

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin
(Department)Tübingen
Abteilung I
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

Untersuchungen zur differentiellen Bindung von HLA-DQ-Peptidfragmenten an
Hitzeschockproteine im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung in der
Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Claudia Nicoleta Hesse
aus Bistrita/Rumänien

2009

Dekan: Prof. Dr. med. I.B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. E. Dannecker

2. Berichterstatter: Frau Professor Dr. I. Kötter

Meinem geliebten Ehemann
und meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1	Abkürzungsverzeichnis	3
2	Einleitung	5
2.1	Das Immunsystem	5
2.2	MHC-Moleküle	6
2.2.1	Struktur der MHC-Moleküle	7
2.2.2	HLA-DQ-Moleküle	8
2.2.3	Antigenprozessierung und Präsentation	9
2.2.4	Antigenerkennung durch T-Zellen	11
2.3	Autoimmunerkrankungen und HLA-Assoziation	12
2.4	Juvenile idiopathische Arthritis	13
2.5	Hitzeschockproteine	15
2.5.1	Die Familie der 70 kDa Hitzeschockproteine (HSP70)	17
2.5.2	Die Familie der 60 kDa Hitzeschockproteine (HSP60)	18
2.5.3	Einfluss von Hitzeschockproteinen auf Autoimmunerkrankungen	19
2.5.4	Hitzeschockproteine und Antigenpräsentation	21
2.6	Zielsetzung der Arbeit	23
3	Material und Methoden	25
3.1	Material	25
3.1.1	Geräte	25
3.1.2	Verbrauchsmaterialien	26
3.1.3	Chemikalien, Reagenzien	27
3.1.4	Hitzeschockproteine	28
3.1.5	Monoklonale Antikörper	28
3.1.6	Puffer und Lösungen	28
3.2	Methoden	29
3.2.1	Peptidsynthese	29
3.2.2	Peptidaufreinigung	30
3.2.3	Massenbestimmung	30
3.2.4	Europium-Immunofluoreszenz-Assay	30
3.2.4.1	Europium-Fluoreszenz-Assay mit HLA-DQ-Peptidfragmenten	31

3.2.4.2	Europium-Assay mit rekombinantem humanem Hsp60.....	32
3.2.4.3	Europium-Assay mit rekombinanten HSP70 Molekülen (DnaK, Hsp70, Hsc70).....	33
4	Ergebnisse.....	35
4.1	Quantitative Bindungsuntersuchungen mit HSP60 und HLA-DQ- Peptidfragmenten im Europium-Fluoreszenz Assay.....	35
4.1.1	Methodische Ergebnisse: Optimierung des Europium-Fluoreszenz- Assays.....	36
4.1.2	Quantitative Bindungsmessungen mit rh-Hsp60 und HLA-DQ- Peptidfragmenten.....	40
4.1.3	Sättigungsversuche von Biot-HLA-DQA1*0401 an rh-Hsp60.....	42
4.1.4	Kompetitionsversuch von rh-Hsp60 mit Biot-HLA-DQA1*0401-Peptid durch 10-fachen Überschuss an unmarkierten Peptiden.....	43
4.2	Quantitative Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und HLA-DQ- Peptidfragmenten im Europium-Fluoreszenz Assay.....	45
4.2.1	Interaktion von Biotin-markierten HLA-DQ-Peptidfragmenten mit verschiedenen HSP70-Molekülen.....	46
4.2.2	Sättigungsexperiment mit Biotin-markiertem HLA-DQA1*0201-Peptid (Biot-KETVWKLPLFHRLR) und DnaK.....	50
4.2.3	Kompetition mit Biot-HLA-DQA1*0201 an DnaK durch 3-/10-fachen molaren Überschuss an unmarkierten HLA-DQA1- Peptidfragmenten.....	51
4.2.4	Kompetition mit Biotin-markiertem CLIP-Peptid an DnaK mit unmarkierten Peptiden aus dem HLA-DQ-Fragment.....	55
5	Diskussion.....	57
6	Zusammenfassung.....	67
7	Literaturverzeichnis.....	69
8	Danksagung.....	83
9	Lebenslauf.....	84

1 Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ADP	Adenosin-diphosphat
Ak	Antikörper
APC	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of differentiation
CIA	Collagen-induzierte Arthritis
CLIP	class II associated invariant chain peptide
cps	counts per second
DELFLIA	Europim-Fluoreszenz-Assay (dissociation-enhanced lanthanide Fluoro-immuno-assay)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithithreitol
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	endoplasmatisches Retikulum
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
HLA	human leucocyte antigen
HSA	humanes Serumalbumin
Hsc70	=Hsp73, konstitutiv exprimiertes, zytosolisches HSP70-Molekül
HSP	Hitzeschockprotein
HSP70	HSP-Familie, 70 kDa
HSP60	HSP-Familie, 60 kDa
Hsp70	=Hsp72, stress-induzierbares, zytosolisches HSP70-Molekül
HV3	hypervariable Region 3
IL	Interleukin
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis

kDa	Kilodalton
Ii	Invariante Kette (invariant chain)
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MHC	major histocompatibility complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
MIIC	MHC Klasse II-Beladungskompartiment
PBS	phosphate-buffered saline (phosphat-gepufferte Saline)
RA	Rheumatoide Arthritis
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie
RT	Raumtemperatur
SA	Streptavidin
SDS-Page	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SE	shared epitope
TAP	transporter associated with antigen processing
Th-Zellen	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TZR	T-Zell-Rezeptor

2 Einleitung

2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes und differenziertes Netzwerk, bestehend aus Immunzellen, Mediatoren, Geweben und Immunorganen, dessen Hauptfunktion darin besteht, fremde und schädliche Einflüsse auf unseren Organismus zu erkennen und zu überwinden. Dies können Viren, Protozoen, Parasiten, Bakterien, Pilze aber auch entartete maligne Zellen sein. Ferner soll das Immunsystem in der Lage sein zwischen fremden und körpereigenen Strukturen zu unterscheiden.

Dem Immunsystem stehen zur Bekämpfung von Fremdkörpern zwei Mechanismen zur Verfügung, das angeborene (innate) und das erworbene (adaptative) Immunsystem. Im Körper laufen beide Systeme verschaltet ab. Ein Antigen kann zum Beispiel das Komplementsystem aktivieren und phagozytiert werden (angeborenes Immunsystem) und dadurch zur T-Zell-Aktivierung führen, anschließend kann eine an B-Zellen gekoppelte Antikörpersynthese initiiert werden (erworbene Immunität).

Die angeborene Abwehr stellt die erste Barriere gegen Krankheitserreger und Fremdstoffe dar. An den nicht-adaptativen zellulären Abwehrmechanismen sind vor allem Makrophagen, polymorphkernige Neutrophile und natürliche Killerzellen beteiligt, die sowohl virale als auch bakterielle Strukturen erkennen können. Sie können körperfremdes Material phagozytieren und eventuell sofort unschädlich machen. Zu den humoralen Faktoren der unspezifischen Immunantwort gehören das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme und Entzündungsmediatoren wie Interferone und Interleukine.

Im Laufe der Evolution hat die adaptative Immunität im Gegensatz zur unspezifischen Abwehr sehr effiziente und hochspezifische Abwehrmaßnahmen entwickelt. Überlebt der Erreger den ersten Angriff der angeborenen Abwehr, werden die Pathogene zellvermittelt oder humoral (antikörpervermittelt) bekämpft. An den adaptativen Abwehrmechanismen sind Zelltypen mit unterschiedlichen Aufgaben wie antigenpräsentierende Zellen (APC), B-

Lymphozyten und T-Lymphozyten beteiligt. Diese Zellen (Lymphozyten) werden bereits in den lymphatischen Organen in zwei Subpopulationen differenziert. Die B-Lymphozyten entstehen im Knochenmark, die T-Lymphozyten hingegen reifen im Thymus. Diese beiden Subpopulationen besitzen unterschiedliche Gruppen von hochvariablen Rezeptormolekülen, wodurch die adaptative Immunität humoral und zellulär vermittelt wird.

Zum einen sind es die Immunglobuline, als Antikörper bezeichnet, die in extrazelluläre Räume des Körpers sezerniert werden sowie auf B-Zellen als Rezeptoren dienen. Deren Hauptaufgabe liegt in der Antigenerkennung sowie der Neutralisierung von extrazellulären Pathogenen und deren Produkten in ihrer nativen Form.

Zum anderen reagieren die T-Lymphozyten mit ihren antigenspezifischen T-Zell-Rezeptoren (TCR) auf Peptidfragmente von Antigenen, die in Verbindung mit Molekülen des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC, s. 2.2) auf der Membran von APCs präsentiert werden. Dieser Erkennungsmechanismus beruht auf direktem Kontakt zwischen T-Zell-Rezeptor, MHC-Molekül und Peptid-Antigen. T-Zellen werden nach ihren Oberflächemolekülen in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen unterteilt.

Die $CD8^+$ T-Zellen (zytotoxisch) sind wesentlich an der Elimination von virusinfizierten Zellen und Tumorzellen durch Induktion von Apoptose und direkter Lyse (Perforin, Granzym B) in den Zielzellen beteiligt. Die $CD4^+$ T-Zellen hingegen werden als T-Helferzellen Subpopulation bezeichnet und wirken aktivierend und/oder regulierend auf andere Zellen des Immunsystems, wie zum Beispiel B-Zellen, zytotoxische T-Zellen und APCs (Janeway und Travers, 1997).

2.2 MHC-Moleküle

Die Haupthistokompatibilitätsgene, auch als major histocompatibility gene complex (MHC) bezeichnet, stellen einen Genlocus auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Genabschnitt von etwa 3500kbp) dar und kodieren die

Histokompatibilitätsgene, die beim Menschen als HLA-Moleküle (human leucocyte antigen) bezeichnet werden.

Sie kodieren nicht nur für die MHC-Moleküle, sondern auch für immunologisch bedeutsame Proteine wie TAP (transporter associated with antigen processing), MICA und MICB (MHC-class I chain genes A und B), Proteine des Komplementsystems, Zytokine, Proteasen sowie einige Hitzeschockproteine (Trowsdale et al., 1991). Eine Ausnahme bildet das β 2-Mikroglobulin (β -Kette des MHC Klasse I-Moleküls), das von Chromosom 15 kodiert wird.

Die im MHC-Genkomplex kodierten Moleküle teilt man in drei Gruppen ein. An der Präsentation der Antigene sind die MHC-Moleküle der Klasse I und II beteiligt. Die MHC-Moleküle sind spezifische Rezeptoren für Peptidantigene aus dem intrazellulären Proteinabbau und dem Abbau phagozytierten Materials. Die Moleküle werden von T-Zellen als MHC-Peptid-Komplexe auf Zelloberflächen erkannt. Peptidfragmente, die aus virusinfizierten oder entarteten Zellen sowie aus dem Abbau phagozytierter Antigene entstehen und als körperfremd identifiziert werden, aktivieren T-Zellen zur antiviralen Zytolyse, Transplantatabstoßung sowie zur Produktion immunregulatorischer Zytokine (Madden, 1995).

2.2.1 Struktur der MHC-Moleküle

Die MHC-Moleküle der Klasse I werden auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert und bestehen aus einer im MHC-Komplex kodierten schweren α -Kette (ca. 43 kDa) und einer nicht im MHC-Komplex kodierten kleinen extrazellulär gelegenen β -Kette (das β 2-Mikroglobulin, ca. 12 kDa). In der α -Kette, bestehend aus drei extrazellulären Domänen, einer Transmembranregion und einem kurzen zytoplasmatischen Bereich, befindet sich der antigenbindende Spalt. Die Bindungspositionen befinden sich bei MHC-Klasse I-Molekülen an beiden Enden der Bindungsgrube. Die Peptide, die durch MHC-Klasse I präsentiert werden, haben am Carboxylende einen hydrophoben Verankerungsrest, so dass zahlreiche Peptide mit passender Länge und den richtigen Verankerungsresten an das entsprechende MHC-Klasse I-Molekül binden

können. So kann ein einzelnes MHC I-Molekül ein breites Spektrum verschiedener Peptide binden. Die MHC-Klasse I-Moleküle können aufgrund ihrer Struktur Peptide mit einer Länge von 8-10 Aminosäuren binden. Der Komplex aus MHC I-Molekül und antigenem Peptid an der Zelloberfläche wird von CD8 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt.

MHC-Klasse II-Moleküle werden hauptsächlich auf Zellen des Immunsystems exprimiert, vor allem auf professionellen antigenpräsentierenden Zellen, wie Makrophagen, dendritischen Zellen und B-Zellen, aber auch auf Thymusepithelzellen.

Sie bestehen aus zwei, vom MHC-Komplex kodierten, nicht-kovalent verbundenen Transmembranglykoproteinketten: eine α -Kette (33-34 kDa) und eine β -Kette (26-28 kDa). Sie besitzen jeweils zwei extrazelluläre Domänen, eine Transmembranregion und einen kurzen zytoplasmatischen Abschnitt. Die α - und β -Ketten werden von je drei Genloci, HLA-DP, -DQ und -DR kodiert. Die α_2 - und β_2 -Domänen sind hochkonserviert. Die peptidbindende Furche wird aus der hypervariablen α_1 und β_1 Domäne gebildet. Der Polymorphismus im Bereich der Antigenbindungsstelle kommt ausschließlich durch die β -Kette zustande, da sie die peptidbindende Grube des HLA-Moleküls formt. Im Gegensatz zu den MHC I-Molekülen ist der peptidbindende Spalt der MHC II-Moleküle an beiden Enden offen und die Bindungsankerstellen über die gesamte Länge des Peptides verteilt, so dass Peptide mit variabler Länge von 12-24 Aminosäuren binden können und von MHC-Klasse II-Molekülen präsentiert werden (Brown, 1993, Rammensee, 1995). Der Komplex aus MHC II-Molekülen und Antigenen aktiviert die CD4 positiven T-Helferzellen.

2.2.2 HLA-DQ-Moleküle

Die HLA-DQ-Subregion enthält 5 Genorte (DQA1, DQA2, DQB1, DQB2, DQB3). Die beiden polymorphen Gene DQA1 und DQB1 kodieren die DQ α - und DQ β -Kette und zusammen bilden sie das DQ $\alpha\beta$ -Molekül. Die Gene DQA2, DQB2 und DQB3 werden nicht exprimiert und stellen Pseudogene dar.

Sowohl für die DQA1- als auch für DQB1-Gene ist ein allelischer Polymorphismus bekannt, d.h. von diesen Genen existieren in einer Population eine Vielzahl unterschiedlicher Allele. Maßgebend jedoch für das DQ-Antigen ist der Polymorphismus der DQ β -Kette (Cruse et al., 1998). Der allelische Polymorphismus ist im Bereich der Peptidbindungsstelle lokalisiert, so dass unterschiedliche HLA-DQ-Allele ein unterschiedliches Repertoire an prozessierten Peptiden selektiv binden können. Des Weiteren besteht zwischen der HLA-DQ- und HLA-DR-Region ein starkes Kopplungsungleichgewicht (Bengovich et al., 1992). Bestimmte HLA-DQ-Antigene werden in Assoziationen mit bestimmten HLA-DR-Antigenen auf der Zelloberfläche exprimiert.

Für die Gene der α -Kette sind bislang mindestens 34 unterschiedliche Allele, für die β -Kette mindestens 87 diverse Allele bekannt (Marsh et al., 2000).

Die serologische Typisierung unterscheidet zwischen DQ1 bis DQ9, wobei nur die β -Kette des DQ-Moleküls erkannt wird.

2.2.3 Antigenprozessierung und Präsentation

Intrazelluläre und extrazelluläre Peptidantigene werden unterschiedlich für die Präsentation auf MHC I und II Molekülen generiert.

Über den MHC-Klasse I-Antigenprozessierungsweg werden vor allem endogene Antigenfragmente präsentiert. Diese stammen von innerhalb der Zelle synthetisierten Antigenen oder von viralen Proteinen, die ebenfalls im Zytoplasma der Zelle erzeugt wurden. Dieser Prozess der Peptidgenerierung geschieht hauptsächlich über den Ubiquitin-Proteasom abhängigen Weg (Schild und Rammensee, 2000).

Der Peptidtransport in das endoplasmatische Retikulum erfolgt ATP-abhängig über TAP1/TAP2 (transporter associated with antigen processing), ein heterodimeres Transporterprotein, das selbst an der Auswahl translozierter Peptide zur Beladung auf MHC I-Molekülen beteiligt ist (Powis et al., 1996).

Mithilfe von molekularen Chaperonen wie Calnexin (transmembran) und Calreticulin (luminal) wird die schwere Kette der MHC I-Moleküle im endoplasmatischen Retikulum (ER) einer Zelle zusammengefaltet. Durch

Interaktion mit ERp57 und dem Protein Tapasin wird verhindert, dass leere MHC I-Moleküle an die Zelloberfläche gelangen und dort extrazelluläre Peptide binden (Williams und Watts, 1995; Lindquist et al., 1998; Ortmann et al., 1997; Rock und Goldberg, 1999).

Die Bindung eines Peptids an frisch synthetisierte und durch Chaperone partiell stabilisierte MHC I-Moleküle / β_2 -Mikroglobulin bewirkt die endgültige Faltung und den Transport des fertigen Komplexes über Golgi-Vesikel an die Zelloberfläche (Pamer und Cresswell, 1998).

Exogene Antigene werden durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) mittels Phagozytose, rezeptor-vermittelter Endozytose oder Makropinozytose in endosomale Vesikel aufgenommen und gelangen meist in den MHC-Klasse II-Antigenprozessierungsweg. Diese endosomalen Vesikel bilden sich aus Teilen der internalisierten Zellmembran und enthalten Aspartatproteasen wie Cathepsin D und E sowie Cysteinproteasen wie Cathepsin B, L, und S. Exogen internalisierte Proteine werden im sauren Milieu der Endosomen zu 10 bis 20 Aminosäuren großen Peptiden degradiert. Die Endosomen verschmelzen dann mit Vesikeln, welche neu synthetisierte MHC-Klasse II-Moleküle enthalten. Die MHC-Klasse II-Moleküle wurden im rauen endoplasmatischen Retikulum synthetisiert. Hier wird durch Anlagerung der invarianten Kette (Ii, CD74) die Peptidbindungstasche blockiert, so dass die Bindung von intrazellulären Peptiden bzw. partiell gefalteten Proteinen im ER an MHC II verhindert wird (Roche und Cresswell, 1990). Durch die Assoziation von MHC II-Molekülen mit Ii entsteht ein nonamerer Komplex aus je drei α -, β -Ketten und Ii (Roche et al., 1991). Des Weiteren dirigiert die invariante Kette das Ausschleusen von MHC II-Molekülen durch den Golgi-Apparat zum Lysosom (Lotteau et al., 1990).

Die zunächst vorhandene „Schutzkette“ Ii in der Bindungsgrube wird schrittweise abgespalten und das in der Bindungsgrube verbleibende Peptid (class-II-associated invariant-chain peptide, CLIP) gegen ein entsprechendes Antigenfragment (Epitop) ausgetauscht. Der Austausch von CLIP gegen antigene Peptide im MHC-Klasse II-Beladungskompartiment wird durch ein

Heterodimer katalysiert. Es handelt sich um HLA-DM, ein Homolog zu MHC-II, bestehend aus einer α - und β -Kette, jedoch ohne die Fähigkeit der Peptidbindung (Mosyak et al., 1998). Die MHC-Peptid-Komplexe werden auf die Zelloberfläche transportiert und von $CD4^+$ T-Lymphozyten erkannt (Ferrari et al., 1997).

2.2.4 Antigenerkennung durch T-Zellen

Die Erkennung von Peptid/MHC-Epitopen auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen erfolgt über T-Zellrezeptoren (TCR) auf der Oberfläche von T-Lymphozyten, wobei jede T-Zelle einen Rezeptortyp bestimmter Spezifität besitzt. Der Rezeptor auf der T-Zelle besteht aus zwei verschiedenen Polypeptidketten: die TCR- α -Kette und die TCR- β -Kette, die durch eine Disulfidbrücke zu einer heterodimeren Struktur verbunden sind. Eine kleine Gruppe von T-Zellen (circa 1%) trägt statt α/β -TCR einen γ/δ -TCR.

Während der T-Zellreifung kann durch unterschiedlichste Kombinationen der Loci für die β - und α -Ketten eine enorme Vielfalt an T-Zell-Rezeptoren von bis zu 10^{15} TCR unterschiedlicher Spezifität generiert werden (Davis und Bjorkmann, 1998). Die so generierten TCR erkennen spezifisch ein einziges im Kontext mit einem MHC-Molekül präsentiertes Antigen, das heißt TCR eines Individuums können Peptide fremder Antigene nur in Verbindung mit körpereigenen MHC-Molekülen erkennen (MHC-Restriktion) (Zinkernagel und Doherty, 1974).

Des Weiteren werden für die Antigenerkennung durch die T-Zellen neben dem TCR auch noch die Zelloberflächenproteine CD4 und CD8 benötigt, die als Korezeptoren dienen. Durch die Expression dieser Oberflächenproteine werden die T-Zellen in zwei Hauptgruppen unterschieden: $CD8^+$ T-Zellen und $CD4^+$ T-Helferzellen. Die naiven $CD8^+$ T-Zellen besitzen eine Affinität für MHC-Klasse I-Moleküle. Der TCR von $CD8^+$ T-Zellen kann so MHC I-Peptid-Komplexe erkennen und zur Stimulation und Differenzierung der $CD8^+$ T-Zellen zu CTLs führen. So können sie direkt die virusbefallenen Zellen durch zytotoxische

Effektormoleküle abtöten, oder durch Freisetzung von Zytokinen den Erreger schädigen.

CD4⁺ T-Helferzellen werden durch Kontakt von Antigen in Verbindung mit MHC Klasse-II aktiviert. Aktivierte T-Helferzellen lassen sich vor allem in die Th1- und Th2-Subpopulation unterteilen. Die Differenzierung geschieht anhand des Zytokinsekretionsmusters. Ihre Hauptfunktion liegt darin, die Antikörperbildung von B-Zellen (Th1) oder die Effektor-Funktion von CD8⁺ T-Zellen (Th2) zu kontrollieren (Mosmann et al., 1991).

Für die Aktivierung und klonale Expansion von T-Zellen sind neben den Korezeptoren CD4⁺ und CD8⁺ weitere Zelloberflächenmoleküle wie CD2, CD28 und CD45 notwendig, welche Hilfsfunktionen bei der Zell-Triggerung übernehmen (Linsley et al., 1990).

