

PCT WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
 Internationales Büro
 INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
 INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ : C12N 15/57, A61K 38/48, 39/02, 39/095, 35/14, 39/40, G01N 33/53, C12N 9/52, C07K 14/47, 14/005, C12N 5/08, A61K 47/48	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 96/09395 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 28. März 1996 (28.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03726 (22) Internationales Anmeldedatum: 21. September 1995 (21.09.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 33 708.6 21. September 1994 (21.09.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; D-Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MEYER, Thomas, Franz, Ferdinand [DE/DE]; Spemannstrasse 30, D-72076 Tübingen (DE). POHLNER, Johannes [DE/DE]; Willersweg 12, D-22515 Hamburg (DE). BECK, Susanne, Christine [DE/DE]; Charlottenstrasse 32, D-72070 Tübingen (DE). JOSE, Joachim [DE/DE]; Hartmeyerstrasse 48, D-72076 Tübingen (DE). WÖLK, Uwe [DE/DE]; Waldstrasse 6/1, D-72072 Tübingen (DE). LORENZEN, Dirk, R. [DE/DE]; Schwenninger Strasse 67, D-71069 Sindelfingen (DE). OETZELBERGER, Karin, Brigitte [DE/DE]; Planie 19, D-72764 Retlingen (DE).	(74) Anwalt: VOSSIUS & PARTNER; Postfach 86 07 67, D-81634 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: DRUG FOR THE PREVENTION AND TREATMENT OF AUTO-IMMUNE AND VIRAL DISEASES, AND DIAGNOSTIC AGENTS FOR DETECTING SAID DISEASES (54) Bezeichnung: ARZNEIMITTEL ZUR PROPHYLAXE UND BEHANDLUNG VON UND DIAGNOSTIKA ZUR ERKENNUNG VON AUTOIMMUNKRANKHEITEN UND VIRALEN ERKRANKUNGEN (57) Abstract The present invention concerne drugs and diagnostic agents as well as diagnostic, therapeutic and preventive methods for treating auto-immune and viral diseases in humans, these diseases being caused by pathogenic bacteria which are, in particular, micro-organisms colonizing human mucus membranes and secreting given exoproteins which display structural similarities to human proteins. Proteins similar to IgA protease which are absorbed particularly well by cells and present as antigens on MHC molecules are of particular significance in this respect. The IgA protease polypeptide (IPP) of pathogenic <i>Neisseriae</i> has a particularly marked homology to human proteins. For example, a given IPP peptide has marked homology to the articular proteins link and aggrecan. It is thus proven, for example, that the IPP is an etiological agent of rheumatoid arthritis (RA). The auto-immune reaction is further encouraged by other properties of the IPP-producing <i>Neisseriae</i> and IPPs. A particularly important property is the ability of the IPP to activate viruses and viral elements. This concerns in particular the activation of proviral retroviruses and endogenic retroviruses in humans. Further auto-immune reactions are induced in humans owing to the activation of viruses and viral elements. The development of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) is also explained by the IPP-dependent activation of the HIV provirus. The properties according to the invention of the pathogenic <i>Neisseriae</i> and the IPPs formed thereby give rise to numerous novel diagnostic, therapeutic and preventive processes.		

(57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung betrifft Arzneimittel und Diagnostika sowie diagnostische, therapeutische und vorbeugende Verfahren zur Behandlung von Autoimmun- und Viruskrankheiten des Menschen, die durch pathogene Bakterien hervorgerufen werden. Diese Bakterien sind insbesondere Mikroorganismen, die die Schleimhäute des Menschen kolonisieren und bestimmte Exoproteine sezernieren, die strukturelle Verwandtschaften zu menschlichen Proteinen aufweisen. Besondere Bedeutung kommt dabei den IgA-Protease-ähnlichen Proteinen zu, die besonders gut von Zellen aufgenommen werden und als Antigene auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Besonders ausgeprägte Homologie zu menschlichen Proteinen besitzt das Polyprotein der IgA-Protease (IPP) von pathogenen Neisserien. Beispielsweise besitzt ein bestimmtes Peptid des IPP ausgeprägte Homologie zu den Gelenkproteinen Link und Aggrecan. So wird z.B. der Nachweis geführt, daß das IPP ein ätiologisches Agens der rheumatoiden Arthritis (RA) ist. Die Autoimmunreaktion wird ferner durch andere Eigenschaften der IPP-produzierenden Neisserien und der IPPs begünstigt. Eine besonders wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit des IPP, Viren und virale Elemente zu aktivieren. Dies betrifft insbesondere die Aktivierung von proviralen Retroviren und endogenen Retroviren des Menschen. Aufgrund der Aktivierung von Viren und viralen Elementen werden weitere Autoimmunreaktionen des Menschen induziert. Durch die IPP-abhängige Aktivierung des HIV-Provirus wird darüber hinaus auch die Entwicklung des acquired immune deficiency syndrome (AIDS) erklärt. Aus den erfindungsgemäßen Eigenschaften der pathogenen Neisserien und der von ihnen gebildeten IPPs leiten sich zahlreiche neue diagnostische, therapeutische und vorbeugende Verfahren ab.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

**Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung von und
Diagnostika zur Erkennung von Autoimmunkrankheiten und
viralen Erkrankungen**

Die vorliegende Erfindung betrifft Arzneimittel und Diagnostika sowie diagnostische, therapeutische und vorbeugende Verfahren zur Behandlung von Autoimmun- und Viruskrankheiten des Menschen, die durch pathogene Bakterien hervorgerufen werden. Diese Bakterien sind insbesondere Mikroorganismen, die die Schleimhäute des Menschen kolonisieren und bestimmte Exoproteine sezernieren, die strukturelle Verwandtschaften zu menschlichen Proteinen aufweisen. Besondere Bedeutung kommt dabei den IgA-Protease-ähnlichen Proteinen zu, die besonders gut von Zellen aufgenommen werden und als Antigene auf MHC-Molekülen präsentiert werden. Besonders ausgeprägte Homologie zu menschlichen Proteinen besitzt das Polyprotein der IgA-Protease (IPP) von pathogenen Neisserien. Beispielsweise besitzt ein bestimmtes Peptid des IPP ausgeprägte Ho-

1 mologie zu den Gelenkproteinen Link und Aggrekan. So wird
z.B. der Nachweis geführt, daß das IPP ein ätiologisches
Agens der rheumatoiden Arthritis (RA) ist. Die Autoimmunre-
aktion wird ferner durch andere Eigenschaften der IPP-produ-
5 zierenden Neisserien und der IPPs begünstigt. Eine besonders
wichtige Eigenschaft ist die Fähigkeit des IPP Viren und vi-
rale Elemente zu aktivieren. Dies betrifft insbesondere die
Aktivierung von proviralen Retroviren und endogenen Retrovi-
ren des Menschen. Aufgrund der Aktivierung von Viren und vi-
10 ralen Elementen werden weitere Autoimmunreaktionen des Men-
schen induziert. Durch die IPP-abhängige Aktivierung des
HIV-Provirus wird darüber hinaus auch die Entwicklung des
acquired immune deficiency syndrome (AIDS) erklärt.
Aus den erfindungsgemäßen Eigenschaften der pathogenen Neis-
15 serien und der von ihnen gebildeten IPPs leiten sich zahl-
reiche neue diagnostische, therapeutische und vorbeugende
Verfahren ab.

Die Ätiologie von Autoimmunkrankheiten des Menschen ist in
vielen Fällen ungeklärt. Es gibt Vermutungen, daß neben be-
20 stimmten individuellen genetischen Prädispositionen auch in-
fektiose Mikroorganismen eine Rolle bei der Entwicklung von
Autoimmunkrankheiten spielen. Wichtige Beispiele für Autoim-
munkrankheiten sind die multiple Sklerose (MS), der insu-
linabhängige Diabetes Mellitus (IDDM), die rheumatoide
25 Arthritis (RA) und möglicherweise auch die Arteriosklerose
(Ask). Neueren Schätzungen zufolge liegt der Anteil der von
Autoimmunkrankheiten betroffenen erwachsenen Bevölkerung bei
etwa 5% bis 15%; die mit den Auswirkungen und der Therapie
einhergehenden wirtschaftlichen und sozialen Belastungen
30 sind dementsprechend bedeutsam.

Eine zentrale Funktion des Immunsystems ist es, von
außen kommende infektiöse Mikroorganismen abzuwehren und
aberrante Zellen des eigenen Körpers zu eliminieren. Zur Er-
füllung dieser Aufgabe ist die Fähigkeit des Immunsystems
35 essentiell, eigene Strukturen (Selbst) von fremden Struktu-
ren (Fremd) zu unterscheiden. Die molekulare Grundlage für

1 die Unterscheidung zwischen Selbst und Fremd stellt die
Wechselwirkung von hochvariablen Rezeptormolekülen auf der
Oberfläche von B-Zellen und von T-Zellen dar. B-Zellen bil-
den Antikörper auf ihrer Oberfläche, die mit nativen Antige-
5 nen reagieren, und T-Zellen bilden T-Zellrezeptoren, die
Peptide erkennen, die auf MHC-Molekülen präsentiert werden.
Von den T-Zellen gibt es mehrere Gruppen: $CD8^+$ T-Zellen rea-
gieren mit Peptiden, die auf Klasse I MHC-Molekülen präsenti-
10 tiert werden, und $CD4^+$ T-Zellen reagieren mit Peptiden, die
auf Klasse II MHC-Molekülen präsentiert werden. Ferner las-
sen sich $CD4^+$ Zellen in TH1 und TH2 Untergruppen untertei-
len, die sich in ihrem Cytokin-Muster unterscheiden und ent-
weder entzündungsfördernd (TH1) bzw. entzündungshemmend
(TH2) sind.

15 Die Aktivierung bzw. Inaktivierung von B- und T-Zellen
setzt meist eine Interaktion zwischen mindestens zwei ver-
schiedenen Zelltypen voraus. So benötigen B-Zellen für ihre
Aktivierung die Hilfe von $CD4^+$ T-Zellen. T-Zellen wiederum
benötigen für ihre Aktivierung entsprechende MHC-bildende
20 antigenpräsentierende Zellen (APC). Während MHC Klasse I von
fast allen Körperzellen gebildet wird, wird MHC Klasse II
insbesondere von Makrophagen, dendritischen Zellen, B-Zellen
und unter bestimmten Umständen auch von T-Zellen, Epithel-
zellen und Fibroblasten gebildet.

25 Der Unterscheidungsprozeß zwischen Selbst und Fremd
findet vermutlich auf mehreren Ebenen statt. So werden B-
Zellen, die gegen Selbst gerichtete Antikörpermoleküle auf
ihrer Oberfläche tragen, in einer frühen Entwicklungsphase
eliminiert. Einen ähnlichen Selektionsprozeß durchlaufen T-
30 Zellen bei ihrer Entwicklung im Thymus, wobei Selbst-reak-
tive T-Zellen eliminiert oder unterdrückt werden. Für die
weitere Differenzierung und Verbreitung im Organismus ver-
bleiben dann vorwiegend solche T-Lymphozyten, die fremde
Strukturen erkennen. Darüber hinaus besitzt das Immunsystem
35 Mechanismen, Toleranz gegenüber bestimmten Antigenen zu ent-
wickeln, obgleich diesbezüglich kein Selbst-Fremd-Abgleich
im Thymus stattgefunden hat. So kann Toleranz z.B. durch se-

1 lektive Eliminierung bzw. Anergetisierung von Lymphozyten
erzeugt werden. Bei diesen letzteren Unterscheidungsprozes-
sen spielen offensichtlich T-Zell-Untergruppen eine ent-
scheidende Rolle, die unterschiedliche (z.B. aktivierende
5 oder hemmende) Cytokine bilden. Die Bildung unterschiedli-
cher T-Zell-Untergruppen hängt wiederum in entscheidendem
Maße von der Art und Weise der Antigenpräsentation ab, bei-
spielsweise hinsichtlich des Körperorgans, in dem sie statt-
findet, und des Typs der antigenpräsentierenden Zelle. Dar-
über hinaus bilden B- und T-Zellen ein immunologisches Netz-
10 werk, das dazu dient, ein ausgewogenes Gleichgewicht zw-
ischen Selbst-Toleranz und Fremd-Reaktivität zu erhalten.

Ungeachtet dieser Regelmechanismen kommt es bei Autoim-
munkrankheiten zu Störungen, die das Immunsystem gegen
15 Selbst ausrichten. Dies kann z. B. dann geschehen, wenn zw-
ischen einer Fremdstruktur, mit der das Immunsystem konfron-
tiert wird und körpereigenen Strukturen nur geringfügige Un-
terschiede bestehen. In diesem Grenzbereich, in dem sich
aufgrund struktureller Merkmale die Bereiche Selbst und
20 Fremd überschneiden, kann es zur Auslösung einer Immunant-
wort kommen. Es kommt dabei zur Vermehrung von T-Lymphozy-
ten, die nicht nur die Fremdstruktur sondern auch die struk-
turell ähnliche körpereigene Struktur erkennen. Während un-
ter normalen Umständen nach Eliminierung der Fremdstruktur
die Immunreaktion erlischt, bleibt sie unter diesen Umstän-
25 den erhalten, ständig genährt durch die Präsentation des
körpereigenen Antigens.

Strukturelle Homologien zwischen mikrobiellen Proteinen
und Proteinen des Wirtsorganismus sind vermutlich nur in
30 Ausnahmefällen zufällige Ereignisse. Einerseits können
Strukturhomologien als Überreste eines gemeinsamen Protein-
Vorfahren auftreten, wobei konservierte und damit homologe
Aminosäuresequenzen essentielle Funktionen erfüllen. Ande-
rerseits ist die strukturelle Anpassung mikrobieller Anti-
gene an Biomoleküle des Wirts ein häufiges Phänomen, das mit
35 der Ko-Evolution von Mikroorganismen mit dem Immunsystem des
Menschen erklärt werden kann. Durch solch ein "Molekulares

1 Mimikry" können sich Mikroorganismen vermutlich vor dem Im-
munsystem schützen, indem mikrobielle Strukturen fälschli-
cherweise als Selbst erkannt werden. Kommt es dennoch zu
einer Immunreaktion, kann dies aufgrund einer sich ent-
wickelnden Kreuzreaktion zur Zerstörung körpereigenen Gewe-
5 bes führen.

Für derartige Autoimmunreaktionen gibt es bereits
einige Beispiele. So bilden Streptokokken, ein extrazellulär
sekretiertes M-Protein, das Homologien zu menschlichem Herz-
10 muskelprotein aufweist. Streptokokkeninfektionen können des-
halb indirekt durch Auslösung einer Autoimmunreaktion zur
Schädigung des Herzens führen. Die durch Trypanosomen her-
vorgeführte Chagas-Krankheit führt ebenfalls zu einer
Autoimmunerkrankung. Diese und weitere Beispiele sind u.a.
15 in de Vries, Cohen und van Rood (Hrsg.), The role of
microorganisms in non-infectious disease, Springer 1990, be-
schrieben.

Ein im Tiermodell gut dokumentiertes Beispiel einer
Autoimmunerkrankung, die durch ein kreuzreaktives bakteriel-
les Antigen ausgelöst wird, ist die Adjuvansarthritis der
20 Ratte. Die entscheidende Funktion spezifischer T-Zellen bei
der Pathogenese konnte durch den Kotransfer der Arthritis
mit einem T-Zellklon auf gesunde Tiere demonstriert werden.
Der betreffende T-Zellklon zeigt Spezifität für ein Peptid
25 aus dem 65 kDa Hitzeschockprotein (Hsp60) von Mykobakterien
und erkennt gleichermaßen ein Peptid aus dem Linkprotein von
Ratten. Interessanterweise ist das Linkprotein ein wesentli-
cher Proteoglykan-Bestandteil des Knorpelgewebes, einem Bin-
degewebe, das bei der Arthritis besonderen Schaden nimmt.

