

**Aus der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin
Tübingen**

**Abteilung Kinderheilkunde I mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. D. Niethammer**

**Definition des HLA-DQ4-Bindungsmotivs
mittels kombinatorischer Peptidbibliotheken**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Thomas Volz
aus
Villingen-Schwenningen**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Dannecker

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Müller

*Meinen Eltern
Yvonne
Andreas und Steffi*

1	Abkürzungsverzeichnis	4
2	Einleitung	7
2.1	Das Immunsystem.....	7
2.2	Der Haupthistokompatibilitätskomplex.....	9
2.3	Struktur der MHC-Moleküle	10
2.3.1	Struktur von MHC-Klasse-I-Molekülen	10
2.3.2	Struktur von MHC-Klasse-II-Molekülen.....	11
2.4	Allelischer Polymorphismus des MHC.....	13
2.5	Bindung von Peptiden an MHC-Moleküle	13
2.5.1	Eigenschaften von MHC-Klasse-I gebundenen Peptiden	13
2.5.2	Eigenschaften von MHC-Klasse-II gebundenen Peptiden	14
2.6	Aufnahme von Antigenen.....	15
2.7	Antigenprozessierung und Präsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle.....	15
2.8	Autoimmunerkrankungen und HLA-Assoziation.....	17
2.9	Juvenile idiopathische Arthritis	19
2.10	Zielsetzung der Arbeit.....	22
3	Material und Methoden	24
3.1	Material.....	24
3.1.1	Zelllinien.....	24
3.1.1.1	EBV-transformierte B-Zelllinie BM9	24
3.1.1.2	Hybridomzelllinie Tü22.....	24
3.1.2	Geräte	25
3.1.3	Chemikalien und Reagenzien	26
3.1.4	Antikörper.....	27
3.1.5	Verbrauchsmaterialien	27

3.2	Methoden	28
3.2.1	Zellbiologische Techniken	28
3.2.1.1	Kultivierung der B-LCL BM9.....	28
3.2.1.2	Zellernte	29
3.2.1.3	Kultivierung der Hybridomzelllinie Tü22.....	29
3.2.1.4	Subklonierung von Tü22-Hybridomen.....	29
3.2.1.5	Gewinnung des Hybridomzellüberstandes.....	30
3.2.1.6	Kryokonservierung von Zellen.....	30
3.2.1.7	Nachweiß der HLA-DQ-Expression mittels FACS.....	30
3.2.2	Biochemische Techniken	31
3.2.2.1	Aufreinigung des mAb Tü22 mittels Protein A Sepharose ...	31
3.2.2.2	Isolierung von HLA-DQ-Molekülen.....	31
3.2.2.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	33
3.2.2.4	Coomassie-Färbung	34
3.2.2.5	Proteinkonzentrationsbestimmung.....	34
3.2.2.6	Europium-Immunofluoreszenz-Assay	34
3.2.2.7	Nachweis der Antikörperproduktion von Hybridomzellen.....	35
3.2.3	Peptide und Peptidbibliotheken.....	36
3.2.3.1	Aufbau einer Peptidbibliothek im Positional Scan Format....	36
3.2.3.2	Synthese einer acetylierten Nonapeptidbibliothek	37
3.2.3.3	Synthese von acetylierten Peptidamiden und N-terminal biotinylierten Peptiden.....	38
4	Ergebnisse	39
4.1	Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers Tü22	39
4.2	Expression von HLA-DQ4 auf BM9-Zellen	40
4.3	Isolierung von HLA-DQ4 Molekülen	41
4.4	Bindungs- und Kompetitionsassay-Vorversuche	41
4.4.1	Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4	42
4.4.2	pH-Abhängigkeit der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA- DQ4.....	43

4.4.3	Kompetition der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 durch CLIP (105-117)	44
4.4.4	Kompetition der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 durch die X ₉ -Teilbibliothek	45
4.5	Kompetitionsassays zur Motivbestimmung.....	46
4.5.1	Position 1	47
4.5.2	Position 2	48
4.5.3	Position 3	50
4.5.4	Position 4	52
4.5.5	Position 5	54
4.5.6	Position 6	56
4.5.7	Position 7	58
4.5.8	Position 8	60
4.5.9	Position 9	62
4.6	Kompetitionsassays mit definierten Nonapeptiden	63
5	Diskussion	68
5.1	Wahl der Methodik	68
5.2	Ermittlung der optimalen Assay-Parameter.....	71
5.2.1	Bindung von CLIP (105-117) an HLA-DQ4	71
5.2.2	pH-Abhängigkeit der Bindung von CLIP (105-117) an HLA-DQ4	71
5.3	Bindungsspezifität von HLA-DQ4	72
5.4	Identifikation von Liganden an HLA-DQ4.....	82
6	Zusammenfassung.....	84
7	Literaturverzeichnis	85
8	Danksagung.....	97
9	Lebenslauf	98

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
APC	antigenpräsentierende Zelle
BCR	B-Zellrezeptor
BSA	Rinderserumalbumin
CD	„cluster of differentiation“ (engl.)
CLIP	„class II associated invariant chain peptides“ (engl.)
DIEA	Diisopropylethylamin
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“ (engl.)
engl.	englisch
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
FACS	„fluorescence activated cell sorter/scanner“ (engl.)
FCS	Fötales Kälberserum (engl. „fetal calf serum“)
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
Fmoc	9-Fluorenyl-methoxycarbonyl
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HLA	„human leukocyte antigen“ (engl.)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“ (engl.)
HPSEC	„High Performance Size Exclusion Chromatography“ (engl.)
IE	internationale Einheit
IgG	Immunglobulin G
li	invariante Kette (engl. „invariant chain“)
kDa	Kilodalton
mA	Milliampere
MHC	„major histocompatibility complex“ (engl.)

min	Minute
MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
n.u.	nicht untersucht
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“ (engl.)
PE	Phycoerythrin
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl. „rotations per minute“)
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBTU	Benzotriazol-1-yl-oxy-tetramethyluronium-tetrafluoroborat
tBu	tert.-Butyl
TCR	T-Zell-Rezeptor
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
W	Watt
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent

Der Einbuchstabencode der Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Die Evolution hat im Laufe mehrerer hundert Millionen Jahre komplexe und leistungsfähige Abwehrmechanismen in Gestalt des Immunsystems geschaffen. Dessen Aufgabe ist es, den Mensch sowohl vor schädigenden Einflüssen aus der Umwelt in Form von Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen als auch vor körpereigenen Angriffen durch maligne Zellen zu schützen, die den Fortbestand des Individuums bedrohen.

Durch fortwährende Weiterentwicklung des Immunsystems war es möglich, den Organismus trotz der vielfältigen Angriffe zu erhalten. Dabei musste immer gewährleistet sein, dass schädigende Einflüsse abgewehrt, körpereigene Strukturen aber nicht angegriffen wurden - das Immunsystem also selbsttolerant ist.

Erst durch das Zusammenspiel verschiedener Komponenten ist das Immunsystem in der Lage, eine möglichst fein regulierte Balance zwischen Selbsttoleranz und Abwehr zu gewährleisten. Diese Selbsttoleranz ist zum Beispiel bei Autoimmunerkrankungen nicht mehr gegeben. Funktioniert dieser Mechanismus hingegen zu gut, besteht die Gefahr, dass z. B. Tumore nicht als entartet erkannt und bekämpft werden.

Die als angeborene oder unspezifisch bezeichnete Immunität ist der entwicklungsgeschichtlich ältere Teil des Immunsystems. Dazu zählt die Säurebarriere der Haut, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme, aber auch zelluläre Komponenten wie Granulozyten, das Monozyten-Makrophagensystem und die natürlichen Killerzellen. Gemeinsam ist allen Komponenten, dass sie unabhängig vom eingedrungenen Erreger in Aktion treten.

Das spezifische oder adaptive Immunsystem stellt hingegen einen hochspezialisierten Mechanismus dar, der zielgerichtet agieren kann. Grundlage dafür ist eine Wechselwirkung zwischen einem Lymphozyten und einer antigenpräsentierenden Zelle. Die Lymphozyten lassen sich in B- und T-Lymphozyten unterscheiden. B-Lymphozyten vermitteln die humorale Immunantwort, wohingegen T-Lymphozyten für die zelluläre Komponente verantwortlich sind.

B-Lymphozyten besitzen den B-Zellrezeptor (BCR), der eine membranständige Variante der Immunglobuline ist. Durch somatische Rekombination während der Reifung im Knochenmark werden bis zu 10^{11} verschiedene Spezifitäten ausgebildet (Davis & Bjorkman, 1988). Nach Bindung eines spezifischen Antigens an den BCR wird der BCR-Antigen-Komplex endozytotisch aufgenommen, das Antigen prozessiert und daraus gewonnene Peptidfragmente mit einem Klasse-II-Molekül des Haupthistokompatibilitätskomplexes präsentiert.

Nach Erkennung durch eine T-Zelle schüttet diese bestimmte Zytokine aus, die die B-Zelle zum einen zur klonalen Expansion veranlassen, zum anderen auch eine Umwandlung in antikörpersezernierende Plasmazellen bewirken. Dieser Vorgang wird auch als klonale Selektion bezeichnet. Ein Teil der B-Zellen reift nicht zu Plasmazellen heran sondern entwickelt sich zu Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit einem Pathogen rasch proliferieren und sich differenzieren können, wodurch eine schnelle sekundäre Immunantwort erfolgen kann. Diese Eigenschaft wird auch als immunologisches Gedächtnis bezeichnet.

T-Zellen reifen im Thymus und können aufgrund ihres T-Zell-Rezeptors (TCR) charakterisiert werden. Wie beim BCR entstehen durch Rekombination bis zu 10^{18} verschiedene TCR-Formen (Davis & Bjorkman, 1988). Der TCR erkennt nur Antigene, die im Komplex mit MHC-Molekülen auftreten, was als MHC-Restriktion bezeichnet wird (Zinkernagel & Doherty, 1974). T-Zellen können anhand zweier Oberflächenmarker weiter unterteilt werden. Zum einen gibt es zytotoxische T-Zellen, die auch als $CD8^+$ -T-Zellen bezeichnet werden, da sie

den Marker CD8 tragen. Sie erkennen MHC-Klasse-I-Antigenkomplexe und spielen bei der Bekämpfung virusinfizierter und entarteter Körperzellen eine Rolle. Zum anderen lassen sich T-Helferzellen, auch als CD4⁺-Zellen bezeichnet, unterscheiden. Ihre Aufgabe ist die Erkennung von MHC-Klasse-II-Antigenkomplexen und die entsprechende Aktivierung der präsentierenden APC.

2.2 Der Haupthistokompatibilitätskomplex

Die Haupthistokompatibilitätsantigene werden durch einen DNA-Abschnitt kodiert, der beim Menschen auf dem kurzen Arm des Chromosom 6 (6p21.31) lokalisiert ist. Eine Ausnahme bildet das β_2 -Mikroglobulin, das von Chromosom 15 codiert wird. Die Region der Haupthistokompatibilitätsantigene wird auch als HLA-Komplex bezeichnet, da die dort kodierten Proteine zuerst auf Leukozyten gefunden und "Humane Leukozyten Antigene" (HLA) genannt wurden. Ihre immunologische Bedeutung wurde erst später im Rahmen von Transplantatabstoßungen bei Gewebetransplantationen entdeckt (Ceppellini et al., 1969).

Innerhalb des HLA-Komplexes werden die HLA-Klasse I, -II, -III Genregionen unterschieden, welche wiederum in Subregionen unterteilt werden können.

MHC-Klasse-I-Antigene werden auf der Oberfläche fast aller kernhaltigen Zellen exprimiert. Ihre Aufgabe ist es, endogene Peptide aus intrazellulären Proteinen CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten zu präsentieren. Die klassischen MHC-I-Antigene werden beim Menschen von den Genloci HLA-A, -B und -C kodiert.

MHC-Klasse-II-Antigene werden dagegen nur auf sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APC) exprimiert. Dazu gehören B-Lymphozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhanszellen der Haut, bestimmte Gliazellen, sowie Thymusepithelzellen. Die Hauptaufgabe der MHC-Klasse-II-Antigene besteht in der Präsentation von Peptiden gegenüber CD4⁺ T-Helferzellen. Diese Peptide stammen in der Regel aus exogenen endozytotisch aufgenommenen Proteinen, allerdings besteht auch die

der Struktur des konstanten Teils der Immunglobuline hat (Bjorkman et al., 1987).

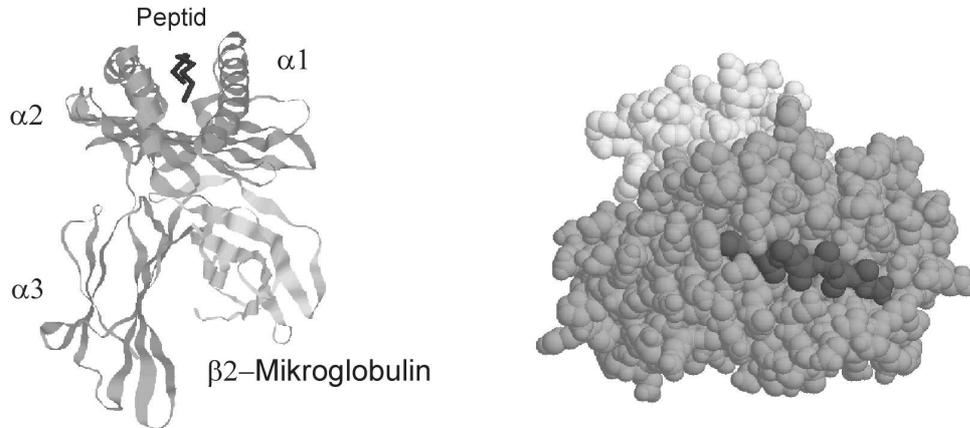


Abbildung 2: Kristallstruktur des HLA-A2-Moleküls mit gebundenem Peptidliganden
 Links: Darstellung als Ribbon-Diagramm in Frontalansicht
 Rechts: Sicht auf die Peptidbindungsgrube
 nach Bjorkman et al., 1987

2.3.2 Struktur von MHC-Klasse-II-Molekülen

MHC-Klasse-II-Moleküle sind heterodimere Transmembranglykoproteine, die sich aus einer α -Kette (33-35 kDa) und einer β -Kette (26-28 kDa) zusammensetzen. Beide Ketten sind nicht kovalent miteinander verbunden (Shackelford et al., 1982). Jede Kette kann in vier Domänen unterteilt werden: dem C-terminalen zytoplasmatischen Teil, der Transmembranregion sowie dem extrazellulär gelegenen N-terminalen Teil, mit den α_1 - und α_2 -Domänen der α -Kette bzw. den β_1 - und β_2 -Domänen der β -Kette.

Der C-terminale zytoplasmatische Teil ist in seiner Länge variabel (12-15 Aminosäuren) und enthält viele geladene und hydrophile Aminosäuren. Eine für Transmembranregionen charakteristische Anhäufung positiv geladener Aminosäuren verbindet diese mit dem zytoplasmatischen Teil. Dies ermöglicht die Interaktion mit den negativ geladenen Phospholipiden der Zellmembran. Die hydrophobe Transmembranregion ist mit den extrazellulären Domänen über einen Abschnitt von 11-13 hydrophilen Aminosäuren verbunden (in der α -Kette vor allem Glutamat und Prolin, in der β -Kette vorwiegend Serin).

Jede der membranah gelegenen α_2 - und β_2 -Domänen weist eine von einer Disulfidbrücke gebildete, 56 Aminosäuren umfassende, Schleife auf. Die 95 Aminosäuren umfassende Sequenz dieser Domänen ist weitgehend konserviert und zeigt wie die α_3 -Domäne und das β_2 -Mikroglobulin der MHC-Klasse-I-Moleküle eine β -Faltblatt-Immunglobulin-Supersekundärstruktur (Kaufman et al., 1984).

In den membranfernen α_1 - und β_1 -Domänen entsteht lediglich in der β_1 -Domäne über eine Disulfidbrücke eine 64 Aminosäuren lange Schleife.

Diese beiden Domänen bilden zusammen die Peptidbindungsgrube, die aus acht antiparallelen β -Faltblattsträngen besteht und seitlich von je einer α -Helix begrenzt wird (Brown et al., 1993).

Ein wesentlicher Unterschied zu den MHC-Klasse-I-Molekülen besteht darin, dass die α -Helices einen größeren Abstand voneinander haben. Als Folge daraus können gebundene Peptide über beide Enden der Bindungsgrube hinausragen (Stern et al., 1994).

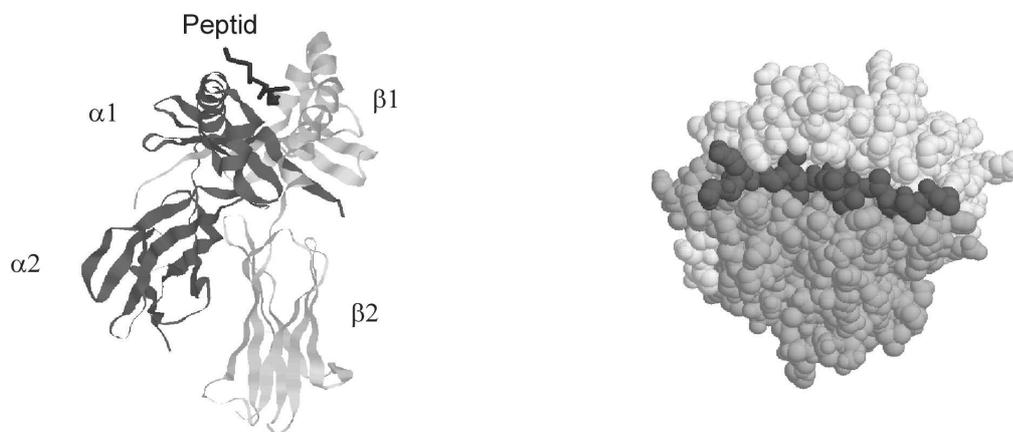


Abbildung 3: Kristallstruktur des HLA-DQ8-Moleküls mit gebundenem Peptidliganden
 Links: Frontalansicht als Ribbon-Diagramm
 Rechts: Sicht auf die Peptidbindungsgrube
 nach Lee et al., 2001

2.4 Allelischer Polymorphismus des MHC

Die Gene des Haupthistokompatibilitätskomplexes zeichnen sich durch einen extrem hohen Polymorphismus aus. Im Januar 2003 wurden für HLA-A 266, für HLA-B 511 und für HLA-C 128 verschiedene Allele angegeben. Bei den MHC-Klasse-II-Antigenen wurden 3 DR α -, 403 DR β -, 23 DQ α -, 53 DQ β -, 20 DP α - und 101 DP β -Allele beschrieben (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/>).

Genauere Untersuchungen über die Lokalisation der Diversität in der Nukleotidsequenz zeigen bei den MHC-Klasse-I-Genen die höchste Variabilität in der α_1 und α_2 Region, sowie bei den MHC-Klasse-II-Genen in der β_1 Region (Marsh, 1998). Die von diesen Exons kodierten Domänen bilden, wie bereits beschrieben, die Peptidbindungsgrube.

2.5 Bindung von Peptiden an MHC-Moleküle

2.5.1 Eigenschaften von MHC-Klasse-I gebundenen Peptiden

Peptide, die von MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden, müssen bestimmte Voraussetzungen erfüllen, um eine stabile Bindung aufzuweisen. Diese Peptide sind in der Regel 9, seltener 8-11 Aminosäuren lang und liegen in gestreckter Konformation in der Bindungsgrube (Falk et al., 1991). Der Carboxy- und Aminoterminus des Peptids binden über H-Brücken an hoch konservierte Seitenketten des MHC-Moleküls und stabilisieren dadurch den Komplex (Madden et al., 1992). Peptide, die mehr als 9 Aminosäuren aufweisen, können aufgrund der geschlossenen Bindungsgrube nicht überstehen, sondern zeigen eine Wölbung in der Mitte des Peptids bei gleichzeitig bestehender C- und N-terminaler Fixierung (Guo et al., 1992).

Eine allelspezifische Bindung von Peptiden wird durch sogenannte Ankeraminosäuren vermittelt. Dabei interagieren Seitenketten des gebundenen Peptids mit den polymorphen Bindungstaschen des MHC-Moleküls. Eine Ankeraminosäure befindet sich am Carboxyterminus, die im allgemeinen

hydrophob oder positiv geladen ist (Rammensee, 1995). Eine weitere Ankerposition findet sich je nach Allel im Verlauf der Sequenz. Die Aminosäuren an den Ankerpositionen weisen in der Regel ähnliche physikochemische Eigenschaften auf (Engelhard, 1994; Rammensee, 1995). Da die Position und Spezifität der Bindungstaschen des MHC-Moleküls unter den verschiedenen Allelen variiert, weißt jedes Allel eine eigene Peptidspezifität auf (Falk et al., 1991). Somit kann aus den Bindungseigenschaften MHC-gebundener Peptide ein sogenanntes Bindungsmotiv für das entsprechende Allel erstellt werden (Rammensee et al., 1995).

2.5.2 Eigenschaften von MHC-Klasse-II gebundenen Peptiden

Die Bindung von Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle zeigt einige Unterschiede im Vergleich zur Interaktion von Peptiden mit MHC-Klasse-I-Molekülen.

Die an beiden Enden offene Bindungsgrube der MHC-Klasse-II-Moleküle erlaubt gebundenen Peptiden N- und C-terminal überstehen zu können (Brown et al., 1993). Dies erklärt die Tatsache, dass die gefundenen Peptide in ihrer Länge deutlich variieren. So konnten Peptide mit einer Länge zwischen 12 und 25 Aminosäuren identifiziert werden (Chicz et al., 1992). Ein 9 Aminosäuren langer Abschnitt des Peptids befindet sich in einer gestreckten, Polyprolin-II-helixartigen Konformation in der Bindungsgrube (Jardetzky et al., 1996).

Die Stabilisierung des MHC-Peptidkomplexes erfolgt zum einen über ein Netzwerk von Wasserstoff-Brückenbindungen, die sich entlang der Bindungsgrube zwischen dem Peptidrückgrat und hochkonservierten Seitenketten des MHC-Moleküls ausbilden. Zum anderen kommt es ähnlich wie bei Klasse-I-Molekülen zu Interaktionen zwischen Peptidseitenketten und Bindungstaschen des MHC-Klasse-II-Moleküls (Stern et al., 1994).

Die Anzahl dieser Bindungstaschen variiert unter den einzelnen Allelen zwischen drei und fünf (Stern et al., 1994; Lee et al., 2001). Diese Taschen sind in ihrer Spezifität weitaus weniger restriktiv als bei Klasse-I-Molekülen, d.h. es

können meist mehrere Aminosäuren, mit oftmals ähnlichen chemischen Eigenschaften, in die entsprechende Tasche binden.

Trotz dieses hohen Grades an Degeneriertheit in der Peptid-MHC-Wechselwirkung können allelspezifische Bindungsmotive bestimmt werden (Rammensee et al., 1995).

2.6 Aufnahme von Antigenen

Exogene Antigene können von APCs über verschiedene Wege internalisiert werden: durch rezeptorvermittelte Endozytose (B-Lymphozyten, Makrophagen), Pinozytose, Makropinozytose (dendritische Zellen) oder wie bei Makrophagen durch Phagozytose (Watts, 1997).

Die rezeptorvermittelte Endozytose über B-Zellrezeptoren (Lanzavecchia, 1985) oder F_c-Rezeptoren (Celis et al., 1984) stellt dabei eine besonders effiziente Möglichkeit der Antigenaufnahme dar (Lorenz et al., 1990). Antigen-spezifische B-Zellen können im Gegensatz zu unspezifischen B-Lymphozyten auch bei 1.000–10.000fach niedrigerer Antigenkonzentration im Serum noch T-Zell-Epitope präsentieren (Lanzavecchia, 1985).

Auch die direkte Bindung von Peptidantigenen an membranständige MHC-Klasse-II-Moleküle mit nachfolgender Internalisierung ist beschrieben worden (Gosselin & Parker, 1990; Pinet et al., 1995). Dieser Weg dürfte allerdings eine Ausnahme darstellen, konnte aber für die Präsentation des basischen Myelinproteins durch HLA-DR gezeigt werden (Vergelli et al., 1997).

2.7 Antigenprozessierung und Präsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle

Die Synthese der beiden Ketten des MHC-Klasse-II-Moleküls erfolgt am rauen endoplasmatischen Reticulum. Dort treten sie mit einem weiteren Transmembranprotein, der invarianten Kette (Ii, CD74), in Kontakt. Die invariante Kette wird im Widerspruch zu ihrem Namen allerdings in mehreren

verschiedenen Isoformen exprimiert (Strubin et al., 1986). Beim Menschen lassen sich die 4 Isoformen p33, p35, p41 und p43 anhand ihres Molekulargewichtes unterscheiden (Cresswell, 1992; Cresswell, 1996).

Zunächst bildet die Ii ein Trimer, an das sich schrittweise 3 $\alpha\beta$ -Heterodimere anlagern (Lamb & Cresswell, 1992). Dadurch entsteht ein $Ii_3\alpha_3\beta_3$ -Nonamer (Roche et al., 1991). Die Ii bindet dabei an die $\alpha\beta$ -Dimere über die sogenannte CLIP-Region, die sich in der Peptidbindungsgrube befindet (Ghosh et al., 1995). Dies verhindert die vorzeitige Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle (Roche & Cresswell, 1990; Teyton et al., 1990). Des Weiteren enthält die Ii an ihrem N-terminalen Abschnitt Sortierungssignale, die die $Ii_3\alpha_3\beta_3$ -Nonamere in endosomale Kompartimente dirigieren (Lotteau et al., 1990; Bakke & Dobberstein, 1990). Dort erfolgt ein schrittweiser proteolytischer Abbau der invarianten Kette (Nakagawa & Rudensky, 1999; Villadangos et al., 1999). Interessanterweise sind die daran beteiligten Proteasen stellenweise zelltypspezifisch. So ist für die Generierung von CLIP in peripheren APCs Cathepsin S zuständig (Riese et al., 1996), wohingegen in Epithelzellen des Thymus diese Funktion von Cathepsin V übernommen wird (Brömme et al., 1999).

Der Austausch von CLIP gegen antigene Peptide wird durch HLA-DM realisiert. Dabei handelt es sich um ein Heterodimer, welches aus einer α -Kette (33-35 kDa) und einer β -Kette (30-31 kDa) besteht (Denzin et al., 1994). HLA-DM weist Strukturähnlichkeiten mit den antigenpräsentierenden MHC-Klasse-II-Molekülen auf, kann aber selbst keine Peptide binden (Mosyak et al., 1998). Der Transport in endosomale Kompartimente geschieht mit Hilfe eines Sortierungssignals im zytoplasmatischen Teil der β -Kette, welches ein Tyrosin-Motiv enthält (Lindstedt et al., 1995; Marks et al., 1995). Dort bindet HLA-DM an wenig stabile MHC-Peptidkomplexe, wie z.B. MHC-CLIP, und bewirkt einen Austausch mit antigenen Peptiden, die eine stabilere Konformation aufweisen. Deshalb wird HLA-DM auch als Peptideditor bezeichnet.

Die Funktion von HLA-DM wird durch ein weiteres Molekül, HLA-DO, reguliert (Jensen, 1998). HLA-DO besteht aus der HLA-DN α -Kette und der HLA-DO β -Kette und konnte in Thymusepithelzellen und B-Zellen gefunden werden

(Douek & Altmann, 1997). HLA-DO beeinflusst die Aktivität von HLA-DM, indem es dessen Funktion inhibiert (Denzin et al., 1997; van Ham et al., 1997).

Der aus antigenem Peptid und MHC-Klasse-II bestehende Komplex wird dann zur Zelloberfläche gebracht, wo die Interaktion zwischen MHC-Molekül und TCR stattfindet.

2.8 Autoimmunerkrankungen und HLA-Assoziation

Die Fähigkeit des adaptiven Immunsystems auf pathogene Einflüsse zu reagieren ohne dabei körpereigene Strukturen anzugreifen, untersteht vielfältigen Kontrollmechanismen, die autoreaktive Immunantworten zu unterdrücken versuchen. Gelingt dies nicht, kann es zum Entstehen von Autoimmunerkrankungen kommen, von denen ca. 5% der Bevölkerung Europas und Nordamerikas betroffen sind (Sinha et al., 1990; Jacobson et al., 1997).

Die Klassifizierung von Autoimmunerkrankungen kann auf mehreren Wegen erfolgen: entweder in Hinsicht auf die Lokalisation der Schädigung, die organspezifisch oder aber systemisch sein kann. Beispiele für organspezifische Autoimmunerkrankungen sind Diabetes mellitus Typ 1 (IDDM), Myasthenia gravis, Morbus Basedow und Multiple Sklerose (MS). Zu den systemischen Autoimmunerkrankungen zählen unter anderem rheumatoide Arthritis (RA), Sklerodermie und der systemische Lupus erythematodes (SLE). Allerdings ist auch eine Klassifizierung aufgrund des Mechanismus' der Autoimmunantwort möglich: antikörpervermittelt bei SLE, Myasthenia gravis und Morbus Basedow bzw. T-Zell-vermittelt bei RA und IDDM.