2.3 Autoimmunerkrankungen und HLA-Assoziation

Eine der wesentlichen Eigenschaften des Immunsystems ist die selektive Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Strukturen. Im Rahmen der Entwicklung von spezifischen Abwehrzellen, die dem Immunsystem das Erkennen feindlicher Organismen ermöglichen, kommt es auch zur Entstehung von auf körpereigene Strukturen reagierenden B- und T-Lymphozyten. Während stark autoreaktive Lymphozyten während ihrer Reifung im Thymus durch negative Selektion vernichtet werden (Kappler et al., 1987), werden schwach autoreaktive Lymphozyten im Rahmen der positiven und negativen Selektion im Thymus nur insuffizient eliminiert. Diese schwach autoreaktiven T-Lymphozyten können in die Peripherie gelangen und auch beim gesunden Menschen nachgewiesen werden (Danke et al., 2004). Normalerweise werden diese Zellen durch verschiedene Regulationsmechanismen kontrolliert, wie das Fehlen von aktivierten autoreaktiven CD4⁺ T-Zellen, die durch CD4⁺CD25⁺ T-Regulationszellen (T_{reg}) unterdrückt werden können. Bei der Autoimmunität wird durch das Versagen der Kontrollmechanismen eine spezifische Immunantwort gegen körpereigene Antigene ausgelöst, in dem die Selbsttoleranz versagt.

Circa 5% der Bevölkerung Europas und Nordamerikas sind von Autoimmunerkrankungen betroffen (Sinha et al., 1990; Jacobson et al., 1997).

Die Autoimmunerkrankungen werden abhängig vom Auftreten der autoimmunen Reaktion in organspezifische, wie z. B. Diabetes mellitus, und systemische Erkrankungen, wie z.B. systemischer Lupus erythematoses (SLE) oder rheumatoide Arthritis (RA), unterteilt.

Fast allen Autoimmunerkrankungen wird eine Assoziation mit bestimmten MHC-Genen der Klasse I oder II zugeschrieben. Diese Assoziationen sind in unterschiedlichem Ausmaß anzutreffen und scheinen entweder einen Schutz oder aber eine Prädisposition gegenüber der Erkrankung zu vermitteln. Zum Beispiel konnte bei HLA-B27-positiven Patienten eine starke Assoziation mit der Gruppe der Spondyloarthritiden (ankylosierende Spondylitis und reaktive Arthritis) gezeigt werden (Brewerton et al., 1973, Keat et al., 1983).

Neben den prädisponierenden HLA-Assoziationen gibt es auch HLA-Gene, die mit einer Protektion vor bestimmten Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Beispielweise ist das HLA-DR2-Allel in geringerer Frequenz bei Diabetes mellitus Patienten als innerhalb der Kontrollgruppe anzutreffen (Thomson et al., 1988).

Im Falle der juvenilen idiopathischen Arthritis gelten die Haplotypen DQ4 und DQ7 als prädisponierend mit der Erkrankung assoziiert, während der Haplotyp DQ2 als protektiv gilt (Haas et al., 1994).

2.4 Juvenile idiopathische Arthritis (JIA)

Untersuchungen der letzten Jahrzehnte haben deutlich gemacht, dass die JIA keine homogene Erkrankung ist, sondern vielmehr eine heterogene Gruppe von Subtypen umfasst, die sich in ihrem klinischen Verlauf wesentlich unterscheiden. Dies spiegelt sich auch in der ILAR-Klassifikation dieser Erkrankung wider, die neben Alter des Kindes bei der Erstmanifestation auch die Anzahl der befallenen Gelenke und die Dauer der Arthritis berücksichtigt (Petty and Southwood, 1998).

Da parallel von der European League against Rheumatism (EULAR) und des American College of Rheumatology (ACR) zwei verschiedene Klassifikationssysteme verwendet wurden, wurde unter der International League of Associations for Rheumatology (ILAR) in den 90er Jahren eine einheitliche Terminologie entwickelt.

Die modifizierte Klassifikation soll dazu dienen, die Unterschiede in der Krankheitsdefinition zu reduzieren und international einheitliche klinische Gruppen unter dem Begriff juvenile idiopatische Arthritis vorzuschlagen (ILAR-Klassifikation). Die häufig verwendete WHO-ILAR-Klassifikation der JIA beruht auf morphologisch chronisch entzündlichen Veränderungen an den Gelenken (Petty et al., 1998):

- Systemische Arthritis
- Polyarthritis, Rheumafaktor negativ
- Polyarthritis, Rheumafaktor positiv
- Oligoarthritis
 - >Persistent (1-4 Gelenke im Langzeitverlauf >6 Monate)
 - >Extended (> als 1-4 Gelenke im Langzeitverlauf >6 Mo.)
- Arthritis mit Enthesitis
- Psoriasis – Arthritis
- Andere (Arthritis > 6 Wochen)
 - erfüllen nicht die oben genannten Kriterien
 - erfüllen die Kriterien mehrerer Kategorien

Die klinische Forschung der letzten Jahre zu Fragen der Ätiologie und Pathogenese der heterogenen Gruppe der JIA vermutet eine chronische Autoimmunerkrankung mit multifaktorieller Genese.

Neben Umweltfaktoren haben komplexe genetische Faktoren eine zunehmende Bedeutung bei der JIA-Pathogenese erlangt, die auslösenden Mechanismen bleiben jedoch weiterhin unklar (Muray et al., 1997; Glass und Giannini, 1999). Die Bedeutung der genetischen Faktoren wurde in mehreren Zwillings- und Familienstudien nachgewiesen (Pralhad et al., 2000; Savolainen et al., 2000). Vor allem die Assoziation mit bestimmten MHC-Genen der Klasse I und II scheint für die Entstehung und Ausprägung der juvenilen Arthritis eine wichtige

Rolle zu spielen. In diesem Kontext wird besonders der Assoziation mit definierten HLA Klasse II-Allelen eine wichtige Rolle beigemessen (Haas et al, 1994; Albert & Scholz, 1998).

So sind die HLA-DQ-Haplotypen DQA1*0501-DQB1*0301 (DQ7) und DQA1*0401-DQB1*0402 (DQ4) besonders stark mit dem Auftreten der Erkrankung assoziiert. Andere Allele verhalten sich in Bezug auf die Erkrankung neutral, wie z. B DRB1*03-DQA1*0501-DQB1*0201 (DR3-DQ2), andere zeigen ein protektives Verhalten, wie z. B. DRB1*07-DQA1*0201-DQB1*0201 (DQ2 in DR7 Haplotyp) (Haas et al., 1994).

Bei den assoziierten HLA-DQA1-Molekülen *0401, *0501, *0601 konnte für die α - Kette ein gemeinsames Motiv in ihrer Aminosäurestruktur gezeigt werden. Dieser Befund hat möglicherweise eine funktionelle Bedeutung bei der MHC-Beteiligung an der JIA-Pathogenese (Haas et al., 1991).

Es ist weiterhin bekannt, dass für die o.g. HLA-Assoziation auch die β -Kette von Bedeutung ist, da ein unterschiedliches Verhalten beider Moleküle trotz identischer α -Kette (DQA1*0501-DQB1*0301-assoziert versus DQA1*0501-DQB1 *0201-neutral) gezeigt wurde (Haas et al.,1994).

Diese differentielle Assoziation könnte erklären, dass die mit der JIA assoziierten HLA-DQ Moleküle Peptide präsentieren können, die von neutralen oder protektiven Molekülen nicht präsentiert werden.

Neben der MHC-Assoziation wird auch ein Einfluss von Hitzeschockproteinen (HSPs) auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie JIA diskutiert. Im Folgenden wird daher auf die Hitzeschockproteine, deren physiologische und pathophysiologische Bedeutung eingegangen.

2.5 Hitzeschockproteine

Hitzeschockproteine (HSP) sind zum ersten Mal im Jahre 1962 beschrieben worden, als Ferruccio Ritossa festgestellt hat, dass thermischer Schock eine Genexpression in *Drosophila melanogaster* induziert (Ritossa, 1962). Allerdings wurde erst im Jahre 1974 das Genprodukt identifiziert und als Hitzeschockprotein bezeichnet.

Die Hitzeschockproteine bilden eine Gruppe von außerordentlich stark konservierten Proteinen, die ubiquitär vorkommen und als Antwort auf Stressfaktoren vermehrt exprimiert oder neu synthetisiert werden.

Es ist bekannt, dass neben Hitzeschock auch andere stressende Reize wie Hypoxie, Ischämie, Infektionen, Entzündungen, Fieber, UV- Bestrahlung, pH- und Osmolaritätsverschiebungen zu einer vermehrten Expression von HSP führen (Linguist, 1986).

Seit der Erstbeschreibung dieser Stressproteine wurden viele weitere HSP Moleküle identifiziert, die sich von Prokaryonten bis komplexen Organismen in allen Spezien nachweisen lassen und untereinander teils beachtliche Strukturhomologie aufweisen. Die Hitzeschockproteine werden aufgrund ihres Molekulargewichtes in mehrere Familien untergliedert. Die wichtigsten sind dabei die Familien der HSP60 Moleküle (z.B. Hsp60, Hsp65, GroeL), HSP70 (z.B. Hsp72, Hsp73, Dnak, GRP78(BIP), SSC1, SSQ1, ECM10, GRP170), HSP90 und HSP110 sowie eine Reihe von niedermolekularen Hitzeschockproteinen (Becker et al., 1994).

Wichtige Hinweise auf die grundlegende physiologische Bedeutung von Stressproteinen erbrachten in den vergangenen Jahrzehnten mehrere Studien die zeigten, dass die HSP eine essentielle Bedeutung für das Überleben von Zellen vor allem in physiologischen aber auch pathophysiologischen Situationen besitzen. Sie werden molekulare Chaperone oder Hilfsproteine genannt. Zu ihren Funktionen zählen die Beteiligung an der korrekten Faltung und Entfaltung nativer Proteine nach der Aminosäuresynthese, die Zusammenlagerung von Proteinen zu Makromolekülen und die korrekt ablaufende Translokation neu synthetisierter Proteine zu deren endgültigem Bestimmungsort, z.B. in den Mitochondrien, dem endoplasmatischen Retikulum oder der Plasmamembran (Kaufmann et al., 1990, Ang et al., 1991, Gething et al., 1992).

Des Weiteren erkennen die Chaperone fehlerhaft gefaltene und denaturierte Proteine und führen diese dem Abbau zu oder beteiligen sich an deren Rückfaltung (Gething et al., 1992). Sie sind eine wichtige Komponente des zytoplasmatischen Ubiquitin-abhängigen Proteindegradierungsweges (Burel et al., 1992).

Daneben besitzen Hitzeschockproteine aber auch eine wichtige Funktion sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptativen Immunität (Schild et al., 1999, Wells und Malkovsky, 2000).

2.5.1 Die Familie der 70 kDa Hitzeschockproteine (HSP70)

Die am häufigsten untersuchte Familie ist die der HSP70 Moleküle. HSP70 Moleküle sind in jedem zellulären Kompartiment eukaryotischer Zellen vertreten. Im Zytosol befinden sich die stress-induzierte Form Hsp70 (Hsp72) und die konstitutionell vorhandene Form Hsc70 (Hsp73). Grp78 (BIP) kommt im ER vor und Grp75 stellt die mitochondriale Form dar (Carbajal et al., 1993). Für HSP70 Moleküle besteht zwischen Pro- und Eukaryonten eine große Homologie in der Aminosäuresequenz von bis zu 50 % (Craig et al., 1993).

Aufgrund der besonders guten Induzierbarkeit gehört die HSP70-Familie zu den bestuntersuchten Hitzeschockproteinen. DnaK aus *E. coli* wird dabei als Prototyp der HSP70 Familie angesehen. Die eukaryotischen zytosolischen Formen (Hsp72/73) sind unter anderem in die verschiedenen Stadien der Proteinreifung involviert. Dabei fungieren HSP70-Moleküle als „Chaperone“ für Bindungsstabilisierung bei der Proteinfaltung reifender Polypeptide (Velazquez et al., 1983; Frydman et al., 1994; Kabakov und Gabai, 1993). Des Weiteren sind HSP70 Moleküle auch für die posttranslationale Translokation neu synthetisierter Proteine vom Zytosol ins ER oder in die Mitochondrien verantwortlich (Pfanner et al., 1993; Welch, 1992). Die Beteiligung von HSP70 bei der Prozessierung und Stabilisierung von Peptiden und Proteinen ist ATP-abhängig. HSP70 besitzt eine schwache endogene ATPase-Aktivität. Unter ATP-Verbrauch entfalten diese Chaperone abnorm oder nur partiell gefaltete Proteine, können Komplexe mit ihnen bilden und sie so vor erneuter Denaturierung schützen oder aber der Lyse zuführen (McClellan und Frydman, 2001).

HSP70-Moleküle bestehen aus einer konservierten aminoterminalen Domäne mit der ATP-Bindungsstelle und der oben beschriebenen schwachen ATPase-Aktivität (circa 44 kDa) und einer carboxyterminalen Substratbindungsdomäne

mit Peptidbindungsstelle, die mit verschiedenen Proteinstrukturen interagieren kann (Craig et al., 1993). Die ATP-Bindung und anschließende Phosphatabspaltung ruft im HSP70 Molekül eine Konformationsänderung hervor, die die Freisetzung von gebundenen Proteinen an der carboxyterminalen Domäne ermöglicht. Weiterhin wurde bei DnaK aus *E. coli* beschrieben, dass die Bindung von Proteinen an DnaK von weiteren HSP beeinflusst wird. Die sogenannten Ko-Chaperone, wie DnaJ (37 kDa) und GrpE (24 kDa) verstärken die ATP-ase Aktivität durch Interaktion mit DnaK (Bukau et al., 1994). HSP70 Moleküle besitzen eine kleine Bindetasche für nur vier bis fünf Aminosäuren. Der Nachweis, dass HSP70 Moleküle eine Bindungsspezifität zu Peptiden mit großen hydrophoben Aminosäuren und basischen Seitenketten aufweisen, gelang schließlich nicht nur für DnaK, sondern auch für HSP73 und BiP (Rudiger et al., 1997). Diese hydrophoben Areale sind im nativen Zustand im Inneren des Proteins verborgen, so dass sie nur im denaturierten Zustand den Hitzeschockproteinen zugänglich sind.

2.5.2 Die Familie der 60 kDa Hitzeschockproteine (HSP60)

HSP60 Moleküle kommen in unterschiedlichen zellulären Kompartimenten wie dem Cytosol, den Mitochondrien, den Chloroplasten, dem ER und dem Zellkern vor (Multhoff et al., 1998). Alle HSP60-Gene werden konstitutiv exprimiert, die Expression kann aber unter Stressbedingungen verstärkt werden. Zwischen pro- und eukaryontischem HSP60 existiert eine große Homologie. Bei den Mitgliedern der HSP60-Familie handelt es sich um Proteine, die komplexe Strukturen aus 14 oder mehr Untereinheiten bilden. Diese Komplexe bilden zwei übereinander liegende heptamere Ringe mit einer zentralen Öffnung (Sigeler et al., 1998). Eine HSP60-Untereinheit hat eine molekulare Masse von circa 60 kDa und wird in eine apikale, intermediäre und äquatoriale Domäne eingeteilt. Die Funktion der apikalen Domäne besteht in der Erkennung von ungefalteten Polypeptidketten durch hydrophobe Wechselwirkungen (Motojima et al., 2004). Die äquatoriale Domäne hingegen beherbergt die ATP-Aktivität des HSP60-Proteins.

In ähnlicher Weise wie die HSP70-Moleküle benötigt das HSP60 die Interaktion mit Co-Chaperonen. Es handelt sich bei Eukaryonten um Hsp10, das einen heptameren Ring aus identischen 10 kDa-Untereinheiten bildet, welcher quasi als „Deckel“ auf der „Kammer“ der Hsp60-Untereinheiten sitzt. Das *E. coli*-Homolog zum eukaryontischen Hsp60 ist GroEL. GroEL interagiert mit dem Co-Chaperonin GroES, das dem Hsp10 entspricht. Hsp10/GroES beeinflusst die Faltungsaktivität von Hsp60/GroEL, indem es die ATPase-Aktivität reguliert (Ranson et al., 1995).

Ein ungefaltetes Substratprotein bindet über hydrophobe Wechselwirkungen an den GroEL-Ring (Bukau und Horwich, 1998). GroES bindet an den gleichen Ring und induziert dadurch eine Konformationsänderung im GroEL, die zu einer Exposition von hydrophilen Aminosäuren auf der Innenfläche des Ringes führt. Innerhalb der GroEL-GroES-Kammer kann sich das Substratprotein, geschützt vor möglichen unerwünschten Interaktionen, falten (Shtilerman et al., 1999). Nach einem Zyklus von ATP-Hydrolyse am GroEL-Ring wird das gefaltene Substratprotein freigesetzt. Die Form der GroEL-GroES-Kammer variiert je nach Status des ATP-Zyklus (Chen et al., 1994, Braig et al., 1994-Kristalstruktur).

GroEL weist ähnlich wie Hsp70 eine Bindungsspezifität zu Peptiden mit großen hydrophoben Peptidsequenzen und positiv geladenen Aminosäuren auf (Hayer-Hartl et al., 1994).

2.5.3 Einfluss von Hitzeschockproteinen auf Autoimmunerkrankungen

Den ersten Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen Hitzeschockproteinen und Autoimmunerkrankungen erbrachten Experimente im Tiermodell. Es konnte nachgewiesen werden, dass in einem Tiermodell der Arthritis (adjuvant induced Arthritis, AIA) die Übertragung der Krankheit bei Ratten durch einen auf mykobakterielles HSP65 reaktiven T-Zellklon möglich war (van Eden et al., 1991).

Nachfolgende Studien versuchten eine Kreuzaktivität zwischen bakteriellem und Ratten HSP60 als mögliche Ursache für die Übertragung von Autoimmunarthritis bei Ratten zu demonstrieren (Cohen und Young 1991).

Der Nachweis, dass der T-Zellklon ein Epitop erkannte, das zwischen bakteriellem und Ratten HSP60 nicht identisch war, sprach gegen diesen postulierten „molekularen Mimikry“-Mechanismus (van Eden et al., 1988). In Analogie zu dem Experiment bei Ratten wurde bei Patienten mit chronischer Polyarthritis eine Reaktion von T-Zellklonen auf mykobakterielles HSP60 nachgewiesen (Res et al., 1988). Kontrovers hierzu dokumentierte eine Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen T-Zellreaktivität aus Synovialflüssigkeit bei Patienten mit rheumatoider Arthritis auf humanes HSP60, nicht aber auf bakterielles HSP60 (van Roon et al., 1997). Umgekehrt konnten in dieser Studie bei gesunden Personen HSP-kreuzreaktive T- und B-Zellen nachgewiesen werden.

Weitere Hinweise auf die Rolle von Hitzeschockproteinen in der Pathogenese autoimmuner rheumatischer Erkrankungen ergaben Untersuchungen, wonach eine T-Zellreaktivität auf Epitope aus humanem HSP60 mit einer Besserung des klinischen Verlaufes bei Kindern mit JIA korrelierte (de Graeff-Meeder et al., 1995). Vakzinierungsexperimente mit Peptiden aus humanem Hsp60 zeigten im Tiermodell positive Ergebnisse (Wendling et al., 2000). Obwohl die T-Zellreaktivität auf HSP (oder Peptide aus HSP) durch zahlreiche Studien belegt wurde, wird die Datenlage bislang kontrovers diskutiert.

Eine weitere möglicherweise bedeutsame Funktion von HSP Molekülen liegt in deren Peptidbindungseigenschaft. Die HSPs der 70 und 90 kDa Klasse haben die Fähigkeit, antigene Peptide, aber auch z.B. Peptide aus MHC II-Molekülen, ATP-abhängig zu binden (s. 2.5.1). Die resultierenden Komplexe aus an HSP 70 gebundenen Peptiden sind extrem immunogen (s. 2.5.4) (zusammengefasst in Srivastava et al., 1998).

Ferner besitzen die Hitzeschockproteine eine immunmodulierende Funktion, indem sie die antigenpräsentierenden Zellen aktivieren. Zum Beispiel kann Hsp70 in Monozyten die Bildung der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL-1 β und IL-6 induzieren (Asea, Kraft et al., 2000). HSP60 stimuliert

Makrophagen zur Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und TNF- α (Chen, Syldath et al., 1999).

2.5.4 Hitzeschockproteine und Antigenpräsentation

Hitzeschockproteine haben neben ihrer protektiven Funktion auch immunstimulatorische Effekte. Die ersten Untersuchungen zu einer gezielten Anwendung von HSP für Vakzinationen in Tumormodellen gehen auf die Arbeiten von Srivastava et al. zurück (Srivastava et al., 1998). Die protektive, antitumorale Wirkung der aus Tumorzellen gewonnenen HSP-Peptid-Komplexe wird auf die Bindung von tumorspezifischen antigenen Peptiden an gp96 zurückgeführt.

Die Rolle der Hitzeschockproteine für die Antigenpräsentation über MHC I-Moleküle ist bereits relativ gut untersucht: kleinste Mengen HSP-Peptid-Komplexe können eine MHC I restringierte CD8⁺ T-Zellantwort initiieren, wohingegen peptidfreies HSP und Peptid alleine keine T-Zellantwort bewirken (Blachere et al., 1997). Für eine rezeptorvermittelte Aufnahme von HSP-Peptid-Komplexen durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) kommen Moleküle wie CD91 (Basu et al., 2001) und CD40 (Becker et al., 2002) in Betracht. Nach dem Transport, der Aufnahme und Prozessierung im Zytosol und endoplasmatischem Retikulum (ER) erfolgt die verstärkte Präsentation auf MHC I-Molekülen und die Induktion von zytotoxischen Effektorzellen.

Studien, in denen eine Immunisierung von Mäusen und Menschen mit Hsc70, gp96 und anderen Hitzeschockproteinen mit gebundenen Peptiden zur Aktivierung Peptid-spezifischer zytotoxischer T-Zellen führte, unterstützen diese postulierte HSP-Funktion in der MHC I-vermittelten Peptid-Präsentation (Udono and Srivastava 1993; Arnold et al., 1999; Blachere et al., 1997).

Eine unspezifische Endozytose (HSP ohne Peptid) führt hingegen zu keiner T-Zellantwort (Singh-Jasuja et al., 2000; Castellino et al., 2000).

Eine Beteiligung von HSP70 auch in der MHC II-vermittelten Peptid-Präsentation wird durch verschiedene Beobachtungen inzwischen ebenfalls angenommen.

Bereits 1992 hatten DeNagel und Pierce (DeNagel and Pierce, 1992) beschrieben, dass HSP70 Moleküle die Beladung von MHC II Molekülen erleichtern.

In Untersuchungen von Panjwani et al. konnte eine Korrelation zwischen verstärkter Präsentation von exogenem Antigen über MHC II und Überexpression von Hsc73 in einer Makrophagen-Zelllinie beobachtet werden (Panjwani et al, 1999). Die von HSP prozessierten Peptidfragmente werden den T-Helfer Zellen anschließend an der Zelloberfläche mittels der MHC-Klasse II präsentiert.