30 Entzündlich-rheumatische Erkrankungen treten in einer
Vielzahl verschiedener Krankheitsbilder wie z. B.
Rheumatoide Arthritis, Felty-Syndrom, Psoriatic Arthritis
und Juvenile Arthritis (Williams in: Encyclopedia of
Immunology, Hrg. Roitt und Delves, 1992, pp. 1339-1343) in
35 Erscheinung. Als potentielle Antigene für die Auslösung
einer arthritogenen T-Zellantwort werden eine Reihe viraler
und bakterieller Proteine in Betracht gezogen. Im Zusammen-

1 hang mit bakteriellen Infektionen, die u.a. durch Yersinien,
Neisserien und Borrelien verursacht werden, treten häufig
"reaktive Arthritiden" auf. Eine wichtige Rolle spielt hier
möglicherweise das Hitzeschockprotein Hsp60, das sowohl
5 unter den Bakterien als auch zwischen Bakterien und dem Men-
schen stark konserviert ist und dadurch autoreaktive Pro-
zesse unterhalten kann.

Neben den mikrobiellen Auslösern spielt die individu-
elle genetische Prädisposition eine Rolle bei der Entwick-
10 lung von Autoimmunkrankheiten. Ein besonders deutlicher Zu-
sammenhang besteht zwischen dem individuellen MHC-Haplotyp,
d.h. der Bildung bestimmter MHC-Moleküle, und dem Auftreten
bestimmter Autoimmunkrankheiten. Eine Übersicht über Asso-
ziationen zwischen MHC-Haplotyp und Autoimmunkrankheiten ist
15 beispielsweise in Jacob, McDevitt and Talal (Ed.), (1991)
Molecular Autoimmunity, Academic Press Inc., San Diego und
in Wordsworth et al., (1992) zu finden. Demnach sind rheuma-
toide Arthritis (RA) und verwandte Autoimmunkrankheiten be-
sonders häufig mit den Haplotypen DR1, DR4Dw4, DR4Dw14 und
20 DR4Dw15 assoziiert.

Autoimmunkrankheiten können auf unterschiedlichen
Effektor-Mechanismen beruhen, die letztlich auf spezifische
Wechselwirkungen zwischen Antigen-Peptiden und MHC zurückzu-
führen sind. Hierzu zählen gegen Selbst gerichtete Antikör-
25 per, gegen Selbst gerichtete $CD4^+$ bzw. $CD8^+$ T-Zellen und ein
entzündungsförderndes Zytokinspektrum. Den T-Zellen kommt
dabei eine Schlüsselrolle zu, da sie bei der Aktivierung
vieler wichtiger Effektor-Mechanismen beteiligt sind. Ent-
sprechend wichtig ist die Wechselwirkung von Peptidantigen
30 mit MHC Klasse II-Molekülen, denn die Komplexbildung zwi-
schen Antigen und MHC Klasse II-Molekül stellt die Voraus-
setzung für die Stimulation von $CD4^+$ T-Zellen einer bestimm-
ten Untergruppe dar. Bei der trimolekularen Wechselwirkung
zwischen MHC Klasse II, Peptidantigen und T-Zellrezeptor
werden daher die Weichen für die Entstehung und den Verlauf
35 einer Autoimmunerkrankung gestellt.

1 Die MHC-Moleküle bilden eine polymorphe Proteinfamilie
und jedes Individuum besitzt ein spezifisches Spektrum von
unterschiedlichen MHC-Molekülen. Hinsichtlich der Antigen-
bindungseigenschaften unterschiedlicher MHC-Moleküle können
5 große Unterschiede bestehen. Über strukturelle Merkmale von
Peptiden, die für die Bindung an MHC-Moleküle von Bedeutung
sind, liegen umfassende wenn auch noch unvollständige Infor-
mationen vor (Rötzschke and Falk, 1994). Da die MHC-Moleküle
das Spektrum an präsentationsfähigen Peptidantigenen defi-
10 nieren, liegt hierin die Ursache für die genetische Prädis-
position einzelner Individuen für bestimmte Autoimmunkrank-
heiten. Denn Voraussetzung für eine spezifische T-Zellreak-
tion ist die Präsentation eines Peptidantigens durch ein
MHC-Molekül.

15 Allgemein wird davon ausgegangen, daß MHC-gebundene
Peptide in einer vom MHC-Molekül gebildeten Grube in einer
bestimmten Orientierung in bezug auf die N- und C-Termini
der Peptide liegen. Die Bindungsgrube der Klasse II MHC-Mo-
leküle ermöglicht, daß die Peptide an einem oder beiden
20 Enden aus der Grube herausragen. Es wird angenommen, daß die
Bindung der Peptide an MHC-Moleküle über bestimmte MHC-al-
lelspezifische Ankerpositionen erfolgt bzw. verstärkt wird.
Prinzipiell ist es daher auch möglich, daß Peptide in entge-
gengesetzter Orientierung im MHC-Molekül über entsprechende
25 Ankerpositionen gebunden werden. Derartige inverse Peptide,
in denen bei identischer Aminosäuresequenz N- und C-Termini
vertauscht sind (z.B. N-LLEQKRAA-C gegenüber N-AARKQELL-C),
weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit ihrem Gegen-
stück auf.

30 Nimmt man als auslösendes Agens für eine Autoimmuner-
krankung einen mikrobiellen Erreger an, so setzt dies vor-
aus, daß dieser Erreger entsprechend der Häufigkeit der
Autoimmunerkrankung und der Häufigkeit der genetischen Prä-
disposition verbreitet ist. So sollte ein dem Auftreten der
35 rheumatoiden Arthritis und dem prädisponierenden MHC (DR1
und DR4) entsprechender Durchseuchungsgrad dieses Erregers

1 bzw. der auslösenden Komponente eines Erregers in der Bevölkerung vorherrschen.

Beispielsweise besiedeln pathogene Neisserien die Schleimhäute des Menschen. Bei einem erheblichen Anteil der Bevölkerung gehören insbesondere Meningokokken zur permanenten Flora des Nasen-Rachenraumes, ohne merklich Symptome auszulösen. Auch Individuen, die nicht ständig von Meningokokken besiedelt werden, werden von Zeit zu Zeit in Form asymptomatischer lokaler Infektionen mit diesen Bakterien konfrontiert. Antigene dieser und anderer Spezies, die sich bezüglich ihrer Kolonisierung auf menschlichen Schleimhäuten ähnlich verhalten, stellen potentielle Auslöser von Autoimmunkrankheiten des Menschen dar.

Die Prophylaxe und Behandlung sowie die Diagnose von Autoimmunkrankheit, wie auch vieler viral induzierter Krankheiten hat sich in der Vergangenheit als besonders schwerwiegendes medizinisches Problem erwiesen; es sind wenige zeitlich erfolgversprechende Ansätze bekannt, die zur Lösung dieses Problems geeignet erscheinen.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war somit, Arzneimittel zur Prophylaxe und Behandlung und Diagnostika zur Erkennung von Autoimmunkrankheiten oder der Prädisposition dazu und vielen Erkrankungen bereitzustellen.

Diese Aufgabe wird durch die in den Ansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen gelöst.

Somit betrifft die Erfindung ein Arzneimittel zur Prophylaxe oder Behandlung von Autoimmunkrankheiten und/oder viralen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel Stoffe oder Zellen enthält, die mit der natürlichen Funktion von bakteriellen Polyproteinen (BPPs) oder Bestandteilen davon oder mit den sie produzierenden Bakterien interferieren.

Unter viralen Erkrankungen werden erfindungsgemäß solche Erkrankungen verstanden, die von Viren oder viralen Elementen induziert werden.

1 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung
ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das
Interferieren eine Inhibierung ist.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die
Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist,
daß die Stoffe oder Zellen umfassen:

- (a) bakterielle Polyproteine (BPPs) oder Bestandteile davon;
- (b) immunkompetente Zellen oder immunologisch aktive Mo-
10 leküle, die spezifisch sind für die BPPs oder die
Bestandteile davon, für entsprechende homologe Peptide
menschlicher Proteine, durch Wirkung der BPPs gebildete
autoreaktive Peptide, durch die Wirkung der BPPs
aktivierte, von Viren bzw. endogenen Viren codierte
15 Peptide oder zu derartigen viralen Peptiden homologe
menschliche Peptide;
- (c) nicht-pathogene oder nicht-pathogen gemachte Bakterien
oder Bestandteile davon,
- (d) Infektionshemmer;
- (e) Stoffe, die die biologische Aktivität von BPPs inhi-
20 bieren;
- (f) Peptide oder Peptidanaloga, die Peptide aus MHC-Mo-
lekülen aufgrund einer hohen Bindungsaffinität ver-
drängen, deren Präsentation zu einer Autoimmunkrankheit
führt.
- 25 (g) Stoffe, die die BPP- oder BPP-Bestandteil- induzierende
Virusaktivierung inhibieren; oder
- (h) Stoffe, die die Virus-bedingten Autoimmunreaktionen
inhibieren, wobei diese Reaktionen durch BPPs oder deren
30 Bestandteile induziert werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die
Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist,
daß die Prophylaxe eine Immunisierung umfaßt.

1 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Immunisierung eine aktive Immunisierung ist.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Immunisierung eine passive Immunisierung ist.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die Autoimmunkrankheit rheumatoide Arthritis ist.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die die BPP produzierenden Bakterien zur Gattung Neisseria gehören.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die virale Erkrankung durch HIV induziert wurde.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, das dadurch gekennzeichnet ist, daß die durch HIV induzierte Krankheit AIDS ist.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei zur Immunisierung kapselspezifische Impfstoffe gegen Meningokokken-Infektionen verwendet werden.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei die Impfstoffe auf der Basis der Proteine der äußeren Membran von Bakterien der Gattung Neisseria hergestellt werden.

35 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei das Protein ein Porin ist.

1 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei die Impfstoffe auf der Basis der Adhesine der Neisserien hergestellt werden.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei das Adhesin ein PilC-Protein ist.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei die passive Immunisierung mit spezifischen Antikörpern oder T-Zellen erfolgt, die gegen Membrankomponenten oder Adhesinen von BPP-produzierenden Bakterien, vorzugsweise Neisserien gerichtet sind.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei als Infektionshemmer Antibiotika oder Rezeptoranaloga zu Rezeptoren menschlicher Zellen, an die pathogene Bakterien binden können oder
20 Liganden, die spezifisch für die Rezeptoren einer Bakterienoberfläche sind, kompetitive Peptide, oder nicht-pathogene oder attenuierte Neisserien sind.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei das kompetitive Peptid PilC ist.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei das BPP IPP ist.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei die IGA-Proteaseaktivität des IPP spezifisch gehemmt wird.

1 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei die Aspartylproteaseaktivität der β -Domäne des IPP spezifisch gehemmt wird.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei die Aufnahme des α -Peptids in menschliche Zellen oder deren Nukleus gehemmt wird.

10 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei die Folgen der Infektion durch BPP-bildende Bakterien durch Immunreaktion gegen BPP-bildende, insbesondere IPP bildende Zellen, BPP, insbesondere IPP oder deren Spaltprodukte inhibiert werden.

15 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei IPP-spezifische Peptidepräsentierende Zellen von T-Zellen eliminiert werden.

20 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei IPP-spezifische Peptidepräsentierende Zellen von monoclonalen Antikörpern eliminiert werden.

25 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei antigenspezifische suppressive T-Zellen verwendet werden.

30 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Arzneimittel, wobei anti-T-Zell-Rezeptorantikörper zum Ausschalten von T-Zellen verwendet werden, die eine Spezifität für die in Anspruch 3b genannten BPPs oder die Bestandteile davon, entsprechende homologe Peptide menschlicher Proteine, durch Wirkung der BPP-Genprodukte gebildete autoreaktive Peptide, durch Wirkung der BPP-Genprodukte induzierte, von Viren bzw. endogenen Viren codierte Peptide oder zu derartigen viralen Peptiden homologe menschliche Peptide aufweisen.

35

1 Weiterhin betrifft die Erfindung eine diagnostische
Zusammensetzung für den Nachweis des ätiologischen Agens von
Autoimmunkrankheiten und/oder viralen Erkrankungen und/oder
5 für den Nachweis der Kontrolle der Wirkung von Arzneimittel
enthaltend

- (a) Oligonucleotide bzw. Primer, die für BPP codierende Gene
spezifisch sind,
- (b) Antikörper, die spezifisch für BPPs oder Bestandteile
10 davon oder BPP bildende Bakterien sind;
- (c) Substrate, die zum Nachweis der biologischen Aktivität
der BPPs eingesetzt werden können; und/oder
- (d) Antigene, die von Antikörpern gemäß Merkmal (b) gebunden
werden.

15 Weiterhin betrifft die Erfindung eine diagnostische
Zusammensetzung für den Nachweis und die Überwachung des
Verlaufs von BPP-induzierten Autoimmunkrankheiten und/oder
viralen Erkrankungen und/oder für den Nachweis der Kontrolle
20 der Wirkung von Arzneimitteln, enthaltend

- (a) Peptide, die autoreaktive immunkompetente Zellen
spezifisch stimulieren,
- (b) Antikörper, die spezifisch sind für BPP-induzierte
virale Antigene oder Viren;
- 25 (c) Oligonucleotide bzw. Primer, die für BPP codierende Gene
spezifisch sind;
- (d) Antikörper, die für BPP-bildende Bakterien oder deren
Antigene spezifisch sind;
- (e) Antigene, die von Antikörpern gemäß (b) oder (d)
30 spezifisch gebunden werden; und/oder
- (f) Substrate, die von viralen Genprodukten umgesetzt
werden, wobei die viralen Genprodukte von BPPs induziert
worden sind.

35 Die Erfindung betrifft ferner ein Peptid, das im
Spaltprodukt eines IPP von *Neisseria meningitidis* ist und
eine der in Figur 1 dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.

1 Die Erfindung betrifft ferner ein Peptid, das ein
Spaltprodukt eines BPP, vorzugsweise eines IPP oder ein
Fragment davon ist oder ein menschliches Homologes dazu ist,
5 wobei das BPP, vorzugsweise das IPP oder das Fragment oder
das menschliche Homologe erhältlich ist durch Computer-
gestützten Vergleich von BPP-, vorzugsweise IPP-Sequenzen
mit Proteindatenbanken oder translatierten Nucleinsäure-
datenbanken von menschlichen Sequenzen oder umgekehrt und
10 wobei mindestens 6 Aminosäuren in einem Abschnitt von 10
Aminosäuren zwischen den Vergleichssequenzen identisch sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist das
erfindungsgemäße Peptid eine in Tabelle VII, Fig. 2, Fig. 3
15 oder Fig. 8 dargestellte Aminosäuresequenz auf.

Die Erfindung betrifft ferner ein menschliches Peptid, das
durch Einwirkung eines BPP, vorzugsweise eines IPP oder
eines Spaltproduktes davon entsteht, ausgenommen die IgA₁-
20 Spaltprodukte.

Ferner betrifft die Erfindung ein virales Peptid, das durch
Einwirkung eines BPP, vorzugsweise eines IPP oder eines
Spaltproduktes davon entsteht.