Für fast alle Autoimmunerkrankungen konnte eine Assoziation mit bestimmten HLA-Allelen nachgewiesen werden. Dabei muss allerdings berücksichtigt werden, dass nicht alle Träger eines assoziierten HLA-Allels auch eine Autoimmunerkrankung entwickeln. Zwillingsstudien mit eineiigen Paaren zeigten, dass die Konkordanzrate weit unter 100% liegt, und von 5% bei MS zu 30% bei IDDM variiert (Rotter & Landaw, 1984). Deshalb ist auch

Umweltfaktoren eine nicht unerhebliche Rolle beizumessen. Auch die Tatsache, dass bestimmte Autoimmunerkrankungen eine Präferenz bezüglich des Geschlechts des Erkrankten aufweisen, zeigt, dass solche Erkrankungen eine multifaktorielle Genese haben können.

Nach welchen Mechanismen MHC-Moleküle in die Entstehung von Autoimmunerkrankungen involviert sein können, wird in verschiedenen Erklärungsmodellen diskutiert:

Molekulares Mimikry:

Strukturelle und/oder konformationelle Ähnlichkeiten zwischen einem Pathogen und einem Selbstpeptid können nach Präsentation durch MHC-Moleküle zu einer Aktivierung selbstreaktiver T-Zellen führen (Oldstone, 1987). Gestützt wird dieses Modell durch den Nachweis zahlreicher Homologien in der Sequenz von präsentierten Peptiden aus Selbstproteinen und Krankheitserregern. Auch die Tatsache, dass T-Zell Klone, die für basisches Myelinprotein spezifisch sind, mit viralen Peptiden aktiviert werden können, gibt weitere Hinweise für dieses Modell (Wucherpfennig & Strominger, 1995; Lang et al., 2002).

Konzept der sequestrierten Antigene:

Einige Gewebe des Körpers bleiben dem Immunsystem aufgrund von strukturellen Voraussetzungen verborgen. Eine Selbsttoleranz gegen dort präsentierte Selbstpeptide kann nach diesem Modell folglich nicht entwickelt werden. Die für diese Selbstpeptide spezifischen T-Zellen können deshalb der negativen Selektion im Thymus entkommen. Kommt es im Rahmen einer Verletzung oder einer Infektion im Rahmen eines Gewebeschadens zu einem Zusammenbruch dieser Barriere, werden diese verborgenen Antigene dem Immunsystem zugänglich, was eine Autoimmunantwort zur Folge haben kann (Nepom & Erlich, 1991).

Der Verlauf der T-Zell-Reifung im Thymus wird durch MHC-Moleküle über das Prinzip der klonalen Deletion maßgeblich beeinflusst (Kappler et al., 1987).

Dabei werden T-Zellen, die eine übermäßig starke Affinität zum MHC-Peptidkomplex haben, durch Apoptose eliminiert. Entkommen dabei autoreaktive T-Zellen der positiven und negativen Selektion im Thymus, können diese unter bestimmten Umständen aktiviert werden und autoimmune Reaktionen auslösen.

2.9 Juvenile idiopathische Arthritis

Der Begriff juvenile idiopathische Arthritis umfasst eine heterogene Gruppe rheumatischer Krankheitsbilder des Kindes- und Jugendalters. Die Unterteilung in einzelne Subtypen geschieht unter anderem aufgrund der Anzahl der befallenen Gelenke, des Alters des Kindes bei der Erstmanifestation, der Dauer der Arthritis und ist hinsichtlich Therapie, Komplikationen und Prognose wichtig. Allerdings wurden parallel von der European League against Rheumatism (EULAR) und des American College of Rheumatology (ACR) zwei verschiedene Klassifikationssysteme verwendet, die keine gemeinsame Terminologie aufwiesen. In den 90er Jahren wurde deshalb unter der International League of Associations for Rheumatology (ILAR) eine differenzierte einheitliche Terminologie entwickelt, die auch zu der Bezeichnung juvenile idiopathische Arthritis führte. Damit sollten die bisher gebräuchlichen Begriffe „juvenile rheumatoide Arthritis“ (ACR) und „juvenile chronische Arthritis“ (EULAR) ersetzt werden (Petty et al., 1998).

Bei den Formen mit oligoartikulärem Befall ist die frühkindliche Oligoarthritis am häufigsten. Sie ist definiert als eine chronische Arthritis mit einer Dauer von mindestens sechs Wochen, die vor dem 16. Lebensjahr, allerdings oft zwischen dem zweiten und dritten Lebensjahr, beginnt und in den ersten sechs Monaten nicht mehr als vier Gelenke affiziert.

Mit etwa 80% überwiegt bei den betroffenen Patienten eindeutig das weibliche Geschlecht.

Klinisch findet sich eine nicht traumatisch bedingte Schwellung und Erguss eines Gelenkes mit Überwärmung der darüber liegenden Haut und eine daraus resultierende schmerzhafteste Bewegungseinschränkung. Das Kniegelenk ist am

häufigsten betroffen, weniger häufig Sprung- und Ellenbogengelenke, selten die kleinen Fingergelenke und fast nie das Hüftgelenk (Sharma & Sherry, 1999). Durch das Auftreten der Erkrankung in einem Lebensabschnitt, in dem das Laufen gerade erst erlernt wurde, wird bei Befall der Gelenke der unteren Extremität die motorische Entwicklung des Kindes stark beeinträchtigt. Eine Hauptkomplikation stellt bei der frühkindlichen Oligoarthritis das Auftreten einer chronischen Iridozyklitis dar, die bei zu spätem Erkennen bis zur Erblindung führen kann.

Ätiologie und Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis sind unklar. Sie wird als Autoimmunerkrankung angesehen, die auf genetisch determinierter Basis durch exogene Faktoren ausgelöst wird.

Die genetischen Faktoren bzw. Gen-Polymorphismen, die mit der Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis in Verbindung gebracht werden, sind so zahlreich, dass von einem komplexen genetischen Hintergrund ausgegangen wird (Murray et al., 1997; Glass & Giannini, 1999). Studien im Hinblick auf den immungenetischen Hintergrund erbrachten für die frühkindliche Form der Oligoarthritis eine Assoziation mit bestimmten HLA-Klasse-I- und II-Molekülen (Haas et al., 1994; Albert & Scholz, 1998).

Die Allele DRB1*11(12)-DQA1*0501-DQB1*0301, DRB1*08-DQA1*0601-DQB1*0301 und DRB1*08-DQA1*0401-DQB1*0402 korrelierten dabei sehr hoch mit der Suszeptibilität für die Erkrankung, während für DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 ein neutrales Verhalten beobachtet werden konnte.

Interessanterweise trat das Allel DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 weniger häufig als erwartet auf, d.h. es scheint „Schutz“ vor juveniler idiopathischer Arthritis zu bieten (Haas et al., 1994).

Untersuchungen bezüglich der HLA-Assoziationen in den einzelnen Untergruppen der juvenilen idiopathischen Arthritis nach der ILAR Klassifikation zeigten eine Assoziation der Haplotypen DRB1*08-DQA1*0401-DQB1*0402 und DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 für die „persistent“ und „extended“ Form der Oligoarthritis (Thomson et al., 2002) und bestätigten die Beobachtungen von Haas et al.

Die α -Ketten der assoziierten HLA-DQ-Moleküle *0401, *0501 und *0601 weisen in ihrer Primärstruktur ein gemeinsames Motiv auf, das möglicherweise eine direkte Beteiligung der MHC-Moleküle an der Pathogenese der JIA erlaubt (Haas et al., 1991). Allerdings ist die Präsenz einer bestimmten β -Kette (DQB1*0301, DQB1*0402) für die beobachtete Assoziation unerlässlich, da sich die Allele DQA1*0501-DQB1*0301 und DQA1*0501-DQB1*0201 trotz gleicher α -Kette unterschiedlich verhalten (Haas et al., 1994).

Um die Peptidbindungseigenschaften der Allele DQA1*0501-DQB1*0301 (assoziiert), DQA1*0501-DQB1*0201 (neutral) und DQA1*0201-DQB1*0202 (protektiv) zu definieren, wurden ihre Bindungsmotive mittels Peptidbibliotheken bestimmt (Ihle et al., 2003).

Hierbei ist anzumerken, dass sich das Allel DQA1*0201-DQB1*0201 von DQA1*0201-DQB1*0202 lediglich in einer einzelnen Aminosäure innerhalb der β -Kette (Position 135 D→G) unterscheidet, die allerdings außerhalb der Peptidbindungsgrube liegt und somit keinen Einfluss auf die Bindungseigenschaft hat.

HLA-DQ-Allel	Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	Position 5	Position 6	Position 7	Position 8	Position 9
gut bindend									
0501/0301 (DQ7)	Y, W, I, F	F, W, Y	A, Y, F	G, A, S	G, A, S	G, A	A, V	A, V	V, A
0501/0201	F, W			D, E	Y, D	E, P	D, E		D, M, F, W
0201/0202	A, K			D, E		T, D, E, P	A, D, E, I	G	W, L, M, I
schlecht bindend									
0501/0301 (DQ7)	D, N	N, D	D	D, E	D, E	D, E	D, E	N, D	K
0501/0201					W			M	
0201/0202			P, R	P, W, K		K, F, L, A			Q, Y, V

Tabelle 1: Differentielles Bindungsmotiv für drei HLA-DQ-Moleküle nach Ihle et al., 2003

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich ist, bestehen sehr große Unterschiede in den Bindungsmotiven dieser drei HLA-DQ-Moleküle.

An den für die Peptidbindung relevanten Positionen 4 und 6 zeigt sich dies besonders deutlich. Die an DQ7 stark bindenden Aminosäuren A, G und S weisen keine Bindung an das neutrale bzw. protektive Allel auf, wohingegen die an DQA1*0501-DQB1*0201 und DQA1*0201-DQB1*0202 stark bindenden Aminosäuren D und E sehr schlecht an DQ7 binden.

Dies führt dazu, dass die von diesen HLA-DQ-Molekülen präsentierten Peptide strikt allelspezifisch sind und von einem dieser drei HLA-DQ-Moleküle gebunden werden können. Diese Eigenschaft wird auch als differentielles Motiv bezeichnet (Ihle et al., 2003).

2.10 Zielsetzung der Arbeit

Die Interaktion von MHC-Molekül, gebundenem antigenem Peptid und TCR steht an zentraler Stelle der adaptiven Immunantwort. Durch die Assoziation von Autoimmunerkrankungen mit bestimmten HLA-Allelen ist das genaue Verständnis dieses Mechanismus von besonderem Interesse. Insbesondere liegt ein Hauptaugenmerk auf der Primärstruktur der präsentierten Peptide, von denen sich eventuell Rückschlüsse auf Ätiologie und Pathogenese ziehen lassen.

Da sowohl Ätiologie als auch Immunpathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis noch immer unbekannt sind, allerdings HLA-Assoziationen zweifelsfrei nachgewiesen wurden, soll versucht werden über die Bestimmung des Peptidbindungsmotivs eines assoziierten HLA-Klasse-II-Moleküls einen weiteren Schritt zur Aufklärung dieses Krankheitsbildes zu leisten.

Nachdem die Bestimmung der Bindungseigenschaften dreier positiv bzw. negativ assoziierter HLA-DQ-Moleküle ein differentielles Motiv erbracht hatten, soll das Bindungsverhalten des Allels DQA1*0401-DQB1*0402 bestimmt werden.

Der Vergleich mit den bereits bekannten Bindungsmotiven assoziierter oder nicht assoziierter HLA-DQ-Moleküle könnte dann das differentielle Bindungsmotiv erweitern und zeigen, ob sich die beobachtete Hierarchie in der Assoziation der HLA-DQ-Moleküle auch im Bindungsverhalten widerspiegelt.

In einem weiteren Schritt können auf Basis des HLA-DQ4-Bindungsmotivs Peptidsequenzen synthetisiert und ihre Affinität zu HLA-DQ4 untersucht werden. Damit sollen Peptide identifiziert werden, die hochaffine Liganden an HLA-DQ4 darstellen, die eventuell für weitere Untersuchungen hinsichtlich T-Zell-Reaktivität benutzt werden könnten.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien

3.1.1.1 EBV-transformierte B-Zelllinie BM9

Die verwendete B-Lymphoblastoid-Zelllinie (B-LCL) BM9 (IHW 9068) ist humanen Ursprungs und wurde vom 12th International Histocompatibility Workshop Cell Panel bezogen.

Sie exprimiert folgende MHC-Allele:

HLA-DR8 (DRA1*0102-DRB1*0801)

HLA-DQ4 (DQA1*0401-DQB1*0402)

HLA-DP2 (DPA1*01-DPB1*02012)

HLA-A2

HLA-B35

HLA-C4

Die Homozygotie bezüglich HLA-DQ4 wurde durch Oligonukleotidtypisierung überprüft. Dies wurde freundlicherweise von Prof. Dr. C. A. Müller (Medizinische Universitätsklinik Tübingen, Abteilung Innere Medizin II, Sektion für Transplantationsimmunologie und Immunhämatologie) durchgeführt.

3.1.1.2 Hybridomzelllinie Tü22

Die Hybridomzelllinie Tü22 produziert monoklonale Antikörper der Subklasse IgG_{2a}, welche ein Epitop auf HLA-DQ-Molekülen erkennen (Ziegler et al., 1986). Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. Dr. A. Ziegler (Institut für Immungenetik, Universitätsklinikum Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt Universität zu Berlin) zur Verfügung gestellt.

3.1.2 Geräte

Beckman L8-70M Ultrazentrifuge + Rotor TI 60	BECKMAN
Brutschrank HeraCell	HERAEUS
CellRoll	INTEGRA BIOSCIENCES
Durchflußzytometer (FACSCalibur)	BECTON DICKINSON
EI 9001 X-Cell™ II-Mini Cell	NOVEX
Feinwaage	SARTORIUS
Gefrierschrank -20°C	LIEBHERR
Gefrierschrank -80°C	FORMA SCIENTIFIC
Kolbenhubpipetten	GILSON
Kühlschrank 4°C	BOSCH
Magnetrührer 10515	BIOBLOCK SCIENTIFIC
Magnetrührstäbchen	ROTH
Magnet-Rührzelle 50 ml	AMICON
Mehrkanalpipette	GILSON
Microplate Reader Tecan SpectraFluor	TECAN
Mikroskop CX40	OLYMPUS
Minifuge T	HERAEUS
Multipipette	EPPENDORF
Peristaltikpumpe	MILLIPORE
Peristaltikpumpe P1	PHARMACIA
pH-Meter	wtw
Pipettierhilfe Pipetboy	INTEGRA BIOSCIENCES
Polymax 1040 Shaker	HEIDOLPH
PowerEase 500	NOVEX
Rekorder 2210	LKB
Rotixa 50RS Zentrifuge	HETTICH
Scotsman Eismaschine	STIEL
Sterilbank HeraSafe	HERAEUS
Tangentialflussfiltrationseinheit VIVAFLOW 200	VIVASCIENCE
Umkehrmikroskop IX50	OLYMPUS
UV-Monitor 2138 Uvicord S, 278 nm Filter	LKB

Victor 1420 Multilabel Counter	WALLAC
Vortexer Reax top	HEIDOLPH
Wasserbad	GFL

3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Ampuwa	FRESENIUS
Aprotinin	ROCHE
BSA	SIGMA
Coomassie Brilliant-Blue R250	SERVA
DELFI [®] A Assay-Buffer	WALLAC
DELFI [®] A Enhancement Solution	WALLAC
DELFI [®] A Europium-labelled Streptavidin	WALLAC
DELFI [®] A Wash Concentrate	WALLAC
DMSO	MERCK
DTT	MERCK
E-64	BOEHRINGER
EDTA	ROTH
Essigsäure p.a.	MERCK
FACSFlow	BECTON DICKINSON
FCS	BIOCHROM
HEPES (1M)	BIOCHROM
Leupeptin	ROCHE
L-Glutamin (200 mM)	BIOCHROM
Methanol p.a.	MERCK
Na ₂ HPO ₄	MERCK
NaCl	ROTH
NaH ₂ PO ₄	MERCK
NaN ₃	ROTH
NaOH	MERCK
Na-Pyruvat (100 mM)	BIOCHROM
NuPage™ Sample-Buffer	NOVEX

Octyl-β-D-Glucopyranosid	MERCK
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	BIOCHROM
Penicillin/Streptomycin (10000 IE/10000 µg/ml)	BIOCHROM
Pepstatin A	BOEHRINGER
PMSF	SIGMA
Protease-Inhibitor-Cocktail Complete Mini [®]	ROCHE
Rainbow [™] -Marker	AMERSHAM
Roti-Nanoquant [®]	ROTH
RPMI 1640 mit 2,0 g/l NaHCO ₃	BIOCHROM
Sepharose CI-4B Protein A Konjugat	PHARMACIA
Tris/HCl	ROTH
Triton X-100	SIGMA
Trypanblau	SIGMA
Zitronensäure	ROTH
Zwittergent 3-12	CALBIOCHEM

3.1.4 Antikörper

γ ₁ /γ _{2a} -Kontrolle (IgG ₁ , IgG _{2a}), FITC-/PE-markiert	BECTON DICKINSON
Ratte-anti-Maus IgG _{2a} , Biotin-konjugiert	PHARMINGEN
Ziege-anti-Maus Ig, FITC-markiert	BECTON DICKINSON

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

20 kDa-Membran, Cellulose-Triacetat	SARTORIUS
96-well Zellkulturplatten, Flachboden, steril	COSTAR
96-well-low-affinity Platten	NUNC
Combitips für Multipipette	EPPENDORF
FACS-Röhrchen, konisch, 4,5 ml	GREINER
FluoroNunc [™] 96-well-MaxiSorp Platten	NUNC
Mikrotiterplatten, 96-well, Flachboden, unsteril	GREINER
NuPage [™] 10% Bis-Tris-Gel	NOVEX

NuPage™ 4-12% Bis-Tris-Gel	NOVEX
NuPage™ MOPS SDS Running Buffer	NOVEX
Pasteurpipetten, ungestopft	ASSISTENT
Pipettenspitzen:	
- 10 µl (weiß)	GILSON
- 200 µl (gelb)	GREINER
- 1000 µl (blau)	GREINER
Plastikpipetten, steril (5 ml, 10 ml, 25 ml)	CORNING
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	EPPENDORF
Röhrchen, steril (15 ml, 50 ml)	BECTON DICKINSON
Rollerflaschen, Polystyrene, 850 cm ²	GREINER
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75cm ² , 162 cm ²)	COSTAR

3.2 Methoden

3.2.1 Zellbiologische Techniken

3.2.1.1 Kultivierung der B-LCL BM9

BM9 (IHW 9068) Zellen wurden zu Beginn in Suspensionskultur in 162 cm² Kulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und 70% Luftfeuchte mit leicht geöffnetem Deckel in einem Begasungsbrutschrank kultiviert. Als Kulturmedium wurde RPMI 1640 verwendet, das mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/10.000 µg/ml), 2 mM L-Glutamin und 5 mM HEPES supplementiert wurde. Nachdem die Zellen den Boden der Kulturflaschen bedeckten, wurden sie durch wiederholtes Aufteilen auf mehrere Flaschen und Mediumzugabe expandiert. Im weiteren Verlauf wurde die Kultivierung auf Rollerflaschen umgestellt, um dadurch eine höhere Zellausbeute zu erreichen. Hierzu wurden 2 Liter Plastikflaschen verwendet, die auf einer Drehvorrichtung (CellRoll) im Brutschrank mit 1 rpm kontinuierlich in Bewegung gehalten wurden.

3.2.1.2 Zellernte

Die zur späteren Lyse benötigten Zellen wurden bei 1800 rpm, 4°C für 6 min abzentrifugiert. Das überstehende Medium wurde verworfen und die pelletierten Zellen anschließend zweimal in PBS gewaschen (resuspendieren und abzentrifugieren), um noch vorhandene Mediumrückstände zu entfernen. Das nach dem letzten Zentrifugationsschritt gewonnene Zellpellet wurde sofort in einem 50 ml Röhrchen bei -20°C tiefgefroren. Aus einem Liter Suspensionskultur konnte etwa 1 ml Zellpellet gewonnen werden, dies entsprach ca. $0,5 \times 10^9$ Zellen.

3.2.1.3 Kultivierung der Hybridomzelllinie Tü22

Tü22-Hybridomzellen wurden in RPMI 1640, angereichert mit 10% FCS (hitzeinaktiviert bei 56°C, 30 min), 1% Penicillin/Streptomycin (10.000 IE / 10.000 µg/ml), 2 mM L-Glutamin und 0,5 mM Na-Pyruvat, ebenfalls in 162 cm² Flaschen kultiviert.

Um eventuell vorhandene Zellen, die die Fähigkeit monoklonale Antikörper zu produzieren, verloren hatten, nicht weiter zu kultivieren, wurde mittels „limiting dilution“ ein monoklonal wachsender Zellcluster selektiert, der eine hohe Antikörperproduktion aufwies.

3.2.1.4 Subklonierung von Tü22-Hybridomen

Tü22-Hybridomzellen wurden zunächst auf eine Konzentration von 50 Zellen/ml und 5 Zellen/ml verdünnt und in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät. Pro well wurden je 200 µl eingesetzt, um eine Zelldichte von 10 Zellen/well bzw. 1 Zelle/well zu erreichen. Das Wachstum wurde mikroskopisch kontrolliert und die Antikörperproduktion, wie in 3.2.2.7 beschrieben, gemessen. Wells, die sowohl gut proliferierende Zellen als auch hohe Antikörperproduktion aufwiesen, wurden danach auf eine Zelldichte von 1/0,3/0,1 Zellen/well verdünnt und wiederum in 96-well-Zellkulturplatten ausgesät. Aus der 0,1 Zellen/well-Verdünnungsreihe wurde schließlich ein Zellcluster identifiziert, der sowohl zweifelsfrei monoklonalen Ursprungs war, als auch hohe Antikörperproduktion

aufwies. Diese Zellen wurden im weiteren Verlauf expandiert und zur Gewinnung der Antikörper verwendet.

3.2.1.5 Gewinnung des Hybridomzellüberstandes

Die von den Hybridomzellen synthetisierten und in das Zellkulturmedium abgegebenen monoklonalen Antikörper wurden durch vorsichtiges Abnehmen des Zellkulturüberstandes gewonnen. Dieser wurde sofort tiefgefroren und bis zur Aufkonzentrierung und Aufreinigung bei -20°C gelagert.

3.2.1.6 Kryokonservierung von Zellen

Zur späteren Wiederanzucht wurden sowohl BM9 (IHW 9068) B-LCL als auch Tü22 Hybridomzellen steril der Suspensionskultur entnommen, mit 1.000 rpm bei 4°C für 6 min pelletiert und in eiskaltem Einfriermedium (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert. Die Zelldichte wurde dabei auf $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Je 1 ml wurde in vorher eisgekühlte Cryotubes gegeben, für 30 min auf Eis gestellt und danach bei -70°C tiefgefroren. Nach ca. 2 Wochen konnten die Cryotubes in flüssigen Stickstoff überführt und gelagert werden.

3.2.1.7 Nachweis der HLA-DQ-Expression mittels FACS

Um die Oberflächenexpression von HLA-DQ-Molekülen auf BM9-Zellen nachzuweisen, wurden diese mit dem HLA-DQ-spezifischen Antikörper Tü22 markiert. Dieser konnte durch einen polyklonalen Ziege-anti-Maus Ig-Antikörper, der mit FITC markiert war, detektiert werden.

Als Negativkontrolle diente ein γ_1/γ_{2a} -Kontrollantikörper (IgG₁, IgG_{2a}).

Die Zellen wurden dazu zweimal mit PBS/2% FCS gewaschen, der Überstand abgenommen und für 30 min auf Eis mit dem entsprechenden Antikörper inkubiert. Danach wurde erneut zweimal gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen, und der Überstand verworfen. Nach einem weiteren Inkubationsschritt mit dem Sekundärantikörper (entfiel bei der Negativkontrolle)

wurden die verwendeten Röhrchen mit 200 µl FACSFlow aufgefüllt. Anschließend konnten die Zellen durchflußzytometrisch analysiert werden.

3.2.2 Biochemische Techniken

3.2.2.1 Aufreinigung des mAb Tü22 mittels Protein A Sepharose

Die tiefgefrorenen Hybridomzellüberstände wurden langsam aufgetaut und über Tangentialflussfiltration (100 kDa Membran) bei 4°C auf ein Endvolumen von 100 ml aufkonzentriert.

Parallel dazu wurden 0,75 g eines Sepharose CI-4B Protein A Konjugats in einer Säule mit dem zehnfachen Volumen PBS versetzt und für 30 min bei RT quellen gelassen. Mit 3 Säulenvolumen PBS wurde die Säule danach gespült, mit dem aufkonzentrierten Hybridomüberstand befüllt und über Nacht bei 4°C mit einer Flussrate von 2 ml/min zyklisiert. Anschließend wurde die Säule mit PBS unter UV-Kontrolle bis zum Erreichen einer Basislinie gewaschen. Die Elution der gebundenen Antikörper erfolgte mit 100 mM Citratpuffer pH 3,0 und wurde ebenfalls durch UV-Absorption kontrolliert. Das Eluat wurde direkt in vorgelegtes 1 M Tris/HCl pH 8,0 eingebracht und die Säule danach mit PBS neutralisiert.

Die Eluate wurden vereinigt, mittels Ultrafiltration (20kDa Membran) aufkonzentriert, in PBS umgepuffert und mit 0,01% NaN₃ versetzt. Die Lagerung der Antikörperisolate erfolgte bei 4°C.

Die Proteinkonzentration wurde, wie in 3.2.2.5 beschrieben, bestimmt und die Reinheit durch SDS-PAGE überprüft.

3.2.2.2 Isolierung von HLA-DQ-Molekülen

Verwendete Pufferlösungen:

Lysepuffer: 10 mM Tris/HCl, 140 mM NaCl, pH 7,8

Waschpuffer: 50 mM Na-Phosphat, 150 mM NaCl, 0,1% (w/v) Zwittergent 3-12, pH 8,0

Elutionspuffer pH 8: 100 mM Na-Phosphat, 0,1% (w/v) Zwittergent 3-12

Elutionspuffer pH 11,2: 100 mM Na-Phosphat, 0,1% (w/v) Zwittergent 3-12
Säulenaufbewahrungspuffer: Waschpuffer mit 0,05% (w/v) NaN_3

Alle pH-Werte wurden mit 1 M HCl bzw. 1 M NaOH eingestellt.

Vor Verwendung wurden alle Pufferlösungen bei 4°C aufbewahrt, der pH-Wert kontrolliert und gegebenenfalls nachgestellt.

Die Isolierung der HLA-DQ-Moleküle erfolgte mittels Immunaффinitätschromatographie (Gorga et al., 1987). Dazu wurden die tiefgefrorenen Zellpellets gewogen und mit der vierfachen Menge Lysepuffer versetzt. In 10 ml Lysepuffer wurde unmittelbar zuvor eine Tablette des Protease-Inhibitor-Cocktails Complete Mini[®] gelöst, um bei der Lyse freigesetzte Proteasen weitgehend zu inaktivieren. Anschließend wurden 2% (w/w) Triton X-100 zugegeben und im Becherglas für 2 h bei 4°C langsam gerührt.

Mit 1 M Tris/HCl pH 8,0 wurde das somit gewonnene Zelllysat auf pH 8,0 gebracht. Um Zelltrümmer und -kerne abzutrennen, wurde für 10 min bei 2.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und durch anschließende Ultrazentrifugation (25.000 rpm, 30 min, 4°C) wurden sowohl noch weitere vorhandene unlösliche Bestandteile pelletiert als auch das Lysat von flottierenden Lipiden befreit. Sowohl das Pellet aus der Vorzentrifugation als auch das Ultrazentrifugationspellet wurden über Nacht erneut, wie oben beschrieben, lysiert.

Alle nachfolgenden Schritte wurden bei 4°C in einem Kühlraum durchgeführt. Die verwendeten Säulen wurden zunächst mit dem vier- bis fünffachen Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen.

Das geklärte Zelllysat wurde über Nacht mit einer Flussrate von ca. 2 ml/min über einen Zyklus bestehend aus einer Vorsäule (CH-Sepharose 4B) und 2-3 Tü22-Sepharose-Säulen gepumpt. Anschließend wurden die Säulen einzeln vom Zyklus entkoppelt und das Lysat durch Spülen mit dem zwei- bis dreifachen Säulenvolumen Lysepuffer mit 0,5% Triton X-100 (w/v) entfernt. Mit Waschpuffer pH 8 wurde unter UV-Detektion gewaschen, bis eine konstante UV-Absorption bei 278 nm erreicht war.

Die nun auf Waschpuffer umgepufferten Säulen wurden anschließend mit Elutionspuffer pH 8 solange gewaschen, bis die UV-Absorption bei 278 nm konstant blieb. Danach erfolgte die alkalische Elution der HLA-DQ-Moleküle unter UV-Detektion bei 278 nm mit Elutionspuffer pH 11,2. Hier wurde bis zum Erreichen einer Baseline eluiert. Die verwendete Säule wurde im Anschluss sofort mit Waschpuffer neutralisiert.