Im Tiermodell wurde eine verstärkte MHC I und II Präsentation durch gp96 in vivo gezeigt (Doody et al., 2004). Des Weiteren wurde mit bakteriellen Hsp70-Peptid-Komplexen (DnaK und myc. Hsp70) ein verstärkte MHC I- und II-Prozessierung und Präsentation mit murinen Makrophagen gefunden (Tobian et al., 2004a/b). Ebenso wurde die verstärkte Prozessierung und Präsentation von Autoantigenen durch Hsp70 beschrieben (Mycko et al., 2004).

Die meisten der genannten Arbeiten wurden allerdings im Tiermodell oder mit Zelllinien und -klonen durchgeführt. 2005 konnte Haug *et al.* erstmals auch im humanen System die Hsp70-verstärkte Aktivierung alloantigenspezifischer T-Zellen in gesunden Spendern zeigen (Haug et al., 2005).

Der Mechanismus der Hsp-verstärkten Antigenprozessierung und Präsentation ist noch nicht genau geklärt. Bekannt ist, dass eine Interaktion zwischen HSP70 mit Peptidfragmenten aus der hypervariablen Region 3 (HV3-Region) von HLA-DRB1 mit dem sogenannten „shared epitope“ existiert (Auger et al., 1996).

Allerdings wurde später gezeigt, dass auch die meisten anderen HLA-DRB1 Peptidfragmente, die die HV3 Region umfassen, an DnaK und humanes Hsp70 binden (Maier, Haug et al., 2002). Nur eine Sequenz, die in HLA-DR Molekülen vorkommt, welche in verschiedenen Arbeiten als RA-protectiv gelten, zeigte keine HSP70-Affinität.

Inzwischen wurde neben den HLA-DR-Peptidfragmenten auch für die gesamten intakten HLA-DR Moleküle eine spezifische Interaktion mit HSP70-Molekülen beschrieben (Haug et al., 2007).

Eine spezifische HLA-DR-HSP-Interaktion lässt die Hypothese zu, dass HSP-gebundene Peptide direkt vom HSP auf das HLA-DR Molekül übertragen werden (Komplex zwischen Peptid-Hsp und HLA-DR).

2.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Immunantwort auf ein Peptid spielt in der Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis eine wichtige Rolle, reicht als alleinige Erklärung für die Manifestation der JIA jedoch wohl nicht aus.

Von besonderem Interesse sind hierbei die sogenannten Hitzeschockproteine (HSP). Die Tatsache, dass Peptide aus HSP in der Lage sind eine autoimmune T-Zell-Antwort auszulösen (van Eden et al., 1988) und die Eigenschaft von Hitzeschockproteinen an MHC-Klasse II-Moleküle (Haug et al., 2005) und deren Peptidfragmente mit den Aminosäuren 70-74 der β -Kette des HLA-DR-Moleküls (HV3-Region) binden zu können (Auger et al., 1996, Maier, Haug et al., 2002) legen ein extrem immunogenes Potential von HSP-Peptid-Komplexen nahe.

Die vorliegende Arbeit schließt sich an die Dissertation von M. Haug (Haug, M 2005) an, die bereits das Bindungsverhalten von HSP70-Molekülen an Peptidsequenzen aus der HV3-Region von HLA-DRB1 (aus einer besonders variablen Region der MHC II-Moleküle) bei der rheumatoiden Arthritis untersucht hat. In diesem Zusammenhang wurde vermutet, dass die auffällige Interaktion von HSP70-Molekülen mit SE-positiven (shared epitope) HLA-DR-Molekülen und das Nicht-Binden von Peptidfragmenten aus RA-protectiven HLA-DR-Molekülen eine Rolle in der Pathogenese der RA spielen könnte.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun die differentielle Interaktion von Peptidfragmenten, die aus mit der JIA assoziierten und nicht-assozierten HLA-DQ-Allelen stammen, an HSP60- und HSP70-Moleküle eingehender untersucht werden.

In Analogie zu den Experimenten von M. Haug mit RA-assozierten/protectiven HLA-DR Peptidsequenzen und HSP70 Molekülen sollte in der hier vorgelegten Arbeit das Nicht-Binden oder Binden von besonders variablen

Peptidfragmenten aus HLA-DQ Molekülen an HSP Moleküle in einem Europium-Fluoreszenz-Bindungsassay analysiert werden.

Hieraus ergaben sich die folgend genannten Fragestellungen:

- Lässt sich mittels Europium-Fluoreszenz-Assay eine differentielle quantitative Bindung von unterschiedlichen Hitzeschockproteinen an die verschiedenen, mit der juvenilen idiopatischen Arthritis positiv oder negativ assoziierten, HLA-DQ Peptidsequenzen nachweisen?
- Bringt eine Quantifizierung der Bindungsaffinität durch Konkurrenzexperimente zusätzliche Erkenntnisse?
- Falls eine spezifische Interaktion gefunden wird, können dann bestimmte Bindungsmuster erkannt werden?
- Korreliert das gefundene Bindungsmuster (ähnlich den Vorarbeiten mit HLA-DR Peptiden) mit den krankheitsspezifischen HLA-DQ Assoziationen der JIA?
- Können die Ergebnisse dazu beitragen, die Assoziation verschiedener HLA-DQ-Allele mit der JIA besser zu verstehen?
- Sind die Ergebnisse mit Vorarbeiten vergleichbar?

3 Material und Methodik

3.1 Materialien

Die folgenden Tabellen enthalten die verwendeten Substanzen neben Bezugsquellen und etwaigen Abkürzungen.

3.1.1 Geräte

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Geräte neben Modellbezeichnung und Hersteller aufgeführt:

Geräte	Typ	Hersteller
Brutschrank	Hera Cell	Heraeus
Combitip-Pipette		Eppendorf
Feinwaage	5436	Sartorius
Gefrierschrank –20°C		Liebherr
Gefrierschrank –80°C		Firma Scientific
Kolbenhubpipetten		Gilson
Kühlschrank 4°C		Bosch
Inkubator-Thermomixer	PH538	WTW
Magnetrührer	10515	Bioblock Scientific
Magnet-Rührzelle	50 ml	Amicon
Magnetrührstäbchen		Roth
Multipipette		Eppendorf
pH-Meter		wtw
Pipettierhilfe Pipetboy		Integra Biosciences
Pipetboy-Acu		Heidolph
Vortexer Reax top		Heidolph
Schüttler-Titramax	Polymax 1040	Heidolph
Schüttler	1420	Wallac
Victor™- 1420 Multilabel Counter	5415C	Wallac

Zentrifuge	Rotixa 50RS	Hettich
------------	-------------	---------

3.1.2 Verbrauchsmaterialien

In dieser Tabelle sind die Verbrauchsmaterialien und die jeweilige Bezugsquelle aufgelistet:

Festmaterial	Typ	Bezugsquelle
Pipettenspitzen	10µl (weiß) 200µl (gelb) 1000µl (blau)	Gilson Greiner Greiner
96-well Mikrotiterplatten, unsteril	FluoroNunc™ MaxiSorp	Nunc™
Röhrchen – konisch, Polypropylen	15/50 ml	Falcon® BD
Magnetührstäbchen		Roth
Sterile Einmal-Pipetten	1ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner
Pateurpipetten	150 und 230mm	Hirschmann
Reagenzgläser	durchsichtig, 12 ml,PS	Greiner
Reaktionsgefäße	0,5 ml; 1,5 ml	Eppendorf

3.1.3 Chemikalien, Reagenzien

1 Substanz	2 Abkürzung	3 Bezugsquelle
Ampuwa®	H ₂ O	Fresenius Kabi
Adenosin-diphosphat	ADP	Sigma
Adenosin-triphosphat	ATP	Sigma
bovines Serum-Albumin	BSA	Sigma
di-Kalium-Hydrogen-Phosphat	K ₂ HPO ₄	Merck
Delfia® Assay Buffer		Wallac
Delfia® Enhancement Solution		Wallac
Delfia® Washing-Buffer		Wallac
Delfia® Europium-labelled Steptavidin		Wallac
Dimethyl-Sulfoxid	DMSO	Merck
EDTA		Roth
Ethanol 70%		Apotheke
Glutaraldehyd		Sigma
Glycin		Roth
Hydroxy-Ethyl-Piperazinyl-Ethan-Sulfonsäure	HEPES-Buffer	Biochrom Ag
Kalium-di-Hydrogen-Phosphat	KH ₂ PO ₄	Merck
Natrium-Azid	NaN ₃	
Natrium-Hydrogen-Carbonat	NaHCO ₃	Merck
Natrium-di-Hydrogen-Phosphat	NaH ₂ PO ₄	Merck
Natrium-Chlorid	NaCl	Merck
Natrium-Hydroxid	NaOH	
PBS ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺		Biochrom
Protease-Inhibitor-Cocktail-Tabletten		Complete™Mini Roche
Tris-(Hydroxy-Methyl)-Aminomethan	TRIS	Merck
Tween-20		Roth
Zwittergent 3-12		

3.1.4 Hitzeschockproteine (rekombinant)

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
Hitzeschockprotein 60 (Cat # SPP-740, rekombinant human)	rh-Hsp60	Stressgen Biotechnologies Corp
DnaK (<i>E.coli</i>) (Cat # SPP-630, rekombinant)	DnaK	Stressgen Biotechnologies Corp
Hitzeschockprotein 72-stress induziert (Cat # NSP-550, rekombinant human)	rh-Hsp70	Stressgen Biotechnologies Corp
Hitzeschockprotein 73-konstitutiv exprimiert (Cat # Spp-750, rekombinant human)	rh-Hsc70	Stressgen Biotechnologies Corp

3.1.5 Monoklonale anti-HSP Antikörper (unmarkiert)

Substanz	Abkürzung	Bezugsquelle
anti-human-Hitzeschockprotein 60-Antikörper (Cat # SPA 807 mouse monoclonal)	anti-Hsp60-Ak.	Stressgen Biotechnologies Corp
anti- <i>E.coli</i> Hitzeschockprotein70-Antikörper (Cat # SPA 880 mouse monoclonal)	anti-DnaK-Ak.	Stressgen Biotechnologies Corp
anti-human-Hitzeschockprotein 72-Antikörper (Cat # SPA 810 mouse monoclonal)	anti-Hsp70-Ak.	Stressgen Biotechnologies Corp
anti-human-Hitzeschockprotein 73-Antikörper (Cat # SPA 815 mouse monoclonal)	anti-Hsc70-Ak.	Stressgen Biotechnologies Corp

3.1.6 Puffer und Lösungen

Europium-Fluoreszenz-Assay

Blockierungspuffer

2% (m/V) BSA in PBS

Peptid-Bindungspuffer (HSP70)

PBS + 0,02% NaN₃ (m/V)

Peptid-Bindungspuffer (HSP60)

150mM NaH₂PO₄, 2mM EDTA,
150mM NaCl, 0.02%NaN₃,
0,1% Zwittergent.

HLA-DQ- Bindungspuffer

PBS + 0,02% NaN₃ (m/V)
+ 0,05% Tween-20 (V/V)

(pH-Werte wie jeweils in den Versuchen angegeben)

3.2 Methoden

3.2.1 Peptidsynthese

Die Peptide wurden mittels eines modifizierten SyRo (multiple peptide synthesizer) (Fa. MultiSynTech, Witten, Deutschland) in einem 0,02 mmol Maßstab mittels der klassischen Fmoc/TBTU-Methode synthetisiert. Schutzgruppen funktioneller Aminosäurereste wurden durch Inkubation mit 90% TFA, 2,5% 1,2-Ethandithiol, 2,2 H₂O, 2,5% Phenol für 2,5 Stunden abgespalten. Die Peptidsynthese wurde in Zusammenarbeit mit dem Labor Dr. Kalbacher durchgeführt (med.-nat. Forschungszentrum, MNF Universität Tübingen).

Die untersuchten Biotin-markierten Peptidsequenzen aus HLA-DQ-Molekülen (α -Kette: Aminosäuresequenz Position 42-55, bzw β -Kette: Aminosäuresequenz Position 65-79) sind:

Bezeichnung	untersuchte Sequenz	Biotin-markiert	unmarkiert	zugehöriges Allel	Assoziation bei JIA
DQA1*0101p	⁴² KETAWRWPEFSKFG ⁵⁵	ja	ja	HLA-DQA1*0101	neutral
DQA1*0201p	⁴² KETVWKLPLFHRLR ⁵⁵	ja	ja	HLA-DQA1*0201	Protektion
DQA1*0301p	⁴² KETVWQLPLFRRFR ⁵⁵	ja	ja	HLA-DQA1*0301	Prädisposition bei DMT1
DQA1*0401p	⁴² KETVWCLPVLQRQFR ⁵⁵	ja	ja	HLA-DQA1*0401	Prädisposition
DQB1*0201p	⁶⁵ KDILERKRAAVDRVC ⁷⁹	ja	nein	HLA-DQB1*0201	Protektion
DQB1*0301p	⁵⁵ KEVLERTRAELDTVC ⁷⁹	ja	nein	HLA-DQB1*0301	Prädisposition

Tabelle 1: verwendete HLA-DQ Peptidfragmente mit dazugehörigen Sequenzen.

Von den meisten Sequenzen wurden auch unmarkierte (nicht biotinylierte) Peptide synthetisiert (s. Tab.1).

3.2.2 Peptidaufreinigung

Die Peptide wurden mit präparativer RP-HPLC (Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie) auf über 95% Reinheit gereinigt.

3.2.3 Massenbestimmung

Die Überprüfung der Massenbestimmung der jeweiligen Peptidfragmente erfolgte mittels ESI-MS (Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie).

3.2.4 Europium-Fluoreszenz-Assay (time-resolved fluorometry)

Für die vorliegende Arbeit wurden quantitative Bindungs- und Wettbewerbsversuche mit HLA-DQ-Peptidfragmenten in einem Europium-Fluoreszenz-Assay (dissociation-enhanced lanthanide fluorescence immunoassay, DELFIA) durchgeführt. Dieser Assay erlaubt Messungen ähnlich wie ein klassischer ELISA (enzym-linked-immunoassay), bietet jedoch verschiedene Vorteile (siehe unten). Die Auswertung der Ergebnisse des Europium-Fluoreszenz-Assays erfolgte mit dem Programm Origin 6.1.

In den Experimenten wurden Dreifachwerte bestimmt.

Hintergrund:

Der Europium-Assay ist eine fluoreszenzbasierte Methode, die auf dem Prinzip der zeitaufgelösten Fluoreszenz (Time-resolved-fluorescence, TRF) beruht. Verglichen mit anderen Methoden (z.B. radioaktiven), zeichnet sie sich durch eine höhere Sensitivität und ungefährlichere Handhabung aus. Das Messprinzip in allen vorgestellten Assayvarianten beruht auf den besonderen photophysikalischen Eigenschaften von Lanthanidkomplexen (Ln-Komplexen) wie Europium (Eu), Samarium (Sm), Terbium (Tb) und Dyspronium (Dy).

Zu den Vorteilen des Lanthanids Europium zählen folgende Charakteristika:

Lanthanide haben einen großen Stoke´s Shift, d.h. die Excitationswellenlänge und Emissionswellenlänge liegen weit auseinander. Zudem besitzen sie einen sehr scharfen Emissionspeak. Auf diese Weise sind beide Lichtimpulse für ein Meßgerät gut zu unterscheiden.

Das an Streptavidin gebundene Europium hat im gebundenen Zustand praktisch keine fluoreszenten Eigenschaften. Durch Zugabe einer Lösung mit niedrigem pH (DELFI[®]A Enhancement solution) dissoziiert Europium jedoch innerhalb weniger Minuten von Streptavidin und bildet stabile Chelatkomplexe innerhalb schützender Mizellen mit Komponenten der Lösung. Die Fluoreszenz des Chelats ist dabei um das einmillionenfache verstärkt.

Ein spezielles Fluoreszenzmeßgerät (Victor Multilabel Counter, Wallac) misst die Fluoreszenzimpulse zwischen 400 und 800µs nach der Exzitation (time-resolved fluorometry). Zu diesem Zeitpunkt ist kurzlebige, unspezifische Fluoreszenz bereits abgeklungen. Dies erhöht die Sensitivität der Messung.

3.2.4.1 Europium-Fluoreszenz-Assay mit HLA-DQ-Peptidfragmenten

Alle Bindungs- und Kompetitionsversuche wurden mit dem im Folgenden beschriebenen Europium-Assay durchgeführt, bei dem durch Europium-markiertes Streptavidin ein biotinyliertes Peptid auf einer Elisa-Platte quantitativ nachgewiesen wird (Thompkins et al., 1993).

Die HLA-DQ-Peptidfragmente wurden wie in 3.2.1 beschrieben synthetisiert und N-terminal biotinyliert.

Die Peptide wurden in nicht-kompetitiven (verschiedene Konzentrationen an Biotin-markiertem Peptid) und kompetitiven (feste Konzentration an Biotin-markiertem Indikatorpeptid +/- verschiedene Überschüsse unmarkierter Kompetitorpeptide) Experimenten eingesetzt.

Für die Durchführung des Assays wurde DELFIA wash concentrate, DELFIA Eu-labelled Streptavidin, DELFIA Assay Buffer sowie DELFIA Enhancement Solution verwendet.

3.2.4.2 Europium-Assay mit rekombinantem humanem Hsp60

Durchführung:

Eine vorausgehende Beschichtung der Mikrotiterplatten mit anti-Hsp60-Antikörper führte zu kaum messbaren Counts, so dass für die weiteren Versuche ein direktes Coating der Platten mit dem Hsp60 Protein vorgenommen wurde.

Verwendeter Bindungspuffer: 150mM NaHPO₄, 2mM EDTA, 150mM NaCl, 0,02% NaN₃, 0,1% Zwittergent, pH 6,5.

Dazu wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (FluoroNunc™) über Nacht (ca.18h) bei 4°C mit rh-Hsp60 (10 µg/ml in PBS) beschichtet.

Erster Waschschrift: 2 x mit 150 µl/well PBS.

Die noch verbliebenen Bindungsstellen auf der Platte wurden durch Zugabe von 1% iger BSA-Lösung (in PBS 0,02% NaN₃ gelöst) geblockt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur.

Zweiter Waschschrift: 3 x mit 200 µl/well DELFIA® Washing-Buffer und 2 x mit 200 µl/well PBS.

Das biotinylierte Peptid wurde in Bindungspuffer mit Proteaseinhibitor auf die mit rh-Hsp60 beschichtete Platte übertragen (50 µl/well als Endvolumen), Konzentration wie beim jeweiligen Versuch angegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur.

Als Kontrolle für die unspezifische Bindung diente reines biotinyliertes Peptid ohne das rekombinant-humane Hitzeschockprotein 60.

Dritter Waschschrift: ungebundene Peptide wurden durch 2 x mit 200 µl/well DELFIA® Washing-Buffer und 1 x mit 200 µl/well PBS entfernt.

Aufgrund der in Vorversuchen sehr niedrigen Gesamtcounts folgte eine Fixierung der gebundenen Peptide mittels Glutaraldehyd (50 µl einer 0,1%igen Glutaraldehydlösung (in PBS) wurde für 8 min zugegeben).

Vierter Waschschrift: 1 x 150 µl/well PBS 1M Glycin (um restliches Glutaraldehyd abzusättigen) und 2 x 200 µl/well DELFIA® Washing-Buffer.

Anschließend wurde 50µl/well Europium-Streptavidin, 1:500 in DELFIA® Assay-Buffer verdünnt (entspricht 0,2 µg/ml), dazugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur.

Fünfter Waschschrift: 3 x mit 200 µl/well DELFIA® Washing-buffer.

Nun wurden 100 µl/well DELFIA® Enhancement solution pipettiert und die resultierende Fluoreszenz nach 8-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (Schüttler) im Wallac Victor Multilabel Counter bei 615 nm gemessen.

3.2.4.3 Europium-Assay mit rekombinanten HSP70 Molekülen (DnaK, Hsp70, Hsc70)

Verwendeter Bindungspuffer: PBS 0,02 % NaN₃

Durchführung:

Dazu wurden 96-Loch-Mikrotiterplatten (FluoroNunc™) über Nacht (ca.18h) bei 4°C mit monoklonalem Antikörper gegen das gewünschte Hitzeschockprotein (10 µg/ml in PBS 0,02% NaN₃ gelöst) beschichtet. Als Antikörper wurden anti-*E.coli*-HSP70 (anti-DnaK), anti-human-Hsp70 und anti-human-Hsc70 (Stressgen) verwendet.

Erster Waschschrift: 2 x mit 150 µl/well PBS gewaschen.

Die noch verbliebenen Bindungsstellen auf der Platte wurden durch Zugabe von 1%iger BSA-Lösung (in PBS gelöst) geblockt. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur.

Zweiter Waschschrift: 3 x mit 200 µl/well DELFIA® Washing-buffer, 2 x mit 200 µl/well PBS.

Parallel dazu wurden in einer nicht-absorbierenden 96-well Platte Hitzeschockproteine in einer Konzentration von 8 µg/ml und biotin-markierte HLA-DQ-Peptide, bzw. andere Peptide in Bindungspuffer für 18 Stunden bei 37°C inkubiert (Schüttler).

Mit biotinyliertem Peptid inkubierte Hitzeschockproteine oder reines biotinyliertes Peptid (ohne HSP, Negativkontrolle des Assays) wurden in die mit Antikörpern beschichtete Platte übertragen (50 µl/well als Endvolumen). Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur.

Dritter Waschschrift: ungebundene Komplexe, Proteine und Peptide wurden durch 2 x mit 200 µl/well DELFIA® Washing-buffer und 1 x mit 200 µl/well PBS entfernt.

Europium-Streptavidin wurde 1:500 in DELFIA® Assay-Buffer verdünnt (entspricht 0,2 µg/ml) und 50 µl/well zugegeben. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde bei Raumtemperatur.

Vierter Waschschrift: 3 x mit 200 µl/well DELFIA® Washing-buffer.

Nun wurden 100 µl/well DELFIA® Enhancement Solution pipettiert und die resultierende Fluoreszenz nach 8-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (Schüttler) im Wallac Victor Multilabel Counter bei 615 nm gemessen.