25 Weiterhin betrifft die Erfindung ein Peptid, das ein virales
Peptid, das durch die Einwirkung eines BPP entstanden ist,
oder ein menschliches Homologes dazu ist, wobei die virale
Peptidsequenz durch Computer-gestützten Vergleich mit
Proteindatenbanken oder translatierten Nucleinsäure-
30 datenbanken von menschlichen Sequenzen oder umgekehrt
erhältlich ist und wobei mindestens 6 Aminosäure in einem
Abschnitt von 10 Aminosäuren zwischen den Vergleichs-
sequenzen identisch sind.

1 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Peptid, das ein von einem Antikörper erkanntes Epitop darstellt.

5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Peptid, das nach MHC-Präsentation von einer T-Zelle erkannt wird.

10 Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Hemmung oder Aktivierung der Transkription viral codierter Polypeptide, dadurch gekennzeichnet, daß man Stoffe, vorzugsweise Biomoleküle, vorzugsweise Proteine, DNA, RNA oder Anti-Sense-RNA oder synthetisch hergestellte Moleküle, vorzugsweise therapeutisch wirksame Moleküle, in eukaryontische, vorzugsweise menschliche Zellen oder deren Zellkern unter Verwendung eines IgA- α -Proteins einschleust.

20 Ferner betrifft die Erfindung ein in vitro-Verfahren zur Clonierung und Vermehrung von menschlichen T-Zellen, deren T-Zellrezeptor MHC-präsentierte IPP-Fragmente spezifisch erkennt, wobei man die T-Zellen in Gegenwart von BPPs oder Bestandteilen davon, entsprechenden homologen Peptiden menschlicher Proteine, durch Wirkung eines BPPs gebildeten autoreaktiven Peptiden, durch die Wirkung eines BPPs aktivierten, von Viren bzw. endogenen Viren codierten Peptiden oder zu derartigen viralen Peptiden homologen menschlichen Peptiden unter üblichen Bedingungen stimuliert.

30 Die Erfindung betrifft ferner ein in vitro-Verfahren zur Clonierung und Vermehrung immunsuppressiver T-Zellen, die T-Zellen supprimieren, welche in MHC-präsentierte abgeleitete Fragmente spezifisch erkennen, wobei man die T-Zellen in Gegenwart von BPPs oder Bestandteilen davon, entsprechenden homologen Peptiden menschlicher Proteine, durch Wirkung eines BPPs gebildeten autoreaktiven Peptiden, durch die Wirkung eines BPPs aktivierten, von Viren bzw. endogenen Viren codierten Peptiden oder zu derartigen viralen Peptiden

35

1 homologen menschlichen Peptiden unter üblichen Bedingungen stimuliert.

5 Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Diagnose einer Autoimmunkrankheit oder einer Prädisposition dazu, vorzugsweise von rheumatoider Arthritis, dadurch gekennzeichnet, daß man in einem T-Zell-Proliferationstest ein IPP, ein Spaltprodukt eines IPPs oder ein Fragment davon oder ein menschliches Homologes dazu auf Proliferation von
10 reaktiven T-Zellen testet.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung ein Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß das Spaltprodukt oder Fragment davon, oder das menschliche Homologe dazu die in Tabelle VII dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.

20 Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von BPPs oder der sie bildenden Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit für BPP-Gene spezifischen Primern durchführt, und das PCR-Produkt durch DNA-Sequenzanalyse oder andere übliche Verfahren wie Gelelektrophorese auf BPP-spezifische Sequenzen untersucht.

25 Schließlich betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis der BPP-abhängigen Aktivierung von Viren oder viralen Elementen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine PCR mit für die viralen Gene spezifischen Primern durchführt, und das PCR-Produkt durch DNA-Sequenzanalyse oder andere
30 übliche Verfahren, wie Gelelektrophorese auf BPP-spezifische Sequenzen untersucht oder die Aktivität der viralen reversen Transkriptase oder anderer viraler Enzyme mißt.

35 Bakterielle Exoproteine stellen in einem besonderen Maße Angriffspunkte für die Immunantwort dar. Eine wichtige Gruppe von Exoproteinen, die sowohl von gramnegativen wie

1 von grampositiven Bakterien gebildet werden, sind die IgA-
Proteasen, die entsprechend ihrer Eigenschaft, menschliches
Immunglobulin A1 (IgA1) an spezifischer Stelle zu spalten,
benannt sind. Entsprechend ihrer Aminosäuresequenzen können
5 die IgA-Proteasen in Untergruppen gegliedert werden. Eine
solche Untergruppe bilden die IgA-Proteasen von pathogenen
Neisserien und bestimmter *Haemophilus*-Spezies. Die bisher
bekannten IgA-Proteasen von Neisserien und *Haemophilus*
unterscheiden sich wiederum in bestimmten Bereichen, während
10 sie in anderen Bereichen homolog sind. Die IgA-Proteasen der
pathogenen Neisserien bilden eine strukturell polymorphe
Enzymfamilie, wobei üblicherweise jeder pathogene
Neisserien-Stamm ein bestimmtes variantes Enzym produziert.
Von den Neisserien geben vor allem Meningokokken dieses als
15 Virulenzfaktor eingestufte Enzym in erheblichen Mengen in
ihre Umgebung ab. IgA-Proteasen liegen extrazellulär vor und
entwickeln sich aus einem Vorläuferpolyprotein (IPP). In dem
Vorläuferpolyprotein (IPP) der IgA-Proteasen von Neisserien
befinden sich weitere Proteindomänen, die zusammen mit dem
Enzym sekretiert werden. Ein IPP setzt sich neben dem
20 Signalpeptid für den Transport über die innere Bakterienmem-
bran aus folgenden separablen Komponenten zusammen, nämlich
einer IgA-Protease-Domäne, einem γ -Peptid, einem α -Protein
und einer β -Domäne (Pohlner et al., 1987).

25 Dieser Erfindung liegt der Nachweis des sehr ausgepräg-
ten molekularen Mimikry der Iga-Proteine (d.h. aller
Proteine des Vorläuferpolyproteins (IPP)) von Neisserien in
bezug auf menschliche Proteine zugrunde. Diese molekulare
Mimikry wird unter anderem durch weitere Sequenzbeispiele
30 von Neisserien Iga-Proteinen belegt, die durch DNA-Sequenz-
analyse von *iga*-Genen erhalten wurden (Beispiel 1). Compu-
terunterstützte Vergleiche dieser abgeleiteten Aminosäurese-
quenzen von Iga-Proteinen mit bekannten menschlichen Pro-
teinsequenzen ergaben zahlreiche erfindungsgemäße Sequenzho-
mologien mit menschlichen Proteinen, die exemplarisch darge-
35 stellt sind (Beispiel 2). So enthalten die Iga $_{\gamma}$ - und Iga $_{\alpha}$ -
Bereiche von Iga-Proteinen erhebliche Sequenzhomologien mit

1 Proteinbestandteilen des menschlichen Proteoglykans wie z.B.
dem Linkprotein oder dem Proteoglykankernprotein (Aggrekan)
bzw. zu anderen omnipräsenten menschlichen Proteinen wie
Myosin und Caldesmon. Interessanterweise wird im Beispiel 2
5 gezeigt, daß die inverse Primärsequenz von Iga vielfach um-
fassendere Homologien zu menschlichen Proteinen aufweist. Da
- wie oben ausgeführt - Peptide prinzipiell auch invers an
MHC-Klasse II-Moleküle binden können und in dieser Orientie-
rung ähnliche Strukturen wie die entsprechenden normalen
10 Peptide aufweisen, sind auch diese invers-homologen Pep-
tidesequenzen der Iga-Proteine für antigenes Mimikry von Be-
deutung und somit Gegenstand dieser Erfindung. Durch die
fortgesetzte Präsentation von einem oder mehreren Peptiden
des Iga-Proteins auf MHC-Molekülen werden daher autoreaktive
15 Prozesse induziert, die sich gegen Molekülstrukturen des
Menschen (z.B. Knorpelgewebe) richten.

Ein weiteres erfindungsgemäßes Merkmal des IPP ist
seine Eigenschaft, in menschliche Zellen von außen her ein-
zudringen und in bestimmten Fällen bis in den Nukleus vorzu-
20 dringen. Diese Eigenschaft wird besonders eindrucksvoll
durch die Aufnahme eines extrazellulären α -Proteins von
Neisserien belegt, das in den Nukleus bestimmter menschi-
cher Zellen eindringt (Beispiel 7). Aus der Struktur des IPP
wird abgeleitet, daß nicht nur das α -Protein in menschliche
25 Zellen gelangt, sondern auch die anderen Komponenten des IPP
bzw. intaktes IPP. Die einzelnen Komponenten des IPP können
während ihres Transports zum Nukleus in unterschiedlichen
Zellkompartimenten teilweise oder ganz abgespalten werden,
wo sie gegenüber ihren Zielzellen wirksam werden.

30 Intrazelluläre Neisserien, die von menschlichen Ziel-
zellen internalisiert wurden, synthetisieren ebenfalls IPP.
Entsprechend kann auch intrazellulär gebildetes IPP aufgrund
seiner Transporteigenschaften in verschiedene Zellkomparti-
mente eindringen und sich auch entsprechend dem von außen
eindringenden IPP in einzelne Komponenten aufspalten. Zusam-
35 men mit den internalisierten Neisserien gelangt auch die
oberflächenexponierte β -Domäne in die Zielzellen hinein.

1 Eine bekannte Eigenschaft der IgA-Protease bzw. der im
IPP enthaltenen IgA-Protease-Domäne ist die sequenzspezifi-
sche Spaltung von Proteinen, die eine entsprechende für die
Spaltung benötigte Sequenz tragen (Pohlner et al., 1992).
5 Eine bevorzugte Spaltsequenzen von Neisserien IgA-Proteasen
sind N-Pro-Pro-!-Thr/Ser-Pro-C, wobei ! die Spaltstelle be-
zeichnet. Daraus resultierend trägt das C-terminale Spalt-
fragment an zweiter Position seines Aminoterminus die Amino-
säure Pro. Ein bekanntes natürliches Substrat der IgA-Pro-
10 tease ist menschliches IgA-1.

Aufgrund der Eigenschaft des IPP, in menschliche Zellen
einzudringen ommt es dort zur Spaltung menschlicher Pro-
teine. Erfindungsgemäß wird hier auf diese Existenz weiterer
natürlicher Substrate der neisserialen IgA-Proteasen erfin-
15 dungsgemäß hingewiesen (Beispiel 9). Der Sequenzvergleich
bereits bekannter Spaltsequenzen der IgA-Protease mit be-
kannten Aminosäuresequenzen menschlicher Proteine in Daten-
banken ergibt Aufschluß über eine Vielzahl von intrazellulä-
ren bzw. zellassozierten menschlichen Proteinen, die ein
20 Substrat für IgA-Protease darstellen.

Eine erfindungsgemäße Folge der Spaltaktivität der IgA-
Protease sind Funktionsänderungen in den betroffenen Zellen.
Aufgrund der zahlreichen Substrate und ihrer vielfältigen
immunologischen Funktionen wird eine immunologische Fehl-
25 steuerung der von IgA-Protease betroffenen Zellen angenom-
men. Es ist weiterhin anzunehmen, daß sich diese immunologi-
sche Fehlsteuerung negativ auf das Gleichgewicht des Im-
munsystems in bezug auf seine Fähigkeit, zwischen Fremd und
Selbst zu unterscheiden, auswirken kann. Die IgA-Protease-
30 Aktivität begünstigt daher die Entstehung von Autoimmun-
krankheiten. Ein Beispiel für eine Wirkung der IgA-Protease-
Aktivität auf eukaryote Zellen ist nachfolgend dargestellt
(siehe Beispiel 20).

Eine weitere Folge der Spaltung menschlicher Proteine
35 durch IgA-Protease ist erfindungsgemäß die Bildung neuer
Selbst-Peptide (Beispiel 10). Interessanterweise entsprechen
C-terminale Produkte, die durch Spaltung mit IgA-Protease

1 entstanden sind, einer bevorzugten Aminosäuresequenz, die
bei Klasse I und Klasse II-präsentierten Peptiden vorgefun-
den wird, die wie die Spaltprodukte der IgA-Protease an
ihrer 2. Position die Aminosäure Pro tragen (Falk and
5 Röttschke, 1994; Engelhard, 1994). IgA-Proteasen sind daher
besonders geeignet, Peptide für die Präsentation in MHC-Mo-
lekülen zu erzeugen, und begünstigen daher die Entstehung
neuer Peptide und deren Präsentation gegenüber dem Immun-
system. Derartige Peptide können so aus menschlichen Protei-
10 nen hervorgehen, die in Abwesenheit von IgA-Protease nicht
erzeugt werden. Solche neuen Selbst-Peptide werden von dem
Immunsystem als Fremd erkannt, da sie zuvor nicht aufgetre-
ten sind. Dadurch wird eine Immunreaktion gegen Selbst in
Gang gesetzt.

15 Interessanterweise ist die Freisetzung des γ -Peptids aus
dem IgA-Protein ebenfalls ein Ergebnis der Spaltaktivität
der IgA-Protease, wodurch die antigenprozessierende Aktivi-
tät der IgA-Protease unmittelbar belegt wird. Eine erfin-
dungsgemäße Eigenschaft des γ -Peptids ist es, durch Klasse
20 II MHC-Moleküle präsentiert zu werden (Beispiel 5). Insbe-
sondere besitzt das γ -Peptid die Eigenschaft, an MHC-Moleküle
zu binden, die eine Prädisposition für RA-ähnliche Krankhei-
ten darstellen, nämlich die MHC-Allele DR1, DR4w4 und
DR4w14. Als Folge der MHC-Bindung des γ -Peptids kommt es
25 unter natürlichen Bedingungen zur Aktivierung von $CD4^+$ T-
Zellen, die in T-Zell-Proliferationstests nachgewiesen wer-
den kann (Beispiele 6 und 17). Darüber hinaus kann gezeigt
werden, daß Antikörper gegen das γ -Peptid mit Peptiden die-
ser menschlichen Proteine kreuzreagieren (Beispiel 3).

30 Interessanterweise kreuzreagieren einzelne Klone stimu-
lierter menschlicher T-Zellen mit MHC-präsentierten Pepti-
den, die von menschlichen Proteinen abstammen, beispiels-
weise Linkprotein bzw. Aggrekan (Beispiel 5). Kreuzreaktive
T-Zellen können aus Synovialflüssigkeit und peripheren Blut-
zellen von RA-Patienten oder aus dem Blut von Personen iso-
35 liert werden, die eine genetische Prädisposition für rheuma-
toide Arthritis besitzen (Beispiel 17). Diese Befunde bele-

1 gen den ätiologischen Zusammenhang zwischen RA und den Iga-
Proteinen pathogener Neisserien. Diese Ergebnisse zeigen
auch, daß die Gegenwart von IPP-spezifischen T-Zellen zwar
eine Voraussetzung für Autoimmukrankheiten darstellt, daß
5 aber nachfolgende pathogenetische Prozesse ebenfalls betei-
ligt sein können. Der experimentelle Nachweis mit γ -Peptid
und korrespondierenden menschlichen Peptiden stimulierbarer
peripheren T-Zellen kann in bezug auf die Diagnostik rheuma-
toider Krankheiten genutzt werden (Beispiel 17).

