu fahnden und keine künstliche Vorselektion vorzunehmen. Es erlaubt somit direkt eine Information über die Immunogenität eines singulären Proteins, falls dieses bereits vollständig isoliert ist, oder eröffnet indirekt den Rückschluss auf Immunogenität: Falls z. B. ein Protein in mehreren stimulierenden Fraktionen neben anderen Proteinen nachweisbar ist, die ihrerseits auch in weiteren, jedoch nicht-stimulierenden Fraktionen vorkommen, so ist davon auszugehen, dass dieses Protein über stimulierende Potenz verfügt.

Als Nachteil ist die große Anzahl an benötigten synovialen mononukleären Zellen zu nennen, die zur Untersuchung der 39 präparierten ribosomalen Proteinfractionen, von TP30, TP50, S-100 Enzymfraktion und ganzen, hitzeinaktivierten Zellen von *S. flexneri* und *E. coli* für den

Lymphozytenproliferationsassay benötigt wird, insbesondere bei Ansatz von Duplikaten und Triplikaten.

Die Anzahl von Patienten mit gesicherter *Shigella*-getriggelter ReA ist in Berlin und Umgebung eher gering. Darüber hinaus weisen nicht alle betroffenen Patienten große Ergussmengen auf und auch die Konzentration der mononukleären Zellen im Gelenkerguss variiert. Zusammengefasst stellt somit die Rekrutierung geeigneter Patienten ebenso wie die ausreichend hohe Anzahl synovialer mononukleärer Zellen im Gelenkpunktat den limitierenden Faktor da. Dies erklärt die geringe Patientenzahl in der vorliegenden Untersuchung und limitiert die Aussagekraft der gezogenen Schlüsse.

Durch eine Reihe von methodischen Veränderungen in der Präparation der ribosomalen Proteine im Vergleich zu den dieser Arbeit zu Grunde liegenden Untersuchung von Mertz¹²⁴ ergab sich einerseits eine größere Ausbeute an Ribosomen, und andererseits konnte in den anschließend neu hinzugefügten Separationsschritten eine größere Reinheit der ribosomalen Proteine erreicht werden:

1. Durch ein spezielles Verfahren zur Bakterienanzucht lässt sich der Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase verhindern, wodurch die Kultur bis zu den hohen finalen Dichten logarithmisches Wachstum zeigt¹³⁶. Folge ist eine erheblich höhere Ausbeute an Ribosomen mit 3-5 % Ribosomen pro 1 g Nassgewicht Bakterienzellen, die ca. um den Faktor 3 höher gegenüber einer Zellernte in der stationären Phase liegt (Knud H. Nierhaus, persönliche Mitteilung).
2. Mit der Dichtegradientenzentrifugation (Zonalzentrifugation) wurde ein zusätzlicher Separationsschritt zur Zerlegung des 70S-Ribosoms in die beiden Untereinheiten 50S und 30S eingeführt. Die Anzahl der in der Folge durch flüssigkeitschromatographische Verfahren aufzutrennenden Proteine wird dadurch deutlich verringert, was sich in einer höheren Auflösung mit geringerer Anzahl ribosomaler Proteine pro erhaltener Proteinfraction äußert.
3. Nach Entfernen der an den Proteinen der großen und kleinen ribosomalen Untereinheit haftenden rRNA durch Essigsäureextraktion erfolgte die flüssigkeitschromatographische Auftrennung. Die Anwendung einer FPLC-Technik stellte aufgrund kurzer Separationszeiten in Verbindung mit guten Auflösungen und hohen Kapazitäten ein Optimum für die hier durchgeführte Proteinpräparation dar.

Der in den Vorarbeiten bei der FPLC verwendete Puffer (PBS 0,07 M) gewährleistet jedoch keine Denaturierung der Proteine, weshalb sie in gefalteter Form verbleiben und somit Bindungsstellen für die Ionenbindungen mit der Matrix der Ionenaustauschsäule nicht zur Verfügung stehen. Die Folge ist eine insuffiziente Adsorption an die Säule mit konsekutiver mangelhafter Auftrennung der Proteine.