4. Ergebnisse

Das Kapitel Ergebnisse ist zweigeteilt und behandelt im

1. Abschnitt: Quantitative Bindungsuntersuchungen mit HSP60 und HLA-DQ-Peptidfragmenten
2. Abschnitt: Untersuchungen mit HSP70 Molekülen:
 - a) Quantitative Bindungsuntersuchungen mit DnaK und HLA-DQ-Peptidfragmenten
 - b) Quantitative Bindungsuntersuchungen mit Hsp70/Hsc70 und HLA-DQ- Peptidfragmenten

4.1 Quantitative Bindungsversuche mit HSP60 und HLA-DQ-Peptidfragmenten im Europium-Fluoreszenz-Assay

Die Etablierung des Europium-Fluoreszenz-Assays ermöglichte die quantitative Analyse der Bindungsmessung von Peptiden (HLA-DQ-Peptidfragmente, s. 3.2.1) an HSP-Moleküle.

Für HSP70 Moleküle und HLA-DR-Peptidfragmente wurde der in der Dissertation von M. Haug (Dissertation M. Haug, 2005) beschriebene Assay etabliert und verwendet. In der hier vorgelegten Arbeit sollte der Assay so modifiziert werden, dass die Affinitätsmessung von HLA-DQ-Peptiden (ca. 15 Aminosäuren lang) an HSP60 und HSP70 möglich wurde.

Zunächst wurde das Bindungsverhalten der Hitzeschockproteine 60 näher untersucht.

Die ersten positiven Resultate wurden mit rekombinantem humanem Hsp60 und einem biotinylierten Peptid mit der Sequenz Biot-⁴²KETVWCLPVL⁵⁵RQFR⁵⁵ (aus HLA-DQA1*0401, AS 42-55, JIA-Prädisposition) erzielt.

4.1.1 Optimierung des Europium-Fluoreszenz-Assays

Die folgenden Versuche wurden durchgeführt, um den Europium-Fluoreszenz-Assay als quantitative Methode mit HLA-DQ-Peptidfragmente zu etablieren und für Messungen mit den Hitzeschockproteinen HSP60 und 70 nutzen zu können.

Test verschiedener Blockierungslösungen

Als erstes wurden verschiedene Blockierungslösungen getestet. Dabei wurden die besten Resultate mit BSA 1% erzielt. Jeweils 1%ige Lösungen von BSA, Milchpulver, bzw. einer fertigen Blockierlösung (Boehringer) wurden zu den Peptid-HSP-Komplexen für eine Stunde hinzugefügt. Es ergab sich folgendes Bild:

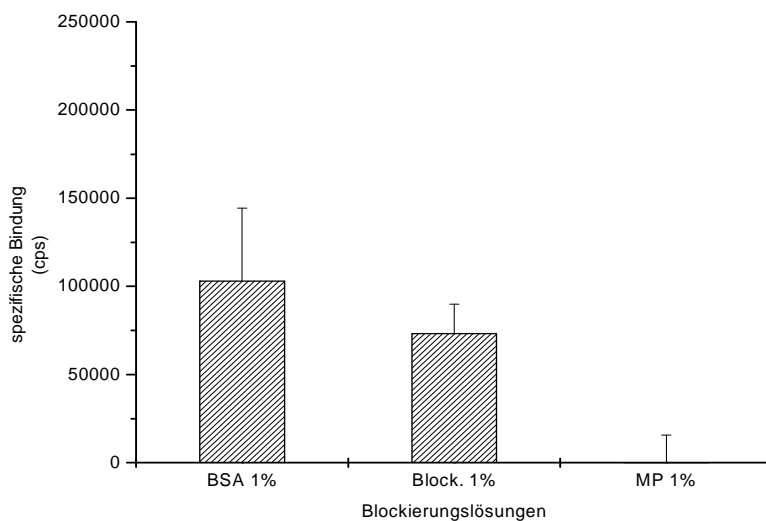


Abb. 4.1 Test verschiedener Blockierungslösungen

Inkubation von 10 µg/ml rh-Hsp60 mit 10 µg/ml Biotin-markiertem HLA-DQA1*0401-Peptid (DQA1*0401p) mit unterschiedlichen Blockierungslösungen (BSA= Bovine Serum Albumin 1%, Block.= Boehringer-Blockierungslösung 1%, MP= Milchpulver 1%), Dreifachwerte, Experimentelle Bedingungen wie im Kapitel 3.2.4 beschrieben, verwendeter Bindungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,02% NaN₃, 1% Zwittergent, pH 5,5

Die spezifische Bindung zeigt die Differenz zwischen den Gesamtcounts und der unspezifischen Bindung (in Counts per second) von Biotin-markiertem-

DQA1*0401 Peptidfragment (Biotin- KETVWCLPVLQRFR –ass.) an HSP60. Mit Milchpulver waren die spezifischen und unspezifischen Counts gleich (keine spezifische Bindung messbar). BSA 1% zeigte die größte gemessene spezifische Bindung, so dass BSA 1% für weitere Versuche als Blockierungsreagenz gewählt wurde.

Bestimmung der Bindungspuffer, Fixierung, Inkubationszeiten

Im nächsten Schritt wurden für die Auswahl eines adäquaten Bindungspuffers drei Puffer verglichen, um auch hier die optimale Bedingung für die HLA-DQ-Peptid Interaktion zu erhalten. Als Puffer für die Peptidfragment-Hsp60-Komplexe zeigte der Bindungspuffer mit 150 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,02% NaN₃, 0,1% Zwittergent bei einem pH von 6,5 die besten Resultate.

Die erhaltenen Messwerte waren allerdings sehr niedrig. Eine Fixierung, nach einem Waschschrift der gebundenen Peptide an Hsp60 mittels Glutaraldehyd (100µl/ml einer 0,8%igen Glutaraldehydlösung, 8 Minute), führte zu höheren Gesamtcounts.

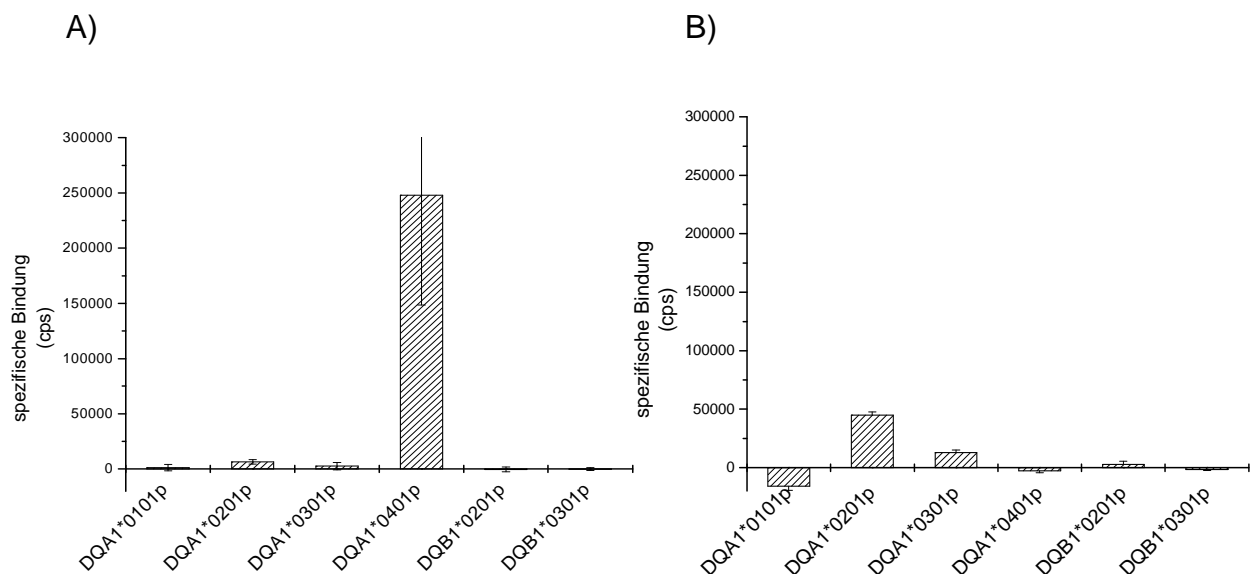


Abb. 4.2 A/B Optimierung der Bindungsaffinität mittels Fixierung

(Dreifachwerte, Experimentelle Bedingungen wie im Kapitel 3.2.4 beschrieben)

A) Inkubation von 5 µ/ml rh-Hsp60 mit 0,4 µg/ml Biotin-markierten HLA-DQ-Peptiden und Fixierung mittels Glutaraldehyd für circa 8 Minuten.

B) Inkubation von 4 µ/ml rh-Hsp60 mit 0,3 µg/ml Biotin-markierten HLA-DQ-Peptiden ohne Fixierung mittels Glutaraldehyd.

Des Weiteren wurde als Inkubationsbedingung für die Bindung der Peptide an Hsp60 eine Inkubation über Nacht (circa 18 h) bei 4 °C gewählt. Kürzere Inkubationszeiten ergaben schlechtere Resultate (Daten nicht gezeigt).

pH-Abhängigkeit

Zur Untersuchung der pH-Abhängigkeit der Bindungsaffinität der Peptidfragmente wurde rh-Hsp60 mit Biotin-markiertem HLA-DQA1*0401 Peptid in Bindungspuffern bei verschiedenen pH-Werten vorinkubiert. Die höchste Bindungsstärke konnte bei einem pH-Wert von 6,5 festgestellt werden. Die Bindung nimmt bei niedrigen pH-Werten stark ab (s. Abb.4.3). Für alle weiteren Versuche wurde das pH-Optimum von 6,5 der Bindung von biotinylierten Peptiden an Hsp60 beibehalten.

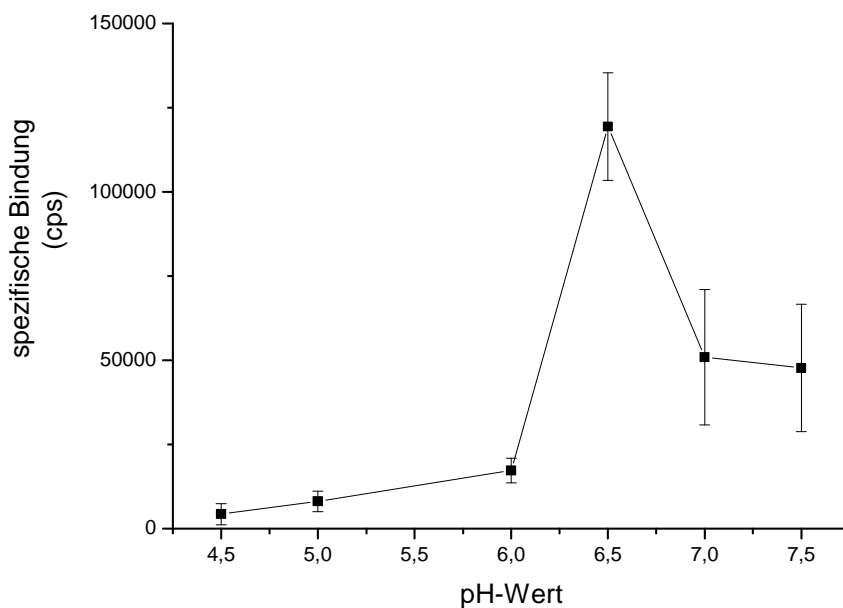


Abb. 4.3 pH Abhängigkeit der rh-Hsp60-Peptid-Interaktion

Inkubation von 10 µg/ml rh-Hsp60 mit Biotin-markiertem DQA1*0401-Peptid (6 µg/ml bzw. 0,3 µM) in Bindungspuffer mit unterschiedlichen pH-Werten; (50 mM NaH₂PO₄, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl, 0,02% NaN₃, 1% Zwittergent). Fixierung mit Glutaraldehyd für 8 Minuten. Das Optimum der rh-Hsp60-Peptid Bindung wurde ca. bei pH 6,5 gefunden.

4.1.2 Quantitative Bindungsmessungen mit rh-Hsp60 und HLA-DQ-Peptidfragmenten

Die Identifizierung der Peptid-Hsp60-Affinität erfolgte durch quantitative Bindungsexperimente im Europium-Fluoreszenz-Assay. In den bisher beschriebenen Vorversuchen wurden die für das Bindungsverhalten der HLA-DQ-Allele optimalen Bedingungen gesucht.

Zunächst wurden Experimente durchgeführt, bei denen die Fluoro-NUNC Mikrotiter-Platten mit einem monoklonalen anti-HSP60 Antikörper beschichtet (gecoatet) und anschließend blockiert wurden (s. 3.2.4.2). Hsp60 wurde mit biotinyliertem HLA-DQ Peptid im Bindungspuffer vorinkubiert und dann auf die mit anti-Hsp60 beschichtete Mikrotiterplatte gegeben.

Da die gemessenen Counts in diesen Versuchen sehr niedrig waren, wurde alternativ ein direktes Coating der Platte mit dem Hsp60 Molekül versucht. Dazu wurden die Mikrotiterplatten direkt mit Hsp60 gecoatet, dann blockiert und anschließend die Biotin-markierten HLA-DQ-Peptidfragmente in Bindungspuffer zugegeben. Abb. 4.4 zeigt ein Experiment, in dem die Bindung verschiedener HLA-DQ-Peptidfragmente an plattengebundenen Hsp60 untersucht wurde. Die Messdaten stellen jeweils Mittelwerte von Dreifachbestimmungen dar.

Die hier untersuchten Biotin-markierten Peptidfragmente stellen Sequenzen aus der hypervariablen Region von mit JIA positiv assoziierten oder protektiven DQ-Allelprodukten dar (verwendete HLA-DQ-Peptidfragmente mit Sequenzen s. Tab.1, Kap. Methode). Die HLA-DQA1*0101 Peptidsequenz gilt als neutral in Bezug auf die JIA-Assoziation.

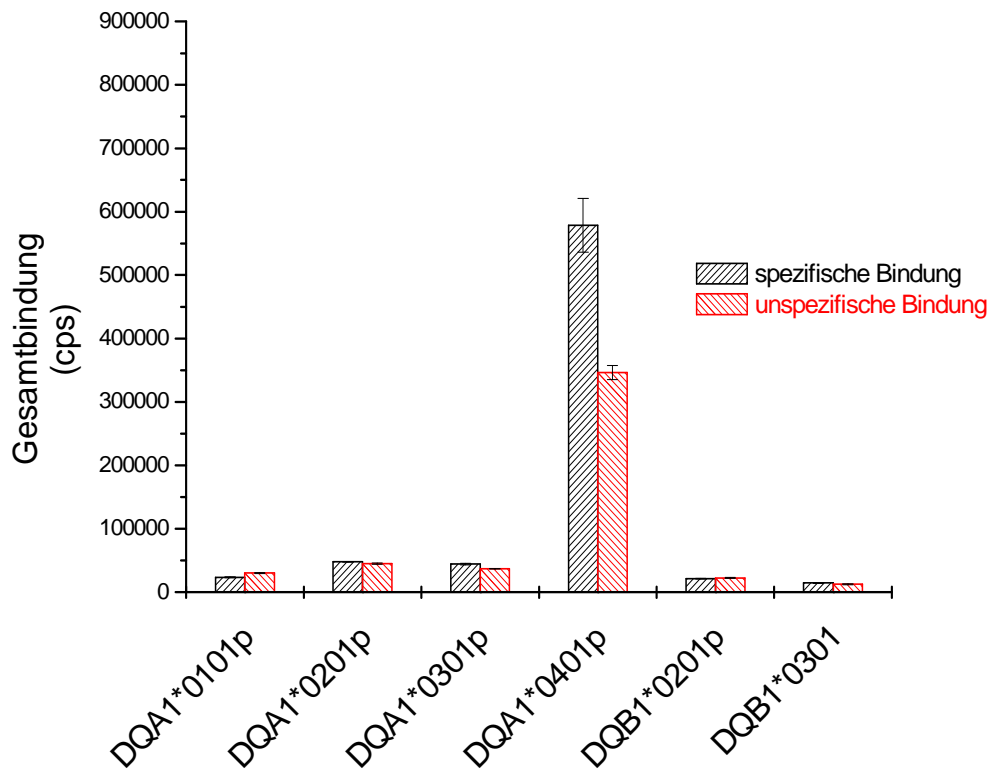


Abb. 4.4 Bindungsassay von HLA-DQ-Peptidfragmenten an HSP60

Interaktion von rh-Hsp60 (8 µg/ml) mit Biotin-markierten Peptidsequenzen aus HLA-DQ (20 µg/ml bzw. 1 µM) in Puffer (150 mM NaHPO₄, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,02% NaN₃, 0,1% Zwittergent, pH6) Fixierung mit Glutaraldehyd, Blockierung mit BSA 1%. Sonstige experimentelle Bedingungen siehe Kap. 3.2.4.

Wie der Versuch in Abbildung 4.4 veranschaulicht, konnte nur für das mit der JIA positiv assoziierte Biotin-markierte DQA1*0401-Peptid eine Affinität zu HSP60 gefunden werden. Allerdings waren trotz Fixierung mit Glutaraldehyd hohe Konzentrationen an Biotin-markierten Peptiden (20 µg/ml, bzw. 1 µM) erforderlich, um eine Bindung von Biot-DQA1*0401-Peptid an das Hsp60 zu erreichen. Des Weiteren war auch die unspezifische Bindung des Biotin-markierten Peptides (Bindung an die blockierte Platte ohne Hsp60 Coating) mit mehr als 50% der Bindung an Hsp60 relativ hoch.

4.1.3 Sättigungsversuche von Biot-HLA-DQA1*0401 an Hsp60

Nachdem eine Interaktion des biotinylierten HLA-DQA1*0401-Peptides an plattengebundenen Hsp60 zu finden war, sollte untersucht werden, ob es sich dabei tatsächlich um eine spezifische Interaktion handelt. Voraussetzung für eine spezifische Interaktion zwischen Peptid und Protein ist, dass die Bindung gesättigt werden kann und sich durch unmarkierte Peptide kompetitieren lässt. Um dies zu untersuchen, wurden zunächst Sättigungsexperimente mit Biotin-markiertem DQA1-0401 Peptid an plattengebundenen Hsp60 durchgeführt.

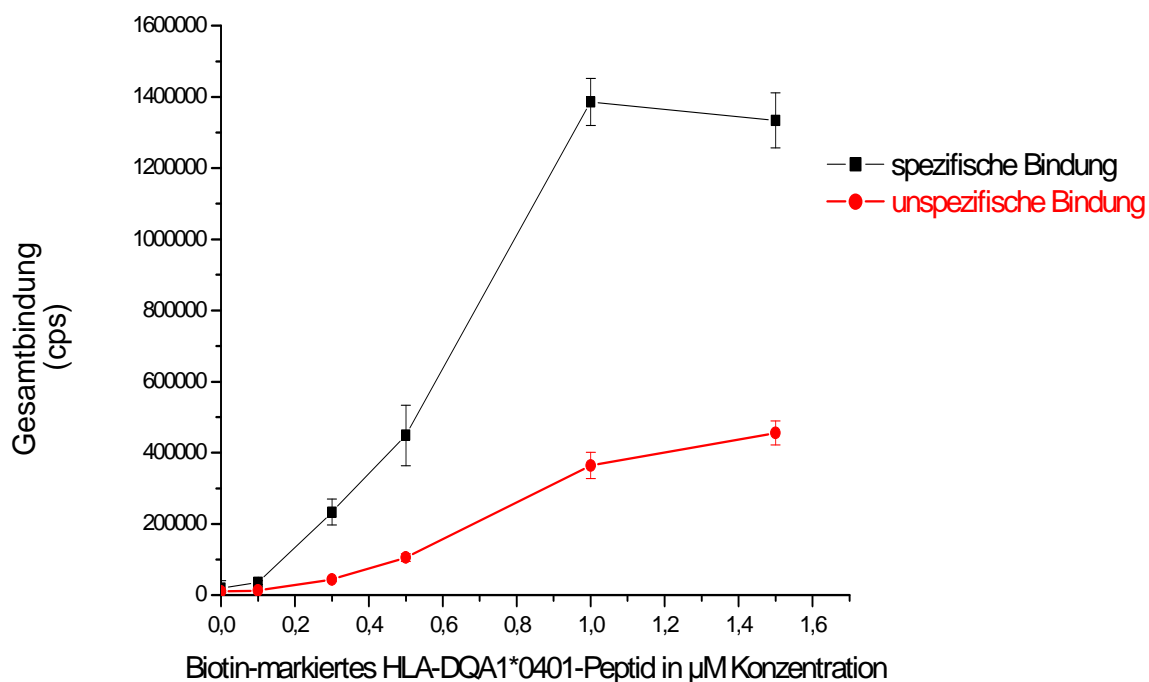


Abb. 4.5 Sättigungsexperimente im Europium-Fluoreszenz-Assay

Interaktion von rh-Hsp60 (8 µg/ml) mit verschiedenen Konzentrationen Biotin-markiertem HLA-DQA1*0401-Peptid (Biot-KETVWCLPVLQRFR, JIA-ass.) in Puffer (150 mM NaHPO₄, 2 mM EDTA, 150 mM NaCl, 0,02% NaN₃, 0,1% Zwittergent) bei einem pH-Wert von 6,5; Fixierung mit Glutaraldehyd, Blockierung mit BSA 1%. Dreifachwerte, experimentelle Bedingungen siehe Kapitel 3.2.4.

Abb. 4.5 zeigt ein solches Sättigungsexperiment. Die Bindungskurve steigt zunächst bis 1 μM (entspricht einer Konzentration von 20 μg Peptid/ml) steil an und nimmt dann einen flachen Verlauf an, lässt sich also sättigen. Damit kann die erste Voraussetzung für eine spezifische Interaktion als erfüllt betrachtet werden.

4.1.4 Kompetitionsversuch von Hsp60 mit Biot-HLA-DQA1*0401-Peptid durch 10-fachen Überschuss an unmarkierten DQA1-Peptidfragmenten

Zweite Voraussetzung für eine spezifische Hsp60-Interaktion mit dem DQA1-0401 Fragment ist, dass sich die Interaktion des markierten Peptids kompetitieren lässt. Dazu wurden Konkurrenzexperimente mit einer definierten Konzentration vom Indikator-Peptid (Biotin-HLA-DQA1*0401) und einem Überschuss an unmarkierten Kompetitorpeptiden durchgeführt. Bei einer spezifischen Interaktion sollte zumindest ein Überschuss an nicht-biotinyliertem DQ0401 Peptid zu einer Konkurrenz führen. Abb. 4.6 zeigt ein Konkurrenzexperiment mit 1 μM Biot-DQ0401 und 10-fachem Überschuss unmarkierter Konkurrenzpeptide aus verschiedenen HLA-DQA1 Molekülen.