10 Neben dem γ -Peptid gibt es zahlreiche andere Bereiche im
Iga-Protein bzw. im IPP, die hinsichtlich des molekularen
Mimikrys mit menschlichen Proteinen bedeutsam sind. Dies
verdeutlicht der Vergleich der Aminosäuresequenzen von Iga-
Proteinen mit bekannten menschlichen Proteinen (Beispiel 2).
15 Diese Vergleiche lassen auf weitere ätiologische Zusammen-
hänge zwischen IPP von pathogenen Neisserien und menschi-
chen Autoimmunkrankheiten schließen, beispielsweise SLE
(Argow et al., 1989) und SS (Williams in: Encyclopedia of
Immunology, Hrg. Roitt und Delves, 1992, pp. 1339-1343). Ex-
perimentelle Evidenzen für derartige Zusammenhänge bilden
20 beispielsweise die immunologische Kreuzreaktion von monoklo-
nalen Antikörpern und polyklonalen Antiseren gegen IPP mit
menschlichen Proteinen. So erkennt der monoklonale Antikör-
per JOP-1, der gegen einen stark konservierten Bereich in-
nerhalb von Iga $_{\alpha}$ gerichtet ist, ein eukaryontisches Zellge-
25 rüstprotein (Beispiel 4).

Eine Eigenschaft der α -Proteine ist es, aus einer ex-
trazellulären Umgebung entweder allein oder im Verbund mit
anderen Bestandteilen des IPP in menschliche Zellen einzu-
dringen. Dieser Vorgang setzt offenbar die Bindung des α -
30 Proteins an einen oder mehrere zelluläre Rezeptoren voraus.
Im Verlauf dieses Prozesses gelangen α -Proteine in den Zell-
kern menschlicher Zellen. Aufgrund ihrer besonderen Struk-
tureigenschaften interagieren sie mit anderen zellulären
Faktoren und insbesondere mit der DNA betroffener Zellen.
35 Hierdurch werden Prozesse (beispielsweise genregulatorische
Prozesse) ausgelöst, die die Funktion betroffener Zellen be-

1 einflussen. Als eine Folge davon wird das Cytokinmuster be-
troffener Zellen verändert. Letztlich wird durch diese α -
Protein-bedingten Vorgänge die Balance des Immunsystems ge-
stört, was zusätzlich zum molekularen Mimikry des IPP die
5 Entstehung und den Erhalt von Autoimmunreaktionen begün-
stigt.

Eine weitere regulatorische Eigenschaft der Iga-Pro-
teine bzw. der IPPs wirkt sich auf den Zustand exogener und
endogener viraler Elemente aus. Es gibt zahlreiche Hinweise
10 auf eine Rolle von Viren und anderen viralen Elementen im
Zusammenhang mit der Ätiologie von Autoimmunkrankheiten des
Menschen. Beispielsweise kann das Epstein-Barr-Virus (EBV)
bestimmte Arthritiden des Menschen hervorrufen. Hierfür ist
möglicherweise eine strukturelle Homologie zwischen einer
15 Region im Nukleokapsidprotein gp110 von EBV (Roudier et al.,
1988) und dem "shared epitope" (Gregersen et al., 1987) be-
stimmter, mit RA-assoziierten HLA-DR-Allele des Menschen
(z.B. DR1, DR4w4, DR4w14) verantwortlich. Neben den struktu-
rellen Ähnlichkeiten zwischen viralen und menschlichen Pro-
teinen, die zu Autoimmunreaktionen führen können, kodieren
20 bestimmte Viren auch immunmodulatorische Faktoren, die
Autoimmunreaktionen begünstigen können. Hierzu zählen einer-
seits immunsuppressive Faktoren wie zum Beispiel das Tat-
Protein des *human immunodeficiency virus* (HIV) (Viscidi et
25 al., 1989) oder bestimmte retrovirale Genprodukte, die ähn-
lich dem Superantigen des MMTV zu einer antigenunspezifi-
schen klonalen Aktivierung des Immunsystems (insbesondere
von T-Zellen) führen können (Held et al., 1993).

Tatsächlich gibt es Hinweise auf einen Zusammenhang
30 zwischen retroviralen Elementen und Autoimmunkrankheiten des
Menschen. So konnte man in der Synovialflüssigkeit von RA-
Patienten virusähnliche Partikel elektronenmikroskopisch
nachweisen. Auch bei Patientien mit dem Sjögren's-Syndrom
konnten ähnliche virale Partikel nachgewiesen werden (Itescu
et al., 1990). Darüber hinaus wurde in der Synovialflüssig-
35 keit von RA-Patienten die Aktivität einer für solche Viren
typischen *Reversen Transcriptase* nachgewiesen.

1 Zum genauen Ursprung derartiger viraler Partikel, die
im Zusammenhang mit Autoimmunkrankheiten stehen, ist wenig
bekannt. Es wird jedoch angenommen, daß es sich beispiels-
weise um aktivierte endogene retrovirale Elemente handelt
5 (Perl et al., 1993), die nach neueren Schätzungen einen
großen Teil des menschlichen Genoms (zwischen 2 und 10 %) ausmachen. In welchem Maße die im menschlichen Genom enthal-
tenen retroviralen Elemente aktivierbar sind, wurde bisher
nicht bestimmt. Aufgrund des oben erwähnten Nachweises von
10 Viruspartikeln und von *Reverse Transcriptase* ist jedoch eine
gelegentliche Aktivierung endogener Retroviren wahrschein-
lich. Über die Mechanismen der Aktivierung endogener Retro-
viren ist bisher wenig bekannt.

Eine wichtige Klasse der Retroviren sind die Lentivi-
15 ren, denen der aus medizinischer Sicht bedeutende "human im-
munodeficiency virus" (HIV bzw. HIV-1) angehört. Der phyloge-
netische Ursprung des HIV ist bisher ungeklärt, jedoch be-
sitzt dieses Virus eine Reihe von nahe verwandten Viren
(z.B. HIV-2, SIV), die teils beim Menschen, teils bei ande-
20 ren Säugern vorkommen. Diese Verwandtschaft deutet auf eine
Abstammung des HIV von anderen HIV-ähnlichen Viren hin; Es
ist denkbar, daß bestimmte gesellschaftlich isolierte Bevöl-
kerungsgruppen in Afrika, das als Ursprung des HIV angesehen
wird, schon seit längerer Zeit mit HIV infiziert waren, be-
vor sich das Virus weltweit ausbreiten konnte. Vieles
25 spricht für einen "zweiten Faktor", der die HIV-Pandemie in-
duziert hat.

Ein solcher "zweiter Faktor" muß auch für die Aktivie-
rung des HIV innerhalb eines bereits infizierten Individuums
30 postuliert werden. Nach Infektion eines Menschen beginnt
sich das HIV zunächst stark zu vermehren (Phase I der Infek-
tion). Danach folgt eine Latenzperiode (Phase II), in der
kaum freie Viren im Blut des Infizierten vorhanden sind: Das
HIV ruht im Genom von CD4⁺ Zellen - insbesondere CD4⁺ T-Zel-
35 len - als sogenanntes Provirus. In dieser proviralen Form
verhält sich das HIV ähnlich den endogenen Retroviren. Durch
einen bisher unbekannten Mechanismus wird das HIV-Provirus

1 jedoch wiederholt aktiviert; es kommt zu einer Serie von
Vermehrungsschüben (Phase III), in deren Verlauf die CD4⁺ T-
Zellpopulation stark vermindert wird. Eine Folge davon wird
das Immunsystem stark geschwächt und es entsteht in der
5 Phase IV der HIV-Infektion das "acquired immune deficiency
syndrome" (AIDS). Interessant ist jedoch, daß die HIV-Infek-
tion in einer kleinen Zahl HIV-infizierter Personen trotz
langer Latenzzeit (Phase II z.T. über 10 Jahren) nicht in
eine Phase III übergegangen ist. Dies deutet darauf hin, daß
10 ein bestimmter Personenkreis zwar mit HIV infiziert wurde
und den integrierten HIV-Provirus besitzt, aber der im Genom
der Zellen integrierte Provirus nicht aktiviert wird.

Die entscheidende, bisher ungelöste Frage zur Entwick-
lung von AIDS betrifft daher den Mechanismus der Aktivierung
des HIV-Provirus in den infizierten Zellen. Experimentell
15 kann gezeigt werden, daß die Aktivierung des Provirus durch
eine Transkription des Provirusgenoms erfolgt, die vom Pro-
motor des "long terminal repeat" (LTR) des Provirus ausgeht.
Bei dieser Aktivierung des LTR spielt das vom Provirus ko-
dierte Tat-Protein eine zentrale Rolle. Das Tat-Protein
20 wirkt mit zellulären Faktoren und neugebildeter viraler RNA
zusammen, die das "Tat responsive element" (TAR) enthält.
Neuere Ergebnisse zeigen, daß das Tat-Protein die Eigen-
schaft besitzt, als lösliches Protein in bestimmte menschi-
che Zellen einzudringen und in den Nukleus dieser vorzudrin-
25 gen. Sofern diese Zellen das HIV-Provirus enthalten, kommt
es zur Transaktivierung des HIV in diesen Zellen. Das Tat-
Protein ist also in der Lage, HIV-Proviren in benachbarten
Zellen zu aktivieren. Diese Befunde zur Funktion von Tat ge-
ben zwar Aufschluß über die genetische Kontrolle der HIV-Ak-
30 tivierung, erklären jedoch nicht die Aktivierung des HIV-
Provirus in den Zellen eines Infizierten; hierfür wird viel-
mehr ein zusätzlicher exogener Faktor angenommen.

Eine wichtige Basis dieser Erfindung ist die struktu-
relle und funktionelle Verwandtschaft der iga-Gene von
35 Neisserien mit Viren bzw. viralen Elementen einschließlich
endogener Proviren. Hinsichtlich der Evolution der IgA-Pro-

1 teasen pathogener Neisserien ist ihre strikte Assoziation
mit pathogenen Bakterien-Spezies auffällig. Genomische DNA-
Hybridisierungsversuche, die mittels des *iga*-Gens von *N.*
5 *gonorrhoeae* und eines benachbarten Gens (*comA*) als Sonde
durchgeführt wurden, deuten an, daß das *comA*-Gen im Gegen-
satz zum *iga*-Gen sowohl in pathogenen wie nicht-pathogenen
Neisserien vorkommt (Facijs and Meyer, 1993). Vermutlich
integrierte das *iga*-Gen im Laufe der Evolution in das Genom
10 der pathogenen Neisserien als ein zusätzliches genetisches
Element. Vielfach vorhandene Sequenzhomologien der Iga-Pro-
teine mit viralen Proteinen deuten auf einen viralen Ur-
sprung der *iga*-Gene hin. Derartige Sequenzhomologien der
iga-Genprodukte und viraler Proteine können durch Computer-
unterstützte Aminosäuresequenzvergleiche nachgewiesen werden
15 (Beispiele 12 und 18). Dabei treten beispielsweise Homolo-
gien zu viralen Polyproteinen und viralen Hüllproteinen ge-
häuft auf. Da viele Neisserien-Spezies natürlich transforma-
tionskompetent und eng an die Wechselwirkung mit Säugetier-
organismen (insbesondere dem Menschen) gebunden sind, kann
20 der Einbau eines viralen Elements in das Neisserien-Genom
über den Weg der Transformation erklärt werden.

Eine besonders auffallende Strukturhomologie der
neisserialen Iga-Proteine betrifft ein bei Prokaryonten an-
sonsten ungewöhnliches Aminosäuresequenzmotiv des aktiven
25 Zentrums einer Aspartylprotease (Beispiel 11). Überraschen-
derweise besitzt von allen bekannten Sequenzmotiven das ak-
tive Zentrum der Aspartylprotease von HIV die größte Homolo-
gie zu dem des *iga* Genprodukts. Dieser Befund deutet auf
eine besonders enge Verwandtschaft zwischen *iga* und dem HIV-
30 Virus hin. Das aktive Zentrum der Neisserien-Aspartylpro-
tease ist in der membrangebundenen β -Domäne des Iga-Proteins
gelegen und kann beispielsweise im Zusammenhang mit der
Neisserien-Infektion in Zellen gelangen. Es wird angenommen,
daß diese zusätzliche proteolytische Aktivität, die auf der
35 Oberfläche von pathogenen Neisserien gebunden ist, in Pro-
zesse der Antigenpräsentation und der Regulation der Zell-
funktionen - ähnlich wie die Aktivität der IgA-Protease -

1 eingreift und auf diese Weise die Aktivierung viraler Elemente sowie die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten unterstützt.

5 Ein weiteres Merkmal der Verwandtschaft zwischen den iga-Genen und bestimmten Viren ist die bereits oben erwähnte Tatsache, daß die Iga-Proteine zunächst in Form großer Vorläufer-Polyproteine gebildet werden und in der Manier viraler Polyproteine durch Autoproteolyse sich selbst in mehrere einzelne Proteine zerlegen (Kräusslich et al., 1989).

10 Eine besonders interessante Verwandtschaft besteht darüber hinaus zwischen den α -Proteinen der Neisserien und dem HIV-kodierten Tat-Protein. Bei beiden Proteinen handelt es sich um relativ kleine (ca. 10 bis 30 kDa), vorwiegend α -helikale, positiv geladene Proteine, die die Fähigkeit zur Dimerisierung besitzen. α -Proteine und Tat-Proteine teilen
15 sich die ungewöhnliche Eigenschaft, vom extrazellulären Milieu in den Nukleus einer menschlichen Zelle einzudringen (Frankel and Pabo, 1988; Beispiel 7). Obwohl die α -Proteine der pathogenen Neisserien eine polymorphe Proteinklasse darstellen (Beispiel 1), werden die hier beschriebenen
20 Eigenschaften von allen bisher getesteten allelen Formen erfüllt.

Die α -Proteine der Neisserien und das Tat-Protein des HIV üben auch biologisch ähnliche Wirkungen auf
25 eukaryontische Zellen aus. So wirken beide Proteine gleichermaßen immunsuppressiv wie in einem T-Zell-Proliferationstest gemessen werden kann (Beispiel 8). Ebenso wie das Tat-Protein wirken auch die α -Proteine der Neisserien aktivierend auf bestimmte virale Promotoren (Beispiel 12). Die α -Proteine der Neisserien können daher - möglicherweise im Verbund mit den anderen Bestandteilen des IPP
30 - in den Kern HIV-infizierter menschlicher Zellen eindringen und den enthaltenen HIV-Provirus aktivieren, so daß eine Replikation und Ausbreitung des Virus erfolgt. Dieser Mechanismus erklärt daher die fortgesetzten HIV-Virusschübe, wo-
35 durch sich eine latente HIV-Infektion der Phase II zur Infektionsphase III hinentwickelt.

1 In dieser Weise aktivieren die α -Proteine der pathoge-
nen Neisserien auch andere endogene Retroviren des menschli-
chen Genoms. Die Bildung endogener retroviraler Proteine be-
günstigt zusammen mit den anderen Eigenschaften des IPP die
5 Entstehung bzw. das Fortschreiten von Autoimmunreaktionen in
der oben beschriebenen Weise. Nach neueren Erkenntnissen
kann auch AIDS als eine Autoimmunkrankheit angesehen werden
(Atlan, 1994). Es ist möglich, daß unterschiedliche Allele
der α -Proteine bzw. der IPPs bestimmte exogene oder endogene
10 Viren in unterschiedlicher Weise aktivieren. Überlagert
durch die genetisch bedingte Prädisposition einzelner Indi-
viduen erklären die teilweise unterschiedlichen biologischen
Funktionen der Neisserien iga-Gene und ihrer Genprodukte die
Entstehung unterschiedlicher Krankheitsbilder.

