

Seite 1

Aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin

DISSERTATION

Kreuzreaktive Peptidliganden für
OspA-spezifische HLA-DR4-restringierte
T-Lymphozyten

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin
Berlin

von

Marc Molinger

aus Düsseldorf

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Thomas Kamradt
2. Prof. Dr. med. Gerd-Rüdiger Burmester
3. Prof. Dr. med. Roland Lauster

Datum der Promotion: 23.06.2006

Kreuzreaktive Peptidliganden OspA-spezifischer HLA-DR₄-restringierter T-Zellen

In dieser Arbeit wurden HLA-DR₄-restringierte T-Zell Antworten auf das Oberflächenprotein A (OspA; engl.: outer surface protein A) von *Borrelia burgdorferi* charakterisiert. Hierbei war das Ziel, Selbstantigene zu finden, die von OspA-spezifischen T-Zellen kreuzreaktiv erkannt werden. Mit Hilfe von OspA-spezifischen T-Zell Hybridomen wurden drei immundominante Epitope im OspA-Molekül auf Kreuzreaktivität untersucht. Dazu wurden die Epitope von jeweils 12 Aminosäuren Länge einer Substitutionsanalyse unterzogen, wobei jede Aminosäure eines Epitops durch jede einzelne der 20 natürlich vorkommenden Aminosäuren ersetzt wurde. Mit Hilfe der daraus resultierenden individuellen Erkennungsmotive (Supertope) der Hybridome wurde in öffentlichen Proteindatenbanken nach Peptiden gesucht, die von OspA-spezifischen T-Zellen kreuzerkannt werden. Eine Suche nach sequenzhomologen Peptiden in den Datenbanken wurde gleichzeitig durchgeführt. Diese Untersuchungen sollten uns dazu verhelfen, die Hypothese der molekularen Mimikry im Hinblick auf Kreuzreaktivität zwischen OspA und erkannten Selbst-Peptiden zu stützen oder zu entkräften. Molekulare Mimikry beschreibt das Phänomen der Ähnlichkeit zwischen Erreger- und Selbstantigenen und geht von der Hypothese aus, dass im Verlauf einer Infektion durch kreuzreaktive Erkennung von Erreger- und Selbstantigen eine Autoimmunreaktion ausgelöst wird. Die Datenbanksuchen ergaben 387 Supertop-definierte Peptide, von denen 13 sowie 88 sequenzhomologe Peptide, von denen 3 kreuzerkannt wurden. Die niedrige Erkennungsrate wurde durch Effekte von Vielfachsubstitutionen erklärt. Die Beobachtungen, dass viele der identifizierten Peptide durch Sequenzhomologie-Suche nicht gefunden worden wären und daß in einigen Fällen geringe Übereinstimmungen der Selbstpeptide mit den Hybridom-Supertopen herrschte, ließ vermuten, dass mit den verwendeten Methoden das Ausmaß von Kreuzreaktivität unterschätzt wird und dass Kreuzreaktivität auf Einzelzellebene ein häufiger und meist nicht zur Immunpathologie führender Prozeß ist. Abschließend wurde diskutiert, inwieweit molekulare Mimikry durch niedrig-affine T-Zell-Rezeptor-Peptid-MHC (TZR-pMHC)-Interaktionen zur Immunhomöostase beitragen und unter welchen Bedingungen (rezidivierende Infektionen, professionelle antigenpräsentierende Zellen) zur Aktivierung autoreaktiver T-Zellen führen könnte. Ausblickend wurde auf protektive Wirkungen durch molekulare Mimikry hingewiesen.