– Ergebnisse –

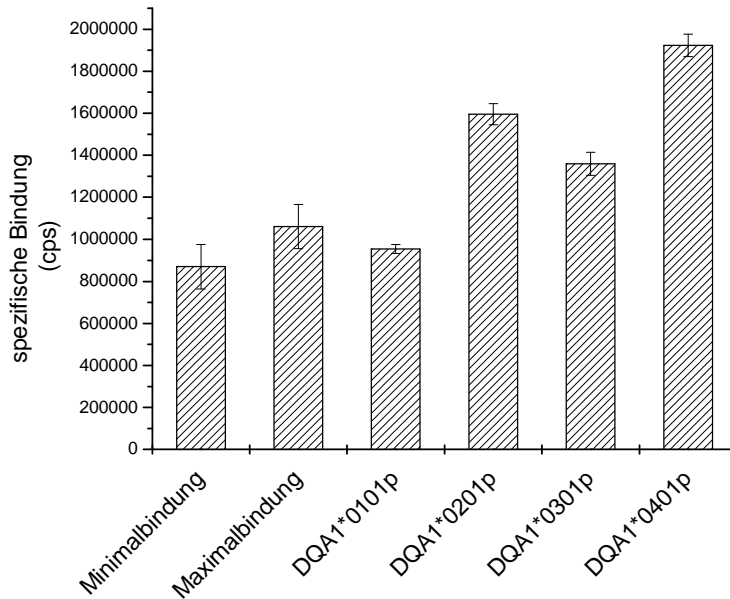


Abb. 4.6 Konkurrenz von Biotin-markiertem DQA1*0401 Peptidfragment an Hsp60 durch 10-fachen molaren Überschuss unmarkierter Peptidfragmente

Inkubation von HLA-DQA1*0401-Biotin-Peptid (20 µg/ml bzw. 1 µM) mit Hsp60 (10 µg/ml) als Indikatorpeptid (Maximalbindung). Die Minimalbindung stellt reines Biotin-markiertes Peptid dar. Konkurrenz durch 10-fachen Überschuss unmarkierter HLA-DQA1-Peptide (DQA1*0101, *0201, *0301, *0401); Puffer: 150 mM NaPO₄ 2 mM EDTA 150 mM NaCl 0,2%NaN₃ 0,1% Zwittergent pH 6,0; Fixierung mit Glutaraldehyd, unspezifische Bindung abgezogen Dreifachwerte, experimentelle Bedingungen siehe Kapitel 3.2.4.

Wie aus Abbildung 4.6 hervorgeht, zeigte sich eine fehlende Konkurrenz der Hsp60-Interaktion mit dem DQA1*0401 Peptidfragment für alle unmarkierten Konkurrenzpeptide. In sämtlichen Konkurrenzversuchen konnte gezeigt werden, dass das unmarkierte DQA1*0401 Peptid die Hsp60-DQA1*0401-Komplexe nicht konkurrieren kann und das Biotin-markierte DQA1*0401-Peptid nicht verdrängen konnte (Daten nicht gezeigt).

Durch Bindungsexperimente wurde nachgewiesen, dass eine Interaktion des biotinylierten HLA-DQA1*0401-Peptidfragments an Hsp60 existiert und dies sättigbar ist (s. Abb. 4.4. und 4.5). Eine Konkurrenz der erwähnten Interaktion durch unmarkierte Peptidfragmente konnte jedoch in mehreren Versuchen nicht demonstriert werden (s. Abb. 4.6).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Fall des Hsp60 eine Affinität des DQA1*0401-Peptidfragments besteht, eine Konkurrenz zwischen markierten und unmarkierten Peptiden jedoch nicht erkennbar war.

4.2 Quantitative Bindungsuntersuchungen mit HSP70 und HLA-DQ-Peptidfragmenten im Europium-Fluoreszenz Assay

Der Nachweis einer Affinität für Biotin-markiertes CLIP₁₀₅₋₁₁₇-Peptid (¹⁰⁵SKMRMATPLLMQA¹¹⁷) zu DnaK gelang Markus Haug aus unserer Arbeitsgruppe (Dissertation M. Haug, 2005). Aus dem Wissen über die Biot-CLIP Affinität an DnaK entstand die Arbeitshypothese, dass DQ-Peptidfragmente möglicherweise eine Affinität zu DnaK aufweisen können. Um zu untersuchen, ob auch die obigen unmarkierten Peptidfragmente (verwendete unmarkierte HLA-DQ-Peptidfragmente mit Sequenzen siehe Tab.1) mit einer Verdrängung des Biotin-markierten CLIP-Peptid von DnaK einhergehen, wurden unmarkierte DQA1*Peptidfragmente mit CLIP verglichen. Hierfür wurde ein quantitativer Kompetitionsassay, ausgehend von den experimentellen Bedingungen etabliert in den Versuchen von M. Haug, durchgeführt.

Aus Abb. 4.14 ist zu ersehen, dass die unmarkierten Peptidfragmente DQA1*0201 und *0401 das Indikatorpeptid von DnaK verdrängen können.

Im Folgenden wurde untersucht, ob die Biotin-markierten Peptidsequenzen aus der hypervariablen Region von mit JIA positiv assoziierten oder protektiven DQ-Allelprodukte (s. Tab.1) an DnaK binden, wie es auch von Biotin-CLIP bekannt ist.

4.2.1 Interaktion von Biotin-markierten HLA-DQ-Peptidfragmenten mit verschiedenen HSP 70-Molekülen

Zielsetzung der nachfolgenden Experimente war die Identifikation der HSP70-DQ-Peptidfragment-Interaktion und Überprüfung der Spezifität dieser Interaktion durch Sättigungs- und Konkurrenzexperimente.

Neben dem prokaryontischen DnaK aus *E.coli* wurde die Interaktion von HLA-DQ-Peptidfragmenten mit dem zytosolischen stressinduzierbaren Hsp70 und dem konstitutiv exprimierten zytosolischen Hsc70 untersucht.

Ausgangsvorversuch für diese Experimente war der CLIP-DnaK Konkurrenzversuch mit unmarkierten DQ-Peptidfragmenten. Eine Optimierung des Bindungsversuchs erfolgte ähnlich den Versuchen mit Hsp60.

Bei diesem Versuch wurden Mikrotitrationsplatten mit einem monoklonalen Antikörper (anti-HSP70-Antikörpern), der DQ-Peptid-HSP70-Komplexe bindet, durch passive Adsorption beschichtet (18h, 4°C). Während die Proben ohne Blockierungsreagenz (BSA 1%) zu einer hohen unspezifischen Bindung führten, war bei den Proben mit BSA 1% eine deutliche Blockierung der unspezifischen Bindung erkennbar (Daten nicht gezeigt). Die Vorinkubation erfolgte über Nacht bei 37°C mit biotinyliertem Peptid (0,4 µM) und HSP 70 (0,10 µM) in Bindungspuffer (PBS 0,02% NaN₃). Das pH-Optimum der HSP70-HLA-DQ-Peptidfragmente-Reaktion wurde im Neutralen gefunden (Daten nicht gezeigt).

Anschließend wurde das mit biotinyliertem Peptid inkubierte HSP70 auf die beschichtete Platte gegeben. Nach einer Stunde Inkubation wurde das nicht gebundene Peptid/HSP abgewaschen.

Es wurden biotinylierte HLA-DQ Peptidfragmente (s. Tab.1) und biotinyliertes CLIP₁₀₅₋₁₁₇ eingesetzt. Die Quantifizierung der Biotin-markierten Peptide-HSP-Komplexe erfolgte über Streptavidin, an das über einen Chelator Europium-Ionen gekoppelt waren.

Nach Inkubation mit Europium-Streptavidin wurde wiederum die resultierende Fluoreszenz gemessen.

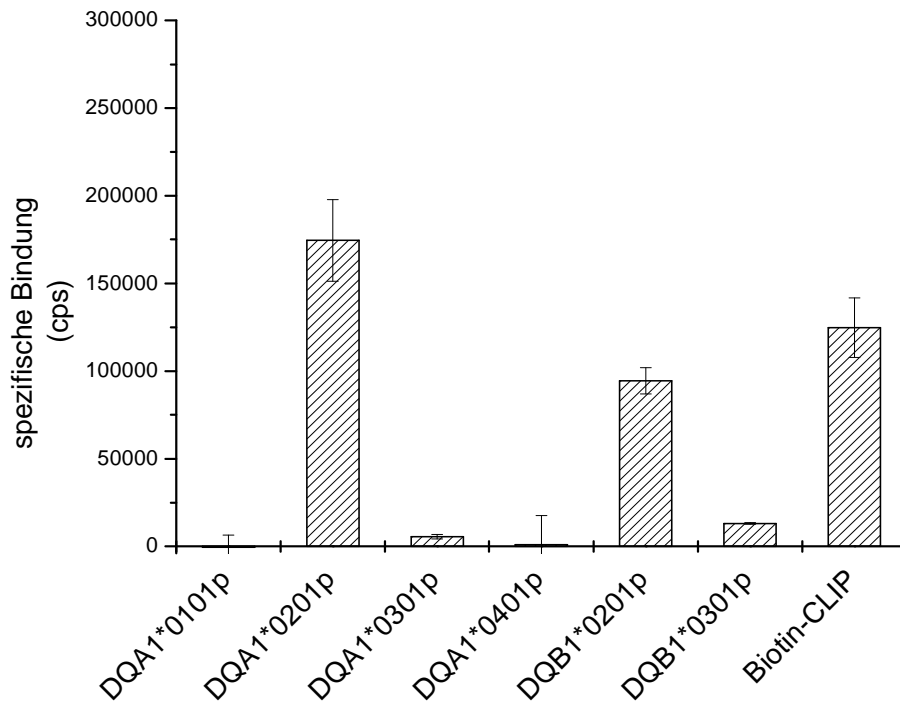


Abb. 4.7 Interaktion von Biotin-markierten HLA-DQ-Peptidfragmenten mit **DnaK**

Die Abbildung zeigt die Interaktion von **DnaK** (8 µg/ml bzw. 0,1 µM) mit Biot-HLA-DQ-Peptidfragmenten (8 µg/ml bzw. 0,4 µM). Bindung von Biotin-markiertem CLIP₁₀₅₋₁₁₇-Peptid wurde als Kontrollpeptid verwendet. Experimentelle Bedingungen siehe Kap. 3.2.4.3. (Vorinkubation DnaK-Peptid-Komplex über Nacht bei 37°C, anti-DnaK Antikörper über Nacht bei 4°C auf die Platte gecoatet (4 µg/ml), Blockierung mit BSA1%, Puffer: PBS 0,02% Na₃N). Die unspezifische Bindung wurde abgezogen.

Abbildung 4.7 zeigt, dass sowohl das Biotin-markierte Peptid HLA-DQA1*0201p (Biot-⁴²KETVWKLPLFHRLR⁵⁵) als auch HLA-DQB1*0201p (Biot-⁶⁵KDILERKRAAVDRVC⁷⁹) eine Affinität zu DnaK aufweisen. Es wurden ähnlich hohe Messwerte wie mit dem Biotin-CLIP-Peptid an DnaK gefunden.

Die beiden oben genannten Peptidfragmente stellen Sequenzen aus der hypervariablen Region von DQ-Allelprodukten dar, die in Bezug auf JIA protektiv wirken.

Im nächsten Schritt sollte nachgewiesen werden, ob eine ähnliche Affinität der Biotin-markierten DQ-Peptidfragmente zu stressinduzierbarem Hsp70 und konstitutiv exprimiertem Hsc70 besteht.

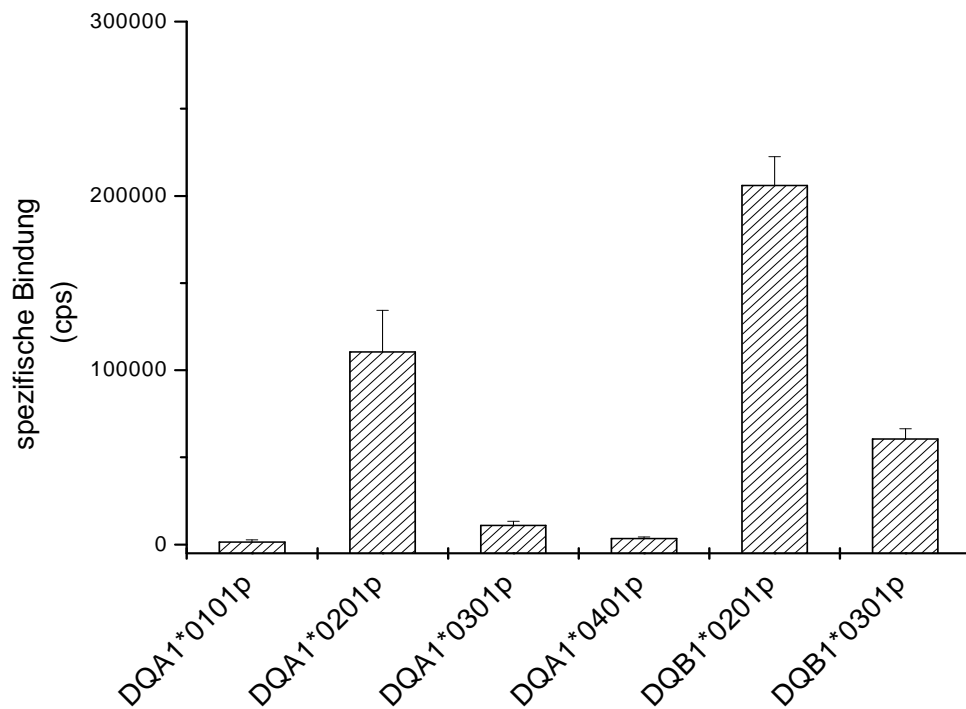


Abb. 4.8 Interaktion von Biotin-markierten HLA-DQ-Peptidfragmenten mit **Hsp72**

Die Abbildung zeigt die Interaktion von **Hsp72** (8 µg/ml bzw. 0,1 µM) mit Biot-HLA-DQ-Peptidfragmenten (8 µg/ml bzw. 0,4 µM)

Vorinkubation Hsp72-Peptid-Komplex über Nacht bei 37°C, anti-Hsp72 Antikörper über Nacht bei 4°C auf die Platte gecoatet (4 µg/ml), Blockierung mit BSA1%, verwendeter Puffer: PBS 0,02% NaN₃, weitere experimentelle Bedingungen siehe Kap. 3.2.4.3. Die unspezifische Bindung wurde abgezogen.

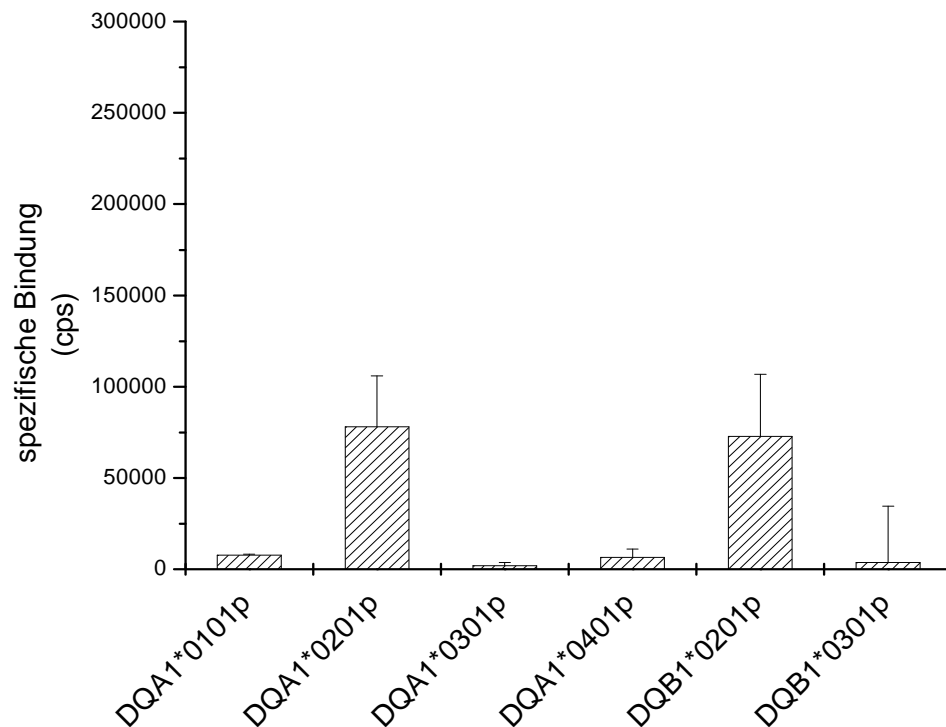


Abb. 4.9 Interaktion von Biotin-markierten HLA-DQ-Peptidfragmenten mit **Hsc70**

Die Abbildung zeigt die Interaktion von **Hsc70** (8 µg/ml bzw. 0,1 µM) mit Biot-HLA-DQ-Peptidfragmenten (8 µg/ml bzw. 0,4 µM). Vorinkubation Hsc70-Peptid-Komplex über Nacht bei 37°C, anti-Hsc70 Antikörper über Nacht bei 4 °C auf die Platte gecoatet (4 µg/ml), Blockierung mit BSA1%, verwendeter Puffer: PBS 0,02% NaN₃, weitere experimentelle Bedingungen siehe Kap.3.2.3.4. Die unspezifische Bindung wurde abgezogen.

Wie die Abb. 4.8 und 4.9 darstellen, konnte für beide untersuchte Hsp70 und Hsc70 ein ähnliches Bindungsmuster wie für DnaK gefunden werden.

Die Affinität der beiden mit der JIA protektiv assoziierten Peptidfragmente (DQA1*0201p und DQB1*0201p) zeigten ähnlich hohe Messwerte wie für DnaK. Für Hsc70 wurden jedoch niedrigere Messwerte als für Hsp70 gemessen.

4.2.2. Sättigungsexperiment mit Biotin-markiertem HLA-DQA1*0201-Peptid (Biot-⁴²KETVWKLPLFHRLR⁵⁵) und DnaK

In Sättigungsexperimenten wurde die Affinität von DnaK an DQA1*0201-Biotin-Peptid durch Applikation von steigender DQA1*0201-Biotin-Peptidkonzentration untersucht.

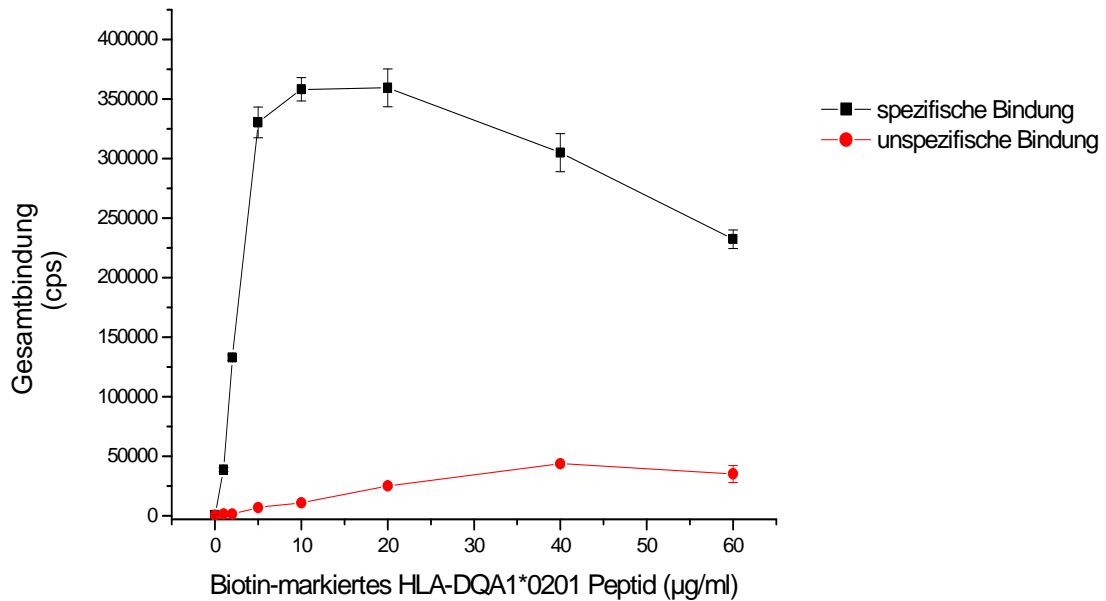


Abb. 4.10 Sättigungsversuch mit HLA-DQA1*0201p an DnaK im Europium-Fluoreszenz-Assay Interaktion von 0,12 µM DnaK mit verschiedenen Konzentrationen Biot-HLA-DQA1*0201-Peptid (Biot-KETVWKLPLFHRLR). Experimentelle Bedingungen siehe Kap.3 (Blockierung mit BSA1%, Fixierung mit Glutaraldehyd, Puffer: PBS 0,02%NaN₃ 10% DMSO). Die unspezifische Bindung wurde abgezogen.

Abbildung 4.10 zeigt eine starke Steigung der Bindungskurve im Bereich bis 5 µg/ml (bzw. 0,25 µM) und erreicht bei 10 µg/ml ein Plateau. Sehr hohe Mengen an Peptid in der Lösung führten wieder zu einer leichten Abnahme der Bindungskurve. Aus diesem Grund wurde für weitere Versuche eine optimale Konzentration an Biotin-markiertem Peptid von 0,2-0,3 µM (5µg/ml) festgelegt. In diesem gewählten Konzentrationsbereich zeigten sich hohe Counts ohne Erreichen des Plateaus sowie ein großer Unterschied zwischen spezifischer und unspezifischer Bindung.

4.2.3 Konkurrenz mit Biot-HLA-DQA1*0201 an DnaK durch 3-/10-fachen molaren Überschuss an unmarkierten HLA-DQA1-Peptidfragmenten

Nachdem festgestellt wurde, dass eine Interaktion zwischen Biotin-markiertem Peptid HLA-DQA1*0201 und DnaK besteht, wurde geprüft, ob eine Konkurrenz des Biotin-markierten HLA-DQA1*0201-Peptides (0,2 µM) an DnaK (0,12 µM) durch einen Überschuss unmarkierter Peptide aus HLA-DQ- Molekülen (siehe Tab.1, Kap. Methode) nachzuweisen ist. Es wurden Konkurrenzversuche analog zu den oben beschriebenen Konkurrenzversuchen mit rh-Hsp60 durchgeführt.

Bei Konkurrenz mit 3fachem molaren Überschuss unmarkierter Peptide (Abb.4.11) ließ sich die stärkste Konkurrenz bei dem unmarkierten DQA1*0201 Peptid beobachten. Die unmarkierten DQA1*0301 und -*0401 Peptide zeigten eine schwache Konkurrenz, wohingegen das unmarkierte Peptid DQA1*0101 keine Konkurrenz aufwies.