Das Eluat wurde direkt in vorgelegtes 1 M Tris/HCl pH 8,0 eingebracht und somit neutralisiert.

Alle Eluate wurden vereinigt und auf Waschpuffer (+0,05% (w/v) NaN₃) umgepuffert. Mittels Ultrafiltration über eine 20 kDa Ausschluss-Membran wurden sie dann auf 0,5 ml aufkonzentriert.

Je 0,5 ml der aufkonzentrierten Isolate wurden mit 20 µl eines Protease-Inhibitor-Gemisches (50 mM PMSF, 1,25 mM Leupeptin, 250 µM Pepstatin A, 2,5 mM Chymostatin) und 20 µl 0,1 M EDTA versetzt und bei 4°C aufbewahrt.

Die Reinheit der HLA-DQ-Isolation wurde mittels SDS-PAGE überprüft, die Proteinkonzentration, wie in 3.2.2.5 beschrieben, ermittelt.

3.2.2.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Es wurde ein modifiziertes Verfahren nach Laemmli verwendet (Laemmli, 1970). Je nach Fragestellung kamen verschieden konzentrierte Fertiggele zum Einsatz. MHC-Isolate wurden in 10% Bis-Tris-Gel, IgG-Isolate in 4-12% Bis-Tris-Gel charakterisiert. 10-20 µg Protein in einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden mit 3 µl DTT (zehnfach konzentriert) und 8 µl NuPage™ Sample-Buffer versetzt, für 10 min bei 70°C erhitzt und danach in die Geltaschen pipettiert. Zur Größenbestimmung erfolgte die Auftrennung eines definierten Markergemisches in einer der äußeren Bahnen. Als Laufpuffer wurde NuPage™ MOPS SDS Running Buffer (1 M MOPS, 1 M TrisBase; 69,3 mM SDS, 20,5 mM EDTA, 1:20 mit H₂O verdünnt) verwendet.

Die angelegte Spannung wurde während der gesamten Elektrophoresedauer von 50 min bei konstant 200 V gehalten, die Stromstärke betrug zu Beginn ca. 120 mA.

3.2.2.4 Coomassie-Färbung

Zur Darstellung der aufgetrennten Proteine erfolgte eine anschließende Färbung des Gels mit Coomassie. Dazu wurde es für 30-60 min durch vorsichtiges Schütteln mit Coomassie-Reagenz (0,2% (w/v) Coomassie Brilliant-Blue R250, 50% (v/v) Methanol, 8% (v/v) Essigsäure) behandelt. Die unspezifische Färbung wurde danach mit 10% (v/v) Methanol und 7% (v/v) Essigsäure unter Schütteln über mehrere Stunden entfernt. Zur Dokumentation wurde das Gel anschließend abfotografiert, bei 80°C für 2 h getrocknet und eingeschweißt.

3.2.2.5 Proteinkonzentrationsbestimmung

Alle Proteinkonzentrationsbestimmungen wurden mit dem Kit Roti-Nanoquant[®] durchgeführt. Es beruht auf einer modifizierten Methode nach Bradford (Bradford, 1976), die allerdings den Vorteil hat, auch größere Konzentrationsunterschiede linear abzudecken.

Durch fünffaches Verdünnen der Stammlösung mit destilliertem Wasser wurde zunächst eine Arbeitslösung hergestellt. In einer Mikrotiterplatte wurden dann 200 µl Arbeitslösung vorgelegt, 5 µl und 10 µl Probe zugegeben und mit 45 µl / 40 µl H₂O auf ein Gesamtvolumen von 250 µl gebracht. Nach 15 min konnten die Absorptionen bei 620 und 450 nm bestimmt werden, aus deren Quotient sich die Proteinkonzentration ermitteln lässt. Die Eichung der Methode erfolgte mit BSA, für die Konzentrationsbestimmung von Immunglobulinen wurde allerdings zur Erhöhung der Genauigkeit die Aufnahme einer Eichgerade mit IgG durchgeführt.

3.2.2.6 Europium-Immunofluoreszenz-Assay

Bindungspuffer: 150 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, 0,5% Octyl-β-D-glucopyranosid, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Aprotinin, 2 µg/ml E-64, 5 µg/ml Leupeptin, 0,7 µg/ml Pepstatin.

Waschpuffer: DELFIA® Wash Concentrate mit 25fachem Volumen destilliertem Wasser verdünnt.

Alle Bindungs- und Kompetitionsversuche wurden mit dem im folgenden beschriebenen Europium-Fluoroimmunodetection-Assay durchgeführt (Tompkins et al., 1993).

Dazu wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (FluoroNunc) bei 4°C mit 0,5 µg/well des monoklonalen anti-DQ-Antikörpers Tü22 beschichtet. Nach 18 Stunden wurde dreimal mit je 150 µl gewaschen und noch verbliebene Bindungsstellen mit einer 1%igen BSA-Lösung für 45 min bei 37°C blockiert.

Parallel dazu wurden in einer weiteren 96-Loch-Platte MHC-Moleküle und Peptide bzw. Peptidbibliotheken in Bindungspuffer für 18h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 10 µl 250 mM Tris/HCl (pH 8,0) pro Ansatz, wurden die neutralisierten MHC-Peptidkomplexe in die mit Tü22 beschichtete Platte übertragen. Nach zweistündiger Inkubation bei RT wurde wiederum dreimal gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe von 100 µl Europium-markiertem Streptavidin, das in DELFIA® Assay-Buffer 1:1000 auf eine Endkonzentration von 0,1 µg/ml verdünnt wurde. Anschließend erfolgte eine einstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschrift wurden 150 µl DELFIA® Enhancement Solution zugegeben, die die Dissoziation des Europiums von den Streptavidinmolekülen ermöglichte. Nach 15 Minuten erfolgte die Messung der resultierenden Fluoreszenz bei 615 nm.

3.2.2.7 Nachweis der Antikörperproduktion von Hybridomzellen

Zur Messung der Antikörperproduktion der Tü22-Hybridomzellen wurde eine 96-well-Platte mit 2 µg/ml HLA-DQ4 in PBS über Nacht bei 4°C inkubiert (50 µl / well). Nach dreimaligem Waschen und anschließendem Blockieren mittels 1%-BSA-Lösung bei 37°C für eine Stunde wurden je 50 µl Zellkulturüberstand pro well zugegeben und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper (Ratte-anti-Maus-IgG_{2a}) zugegeben, der vorhandene Tü22-Antikörper der Subklasse IgG_{2a} erkennt. Nach 1 h Inkubation und Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl Europium-

markiertem Streptavidin (1:1000 in DELFIA[®] Assay Buffer auf 0,1 µg/ml verdünnt), nach einer weiteren Stunde und vorausgegangenem Waschschrift konnte dann nach Zugabe von 150 µl DELFIA[®] Enhancement-Solution pro well die resultierende Fluoreszenz bei 615 nm gemessen werden. Als Negativkontrolle wurde das für die Kultivierung der Hybridomzellen verwendete Medium benutzt.

3.2.3 Peptide und Peptidbibliotheken

3.2.3.1 Aufbau einer Peptidbibliothek im Positional Scan Format

Peptidbibliotheken setzen sich aus mehreren Teilbibliotheken zusammen, die durch definierte (O) und randomisierte (X) Aminosäurepositionen charakterisiert sind. Die hier verwendete Nonapeptidbibliothek besteht aus 171 O/X₈-Teilbibliotheken mit einer definierten und acht randomisierten Aminosäurepositionen sowie der völlig randomisierten X₉-Teilbibliothek. In den O- und X-Positionen wurden die biogenen L-Aminosäuren mit Ausnahme von Cystein eingesetzt.

Jede Teilbibliothek besitzt somit als charakteristisches Merkmal eine definierte Aminosäure an einer bestimmten Position, wohingegen alle anderen Positionen randomisiert sind. Dieser Aufbau wird als „positional scan format“ bezeichnet (Pinilla et al., 1992).

```

OXXXXXXXXX
XOXXXXXXXX
XXOXXXXXXXX
XXXOXXXXXX
XXXXOXXXXX
XXXXXOXXX
XXXXXXOXX
XXXXXXXOX
XXXXXXXXXO

```

Abbildung 4: Aufbau einer Nonapeptidbibliothek im Positional Scan Format

3.2.3.2 Synthese einer acetylierten Nonapeptidbibliothek

Die acetylierte Nonapeptidbibliothek wurde freundlicherweise von Dr. Burkhard Fleckenstein, Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Kurzbeschreibung des Herstellungsverfahrens für Peptidbibliotheken:

Alle Nonapeptidamidteilbibliotheken wurden mittels Festphasenpeptidsynthese unter Verwendung der Fmoc/tBu-Strategie und Fmoc-Rink-Amid-4-methylbenzhydrylamine Polystyrol Harz hergestellt. Die in der Sequenz randomisierten Positionen (X) wurden durch Doppelkupplung mit einer äquimolaren Mischung der 19 Fmoc-L-Aminosäuren eingeführt. Dabei wurden die vorgemischten Aminosäuren in äquimolarem Verhältnis zu den reaktiven Gruppen auf dem Harz eingesetzt.

Für die definierten Positionen (O) wurde ein fünffacher Überschuss der jeweiligen Fmoc-L-Aminosäure verwendet.

Nach der Kupplung der neunten Aminosäure wurde durch Piperidin/DMF (1:1) die intermediäre Fmoc-Gruppe entfernt. Die Acetylierung der Peptide erfolgte durch Zugabe von Diisopropylethylamin und Essigsäureanhydrid zum Harz.

Die acetylierten Peptidbibliotheken wurden vom Harz und von den Seitenkettenschutzgruppen mit TFA/Phenol/Ethandithiol/Thioanisol (96:2:1:1, v/v) befreit. Durch Zugabe von n-Heptan/Diethylether (1:1) wurden die Peptide ausgefällt und dreimal mit n-Heptan/Diethylether (1:1) gewaschen. Anschließend wurden sie in *tert.*Butanol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.

Um die Äquimolarität der Aminosäuren in den randomisierten Positionen der Teilbibliotheken sicherzustellen, wurde von nicht-acetylierten Proben sowohl Pool-Sequencing (Stevanović & Jung, 1993) als auch ESI-MS (Metzger et al., 1994) durchgeführt.

3.2.3.3 Synthese von acetylierten Peptidamiden und N-terminal biotinylierten Peptiden

Acetylierte Peptidamide und N-terminal biotinylierte Peptide wurden freundlicherweise von PD Dr. Karl-Heinz Wiesmüller, EMC microcollections GmbH, Tübingen, zur Verfügung gestellt.

Alle Peptide wurden durch multiple Festphasen-Peptidsynthese unter Verwendung der Fmoc/tBu-Strategie auf Rink-Amid-Harz bis Position 7 mit Einfachkupplung und ab Position 7 mit Doppelkupplung hergestellt. Die Fmoc-L-Aminosäuren wurden in siebenfachem Überschuss im Vergleich zu den reaktiven Gruppen des Harzes eingesetzt und mit 1-Hydroxybenzotriazol / Diisopropylcarbodiimid in DMF aktiviert. Die Peptide wurden, wie beschrieben, N-terminal acetyliert.

Zur Herstellung biotinylierter Peptide wurde nach Kupplung der letzten Aminosäure zunächst ϵ -Aminocaprinsäure (Aca) als Spacer eingeführt. Fmoc-Aca wurde dabei analog einer Fmoc-L-Aminosäure gekuppelt. Ein dreifacher Überschuss an Biotin wurde äquimolar mit TBTU/HOBt in DMF voraktiviert und mit dreifachem Überschuss an DIEA in DMF auf das Harz gegeben.

Nach Acetylierung bzw. Biotinylierung wurden die Peptide vom Harz abgespalten und die Seitenketten mit TFA/Triisopropylsilan/Wasser (95:5:2,5) entfernt. Anschließend wurden sie in Diethylether präzipitiert, zweimal in Diethylether gewaschen und in *tert.*Butanol/Wasser (4:1) aufgenommen und lyophilisiert.

Die Reinheiten der Peptide wurde durch HPLC und die Identität der Peptide durch ESI-MS kontrolliert. Alle Peptide zeigten HPLC Reinheiten > 85%, das biotinylierte Peptid wurde über präparative HPLC gereinigt (>95%). Die erwarteten Massen wurden mit ESI-MS nachgewiesen.

4 Ergebnisse

4.1 Aufreinigung des monoklonalen Antikörpers

Tü22

Aus 4,5 Liter Hybridomzellüberstand wurde mittels Protein-A-Affinitätschromatographie eine Gesamtmenge von ca. 35 mg Antikörper isoliert. Wie beschrieben wurde der Überstand zuerst auf ein Volumen von ca. 100 ml aufkonzentriert und über Nacht über eine Protein-A-Säule zyklisiert. Anschließend erfolgte die Elution der gebundenen Antikörper mit Citratpuffer pH 3,0. Nach Aufkonzentrierung über eine 20 kDa Ausschlussmembran auf 1 ml wurde der Proteingehalt ermittelt.

Die gesamte Antikörpermenge wurde dabei in zwei unabhängigen Zyklen gewonnen. Die Reinheitskontrolle erfolgte mittels SDS-PAGE (Abb.5). Daraus ist ersichtlich, dass die Aufreinigung mit hoher Effizienz durchgeführt wurde, da sich nur die leichten (25 kDa) und schweren (50 kDa) Ketten in den Spuren 2 und 3 erkennen lassen.

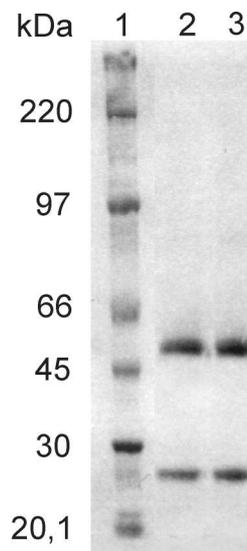


Abbildung 5: SDS-PAGE Tü22-Isolierung
 Spur 1: Markergemisch, Spur 2: Tü22 - 1. Isolat, Spur 3: Tü22 - 2. Isolat

Die Funktionalität der aufgereinigten Antikörper wurde anschließend mittels ELISA getestet. Dabei zeigten beide Isolate eine hohe Affinität an immobilisierte HLA-DQ4 Moleküle.

4.2 Expression von HLA-DQ4 auf BM9-Zellen

Die Expression von HLA-DQ4 Molekülen auf BM9-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

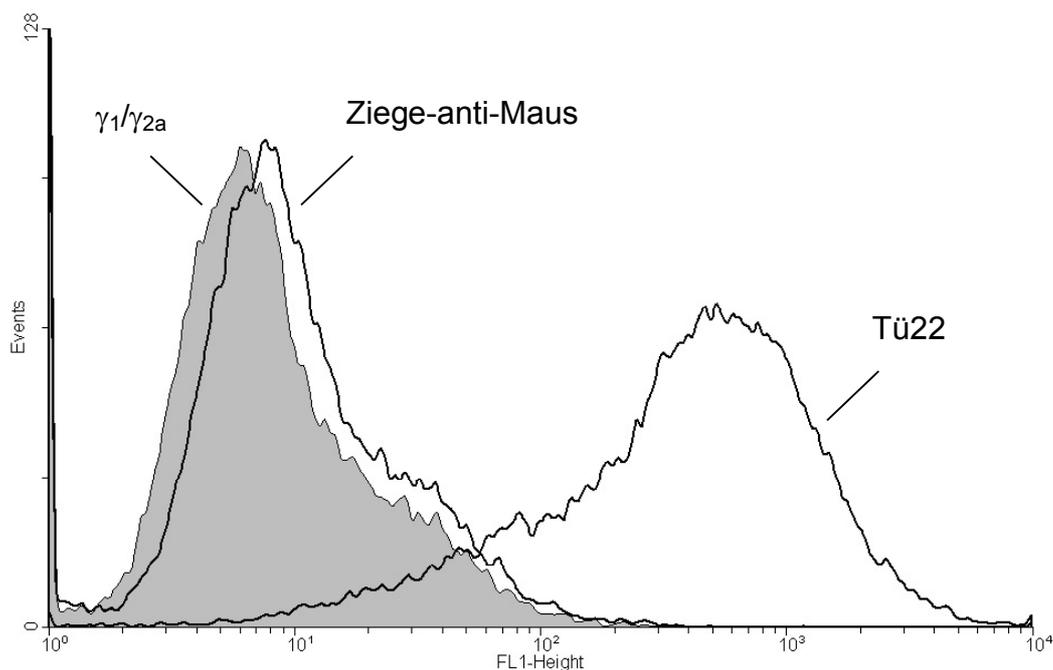


Abbildung 6: Nachweis der Expression von HLA-DQ auf BM9-Zellen

Die mit dem HLA-DQ-spezifischen Antikörper Tü22 angefärbten Zellen zeigen eine um mehr als zwei Zehnerpotenzen höhere Fluoreszenzintensität als die γ_1/γ_{2a} -Negativ-Kontrolle. Dabei ist eine Kreuzreaktion des FITC-markierten Ziege-anti-Maus-Sekundär-Antikörpers mit BM9-Zellen für diese hohe Intensität auszuschließen, da sich dessen Bindungsfähigkeit an BM9 im Bereich des Isotyp-Kontrollantikörpers befindet. Die sehr hohe Signalstärke bei der Markierung mit Tü22 ist also ausschließlich auf die Oberflächenexpression von HLA-DQ4-Molekülen zurückzuführen.

4.3 Isolierung von HLA-DQ4 Molekülen

HLA-DQ4 Moleküle wurden aus Zelllysat von BM9-Zellen durch Immunaffinitätschromatographie gewonnen. Obwohl HLA-Moleküle mehrere Wochen bei 4°C gelagert werden konnten, wurden sie jeweils frisch isoliert und sofort im Anschluss in Bindungs- und Kompetitionsmessungen eingesetzt. Die Reinheit jeder HLA-Isolierung wurde durch SDS-PAGE überprüft.

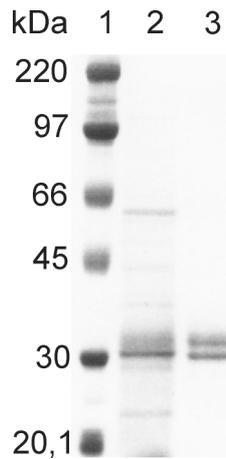


Abbildung 7: SDS-PAGE HLA-Isolierung
 Spur 1: Marker-Gemisch, Spur 2: HLA-DQ4-Isolat
 Spur 3: Referenz-MHC (HLA-DR1)

Abbildung 7 zeigt exemplarisch die elektrophoretische Auftrennung eines HLA-DQ4-Isolats. Die kräftig ausgeprägte Bande im Bereich 30 kDa in Spur 2 repräsentiert die α - und β -Kette des HLA-DQ-Moleküls, die sich nicht so scharf trennen lassen wie die entsprechenden Untereinheiten des isolierten HLA-DR1-Isolats in Spur 3. Die schwach ausgeprägte Bande in Spur 2 auf Höhe 66 kDa stellt das intakte, nicht vollständig reduzierte HLA-DQ4-Dimer dar.

4.4 Bindungs- und Kompetitionsassay- Vorversuche

In den Vorversuchen sollten die für die Kompetitionsassays mit der Nonapeptidbibliothek optimalen Bedingungen gefunden werden. Die erhaltenen

Messdaten stellen jeweils Mittelwerte von Dreifachbestimmungen dar. Anzumerken ist, dass sich die absoluten Messwerte verschiedener Messplatten nicht miteinander vergleichen lassen, da sie unter anderem von der Qualität des HLA-Isolats abhängig sind. Dies gilt jedoch nicht für die relativen Messwerte, die sich jeweils auf eine Referenz innerhalb einer Messplatte beziehen und somit einen Vergleich erlauben.

4.4.1 Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4

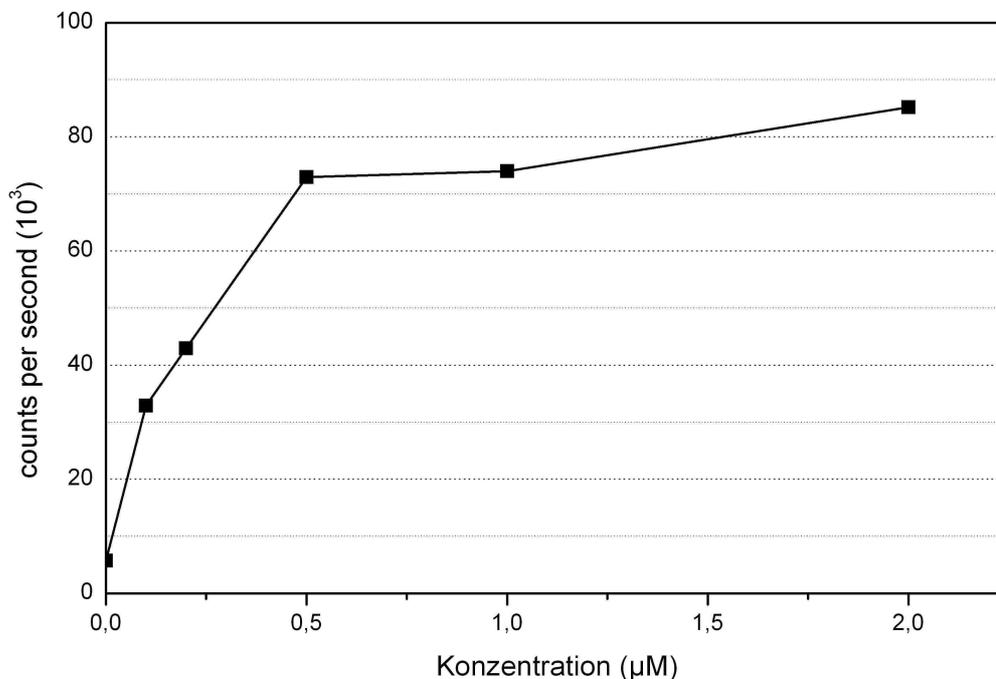


Abbildung 8: Konzentrationsabhängigkeit der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4

Nachdem in Vorversuchen eine Bindung der biotinylierten CLIP-Sequenz 105-117 (die Nummerierung erfolgt nach der p35 Isoform) an HLA-DQ4 nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurde im folgenden die Konzentrationsabhängigkeit dieser Reaktion untersucht.

Die Bindungskurve hat im Bereich bis 0,5 µM eine starke Steigung, flacht dann zunehmend ab und weist eine typische Sättigungskinetik auf. Da berücksichtigt werden musste, dass die Peptidkollektionen in einem noch zu bestimmenden

Überschuss zu dem biotinmarkierten Peptid zugegeben werden sollten, und zu hohe Gesamtpeptidkonzentrationen zur Präzipitation führen können, wurde deshalb für alle weiteren Versuche die Konzentration an Markerpeptid bei 1 μM festgelegt.

4.4.2 pH-Abhängigkeit der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4

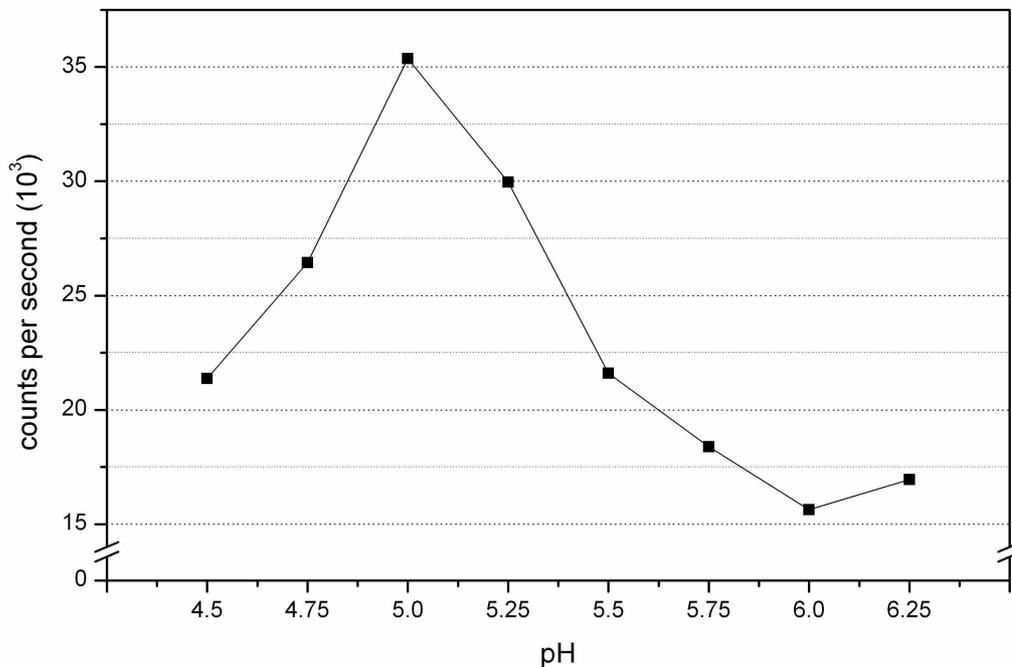


Abbildung 9: pH-Abhängigkeit der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4

Abbildung 9 zeigt die Abhängigkeit der Bindungsstärke vom pH-Wert. Von pH 4,5 bis 5,0 ist dabei ein steiler Anstieg zu verzeichnen. Die höchste Bindungsstärke konnte bei einem pH-Wert von 5,0 festgestellt werden. Eine weitere Erhöhung des pH-Wertes führt jedoch zu einem starken Nachlassen der Bindungsstärke. Für alle weiteren Versuche wurde das pH-Optimum von 5,0 bei der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 beibehalten.

4.4.3 Konkurrenz der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 durch CLIP (105-117)

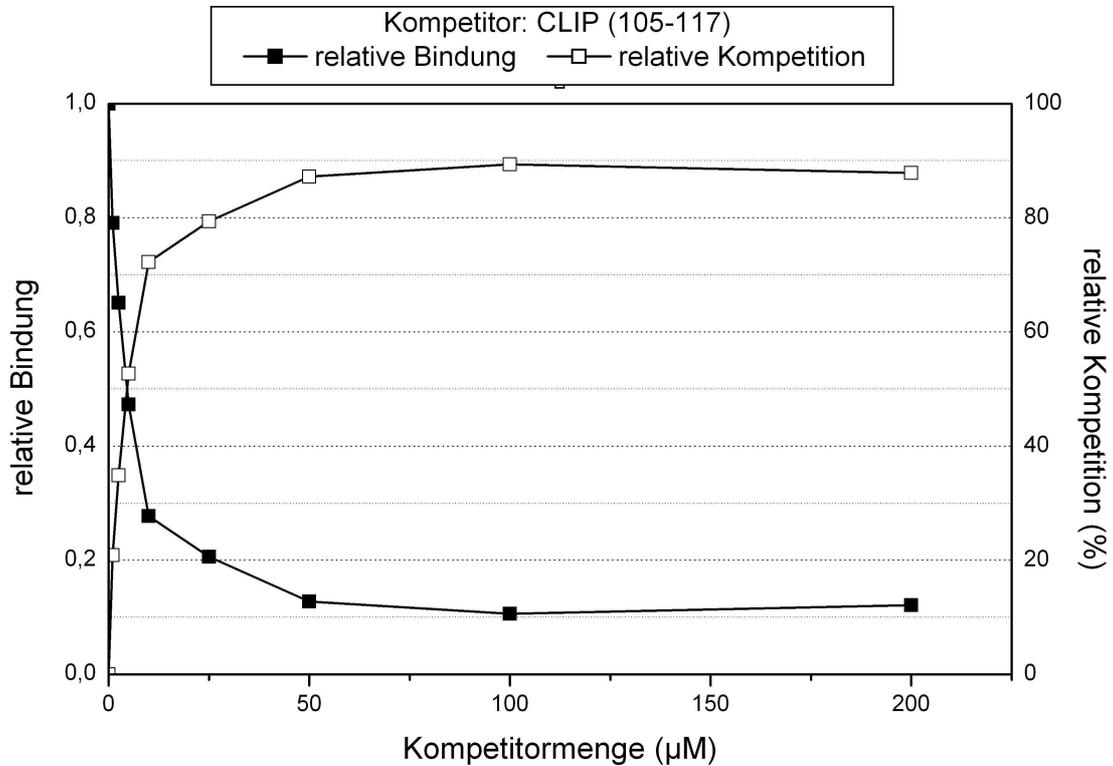


Abbildung 10: Konkurrenz der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 durch CLIP (105-117)

Die Messwerte in Abbildung 10 sind als relative Bindung zu einem Ansatz ohne Kompetitor ermittelt worden. Die relativen Konkurrenzswerte entsprechen der spiegelbildlichen Darstellung der Bindungswerte.

Bereits bei niedriger Kompetitormenge erfolgt ein starker Anstieg der relativen Konkurrenzkurve, die mit weiterer Erhöhung des Kompetitorüberschusses immer flacher wird und schließlich ein Plateau erreicht.