15 Es ist zu erwarten, daß in anderen bakteriellen Krank-
heitserregern weitere Gene existieren, die eine den
Neisserien iga-Genen ähnliche biologische Funktion besitzen.
Gene, die für bakterielle Polyproteine (BPPs) kodieren und
strukturelle und funktionelle Verwandtschaften zu dem iga-
20 Gen der pathogenen Neisserien aufweisen, sind beispielsweise
das vacA-Gen von *Helicobacter pylori* (Schmitt and Haas,
1993), das aida-Gen von enteropathogenen *E. coli* (Benz and
Schmidt, 1989), das pertactin-Gen von *Bordetella*
parapertussis (Dougan et al., 1991) und das Gen für die
25 Serinprotease von *Serratia marcescens* (Nakahama et al.,
1986).

In ihrer Gesamtheit belegen diese unerwarteten Befunde erst-
mals einen Zusammenhang zwischen BPPs (d.h. bakteriellen
30 IgA-Proteasen und deren assoziierten Proteine, sowie Iga-
ähnlichen Proteinen anderer pathogener Bakterien) und
Autoimmun- und Viruskrankheiten des Menschen. Insbesondere
offenbaren die dargestellten Ergebnisse einen Zusammenhang
zwischen Neisserien-Infektionen und Autoimmunkrankheiten des
Menschen. Demnach stellen IgA-Protease-bildende Neisserien
35 beispielsweise das ätiologische Agens RA-ähnlicher Autoim-
munkrankheiten des Menschen dar.

1 Desweiteren offenbart die vorliegende Erfindung erst-
mals die Rolle von BPPs und der sie bildenden Bakterienspe-
zies bei der Aktivierung von viralen Elementen. So wird wird
beispielhaft die Rolle der neisserialen Iga-Proteine bzw.
5 IPPs für die Aktivierung von viralen Elementen (insbesondere
von HIV-Proviren und anderen endogenen Retroviren) demon-
striert. Die vorliegende Erfindung erklärt somit die Entste-
hung von AIDS, indem HIV in Virus-infizierten Personen auf-
grund der biologischen Funktion der Iga-Proteine bzw. der
10 IPPs von Neisserien aktiviert wird. Durch die Aktivierung
viraler Elemente, insbesondere endogener Retroviren, werden
Autoimmunreaktionen hervorgerufen, die indirekt auf die bio-
logische Wirkung von BPPs, insbesondere der Neisserien Iga-
Proteine bzw. IPPs, zurückzuführen sind. Aus der unter-
15 schiedlichen Struktur und Wirkung von BPPs und der jeweils
aktivierten viralen Elemente erklärt sich die Vielfalt der
hervorgerufenen Krankheitsbilder.

In dem durch IPP bzw. indirekt durch Neisserien hervorgeru-
fenen pathogenetischen Prozeß spielen beispielsweise fol-
20 gende Ereignisse eine Rolle:

1. Pathogene IgA-Protease-bildende Neisserien (insbesondere
Meningokokken) infizieren die menschliche Schleimhaut.
Die Infektion einzelner Individuen kann vorübergehend
oder persistierend mit abwechselnd unterschiedlichen
25 Stämmen erfolgen. Die Infektionen können asymptomatisch
oder auch symptomatisch verlaufen.
2. Die Erreger bilden IgA-Proteasen, die in varianten For-
men auftreten können und Aminosäuresequenzen beinhalten,
die molekulares Mimikry in bezug auf menschliche Pro-
30 teine darstellen. So besteht beispielsweise molekulares
Mimikry zwischen dem γ -Peptid-Anteil des Neisserien IPP
und menschlichem Linkprotein bzw. Aggrekan.
3. Peptide des IPP, insbesondere des γ -Peptid-Anteils, wer-
35 den auf Klasse II MHC-Molekülen präsentiert.

- 1 4. Es werden CD4 T-Zellen, deren T-Zellrezeptor gegen ein
MHC-präsentiertes Peptid (Fremd) des IPP gerichtet ist,
aktiviert.
- 5 5. Diese aktivierten T-Zellen reagieren kreuz mit einem
Selbst-Peptid, das ebenfalls MHC präsentiert wird. D.h.
diese T-Zellen werden auch durch MHC-präsentiertes
Selbst-Peptid aktiviert.
- 10 6. Ähnliche Kreuzreaktionen kommen auf B-Zell-Ebene zu-
stande, indem Antikörper, die zunächst gegen IPP gerich-
tet sind mit Selbst kreuzreagieren und entsprechende B-
Zellen durch die Hilfe aktivierter T-Zellen aktiviert
werden.
- 15 7. Selbstreaktive T- und B-Zellen werden in bestimmte Kör-
perregionen eingeschleust, in denen entsprechende
Selbst-Antigene gebildet werden. Durch die fortlaufende
Stimulation mit Selbstantigen und die Bildung inflamma-
torischer Zytokine wird eine chronische entzündliche Re-
aktion in Gang gesetzt, in deren Verlauf es zu einer un-
spezifischen Zellproliferation und Gewebszerstörung
20 kommt.
- 25 8. Durch die fortschreitende Freisetzung von proteolyti-
schen Spaltprodukten von Selbst-Antigen kommt es zu wei-
teren Autoimmunreaktionen.
- 30 9. Ein oder mehrere zusätzliche Eigenschaften des IPP be-
günstigen das Zustandekommen einer Autoimmunreaktion ge-
gen menschliche Selbstproteine, indem beispielsweise
(a) α -Protein allein oder im Verbund mit anderen Be-
standteilen des IPP intrazellulär produziert oder von
außen in Zellen aufgenommen wird,
(b) IgA-Protease funktionell wichtige Proteine wie IgA1,
CD8 etc. spaltet,
(c) durch die Spaltung von menschlichen Proteinen neue
T-Zell-Epitope generiert werden, die eine gegen Selbst
gerichtete Immunreaktion bewirken, und/oder
35 (d) durch die regulatorischen Eigenschaften des α -Pro-
teins und anderer Bereiche des IPP immunologische Reak-
tionen beschleunigt oder supprimiert werden.

- 1 10. In einer weiteren Reaktion, die parallel zu den oben
geschilderten Vorgängen abläuft, werden aufgrund der
Wirkungen der neisseriellen IPPs im Verlauf der
Neisserien-Infektion virale Elemente aktiviert. Die ent-
5 stehenden viralen Partikel und anderen viralen Genpro-
dukte üben eine Vielzahl unterschiedlicher Funktionen
aus, die entsprechend unterschiedliche klinische Formen
der Autoimmunkrankheiten des Menschen ergeben können.
- 10 11. Trifft das neisserielle IPP auf eine HIV-infizierte
Zelle, so kommt es zur Aktivierung des HIV-Virus. In
diesem Fall wird das klinische Bild durch die fort-
schreitende HIV-Infektion bestimmt.

15 Es ist sehr wahrscheinlich, daß die BPPs anderer bakteriel-
ler Mikroorganismen bei Einwirkung auf den menschlichen Or-
ganismus und seine Zellen ähnliche Reaktionen hervorrufen
wie das IPP der pathogenen Neisserien.

20 Dieser oben beschriebene Sachverhalt erlaubt die Entwicklung
rationaler Strategien zur Bekämpfung von Autoimmunreaktionen
und viraler Infektionen. Darüber hinaus ergeben sich diagno-
stische Verwendungsmöglichkeiten zur Identifizierung von Ri-
sikogruppen und der frühzeitigen Diagnose solcher Krankhei-
ten. So leiten sich aus den beschriebenen Erkenntnissen un-
mittelbar folgende diagnostische, therapeutische und vorbeu-
25 gende Verfahren ab:

A Anti-Neisserien-Vakzine und Inhibitoren

30 Da Neisserien ein ätiologisches Agens von Autoimmun-
und Viruskrankheiten des Menschen, insbesondere der rheuma-
toiden Arthritis und von AIDS, darstellen, richtet sich da-
her ein erster Ansatz zur Bekämpfung dieser Krankheiten ge-
gen Infektionen mit IgA-Protease-produzierenden pathogenen
Neisserien einschließlich asymptomatisch verlaufender Infek-
35 tionen. Mehrere prinzipiell unterschiedliche Methoden können
hierfür angewandt werden, (a) die aktive Immunisierung, (b)
die passive Immunisierung, (c) die Behandlung mit Infek-

1 tionshemmern einschließlich Antibiotika und (d) kombinierte
Methoden.

5 (a) Aktive kapselspezifische Vakzine gegen Meningokokken-Infektionen der Serogruppen A und C sind bereits erhältlich, nicht jedoch anderer Serogruppen einschließlich der
weit verbreiteten Serogruppe B. Daneben wurden jedoch weitere Ansatzpunkte zur Entwicklung wirksamer Neisserien-Vakzine beschrieben, die beispielsweise auf der Basis von Proteinen der äußeren Membran insbesondere der Porine (Wiertz, 1993) hergestellt werden und/oder gegen wesentliche Adhäsine gerichtet sind, insbesondere das Pilus-assoziierte PilC-Protein (Meyer et al., Deutsche Patentanmeldung P 43 36 530.2; Normark und Jonsson, PCT-Anmeldung WO 92/13 871).

10 (b) Passive Immunisierungen mittels spezifischer Antikörper oder T-Zellen, die gegen entsprechende Komponenten der Neisserien gerichtet sind, können ebenfalls als wirksamer Schutz vor Neisserien-induzierten Autoimmun- und Viruskrankheiten verwendet werden.

15 (c) Eine weitere Möglichkeit zur Bekämpfung von Neisserien-Infektionen und darauf beruhender Autoimmun- und Viruskrankheiten besteht in der Verabreichung von spezifischen Infektionshemmern, die die Vermehrung und oder die Infektion der menschlichen Schleimhäute mit pathogenen Neisserien verhindern. Als solche können beispielsweise spezifische Antibiotika gegen Neisserien und Rezeptoranaloga, die die Bindung der Neisserien an zelluläre Rezeptoren verhindern, verwendet werden. Besonders wirksame Rezeptoranaloga stellen solche Substanzen dar, die die PilC-vermittelte Bindung der Neisserien an menschliche Epithelzellen verhindern (Deutsche Patentanmeldung P 43 36 530.2) oder die von Opa-Proteinen vermittelte zelluläre Invasivität der Neisserien blockieren (Beispiel 15). Zu letzteren Substanzen, die die Invasivität der Neisserien blockieren, zählen u.a. Verbindungen, die strukturelle Ähnlichkeiten mit Heparansulfaten besitzen (z.B. Heparin, Beispiel 15).

20 25 30 35 (d) Eine kombinierte Methode zur Bekämpfung von Neisserieninfektionen besteht in der Verabreichung eines Li-

ganden der Neisserien-Oberfläche, der mit einem Antigen gekoppelt ist. Durch Bindung des Liganden an die Neisserien-Oberfläche wird somit ein bestimmtes Antigen auf der Bakterienoberfläche deponiert. Werden gegen dieses Antigen Antikörper gebildet, so können die Antikörper über den Liganden an die Bakterienoberfläche binden und das Bakterium über eine der bekannten Reaktionen inaktivieren. Diese Möglichkeit der Erregereliminierung ist insbesondere für den Fall der Neisserien geeignet, da diese Bakterien strukturell und antigen-variable Oberflächenkomponenten ausprägen (Robertson und Meyer, 1992). Da viele variable Oberflächenproteine jedoch konservierte Rezeptorbindende bzw. ligandenbindende Eigenschaften ausprägen, können die Neisserien über den Weg des Liganden effektiv eliminiert werden. Beispiele für Neisserien-Proteine mit einer konservierten Bindung von Liganden sind das PorB (oder P.I-Porin), das Purinnukleotidtriphosphate bindet (Rudel, 1994), ein Gangliosyltetraosylceramid-bindendes Oberflächenadhäsion (Paruchuri, 1990) und das oberflächengebundene PilC-Protein der Neisserien (Rudel, 1994). Die Liganden dieser bakteriellen Rezeptoren werden vorzugsweise mit einem Antigen gekoppelt, gegen das bereits wirksame Antikörper vorliegen; es ist jedoch auch möglich eine aktive Immunisierung gegen das gekoppelte Antigen durchzuführen bzw. antigenspezifische Antikörper passiv zu verabreichen. es ist auch möglich, den Liganden derart zu verändern, daß seine Affinität zur Bakterienoberfläche gesteigert wird.

B Kompetition um Neisserien-spezifische Rezeptoren

Es ist bekannt, daß pathogene und nicht-pathogene Neisserien z.T. sehr ähnliche bzw. identische Rezeptoren auf der Schleimhaut des Menschen erkennen und zur Infektion benutzen. Es ist daher möglich, nicht-pathogene oder attenuierte Neisserien zur Verdrängung von pathogenen, IgA-Protease-produzierenden Neisserien zu benutzen. Durch eine derartige Kompetition um die Rezeptoren auf den menschlichen

1 Schleimhäuten können Infektionen mit pathogenen Neisserien
weitgehend unterbunden werden.

C Inhibition der IPP-Funktionen

5 Als auslösendes Agens von Neisserien-induzierten
Autoimmunkrankheiten bestimmter viraler Krankheiten wurde
IPP nachgewiesen. Demnach dienen zur Bekämpfung solcher
Krankheiten Substanzen (einschließlich Impfstoffe), die ge-
gen die enzymatischen Aktivitäten des IPP gerichtet sind. So
10 verhindert die Ausprägung der IgA-Protease-Aktivität im IPP
beispielsweise die Freisetzung des γ -Peptids, das eine zen-
trale Rolle bei der Autoimmunpathogenese spielt. Als wirksa-
mer spezifischer Inhibitor der proteolytischen Aktivität der
IgA-Protease wurden synthetische Peptide der Struktur R-
15 boroPro-OH beschrieben (Bachovchin et al., 1990). Solche
oder ähnlich wirkende Substanzen können daher zur Bekämpfung
von Autoimmunkrankheiten eingesetzt werden.

Desweiteren können Substanzen eingesetzt werden, die
auf andere Funktionen des IPP oder seiner einzelnen Bestand-
20 teile inhibitorisch wirken. Insbesondere können Substanzen
verwendet werden, die zu einer Hemmung der Aspartyl-Protease
der β -Domäne oder zu einer Blockierung der Aufnahme des α -
Proteins in menschliche Zellen oder deren Nukleus führen.

25 D Nutzbarmachung von Funktionen des IPP

Eine besondere Eigenschaft der Neisserien IPPs ist ihr
intrazellulärer Wirkort. Die Beschreibung macht deutlich,
daß ein Neisserien IPP bzw. dessen Spaltprodukte zahlreiche
Funktionen enthält, die intrazellulär wirksam werden. Durch
30 Verwendung der intrazellulären Transportfunktion eines
Neisserien IPP und insbesondere des α -Proteins ist es mög-
lich, auch andere biologische Moleküle an genau den Wirkort
zu transportieren wo das native IPP bzw. dessen Spaltpro-
dukte ihre natürlichen Wirkungen entfalten. Es ist daher
möglich, an den natürlichen Wirkort eines IPP Substanzen zu
35 transportieren, die die natürliche biologische Funktion
eines IPP inhibieren. Es ist ebenso möglich, Moleküle zu

1 transportieren, die Folgereaktionen (z.B. die Replikation
von viralen Elementen) inhibieren und damit eine Autoimmun-
reaktion bzw. die Virusvermehrung begrenzen. So ist es bei-
spielsweise möglich, spezifische Antikörper oder Antikörper-
5 fragmente in menschliche Zellen bis in den Nukleus zu
schleusen und auf diese Weise pathologische Reaktionen zu
stoppen. Ein alternatives Verfahren besteht darin, IPPs der-
art zu modifizieren, daß sie ihre natürliche Funktion nicht
mehr ausüben können, sondern vielmehr IPP-spezifische Reak-
10 tionen blockieren. In einem weiteren Verfahren werden mit
Hilfe der IPP-Transportfunktionen Nukleinsäuren in menschi-
che Zellen eingeschleust, die ihrerseits antagonistische
Funktionen des IPP bzw. seiner Folgereaktionen ausüben und
somit eine Autoimmunreaktion bzw. eine Virusvermehrung
15 unterbinden. Derartige Nukleinsäureabschnitte könnten für
inhibitorische Proteine kodieren und als DNA in das Genom
der betroffenen Zelle integrieren oder eine von zahlreichen
anderen inhibitorischen Eigenschaften besitzen. Der beson-
dere Vorteil dieser Methode ist, daß mittels der IPP-Trans-
portfunktion inhibitorische Moleküle in die selben Zellen
20 eines Organismus gelangen, die auch unter natürlichen Be-
dingungen von den IPPs der Neisserien betroffen werden.