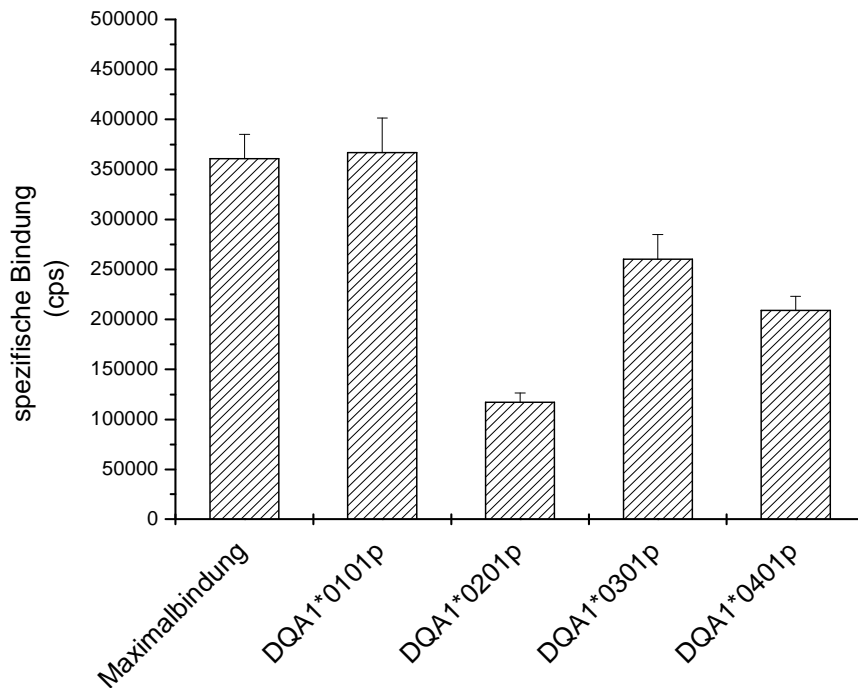


Abb.4.11 Konkurrenz von Biotin-DQA1-0201-Peptid an DnaK durch 3-fachen molaren Überschuss unmarkierter Peptidfragmente

Inkubation von 0,12 μM DnaK mit 0,3 μM Biotin-DQA1-0201-Peptid (6 $\mu\text{g/ml}$) als Indikatorpeptid (Maximalbindung). Konkurrenz durch 3-fachen molaren Überschuss unmarkierter HLA-DQA1-Peptidfragmente (DQA1*0101p, *0201p, *0301p, *0401p). Verwendeter Puffer: PBS 0.02% NaN₃ 10% DMSO. Experimentelle Bedingungen siehe Kap.3.2.3.4.

Besonders starke Konkurrenz der Interaktion zwischen Biotin-markiertem Peptid HLA-DQA1*0201 und DnaK wurde in Konkurrenzversuchen mit 10-fachem molaren Überschuss unmarkierten Peptiden gefunden (Abb. 4.12). Die stärkste Konkurrenz zeigte das unmarkierte DQA1*0201 Peptid. Eine ähnliche Konkurrenz ließ sich bei den unmarkierten DQA1*0301 und -*0401 Peptiden erkennen. Lediglich das DQA1*0101 Peptid zeigte keine Konkurrenz.

Bei dem 10-fachen molaren Überschuss unmarkierter Peptide ergab sich folgendes repräsentatives Bild (Abb. 4.12):

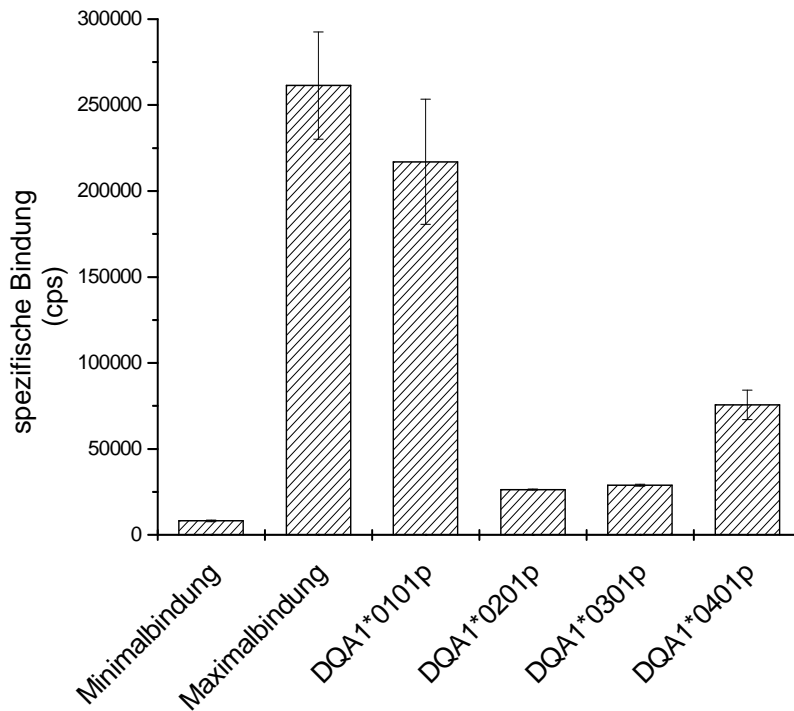


Abb.4.12 Konkurrenz von Biotin-DQA1-0201–Peptid an DnaK durch 10-fachen molaren Überschuss unmarkierter Peptidfragmente

Inkubation von 0,12 μM DnaK mit 0,2 μM Biotin-DQA1-0201–Peptid (4 $\mu\text{g/ml}$) als Indikatorpeptid (Maximalbindung). Minimalbindung 0,2 μM Biotin-DQA1-0201–Peptid ohne DnaK. Konkurrenz durch 10-fachen molaren Überschuss unmarkierter HLA-DQA1-Peptidfragmente. Verwendeter Puffer: PBS 0,02%Na₃. Experimentelle Bedingungen siehe Kap.3.2.3.4.

Abb. 4.13 zeigt ein ähnliches Konkurrenzexperiment von Biotin-markiertem DQA1*0201-Peptidfragment an DnaK wie in Abb. 4.11 und 4.12 mit verschiedenen Überschüssen (1-,3-,10fachen) an unmarkierten HLA-DQ-Peptidfragmenten.

Die unmarkierten HLA-DQ-Peptidfragmente (DQA1*0201, *0301, *0401) bewirkten eine konzentrationsabhängige Konkurrenz des Indikatorpeptides. Einzige Ausnahme bildete das Peptid DQA1*0101.

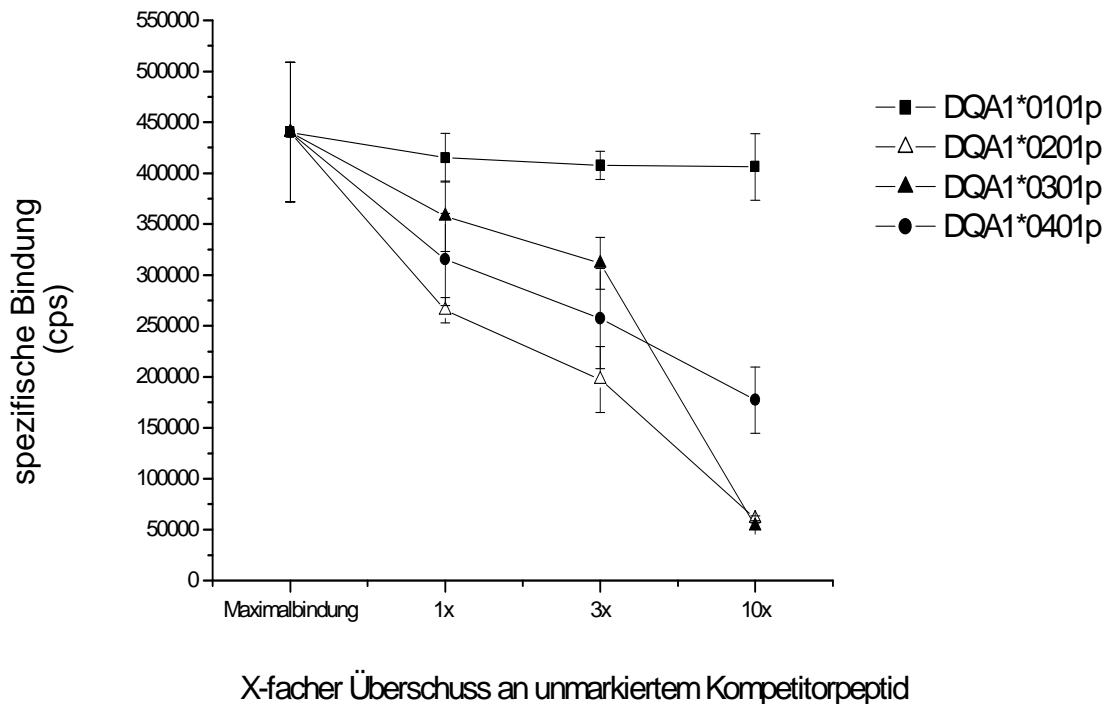


Abb. 4.13 Wettbewerbsassay unmarkierter HLA-DQ-Peptidfragmente an DnaK
Inkubation von 0,8 µg/ml DnaK mit 0,3 µM Biot-HLA-DQA1*0201 (entspricht 6 µg/ml Peptid).
Wettbewerb durch verschiedene molare Überschüsse unmarkierter Wettbewerbspeptide aus den
HLA-DQA1-Peptidfragmenten. Die untersuchten Peptide zeigten eine konzentrationsabhängige
Wettbewerb. Die einzige Ausnahme stellte das Peptid HLA-DQA1*0101 dar.

Damit ist durch drei verschiedene Versuche, nämlich Bindungs-, Sättigungs- und Wettbewerbsassay, nachgewiesen worden, dass aus den hier untersuchten DQ-Peptidfragmenten das HLA-DQA1*0201 Peptidfragment die höchste Affinität bzw. Wettbewerb an DnaK zeigt.

Des Weiteren zeigen diese Experimente, dass in allen Versuchen das HLA-DQA1*0101 Peptidfragment keine Affinität zu DnaK aufweist.

4.2.4 Konkurrenz der Bindung von Biotin-markiertem CLIP₁₀₅₋₁₁₇-Peptid an DnaK durch unmarkierte Peptidfragmente aus dem HLA-DQA1-Molekül

Wie in Kapitel 4.2 erwähnt, wurden unmarkierte HLA-DQ-Peptidfragmente mit CLIP₁₀₅₋₁₁₇-Peptid in Bezug auf Peptid-DnaK-Bindungsaffinität verglichen um zu demonstrieren, dass auch die o.g. unmarkierten Peptidfragmente zu einer Verdrängung des Biotin-markierten CLIP-Peptids von DnaK führen. Hierfür wurde ein quantitativer Wettbewerbsassay mit Biotin-markiertem CLIP₁₀₅₋₁₁₇-Peptid durchgeführt und die Bindung durch unmarkierte HLA-DQ-Peptidfragmente kompetitiert.

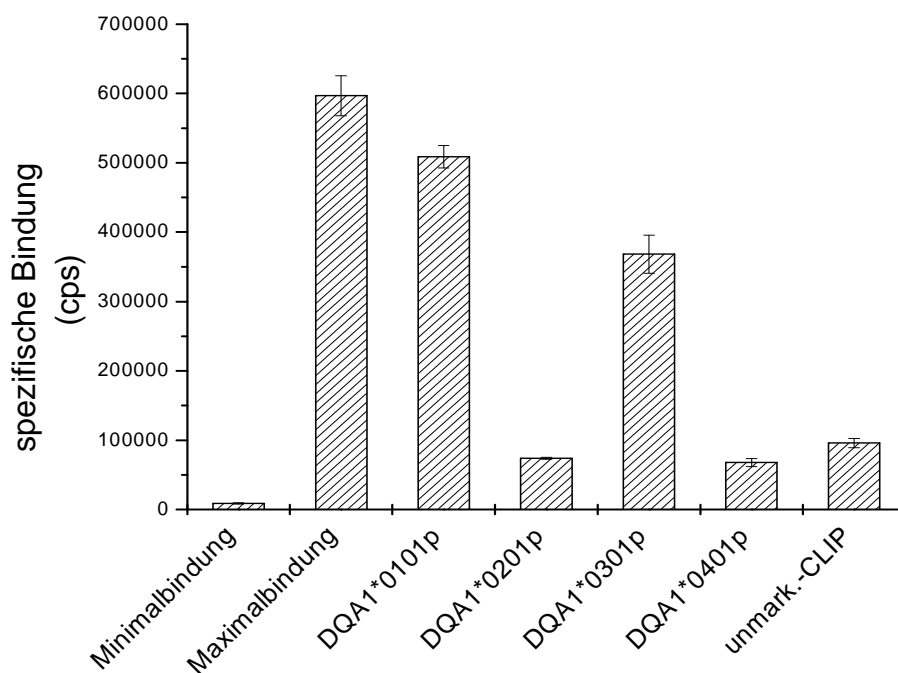


Abb. 4.14 Wettbewerbsversuch mit DnaK, Biotin-markiertem-CLIP-Peptid und 10-fachem molarem Überschuss unmarkierter Peptide

Bindung von Biotin-markiertem-CLIP (10 µg/ml) an DnaK (10 µg/ml bzw. 0,15 µM) als Indikatorpeptid (Maximale Bindung). Konkurrenz durch 10-fachen Überschuss unmarkierter HLA-DQA1-Peptidfragmente (DQA1*0101, *0201, *0301, *0401) und unmarkiertem CLIP-Peptid als Kontrollpeptid. Experimentelle Bedingungen siehe Kap. 3.2.4. Dreifachwerte, die unspezifische Bindung wurde abgezogen.

Aus Abb. 4.14 ist zu ersehen, dass HLA-DQ-Peptidfragmente auch ein „fremdes“ Indikatorpeptid aus der DnaK-Bindung verdrängen können. Die stärkste Konkurrenz zeigte das unmarkierte DQA1*0201 Peptid, eine ähnliche Konkurrenzstärke zeigte das DQA1*0401 Peptid. Anders als in den Konkurrenzversuchen von Biotin-markiertem DQA1*0201 an DnaK nimmt das unmarkierte Peptid DQA1*0301 eine Position dazwischen ein und weist eine schwächere Konkurrenz auf. Das unmarkierte DQA1*0101 zeigte, wie erwartet, keine Konkurrenz.

5 Diskussion

Die juvenile idiopathische Arthritis ist eine chronische, entzündliche Erkrankung und wird den Autoimmunerkrankungen zugeordnet. Der Begriff JIA bezeichnet eine Erkrankung mit erheblicher klinischer Heterogenität. Es ist noch immer unklar, welcher Pathomechanismus der JIA zugrunde liegt.

Eine Vielzahl genetischer und nicht-genetischer Faktoren spielen in der Auslösung der Erkrankung eine Rolle. Verschiedene Prozesse der unspezifischen sowie der spezifischen Immunantwort führen zum klinischen Bild der juvenilen Arthritis.

So könnte zum Beispiel ein unbekanntes Antigen mit einem Tropismus für Gelenke auf dem Blutweg in die Synovialis gelangen und durch Antigen-präsentierende Zellen (APC) mit Hilfe von HLA-Molekülen den T-Lymphozyten präsentiert werden. Die Interaktion zwischen den APC und dem korrespondierenden Rezeptor der T-Lymphozyten (TCR) führt zu einer klonalen Expansion von spezifischen T-Lymphozyten und zur Auslösung einer komplexen Kaskade von immunologischen und entzündlichen Phänomenen.

Viele Studien zeigen, daß eine HLA-assoziierte Prädisposition besteht, welche jedoch als eine alleinige genetische Erklärung für die Manifestation der JIA nicht ausreicht (Buckner et al., 2002; Haas et al., 1994). Für die juvenile idiopathische Arthritis, genau wie auch für viele andere chronisch entzündliche Erkrankungen, sind positive und negative Assoziationen mit MHC-Klasse I und MHC-Klasse II-Allelen bekannt, wobei die Assoziationen mit der MHC-Klasse II im Vordergrund stehen (Feichtlbauer et al., 1998).

Bei der juvenilen idiopathischen Arthritis, vor allem bei den beiden oligoartikulären Verlaufsformen, besteht eine ausgeprägte Assoziation für die Haplotypen DRB1*0801-DQA1*0401-DQB1*0402, DRB1*11-DQA1*05-DQB1*03 und DRB1*1301-DQA1*01-DQB1-06 (Thomson et al., 2002).

Der Haplotyp HLA-DRB1*04, der besonders stark mit der rheumatoiden Arthritis der Erwachsenen assoziiert ist und das sogenannte „shared epitope“ exprimiert, zeigt eine Assoziation nur für den RF-positiven Polyarthritis-Subtyp der JIA. In allen anderen Subgruppen (Ausnahme: systemische und Enthesitis assoziierte

Verlaufsformen) wirkt der Haplotyp HLA-**DRB1*04**-DQA1*03-DQB1*03 in Bezug auf die Erkrankung eher protektiv.

Für die “persistente“ Form der Oligoarthritis wurde ein verringertes Erkrankungsrisiko für den Haplotyp DRB1*0701-DQA1*02-DQB1*02 beobachtet (decreased risk of association OR 0,2) (Thomson et al., 2002; Haas et al., 1994).

Die Rolle der Hitzeschockproteine im Rahmen der Immunantwort beruht auf ihrer Beteiligung bei der Prozessierung und der Präsentation antigener Peptide und ihrer Mitwirkung bei der Erkennung von Tumorzellen durch immunologische Effektorzellen (Multhoff et. al., 1998).

Bisher gibt es zahlreiche Studien, welche die Re-Präsentation exogener antigener Peptide (sogenannte „cross-presentation“) und HSP-gebundener Peptide in APC untersucht haben (Basu et al., 2001, Binder et.al, 2000, Panjawani et al., 1999 Singh-Jasuja et al., 2000). Diese Studien belegen das extreme immunogene Potential von HSP-Peptid-Komplexen. Besonders für HSP70 und HSP90 Moleküle und für die Antigenpräsentation über MHC-Klasse I-Moleküle ist dieser Effekt gut untersucht. Auch über MHC-Klasse II-Moleküle werden HSP-gebundene Antigene verstärkt präsentiert. Für gp96 wurde dies im Tiermodell (Doody et al., 2004) und für Hsp70 auch im humanen System gezeigt (Haug et al., 2005).

Ausgangspunkt dieser Arbeit zur Untersuchung der Bedeutung der HLA-Molekül-Hitzeschockprotein-Interaktion für die Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis waren experimentelle Daten aus unserer Arbeitsgruppe über eine mögliche Interaktion zwischen HSP70-Molekülen und HLA-DR Peptidfragmenten (Maier et al., 2002), die die Vermutung nahelegten, dass die Immunantwort auf Hitzeschockprotein-HLA-Komplexe an der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis beteiligt sein könnte.

Erste Hinweise, dass eine gemeinsame Präzipitation von SE-positiven DR-Peptiden mit DnaK existiert, lieferten Untersuchungen von Auger et al. (1996). Andere Arbeiten haben gezeigt, dass nicht nur die SE-Peptidsequenzen, sondern die meisten Peptidsequenzen aus der HV3-Region von HLA-DRB1-Molekülen an HSP70 binden können (Maier, Haug et. al., 2002). Die einzigen

Peptidsequenzen aus HLA-DR-Molekülen, die keine Affinität zu HSP70 zeigten, stammten aus HLA-DR Molekülen, die als RA-protectiv gelten. Ergänzend hierzu konnte für komplette HLA-DR-Moleküle kein Unterschied in der HSP70 Affinität zwischen RA-protectiven und RA-prädisponierenden HLA-DR-Molekülen beobachtet werden (Haug et al., 2007).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde eine quantitative Bestimmung der Interaktion von HLA-DQ-Peptidfragmenten mit HSP60- und 70-Molekülen durchgeführt. Es wurden die Bindungseigenschaften von den drei verschiedenen Mitgliedern der HSP70-Familie untersucht: DnaK (*E. coli*), humanes Hsp70 (stress-induzierbar), bovines Hsc70 (konstitutiv exprimiert) sowie rekombinantes humanes Hsp60.

Zuerst wurde untersucht, ob verschiedene Biotin-markierte Peptidsequenzen aus krankheitsassoziierten und nicht-krankheitsassoziierten HLA-DQ-Molekülen im Europium-Fluoreszenz-Assay eine Affinität zu HSP60 zeigen. Untersuchungen in diese Richtung erschienen sinnvoll, da eine Beteiligung an pathophysiologischen Prozessen bei den hochkonservierten Proteinen der HSP60-Familie diskutiert wird. Graeff-Meeder konnte bei der oligoartikulären JIA durch eine Reaktivität gegen HSP60 eine Korrelation mit einem besseren klinischen Verlauf nachweisen (de Graeff-Meeder et al., 1995).

Des Weiteren zeigten Studien von Immunantworten nach Immunisation mit Bakterien, dass das bakterielle HSP60 ein immundominantes Antigen für die T-Zell-vermittelte zelluläre Immunantwort darstellt (Kaufmann et al., 1992). Tierexperimentelle Arbeiten belegen einen solchen Zusammenhang durch den Nachweis, dass eine Reaktion von T-Zellklonen auf mykobakterielles HSP60 eine Autoimmunarthritis bei Ratten auslösen kann (Cohen et al., 1991).

Ferner kann HSP60 bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen eine verstärkte Immunantwort auslösen (Holoshitz et al., 1983, Cohen et al., 1985, Van Eden et al., 1985, 1989, 1995).

Europium-Fluoreszenz-Assay zum Nachweis der Interaktion von HLA-DQ-Peptidfragmenten und HSP

Der Europium-Fluoreszenz-Assay stellt eine Methode dar, die quantitative Aussagen bezüglich Bindungs- und Kompetitionsverhalten mit HLA-DQ-Peptidfragmenten erlaubt (Tompkins et al., 1993). Diese Methode (auch DELFIA genannt) ist im Vergleich zu der bereits klassischen ELISA-Methode sensitiver und weist niedrigere Hintergrundwerte auf (Smith et al., 2001). Des Weiteren liegen die Vorteile der Bindungsassays in ihrer Schnelligkeit.

Folgende Einschränkung ist bei der Interpretation der Daten zu bedenken: die quantitativen Messungen mittels des äußerst sensitiven Europium-Fluoreszenz-Assays führten zum Teil zu schwankenden Ergebnissen in mehreren identisch durchgeführten Versuchen.

In den Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen ermittelt. Zum einen hatte sich gezeigt, dass für die genannten Versuche mit Hsp60 eine Fixierung der gebundenen Peptide mittels Glutaraldehyd an Hitzeschockproteine notwendig war, um höhere Messwerte zu erhalten. Zum anderen konnten Hintergrundreaktionen dadurch minimiert werden, dass eine Blockierungslösung wie BSA 1% (bovine serum albumine 1%) verwendet wurde. Außerdem wurde mit dem Europium-Fluoreszenz-Assay das pH-Optimum der HSP-Peptid-Interaktion bei 6,5 (Hsp60) bzw. im Neutralen (Hsp70) bestimmt.