4.4.4 Konkurrenz der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 durch die X₉-Teilbibliothek

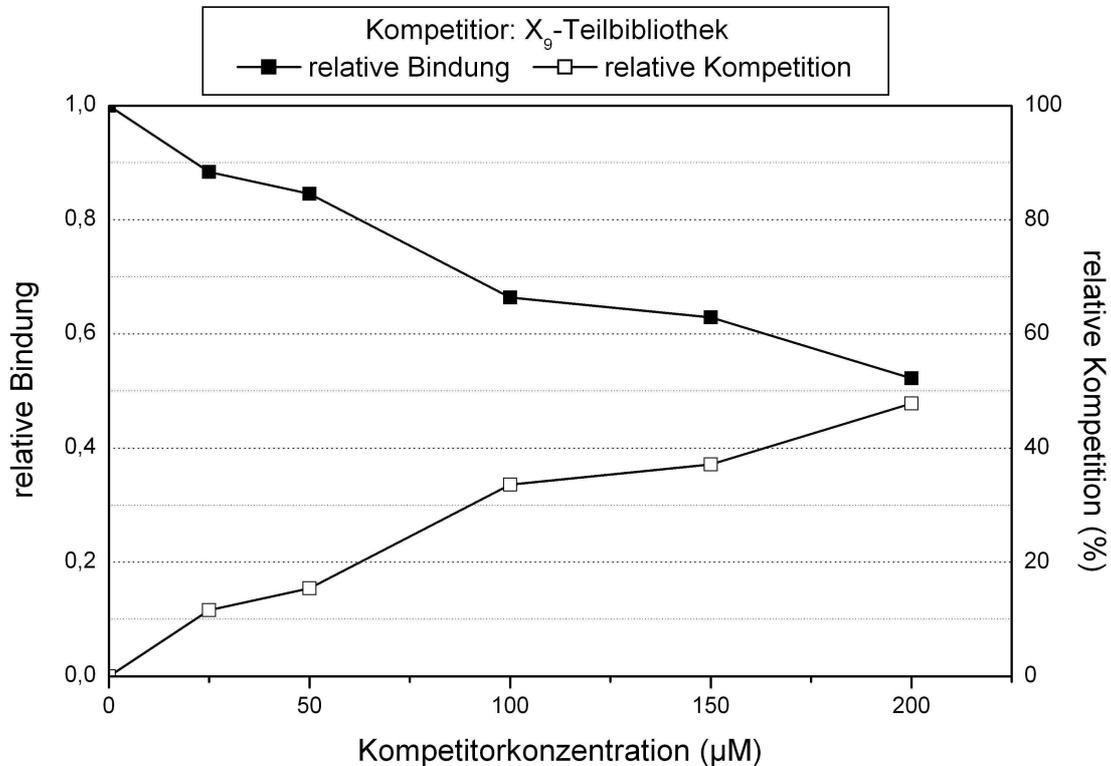


Abbildung 11: Konkurrenz der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 durch die X₉-Teilbibliothek

Die Konkurrenz der Bindung von biot-CLIP (105-117) an HLA-DQ4 durch die völlig randomisierte Teilbibliothek X₉ zeigt konzentrationsabhängig einen annähernd linearen Verlauf. Ein Plateau ist bis zu einer Konzentration von 200 μM nicht zu erkennen.

Messungen oberhalb 200 μM wurden nicht durchgeführt, da die in diesem Fall eingesetzte Gesamtpeptidmenge sehr hoch wäre, was eine HLA-Präzipitation zur Folge haben könnte. Valide Aussagen wären daher nicht mehr möglich.

Eine Konzentration von 150 μM der X₉-Teilbibliothek (entspricht einem 150fachen Überschuss zum Markerpeptid) lieferte sowohl ausreichende Konkurrenz, führte aber nicht zu HLA-Präzipitation und wurde im weiteren Verlauf beibehalten.

4.5 Kompetitionsassays zur Motivbestimmung

Um die Eigenschaften der einzelnen Aminosäuren an den definierten Positionen zu bestimmen, wurden die entsprechenden Teilbibliotheken in 150fachem Überschuss zum biotinylierten Indikatorpeptid mit isolierten HLA-DQ4-Molekülen unter Verwendung der in den Vorversuchen ermittelten Parameter inkubiert. Dabei wurden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt und der daraus resultierende Mittelwert gebildet.

Um die Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Messplatten zu gewährleisten wurde auf jeder Messplatte die Konkurrenz der X₉-Teilbibliothek ermittelt, auf die die Ergebnisse der OX₈-Teilbibliotheken bezogen wurden. Somit konnten experimentell bedingte kleinere Schwankungen zwischen den einzelnen Messplatten ausgeglichen und die gewonnenen Ergebnisse verglichen werden.

Für jede OX₈-Teilbibliothek wurde ein Konkurrenz-Index ermittelt, der sich nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konkurrenz-Index} = (X_9/OX_8) - 1$$

Somit ergeben sich positive Werte, wenn die entsprechende OX₈-Teilbibliothek besser als die X₉-Teilbibliothek bindet, negative Werte hingegen, wenn die Bindung schlechter ist.

Die Ermittlung der Konkurrenz-Indizes aller Teilbibliotheken erfolgte in mindestens zwei voneinander unabhängigen Messreihen. Bei widersprüchlichen Ergebnissen wurden entsprechende Teilbibliotheken ein drittes Mal getestet.

Jede Messreihe wurde mit HLA-Isolaten einer Aufreinigung durchgeführt. Die sehr hohe Sensitivität des verwendeten Europium-Testsystems führt mitunter zu der Tatsache, dass Teilbibliotheken in der ersten Messreihe einen positiven, in der zweiten Testreihe hingegen einen negativen Konkurrenz-Index aufweisen. Sofern dieses Verhalten keine Auswirkungen auf die Bestimmung der Bindungseigenschaft der entsprechenden Teilbibliothek hatte, wurde im allgemeinen auf eine dritte Messung verzichtet.

4.5.1 Position 1

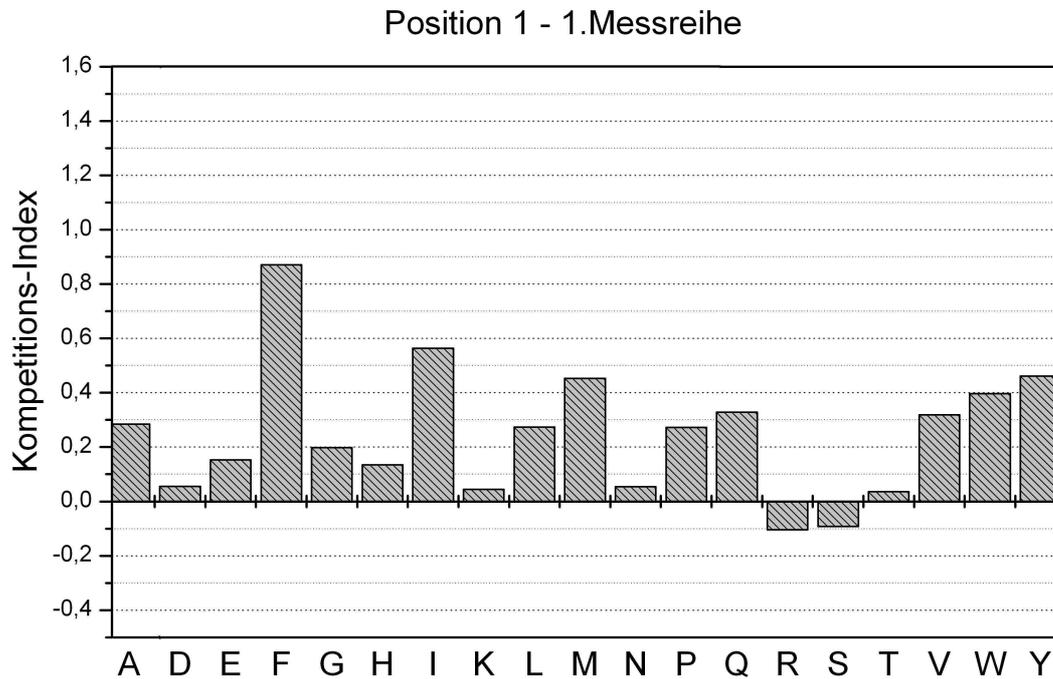


Abbildung 12: Kompetitions-Indizes für OX₈-Teilbibliotheken, 1. Messreihe

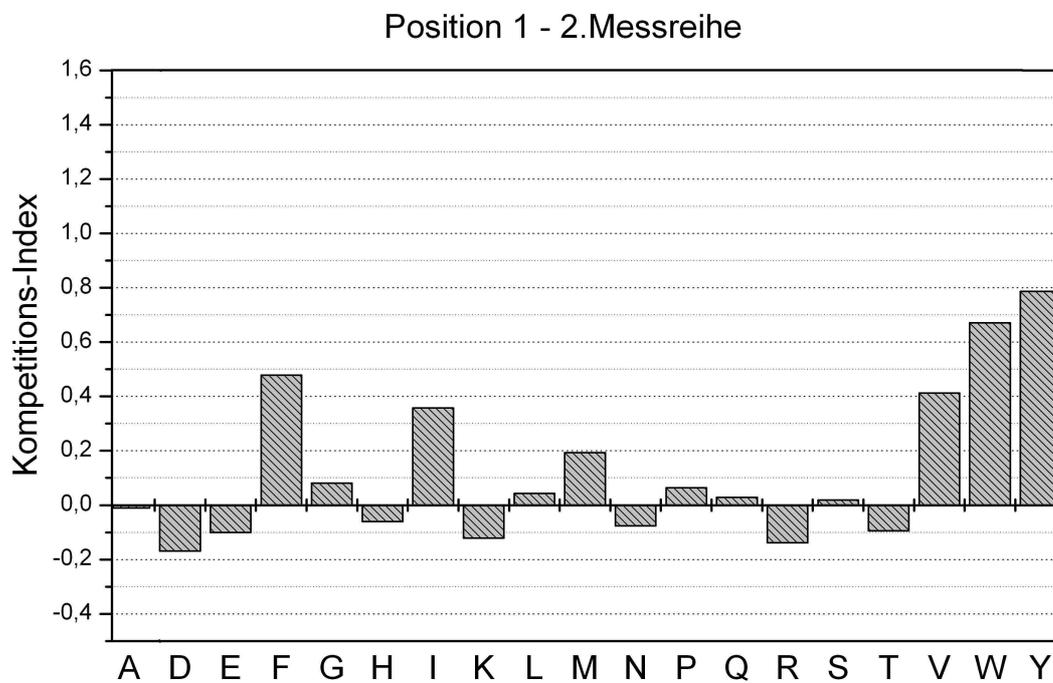


Abbildung 13: Kompetitions-Indizes für OX₈-Teilbibliotheken, 2. Messreihe

Betrachtet man beide Messreihen, so wird deutlich, dass an Position 1 die Teilbibliotheken mit den aromatischen Aminosäuren F, Y, W sowie den hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren V, I, M die höchsten Wettbewerbswerte aufweisen. Die in der ersten Messreihe ebenfalls positiven Wettbewerbs-Indizes für die Aminosäuren A, L, P, Q konnten in der zweiten Messreihe nicht bestätigt werden; sie zeigen hier ein indifferentes Verhalten mit Wettbewerbs-Indizes im Bereich der X₉-Teilbibliothek. Auch die Aminosäuren mit positiv oder negativ geladenen Seitenketten (D, E, H, K, R) zeigen ein indifferentes Verhalten mit schwach positiven Indizes in der ersten und schwach negativen Wettbewerbs-Indizes in der zweiten Messreihe.

Zusammenfassend betrachtet ergibt sich an Position 1 eine Präferenz für Teilbibliotheken mit voluminösen aromatischen oder hydrophoben Aminosäuren.

4.5.2 Position 2

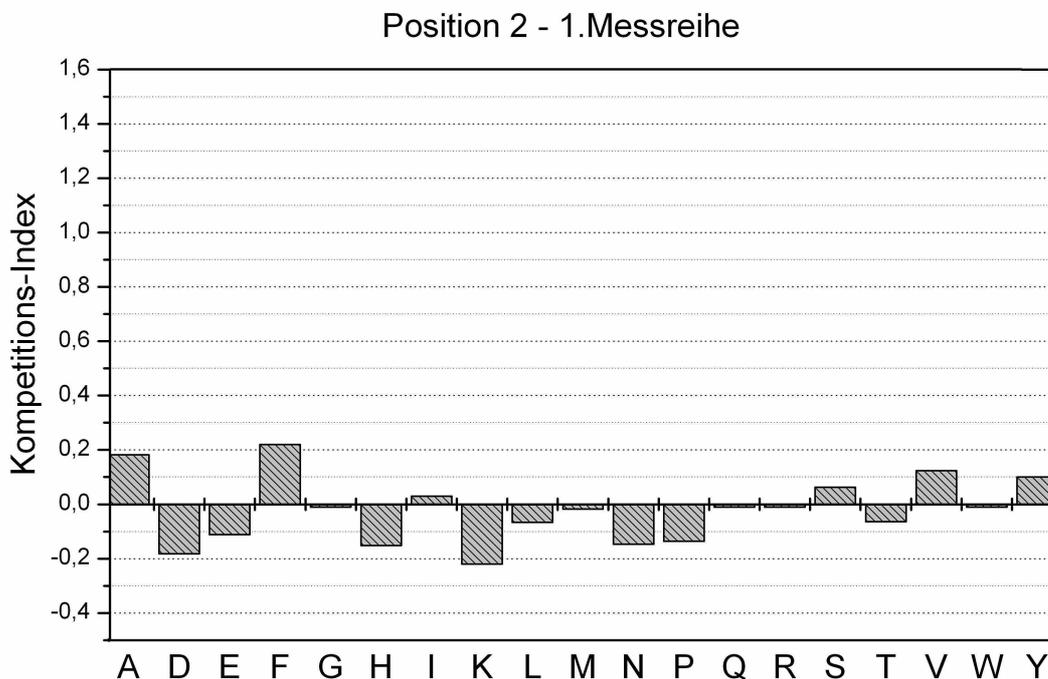


Abbildung 14: Wettbewerbs-Indizes für XOX₇-Teilbibliotheken, 1. Messreihe

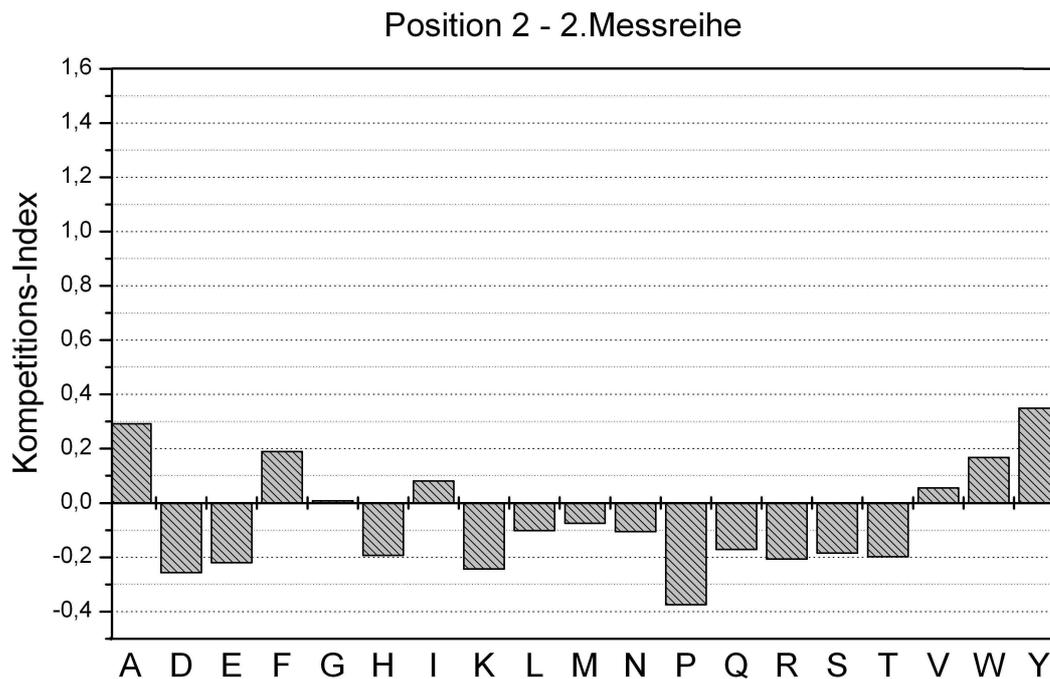


Abbildung 15: Kompetitions-Indizes für XOX₇-Teilbibliotheken, 2. Messreihe

An Position 2 zeigen sich in beiden Messreihen nur sehr gering ausgeprägte Kompetitions-Indizes für die einzelnen Teilbibliotheken. Positive Kompetitions-Indizes konnten in beiden Messreihen für F, Y, I und V sowie für A gezeigt werden. Im Gegensatz zur ersten Messreihe konnte für W in der zweiten Messreihe auch ein positiver Index ermittelt werden. Geladene Aminosäuren zeigen wie schon in Position 1 ein indifferentes Verhalten bzw. weisen negative Indizes auf.

4.5.3 Position 3

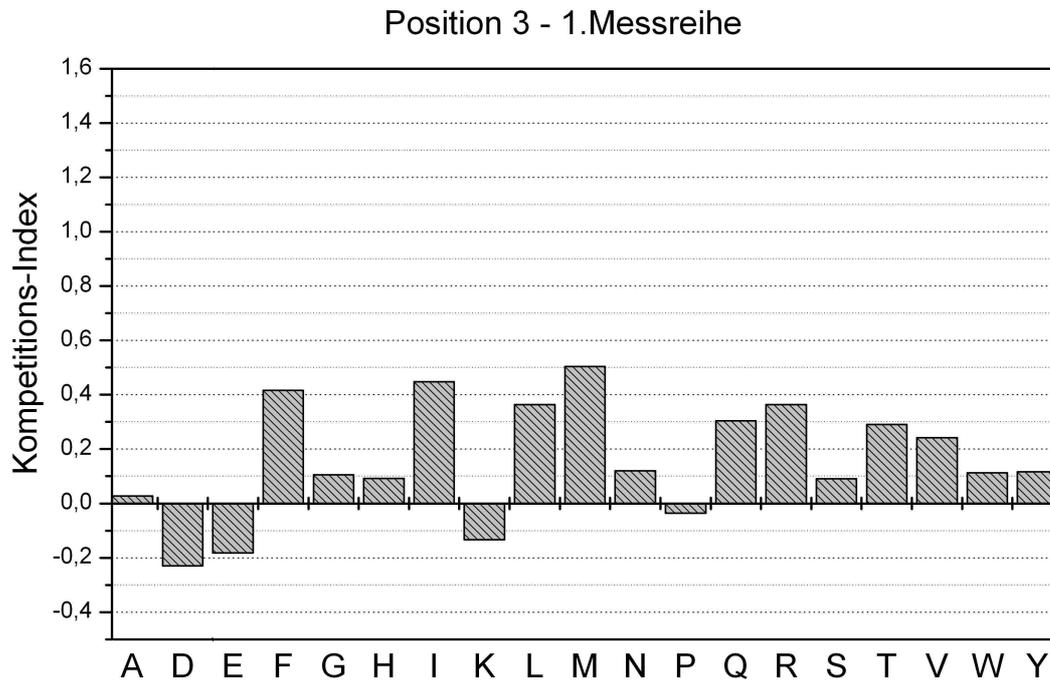


Abbildung 16: Wettbewerbs-Indizes für X_2OX_6 -Teilbibliotheken, 1. Messreihe

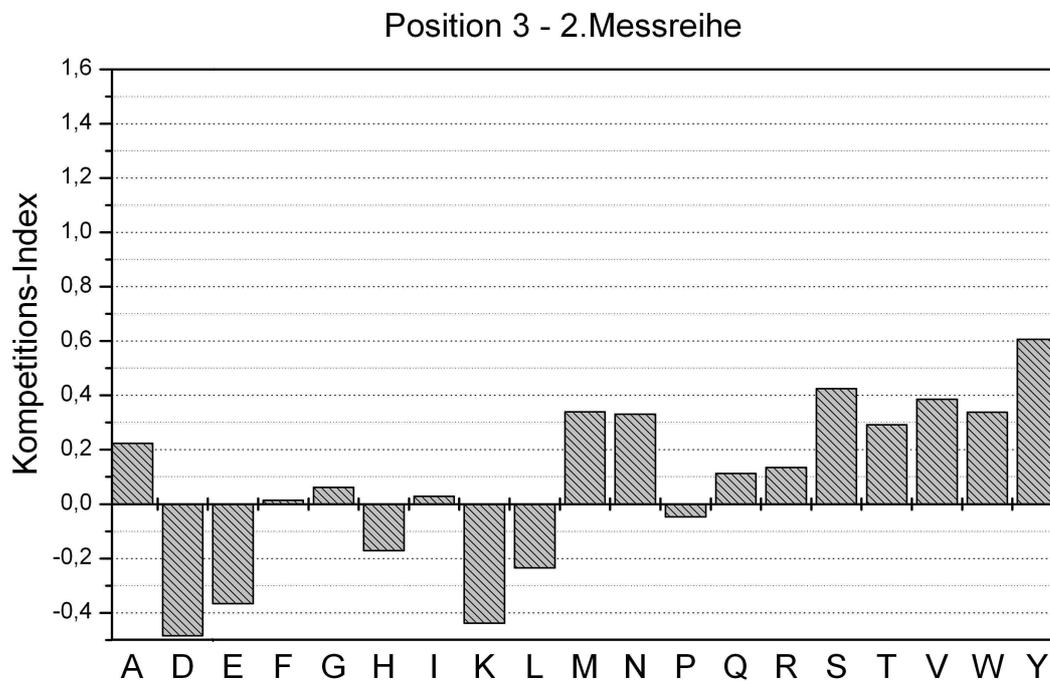


Abbildung 17: Wettbewerbs-Indizes für X_2OX_6 -Teilbibliotheken, 2. Messreihe

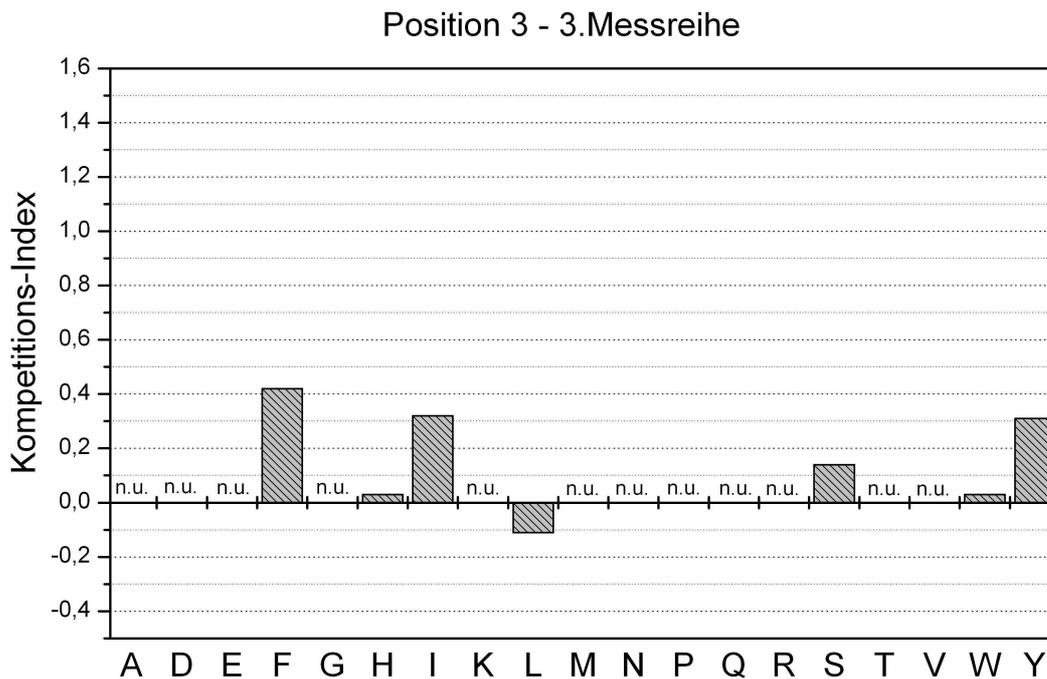


Abbildung 18: Kompetitions-Indizes für X_2OX_6 -Teilbibliotheken, 3. Messreihe

In den ersten beiden Messreihen weisen die kleinen Aminosäuren A und G schwach positive, die geladenen Aminosäuren D, E und K sowie die Aminosäure P hingegen negative Indizes auf.

Die positiven Kompetitions-Indizes für F und I in der ersten Messreihe wurden in der zweiten Messreihe nicht wiedergefunden, konnten aber in einer dritten Messung wieder gezeigt werden. Auch der positive Index für L konnte in den darauffolgenden Messungen nicht mehr bestätigt werden; er war zweimal negativ.

Die aromatischen Aminosäuren W und Y liefern durchweg positive Indizes, die allerdings in den einzelnen Messreihen verschieden stark ausgeprägt sind.

Trotz drei durchgeführter Messungen sind die Ergebnisse für die Kompetitionsfähigkeit der X_2OX_6 -Teilbibliotheken sehr uneinheitlich, so dass diese Werte eher unter Vorbehalt zu betrachten sind.

4.5.4 Position 4

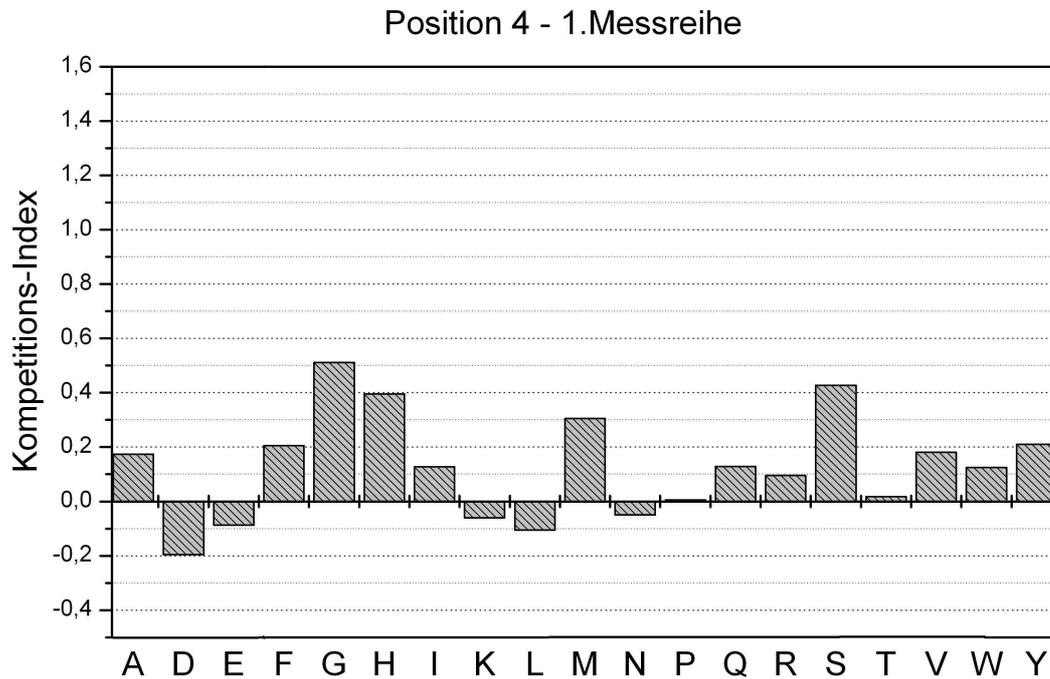


Abbildung 19: Wettbewerbs-Indizes für X_3OX_5 -Teilbibliotheken, 1. Messreihe

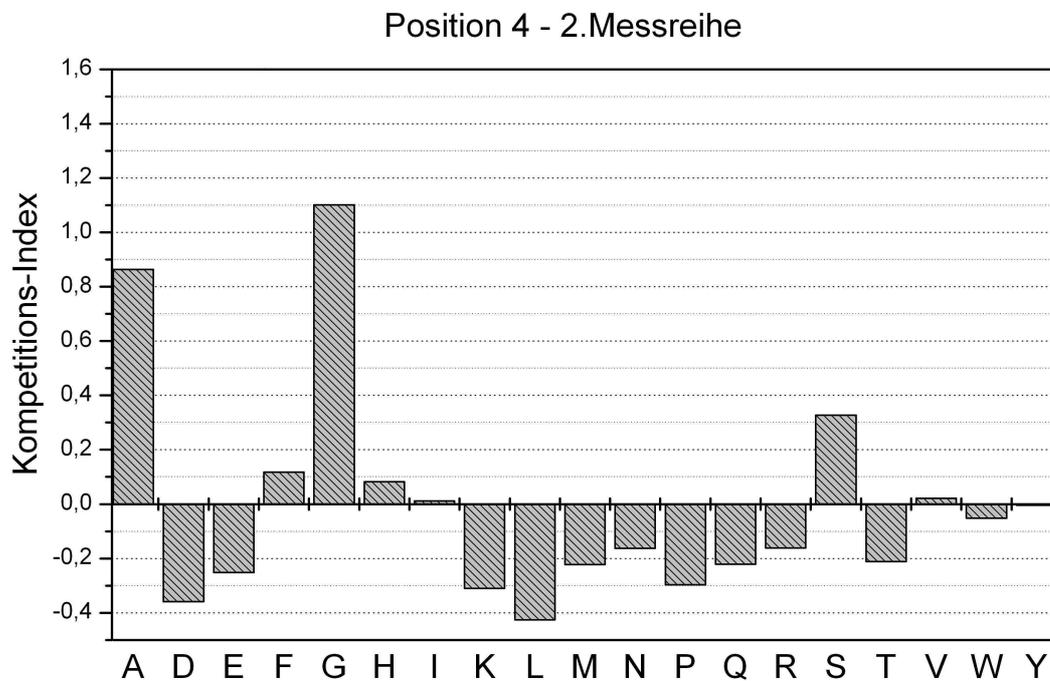


Abbildung 20: Wettbewerbs-Indizes für X_3OX_5 -Teilbibliotheken, 2. Messreihe

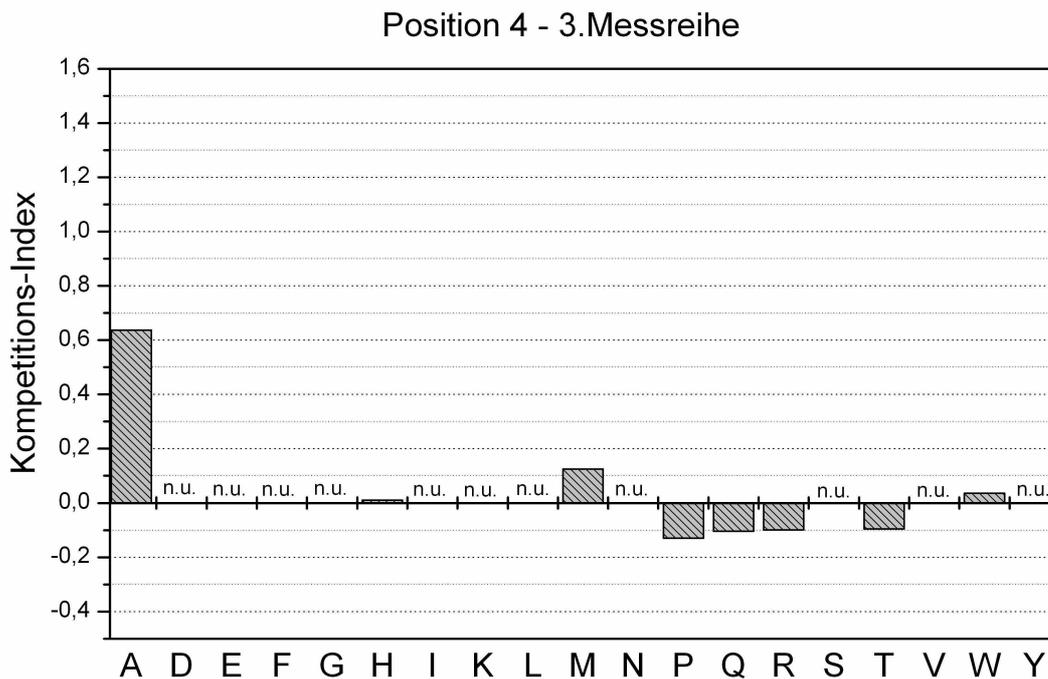


Abbildung 21: Kompetitions-Indizes für X_3OX_5 -Teilbibliotheken, 3. Messreihe

Teilbibliotheken mit den kleinen Aminosäuren Glycin und Serin an Position 4 zeigen sowohl in der ersten als auch in der zweiten Messreihe die höchsten Kompetitionswerte. Der hohe Kompetitions-Index für die Aminosäure Alanin aus der zweiten Messreihe konnte in der dritten Messung bestätigt werden.