Autoimmunität

Kreuzreaktivität

Molekulare Mimikry

T-Zell-Rezeptor-Peptid-MHC (TZR-pMHC)-Bindung

Cross-reactive peptide ligands for OspA-specific HLA-DR4-restricted T-cells

In this thesis HLA-DR4-restricted T-cell responses against the Outer surface protein A (OspA) of *Borrelia burgdorferi* were characterized. We wished to identify self-antigens that are cross-recognized by OspA-specific HLA-DR4-restricted T-Lymphocytes. With the help of OspA-specific T-cell hybridomas three immunodominant epitopes within the OspA-molecule were examined for cross-reactivity. Therefore we analysed these epitopes of 12 amino-acids length by substitution analysis where each single amino acid of an epitope was replaced by every of the 20 naturally occurring amino acids. With the help of the resulting individual hybridoma's binding motifs (supertopes) we searched public protein-databases for peptides that could be cross-recognized by OspA-specific T-cells. At the same time we screened the databases for self-peptides with sequence-homology. These investigations should enable us to strengthen or weaken the hypothesis of molecular mimicry according to cross-reactivity between OspA and recognized self-peptides. The term molecular mimicry describes the similarity between microbial- and self-antigen and aims the hypothesis that during an infection an autoimmune response is elicited by cross-recognition of the microbial- and self-antigen. The protein-database screenings yielded 387 supertope-defined peptides of which 13 peptides were recognized as well as 3 recognized peptides out of 88 peptides from sequence-homology searchings. This low output was explained due to multiple-substitution effects. The observations that most of the identified peptides wouldn't have been found by sequence-homology search alone and that significant differences between the self-peptides and the hybridoma's supertopes occurred led to the presumptions that the mentioned methods underestimate cross-reactivity and that cross-reactivity at the T-cell-level is a frequent event rarely followed by autoimmunity. In conclusion, it was discussed to what extent molecular mimicry contributes to immune homeostasis by low-affinity-interactions in T-Cell-Receptor-Peptide-MHC (TCR-pMHC)-binding and under which circumstances it may lead to the activation of autoreactive T-cells (recurrent infections, professional antigen-presenting cells). At least a glance was made upon the protective consequences by molecular mimicry.

Autoimmunity

Cross-reactivity

Molecular Mimicry

T-Cell-Receptor-Peptide-MHC (TCR-pMHC)-Binding

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|---|----|
| 1. | Einführung | 8 |
| 1.1 | Autoimmunität - eine allgemeine Betrachtung | 8 |
| 1.2 | Träger der angeborenen und adaptiven Immunabwehr | 9 |
| 1.3 | T-Lymphozyten im Immunsystem | 9 |
| 1.3.1 | Der T-Zell-Rezeptor und Antigenerkennung | 10 |
| 1.3.2 | T-Zellaktivierung | 11 |
| 1.4 | MHC und Antigenerkennung | 13 |
| 1.5 | TZR-pMHC-Bindungskomplex | 13 |
| 1.6 | Lyme Borreliose - der Erreger | 16 |
| 1.6.1 | Lyme Borreliose - klinische Manifestationen | 17 |
| 1.6.2 | Immunantwort auf <i>Borrelia burgdorferi</i> | 18 |
| 1.6.3 | Therapie der Lyme Borreliose | 18 |
| 1.6.4 | Prävention der Lyme Borreliose | 19 |
| 1.6.5 | Persistenz von <i>Borrelia burgdorferi</i> | 19 |
| 1.7 | Die Hypothese der infektinduzierten Immunpathologie | 20 |
| 1.7.1 | Molekulare Mimikry - Begriff und immunologischer Mechanismus | 20 |
| 1.7.2 | Bedingungen zur Entstehung von Autoimmunität durch molekulare Mimikry | 22 |
| 1.8 | Immunologische Toleranz - zentral und peripher | 22 |
| 1.8.1 | Klonale Deletion | 23 |
| 1.8.2 | Anergie | 23 |
| 1.8.3 | Ignoranz | 24 |
| 1.8.4 | Immundeavation | 25 |
| 1.8.5 | Hemmende Rezeptoren | 25 |
| 1.8.6 | Verlust der T-Zell Toleranz | 25 |
| 1.8.7 | Von der Infektion zur Autoimmunität | 26 |
| 1.9 | Kreuzreaktivität und Entwicklung eines transgenen Mausmodells | 26 |
| 1.9.1 | OspA und potentiell kreuzreaktive Selbstpeptide | 27 |
| 1.9.2 | Ziele der vorliegenden Arbeit | 27 |
| 2 | Material und Methoden | 29 |
| 2.1 | Material | 29 |
| 2.1.1 | Chemikalien, Lösungen und Puffer | 29 |
| 2.1.2 | Zellkulturmedien und Seren | 30 |