Ergebnisse mit HSP60 und HLA-DQ-Peptidfragmenten

In den Hauptuntersuchungen sollte zunächst die Affinität verschiedener Biotin-markierter Peptidsequenzen an Hsp60 untersucht werden. Die hier untersuchten Peptidsequenzen wurden durch Festphasenpeptidsynthese nach der Fmoc/TBTU-Methode mit Hilfe eines modifizierten multiplen Peptidsynthesizers synthetisiert.

Die hier verwendeten Biotin-markierten Peptidsequenzen umfassen Aminosäuresequenzen aus mit JIA assoziierten, bzw. nicht-assoziierten HLA-DQ-Molekülen, die zwischen den verschiedenen allelischen Varianten besonders variabel sind (Aminosäureposition 42-55 aus DQA1, Aminosäureposition 65-79 aus DQB1).

Für den angestrebten Nachweis einer Affinität zu Hsp60 waren zunächst größere Mengen an Biotin-markierten Peptiden notwendig, was allerdings die dosisabhängige unspezifische Bindung an der Platte zur Folge hatte. Eine Interaktion wurde für das Peptid Biot-(KETVWCLPVLRQFR)-DQA1*0401 gefunden (Abb 4.4), das mit der Prädisposition für juvenile idiopathische Arthritis assoziiert ist.

Durch quantitative Bindungsexperimente wurde gezeigt, dass eine Bindung des mit JIA krankheitsassoziierten Biotin-markierten DQA1*0401-Peptidfragments an Hsp60 detektiert werden kann (Abb. 4.4) und diese Interaktion sättigbar ist (Abb. 4.5). Hierbei war allerdings eine Fixierung der gebundenen Peptidfragmente an Hsp60 mit Glutaraldehyd erforderlich (Abb 4.2 A). Die Bindungsexperimente ohne Fixierung mit Glutaraldehyd zeigten keinen Unterschied zwischen den spezifischen und unspezifischen Bindungen (Abb. 4.2 B). Des Weiteren waren sehr hohe unspezifische Hintergrundbindungen (mit mehr als 50%) des Biotin-markierten Peptids (Bindung an die blockierte Platte ohne Hsp60 Coating) erkennbar (Abb. 4.4).

Aus diesen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass die Hsp60-Peptidfragment-Interaktion entweder äußerst schwach ist oder ein falsch positives Signal durch Fixierung unspezifisch adhärierenden Biotin-Peptids gemessen wurde. Eine Kompetition der Hsp60-Peptidfragment-Interaktion durch unmarkierte Peptidfragmente konnte nicht gezeigt werden (Abb. 4.6), was ebenfalls für ein unspezifisches Signal spricht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Fall der mit JIA krankheitsassoziierten HLA-DQA1 Peptidfragmente eine Interaktion mit Hsp60 gefunden wurde, diese jedoch keine Spezifität aufweist. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass unspezifische Bindungen, zum Beispiel Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Hsp60 und Biotin-markiertem Peptid

HLA-DQA1*0401, entstehen und so die spezifische Hsp60-Peptid-Bindung blockieren.

Ein anderer Grund für die fehlende Fähigkeit von Hsp60 mit Peptidfragmenten aus dem HLA-DQ-Molekül spezifisch zu interagieren, könnte eine fehlende Bindungsstelle mit einem definierten Motiv für die untersuchten Peptidfragmente sein, wie es sie z. B. bei HSP70 gibt. Hsp60 interagiert zwar durch seine intrazelluläre Funktion im MHC-Prozessierungsweg mit verschiedensten Peptiden und Proteinen, allerdings in einem Komplex aus zwei aufeinander liegenden heptameren Ringen mit einem circa 50 Å weiten Zentrum, so dass wahrscheinlich kein genaues „Bindungsmotiv“ für o.g. Peptidfragmente an der Bindungsstelle in vitro vorliegt.

Die hier vorgelegten Ergebnisse zeigen, dass die Bindungsversuche von rekombinant humanem Hsp60 und krankheitsassoziierten, bzw. nicht-krankheitsassoziierten Peptiden aus dem HLA-DQ-Molekül bei der JIA kein spezifisches Bindungsmuster ergeben und damit auch keinen Beitrag zur Erklärung der HLA-Assoziation der JIA leisten können.

Ergebnisse mit HSP70 und HLA-DQ-Peptidfragmenten

In einem zweiten Schritt wurde untersucht, ob sich die HLA-DQ-Peptidfragmente untereinander im Bezug auf ihre Affinität zu DnaK, Hsp70 und Hsc70 unterscheiden. Der Nachweis einer Peptid-HSP-Interaktion sollte als zusätzliches Argument für die Hypothese einer pathogenetischen Bedeutung der HSP bei der JIA gewertet werden.

Es erfolgte mittels Europium-Fluoreszenz-Assay die quantitative Messung der Stärke der Interaktion der HLA-DQA-Allele an HSP70 Moleküle. Dabei sollte überprüft werden, ob und welche HLA-DQ-Peptidfragmente mit HSP70 interagieren können.

In den Experimenten zeigten die nicht-krankheitsassoziierten Biotin-markierten Peptidsequenzen HLA-DQA1*-0201/-DQB1*0201 eine Affinität zu DnaK. Biotin-markiertes CLIP₁₀₅₋₁₁₇-Peptid besaß in den Versuchen eine ähnliche Affinität zu DnaK wie das DQA1*0201-Peptidfragment.

Für die Peptidfragmente aus HLA-DQA1*0201/DQB1*0201 wurde in allen Versuchen mit stress-induzierbarem-Hsp70, konstitutiv-exprimiertem-Hsp70 und DnaK eine Affinität gefunden. Die höchste Affinität wurde für das Peptidfragment aus HLA-DQA1*0201 an DnaK gefunden. Für die JIA werden die HLA-DQ-Haplotypen DQA1*0201-DQB1*0201 (DQ2) zu den protektiven Allelen gerechnet.

Als Plausibilitätskontrolle der Interaktion von DnaK mit dem DQA1*0201-Peptidfragment wurden mehrere Sättigungsexperimente durchgeführt. Die o.g. Interaktion wurde im niedrigen μM Bereich gefunden. Ähnliche Resultate für die HSP70-Peptid-Interaktion wurden in anderen Arbeiten beschrieben (MacAry et al. 2004, Javid et al. 2004, Haug, 2005). Interessant war die Beobachtung, dass die Bindungsaffinität der Peptide an DnaK bei pH-Werten von 5 oder niedriger nur sehr schwach war. Die Affinität von HSP70 zu HLA-DQ-Peptiden wies ein Optimum bei pH im neutralen Bereich auf (Daten nicht gezeigt).

Die pH-Abhängigkeit der DnaK-Peptid-Interaktion könnte die unterschiedliche Affinität und Bindungsverhalten der HSP70 in verschiedenen zellulären und extrazellulären Kompartimenten erklären. Wo ein neutraler pH herrscht, können HSP70 Peptide binden - wie zum Beispiel im Zytosol oder im Extrazellulärraum. In den MHC II-Beladungskompartimenten bei erniedrigten pH-Werten können die Peptide aufgrund der reduzierten HSP70-Affinität abgegeben werden (Mycko et al., 2004, Haug et al., 2007).

Im nächsten Schritt erfolgte die Competition des Biotin-markierten HLA-DQA1*0201-Peptides durch einen Überschuss unmarkierter Peptide aus HLA-DQA1-Molekülen. Die Untersuchungen zeigten, dass eine konzentrationsabhängige Competition für alle untersuchten Peptide, mit Ausnahme vom HLA-DQA1*0101-Peptidfragment, festgestellt wurde.

Kompetitionsversuche konnten nur mit Peptidfragmenten aus DQA1 Molekülen durchgeführt werden, da keine unmarkierten Peptidfragmente aus DQB1 Molekülen zur Verfügung standen.

Schlussfolgerung und Hypothese aus der vorliegenden Arbeit

Die Untersuchungen der Bindungsaffinität von HLA-DQ-Peptidfragmenten an HSP60 ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen prädisponierenden und protektiven HLA-DQ-Peptidfragmenten. Die gefundene Interaktion war schwach, mit hohem Hintergrund und nicht kompetitierbar.

In der vorliegenden Arbeit ließ sich aber zwischen HSP70-Molekülen und HLA-DQ-Peptidfragmenten ein „differentielles Bindungsmuster“ feststellen. Für beide Peptidsequenzen aus dem als protektiv geltenden HLA-DQ-Molekül DQ2 (DQA1*0201/DQB1*0201) wurde eine Affinität sowohl zu eukaryotischen HSP70 Molekülen (stress-induzierbares Hsp70 und konstitutiv exprimiertes Hsc70) als auch zu prokaryotischem DnaK gezeigt (Abb. 4.7, 4.8 und 4.9).

Die Unterschiede der Interaktion sind möglicherweise auf die unterschiedliche Peptidbindungseigenschaft der beiden HSP-Klassen zurückzuführen. HSP70 Moleküle besitzen eine Peptidbindungsstelle mit Bindungsmotiv und können zum Beispiel in dem Vorgang der zellulären Peptidprozession und -präsentation eine Reihe von intrazellulären Peptiden binden (Srivastava et al., 2002) und so eine Immunreaktion initiieren.

Diese Ergebnisse zur Bindungsaffinität von HLA-DQ-Peptidfragmenten an HSP70-Moleküle passen gut in den Kontext der von Maier et al. und Haug et al. beschriebenen Ergebnisse, die eine Interaktion von HSP70 Molekülen und Peptidsequenzen aus der HV3-Region von HLA-DRB1-Molekülen, bzw. intakten HLA-DRB1-Molekülen zeigten (Maier et al., 2002, Haug et al., 2007).

Ergänzend zu den Arbeiten von Maier und Haug wurde in der hier vorgelegten Arbeit eine Affinität an HSP70 nicht nur für die HLA-Peptidfragmente aus der HV3-Region (DQB1, β -Kette) sondern auch für Peptidfragmente aus DQA1 (α -Kette) von HLA-DQ-Molekülen gefunden. Peptidsequenzen aus der α -Kette von HLA-DR wurden in den Arbeiten von Maier et al. und Haug et al. nicht untersucht, da die α -Kette bei HLA-DR im Gegensatz zu HLA-DQ nicht polymorph, also für alle HLA-DR Moleküle (assoziiert oder nicht) gleich ist.

Hypothetisch könnte die Bindung von DQA1*0201- und DQB1*0201-Peptidfragmenten an HSP70 dafür sprechen, dass auch intakte, in Bezug auf

JIA protektiv wirkende DQ-Moleküle wie DQ2 an HSP70 binden und so die Immunantwort beeinflussen, während neutrale und prädisponierende DQ-Moleküle keine Affinität zu HSP70 zeigen. Andererseits ist die beobachtete differentielle Affinität auch mit der Hypothese vereinbar, dass nicht komplette DQ-Moleküle, sondern DQ-Peptid-Fragmente eine Rolle in der Pathogenese der JIA spielen könnten. Dabei sind verschiedene Modelle denkbar.

So könnte zum Beispiel HSP70 durch die Interaktion mit den mit JIA protektiv assoziierten HLA-DQ-Peptidfragmenten an Antigenpräsentation und damit an T-Zellaktivierung beteiligt sein. Dadurch könnte es im Thymus, im Rahmen der Maturation der Thymuszellen, zu einer negativen Selektion von Thymozyten (potentiell autoreaktive T-Zellen) kommen, die mit zu starker Affinität interagieren, da sie Selbst-MHC und Selbst-Peptid erkennen. Es ist bekannt, dass die Stärke der Interaktion nicht nur durch die Interaktion des TCR mit dem MHC/Peptid Komplex, sondern auch durch die Wirkung kostimulatorischer und adhäsiver Moleküle bedingt ist (Amsen et al., 1998). Aufnahme und Präsentation dieser an HSP70 gebundenen extrazellulären protektiven HLA-DQ-Peptidfragmente durch APC über MHC II könnte zum Beispiel eine Signaltransduktion bewirken, die zu einer Reihe von Ereignissen, wie Repräsentation von HSP-antigenen Peptiden, Freisetzung von Zytokinen, Translokation von $\text{NF-}\kappa\text{B}$ im APC-Kern und APC-Maturation, führen kann (Basu et al., 2000; Panjwani et al., 2000). Dies könnte die HLA-abhängige klonale Deletion von potentiell selbstreaktiven T-Zellen amplifizieren, so dass autoaggressive Reaktionen mit Aktivierung zytotoxischer autoreaktiver T-Zellen nicht in Gang gesetzt werden.

Einer weiteren Hypothese zufolge könnten die protektiven HLA-DQ-Peptidfragmente durch die Bindung an HSP70 die T-Zellantwort modulieren und dadurch in die Immunregulation eingreifen. Normalerweise sind die HSP-Peptid-Komplexe intrazellulär lokalisiert. Durch Zellnekrosen können diese o.g. Komplexe extrazellulär freigesetzt werden (Basu et al., 2000).

Die HSP-Peptid-Komplexe werden rezeptorvermittelt durch professionelle antigenpräsentierende Zellen (APCs) aufgenommen. Die Antigenpräsentation erfolgt nach der Prozessierung der aufgenommenen HSP-Peptid-Komplexe und

der Beladung der daraus resultierenden Peptide auf den MHC II-Molekülen. Es ist daher denkbar, dass diese Präsentation zur Aktivierung und Expansion klonaler $CD4^+CD25^{high}$ T-Regulationszellen führen könnte. Diese Suppressorzellen könnten aktivierte autoreaktive $CD4^+$ T-Zellen unterdrücken und somit für die JIA-Protektion dieser HLA-DQ-Peptidfragmente verantwortlich sein.

Zusammenfassend und noch spekulativ ist es daher denkbar, dass der HLA-DQ2 Haplotyp zu einer Deletion von autoreaktiven T-Zellen oder zu einem veränderten Aktivierungsgrad von T-Zellen führt, so dass eine Autoimmunreaktion verhindert wird.

6. Zusammenfassung

Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist eine komplexe Erkrankung, bei der multiple genetische Faktoren unterschiedliche Einflüsse auf die Pathogenese und damit auf eine mögliche JIA Entwicklung haben dürften.

Der Major Histocompatibility Complex (MHC) ist wesentlich an der Immunpathogenese der JIA beteiligt. Die Mechanismen, mit denen die HLA - Allele Empfänglichkeit gegenüber- bzw. Schutz vor Autoimmunerkrankungen vermitteln, sind noch weitgehend unbekannt.

Hitzeschockproteine (HSP) scheinen neben der MHC-Assoziation und anderen genetischen Faktoren ebenfalls an der Pathogenese von rheumatischen Erkrankungen beteiligt zu sein. Ihre Fähigkeit zur Stimulation des menschlichen Immunsystems ist sowohl für das mikrobielle- als auch das humane Hitzeschockprotein nachgewiesen. Zusätzlich ist bereits bekannt, dass HSP70-Moleküle Peptidfragmente aus mit der rheumatoiden Arthritis assoziierten HLA-DR-Molekülen differentiell binden und auch mit ganzen, intakten HLA-DR-Molekülen interagieren können.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, ob Peptidfragmente aus HLA-DQ Molekülen spezifisch mit HSP60- und HSP70-Molekülen interagieren können und ob ein differentielles Bindungsmuster zwischen mit der JIA protektiv, bzw. krankheitsassoziierten HLA-DQ-Molekülen gefunden werden kann. Es wurden dabei Peptidsequenzen aus besonders variablen Regionen von HLA-DQA1 und HLA-DQB1-Molekülen untersucht, für die bereits eine Bedeutung in der Pathogenese der JIA vermutet wird. Die Bindungsaffinität dieser Peptidfragmente wurde mittels eines quantitativen Europium-Assays analysiert.

Für rekombinantes humanes Hsp60 konnte keine spezifische Interaktion mit Peptidfragmenten aus HLA-DQ-Molekülen gezeigt werden. Eine spezifische Interaktion von Hsp60 mit HLA-DQ-Peptidfragmenten kann damit höchstwahrscheinlich nicht als Erklärung für eine Beteiligung von Hsp60 an der JIA-Pathogenese beitragen.

Im Gegensatz hierzu wurde sowohl mit prokaryotischem DnaK als auch den eukaryotischen Hsc70 (konstitutiv exprimiert) und Hsp70 (stress-induziert) eine „differentielle“ Interaktion mit HLA-DQ-Peptidfragmenten gefunden. Die gefundenen Interaktionen waren spezifisch, da sowohl eine Sättigung als auch eine Konkurrenz durch unmarkiertes gleiches oder andere Peptide gezeigt werden konnte. Für alle untersuchten HSP70 Moleküle wurde in den Bindungsversuchen die stärkste Affinität zu HLA-DQ-Peptidfragmenten aus dem als JIA-protectiv beschriebenen DQ2-Molekül (DQA1*0201/ DQB1*0201) gefunden. Interessanterweise zeigte sowohl das Peptidfragment aus der DQA1-Kette als auch aus der DQB1-Kette eine Affinität zu den HSP70 Molekülen. Neutrale und prädisponierende DQ-Moleküle zeigten keine bzw. eine geringe Affinität zu HSP70.

Es konnte in dieser Arbeit erstmals eine spezifische und differentielle Interaktion von HSP70 mit HLA-DQ-Peptidfragmenten gefunden werden. Die spezifische Bindung von mit der JIA protectiv assoziierten Peptidsequenzen aus dem DQ2-Molekül (DQA1*0201/ DQB1*0201) an DnaK, Hsc70 und Hsp70 könnte einen möglichen Faktor einer veränderten Antigenpräsentierung und T-Zellreaktion darstellen und damit einen Beitrag zur Erklärung der HLA-DQ Assoziation der Erkrankung leisten.

7. Literaturverzeichnis

Albert, E. D. and S. Scholz (1998). "Juvenile arthritis: genetic update." *Baillieres Clin Rheumatol* 12(2): 209-18.

Amsen et al., (1998). "Costimulatory signals are required for induction of transcription factor Nur77 during negative selection of CD4⁺CD8⁺ thymocytes." *PNAS*. 96(2): 622-627.

Anderton, S. M., R. van der Zee (1993). "Inflammation activates self hsp60-specific T cells." *Eur J Immunol* 23(1): 33-8.

Anderton, S. M., R. van der Zee (1994). "Differential mycobacterial 65-kDa heat shock protein T cell epitope recognition after adjuvant arthritis-inducing or protective immunization protocols." *J Immunol* 152(7): 3656-64.

Anderton, S. M., R. van der Zee (1995). "Activation of T cells recognizing self 60-kD heat shock protein can protect against experimental arthritis." *J Exp Med* 181(3): 943-52.

Ang, D., K. Liberek (1991). "Biological role and regulation of the universally conserved heat shock proteins." *J Biol Chem* 266(36): 24233-6.

Arnold-Schild, D., D. Hanau (1999). "Cutting edge: receptor-mediated endocytosis of heat shock proteins by professional antigen-presenting cells." *J Immunol* 162(7): 3757-60.

Asea A, Kraeft SK, Kurt-Jones EA, Stevenson MA, Chen LB, Finberg RW, Koo GC, Calderwood SK (2000) HSP70 stimulates cytokine production through a CD14-dependant pathway, demonstrating its dual role as a chaperone and cytokine. *Nat. Med.* 6:435-42

Auger, I., J. M. Escola (1996). "HLA-DR4 and HLA-DR10 motifs that carry susceptibility to rheumatoid arthritis bind 70-kD heat shock proteins." *Nat Med* 2(3): 306-10.

Auger I, Lepecuchel L, Roudier J (2002) Interaction between heat-shock protein 73 and HLA-DRB1 alleles associated or not with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 46:929-33

Basu S, Binder RJ, Ramalingam T, Srivastava PK (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity.* 14:303-13

Basu S, Binder RJ, Suto R, Anderson KM, Srivastava PK (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF- κ B pathway. *Int. Immunol.* 12:1539-46

Becker, J. and E. A. Craig (1994). "Heat-shock proteins as molecular chaperones." *Eur J Biochem* 219(1-2): 11-23.

Becker T, Hartl FU, Wieland F (2002) CD40, an extracellular receptor for binding and uptake of Hsp70-peptide complexes. *J. Cell Biol.* 158:1277-85

Begovich, A. B.; McClure, G. R.; Suraj, V. C.; Helmuth, R. C.; (1992)
"Polymorphism, recombination, and linkage disequilibrium within the HLA class II region.
J.Immunol.; 148; 249 - 255

Binder et al., (2000) "CD91: a receptor for heat shock protein gp96."
Nat Immunol. Aug;1(2):151-5.

Blachere NE et al., (1997)"Heat shock protein-peptide complexes, reconstituted in vitro, elicit peptide-specific cytotoxic T lymphocyte response and tumor immunity."
J Exp Med. Oct 20;186(8):1315-22.

Boog, C. J., E. R. de Graeff-Meeder (1992). "Two monoclonal antibodies generated against human hsp60 show reactivity with synovial membranes of patients with juvenile chronic arthritis." *J Exp Med* 175(6): 1805-10.

Braig, K., et al., (1994) "The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å." *Nature* 371: 578-586,

Brewerton et al., (1973) "Human lymphocyte antigens as a possible diagnostic aid in ankylosing spondylitis."
J Clin Pathol. May;26(5):387.

Brown ,J.H., Jardetzky, T.S., Gorga, J.C, Stern, L.J., Urban, L.G (1993). „Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1." *Nature* 364, 33-39

Buckner et al., (2002) "Genetics of rheumatoid arthritis: is there a scientific explanation for the human leukocyte antigen association?"
Curr Opin Rheumatol May;14(3):254-9. Review.

Bukau et al., (1994) « The ATP hydrolysis-dependent reaction cycle of the *Escherichia coli* Hsp70 system DnaK, DnaJ, and GrpE."

Proc Natl Acad Sci USA Oct 25;91(22):10345-9.

Bukau, B. and A. L. Horwich (1998). "The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines." *Cell* 92(3): 351-66.

Burel, C.,V. Mezger, M. Pinto, M. Rallu, S.Trigon, M. Morange (1992): Mammalian heat shock protein families. Expression und function. *Experientia* 48, 629-634

Carbajal et al., (1993) « Intramitochondrial localization of the main 70-kDa heat-shock cognate protein in Drosophila cells." *Exp Cell Res.* 1993 Aug; 207(2):300-9.

Castellino et al., (2000) "Receptor-mediated uptake of antigen/heat shock protein complexes results in major histocompatibility complex class I antigen presentation via two distinct processing pathways." *J. Exp. Med.* Jun 5;191(11):195

Chen, W., U. Syldath (1999). "Human 60-kDa heat-shock protein: a danger signal to the innate immune system." *J Immunol* 162(6): 3212-9.