Die Aminosäuren H, M, P, Q, R, T und W, die in den ersten beiden Messreihen keine eindeutigen Ergebnisse zeigten, wurden einer dritten Messung unterzogen.

Der positive Kompetitions-Index von X_3HX_5 in der ersten Messreihe konnte in den beiden darauffolgenden Messreihen nicht mehr bestätigt werden, es zeigte sich in der dritten Messung ein Index nahe 0. Die negativen Indizes der Teilbibliotheken mit den Aminosäuren P, Q, R und T an der definierten Position, die in Messreihe 2 ermittelt wurden, konnten in der dritten Messung bestätigt werden.

Die in der ersten Messung noch schwach positiven Indizes für V, W, Y wurden in den beiden folgenden Messreihen nicht mehr bestätigt, es zeigte sich ein indifferentes Verhalten.

Ein unklares Verhalten zeigt die Teilbibliothek X_3MX_5 , die in drei voneinander unabhängigen Versuchen jeweils unterschiedliche Ergebnisse lieferte. In den Messreihen zwei und drei lagen die Kompletions-Indizes im Bereich der X_9 -Bibliothek.

Fasst man die Ergebnisse aller drei Messreihen zusammen, so zeigt sich an Position 4 die eindeutige Bevorzugung sehr kleiner Aminosäuren, mit den höchsten Indizes für die beiden aliphatischen Aminosäuren Glycin und Alanin, gefolgt von der neutralen Aminosäure Serin.

4.5.5 Position 5

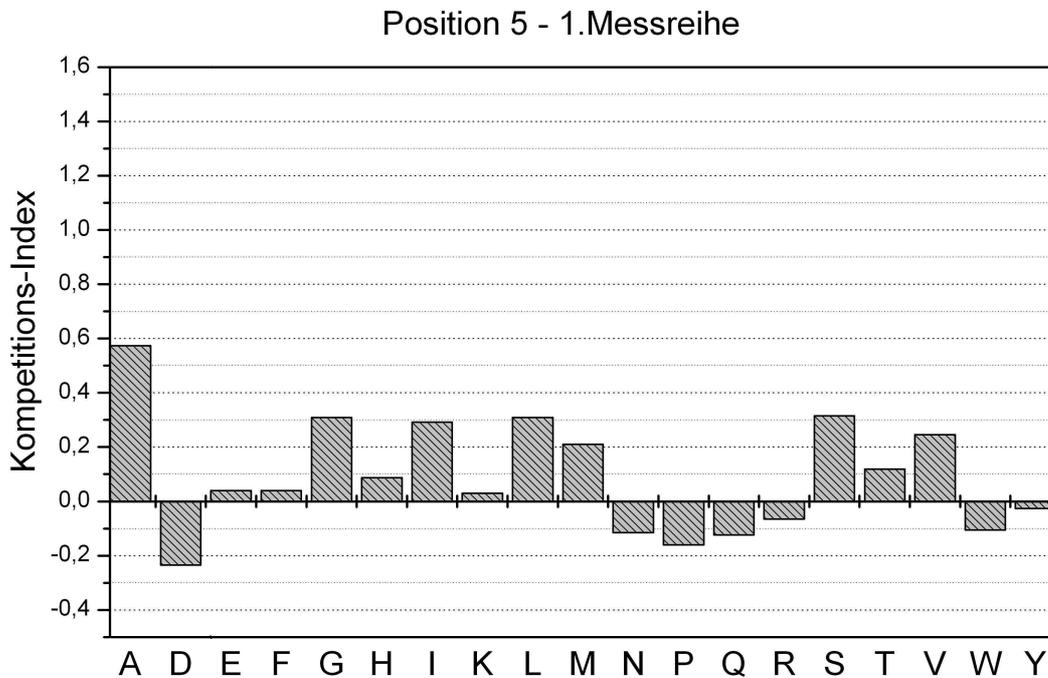


Abbildung 22: Kompletions-Indizes für X_4OX_4 -Teilbibliotheken, 1. Messreihe

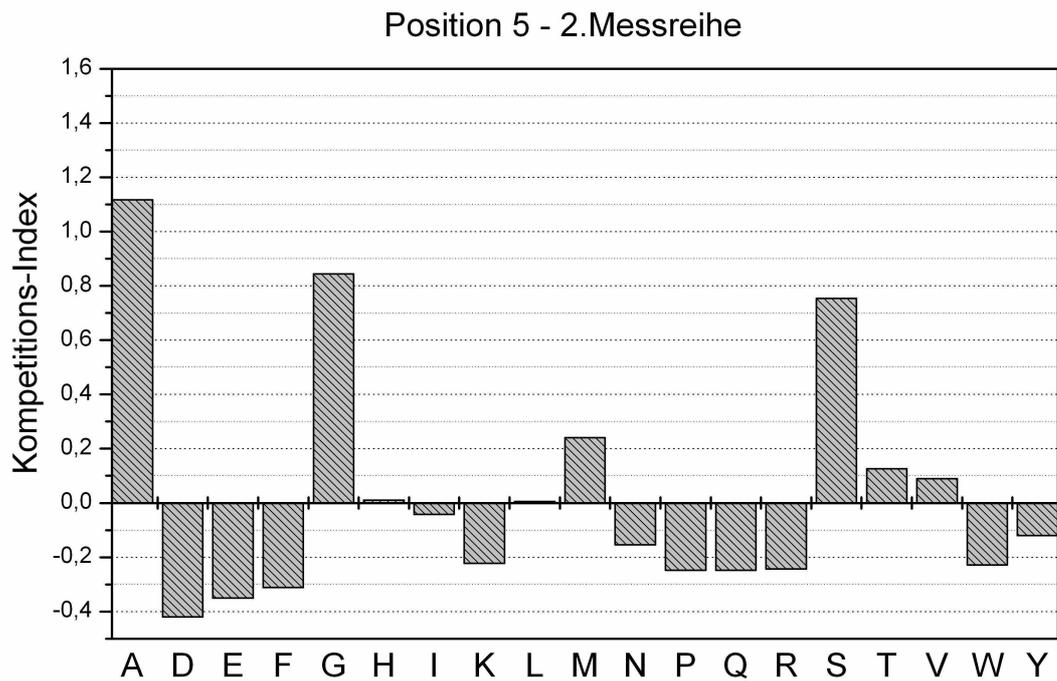


Abbildung 23: Wettbewerbs-Indizes für X₄OX₄-Teilbibliotheken, 2. Messreihe

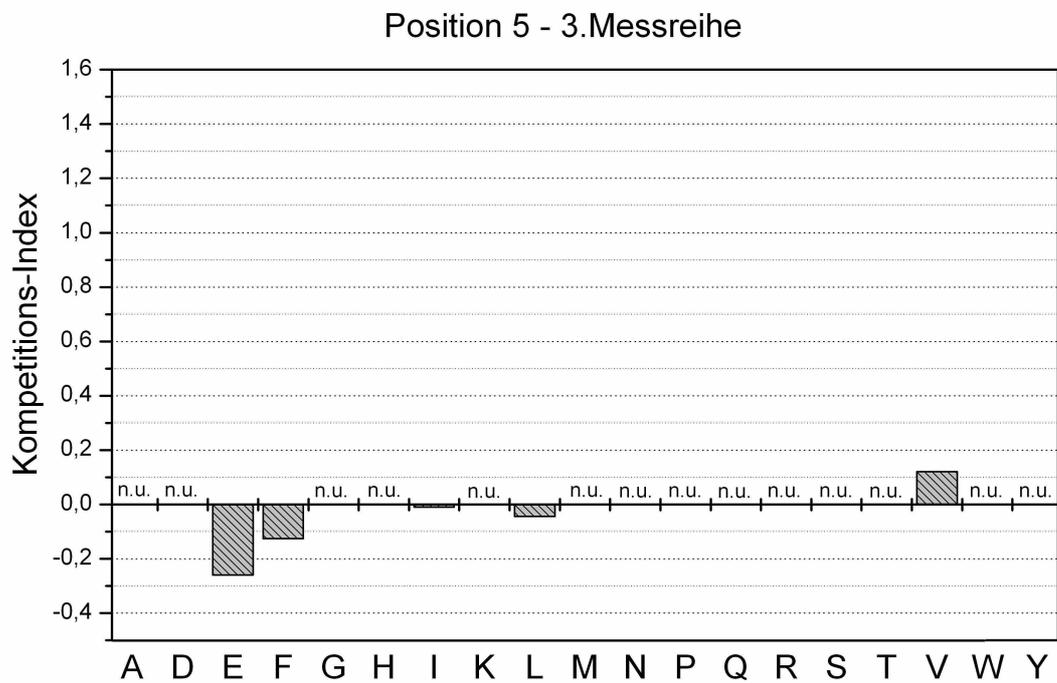


Abbildung 24: Wettbewerbs-Indizes für X₄OX₄-Teilbibliotheken, 3. Messreihe

Position 5 liefert ein ähnliches Bild wie Position 4. Auch hier bestätigte die zweite Messreihe die positiven Kompetitionswerte der kleinen Aminosäuren A, G und S, die hier ganz eindeutig das Bindungsverhalten dominieren.

Die negativen Kompetitions-Indizes von F, I und L aus der zweiten Messreihe wurden in der dritten Messung bestätigt. Somit können die positiven Indizes aus der ersten Messreihe nicht weiter aufrechterhalten werden.

Für die beiden negativ geladenen Aminosäuren D und E wurden in den Messreihen eins und zwei bzw. zwei und drei jeweils negative Kompetitions-Indizes ermittelt.

4.5.6 Position 6

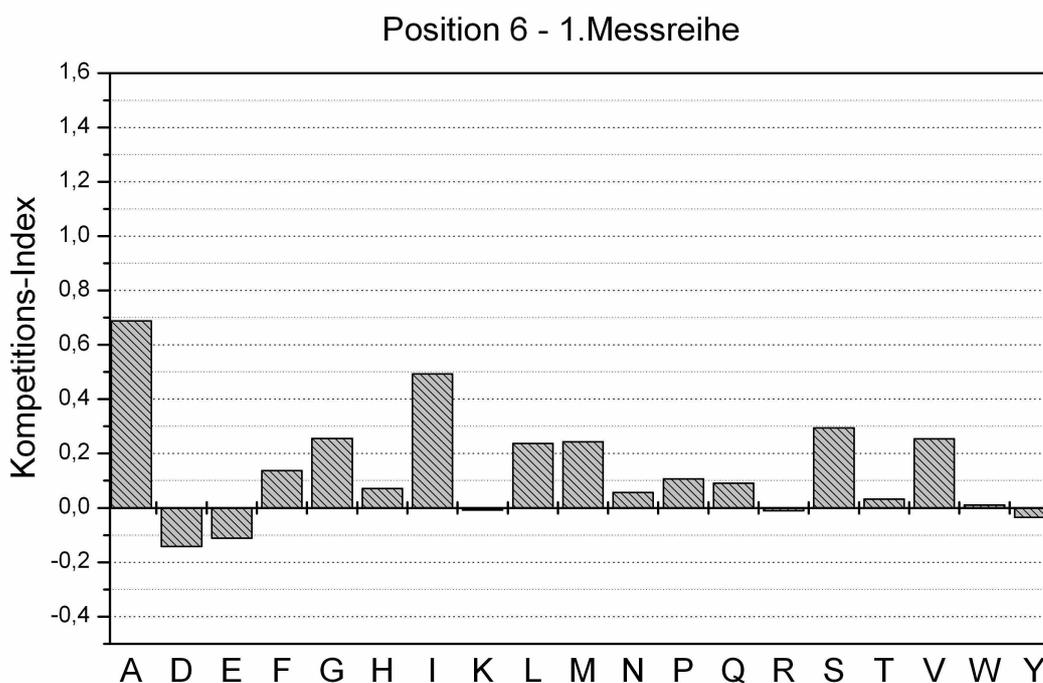


Abbildung 25: Kompetitions-Indizes für X_5OX_3 -Teilbibliotheken, 1. Messreihe

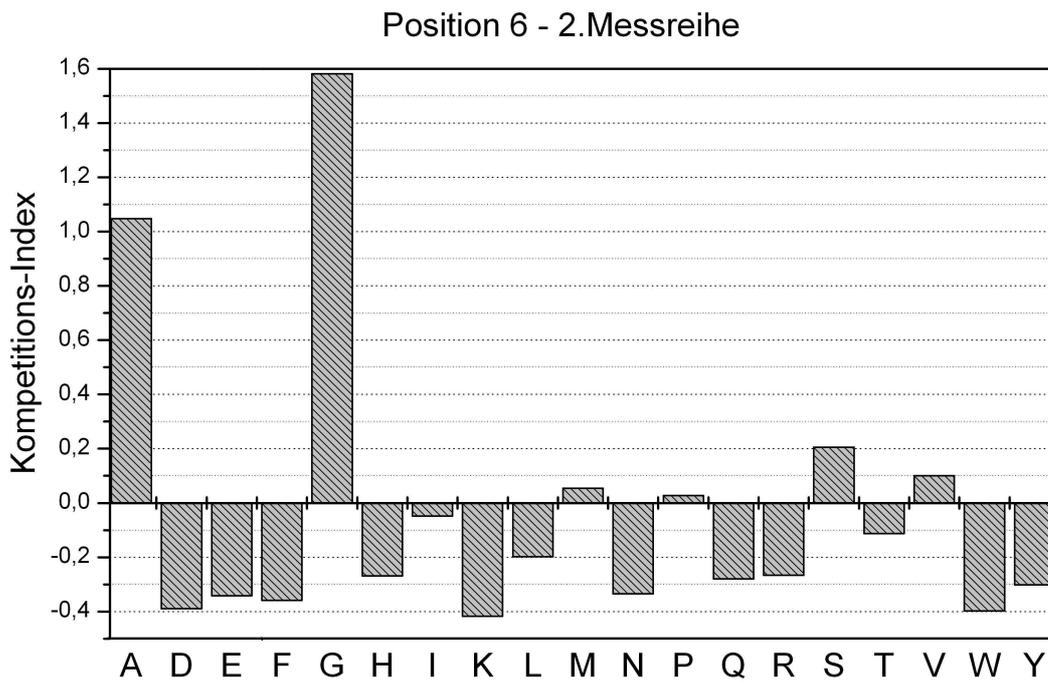


Abbildung 26: Kompetitions-Indizes für X_5OX_3 -Teilbibliotheken, 2. Messreihe

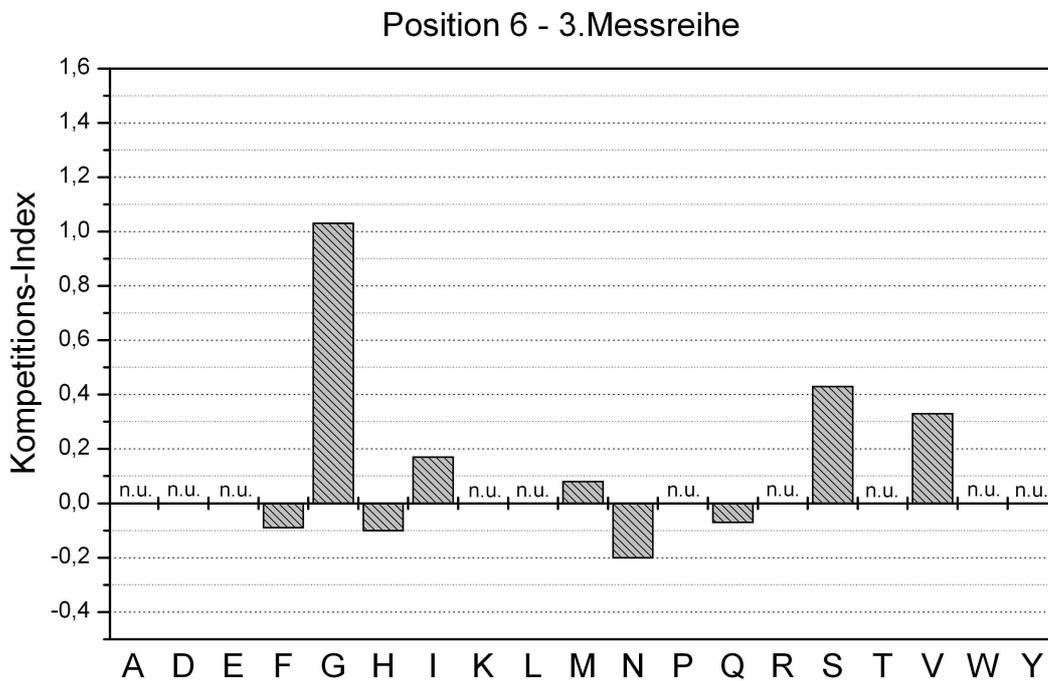


Abbildung 27: Kompetitions-Indizes für X_5OX_3 -Teilbibliotheken, 3. Messreihe

An Position 6 konnten in der ersten und zweiten Messreihe für A sowie in der zweiten und dritten Messreihe für G stark positive Wettbewerbs-Indizes gezeigt werden. Der ebenfalls hoch positive Index für I aus der ersten Messreihe wurde in den beiden folgenden Versuchen nicht mehr bestätigt; er bewegte sich im Bereich der X_9 -Teilbibliothek. Die schwach positiven Indizes für S und V wurden hingegen in allen drei Messreihen wiedergefunden. Mit der dritten Messreihe konnte auch der negative Wettbewerbswert für die Aminosäuren F, H, M, N und Q aus der zweiten Messung bestätigt werden. L, in der ersten Messreihe noch positiv, lieferte im zweiten Versuch einen schwach negativen Wert. In der dritten Messreihe konnte lediglich ein Wettbewerbs-Index nahe Null ermittelt werden, so dass Leucin somit als gut bindende Aminosäure an Position 6 ausscheidet. Unter Berücksichtigung aller drei Messreihen lässt sich an Position 6 die eindeutige Dominanz der beiden kleinen Aminosäuren G und A im Wettbewerbsvermögen der X_5OX_3 -Teilbibliotheken erkennen.

4.5.7 Position 7

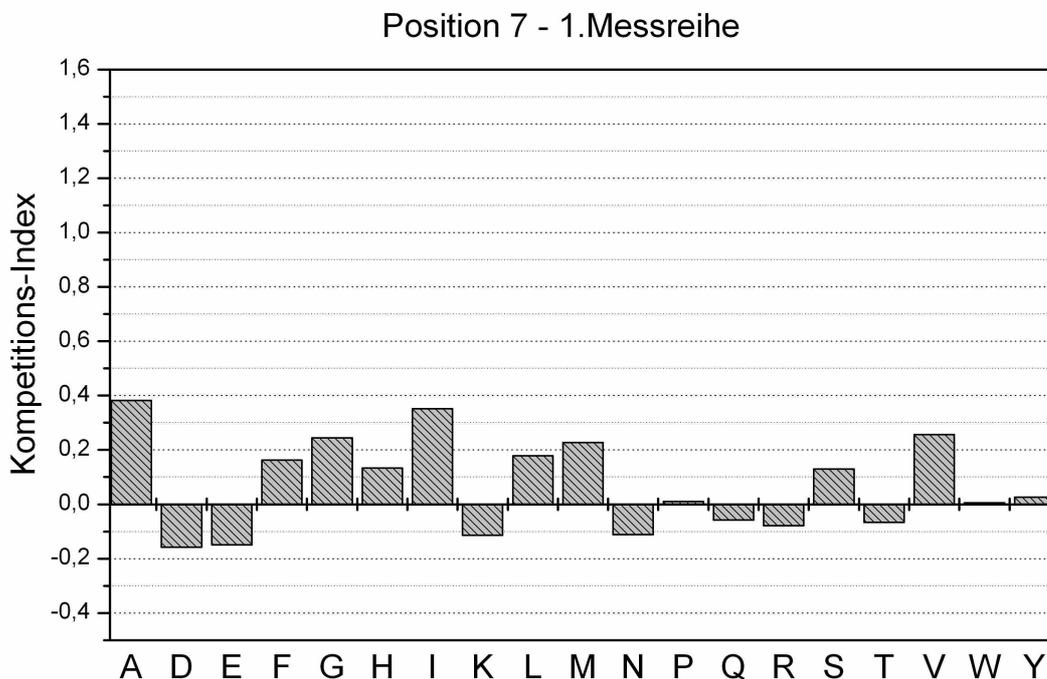


Abbildung 28: Wettbewerbs-Indizes für X_6OX_2 -Teilbibliotheken, 1. Messreihe

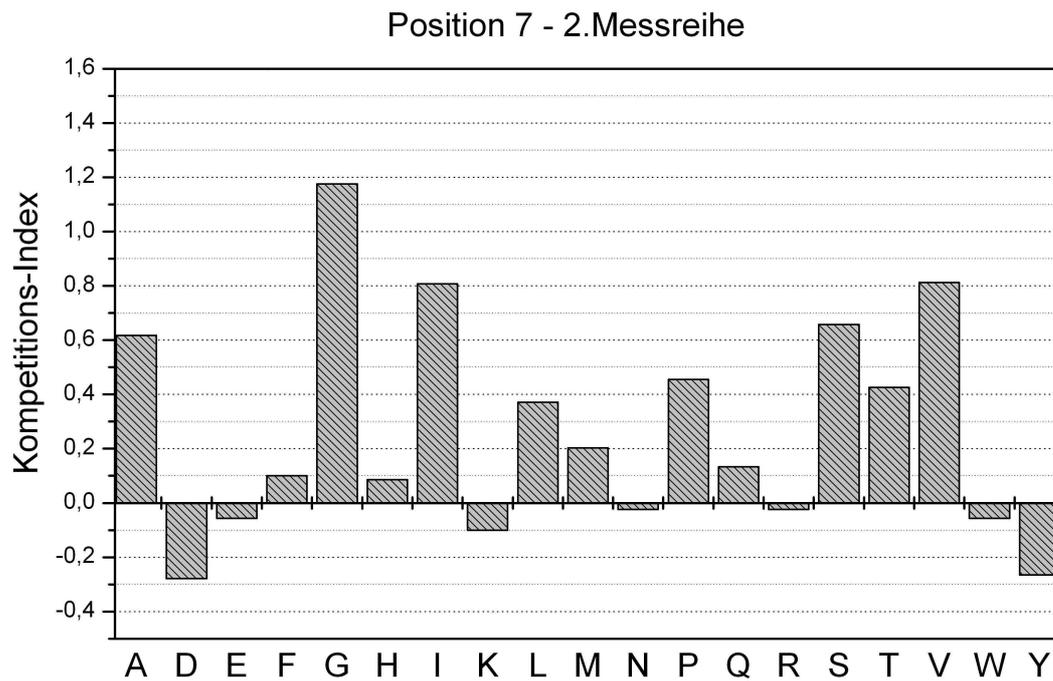


Abbildung 29: Kompetitions-Indizes für X_6OX_2 -Teilbibliotheken, 2. Messreihe

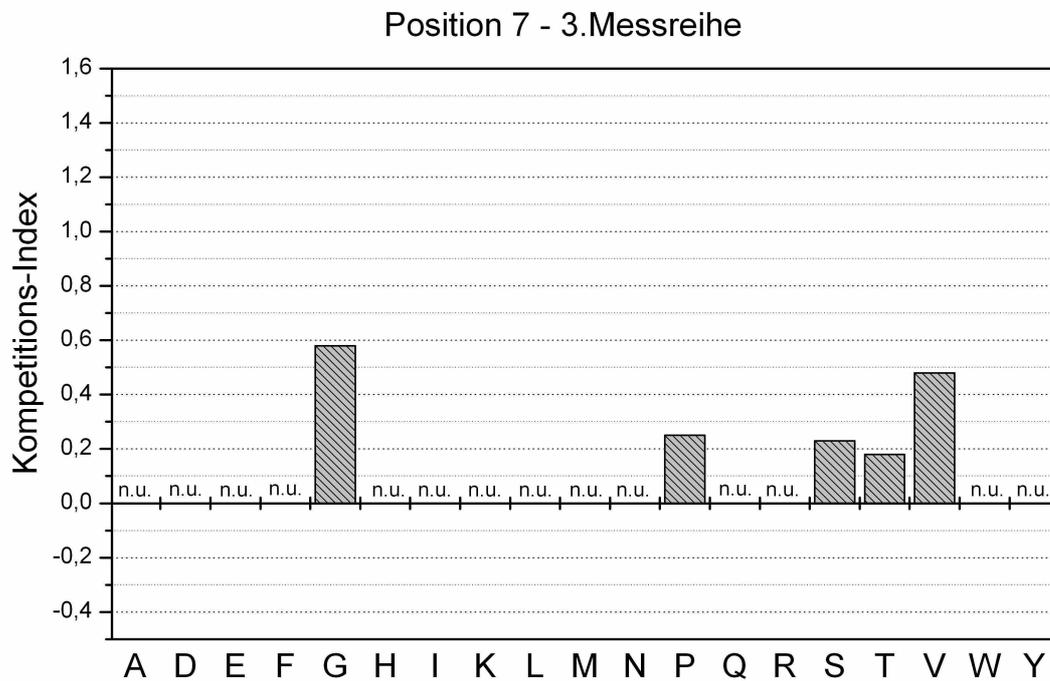


Abbildung 30: Kompetitions-Indizes für X_6OX_2 -Teilbibliotheken, 3. Messreihe

An Position 7 zeigen Teilbibliotheken mit den Aminosäuren A, G, V, I und S in zwei Messreihen die beste Fähigkeit zur Konkurrenz. Negativ auf das Bindungsverhalten wirken sich sowohl geladene (D, E, K und R) als auch aromatische Reste (F, W, und Y) aus.