Aus diesem Grund kam hier ein Puffersystem zum Einsatz, welches zur Denaturierung der Proteine 6 M Harnstoff enthält und somit über die Entfaltung und Streckung der Proteine freie Bindungsstellen für die Ionenaustauschchromatographie gewährleistet. Dies bedingt eine optimale Adsorption mit sehr viel höherer anschließender Auflösung der Proteine.

Das entwickelte Protokoll ermöglichte über ein optimiertes Puffersystem und eine verlängerte Chromatographiedauer die Auftrennung der Proteine der kleinen ribosomalen Untereinheit in 25, die der großen Untereinheit in 33 Fraktionen.

4. Die Identifizierung der Proteine und Proteinfractionen erfolgte durch gelelektrophoretische Verfahren. Neben der SDS-PAGE war insbesondere zur Unterscheidung der kleinen ribosomalen Proteine der Einsatz der 2-D-PAGE erforderlich.

Hier konnte neben der herkömmlichen 2-D-PAGE ein spezielles Verfahren etabliert werden, eine Mini-2-D-PAGE in Briefmarkengröße. Mit den Dimensionen 3 x 4 x 0,05 cm bietet sie neben einer sehr hohen Auflösung äußerst kurze Laufzeiten der Elektrophorese (1. Dimension 15 min, 2. Dimension 90 min). Durch Nachweismengen von 100-200 ng pro Einzelprotein bei Coomassiefärbung, bzw. bei Silberfärbung entsprechend weniger, sind nur sehr geringe Proteinmengen erforderlich, und es lassen sich mit einem Ansatz 20 Gele gleichzeitig fahren. Diese Eigenschaften erlauben im Gegensatz zur herkömmlichen 2-D-PAGE die Charakterisierung einer unbekanntem Proteinpräparation innerhalb weniger Stunden unter Verbrauch nur sehr geringer Proteinmengen.

Nach Erlernen der aufgrund der äußerst kleinen Dimensionen zunächst schwierigen Handhabung der Apparaturen repräsentierte es ein praktikables und effektives Verfahren, welches bevorzugt eingesetzt wurde.

5. Zur Untersuchung der Frage, ob die auf zellulärer Ebene eine Stimulation induzierenden ribosomalen Proteine auch humoral erkannt werden, bzw. ob sich Antikörper gegen ribosomale Proteine sowohl im Serum von Patienten, als auch bei gesunden Kontrollen nachweisen lassen, wurde der Western Blot eingesetzt. Die Methode zum Transfer der mittels

SDS-PAGE aufgetrennten Proteine der kleinen und großen ribosomalen Untereinheit auf eine Membran wurde komplikationslos etabliert.

Da es zum Nachweis von Antikörpern gegen multiple, dicht beieinander liegende Proteine kam, war eine eindeutige Identifikation nicht möglich. Es bestand somit die Notwendigkeit, ein Protokoll zu etablieren, welches den Transfer nach zweidimensionaler gelelektrophoretischer Darstellung ermöglicht. Durch Variation des Transferpuffer, sowie Dauer und Temperatur des Transfers konnte dies erreicht werden. Der Vergleich zwischen PVDF- und Nitrozellulosemembran erbrachte eine größere Hitzebeständigkeit und besser anhaftende Proteine der PVDF-Membran, weshalb diese in der Folge verwendet wurde.

Nach Inkubation mit primärem und sekundärem Antikörper, der Zugabe des Substrates und der Entwicklung des Films erschwerte zunächst ein inhomogener, dunkler Hintergrund die Identifikation insbesondere schwacher Signale.

Durch Inkubation nur des sekundären Antikörpers mit einer Membran ohne transferierte Proteine konnte bei resultierendem homogenen, klaren Hintergrund eine unspezifische Bindung des sekundären Antikörpers an die Membran ausgeschlossen werden. Die Inkubation des primären Antikörpers (Serum) mit einer Membran ohne transferierte Proteine und ohne anschließende Applikation des sekundären Antikörpers führte zu einer inhomogenen Dunkelfärbung des Films, was für die Ausbildung unspezifischer Bindungen aus in dem Serum enthaltenen Proteinen an die Membran sprach und eine effektivere Blockierung nötig machte.