| | | |
|---------|---|----|
| 2.1.3 | Zelllinien | 30 |
| 2.1.4 | Versuchstiere | 30 |
| 2.1.5 | Rekombinante Proteine und Peptide | 31 |
| 2.1.6 | Antikörper | 32 |
| 2.2 | Methoden | 32 |
| 2.2.1 | Kultur von Hybridomzellen | 32 |
| 2.2.2 | Einfrieren von Hybridomzellen | 32 |
| 2.2.3 | Auftauen von Hybridomzellen | 32 |
| 2.2.4 | Zählen von Hybridomzellen | 33 |
| 2.2.5 | Bestrahlung von antigenpräsentierenden Zellen | 33 |
| 2.2.6 | Kultivierung der CTLL-2 Zelllinien | 33 |
| 2.2.7 | Herstellung der Hybridomzellen | 33 |
| 2.2.8 | Klonierung der Hybridomzellen | 34 |
| 2.2.9 | Kontrolle der Zuchtmäuse auf die Expression von HLA-DR4/huCD4 | 34 |
| 2.3 | Probenvorbereitung | 35 |
| 2.3.1 | Antigenerkennung durch die klonierten Hybridome im Testansatz | 35 |
| 2.4 | Analytische Methoden | 35 |
| 2.4.1 | Enzym-gekoppelter Immunnachweis (ELISA) | 35 |
| 2.4.1.1 | Europium-basierte Detektion | 35 |
| 2.4.1.2 | Peroxidase-basierte Detektion | 36 |
| 2.4.1.3 | Auswertung der ELISA-Meßwerte | 36 |
| 2.5 | CTLL-2 Zelllinien | 36 |
| 2.5.1 | Zytokinbestimmung und Proliferationsmessung | 37 |
| 2.6 | Statistik | 37 |
| 2.7 | Datenbanksuche und Peptidsynthese | 38 |
| 2.8 | Strukturmodellierung nach dem ICM-Programm | 38 |
| 3 | Ergebnisse | 39 |
| 3.1 | Verkürzungsanalysen OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifischer Hybridome -Vorergebnisse | 39 |
| 3.1.1 | Identifizierung der 4 immundominanten Epitope im OspA-Molekül | 39 |
| 3.1.2 | OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifische Hybridome in der Verkürzungsanalyse | 39 |
| 3.1.3 | Verkürzungsanalyse: Hybridom 376/5 | 40 |
| 3.1.4 | Verkürzungsanalyse: Hybridom 170/1 | 42 |
| 3.2 | Minimalepitope nach Verkürzungsanalysen OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifischer Hybridome | 43 |
| 3.3 | Substitutionsanalysen und Supertope OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifischer Hybridome | 44 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.3.1 | OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifische Hybridome 170/1 und 376/5 | 44 |
| 3.4 | Substitutionsanalysen und Supertope OspA ₁₄₅₋₁₅₆ -spezifischer Hybridome | 47 |
| 3.4.1 | OspA ₁₄₅₋₁₅₆ -spezifische Hybridome 149/40 und 219/1 | 47 |
| 3.5 | Substitutionsanalysen und Supertope OspA ₁₄₉₋₁₆₀ -spezifischer Hybridome | 49 |
| 3.5.1 | OspA ₁₄₉₋₁₆₀ -spezifische Hybridome 29/1 und 8/2 | 50 |
| 3.6 | Auflistung der definierten Supertope für OspA ₁₆₄₋₁₇₅ , OspA ₁₄₉₋₁₆₀ , OspA ₁₄₅₋₁₅₆ | 52 |
| 3.7 | Identifikation der Selbstpeptide (Mimikry-Peptide) | 52 |
| 3.7.1 | Identifizierte Selbstpeptide für OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifische Hybridome | 52 |
| 3.7.2 | Durch Sequenzhomologie-Suche identifizierte Selbstpeptide: OspA ₁₆₄₋₁₇₅ | 53 |
| 3.7.3 | Durch Supertop-Suche identifizierte Selbst-Peptide: OspA ₁₆₄₋₁₇₅ | 55 |
| 3.8 | Selbstpeptide aktivieren OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifische Hybridome dosisabhängig | 57 |
| 3.8.1 | Dosisabhängige Aktivierung der Hybridome 257/4, 170/6 und 26/1 | 58 |
| 3.9 | Verkürzungsanalysen vor Modellierung OspA ₁₆₄₋₁₇₅ -spezifischer Hybridome | 61 |
| 3.9.1 | Modellierung zur Bestimmung der DRB1*0401-Bindungsepitope | 64 |
| 4 | Diskussion | 66 |
| 4.1 | Aussagen zu den bisherigen Befunden | 66 |
| 4.1.1 | Identifizierung der kreuzreagierenden Selbstantigene | 66 |
| 4.2 | Strukturelle Kriterien zur kreuzreaktiven Peptiderkennung OspA-spezifischer T-Zellen | 67 |
| 4.3 | Randomisierte Peptidbibliotheken | 70 |
| 4.4 | Rolle von TZR- und pMHC-Interaktionen in der Peptiderkennung | 72 |
| 4.5 | TZR- und pMHC-Kontaktpunkte und Häufigkeit von T-Zell-Kreuzreaktivität | 72 |
| 4.6 | Konsequenz der T-Zell-Kreuzreaktivität für die molekulare Mimikry-Hypothese | 73 |
| 4.7 | Rezidivierende Infektionen in der Pathogenese von Autoimmunität | 75 |
| 4.8 | Rolle von niedrig-affinen Wechselwirkungen und Erweiterung der molekularen Mimikry-Hypothese um protektive Aspekte | 79 |
| 5 | Zusammenfassung | 81 |
| 6 | Abkürzungen | 82 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 84 |
| 8 | Anhang | 96 |
| 8.1 | Tabelle zu den Abkürzungen und Molekulargewichten für Aminosäuren | 96 |