4.5.8 Position 8

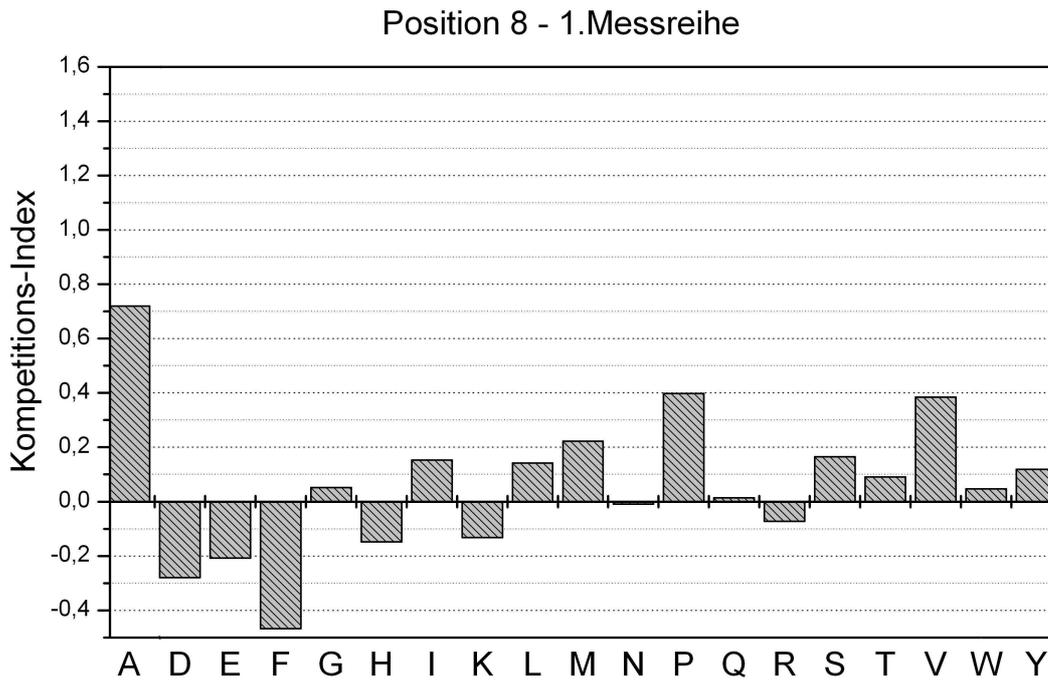


Abbildung 31: Kompetitions-Indizes für X₇OX-Teilbibliotheken, 1. Messreihe

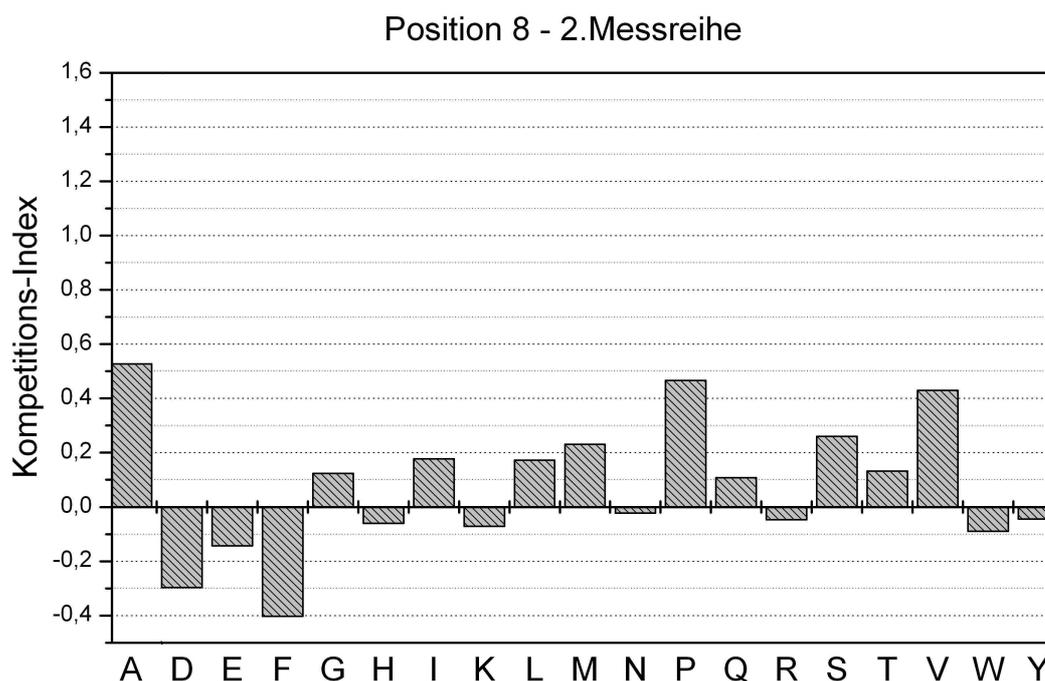


Abbildung 32: Kompetitions-Indizes für X₇OX-Teilbibliotheken, 2. Messreihe

In beiden Messreihen zeigt sich, dass an Position 8 die Teilbibliotheken mit den Aminosäuren A, P und V die höchsten Kompetitionswerte aufweisen. Negativ auf die Kompetitionsfähigkeit wirkt sich hingegen das Vorhandensein der negativ geladenen Aminosäuren D und E, sowie der großen, aromatischen Aminosäure F, aus.

4.5.9 Position 9

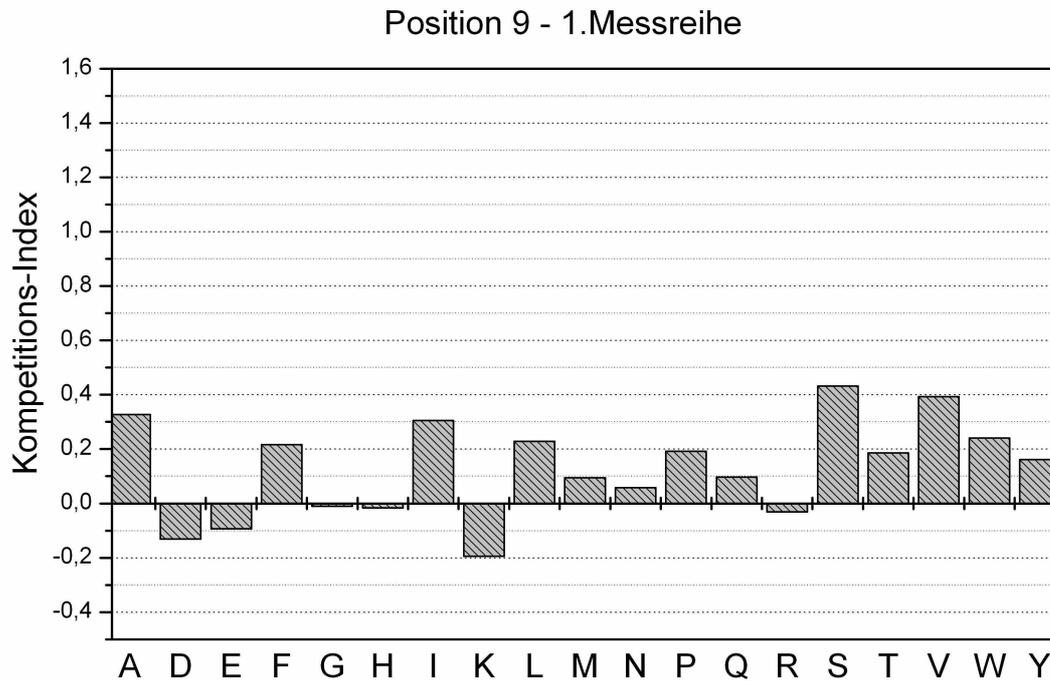


Abbildung 33: Kompetitions-Indizes für X₈O-Teilbibliotheken, 1. Messreihe

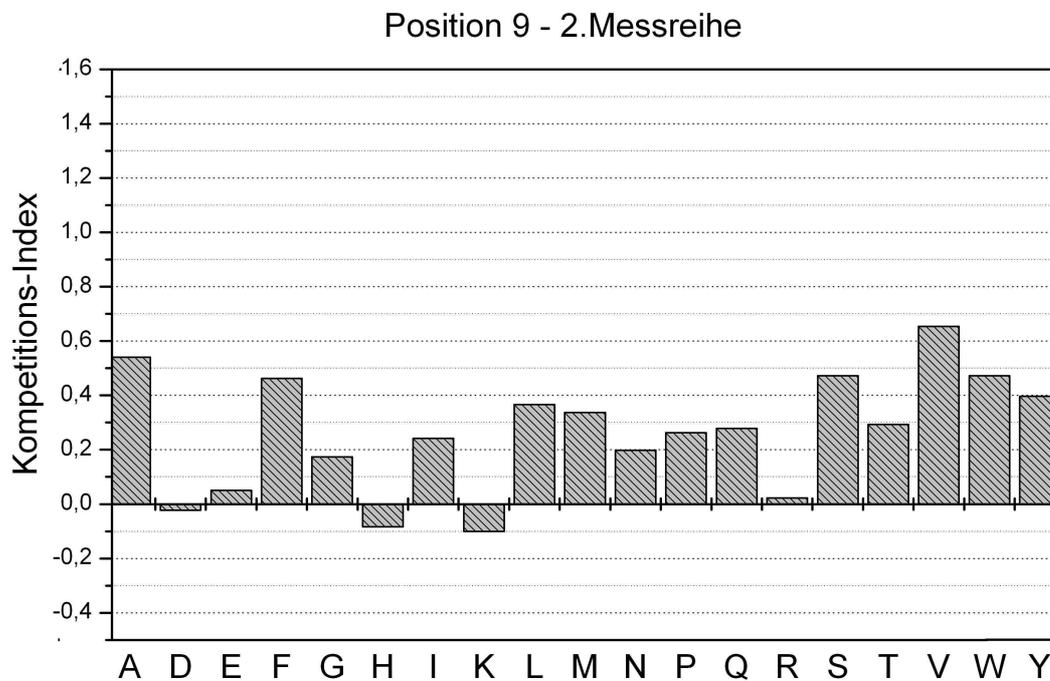


Abbildung 34: Kompetitions-Indizes für X₈O-Teilbibliotheken, 2. Messreihe

An Position 9 binden Teilbibliotheken mit aromatischen (F, W und Y) oder hydrophoben Aminosäuren (L, M, V) besonders gut. Auch die beiden kleinen Aminosäuren A und S weisen einen hohen Kompletions-Index auf.

Geladene Aminosäuren (D, E, H, K und R) zeigen einen schwach negativen bzw. indifferenten Einfluss auf die Bindung der entsprechenden Teilbibliothek.

4.6 Kompletionsassays mit definierten Nonapeptiden

Basierend auf den Ergebnissen, die in Versuchen mit der Nonapeptidbibliothek gewonnen wurden, wurde das Verhalten aller Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in die Kategorien aktiv, indifferent und inaktiv eingeteilt. Als aktiv wurden Aminosäuren klassifiziert, die hoch positive Kompletions-Indizes zeigten, also gute Bindungseigenschaften besitzen. Ergaben sich stark negative Indizes – konnte die Teilbibliothek also nicht binden - wurde die entsprechende Aminosäure als inaktiv bewertet. Aminosäuren, die lediglich schwach positive oder schwach negative Indizes aufwiesen; deren Bindungsfähigkeit sich kaum von der der X₉-Teilbibliothek unterschied, wurden als indifferent bezeichnet. Dabei wurden die Ergebnisse der zweiten und, sofern vorhanden, dritten Messreihe besonders berücksichtigt, da unklare Ergebnisse oftmals nur durch diese Werte genauer bestimmt werden konnten.

Position	1	2	3	4	5	6	7	8	9
aktiv	Y W F V I M	Y A F W	Y S V W N T	A G S	A G S	G A	G I V A S	A P V	V A F S W Y L M
indifferent	A G H L P Q S T N	G I L M N V	A F G I M P Q R	F H I N R V W Y	M T V H I L N Y	I L M P S T V	P T L M Q E F H K N S W	G H I K L M N Q R S T W Y	E G I N P Q R T
inaktiv	D R K E	P D K E R H Q S T	D E K L H	L D K E P M Q T	F E P Q R D K W	D E F H K N Q R W Y	D Y	D E F	D H K

Tabelle 2: Einteilung des Kompletionsverhaltens der einzelnen Teilbibliotheken in die drei Kategorien aktiv, indifferent und inaktiv

Aus den Aminosäuren jeder Kategorie wurden Nonapeptide mit definierter Sequenz synthetisiert. Dabei wurden die Aminosäuren an der entsprechenden Position aus Tabelle 2 zufällig ausgewählt.

Aus der Kategorie der aktiven Aminosäuren wurden 15 Peptide synthetisiert, aus den Kategorien der indifferenten bzw. inaktiven Aminosäuren wurden je 3 Sequenzen zusammengestellt.

Alle Nonapeptide wurden als Peptidamide mit acetyliertem C-Terminus synthetisiert.

Gruppe 1 (aktiv)	Gruppe 2 (indifferent)	Gruppe 3 (inaktiv)
FAWASGIPW	AVMITMHRT	DPDLFEDFK
YWNGSAVAM	PLRFHSNIR	KDHDWDYED
MYTSGGAVL	TGIVNVWMT	ESKERFDEK
VAYGSGIAW		
WFNSAAGPS		
IFVAAASPL		
WYTASGIVV		
IWVSAGSVF		
YFTGSGIAW		
MYWVGASPY		
FATGAGIVS		
MFWGSAIAV		
VWNASGVAW		
WASGGaipV		
YYSgagVPM		

Tabelle 3: Sequenzen der zufällig zusammengestellten Nonapeptide

Zusätzlich zu den in Tabelle 3 aufgeführten Peptiden wurden zwei weitere Sequenzen synthetisiert:

YYYGAGGAV: beinhaltet ausschließlich Aminosäuren der in der zweiten Messreihe am stärksten kompetitierenden Teilbibliotheken.

YASASGIPF: beinhaltet Aminosäuren, die an benachbarten Positionen hohe Kompetitions-Indizes aufweisen. Damit sollte exemplarisch untersucht werden, inwieweit das Phänomen der translationalen Invarianz (Definition siehe S.70) Einfluss auf die Bindungsfähigkeit hat.

Mit dem bereits etablierten Europium-Immunofluoreszenz-Assay wurde die Affinität dieser Peptide zu HLA-DQ4 gemessen. Dabei wurde wieder auf das Prinzip des Kompetitionsassays zurückgegriffen und biotinmarkiertes CLIP (105-117) als Indikatorpeptid verwendet. Die Konzentration des Indikatorpeptids lag bei 1 μ M, die Peptide wurden dazu in vierfachem Überschuss in einer Konzentration von 4 μ M eingesetzt. Zusätzlich wurde die Kompetitionsfähigkeit der X₉-Teilbibliothek sowie des unbiotinylierten CLIP (105-117) in dieser Konzentration bestimmt.

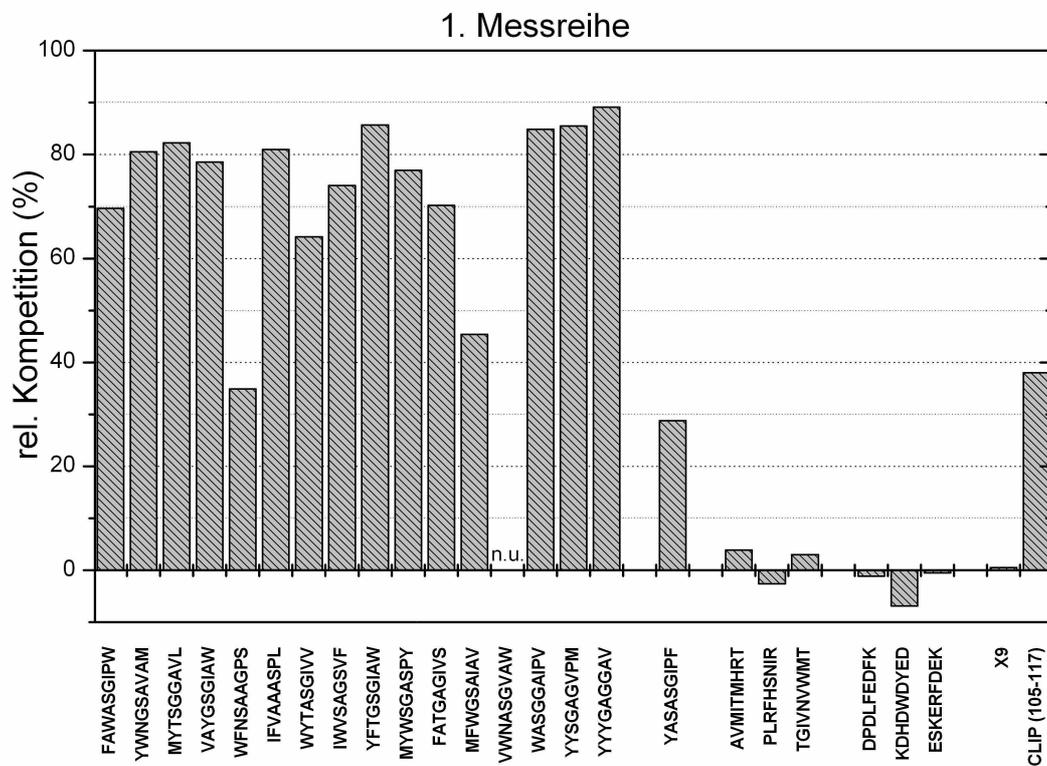


Abbildung 35: Relative Competition definierter Nonapeptide, 1. Messreihe

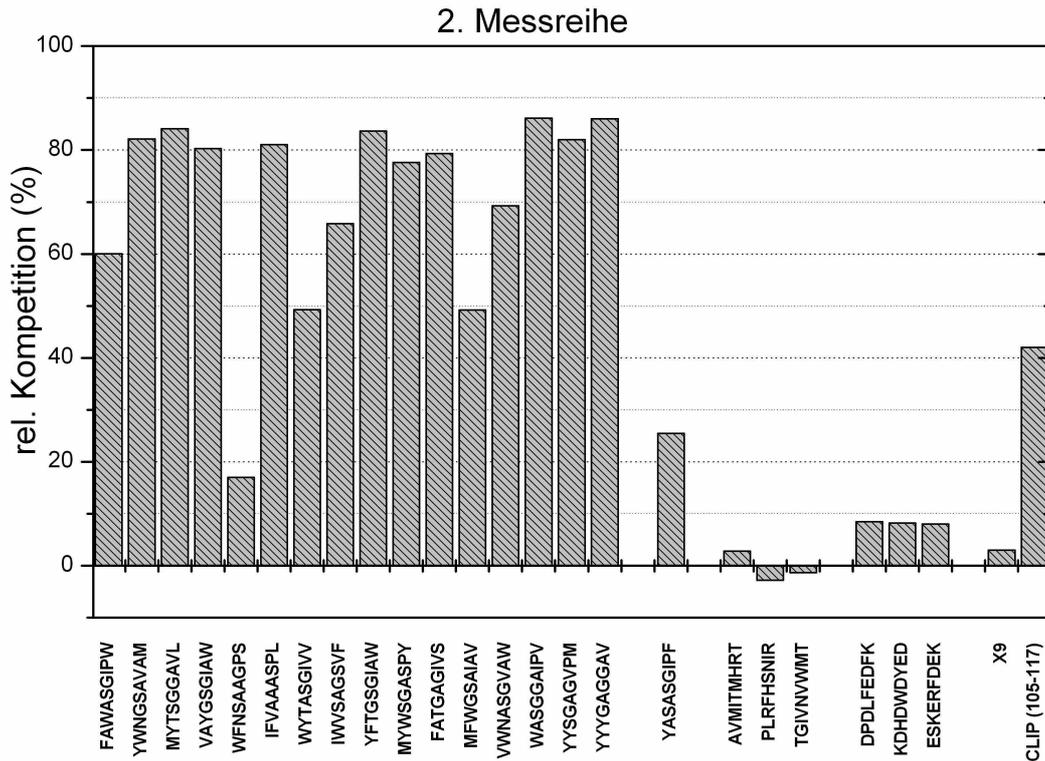


Abbildung 36: Relative Competition definierter Nonapeptide, 2. Messreihe

Peptide der Gruppe 1 zeigen bereits bei vierfachem Überschuss eine relative Competition von bis zu 90%. Die Maximalwerte werden durch das Peptid YYYGAGGAV erreicht, das aus den am besten bindenden Aminosäuren zusammengesetzt wurde. Allerdings liefern auch völlig randomisiert zusammengestellte Sequenzen dieser Gruppe Competitionswerte, die sich nur geringfügig unter dem Maximalwert bewegen.

Mit einer Ausnahme zeigen alle Sequenzen der Gruppe 1 eine zum Teil deutlich höhere Affinität zu HLA-DQ4 als CLIP (105-117).

Eine Ausnahme im Competitionsverhalten bildet das Peptid mit der Sequenz WFNSAAGPS. Obwohl diese Sequenz ausschließlich aus aktiven Aminosäuren besteht, bleibt die Competitionsfähigkeit deutlich hinter den anderen Peptiden der Gruppe 1 zurück. Dies könnte durch das Vorkommen von Prolin und Serin an den Positionen 8 und 9 erklärt werden. Dadurch entsteht ein sehr kleiner, polarer und geknickter C-Terminus, der nur sehr schlecht in die P9-Tasche binden kann, und somit insgesamt eine starke Bindung dieses Peptids verhindert.

Das Peptid mit der Sequenz FATGAGIVS weist ebenfalls Serin an Position 9 auf, besitzt aber an Position 8 das hydrophobe Valin, so dass hier das C-terminale Ende viel hydrophober ausfällt, und somit besser in die Bindungstasche passt.

Die übrigen Peptide der Gruppe 1, deren C-terminales Ende durch Prolin an Position 8 abknickt, weisen an Position 9 entweder stark polare Aminosäuren (L, V oder M) oder voluminöse, hydrophobe aromatische Aminosäuren (W, Y) auf. In beiden Fällen ergibt sich ein C-Terminus, der entweder durch seine ausgeprägte Polarität oder durch seine Hydrophobizität in die entsprechende Tasche binden kann.

Die Sequenzen aus den Gruppen 2 und 3, die aus indifferent bzw. inaktiven Aminosäuren zusammengesetzt wurden, zeigen keine nennenswerte Konkurrenz. Unterschiede zwischen den beiden Messreihen und negative Konkurrenzwerte müssen auf die hohe Sensitivität des Messsystems zurückgeführt werden.

Das Peptid YASASGIPF, mit dem der Einfluss der translationalen Invarianz untersucht werden sollte, zeigte lediglich eine relative Konkurrenz von ca. 25% und bleibt damit weit hinter den Konkurrenzwerten der Peptide der Gruppe 1 zurück.

5 Diskussion

5.1 Wahl der Methodik

Die Bestimmung der Bindungseigenschaften von MHC-Klasse-I- und -II-Molekülen kann prinzipiell über folgende Methoden erfolgen:

1. „pool sequencing“
2. „phage display libraries“
3. Peptidbibliotheken

Die Methode des „pool sequencing“ beruht darauf, dass zunächst die entsprechenden MHC-Moleküle isoliert, die gebundenen Peptide mittels Säurebehandlung eluiert und über HPLC aufgetrennt werden. Die Charakterisierung dieses „Peptidpools“ erfolgt anschließend durch Edman-Abbau.

Mit dieser Technik konnten erstmals die allel-spezifischen Bindungsmotive von zahlreichen MHC-Klasse-I- und Klasse-II-Molekülen ermittelt werden (Falk et al., 1991; Malcherek et al., 1993; Falk et al., 1994).

Ein anderer Ansatz besteht in der Anwendung einer „phage display peptide library“ zur Identifizierung eines Bindungsmotivs (Hammer et al., 1992; Hammer et al., 1993).

Bei dieser Methode werden Oligonukleotide, die die zu untersuchenden Peptide kodieren, in das Gen III des filamentösen Phagen M13 inseriert und von diesem präsentiert. Mittels isolierter MHC-Moleküle werden die Phagen selektioniert, deren präsentierte Peptide der Spezifität des jeweiligen MHC-Allels entsprechen. Durch anschließende Sequenzierung der identifizierten M13 Klone können die Aminosäuresequenz bestimmt und Rückschlüsse auf das MHC-Bindungsmotiv gezogen werden.

Im Gegensatz zur „pool sequencing“-Technik ist es hier theoretisch möglich, Sequenzen zu identifizieren, die nicht endogenen Ursprungs sind.

Nachteilig ist jedoch der erhebliche zeitliche und materielle Aufwand der Methodik von der Produktion der Phagen bis zur Sequenzierung der identifizierten Klone.

Eine weitere Option zur Messung der MHC-Peptid-Interaktion stellen Peptidbibliotheken dar (Fleckenstein et al., 1996; Jung et al., 1998).

Die Verwendung von synthetischen kombinatorischen Peptidbibliotheken im „positional scan format“ (PS-SPCL) erlaubt die Quantifizierung der Bindungseigenschaft jeder einzelnen Aminosäure an jeder Sequenzposition. Basierend auf dem Prinzip des Wettbewerbsassays können bei dieser Methode nicht nur hoch affine Aminosäuren identifiziert werden; es ist zudem möglich, nicht bindende oder sogar verbotene Aminosäuren zu erfassen. Dies ist mit den beiden anderen Methoden nicht zu realisieren.

Die Detektion der MHC-Peptidkomplexe kann dabei entweder HPSEC basiert oder über den bereits vorgestellten Europium-Fluoroimmunoassays erfolgen. Letzterer bietet gegenüber der HPSEC den Vorteil wesentlich weniger materialaufwendig zu sein und bedeutet auf Grund des hohen Grades an Parallelisierbarkeit einen enormen Zeitgewinn.

Die hohe Sensitivität des Europium basierten Fluoroimmunoassays führt jedoch dazu, dass die Ergebnisse aus mehreren unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen Schwankungen unterworfen sind, die sich nicht vermeiden lassen.

Dies lässt sich in dieser Arbeit bei den Wettbewerbsassays mit der Nonapeptidbibliothek sehr ausgeprägt beobachten. Da beide Versuchsreihen mit jeweils unabhängig voneinander isolierten MHC-Molekülen durchgeführt wurden, beeinflusst die Qualität des Isolates sicherlich auch das Resultat. Des Weiteren kann die Zusammensetzung der verwendeten Pufferlösungen hinsichtlich Ionenstärke und Detergenzienkonzentration nicht exakt gleich reproduziert werden. Während beide Versuchsreihen mit der gleichen

Nonamerpeptidbibliothek durchgeführt wurden, wurde das biotinylierte Indikatorpeptid für die zweite Versuchsreihe neu synthetisiert.

Somit wird deutlich, dass die Ergebnisse vor diesem Hintergrund betrachtet werden müssen, d.h. es gilt weniger die Absolutwerte der einzelnen Versuche zu interpretieren; vielmehr muss das Hauptaugenmerk auf der Identifizierung einer „Tendenz“ oder eines Musters liegen, das nach beiden Versuchen erkennbar wird. Bei den Messungen mit der Peptidbibliothek ist darunter zu verstehen, dass z.B. positionsspezifische Teilbibliotheken mit gleichen physikochemischen Eigenschaften wiederholt ähnliche Ergebnisse aufweisen.

Die Verwendung von Peptidbibliotheken zur Motivbestimmung weist eine weitere Besonderheit auf. In Studien mit Undecapeptidbibliotheken zeigte sich, dass sowohl an der beobachteten Position i , als auch an der benachbarten Position $i+1$ ähnliche Kompetitionswerte gefunden werden konnten (Jung et al., 1998). Dies kann auf das Phänomen der translationalen Invarianz zurückgeführt werden. Da die Peptidbindungsgrube von MHC-Klasse-II-Molekülen an beiden Enden offen ist, können sich Peptide in die eine oder andere Richtung verschieben. Ein Ansatz diese Problem zu lösen, besteht darin, mit kürzeren Peptiden zu arbeiten, die möglichst genau in die Bindungsgrube passen. Dies wird durch die Verwendung von Nonapeptidbibliotheken erreicht. Damit kann auch gezeigt werden, dass die translationale Invarianz signifikant geringer ist als bei Verwendung von Undecapeptidbibliotheken (Fleckenstein et al., 1999). Die Verkürzung der Peptidbibliotheken auf eine Länge von 9 Aminosäuren geht allerdings mit einer Reduzierung der Affinität im Vergleich zu längeren Sequenzen einher. Die dadurch benötigten höheren Peptidkonzentrationen können in ungünstigen Fällen zur Präzipitation führen. Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuche konnten allerdings die Gesamtpeptidkonzentrationen so gewählt werden, dass dieses Problem nicht weiter beachtet werden musste.

5.2 Ermittlung der optimalen Assay-Parameter

5.2.1 Bindung von CLIP (105-117) an HLA-DQ4

Da bisher für DQA1*0401-DQB1*0402 kein Bindungsmotiv vorlag, wurde die Auswahl eines möglichen an HLA-DQ4 bindenden Liganden aufgrund der Tatsache getroffen, dass HLA-DQ-Moleküle Zugang zur invarianten Kette haben und für mehrere HLA-DQ-Moleküle Sequenzen aus der CLIP-Region als Liganden beschrieben worden sind (Falk et al., 1994; Chicz et al., 1994; Khalil-Daher et al., 1998).