Chen, S.,et al.,(1994) "Location of a folding protein and shape changes in GroEL-GroES complexes imaged by cryo-electron microscopy." *Nature* 371: 261-264,

Cohen, I. R. and A. W. Lohse (1991). "Physiology and pathophysiology of autoimmunity." *Semin Liver Dis* 11(3): 183-6.

Craig et al., (1993) "Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70." *J Bacteriol.* Oct;175(20):6484-91.

Cruse, J. M.; Lewis, R. E.; (1998)
"Atlas of Immunology"
CRC Press, Boca Raton, London, New York

Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW (2004) "Autoreactive T Cells in Healthy Individuals." *J Immunol* 172:5967-72

Davis, M. M. and Bjorkman, P. J. (1988)
"T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition."
Nature; 334 (6181), 395-402.

de Graeff-Meeder, E. R., G. T. Rijkers (1993). "Antibodies to human HSP60 in patients with juvenile chronic arthritis, diabetes mellitus, and cystic fibrosis." *Pediatr Res* 34(4): 424-8.

de Graeff-Meeder, E. R., R. van der Zee (1991). "Recognition of human 60 kD heat shock protein by mononuclear cells from patients with juvenile chronic arthritis." *Lancet* 337(8754): 1368-72.

de Graeff-Meeder, E. R., W. van Eden (1995). "Juvenile chronic arthritis: T cell reactivity to human HSP60 in patients with a favorable course of arthritis." *J Clin Invest* 95(3): 934-40.

de Graeff-Meeder, E. R., W. van Eden (1993). "Heat-shock proteins and juvenile chronic arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 11 Suppl 9: S25-8.

DeNagel, D. C. and S. K. Pierce (1991). "Heat shock proteins and immune responses: an early view." *Immunol Res* 10(1): 66-78.

Doody ADH et al., (2004) "Glycoprotein 96 can chaperone both MHC class I- and class II-restricted epitopes for in vivo presentation, but selectively primes CD8+ T cell effector function. "
J Immunol. May 15;172(10):6087-92.

Ellis, R. J. and S. M. van der Vies (1991). "Molecular chaperones." *Annu Rev Biochem* 60: 321-47.

Feichtlbauer et al., (1998) „HLA region microsatellite polymorphisms in juvenile arthritis." *Tissue Antigens Sep*;52(3):220-9.

Ferrari et al., (1997) "Distinct intracellular compartments involved in invariant chain degradation and antigenic peptide loading of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules."
J Cell Biol. 1997 Dec 15;139(6):1433-46.

Fink, A. L. (1999). "Chaperone-mediated protein folding." *Physiol Rev* 79(2): 425-49.

Frydman, J., E. Nimmesgern, K. Ohtsuka, F. U. Hartl (1994): "Folding of nascent polypeptide chains in a high molecular mass assembly with molecular chaperones."
Nature 370, 111-117.

Gaston, J. S. (1997). "Heat shock proteins and arthritis--new readers start here." *Autoimmunity* 26(1): 33-42.

Gething, M. J. & Sambrook, J. Protein folding in the cell. *Nature* 355,33.45 (1992)

Gething, M. J. (1996). "Molecular chaperones: clasping the prize." *Curr Biol* 6(12): 1573-6.

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

“Juvenile rheumatoid arthritis as a complex genetic trait.”
Arthritis Rheum.; 42 (11), 2261-2268.

Gregersen, P. K., J. Silver (1987). “The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis.” *Arthritis Rheum* 30(11): 1205-13.

Gupta, R. S. (1995). “Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells.” *Mol Microbiol* 15(1): 1-11.

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., A. Kimura (1994). “Polymorphism in the upstream regulatory region of DQA1 genes and DRB1, QAP, DQA1, and DQB1 haplotypes in the German population.” *Hum Immunol* 39(1): 31-40.

Haas, J. P., C. Nevinny-Stickel (1994). “Susceptible and protective major histocompatibility complex class II alleles in early-onset pauciarticular juvenile chronic arthritis.” *Hum Immunol* 41(3): 225-33.

Haas, J. P., H. Truckenbrodt (1994). “Subtypes of HLA-DRB1*03, *08, *11, *12, *13 and *14 in early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis (EOPA) with and without iridocyclitis.” *Clin Exp Rheumatol* 12 Suppl 10: S7-14.

Haug, M. (2005) “Hitzeschockproteine: Interaktion mit HLA-DR-Molekülen und Einfluss auf die MHC II-vermittelte T-Zellantwort“ Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften der Fakultät der Chemie und Pharmazie der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

Haug, M., Dannecker, L., Schepp, C. P., Kwok, W. W., Wernet, D., Buckner, J. H., Kalbacher, H. (2005), The heat shock protein Hsp70 enhances antigen-specific proliferation of human CD4(+) memory T cells. *Eur. J. Immunol.* 35: 3163–3172.

Haug et al., (2007). “70-kDa heat shock proteins: specific interactions with HLA-DR molecules and their peptide fragments.”
Eur J Immunol. Apr;37(4):1053-63

Hayer-Hartl, M.K., Ewbank, J.J., Creighton, T.E., and Hartl, F.U. (1994). “Conformational specificity of the chaperonin GroEL for the compact folding intermediates of alpha-lactalbumin.” *EMBO J.* 13, 3192-3202.

Holoshitz, J., A. Klajman (1986). "T lymphocytes of rheumatoid arthritis patients show augmented reactivity to a fraction of mycobacteria cross-reactive with cartilage." *Lancet* 2(8502): 305-9.

Ihle, J., B. Fleckenstein (2003). "Differential peptide binding motif for three juvenile arthritis associated HLA-DQ molecules." *Clin Exp Rheumatol* 21(2): 257-62.

Janeway, C. A., Traver, P. (1997)
Immunologie
2.Aufl., Spektrum, Akademischer Verlag

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.

Javid B. et al., (2004) « Peptides complexed with the protein HSP70 generate efficient human cytolytic T-lymphocyte responses."
Biochem Soc Trans. Aug;32(Pt 4):622-5.

Johansen, B. H., T. Jensen (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): 142-50.

Kabakov et al., (1993). "Protein aggregation as primary and characteristic cell reaction to various stresses."
Experientia. Aug 15;49(8):706-13.

Kappler, J. W., Roehm, N. and Marrack, P. (1987)
"T cell tolerance by clonal elimination in the thymus."
Cell; 49 (2), 273-280.

Kaufmann, S. H. (1990). "Heat shock proteins and the immune response."
Immunol Today 11(4): 129-36.

Kaufmann, S. H. (1990). "Heat-shock proteins: a link between rheumatoid arthritis and infection?" *Curr Opin Rheumatol* 2(3): 430-5.

Kaufmann, S. H. (1991). "Heat-shock proteins and pathogenesis of bacterial infections." *Springer Semin Immunopathol* 13(1): 25-36.

Kaufmann, S. H., B. Schoel (1991). "Heat-shock protein 60: implications for pathogenesis of and protection against bacterial infections." *Immunol Rev* 121: 67-90. resistance.

Keat, A. (1983) "Reiter's syndrome and reactive arthritis in perspective."
N Engl J Med Dec 29;309(26):1606-15

Kol, A., A. H. Lichtman (2000). "Cutting edge: heat shock protein (HSP) 60 activates the innate immune response: CD14 is an essential receptor for HSP60 activation of mononuclear cells." J Immunol 164(1): 13-7.

Life, P., A. Hassell (1993). "Responses to gram negative enteric bacterial antigens by synovial T cells from patients with juvenile chronic arthritis: recognition of heat shock protein HSP60." J Rheumatol 20(8): 1388-96.

Lindquist, S. (1986). "The heat-shock response." Annu Rev Biochem 55: 1151-91.

Lindquist, J.A. et al., (1998). » ER-60, a chaperone with thiol-dependent reductase activity involved in MHC class I assembly." EMBO J Apr 15;17(8):2186-95

Linsley et al., (1990) « Role of the CD28 receptor in T-cell activation." Immunol Today. Jun;11(6):211-6. Review.

Lipsker, D., U. Ziyhan (2002). "Heat shock proteins 70 and 60 share common receptors which are expressed on human monocyte-derived but not epidermal dendritic cells." Eur J Immunol 32(2): 322-32.

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.

MacAry PA et al., (2004) « HSP70 peptide binding mutants separate antigen delivery from dendritic cell stimulation." Immunity. Jan;20(1):95-106.

Madden,D.R. (1995). "The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes." Annu. Rev. Immunol. 13, 587-622.

Maier, J. T., M. Haug (2002). "Possible association of non-binding of HSP70 to HLA-DRB1 peptide sequences and protection from rheumatoid arthritis." Immunogenetics 54(2): 67-73.

Marsh, S. G. (1998)
HLA class II region sequences, 1998.
Tissue Antigens; 51 (4 Pt 2), 467-507.

Marsh SGE, Parham P, Barber LD (2000), The HLA Facts Book, Academic Press

McClellan et al., (2001) "Molecular chaperones and the art of recognizing a lost cause."
Nat Cell Biol. Feb;3(2):E51-3

Mosmann et al., (1991). "Functional diversity of T lymphocytes due to secretion of different cytokine patterns."
FASEB J. Feb;5(2):171-7. Review.

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.

Motojima et al., (2004) "Substrate polypeptide presents a load on the apical domains of the chaperonin GroEL."
Proc Natl Acad Sci U S A. Oct 19;101(42):15005-12.

Multhoff, G. and C. Botzler (1998). "Heat-shock proteins and the immune response." Ann N Y Acad Sci 851: 86-93.

Multhoff, G., C. Botzler (1998). "The role of heat shock proteins in the stimulation of an immune response." Biol Chem 379(3): 295-300.

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.

Mycko MP, et al., (2004) « Inducible heat shock protein 70 promotes myelin autoantigen presentation by the HLA class II."
J Immunol Jan 1;172(1):202-13.

Ohashi, K., V. Burkart (2000). "Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex." J Immunol 164(2): 558-61.

Ortmann, B, et al.. (1997). „A critical role for tapasin in the assembly and function of multimeric MHC class I-TAP complexes." Science Aug 29;277(5330):1306-9

Pamer, E., Cresswell, R. (1998) "Mechanisms of MHC class I--restricted antigen processing." Annu Rev Immunol.;16:323-58.

Panjwani et al., (1999) « The HSC73 molecular chaperone: involvement in MHC class II antigen presentation.”
J Immunol. Aug 15;163(4):1936-42.

Pelkonen, P. M. (1998). “Juvenile arthritis with oligoarticular onset.” *Baillieres Clin Rheumatol* 12(2): 273-86.

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. J. Rheumatol.; 25 (10), 1991-1994.

Pfanner et al., (1993). “Roles of molecular chaperones in protein targeting to mitochondria.”
Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. Mar 29;339(1289):355-61

Pierce, S. K., D. C. DeNagel (1991). “A role for heat shock proteins in antigen processing and presentation.” *Curr Top Microbiol Immunol* 167: 83-92.

Powis, S. J. et al (1996). “The rat cim effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER.”*Immunity* Feb;4(2):159-65.

Prahalad et al., (2000) “Twins concordant for juvenile rheumatoid arthritis.”*Arthritis Rheum* Nov;43(11):2611-2.

Prakken, A. B., W. van Eden (1996). “Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis.” *Arthritis Rheum* 39(11): 1826-32

Prakken, B., W. Kuis (2002). “Heat shock proteins in juvenile idiopathic arthritis: keys for understanding remitting arthritis and candidate antigens for immune therapy.” *Curr Rheumatol Rep* 4(6): 466-73.

Prakken, B. J., S. Roord (2003). “Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: a model for T cell regulation in human arthritis.” *Springer Semin Immunopathol* 25(1): 47-63.

Ramage, J. M. and J. S. Gaston (1999). “Depressed proliferative responses by peripheral blood mononuclear cells from early arthritis patients to mycobacterial heat shock protein 60.” *Rheumatology (Oxford)* 38(7): 631-5.

Ramage, J. M., J. L. Young (1999). “T cell responses to heat-shock protein 60: differential responses by CD4+ T cell subsets according to their expression of CD45 isotypes.” *J Immunol* 162(2): 704-10.

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.

Ranson, et al.,(1995) "Binding, encapsulation and ejection: substrate dynamics during a chaperonin-assisted folding reaction". *J. Mol. Biol.* 266: 656-664,

Res, P., J. Thole (1991). "Heat-shock proteins and autoimmunity in humans." *Springer Semin Immunopathol* 13(1): 81-98.

Res, P. C., C. G. Schaar (1988). "Synovial fluid T cell reactivity against 65 kD heat shock protein of mycobacteria in early chronic arthritis." *Lancet* 2(8609): 478-80.

Res, P. C., J. E. Thole (1991). "Heat shock proteins in immunopathology." *Curr Opin Immunol* 3(6): 924-9.

Richarme, G. and M. Kohiyama (1993). "Specificity of the Escherichia coli chaperone DnaK (70-kDa heat shock protein) for hydrophobic amino acids." *J Biol Chem* 268(32): 24074-7.

Ritossa F (1962) "A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in Drosophila." *Experientia* 18:571-3

Robert, J., A. Menoret (2001). "Immunological properties of heat shock proteins are phylogenetically conserved." *Adv Exp Med Biol* 484: 237-49.

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.

Rock, K.L., Goldberg, A.L., "Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides".
Annu Rev Immunol. 1999;17:739-79. Review

Rudiger S. et al., (1997). "Interaction of Hsp70 chaperones with substrates" *Nat Struct Biol.* May;4(5):342-9. Review.

Savolainen et al., (2000) "Magnitude of the genetic component in juvenile idiopathic arthritis." *Ann Rheum Dis.* Dec;59(12):1001

Schild, H., D. Arnold-Schild (1999). "Stress proteins and immunity mediated by cytotoxic T lymphocytes." *Curr Opin Immunol* 11(1): 109-13.

Schild H., Rammensee, H.G. (2000). "Perfect use of imperfection." *Nature* Apr 13;404(6779):709-10

Scholz, S. and E. D. Albert (1993). "Immunogenetic aspects of juvenile chronic arthritis." *Clin Exp Rheumatol* 11 Suppl 9: S37-41

Shtilerman et al., (1999) "Chaperonin function: folding by forced unfolding." *Science.* Apr 30;284(5415):822-5.

Sigeler et al., (1998)" Structure and function in GroEL-mediated protein folding." *Annu Rev Biochem.*;67:581-608. Review.

Sidney, J., M. F. del Guercio (2002). "The HLA molecules DQA1*0501/B1*0201 and DQA1*0301/B1*0302 share an extensive overlap in peptide binding specificity." *J Immunol* 169(9): 5098-108.

Singh-Jasuja H., Hilf N., Arnold-Schild D, Schild H (2001) The role of heat shock proteins and their receptors in the activation of the immune system. *Biol. Chem.* 382:629-36

Singh-Jasuja H., Scherer HU, Hilf N., Arnold-Schild D, Rammensee HG, Toes RE, Schild H (2000a) The heat shock protein gp96 induces maturation of dendritic cells and down-regulation of its receptor. *Eur. J. Immunol.* 30:2211-5

Singh-Jasuja H., Toes RE, Spee P, Munz C, Hilf N., Schoenberger SP, Ricciardi-Castagnoli P, Neefjes J, Arnold-Schild D, Rammensee HG, , Schild H (2000b) Cross-presentation of glycoprotein 96-associated antigens on major histocompatibility complex class I molecules requires receptor-mediated endocytosis. *J.Exp.Med.* 191:1965-74

Sinha, A. A., Lopez, M. T. and McDevitt, H. O. (1990) "Autoimmune diseases: the failure of self tolerance." *Science*; 248 (4961), 1380-1388.

Smerdel, A., R. Ploski (2002). "Juvenile idiopathic arthritis (JIA) is primarily associated with HLA-DR8 but not DQ4 on the DR8-DQ4 haplotype." *Ann Rheum Dis* 61(4): 354-7

Smith et al., (2001) „Comparison of dissociation-enhanced lanthanide fluorescent immunoassays to enzyme-linked immunosorbent assays for

detection of staphylococcal enterotoxin B, Yersinia pestis-specific F1 antigen, and Venezuelan equine encephalitis virus." Clin Diagn Lab Immunol. Nov;8(6):1070-5.

Soltys, B. J. and R. S. Gupta (1996). "Immunoelectron microscopic localization of the 60-kDa heat shock chaperonin protein (Hsp60) in mammalian cells." Exp Cell Res 222(1): 16-27.

Srivastava, P. (1998). "Heat shock proteins come of age: primitive functions acquire new roles in an adaptive world." Immunity Jun;8(6):657-65

Srivastava, P. (2002). "Interaction of heat shock proteins with peptides and antigen presenting cells: chaperoning of the innate and adaptive immune responses." Annu Rev Immunol 20: 395-425.

Srivastava, P. (2002). "Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity." Nature Rev Immunol 2(3): 185-94.

Thomson, W., J. H. Barrett (2002). "Juvenile idiopathic arthritis classified by the ILAR criteria: HLA associations in UK patients." Rheumatology (Oxford) 41(10): 1183-9.

Thomson, W. and R. Donn (2002). "Juvenile idiopathic arthritis genetics - what's new? What's next?" Arthritis Res 4(5): 302-6.

Thomson et al., (1988) "HLA disease associations: models for insulin dependent diabetes mellitus and the study of complex human genetic disorders." Annu Rev Genet.;22:31-50.

Tobian AAR, et al., (2004) "Bacterial heat shock proteins enhance class II MHC antigen processing and presentation of chaperoned peptides to CD4+ T cells." J Immunol. Oct 15;173(8):5130-7.

Tompkins, S. M., P. A. Rota (1993). "A europium fluoroimmunoassay for measuring binding of antigen to class II MHC glycoproteins." J Immunol Methods 163(2): 209-16.

Trowsdale J, Ragoussis J, Campbell RD. (1991). "Map of the human MHC." Immunol Today. Dec;12(12):443-6.

Udono et al., (1993) "Heat shock protein 70-associated peptides elicit specific cancer immunity." J Exp Med. Oct 1;178(4):1391-6.

van Eden, W. (1988). "Cloning of the mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis." *Nature*. Jan 14;331(6152):171-3.

van Eden, W. (1991). "Heat-shock proteins as immunogenic bacterial antigens with the potential to induce and regulate autoimmune arthritis." *Immunol Rev* 121: 5-28.

van Eden, W. (1991). "Heat-shock proteins: antigens critical to immune responses in health and disease." *Neth J Med* 38(1-2): 45-50.

van Eden, W., E. J. Hogervorst (1991). "Heat-shock proteins as antigens in autoimmunity." *Biochem Soc Trans* 19(1): 171-5.

van Eden, W., S. M. Anderton (1996). "(Altered) self peptides and the regulation of self reactivity in the peripheral T cell pool." *Immunol Rev* 149: 55-73.

van Eden, W., R. van der Zee (1998). "Do heat shock proteins control the balance of T-cell regulation in inflammatory diseases?" *Immunol Today* 19(7): 303-7.

van Eden, W., R. van der Zee (1998). "Heat-shock protein T-cell epitopes trigger a spreading regulatory control in a diversified arthritogenic T-cell response." *Immunol Rev* 164: 169-74.

van Eden, W., U. Wendling (2000). "Arthritis protective regulatory potential of self-heat shock protein cross-reactive T cells." *Cell Stress Chaperones* 5(5): 452-7.

Van Roon et al., (1997) "Stimulation of suppressive T cell responses by human but not bacterial 60-kD heat-shock protein in synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis." *J Clin Invest*. Jul 15;100(2):459-63.

Velazquez et al., 1983. "Is the major *Drosophila* heat shock protein present in cells that have not been heat shocked?" *J Cell Biol*. Jan;96(1):286-90.

Welch et al., (1992). "Heat shock gene regulation by nascent polypeptides and denatured proteins: hsp70 as a potential autoregulatory factor." *J Cell Biol*. Jun;117(6):1151-9.

Wells AD, Malkovsky M (2000) "Heat shock proteins, tumor immunogenicity and antigen presentation: an integrated view." *Immunol. Today* 21:129-32

Wendling, U., L. Paul (2000). "A conserved mycobacterial heat shock protein (hsp) 70 sequence prevents adjuvant arthritis upon nasal administration and induces IL-10-producing T cells that cross-react with the mammalian self-hsp70 homologue." *J Immunol* 164(5): 2711-7.

Williams, D. B. and T. H. Watts (1995). "Molecular chaperones in antigen presentation." *Curr Opin Immunol* 7(1): 77-84.

Young, D. B. (1992). "Heat-shock proteins: immunity and autoimmunity." *Curr Opin Immunol* 4(4): 396-400.

Zanelli, E., F. C. Breedveld (2000). "HLA association with autoimmune disease: a failure to protect?" *Rheumatology (Oxford)* 39(10): 1060-6.

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.

Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Professor Dr. Günther Dannecker danke ich ganz herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, seine zahlreichen Anregungen und weiterführenden Diskussionen.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Markus Haug, der mir bei der praktischen Durchführung der Arbeit vor allem in den Anfängen zur Seite stand, für die engagierte und motivierende Betreuung sowie für seine hilfsbereite und konstruktive Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Herrn Dr. Hubert Kalbacher und seiner Arbeitsgruppe danke ich für die Bereitstellung der verwendeten Peptide.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und Hilfestellungen, die das Arbeitsklima so angenehm gemacht haben.

Für die großartige Unterstützung und die Durchsicht des Manuskripts danke ich meinem Ehemann.

Ein besonderer, lieber Dank an meine Eltern, ohne deren unermüdliche moralische Unterstützung ich nie so weit gekommen wäre.

Lebenslauf

Claudia-Nicoleta Hesse, geb. Brehaitia

26.04.1979	geboren in Bistrita, Rumänien
1985 – 1989	Grundschule Bistrita, Rumänien
1989 – 1993	Gymnasium Bistrita, Rumänien
1993 - 1997	Liviu-Rebreanu-Lyceum, Bistrita, Rumänien
06/1997	Abitur
10/1997 - 09/2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Iuliu-Hatieganu-Universität Klausenburg, Rumänien
ab 10/2000	Fortsetzung des Studiums an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
03/2001	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Tübingen
03/2003	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Tübingen
04/ - 09/2003	Experimentelle Arbeit zur Dissertation an der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin, Tübingen Thema: Untersuchungen zur differentiellen Bindung von HLA-DQ-Peptidfragmenten an Hitzeschockproteine im Hinblick auf eine mögliche Bedeutung in der Pathogenese der juvenilen idiopathischen Arthritis
10/2003 –10/2004	Praktisches Jahr: Kreiskrankenhaus Böblingen
08/2004 –09/2004	Toronto Western Hospital (Innere Medizin)
18/11/2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Böblingen
01/2005-07/2006	Assistenzärztin, Abteilung Innere Medizin II Trier
seit 08/2006	Assistenzärztin, Abteilung Innere Medizin, Kreiskrankenhaus Böblingen