

## 7. *Zusammenfassung*

Die RA ist eine schwere Autoimmunerkrankung charakterisiert durch eine chronische Entzündung der Gelenke. Die Assoziation der Erkrankung mit DRB1\*0401- und DRB1\*0404-Molekülen und der Nachweis von aktivierten, in manchen Untersuchungen sogar oligoklonalen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Synovialflüssigkeit und im Gewebe der betroffenen Gelenke deuten auf eine Beteiligung von CD4<sup>+</sup>, MHC-Klasse-II-restringierten T-Zellen hin. Allerdings ist kein Antigen bekannt, welches diese T-Zellen stimuliert und zu deren Expansion geführt haben könnte.

Eine Möglichkeit, das oder die beteiligte(n) Antigen(e) zu finden, ist, synoviale T-Zell-Klone aus RA-Patienten systematisch auf ihre Spezifität zu untersuchen. Um ein solches Vorhaben in die Tat umzusetzen, benötigt man eine ständig in größeren Mengen verfügbare und gut charakterisierte antigenpräsentierende Zelle (APZ). Periphere Lymphozyten des Blutes (PBMC) mit den entsprechenden Klasse-II-Produkten für die Antigenpräsentation zu verwenden ist schwierig, da deren Verfügbarkeit sehr begrenzt ist. Daher war eine Zielsetzung dieser Arbeit das Etablieren einer in dieser Weise einsetzbaren APZ. Diese APZ sollte dabei einer *in vivo* vorkommenden APZ möglichst ähnlich sein. Zu diesem Zweck wurde P388D1 -eine murine makrophagen-ähnliche Zelllinie - mit Genen von HLA-DR-Molekülen transfiziert, die bei RA-Patienten gehäuft auftreten.

Die Transfektionen erfolgten mittels Elektroporation. FACS- und Northern-Blot-Analysen dienten dem Nachweis der Expression der HLA-DR-Produkte. Zur funktionellen Charakterisierung der transfizierten P388D1 wurden antigen-, allo- und autoreaktive T-Zellen herangezogen. Es konnte gezeigt werden, daß die transfizierten P388D1 Antigene im Kontext mit den exprimierten HLA-DR-Molekülen präsentieren und T-Zellen spezifisch zur IL-3/GM-CSF-Produktion stimulieren. Mittels dieser Transfektanten wurden die restringierenden Elemente verschiedener getesteter T-Zellen eindeutig identifiziert.

Eine Selektion spezifischer T-Zellen aus einer T-Zell-Population scheint jedoch nicht

möglich zu sein, da humane T-Zellen, die mit Transfektanten stimuliert wurden, keine IL-2-Rezeptor-Expression und IL-2-Produktion aufweisen.

Im Verlauf der funktionellen Charakterisierung fanden sich Hinweise auf zelltypspezifisches Prozessieren und Präsentieren von endogenen und exogenen Proteinen. Für die Untersuchung der Spezifitäten von T-Zellen folgt daraus, daß es von großer Bedeutung sein kann, welche APZ zu ihrer Stimulation eingesetzt werden. Die Vorstellung, daß ein endogenes Peptid im Kontext mit dem autologen HLA-DR-Molekül bei der Aktivierung autoreaktiver T-Zellen beteiligt ist, wurde bekräftigt. Mit Hilfe der transfizierten P388D1 wird es möglich sein, diese Peptide zu isolieren und näher zu charakterisieren.

Eine weitere Zielsetzung dieser Arbeit war die Frage nach der molekularen Grundlage einer Assoziation der RA mit bestimmten HLA-DR4-Subtypen. Dazu wurde eine *in vitro* site-directed-mutagenesis mit Hilfe der PCR etabliert und die mit der RA assoziierten HLA-DR-Produkte gezielt an einzelnen Aminosäurepositionen verändert.

Nach den durchgeführten Untersuchungen scheint die funktionelle Bedeutung von einzelnen Aminosäurepositionen für die Antigenpräsentation abhängig zu sein vom eingesetzten Antigen, den antigenspezifischen T-Zellen, den APZ und wahrscheinlich weiteren Faktoren wie Adhäsionsmolekülen und Interleukinen. Diese Ergebnisse untermauern die Vorstellung, daß die mit bestimmten Erkrankungen assoziierten HLA-Produkte wahrscheinlich nur ein Baustein für die Pathogenese einer Erkrankung darstellen.

Die herausragende Bedeutung der Aminosäureposition 86 des HLA-DR-Moleküls für die Antigenpräsentation konnte bestätigt werden.

## 8. *Summary*

RA is a severe autoimmune disease characterized by long-term inflammation of multiple joints. The association of the disease with DRB1\*0401 and DRB1\*0404 MHC class II genes and the observation of activated, in some investigations oligoclonal, CD4<sup>+</sup> T cells in the synovial fluid and tissue of affected joints suggest the involvement of CD4<sup>+</sup>, class II restricted T cells in the disease. The antigen recognized by these T cells is unknown. A possibility to find this antigen is to test cloned T cells from the synovial fluid and synovia of RA patients for their specificities. In the human system it is difficult to get enough PBMC expressing the same HLA-DR-molecules as T cells from RA-patients. Therefore one aim of this work was to establish a continuously available and well characterized APC. The newly established APC should be similar to an *in vivo* existing APC.

P388D1, a murine macrophage-like cell line was transfected with genes coding for the same HLA-DR-molecules as expressed by most RA-patients. The transfections were performed by electroporation. The expression of the transfected molecules was detected by FACS- and Northern-blot-analysis.

Antigen-, allo-, and autoreactive T cells were used to characterize the functional properties of the transfected P388D1. It could be shown that the transfected P388D1 present different antigens in the context of the newly expressed HLA-DR-molecules and activate T cells to a specific IL-3/GM-CSF production. However, the transfected P388D1 were not able to induce IL-2 production or expression of the IL-2 receptor on activated T cells. Therefore, selection of antigen-specific T cells from a T cell populations using transfected P388D1 as APC is not possible.

Several lines of evidence suggest that there is cell-type specific processing and presentation of endogenous and exogenous proteins. Therefore, it could be important which APC is used for stimulation of T cells.

Activation of certain autoreactive T cell clones with the transfectants confirmed that an endogenous peptide is recognized in context with the autologous HLA-DR-molecule. Using the transfected P388D1 it will be possible to isolate, characterize and sequence these peptides.

The second aim of this work was the investigation of the molecular basis of the association of RA with subtypes of HLA-DR4. HLA-DR-molecules associated with RA were changed at distinct amino acid positions by *in vitro* site-directed-mutagenesis. A method was developed for using PCR for *in vitro* site-directed-mutagenesis.

It was clearly shown, that the importance of single amino acid positions of the HLA-DR-molecule for antigen presentation is dependent on the antigen used, the antigen specific T cells and probably further factors like adhesion molecules and interleukins. These results support the view that the association between a disease and an HLA-product is only one factor in the pathogenesis of this disease.

The importance of amino acid position 86 of the HLA-DR-molecule for antigen presentation was confirmed.