25 Zu diesen unter natürlichen Bedingungen betroffenen mensch-
lichen Zellen zählen insbesondere bestimmte Zellen der
menschlichen Schleimhaut (z.B. des Nasopharynx) und be-
stimmte Zellen im menschlichen Blut.

30 Eine weitere Möglichkeit, die Targeting-Eigenschaften des
alpha-Proteins nutzbar zu machen, besteht in der chemischen
Synthese von analogen Peptiden, die Teilbereiche des alpha-
Proteins darstellen und ähnliche Transport- und Targetingei-
genschaften besitzen. Ein Vorteil chemisch synthetisierter
Peptide besteht insbesondere in der Möglichkeit, aktive
35 Gruppen einzuführen, die zur Kopplung an biologisch wirksame

1 Substanzen wie aktive Proteine, Nukleinsäuren bzw. andere
Substanzen verwendet werden können. Somit kann das α -Protein
auch für "gene targeting"-Experimente verwendet werden.

5 E Eliminierung IPP-betroffener Zellen mittels spezifi-
scher Antikörper oder cytotoxischer T-Zellen

Menschliche Zellen, die durch Aufnahme extrazellulären
IPPs oder durch Infektion mit pathogenen Neisserien betrof-
fen sind, präsentieren IPP-abgeleitete Peptide auf ihren
10 MHC-Molekülen. Dieser Umstand läßt sich nutzen, um betrof-
fene Zellen, wie nachfolgend beschrieben, spezifisch zu eli-
minieren:

(a) IPP-abgeleitete Peptide, die auf MHC-Klasse I prä-
sentierte werden, können von $CD8^+$ T-Zellen spezifisch erkannt
15 und eliminiert werden. Es ist möglich, solche spezifischen
T-Zellen durch Klonierung *in vitro* zu vermehren und in be-
troffene Individuen zurückzubringen. Voraussetzung für diese
Anwendung ist jedoch, daß diese spezifischen T-Zellen nicht
20 gegen Selbst-Antigene reagieren; dies kann durch geeignete
Screening-Verfahren ausgeschlossen werden.

(b) Entsprechend ist es möglich, IPP-abgeleitete Pep-
tide, die entweder MHC Klasse I oder Klasse II präsentiert
werden, mittels spezifischer monoklonaler Antikörper, die
mittels bekannter Verfahren (z.B. durch Hybridomatechnik,
25 Humanisierung tierischer Antikörper und/oder rekombinante
Antikörpertechnologie) gewonnen werden, zu eliminieren. Dies
kann dadurch erfolgen, daß der gebundene Antikörper das Kom-
plementsystem aktiviert oder eine Antikörper-abhängige zyto-
toxische zellvermittelte Reaktion (ADCC) hervorruft, was je-
30 weils die Eliminierung betroffener antigenpräsentierender
Zellen zur Folge hat. Auch hierbei muß durch vorangegange-
nes Screening sichergestellt sein, daß der gewonnene Anti-
körper nicht gegen Selbst-Antigene gerichtet ist.

1 F Toleranzerzeugung durch antigenspezifische, suppressive
T-Zellen

5 (a) Gegen Selbst gerichtete T-Zellen können vorwiegend
aktivierende oder vorwiegend supprimierende Eigenschaften
ausprägen. Für den Fall, daß vorwiegend aktivierende T-Zel-
len vorhanden sind, wird die Autoimmunreaktion begünstigt.
Andererseits kann eine Autoimmunreaktion unterdrückt werden,
wenn neben den aktivierenden T-Zellen genügend supprimie-
rende T-Zellen vorhanden sind. Durch Stimulierung bzw. Ver-
10 mehrung der antigenspezifischen supprimierenden T-Zellen
kann also eine Autoimmunreaktion unterdrückt werden. Die
Stimulierung supprimierender T-Zellen hängt von organ- und
zellspezifischen Parametern der Antigenpräsentation von
Selbst-Peptiden bzw. Selbst-ähnlichen Peptiden ab
15 (Mitchison, 1993). So können beispielsweise durch orale Gabe
solcher Peptide vorwiegend supprimierende T-Zellen erzeugt
und die Autoimmunreaktion unterdrückt werden.

20 (b) Entsprechend ist es möglich, antigenspezifische
supprimierende T-Zellenaus Patienten zu isolieren, *in vitro*
zu vermehren und die vermehrten T-Zellen in großer Zahl in
geeigneter Form zu verabreichen. Diese T-Zellen können so-
dann supprimierend auf die entsprechenden aktivierenden
antigenspezifischen T-Zellen einwirken und so die antigen-
spezifische Autoimmunreaktion unterdrücken. Die *in vitro*-
25 Vermehrung der supprimierenden T-Zellen erfolgt unter be-
kannten Standardbedingungen wie sie in Beispiel 6. beschrie-
ben werden.

30 (c) Entsprechend können antigenspezifische T-Zellen
durch genetische Manipulation *in vitro* verändert werden, so
daß sie die Eigenschaften von supprimierenden T-Zellen an-
nehmen. Dies geschieht beispielsweise durch die Transfektion
von T-Zellen mit den funktionellen Genen supprimierender
Interleukine. die hierzu verwendeten Methoden entsprechen
dem Stand der Technik.

1 G Entwicklung einer T-Zell-Vakzine

5 (a) Da autoreaktive T-Zellen mit kontrollierenden T-Zellen ein Gleichgewicht bilden, das bei Autoimmunkrankheiten gestört ist, besteht weiterhin die Möglichkeit, autoreaktive T-Zellen durch Vakzinierung zu eliminieren (Zhang et al., 1993; Atlan et al., 1994). Die Entwicklung einer T-Zell-Vakzine ist immer dann möglich, wenn das Selbst-Antigen bekannt ist und so die Herstellung antigenspezifischer attenuierter T-Zellen *in vitro* ermöglicht wird.

10 (b) Bei Autoimmunkrankheiten spielen oftmals autoreaktive T-Zellen mit bestimmten an variablen V_β bzw. V_α -Ketten des T-Zell-Rezeptors eine Rolle. Solche klonalen autoreaktiven T-Zellen, die möglicherweise durch die Einwirkung eines Superantigens entstanden sind, können ebenfalls für die Herstellung einer T-Zell-Vakzine verwendet werden.

15 (c) Andererseits ist es auch möglich, gegen antigenspezifische autoreaktive T-Zellen Antikörper zu entwickeln, die spezifisch gegen autoreaktive T-Zellen reagieren und somit die Elimination der autoreaktiven T-Zellen ermöglichen.

20 H Kompetitive bzw. anergisierende Peptide und peptid-analoge Agentien

25 Einzelne MHC-Moleküle binden jeweils eine Vielzahl unterschiedlicher Peptide. Es ist daher auch möglich, MHC-Moleküle mit Peptiden zu beladen, die entweder keine autoreaktive T-Zell-Aktivierung ermöglichen oder autoreaktive T-Zellen anergisieren.

30 I Diagnostika für den direkten Nachweis des ätiologischen Agens von Autoimmun- und Viruskrankheiten des Menschen sowie für die Kontrolle der Wirkung von Arzneimitteln

35 Auslöser der erfindungsgemäßen Autoimmun- und Virus bedingten Krankheiten sind die bakteriellen Polyproteine (BPPs) bzw. die BPP-bildenden Bakterien. Gegenstand dieser Erfindung sind daher diagnostische Verfahren, die sich für einen qualitativen oder quantitativen Nachweis von BPPs bzw. der sie bildenden Bakterien eignen. Hierzu zählen bekannte mikrobiologische, direkte (antigenspezifische) und indirekte

1 (antikörperspezifische, T-Zell-spezifische) immunologische,
sowie enzymatische und genanalytische Nachweismethoden. Zu
den genanalytischen Methoden zählen insbesondere die Polyme-
rase-Chain-Reaction (PCR) und DNA-Hybridisierungsmethoden.
5 Die genannten Nachweisverfahren betreffen insbesondere die
pathogenen Neisserien und die von ihnen gebildeten IPPs.

J Diagnostika für den Nachweis und die Überwachung des
Verlaufs von Autoimmun- und Viruskrankheiten des Menschen
sowie für die Kontrolle der Wirkung von Arzneimitteln

10 Die dargestellten Krankheitsformen durchlaufen mehrere
Stadien. Die Kenntnis des genauen Stadiums des Krankheits-
verlaufs ist wichtig für eine gezielte therapeutische oder
vorbeugende Behandlung. Gegenstand dieser Erfindung sind da-
her diagnostische Verfahren, die Aufschluß über den Krank-
15 heitsverlauf geben. Hierzu zählen Verfahren zum quantita-
tiven und qualitativen Nachweis des Immunstatus und der
antigenspezifischen Immunreaktionen auf B- und T-Zellebene.
Desweiteren zählen hierzu Verfahren zum Nachweis der Akti-
vierung von Viren bzw. viralen Elementen beispielsweise mit-
20 tels genanalytischer (z.B. PCR Techniken; Hermann und Kal-
den, 1994) und/oder enzymatischer (z.B. Nachweis von
Reverser Transcriptase-Aktivität). Darüber hinaus zählen
hierzu Nachweisverfahren anderer typischer Wirkungen bakte-
25 rieller BPPs und insbesondere der Neisserien IPPs.

K Davon abgeleitete diagnostische Kits etc.

L Kurzfassung der erfindungsgemäßen Verfahren

30 (a) Zusammenfassend ermöglichen die in dieser Erfindung
dargestellten Ergebnisse eine Vielzahl neuer antigenspezifi-
scher Verfahren zur Therapie- bzw. Vorbeugung gegen Autoim-
mun- und Viruskrankheiten des Menschen. Hierzu zählen die
oben beispielhaft aufgeführten und weitere, in der Literatur
beschriebene Therapieformen (z.B. Bläß, 1994; Tisch et al.,
35 1994 und darin zitierte Literatur). Den antigenspezifischen
Therapieformen liegen - bezogen auf die Rolle der pathogenen
Neisserien - folgende Antigene zugrunde:

- 1 * Peptide der Iga-Genprodukte der pathogenen Neisserien,
* entsprechende homologe Peptide menschlicher Proteine,
* durch die Wirkung der Iga-Genprodukte gebildete autoreak-
tive Peptide,
5 * durch die Wirkung der Iga-Genprodukte hervorgerufene, von
Viren, bzw. endogenen Viren kodierte Peptide und
* und zu solchen viralen Peptiden homologe menschliche Pep-
tide.

10 (b) Desweiteren sind Gegenstand dieser Erfindung alle
oben beispielhaft aufgeführten Verfahren zur Therapie von,
oder zur Vorbeugung gegen Autoimmun- und Viruskrankheiten
des Menschen, die direkt oder indirekt gegen die biologische
Wirkung bakterieller Polyproteine (BPPs), insbesondere der
Neisserien IPPs, gerichtet sind. Zu diesen Verfahren zählen
insbesondere

- 15 * gegen Infektionen mit pathogenen Neisserien gerichtete
Verfahren,
* gegen ein IPP von pathogenen Neisserien oder dessen Spalt-
produkte gerichtetes Verfahren und
20 * Verfahren, die sich eine oder mehrere spezifische Eigen-
schaften der Neisserien IPPs zunutzemachen.

(c) Desweiteren sind Gegenstand dieser Erfindung di-
agnostische Verfahren, sofern sie sich aus den oben genann-
ten Ergebnissen ableiten und die für die Diagnostik von
25 Autoimmun- und Viruskrankheiten des Menschen von Belang
sind. Hierzu zählen insbesondere

- * Verfahren, die auf der direkten oder indirekten Verwendung
eines oder mehrerer der oben unter L(a) genannten Peptide
beruhen,
30 * immunologische Verfahren
* Verfahren zum Nachweis pathogener Neisserien
* Verfahren zum direkten oder indirekten Nachweis von Viren
oder viralen Elementen, die durch die Wirkung pathogener
Neisserien bzw. eines Neisserien-IPP aktiviert worden sind,
bzw. deren Genprodukte oder Reaktionen, die durch die Wir-
35 kung pathogener Neisserien bzw. eines Neisserien-IPP hervor-
gerufen worden sind.

Definitionen

Die hier verwendete Bezeichnung "BPP" bezieht sich auf bakterielle Polyproteine im Allgemeinen und schließt die IgA-Protease-Polyproteine von pathogenen Neisserien (IPPs) mit ein. Der Begriff "IPP" bezieht sich nicht nur auf das unmittelbare Genprodukt des *iga*-Gens der pathogenen Neisserien, sondern auch auf die bei der nachfolgenden autoproteolytischen Prozessierung entstehenden Folgeprodukte "IgA-Protease", " α -Protein", " γ -Peptid" und β -Domäne bzw. intermediäre Fusionen dieser Proteine.

Der Begriff pathogene Neisserien bezieht sich auf *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis*. Sofern der Begriff "Neisserien" nicht näher erläutert wird, schließt er zumindest die beiden pathogenen Neisserien mit ein.

Unter dem Begriff Viruskrankheiten werden pathogenetische Prozesse verstanden, die eine Folge der Aktivierung von Viren oder viralen Elementen sind, wobei die Aktivierung durch bakterielle Krankheitserreger bzw. deren BPPs bewirkt wird. Die Aktivierung erfolgt insbesondere durch die Einwirkung eines IPP von pathogenen Neisserien auf menschliche Zellen. Unter dem Begriff "Viren" werden Viren verstanden, die in ihrer Genexpression und oder Replikation eine Aktivierung durch BPPs, insbesondere ein IPP pathogener Neisserien, erfahren. Es ist nicht auszuschließen, daß unterschiedliche IPPs pathogener Neisserien qualitativ und quantitativ unterschiedliche Wirkungen auf Viren oder virale Elemente ausüben. Der Begriff Viren bezieht sich auf genetisch vollständige Viren bzw. Virusgenome (z.B. HIV bzw. HIV-Provirus), während sich der Begriff virale Elemente auf genetisch unvollständige virale Genome (z.B. endogene Retroviren) bezieht.

Die Figuren zeigen:

Figur 1: DNA-Sequenzen und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen (im Einbuchstabencode) von *N. meningitidis* iga-Domänen.

In den Iga-Proteasegenen von Meningokokken existieren zwei allele iga α -Bereiche, wobei iga α 3 ca. 475 Basenpaare und iga α 4 ca 1175 Basenpaare umfaßt. Die Iga α 3- und Iga α 4-Domänen zeigen untereinander wie auch zu den entsprechenden Iga α 1- und Iga α 2-Domänen von *N. gonorrhoeae* ausgeprägte Homologien in den Primär- und Sekundärstrukturen. Die Iga γ 2-Allele stimmen bis auf die Aminosäure an Position 4 mit dem Iga γ 1-Allel von *N. gonorrhoeae* überein. Die zugehörigen DNA-Sequenzen iga γ 2 und iga γ 2* unterscheiden sich in der Base an Position 93. Das iga γ 3-Allel weist gegenüber iga γ 2 eine Deletion von 4 Triplets im zentralen Bereich auf. Das iga γ 4-Allel zeigt neben dieser Deletion eine Konversion von Glycin-Alanin zu Serin-Prolin auf, die durch einen Ersatz von G durch A an Position 49 und einen Ersatz von G durch C an Position 52 der entsprechenden kodierenden Region bedingt ist.