Der Vergleich zwischen bovinem Serumalbumin und Milchpulver zur Blockierung erbrachte in den höheren Konzentrationen nahezu identische Resultate, weshalb das weit kostengünstigere Milchpulver verwendet wurde. Durch die Blockierung der Membran über Nacht in 10 % w/v Milchpulver in TBS-Tween 0,05% v/v, Applikation des primären und sekundären Antikörpers ebenfalls in 10 % Milchpulver in TBS-Tween 0,05% v/v, sowie Variation der Inkubationszeiten und -temperaturen konnte ein Protokoll etabliert werden, welches reproduzierbar den Nachweis und die Identifikation auch schwacher Signale ermöglichte.

4.4 Ausblick

Bei der Suche nach möglichen arthritogenen Bakterienbestandteilen zur Aufklärung der Pathogenese der ReA bietet sich initial eine Analyse auf CD4-Ebene aus mehreren Gründen

an: Es erlaubt die Untersuchung komplexer Proteine im Gegensatz zu einzelnen Peptiden hinsichtlich ihrer Immundominanz und ermöglicht somit eine Vorselektion möglicher Kandidatenproteine. Die Tatsache, dass gegenwärtig unklar ist, welche T-Zell-Subpopulation für die Initiation der Immunreaktion und auch für die resultierende Gelenkschädigung pathogenetisch verantwortlich ist, eine T-Zell-Reaktion ohne Beteiligung von CD4 jedoch nicht denkbar ist⁷⁶, muß als weiteres Argument zur initialen Untersuchung der CD4-Antwort angesehen werden.

Nach erstmaliger Identifikation T-Zell-stimulierender Antigene von *Shigella flexneri* auf CD4-Ebene bietet sich in einem anschließenden Schritt die eingehendere Untersuchung jener als immundominant identifizierten Proteine auf CD8-Ebene an, indem aus den stimulierenden Proteinen abgeleitete Peptide zu untersuchen sind.

Bei der *Yersinia*-getriggerten ReA wurde in diesem Zusammenhang ein einzelnes Nonamer mit HLA-B27-Bindungsmotiv aus dem hsp60 von *Yersinia* als Zielantigen einer zytotoxischen T-Zell-Reaktion identifiziert¹¹⁶.

Bei der AS, in welche eine ReA übergehen kann⁵⁰, werden Knorpelantigene als mögliche Zielantigene der Immunantwort diskutiert. Dabei könnte der HLA-B27-Knorpelpeptid-Komplex durch selbstreaktive zytotoxische T-Zellen erkannt werden und eine gelenkspezifische Gewebsschädigung resultieren. Diese Theorie wurde in einem weiteren Ansatz unter Verwendung eines Computerprogramms untersucht, welches 18 humane Knorpelantigene hinsichtlich folgender zwei Parameter screen: Nonamere, die über das Bindungsmotiv für HLA-B27 verfügen und Simulierung der Funktion des Proteasoms, welches als multikatalytische Protease die Prozessierung von Proteinen zu Peptiden im Zytosol leistet¹⁹⁻²¹. Bei 121 identifizierten Nonameren ließ sich nur bei einem vom Kollagen Typ IV abgeleiteten Peptid eine Stimulation von zytotoxischen T-Zellen bei 4 von 7 synovialen Proben nachweisen, wogegen keines der anderen Peptide stimulatorisch wirkte. Die zytotoxische T-Zell-Reaktion konnte durch Gabe eines gegen HLA-B27 gerichteten Antikörpers blockiert werden, was bestätigte, dass es sich um eine HLA-B27-restringierte Immunreaktion handelte¹⁶⁶.

Analog zu diesen Ansätzen sollten die in der vorliegenden Untersuchung erstmals identifizierten T-Zell-Antigene von *Shigella* auf CD4-Ebene in Folgeuntersuchungen auch auf CD8-Ebene untersucht werden, um nach stimulatorischen Peptiden zu fahnden.