In Vorversuchen mit verschiedenen Peptiden, die von der Ii abgeleitet waren, zeigte die Sequenz SKMRMATPLLMQA - entspricht CLIP (105-117) - gute Bindungseigenschaften.

5.2.2 pH-Abhängigkeit der Bindung von CLIP (105-117) an HLA-DQ4

Da die Bindung von Peptiden an MHC-Moleküle auch von der Ladung der Aminosäure-Seitenketten abhängig ist, wurden HLA-DQ4-Moleküle mit CLIP (105-117) bei verschiedenen pH-Werten inkubiert. Dabei zeigte sich ein ausgeprägtes pH-Optimum bei 5,0. Schon geringe Abweichungen von diesem Wert führen zu einem starken Nachlassen der Affinität von CLIP (105-117) an HLA-DQ4.

Während für HLA-DR-Moleküle eine starke Toleranz bezüglich Variationen des pH-Wertes gezeigt werden konnten (Sette et al., 1992), sind für HLA-DQ-Moleküle sehr spezifische Bindungsoptima beschrieben worden, die allerdings zwischen verschiedenen Allelen variieren (Buckner et al., 1996). Zudem konnte gezeigt werden, dass ein niedriger pH-Wert die Bindung von Peptiden an MHC-Klasse-II-Moleküle verstärkt (Jensen, 1991).

Das für HLA-DQ4 ermittelte Bindungsverhalten lässt sich sehr gut mit diesen Ergebnissen vereinbaren. Es zeigt zum einen ein für HLA-DQ-Moleküle charakteristisches, sehr distinktes pH-Optimum. Zum anderen befindet sich dieses Optimum in einem niedrigen pH-Bereich, der in einem spät-

endosomalen Kompartiment vorkommt, in dem die Beladung von MHC-Molekülen mit antigenen Peptiden erfolgt (Mouritsen et al., 1992; Watts, 1997).

5.3 Bindungsspezifität von HLA-DQ4

Ziel dieser Arbeit war, die Bindungsspezifität des HLA-Allels DQA1*0401-DQB1*0402 zu bestimmen.

Detaillierten Einblick in die Interaktion von Peptid und MHC-Klasse-II-Molekülen wurde zuerst durch die Röntgenstrukturanalyse von HLA-DR1 geliefert (Stern et al., 1994). Hierbei zeigte sich, dass an der Bindung von Peptiden an das MHC-Klasse-II-Molekül zwei Mechanismen beteiligt sind.

Ein nicht unerheblicher Teil an der Gesamtbindungsenergie wird durch Wasserstoff-Brücken vermittelt, die sich zwischen dem gebundenem Peptid-Rückgrat und dem MHC-Klasse-II-Molekül bilden. Interessanterweise ist die Mehrzahl der in diesen Bindungen involvierten Aminosäuren des MHC-Moleküls zwischen den verschiedenen Allelen hoch konserviert. Diese Beobachtung konnte sowohl für weitere HLA-DR-Moleküle (DR2a, DR2b, DR3 und DR4) (Ghosh et al., 1995; Dessen et al., 1997; Smith et al., 1998; Li et al., 2000), als auch für das, zu HLA-DR homologe, murine I-E^k-Molekül (Fremont et al., 1996), für HLA-DQ8 (Lee et al., 2001) und für die, zu HLA-DQ homologen, murinen I-A^k, I-A^d und I-A^{g7} (Fremont et al., 1998; Scott et al., 1998; Corper et al., 2000; Latek et al., 2000) nachgewiesen werden.

Diese Wasserstoffbrückenbindungen führen allelunabhängig zur Ausbildung einer Polyprolin-Typ-II-artigen gestreckten Konformation des gebundenen Peptids und zu einer definierten Orientierung des N- und C-Terminus (Jardetzky et al., 1996).

Zum anderen inserieren Seitenketten des Peptids in sogenannte Taschen innerhalb der Bindungsgrube. Die an der Bildung dieser Taschen beteiligten Aminosäuren sind hoch polymorph. Dies führt dazu, dass zwischen den verschiedenen Allelen die Struktur dieser Taschen sowie deren Akzeptanz für bestimmte Aminosäuren stark variieren kann. Als Resultat ergibt sich daraus

die Allelspezifität hinsichtlich des Bindungsverhaltens von Peptiden (Rammensee et al., 1995).

Die Betrachtung von Röntgenstrukturanalysen und bekannten Bindungsmotiven ergab, dass eine Nonamer-Kernsequenz mit Ankeramino­säuren an den relativen Peptidpositionen P1, P4, P6 und P9 für die Peptidbindung entscheidend ist.

Differentielles Bindungsmotiv von vier HLA-DQ-Molekülen

HLA-DQ-Allel	Position 1	Position 2	Position 3	Position 4	Position 5	Position 6	Position 7	Position 8	Position 9
gut bindend									
0401/0402 (DQ4)	Y, W, F, I, V, M	Y, A, F, W	Y, S, V, W, N, T	A, G, S	A, G, S	G, A	G, I, V, A, S	A, P, V	V, A, F, S
0501/0301 (DQ7)	Y, W, I, F	F, W, Y	A, Y, F	G, A, S	G, A, S	G, A	A, V	A, V	V, A
0501/0201	F, W			D, E	Y, D	E, P	D, E		D, M, F, W
0201/0202	A, K			D, E		T, D, E, P	A, D, E, I	G	W, L, M, I
schlecht bindend									
0401/0402 (DQ4)	D, R, K, E	P, D, E, K	D, E, K, L, H	L, D, K, E	F, E, P, Q, R, D	D, E, F	D, Y	D, E, Y	D, H, K
0501/0301 (DQ7)	D, N	N, D	D	D, E	D, E	D, E	D, E	N, D	K
0501/0201					W			M	
0201/0202			P, R	P, W, K		K, F, L, A			Q, Y, V

Tabelle 4: Differentielles Bindungsmotiv von vier HLA-DQ-Molekülen modifiziert und erweitert nach Ihle et al., 2003

Vergleicht man zunächst die gut und schlecht bindenden Aminosäuren an den entsprechenden Positionen für alle vier Allele, so zeigen sich sowohl ausgeprägte Gemeinsamkeiten zwischen den assoziierten Allelen HLA-DQ4 und HLA-DQ7, als auch starke Unterschiede zum neutralen Allel DQA1*0501/DQB1*0201 und dem protektiven Allel DQA1*0201/DQB1*0202. Letztere weisen hingegen untereinander auffallende Ähnlichkeiten im Bindungsverhalten auf.

Im folgenden wird zum einem das unterschiedliche Bindungsverhalten diskutiert und, um diese Unterschiede noch eingehender darzustellen, ein Vergleich der polymorphen Aminosäuren dieser MHC-Allele vorgenommen, sofern sie an der Bildung der Bindungstaschen beteiligt sind. Der Schwerpunkt liegt dabei auf den relativen Peptidpositionen P1, P4, P6 und P9.

Auf Basis der bekannten Kristallstrukturen von drei murinen I-A-Molekülen (I-A^k, I-A^d, I-A^{g7}) konnten die an der Bildung der Bindungstaschen beteiligten Aminosäuren identifiziert werden (Cucca et al., 2001). Eine Bestätigung dieses Ansatzes erfolgte durch die Kristallstruktur des human HLA-DQ8-Moleküls (Lee et al., 2001), in dem die von Cucca et al. beschriebenen Eigenschaften dieses HLA-Allels weitestgehend nachgewiesen wurden.

Position 1

HLA-DQ4 und HLA-DQ7 akzeptieren an Position 1 entweder hydrophobe (Isoleucin, Valin, Methionin) oder aromatische, voluminöse Aminosäuren (Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan). Im Fall von DQ7 stehen diese Daten in völliger Übereinstimmung mit Bindungsmotiven die entweder durch pool-sequencing oder durch Bindungsstudien gewonnen wurden (Falk et al., 1994; Johansen et al., 1996; Khalil-Daher et al., 1998).

DQA1*0501/DQB1*0201, das die gleiche α -Kette wie DQ7 besitzt, zeigt in Position 1 die Präferenz für die großen, aromatischen Aminosäuren Phenylalanin und Tryptophan (Ihle et al., 2003). Durch pool-sequencing gewonnene Bindungsmotive zeigen, dass nicht nur Phenylalanin und Tryptophan, sondern auch Tyrosin, Leucin, Isoleucin und Valin an Position 1 binden können (Vartdal et al., 1996). Bei der Ähnlichkeit im Bindungsverhalten von DQ7 und DQA1*0501/DQB1*0201 an dieser Position dürfte der Einfluss der gemeinsamen α -Kette zum Tragen kommen (Johansen et al., 1996).

Das Allel DQA1*0201/DQB1*0202, dessen β -Kette bis auf eine Aminosäure, die allerdings außerhalb der Peptidbindungsspalte liegt, mit DQA1*0501/DQB1*0201 homolog ist, zeigt an Position 1 dagegen ein komplett anderes Bindungsverhalten; es finden sich keine aromatischen Aminosäuren, vielmehr werden Alanin und Lysin als Anker beschrieben.

P1-Tasche

An der Bildung der P1-Tasche sind nach Cucca et al. die polymorphen Aminosäurepositionen $\beta 82$, $\beta 86$, $\alpha 24$, $\alpha 52$, $\alpha 53$ und $\alpha 54$ beteiligt.

	$\beta 82$	$\beta 86$	$\alpha 24$	$\alpha 52$	$\alpha 53$	$\alpha 54$
DQA1*0401/DQB1*0402	N	E	H	R	-	F
DQA1*0501/DQB1*0301	N	E	H	R	-	F
DQA1*0501/DQB1*0201	N	E	H	R	-	F
DQA1*0201/DQB1*0202	N	E	H	R	-	F

Tabelle 5: Polymorphe Aminosäuren, die an der Bildung der P1-Tasche beteiligt sind nach Cucca et al., 2001

Interessanterweise besitzen alle vier MHC-Moleküle an den untersuchten Positionen die gleichen Aminosäuren. Damit ließe sich die Beobachtung erklären, dass DQ4, DQ7 und DQA1*0501/DQB1*0201 das gleiche Bindungsverhalten bezüglich der P1-Tasche zeigen.

Obwohl DQA1*0201/DQB1*0202 im Bereich der P1-Tasche nach obigen Daten zu den anderen MHC-Molekülen homolog ist, zeigt sich eine hohe Affinität zu den Aminosäuren Alanin und Lysin und nicht, wie eventuell zu erwarten wäre, die gleiche Spezifität wie die übrigen drei MHC-Moleküle.

Auf Basis des HLA-DR1-Kristalls berechnete HLA-DQ-Molekülstrukturen der Allele DQA1*0501/DQB1*0301, DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 zeigen allerdings, dass diese drei Moleküle als Gemeinsamkeit eine große P1-Tasche besitzen, die aromatische und hydrophobe Aminosäuren binden kann (Johansen et al., 1996). Die Bindungsspezifität der P1-Tasche von DQA1*0201/DQB1*0202 scheint somit von weiteren Faktoren abhängig zu sein, die sich nicht ohne weiteres aus der Analyse der oben genannten Aminosäurepositionen ableiten lassen.

Position 4

An Position 4 werden von HLA-DQ4 und HLA-DQ7 kleine Aminosäuren, die entweder ungeladene polare Seitenketten aufweisen (Serin) oder apolare Seitenketten besitzen (Glycin, Alanin), akzeptiert. Im Gegensatz dazu zeigen

die negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure keine Bindung.

Betrachtet man DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202, so ergibt sich hier ein völlig konträres Bild. Diese beiden Allele zeigen an Position 4 hohe Affinität zu Glutaminsäure und Asparaginsäure.

P4-Tasche

	β 11	β 13	β 26	β 28	β 74	β 78	α 9	α 9a	α 62
DQA1*0401/DQB1*0402	F	G	G	T	S	V	Y	G	N
DQA1*0501/DQB1*0301	F	A	Y	T	E	V	Y	G	N
DQA1*0501/DQB1*0201	F	G	L	S	A	V	Y	G	N
DQA1*0201/DQB1*0202	F	G	L	S	A	V	Y	G	N

Tabelle 6: Polymorphe Aminosäuren, die an der Bildung der P4-Tasche beteiligt sind nach Cucca et al., 2001

Ausgeprägte Unterschiede zwischen DQA1*0401/DQB1*0402 (DQ4), DQA1*0501/DQB1*0301 (DQ7), DQA1*0501/DQB1*0201 und DQB1*0201/DQB1*0202 finden sich an den Positionen β 26, β 28 und β 74.

Ein auf Basis des DQ8-Moleküls modelliertes DQ7-Dimer besitzt eine kleine P4-Tasche, die unter anderem durch das Vorkommen von Tyrosin an β 26 bedingt ist (Lee et al., 2001). Dies würde die ausschließliche Bindung von kleinen Aminosäuren erklären. Zusätzlich dürfte die negative Ladung von Glutaminsäure an β 74 das Binden von Glutaminsäure und Asparaginsäure aufgrund der Ladungsverhältnisse erschweren.

DQ4 besitzt im Gegensatz zu DQ7 an β 26 Glycin und an β 74 Serin. Damit dürfte die P4-Tasche weitaus größer ausfallen als bei DQ7, da Glycin die P4-Tasche nicht soweit einengen kann wie Tyrosin. Auch die Ladungsverhältnisse dürften sich durch das Vorkommen von Serin anstatt Glutaminsäure an β 74 unterscheiden. Trotzdem weisen DQ4 und DQ7 das gleiche Bindungsverhalten im Bereich der P4-Tasche auf, das demzufolge von weiteren Faktoren abhängig sein muss.

Nach der auf Basis des HLA-DR1 modellierten DQ-Moleküle tragen auch die Positionen β 70 und β 71 zur Bildung der P4-Tasche bei (Johansen et al., 1996).

DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 besitzen an diesen beiden Positionen zwei basische Aminosäuren: an β 70 Arginin und an β 71 Lysin. Deren positive Ladungen tragen zur hohen Affinität für Glutaminsäure und Asparaginsäure bei (Vartdal et al., 1996; van de Wal et al., 1997).

DQ7 hat an β 70 ebenfalls Arginin, an β 71 steht allerdings die neutrale Aminosäure Threonin. Berücksichtigt man zusätzlich, dass an β 74 mit Glutaminsäure eine negative Ladung hinzukommt, führen diese Merkmale dazu, dass der basische Charakter dieser Tasche weniger stark ausgeprägt ist als bei DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 und ein eher neutrales Verhalten beobachtet wird (Johansen et al., 1996).

Interessanterweise unterscheidet sich DQ4 an β 70 und β 71 von allen drei anderen HLA-Allelen insofern, als dass es an diesen Positionen die zwei negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure (β 70) und Asparaginsäure (β 71) besitzt. Deren negative Ladung könnte die Ladungsverhältnisse der P4-Tasche ähnlich wie die basischen Aminosäuren bei DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 verändern. Ein mögliches Resultat wäre das beobachtete Nicht-Binden von Glutaminsäure und Asparaginsäure an Position 4.

Position 6

An der ebenfalls wichtigen Position 6 zeigen DQ4 und DQ7 ähnlich wie an Position 4 erneut eine starke Affinität zu den kleinen aliphatischen Aminosäuren Alanin und Glycin; die beiden negativ geladenen Aminosäuren Glutaminsäure und Asparaginsäure binden, wie schon bei Position 4 beschrieben, nicht.

DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 weisen auch hier ein gegensätzliches Bindungsverhalten zu DQ4 und DQ7 mit der Akzeptanz von Glutaminsäure und Asparaginsäure auf.

P6-Tasche

	$\beta 9$	$\beta 11$	$\beta 30$	$\beta 37$	$\alpha 11$	$\alpha 62$	$\alpha 65$	$\alpha 66$	$\alpha 69$
DQA1*0401/DQB1*0402	F	F	Y	Y	N	N	V	T	N
DQA1*0501/DQB1*0301	Y	F	Y	Y	N	N	V	L	N
DQA1*0501/DQB1*0201	Y	F	S	I	N	N	V	L	N
DQA1*0201/DQB1*0202	Y	F	S	I	N	N	V	L	N

Tabelle 7: Polymorphe Aminosäuren, die an der Bildung der P6-Tasche beteiligt sind nach Cucca et al., 2001

Die an der Bildung der P6-Tasche beteiligten Aminosäuren zeigen zwischen den einzelnen Allelen auffällig starke Parallelen. Die Hauptunterschiede finden sich an den Positionen $\beta 30$ und $\beta 37$.

Sowohl DQ4 als auch DQ7 besitzen an $\beta 30$ und $\beta 37$ jeweils die Aminosäure Tyrosin, während DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 an $\beta 30$ Serin und an $\beta 37$ Isoleucin aufweisen. Die P6-Tasche von DQ4 und DQ7 dürfte durch das sehr voluminöse Tyrosin somit sehr klein ausfallen. Dies könnte zur ausschließlichen Akzeptanz von Glycin und Alanin an Position 6 beitragen.

Position 9

An Position 9 zeigen DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 die Akzeptanz von aromatischen, voluminösen oder hydrophoben Aminosäuren. Im Falle von DQA1*0501/DQB1*0201 auch die Bindung von Asparaginsäure.

Die Aminosäuren Alanin und Valin weisen hingegen die höchste Affinität zu den beiden assoziierten Molekülen DQ4 und DQ7 auf. Im Falle von DQ4 sind dies aber nur die am besten bindenden Aminosäuren. Im Gegensatz zu den zentralen Positionen ist die Spezifität an Position 9 nicht so stark ausgeprägt, d.h. auch aromatische bzw. hydrophobe Aminosäuren haben die Möglichkeit zu binden.

P9-Tasche

	$\beta 57$	$\beta 61$	$\alpha 68$	$\alpha 69$	$\alpha 72$	$\alpha 76$
DQA1*0401/DQB1*0402	D	W	H	N	I	R
DQA1*0501/DQB1*0301	D	W	H	N	S	R
DQA1*0501/DQB1*0201	A	W	H	N	S	R
DQA1*0201/DQB1*0202	A	W	H	N	I	R

Tabelle 8: Polymorphe Aminosäuren, die an der Bildung der P9-Tasche beteiligt sind nach Cucca et al., 2001

Unterschiede zwischen den 4 betrachteten HLA-Allelen finden sich an den Positionen $\beta 57$ und $\alpha 72$. Am bedeutendsten ist dabei, dass die beiden assoziierten HLA-Moleküle DQ4 und DQ7 an Position $\beta 57$ Asparaginsäure aufweisen, während DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202 an $\beta 57$ Alanin besitzen.

Dem Polymorphismus hinsichtlich des Vorkommens von Asparaginsäure an $\beta 57$ wird eine zentrale Rolle bei der Ausbildung und Bindungsspezifität der P9-Tasche zugeschrieben. Aus Röntgenstrukturanalysen ist bekannt, dass sich zwischen Asparaginsäure an $\beta 57$ und Arginin an $\alpha 76$ eine Salzbrücke ausbildet, die sowohl die Ladungsverhältnisse als auch die Form der P9-Tasche beeinflusst.

Wird Asparaginsäure durch eine andere Aminosäure (Alanin, Valin oder Serin) ersetzt, kann diese Bindung nicht gebildet werden. Deswegen wurde angenommen, dass in diesem Fall die nun freie positive Ladung des Arginin an $\alpha 76$ mit negativ geladenen Aminosäuren an Position 9 des gebundenen Peptids interagieren kann (Nepom et al., 1996; Reizis et al., 1998).

Gezielte Mutation an Position $\beta 57$ des Allels DQA1*0501/DQB1*0202 zeigte, dass dort der Austausch von Alanin zu Asparaginsäure zu Änderungen im Bindungsverhalten der P9-Tasche führt (Quarsten et al., 1998). Auf Basis der HLA-DR1-Koordinaten berechnete Modelle zeigen in der Ausbildung ihrer dreidimensionalen Struktur ausschließlich Veränderungen im Bereich der P9-Tasche. Während WT-DQ2 (DQA1*0501/DQB1*0202, Alanin an $\beta 57$) eine breite und tiefe Tasche aufweist, die zum größten Teil hydrophoben Charakter hat, zeigt das Mut57-DQ2 Molekül (DQA1*0501/DQB1*0202, Asparaginsäure

an $\beta 57$) anstatt einer Tasche eher ein Plateau, zu dessen Bildung nicht zuletzt auch die Salzbrücke zwischen Asparaginsäure an $\beta 57$ und Arginin an $\alpha 76$ beiträgt.

Daraus ergeben sich auch Unterschiede im Bindungsverhalten beider Moleküle. WT-DQ2 akzeptiert aufgrund seiner Struktur an P9 aromatische (Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin) und aliphatische Aminosäuren (Isoleucin, Leucin und Valin). Die vorausgesagte Interaktion zwischen der freien positiven Ladung von Arginin an $\alpha 76$ und gebundenem Peptidliganden findet allerdings nicht an den Aminosäureseitenketten, sondern am Peptidrückgrat statt. Dies kann das geringe Vorkommen von negativ geladenen Aminosäuren in P9 bei diesem Allel erklären (Quarsten et al., 1998).

Die nach diesem Modell für Mut57-DQ2 vorausgesagten Liganden müssen an P9 kleinere Anker aufweisen, wobei Valin die größte Aminosäure darstellt, die ohne weiteres binden kann.

Vergleicht man vor diesem Hintergrund die beobachteten Bindungseigenschaften der vier HLA-Moleküle, so wird deutlich, dass DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0202, die beide Alanin an $\beta 57$ besitzen und demzufolge eine große und hydrophobe Tasche aufweisen, ebenfalls entsprechende großvolumige Aminosäuren binden können (Johansen et al., 1996; Vartdal et al., 1996).

DQ4 und DQ7, die beide Asparaginsäure an Position $\beta 57$ besitzen, sollen nach obigem Modell eine kleinere Bindungstasche haben. Das Vorkommen von Tyrosin an $\beta 30$ und $\beta 37$ trägt ebenfalls dazu bei, diese Bindungstasche einzuengen (Johansen et al., 1996).

Dies kann teilweise an den gebundenen Aminosäuren beobachtet werden. DQ4 und DQ7 binden im Gegensatz zu den anderen beiden Allelen auch die relativ kleinvolumigen Aminosäuren Alanin, Valin und Serin. Allerdings konnte im Falle von DQ4 auch die Bindung von aromatischen und hydrophoben Aminosäuren beobachtet werden.

Zusammenfassung des Peptidbindungsverhaltens

Die beiden mit JIA assoziierten HLA-Allele DQA1*0401/DQB1*0402 und DQA1*0501/DQB1*0301 zeigen auffallend starke Gemeinsamkeiten in ihrem Peptidbindungsverhalten. Dies kann stellenweise auf Homologien in der Primärstruktur der α - und β -Kette der MHC-Moleküle zurückgeführt werden, die zur Ausbildung von ähnlich aufgebauten Bindungstaschen führt. Allerdings können auch unterschiedliche Aminosäuren zur Bildung von Bindungstaschen gleicher Spezifität führen, wie an der P4-Tasche ersichtlich ist.

Auch die beiden Allele DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0201, die sich im Hinblick auf das Risiko an JIA zu erkranken neutral oder protektiv verhalten, weisen starke Sequenzhomologien im Bereich der Bindungstaschen auf, die sich auch im Peptidbindungsverhalten widerspiegeln.

Die Tatsache, dass beide assoziierten HLA-DQ-Allele dieselbe Peptidbindungsspezifität aufweisen, also potentiell dieselben Peptide präsentieren können, ist ein Argument für eine T-Zell vermittelte Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis (Wedderburn et al., 2001).

Die Allele DQA1*0501/DQB1*0201 und DQA1*0201/DQB1*0201 können aufgrund ihres Bindungsmotivs diese arthritogenen Peptide nicht binden und somit keine Entzündungsreaktion auslösen.

Der neutrale bzw. protektive Effekt dieser beiden Allele könnte aber auch über das Prinzip der negativen Selektion im Thymus erklärt werden (Kappler et al., 1987). Dabei werden potentiell autoreaktive T-Zellen eliminiert. Dass sich der protektive Effekt bestimmter MHC-Allele auf diesen Mechanismus zurückführen lässt, konnte in einem Mausmodell des Insulin abhängigen Diabetes mellitus (IDDM) gezeigt werden (Schmidt et al., 1997).

5.4 Identifikation von Liganden an HLA-DQ4

Die Möglichkeit mittels Peptidbibliotheken den Einfluss jeder Aminosäure an jeder Position auf das Bindungsverhalten an HLA-DQ4 zu bestimmen, war die Grundlage, Liganden für dieses HLA-Allel erfolgreich zu determinieren.

Die Einteilung der Aminosäuren in drei Untergruppen (aktiv, indifferent und inaktiv), wie in 4.6 beschrieben, und die Bildung von zufällig zusammengesetzten Nonapeptidsequenzen erwies sich bereits bei der Suche nach neuen Liganden für HLA-DRB*0301 als sehr geeignet (Jung et al., 1998).

Dieses Prinzip konnte nun zum ersten Mal sehr erfolgreich auf die Liganden-Bestimmung eines HLA-DQ-Moleküls übertragen werden. Dabei zeigten sich überraschend klare Ergebnisse: fast alle Peptide, die aus gut bindenden Aminosäuren zusammengesetzt waren, zeigten bereits bei niedrigen Konzentrationen hohe Kompetitionswerte bis zu 90%. Dabei war es nahezu unerheblich, ob die Sequenzen willkürlich zusammengesetzt waren, oder gezielt die am stärksten bindenden Aminosäuren pro Position kombiniert wurden.

Hingegen konnten Peptide aus den Gruppen der indifferenten und inaktiven Aminosäuren keine nennenswerte Affinität zu HLA-DQ4 aufweisen. Zumindest bei Peptiden der Gruppe der indifferenten Aminosäuren hätte eine geringfügig höhere Affinität als bei Peptiden der Gruppe der inaktiven Aminosäuren erwartet werden können. Allerdings muss hierbei berücksichtigt werden, dass jeweils nur drei Peptide pro Gruppe zum Einsatz kamen. Es ist deswegen nicht auszuschließen, dass Sequenzen, vor allem aus der Gruppe der indifferenten Aminosäuren, höhere Kompetitionswerte aufweisen, wenn sie aus Aminosäuren mit positiven Kompetitions-Indizes innerhalb ihrer Gruppe zusammengestellt werden.

Allerdings lag der Fokus bei diesem Versuch auf der Suche nach hochaffinen Peptiden, so dass in dieser Richtung keine weiteren Schritte unternommen wurden.

Ein Phänomen, das bei der Verwendung von Peptidbibliotheken zur Bestimmung von Klasse-II-Bindungsmotiven auftritt, ist die sogenannte translationale Invarianz. Um abzuklären, inwieweit die Ergebnisse von dieser

Eigenschaft der Methodik beeinflusst werden, wurde die Kompetitionsfähigkeit eines Nonapeptids gemessen, dessen Sequenz aus Aminosäuren besteht, die nicht nur an der beobachteten Position, sondern auch an benachbarten Positionen in den Versuchen mit der Nonapeptidbibliothek positive Kompetitions-Indizes lieferten. Dabei zeigte sich, dass die Kompetitionsfähigkeit dieses Peptids weit hinter der Affinität der Peptide der Gruppe 1 zurückblieb. Dies macht deutlich, dass die translationale Invarianz bei Verwendung einer Nonapeptidbibliothek nur geringen Einfluss auf die Ergebnisse hat (Fleckenstein et al., 1999).

Die Blockade der Antigen-Präsentation durch MHC-Klasse-II-Moleküle ist ein denkbare Konzept in der Entwicklung von immunomodulatorischen Therapieansätzen bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen. Peptide mit hoher Affinität zum Klasse-II-Molekül sind dabei die Grundlage für die Entwicklung potenter „MHC-Blocker“ (Falcioni et al., 1999).

Die nun bestimmten hochaffinen Liganden an HLA-DQ4 könnten somit als Basis für die Entwicklung ähnlicher Verbindungen dienen.

6 Zusammenfassung

Ätiologie und Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis sind immer noch weitgehend unklar. Der Nachweis von mehreren HLA-Klasse-I und Klasse-II-Allelen mit Suszeptibilität oder Schutz zumindest in einer Untergruppe der Erkrankung legt die Vermutung nahe, dass diese Moleküle im Krankheitsprozess involviert sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war, das Bindungsmotiv des mit juveniler idiopathischer Arthritis assoziierten HLA-Allels DQA1*0401/DQB1*0402 durch den Einsatz von synthetischen kombinatorischen Peptidbibliotheken zu bestimmen. Dabei zeigte sich ein charakteristisches Bindungsverhalten mit der Akzeptanz von kleinen Aminosäuren in den zentralen Bindungstaschen und der Affinität zu voluminösen, hydrophoben Aminosäuren in den äusseren Taschen. Der Vergleich mit dem Bindungsmotiv des ebenfalls assoziierten Allels DQA1*0501/DQB1*0301 (DQ7) zeigte, dass beide Bindungsmotive in weiten Teilen gleich sind.