Figur 2: Homologien zwischen Aminosäuresequenzen des Iga-Protease-Vorläufers (IPP) pathogener Neisserien und verschiedenen humanen Proteinen.

Iga α , Iga γ , Iga α und Iga β bezeichnen die verschiedenen Domänen des Iga-Proteins, die unterschiedliche Funktionen erfüllen und die durch spezifische Autoproteolyse aufgespalten werden (Pohlner et al., 1987). Die Sequenzen sind im Einbuchstabencode in der Orientierung vom Amino- zum Carboxylende angegeben. Die Nummern am Aminoende der Sequenzausschnitte geben die entsprechenden Positionen im Iga-Protein von *N. gonorrhoeae* MS11 (Iga α , Iga γ , Iga α 1 und Iga β ; (Pohlner et al., 1987), *N. gonorrhoeae* R16 (Iga α 2; Halter et al., 1989) und *N. meningitidis* B1939 (Iga α 4, Position bezogen auf Aminoende vom α -Protein) sowie die Sequenzposition in den humanen Proteinen an. Identische Aminosäurepositionen zwischen Iga-Proteinen und den menschlichen Proteinen sind durch Einrahmungen hervorgehoben. Positionen, die mit Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften besetzt sind, sind fett gedruckt. Abkürzungen: Hs47, 47 kd Hitzeschockprotein; Rsmb, Small Nuclear Ribonucleoprotein assoziiertes Protein; Nfh, Neurofilament Triplet h Protein; Qxyb, Oxysterol-Bindungsprotein.

1

Figur 3: Homologien zwischen Aminosäuresequenzen des γ -Peptides pathogener Neisserien (hier *N. gonorrhoeae* MS11 und R16) und verschiedener Bindegewebsproteine des Menschen.

5

Die ersten sechs gezeigten Homologiebereiche stammen aus den häufigsten Proteinbestandteilen der extrazellulären Matrix des Knorpelgewebes. Das Link-Protein bildet mit Hyaluronsäure und dem Proteoglykan-Kernprotein riesige Aggregate, die durch Wasseraufnahme der Stabilisierung und Elastizität des Knorpels dienen. Diese Bindegewebsbestandteile sind untereinander hoch konserviert und aus duplizierten Sequenzbereichen, den sogenannten Proteoglykan-Tandem-Repeats (PTR), aufgebaut. Während im Link-Protein und im Fibroblasten-Proteoglykan jeweils nur ein einzelner PTR existiert, besteht das Proteoglykan-Kernprotein aus zwei Domänen (G1 und G2) mit je zwei PTR's.

10

15

Die Sequenzen sind im Einbuchstabenkode in der Orientierung vom Amino- zum Carboxylende angegeben. Das γ -Peptid ist in seiner vollen Länge dargestellt, wobei die Serinposition am Aminoende der Position 960 im Iga-Protein von *N. gonorrhoeae* MS11 entspricht (Pohlner et al., 1987). Die Nummern am Aminoende der Sequenzausschnitte geben die jeweiligen Positionen in den menschlichen Proteinen an. Identische Aminosäuren zwischen Iga γ -Allelen und den menschlichen Proteinen sind fett gedruckt. Positionen, die mit Aminosäuren ähnlicher Eigenschaften besetzt sind, sind unterstrichen. Im Anschluß an die Sequenzen ist die Identität mit dem γ -Peptid in Prozent angegeben.

20

25

Figur 4: Übersicht der Sequenzhomologien zwischen menschlichen Proteinen und IPP.

1) Das Polyprotein IPP setzt sich zusammen aus dem Signalpeptid (S) dem enzymatischen Teil (P), dem γ -Peptid (γ), dem α -Peptid (α) und dem β -Core (β). Cys markiert die beiden in allen IPP's konservierten Cysteinreste. Darunter sind die Bereiche dargestellt, die sich bei der Sequenzanalyse verschiedener IPP's als konserviert oder variabel in *N. gonorrhoeae* (2) bzw. *N. meningitidis* (3) erwiesen haben. Schwarz markierte Domänen liegen jeweils variabel, schräg gestreifte Domänen liegen jeweils konserviert vor.

30

35

In den Zeilen 4 - 8 sind die Homologien zu menschlichen Proteinen dargestellt. In Zeile 4 und Zeile 5 markiert ein schwarzes Quadrat eine Homologie von 7 bzw. 6 identischen Aminosäuren an einem Stück. Die in der Zeile 6 mit einem Quadrat markierte Position zeigt einen

1 Bereich innerhalb des IPP an, der eine Sequenzhomologie zu einem
menschlichen Protein von 5 identischen Aminosäuren in Folge hat,
wobei diese Homologie ein Teil eines Fensters ist, indem mindestens
5 7 von 10 Aminosäuren identisch sind. In den Zeilen 7 und 8 sind
Sequenzhomologien der reversen Aminosäuresequenz des IPP von *N.*
gonorrhoeae MS11 mit menschlichen Proteinen dargestellt, wobei ein
Quadrat in siebten Zeile 7 identischen Aminosäuren an einem Stück
entspricht, und ein Quadrat in Zeile 8 dementsprechend 6
Aminosäuren.

10 **Figur 5: Konstruktion des Expressionsplasmids pOK19.**

Das 1032 bp große Insert des Plasmids pOK18 (weiß dargestellt)
kodiert für das 339 Aminosäuren große Link-Protein (s. Fig.6)
Nach Restriktion mit den Enzymen EcoRI und BamHI wurde es über
15 dieselben Schnittstellen in den Vector pEV41a eingesetzt, wodurch
das Expressionsplasmid pOK19 entstand.

Figur 6: Aminosäuresequenz des menschlichen Link-Proteins.

20 Die Sequenz ist im Einbuchstabenkode in der Orientierung vom Amino-
zum Carboxylende angegeben ohne ihre Signalsequenz, welche aus 15
Aminosäuren besteht. Die Nummern auf der rechten Bildseite
bezeichnen die entsprechenden Aminosäurepositionen. Das Sternchen an
der Position 340 bezeichnet das Stopkodon. Der konservative
Aminosäureaustausch gegenüber der von Perkins S.J. et al. (1989)
25 veröffentlichten Sequenz an der Position 27 (Val /Leu) ist fett
gedruckt dargestellt. Die homologen Bereiche zu dem γ -Peptid, wie in
Fig.3 gezeigt, sind unterstrichen.

Figur 7: Proteine des Menschen, die als IgA-Protease Substrate dienen können.

Eine Vielzahl von menschlichen Proteinen enthält eine Abfolge von Aminosäuren, die von IgA-Protease erkannt und geschnitten werden kann (Tab. 6). In einer Auswahl von menschlichen Proteinen sind diese Sequenzen fettgedruckt dargestellt, wobei die Hochzahlen die Lage der dargestellten Abschnitte innerhalb der entsprechenden Proteine angeben. Verwendete Abkürzungen:

10	Ig-A	=	Immunglobulin A-1; C-Kette
	Cd8	=	Cd8; alpha-Kette
	Cd6	=	Cd6
	MsF	=	Makrophagen stimulierendes Protein
	Kol	=	Kollagen alpha-1
	Tf-g	=	T-Zellen spezifischer Transkriptionsfaktor G
	NF-kappa-b	=	Kernprotein NF-kappa-b p100 Untereinheit
	Mse55	=	Serum Protein Mse55
	Il-11	=	Interleukin-11
15	TNF R1	=	Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1
	CC10	=	Complement C-10 Komponente, C-Kette
	Cd2	=	Cd2
	rff	=	MHC Klasse II Regulationsfaktor
	cd45	=	Leukocyten Common Antigen Cd45

Figur 8: Vergleich eines möglichen MHC-Klasse II Bindungsmotivs mit zwei putativen durch IgA-Protease-Aktivität entstandenen kryptischen Selbstpeptiden.

Das von Röttschke und Falk (1994) postulierte Bindungsmotiv für MHC-Klasse II gebundene Peptide ist in Zeile (1) gezeigt. Ac markiert die Position von hydrophoben Aminosäuren, über die eine Verankerung mit dem MHC-Molekül erfolgen kann. X markiert eine Aminosäure, die nicht näher charakterisiert werden kann. In Zeile (2) und Zeile (3) sind anhand von den zwei potentiellen IgA-Protease Substraten CD8 (Cd8; alpha-Kette) und CC10 (Complement C-10 Komponente; C-Kette) die Übereinstimmungen dieses Bindungsmotivs mit Peptiden, die durch IgA-Protease-Aktivität neu entstehen können dargestellt. Direkte Übereinstimmungen mit dem Bindungsmotiv sind in den IgA-Protease Spaltprodukten fettgedruckt.

Figur 9: Homologien verschiedener retroviraler Aspartylproteasen mit der IgA-Protease von Neisserien.

Das Allignment zeigt den Bereich um das katalytische Zentrum der Aspartylproteasen. Fett gedruckte Aminosäuren stellen identische oder ähnliche Reste dar. Folgende Abkürzungen werden verwendet:

MMTV	= mouse mammary tumor virus
HTLV-2	= human t-cell leukemia virus II
SIV	= simian immunodeficiency virus
CIV	= chimpanzee immunodeficiency virus
HIV-2	= human immunodeficiency virus II
HIV-1	= human immunodeficiency virus I
FIV	= feline immunodeficiency virus
EIV	= equine immunodeficiency virus
RRP	= retrovirus related polyprotein from Drosophila
IgA-P	= neisserial IgA-protease

Beispiel 1:

DNA-Sequenzanalyse relevanter IgA-Protease-Genfragmente von *N. meningitidis* Stämmen

Die chromosomale DNA verschiedener Meningokokkenstämme wurde isoliert, die *iga*_{γ α} -Regionen mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in einer Agarosegelelektrophorese auf ihre Größe untersucht. Für die PCR-Amplifikation wurden als Vorwärtsprimer die Oligonukleotide JO154 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCACACCGTTCGGTACAGCA) / JO126 (5'-CAGGAAACAGCTATGACCACACCGTTCGGTACAGCA) und als Rückwärtsprimer die Oligonukleotide JO136 (5'-TGTAACGACGACGGCCAGTATGATGGCGAGGGCGGTGCCGGCA) / JO146 (5'-TGTAACGACGACGGCCAGTATGATGGCGAGGGCGGTGCCGGCA) eingesetzt. Anhand ihrer Länge konnten die amplifizierten DNA-Fragmente in zwei Größengruppen eingeteilt werden. DNA-Sequenzanalysen wurden nach der Dideoxymethode durchgeführt. Die flankierenden Sequenzbereiche wurden mittels PCR-Cyclus-Sequenzierung unter Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Universalvorwärts- (5'-TGTAACGACGACGGCCAGT) und Universalrückwärtsprimern (5'-CAGGAAACAGCTATGACC), sowie parallel dazu unter Einsatz von Fluoreszenz-markierten Dideoxynukleotiden analysiert. Auf diese Art wurde *iga*_γ bei 13 verschiedenen Meningokokken-Stämmen bestimmt. Die Sequenzen der *iga*_{γ α} - Bereiche von *N. meningitidis* D1941 und B1939 wurden nach deren Subklonierung in M13mp18/19 ermittelt. Die Amplifikation wurde nach Standardbedingungen mit dem Primerpaar JO97 (5'-TCGAATTCGGTATTACCGGTTGT) / JO24 (5'-TCCAGCGCATCCAAGGGG) durchgeführt und die DNA-Fragmente anschließend über Agarose-Gelelektrophorese gereinigt. Nach dem Auffüllen der Enden mit Klenow-Polymerase und Nachschneiden am 5'-Ende mit EcoRI- wurden die Fragmente zwischen die EcoRI und HincII-Schnittstellen der M13mp18/19-Vektoren inseriert. Die Größe des *iga*_{γ α} -Fragments vom Stamm B1939 machte für die Sequenzierung eine weitere Subklonierung erforderlich, in der das zentrale PstI-Fragment in die entsprechende Schnittstelle von M13mp19 eingesetzt wurde. Alle verwendeten Klönierungs-

1 und Sequenzierungstechniken entsprachen dem Stand der Tech-
nik und richteten sich nach der Methodenbeschreibung von
Sambrook et al. (Molecular Cloning, A Laboratory Manual. CSH
Press 1989) bzw. nach Herstellerangaben für Enzyme und ver-
5 wendete Geräte (Perkin Elmer Cetus und Applied Biosystems).
Für die iga_{γ} -Domäne von Menigokokken wurden drei Haupt-
allele, repräsentiert durch die Stämme D1941 ($iga_{\gamma 2}$),
Ng17/84 ($iga_{\gamma 3}$) und B48 ($iga_{\gamma 4}$), gefunden (Figur 1). Gegen-
über dem $iga_{\gamma 1}$ -Allel von *N. gonorrhoeae*, das für ein Ala an
10 Position 4 von Iga_{γ} kodiert, enthalten alle Iga_{γ} -Allele von
Meningokokken ein Threonin an der entsprechenden Position
kodiert. $Iga_{\gamma 3}$ unterscheidet sich von $iga_{\gamma 2}$ durch eine Dele-
tion von vier Kodons (Figur 3). Zusätzlich zu dieser Deletion
enthält $iga_{\gamma 4}$ an den Aminosäurepositionen 18 und 19 Serin
15 und Prolin anstelle von Glycin und Alanin, wie bei allen
anderen iga_{γ} -Formen. Die iga_{γ} -Domänen aller bisher untersuch-
ten Stämmen ließen sich in diese vier Gruppen einteilen. Die
entsprechenden DNA-Sequenzen waren in hohem Maß konserviert.
Ein Aminosäureaustausch manifestierte sich durch den Aus-
20 tausch eines einzigen Nukleotids an der Position 1 des ent-
sprechenden Kodons, weshalb man die Anzahl der Aminosäure-
austausche gleichsetzen kann mit der Anzahl der Nukleo-
tidaustausche. Eine zusätzliche Variation in den Iga_{γ} -Pro-
teinen ergab sich an Position 22. Hier wurde entweder Prolin
25 oder Alanin gefunden, wobei dies jedoch nicht spezifisch
einer Gruppe von iga_{γ} -Formen zuzuordnen war.
Die $iga_{\alpha 3}$ - und $iga_{\alpha 4}$ -Allele kodieren für α -Proteine von 169
bzw. 392 Aminosäuren. Im N-terminalen Bereich sind diese
Proteine über 25 Aminosäuren identisch mit dem $Iga_{\alpha 1}$ - und
30 $Iga_{\alpha 2}$ -Allelen (Halter et al., 1989) von *N. gonorrhoeae* Ms11
und R16. Darüberhinaus finden sich zwischen allen vier Al-
lelen ausgeprägte Homologien, die in der Form kurzer Se-
quenzmotive über die Proteine verteilt sind. Neben den Homo-
logien untereinander treten eine Vielzahl von Homologien zu
35 zellulären Proteinen und Matrixproteinen menschlichen Ur-
sprungs auf (Figur 2). Ein monoklonaler Antikörper, der ein
Epitop im konservierten N-terminalen Bereich der α -Proteine

1 erkennt, zeigt eine ausgeprägte Kreuzreaktivität mit Struk-
turen menschlicher Zellen, die ein myosinähnliches Vertei-
lungsmuster aufweisen. In der Ig γ -Domäne treten Homologien
hauptsächlich zu Bindegewebsbestandteilen wie Proteoglykan
5 und Linkprotein auf (Figur 3).