Signifikante Unterschiede ergeben sich im Hinblick auf das Bindungsmotiv des neutralen Allels DQA1*0501/DQB1*0201 sowie des protektiven Allels DQA1*0201/DQB1*0201.

Die beobachtete Hierarchie (assoziiert, neutral, protektiv) der Assoziation diverser HLA-DQ-Allele mit der juvenilen idiopathischen Arthritis lässt sich somit auch auf die Ebene der Peptidbindungsspezifität übertragen. Das nun bestimmte HLA-DQ4-Bindungsmotiv fügt sich dabei nahtlos in das von Ihle et al. beschriebene, differentielle Bindungsmotiv dreier HLA-DQ-Moleküle ein und erweitert es.

Die Bestimmung des Bindungsmotivs war Voraussetzung, um Liganden des HLA-DQ4 Moleküls zu determinieren. Hier konnten mehrere hochaffine Nonapeptide identifiziert werden. Diese Liganden ermöglichen zum einen weitere Untersuchungen zur T-Zell-Reaktivität, zum Beispiel mittels MHC-Tetramertechnologie, und könnten zum anderen die Entwicklung neuer immunomodulatorischer Therapieansätze eröffnen.

7 Literaturverzeichnis

Albert, E. D. and Scholz, S. (1998)

Juvenile arthritis: genetic update.
Baillieres Clin. Rheumatol.; 12 (2), 209-218.

Bakke, O. and Dobberstein, B. (1990)

MHC class II-associated invariant chain contains a sorting signal for endosomal compartments.
Cell; 63 (4), 707-716.

Bjorkman, P. J., Saper, M. A., Samraoui, B., Bennett, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1987)

Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2.
Nature; 329 (6139), 506-512.

Bradford, M. M. (1976)

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem.; 72, 248-254.

Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1993)

Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1.
Nature; 364 (6432), 33-39.

Brömme, D., Li, Z., Barnes, M. and Mehler, E. (1999)

Human cathepsin V functional expression, tissue distribution, electrostatic surface potential, enzymatic characterization, and chromosomal localization.
Biochemistry; 38 (8), 2377-2385.

Buckner, J., Kwok, W. W., Nepom, B. and Nepom, G. T. (1996)

Modulation of HLA-DQ binding properties by differences in class II dimer stability and pH-dependent peptide interactions.
J. Immunol.; 157 (11), 4940-4945.

Celis, E., Zurawski, V. R., Jr. and Chang, T. W. (1984)

Regulation of T-cell function by antibodies: enhancement of the response of human T-cell clones to hepatitis B surface antigen by antigen-specific monoclonal antibodies.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A; 81 (21), 6846-6850.

Ceppellini, R., Mattiuz, P. L., Scudeller, G. and Visetti, M. (1969)

Experimental allotransplantation in man. I. The role of the HL-A system in different genetic combinations.
Transplant. Proc.; 1 (1), 385-389.

Chicz, R. M., Lane, W. S., Robinson, R. A., Trucco, M., Strominger, J. L. and Gorga, J. C. (1994)

Self-peptides bound to the type I diabetes associated class II MHC molecules HLA-DQ1 and HLA-DQ8.

Int. Immunol.; 6 (11), 1639-1649.

Chicz, R. M., Urban, R. G., Lane, W. S., Gorga, J. C., Stern, L. J., Vignali, D. A. and Strominger, J. L. (1992)

Predominant naturally processed peptides bound to HLA-DR1 are derived from MHC-related molecules and are heterogeneous in size.

Nature; 358 (6389), 764-768.

Corper, A. L., Stratmann, T., Apostolopoulos, V., Scott, C. A., Garcia, K. C., Kang, A. S., Wilson, I. A. and Teyton, L. (2000)

A structural framework for deciphering the link between I-A⁹⁷ and autoimmune diabetes.

Science; 288 (5465), 505-511.

Cresswell, P. (1992)

Chemistry and functional role of the invariant chain.

Curr. Opin. Immunol.; 4 (1), 87-92.

Cresswell, P. (1996)

Invariant chain structure and MHC class II function.

Cell; 84 (4), 505-507.

Cucca, F., Lampis, R., Congia, M., Angius, E., Nutland, S., Bain, S. C., Barnett, A. H. and Todd, J. A. (2001)

A correlation between the relative predisposition of MHC class II alleles to type 1 diabetes and the structure of their proteins.

Hum. Mol. Genet.; 10 (19), 2025-2037.

Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988)

T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition.

Nature; 334 (6181), 395-402.

Denzin, L. K., Robbins, N. F., Carboy-Newcomb, C. and Cresswell, P. (1994)

Assembly and intracellular transport of HLA-DM and correction of the class II antigen-processing defect in T2 cells.

Immunity; 1 (7), 595-606.

Denzin, L. K., Sant'Angelo, D. B., Hammond, C., Surman, M. J. and Cresswell, P. (1997)

Negative regulation by HLA-DO of MHC class II-restricted antigen processing.

Science; 278 (5335), 106-109.

Dessen, A., Lawrence, C. M., Cupo, S., Zaller, D. M. and Wiley, D. C. (1997)
X-ray crystal structure of HLA-DR4 (DRA*0101, DRB1*0401) complexed with a peptide from human collagen II.
Immunity; 7 (4), 473-481.

Douek, D. C. and Altmann, D. M. (1997)
HLA-DO is an intracellular class II molecule with distinctive thymic expression.
Int. Immunol.; 9 (3), 355-364.

Engelhard, V. H. (1994)
Structure of peptides associated with class I and class II MHC molecules.
Annu. Rev. Immunol.; 12, 181-207.

Falcioni, F., Ito, K., Vidovic, D., Belunis, C., Campbell, R., Berthel, S. J., Bolin, D. R., Gillespie, P. B., Huby, N., Olson, G. L., Sarabu, R., Guenot, J., Madison, V., Hammer, J., Sinigaglia, F., Steinmetz, M. and Nagy, Z. A. (1999)
Peptidomimetic compounds that inhibit antigen presentation by autoimmune disease-associated class II major histocompatibility molecules.
Nat. Biotechnol.; 17 (6), 562-567.

Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. and Rammensee, H. G. (1991)
Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules.
Nature; 351 (6324), 290-296.

Falk, K., Rötzschke, O., Stevanović, S., Jung, G. and Rammensee, H. G. (1994)
Pool sequencing of natural HLA-DR, DQ, and DP ligands reveals detailed peptide motifs, constraints of processing, and general rules.
Immunogenetics; 39 (4), 230-242.

Fleckenstein, B., Jung, G. and Wiesmüller, K. H. (1999)
Quantitative analysis of peptide-MHC class II interaction.
Semin. Immunol.; 11 (6), 405-416.

Fleckenstein, B., Kalbacher, H., Muller, C. P., Stoll, D., Halder, T., Jung, G. and Wiesmüller, K. H. (1996)
New ligands binding to the human leukocyte antigen class II molecule DRB1*0101 based on the activity pattern of an undecapeptide library.
Eur. J. Biochem.; 240 (1), 71-77.

Fremont, D. H., Hendrickson, W. A., Marrack, P. and Kappler, J. (1996)
Structures of an MHC class II molecule with covalently bound single peptides.
Science; 272 (5264), 1001-1004.

Fremont, D. H., Monnaie, D., Nelson, C. A., Hendrickson, W. A. and Unanue, E. R. (1998)

Crystal structure of I-A^k in complex with a dominant epitope of lysozyme.
Immunity; 8 (3), 305-317.

Ghosh, P., Amaya, M., Mellins, E. and Wiley, D. C. (1995)

The structure of an intermediate in class II MHC maturation: CLIP bound to HLA-DR3.

Nature; 378 (6556), 457-462.

Glass, D. N. and Giannini, E. H. (1999)

Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait.

Arthritis Rheum.; 42 (11), 2261-2268.

Gorga, J. C., Horejsi, V., Johnson, D. R., Raghupathy, R. and Strominger, J. L. (1987)

Purification and characterization of class II histocompatibility antigens from a homozygous human B cell line.

J. Biol. Chem.; 262 (33), 16087-16094.

Gosselin, E. J. and Parker, D. C. (1990)

Class II MHC molecules and antigen enter the same vesicles during internalization by resting B lymphocytes.

Cell. Immunol.; 129 (2), 404-413.

Guo, H. C., Jardetzky, T. S., Garrett, T. P., Lane, W. S., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1992)

Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle.

Nature; 360 (6402), 364-366.

Haas, J. P., Andreas, A., Rutkowski, B., Brunner, H., Keller, E., Hoza, J., Havelka, S., Sierp, G. and Albert, E. D. (1991)

A model for the role of HLA-DQ molecules in the pathogenesis of juvenile chronic arthritis.

Rheumatol. Int.; 11 (4-5), 191-197.

Haas, J. P., Nevinny-Stickel, C., Schoenwald, U., Truckenbrodt, H., Suschke, J. and Albert, E. D. (1994)

Susceptible and protective major histocompatibility complex class II alleles in early-onset pauciarticular juvenile chronic arthritis.

Hum. Immunol.; 41 (3), 225-233.

Hammer, J., Takacs, B. and Sinigaglia, F. (1992)

Identification of a motif for HLA-DR1 binding peptides using M13 display libraries.

J. Exp. Med.; 176 (4), 1007-1013.

Hammer, J., Valsasnini, P., Tolba, K., Bolin, D., Higelin, J., Takacs, B. and Sinigaglia, F. (1993)

Promiscuous and allele-specific anchors in HLA-DR-binding peptides.
Cell; 74 (1), 197-203.

Ihle, J., Fleckenstein, B., Terreaux, C., Beck, H., Albert, E. D. and Dannecker, G. E. (2003)

Differential peptide binding motif for three juvenile arthritis associated HLA-DQ molecules.
Clin. Exp. Rheumatol.; 21 (2), 257-262.

Jacobson, D. L., Gange, S. J., Rose, N. R. and Graham, N. M. (1997)

Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States.
Clin. Immunol. Immunopathol.; 84 (3), 223-243.

Janeway, C.A., Travers P., Walport, M. and Shlomchik M. (2001)
Immunobiology 5th ed., New York: Garland Publishing

Jardetzky, T. S., Brown, J. H., Gorga, J. C., Stern, L. J., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1996)

Crystallographic analysis of endogenous peptides associated with HLA-DR1 suggests a common, polyproline II-like conformation for bound peptides.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A; 93 (2), 734-738.

Jensen, P. E. (1991)

Enhanced binding of peptide antigen to purified class II major histocompatibility glycoproteins at acidic pH.
J. Exp. Med.; 174 (5), 1111-1120.

Jensen, P. E. (1998)

Antigen processing: HLA-DO - a hitchhiking inhibitor of HLA-DM.
Curr. Biol.; 8 (4), R128-R131.

Johansen, B. H., Jensen, T., Thorpe, C. J., Vartdal, F., Thorsby, E. and Sollid, L. M. (1996)

Both alpha and beta chain polymorphisms determine the specificity of the disease-associated HLA-DQ2 molecules, with beta chain residues being most influential.
Immunogenetics; 45 (2), 142-150.

Jung, C., Kalbus, M., Fleckenstein, B., Melms, A., Jung, G. and Wiesmüller, K. H. (1998)

New ligands for HLA DRB1*0301 by random selection of favourable amino acids ranked by competition studies with undecapeptide amide sublibraries.
J. Immunol. Methods; 219 (1-2), 139-149.

Kappler, J. W., Roehm, N. and Marrack, P. (1987)

T cell tolerance by clonal elimination in the thymus.

Cell; 49 (2), 273-280.

Kaufman, J. F., Auffray, C., Korman, A. J., Shackelford, D. A. and Strominger, J. (1984)

The class II molecules of the human and murine major histocompatibility complex.

Cell; 36 (1), 1-13.

Khalil-Daher, I., Boisgerault, F., Feugeas, J. P., Tieng, V., Toubert, A. and Charron, D. (1998)

Naturally processed peptides from HLA-DQ7 ($\alpha 1^*0501$ - $\beta 1^*0301$): influence of both alpha and beta chain polymorphism in the HLA-DQ peptide binding specificity.

Eur. J. Immunol.; 28 (11), 3840-3849.

Laemmli, U. K. (1970)

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature; 227 (259), 680-685.

Lamb, C. A. and Cresswell, P. (1992)

Assembly and transport properties of invariant chain trimers and HLA-DR-invariant chain complexes.

J. Immunol.; 148 (11), 3478-3482.

Lang, H. L., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., Stuart, D. I., Bell, J. I., Jones, E. Y. and Fugger, L. (2002)

A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis.

Nat. Immunol.; 3 (10), 940-943.

Lanzavecchia, A. (1985)

Antigen-specific interaction between T and B cells.

Nature; 314 (6011), 537-539.

Latek, R. R., Suri, A., Petzold, S. J., Nelson, C. A., Kanagawa, O., Unanue, E. R. and Fremont, D. H. (2000)

Structural basis of peptide binding and presentation by the type I diabetes-associated MHC class II molecule of NOD mice.

Immunity; 12 (6), 699-710.

Lee, K. H., Wucherpfennig, K. W. and Wiley, D. C. (2001)

Structure of a human insulin peptide-HLA-DQ8 complex and susceptibility to type 1 diabetes.

Nat. Immunol.; 2 (6), 501-507.

- Li, Y., Li, H., Martin, R. and Mariuzza, R. A. (2000)**
Structural basis for the binding of an immunodominant peptide from myelin basic protein in different registers by two HLA-DR2 proteins.
J. Mol. Biol.; 304 (2), 177-188.
- Lindstedt, R., Liljedahl, M., Peleraux, A., Peterson, P. A. and Karlsson, L. (1995)**
The MHC class II molecule H2-M is targeted to an endosomal compartment by a tyrosine-based targeting motif.
Immunity; 3 (5), 561-572.
- Lorenz, R. G., Blum, J. S. and Allen, P. M. (1990)**
Constitutive competition by self proteins for antigen presentation can be overcome by receptor-enhanced uptake.
J. Immunol.; 144 (5), 1600-1606.
- Lotteau, V., Teyton, L., Peleraux, A., Nilsson, T., Karlsson, L., Schmid, S. L., Quaranta, V. and Peterson, P. A. (1990)**
Intracellular transport of class II MHC molecules directed by invariant chain.
Nature; 348 (6302), 600-605.
- Madden, D. R., Gorga, J. C., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1992)**
The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC.
Cell; 70 (6), 1035-1048.
- Malcherek, G., Falk, K., Röttschke, O., Rammensee, H. G., Stevanović, S., Gnau, V., Jung, G. and Melms, A. (1993)**
Natural peptide ligand motifs of two HLA molecules associated with myasthenia gravis.
Int. Immunol.; 5 (10), 1229-1237.
- Marks, M. S., Roche, P. A., van Donselaar, E., Woodruff, L., Peters, P. J. and Bonifacio, J. S. (1995)**
A lysosomal targeting signal in the cytoplasmic tail of the beta chain directs HLA-DM to MHC class II compartments.
J. Cell Biol.; 131 (2), 351-369.
- Marsh, S. G. (1998)**
HLA class II region sequences, 1998.
Tissue Antigens; 51 (4 Pt 2), 467-507.
- Metzger, J. W., Kempter, C., Wiesmüller, K. H. and Jung, G. (1994)**
Electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry of synthetic multicomponent peptide mixtures: determination of composition and purity.
Anal. Biochem.; 219 (2), 261-277.

- Mosyak, L., Zaller, D. M. and Wiley, D. C. (1998)**
The structure of HLA-DM, the peptide exchange catalyst that loads antigen onto class II MHC molecules during antigen presentation.
Immunity; 9 (3), 377-383.
- Mouritsen, S., Hansen, A. S., Petersen, B. L. and Buus, S. (1992)**
pH dependence of the interaction between immunogenic peptides and MHC class II molecules. Evidence for an acidic intracellular compartment being the organelle of interaction.
J. Immunol.; 148 (5), 1438-1444.
- Murray, K., Thompson, S. D. and Glass, D. N. (1997)**
Pathogenesis of juvenile chronic arthritis: genetic and environmental factors.
Arch. Dis. Child.; 77 (6), 530-534.
- Nakagawa, T. Y. and Rudensky, A. Y. (1999)**
The role of lysosomal proteinases in MHC class II-mediated antigen processing and presentation.
Immunol. Rev.; 172, 121-129.
- Nepom, B. S., Nepom, G. T., Coleman, M. and Kwok, W. W. (1996)**
Critical contribution of beta chain residue 57 in peptide binding ability of both HLA-DR and -DQ molecules.
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.; 93 (14), 7202-7206.
- Nepom, G. T. and Erlich, H. (1991)**
MHC class-II molecules and autoimmunity.
Annu. Rev. Immunol.; 9, 493-525.
- Oldstone, M. B. (1987)**
Molecular mimicry and autoimmune disease.
Cell; 50 (6), 819-820.
- Petty, R. E., Southwood, T. R., Baum, J., Bhattay, E., Glass, D. N., Manners, P., Maldonado-Cocco, J., Suarez-Almazor, M., Orozco-Alcala, J. and Prieur, A. M. (1998)**
Revision of the proposed classification criteria for juvenile idiopathic arthritis: Durban, 1997.
J. Rheumatol.; 25 (10), 1991-1994.
- Pinet, V., Vergelli, M., Martin, R., Bakke, O. and Long, E. O. (1995)**
Antigen presentation mediated by recycling of surface HLA-DR molecules.
Nature; 375 (6532), 603-606.
- Pinilla, C., Appel, J. R., Blanc, P. and Houghten, R. A. (1992)**
Rapid identification of high affinity peptide ligands using positional scanning synthetic peptide combinatorial libraries.
Biotechniques; 13 (6), 901-905.

Quarsten, H., Paulsen, G., Johansen, B. H., Thorpe, C. J., Holm, A., Buus, S. and Sollid, L. M. (1998)

The P9 pocket of HLA-DQ2 (non-Asp β 57) has no particular preference for negatively charged anchor residues found in other type 1 diabetes-predisposing non-Asp β 57 MHC class II molecules.

Int. Immunol.; 10 (8), 1229-1236.

Rammensee, H. G. (1995)

Chemistry of peptides associated with MHC class I and class II molecules.

Curr. Opin. Immunol.; 7 (1), 85-96.

Rammensee, H. G., Friede, T. and Stevanović, S. (1995)

MHC ligands and peptide motifs: first listing.

Immunogenetics; 41 (4), 178-228.

Reizis, B., Eisenstein, M., Mor, F. and Cohen, I. R. (1998)

The peptide-binding strategy of the MHC class II I-A molecules.

Immunol. Today; 19 (5), 212-216.

Riese, R. J., Wolf, P. R., Brömme, D., Natkin, L. R., Villadangos, J. A., Ploegh, H. L. and Chapman, H. A. (1996)

Essential role for cathepsin S in MHC class II-associated invariant chain processing and peptide loading.

Immunity; 4 (4), 357-366.

Roche, P. A. and Cresswell, P. (1990)

Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding.

Nature; 345 (6276), 615-618.

Roche, P. A., Marks, M. S. and Cresswell, P. (1991)

Formation of a nine-subunit complex by HLA class II glycoproteins and the invariant chain.

Nature; 354 (6352), 392-394.

Rotter, J. I. and Landaw, E. M. (1984)

Measuring the genetic contribution of a single locus to a multilocus disease.

Clin. Genet.; 26 (6), 529-542.

Schmidt, D., Verdaguer, J., Averill, N. and Santamaria, P. (1997)

A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity.

J. Exp. Med.; 186 (7), 1059-1075.

Scott, C. A., Peterson, P. A., Teyton, L. and Wilson, I. A. (1998)

Crystal structures of two I-A^d-peptide complexes reveal that high affinity can be achieved without large anchor residues.

Immunity; 8 (3), 319-329.

Sette, A., Southwood, S., O'Sullivan, D., Gaeta, F. C., Sidney, J. and Grey, H. M. (1992)

Effect of pH on MHC class II-peptide interactions.
J. Immunol.; 148 (3), 844-851.

Shackelford, D. A., Kaufman, J. F., Korman, A. J. and Strominger, J. L. (1982)

HLA-DR antigens: structure, separation of subpopulations, gene cloning and function.
Immunol. Rev.; 66, 133-187.

Sharma, S. and Sherry, D. D. (1999)

Joint distribution at presentation in children with pauciarticular arthritis.
J. Pediatr.; 134 (5), 642-643.

Sinha, A. A., Lopez, M. T. and McDevitt, H. O. (1990)

Autoimmune diseases: the failure of self tolerance.
Science; 248 (4961), 1380-1388.

Smith, K. J., Pyrdol, J., Gauthier, L., Wiley, D. C. and Wucherpfennig, K. W. (1998)

Crystal structure of HLA-DR2 (DRA*0101, DRB1*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein.
J. Exp. Med.; 188 (8), 1511-1520.

Stern, L. J., Brown, J. H., Jardetzky, T. S., Gorga, J. C., Urban, R. G., Strominger, J. L. and Wiley, D. C. (1994)

Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide.
Nature; 368 (6468), 215-221.

Stevanović, S. and Jung, G. (1993)

Multiple sequence analysis: pool sequencing of synthetic and natural peptide libraries.
Anal. Biochem.; 212 (1), 212-220.

Strubin, M., Berte, C. and Mach, B. (1986)

Alternative splicing and alternative initiation of translation explain the four forms of the Ia antigen-associated invariant chain.
EMBO J.; 5 (13), 3483-3488.

Teyton, L., O'Sullivan, D., Dickson, P. W., Lotteau, V., Sette, A., Fink, P. and Peterson, P. A. (1990)

Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways.
Nature; 348 (6296), 39-44.

Thomson, W., Barrett, J. H., Donn, R., Pepper, L., Kennedy, L. J., Ollier, W. E., Silman, A. J., Woo, P. and Southwood, T. (2002)

Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients.

Rheumatology (Oxford); 41 (10), 1183-1189.

Tompkins, S. M., Rota, P. A., Moore, J. C. and Jensen, P. E. (1993)

A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins.

J. Immunol. Methods; 163 (2), 209-216.

Trowsdale, J. (1993)

Genomic structure and function in the MHC.

Trends Genet.; 9 (4), 117-122.

van de Wal, Y., Kooy, Y. M., Drijfhout, J. W., Amons, R., Papadopoulos, G. K. and Koning, F. (1997)

Unique peptide binding characteristics of the disease-associated DQ($\alpha 1^*0501$, $\beta 1^*0201$) vs the non-disease-associated DQ($\alpha 1^*0201$, $\beta 1^*0202$) molecule.

Immunogenetics; 46 (6), 484-492.

van Ham, S. M., Tjin, E. P., Lillemeier, B. F., Gruneberg, U., van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D., Ottenhoff, T. H., Pappin, D. J., Trowsdale, J. and Neefjes, J. (1997)

HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading.

Curr. Biol.; 7 (12), 950-957.

Vartdal, F., Johansen, B. H., Friede, T., Thorpe, C. J., Stevanović, S., Eriksen, J. E., Sletten, K., Thorsby, E., Rammensee, H. G. and Sollid, L. M. (1996)

The peptide binding motif of the disease associated HLA-DQ ($\alpha 1^* 0501$, $\beta 1^* 0201$) molecule.

Eur. J. Immunol.; 26 (11), 2764-2772.

Vergelli, M., Pinet, V., Vogt, A. B., Kalbus, M., Malnati, M., Riccio, P., Long, E. O. and Martin, R. (1997)

HLA-DR-restricted presentation of purified myelin basic protein is independent of intracellular processing.

Eur. J. Immunol.; 27 (4), 941-951.

Villadangos, J. A., Bryant, R. A., Deussing, J., Driessen, C., Lennon-Dumenil, A. M., Riese, R. J., Roth, W., Saftig, P., Shi, G. P., Chapman, H. A., Peters, C. and Ploegh, H. L. (1999)

Proteases involved in MHC class II antigen presentation.

Immunol. Rev.; 172, 109-120.

Watts, C. (1997)

Capture and processing of exogenous antigens for presentation on MHC molecules.

Annu. Rev. Immunol.; 15, 821-850.

Wedderburn, L. R., Patel, A., Varsani, H. and Woo, P. (2001)

Divergence in the degree of clonal expansions in inflammatory T cell subpopulations mirrors HLA-associated risk alleles in genetically and clinically distinct subtypes of childhood arthritis.

Int. Immunol.; 13 (12), 1541-1550.

Wucherpfennig, K. W. and Strominger, J. L. (1995)

Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein.

Cell; 80 (5), 695-705.

Ziegler, A., Heinig, J., Muller, C., Gotz, H., Thinnes, F. P., Uchanska-Ziegler, B. and Wernet, P. (1986)

Analysis by sequential immunoprecipitations of the specificities of the monoclonal antibodies TU22,34,35,36,37,39,43,58 and YD1/63.HLK directed against human HLA class II antigens.

Immunobiology; 171 (1-2), 77-92.

Zinkernagel, R. M. and Doherty, P. C. (1974)

Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system.

Nature; 248 (450), 701-702.

8 Danksagung

Bedanken möchte ich mich an erster Stelle bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Günther Dannecker für die Überlassung des Themas, seine hervorragende Betreuung bei der Durchführung und Korrektur der Arbeit, sowie für die zahlreichen Aktivitäten außerhalb des Labors.

Weiterhin gilt mein Dank Luciana Dannecker für die Einführung und Hilfe bei diversen Zellkulturtechniken sowie für ihre organisatorische Tätigkeit.

Bei Markus Haug und Dipl.-Biochem. Carsten Schepp bedanke ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die außerordentlich gute Arbeitsatmosphäre.

Dr. Hubert Kalbacher bin ich sehr dankbar für die Möglichkeit, in seinem Labor die Isolation der HLA-DQ-Moleküle durchzuführen.

Beim gesamten Team der Arbeitsgruppe Kalbacher möchte ich mich für die überaus angenehme Atmosphäre im „Berghof“ bedanken.

Dr. Gerold Schwarz danke ich für die Einführung in zahlreiche biochemische Techniken, insbesondere in die Methodik der HLA-Isolation.

Ferner gilt mein Dank PD Dr. Karl-Heinz Wiesmüller für fruchtbare Diskussionen und die großzügige Bereitstellung von Peptiden.

Dr. Burkhard Fleckenstein danke ich für die Überlassung der Nonapeptid-Bibliothek.

Prof. Dr. Andreas Ziegler, Institut für Immungenetik, Universitätsklinikum Charité, Berlin, gilt mein Dank für die Überlassung der Tü22 Hybridome.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir dieses Studium ermöglicht haben und mich jederzeit vorbehaltlos unterstützten.

Andreas und Steffi gilt mein Dank für viele konstruktive Diskussionen.

Yvonne danke ich für ihre Zuneigung und das unendliche Verständnis, das sie mir entgegenbrachte.

9 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

- Name: Thomas Volz
- Geburtsdatum: 26.07.1975
- Geburtsort: Villingen-Schwenningen

SCHULAUSSBILDUNG

- 1982 - 1986 Hirschbergschule, Grundschule, Villingen-Schwenningen
- 1986 - 1995 Gymnasium am Deutenberg, Villingen-Schwenningen
Abschluss: allgemeine Hochschulreife

ZIVILDienst

- 1995 - 1996 Klinik für Allgemein- und Viszeralchirurgie, Klinikum Villingen-Schwenningen

STUDIUM UND BERUFLICHER WERDEGANG

- 10/1996 Aufnahme des Studiums der Humanmedizin an der Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 09/1998 Ärztliche Vorprüfung
- 10/1998 Fortsetzung des Studiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 09/1999 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 03/2000 Famulatur an der Medizinischen Klinik Schwenningen, Klinikum Villingen-Schwenningen
- 08/2000 Famulatur an der Universitäts-Kinderklinik Tübingen
- 04/2001 Famulatur in der Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin am Universitätsklinikum Tübingen
- 08/2001 Famulatur in der Praxis für Chirurgie/Unfallchirurgie, Dr. Fleischer - Dr. Jundt, Villingen-Schwenningen

- 04/2002 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 10/2002 Beginn des Praktischen Jahres am Universitätsklinikum Tübingen, Wahlfach Dermatologie
- 11/2003 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- seit 01/2004 Arzt im Praktikum an der Universitäts-Hautklinik Tübingen

PROMOTIONSARBEIT

- Januar 2000 Beginn der Promotionsarbeit im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 510, Projekt D3 bei Prof. Dr. Günther Dannecker an der Klinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Universität Tübingen

VERÖFFENTLICHUNGEN

Volz T, Schwarz G, Fleckenstein B, Ihle J, Maier JT, Wiesmüller KH, and Dannecker GE.

Ligands binding to the MHC class II allele DQA1*0401-DQB1*0402 identified by screening synthetic combinatorial peptide libraries

Immunobiology 204 (1-2), S. 128-129, 2001

32. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie,
Dresden, 26.-29. September 2001,

Posterpräsentation

Volz T, Schwarz G, Fleckenstein B, Schepp CP, Haug M, Roth J, Wiesmüller KH, and Dannecker GE.

Determination of the peptide binding motif and high affinity ligands for HLA-DQ4 using synthetic peptide libraries

Human Immunology, *submitted*