Beispiel 2

Sequenzvergleiche mit menschlichen Proteinen

10 Um herauszufinden, welche Bereiche der IgA-Protease am mole-
kularen Mimikry beteiligt sein können und welche Aminosäure-
sequenzen als mögliche B-Zell-oder T-Zell-Epitope in Frage
kommen wurden computergestützte Vergleiche der Aminosäurese-
quenz des IgA-Protease-Precursors (IPP) mit Proteinen des
15 Menschen durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurde die aus 1532 Aminosäuren bestehende
Sequenz des IPP von *Neisseria gonorrhoeae* MS11 in aufeinander-
folgende Peptide von 50 Aminosäuren Länge unterteilt, die
eine Überlappung von jeweils 10 Aminosäuren aufwiesen. Mit
den so entstandenen IPP-Polypeptiden wurde zunächst unter
20 Verwendung der Wisconsin Sequence Analysis Package von GCG
(Genetics Computer Group Inc.) in verschiedenen Datenbanken
nach Sequenzen, die auch in menschlichen Proteinen vorkom-
men, gesucht. Als Datenbanken standen die SWISS-PROT Daten-
bank, die NBRF PIR(R) Protein Datenbank und die Genpept Da-
tenbank, die die Translationsprodukte aller kodierenden DNA-
Sequenzen aus der Genbank Nukleinsäure Datenbank enthält,
zur Verfügung. Eine Zusammenfassung der erhaltenen Ergeb-
nisse ist in Figur 4 dargestellt. Bereiche des IPP, die ge-
häuften Homologien zu menschlichen Proteinen zeigten, wurden
30 mit Hilfe des Blast Algorithmus (Best local alignment search
tool) nach Altschul et al. 1990, der Fasta Facility (Pearson
and Lipman, 1988) und des Algorithmus nach Smith and
Waterman (1981) unter Verwendung des Blast-Servers am NCBI
in Bethesda, USA und des Blitz-Servers am EMBL in Heidelberg
35 auf Hinweise bezüglich funktioneller oder Struktur-bildender
Eigenschaften untersucht. Handelte es sich um Bereiche, die

1 in den bisher bekannten IPP's variabel sind, wurden alle
Variationen zum Datenbankvergleich eingesetzt.

Bei MHC-Klasse II präsentierten Peptiden konnte bisher
keine einheitliche Länge nachgewiesen werden (Falk et al.,
5 1994). So ist es durchaus möglich, daß die gebundenen Pep-
ptide mit einem oder mit beiden Enden aus der Bindungstasche
herausschauen (Rötzschke and Falk, 1994). Das bedeutet, daß
die terminalen NH₂- und COOH-Gruppen des Peptides bei der
MHC-Peptidwechselwirkung ohne Bedeutung sind. Es wäre also
10 durchaus möglich, daß MHC-Klasse II präsentierte Antigene in
unterschiedlicher Orientierung gebunden werden. deshalb
wurde eine Computersimulation mit dem Peptid LLEQKRAA, dem
"shared epitope" der MHC-Moleküle des mit RA verbunden Typus
DR4 und DR1 durchgeführt. Die "shared epitope hypothesis"
15 wurde erstmals von Gregersen et al. (1987) aufgestellt und
besagt, daß die mit RA assoziierten DR4-Subtypen ein gemein-
sames Epitop besitzen, welches auf den mit RA nicht asso-
ziierten Subtypen nicht vorkommt. Es zeigte sich, daß beide
möglichen Orientierungen des Peptids bezüglich des NH₂-Ter-
minus ähnliche Oberflächeneigenschaften aufweisen. Dies ist
20 um so mehr von Bedeutung, da die Bindung zwischen MHC-Mole-
kül und präsentiertem Peptid nicht von der vollständigen Se-
quenz des Peptids, sondern anscheinend nur von bestimmten
Aminosäuren an distinkten Positionen, sogenannten Ankerposi-
tionen abhängig zu sein scheint (Sinigaglia and Hammer,
25 1994). Grundsätzlich ist es also möglich, daß verschiedene
MHC-Subtypen verschiedene Peptide in unterschiedlicher
Orientierung binden. Aus diesem Grund wurde der IPP von N.
gonorrhoeae mit Hilfe des Computers invertiert und mit den
Proteinen des Menschen verglichen. Es zeigte sich, daß die
30 umgekehrte Sequenz einen signifikant höheren Anteil von
identischen Sequenzen mit menschlichen Proteinen teilt, als
der IPP in seiner nativen Form. (Figur 4)

Man kann darüberhinaus erkennen, daß sich die Homologien
des IPP zu menschlichen Proteinen auf vorwiegend vier Berei-
35 che konzentrieren, auf das γ -Peptid, das α -Protein, einen
Teil des β -Cores, sowie einen konstanten Bereich der Pepti-

1 dase. Die überwiegende Mehrheit der Homologien zu menschli-
chen Proteinen befindet sich in Bereichen, die in den bisher
bekannten IPP-Formen verschiedener Neisserien konserviert
sind. Dies geht mit der Hypothese konform, daß in diesen Be-
5 reichen ein molekulares Mimikry vorliegt, und deutet dar-
aufhin, daß es in diesen Sequenzabschnitten zu einer Anpass-
ung an das Proteinmuster des Wirtes gekommen ist, die sich
evolutionär bewährt haben. Interessanterweise sind die kon-
stanten und die variablen Bereiche der verschiedenen IPPs
10 sowohl bei *N. gonorrhoeae* als auch bei *N. meningitidis* in
der gleichen Anordnung erhalten.

Ausgewählte Beispiele des molekularen Mimikry von IPP sind
in Figur 2 dargestellt. Daraus wird ersichtlich, daß im IPP
eine Vielzahl von Sequenzmustern menschlicher Proteine ko-
15 piert ist, mit dem vorrangigen Ziel das Protein vor der Im-
munantwort des Wirtes, aufgrund der gegen "Selbst" bestehen-
den Toleranz zu schützen. Kommt es dennoch, möglicherweise
durch Miteinbeziehung von flankierenden nicht-identischen
Regionen zu einer Immunantwort, so kann diese sich auch ge-
20 gen das körpereigene Protein richten und bleibt nach dem
Verschwinden des eigentlichen Auslösers durch eine ständige
Stimulation erhalten. Eine Reihe von Teilsequenzen des IPP,
die Homologien zu menschlichen Proteinen zeigen, erfüllen
auch die Kriterien, die bisher für die Bindung von Peptiden
25 durch MHC-Klasse II Moleküle, also zur Antigen-Präsentation
bekannt sind. Der Weg von der bakteriellen Infektion hin zur
Entwicklung der Autoimmunkrankheit ist somit - einmal in
Gang gekommen - unwiderruflich vorgezeichnet. Ein Beispiel,
in Bezug auf RA von besonders großem Interesse, ist das γ -
30 Peptid des IPP. Hier zeigt sich molekulares Mimikry bezüg-
lich menschlichem Link-Protein bzw. Aggrecan (Figur 3), wo-
bei die Kriterien für eine mögliche Antigenpräsentation
ebenfalls erfüllt sind.

Beispiel 3**Herstellung des rekombinanten menschlichen Link-Proteins**

Aus Primärkulturen menschlicher Chondrocyten des Hüftgelenks wurde die Gesamt-mRNA isoliert. Diese mRNA wurde mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben und als Matrize verwendet, um mit Hilfe spezifischer Oligonukleotide (JO123 5'-GCGAATTCCGATCATCTTTCAGACAACTATACT und JO125 5'-AACGGATCCTCATCAGTTGTATGATGATGCTCTGAAGCAGTA) das Gen des Link-Proteins in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren. Nach Aufreinigung und Restriktion mit EcoRI und BamHI wurde das auf diese Weise erhaltene, 1032bp große Fragment in den Vektor pBluescriptII-SK kloniert und sequenziert.

Die Sequenz des Fragmentes (Insert des Plasmids pOK18 siehe Fig.5) stimmt mit der von S.J. Perkins et al. (1989) veröffentlichten bis auf den konservativen Austausch einer Aminosäure (Val/Leu) an der Position 27 überein (siehe Fig.6) Zur Expression des Proteins wurde das pEV41a-System gewählt, dessen MS2-Polymerase-Anteil unter der Kontrolle des λ_{p1} -Promoters eine gesteigerte Proteinsynthese gewährleistet und dessen 6 Histidine eine einfache Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie erlauben (Pohlner et al., 1993).

Der durch diesen Schritt entstandene Vektor pOK19 (siehe Fig.5) wurde durch Elektroporation in den E. coli-Stamm 2136 eingebracht, der im Genom den temperatursensitiven Repressor CI857 besitzt. Nach Temperaturinduktion bei 42° wird das Fusionsprotein in großen Mengen produziert und im Innern der Zelle in Einschlußkörper abgelagert. Nach der Lyse der Zellen werden diese Einschlußkörper in Guanidiniumhydrochlorid gelöst. Das Fusionsprotein wird dann mit Hilfe seines aminoterminalen "Histidin-tags" an eine Nickelsäule gebunden und nach dem Waschen der Säule durch pH-Änderung eluiert (Diagen GmbH, Quigen Inc. QuiaExpress, 1992).

Herstellung von Peptidantiserum:

Weibliche Balb/c-Mäuse wurden intraperitoneal dreimal mit je 100mg des synthetisch hergestellten Pam₃Cys- γ -Peptids (Pam₃Cys-SPAANTASQAQKATQTDGAQIAKPQNIVVA) in Saline immunisiert. Der "Pam₃Cys"- wirksame Anteil der Lipopeptids ersetzt ein Adjuvans (Wiesmüller et al., 1989). Das Antiserum wurde nach dem Stand der Technik gewonnen. Es reagiert im ELISA in einer Verdünnung von 1:2000 sehr gut mit dem synthetischen γ -Peptid, sowie mit den kürzeren Peptiden P2 (TDGAQIAKPQNIVVA) und P3 (QKATQTDGAQIAKPQ). Im Immunoblot erkennt dieses Antiserum sowohl ein rekombinantes γ -Fusionsprotein, als auch das rekombinante Link-Protein (siehe Figur 6). Offensichtlich können also Antikörper, die gegen das γ -Peptid gerichtet sind, auch mit dem menschlichen Link-Protein kreuzreagieren.

Beispiel 4

Kreuzreaktivität des monoklonalen Antikörpers JOP1 mit humanen zellulären Proteinen.

BalbB Mäuse wurden wiederholt mit dem Protein P121, das das gesamten γ - und α -Bereich des IPP von *Neisseria gonorrhoeae* MS11 enthält, immunisiert. Nach Hybridisierung der erhaltenen Makrophagen mit der Zelllinie NS-1 und wiederholter Subklonierung fanden sich sieben monoklonale Antikörper produzierende Zellklone. Alle Verfahren wurden unter Standardbedingungen durchgeführt. Einer der produzierten monoklonalen Antikörper, mit JOP1 bezeichnet, erkannte ein konserviertes Epitop von ca. 12 Aminosäuren (QAKAEQVKRQQA) am Aminoende der *Neisseria* α -Proteine 1-4. Dies konnte durch Epitop-Kartierung unter Verwendung von Immunoassays im Anschluß an Kolonieblotting mit einer Vielzahl rekombinanter *E coli*-Stämme, die unterschiedliche α - und γ -Proteine exprimierten, gezeigt werden. Mit menschlichen Zellen (Chang-Konjunktiva) zeigte JOP1 eine Kreuzreaktion, die sich in der indirekten Immunfluoreszenzmikroskopie wie eine Myosin-spezifische Färbung der Zellen äußerte. (ohne Abb.)

1

Beispiel 5**MHC-Bindungstest**

5

10

15

20

25

30

35

Kommerziell erhältliche EBV-transformierte homozygote B-Zelllinien (Kimura et al., 1992), wurden in großen Maßstab kultiviert. Durch die Virustransformation zeigen diese B-Zellen eine stark erhöhte Expressionsrate von MHC-Klasse II Molekülen (Gorga et al., 1987), was deren Isolierung über Affinitätschromatographie ermöglicht. Dazu wurde ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch HLA-DR Moleküle erkennt, an CNBr-aktivierte Sepharose gekoppelt (Halter et al., [1993]). Ungefähr 1 mg der aufgereinigten MHC-Dimere wurden bei 37° und pH 5.5 mit etwa 0,1 mg eines Fluoreszenzmarkierten Peptides (als Fluorochrom wird AMCA verwendet; siehe Kalbacher, 1992), das bekannte Bindungsaffinitäten besitzt, inkubiert. Nach 48h wird der Ansatz mit Hilfe einer Gelfiltrationsmethode (High Pressure Size Exclusion Chromatographie, Superdex TM75) aufgetrennt und das Verhältnis Fluoreszenz (F) zu Proteinmenge (UV) bestimmt. Dieser Wert repräsentiert 100% Bindung. Im nächsten Schritt werden dann zusätzlich unmarkierte Peptide im 20-fachen Überschuß zugegeben und die Verringerung des F/UV -Wertes als Maß für die Bindung an das entsprechende Allel definiert (Kropshofer et al., 1993). Auf diese Weise wurde in Kompetitionsassays die Bindung verschiedener Abschnitte des γ -Peptids, sowie verschiedener humaner Peptide an für die Ätiologie von Rheuma bedeutsame HLA-Allele untersucht (Tabelle I).

Tabelle I

Für die Ätiologie von Rheuma bedeutsame HLA-Allele.
Mit "+" gekennzeichnete Allele sind genetisch assoziiert mit
Rheumafaktor positiver rheumatoider Arthritis (RA; Wordsworth . et
al., 1992).

HLA-Allel:	Name	Workshop Nr.:	RA-Association:
HLA-DR1w1	WT100Bis	9006	+
HLA-DR3	Cox	9022	-
HLA-DR4w4	WT51	9029	+
HLA-DR4w4	BSM	9032	+
HLA-DR4w13	YHAF	9030	-
HLA-DR4w14	BM92	9092	+

Dabei konnte gezeigt werden, daß die Peptide P3 und P4
(Tabelle VII) aus der mittleren Region des γ -Peptides, wel-
che die homologen Bereiche enthält, Affinität zu den HLA-Al-
lelen DR1 und DR4, die beide mit RA assoziiert sind, aufwei-
sen. Dies ist in Tabelle II dargestellt. Die HLA-Allele
DR4w13 und DR3 sind nicht mit RA assoziiert und wurden als
Kontrolle verwendet.

Tabelle II

MHC-Bindung der neisserialen Peptide:

Ergebnisse des MHC-Bindungsassays der neisserialen Peptide P1-P6 (Tab.8) im Vergleich zu den fluoreszenz-markierten Referenzpeptiden S1, S2 oder S3 (Tab.8) an verschiedenen MHC-Allelen (Tab.1).

	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	S 1	S 2	S 3
DR1Dw1	0%	0%	16%	16%	10%	9%	92%	-	-
DR4Dw4	0%	19%	24%	38%	0%	0%	-	86%	-
DR4Dw13	0%	0%	0%	14%	6%	11%	-	82%	-
DR4Dw14	0%	0%	18%	0%	8%	0%	-	87%	-
DR3	0%	0%	0%	0%	0%	0%	-	-	92%

Aminoterminal Peptide der zum γ -Peptid homologen humanen Bereiche wurden ebenfalls diesem Bindungsassay unterworfen. Das Peptid H3 (HPTKLTIDEAVQACL) entstammt aus einer Region des menschlichen Link-Proteins, die 40% Identität zum neisserialen Antigen besitzt. H3 bindet mit hoher Affinität an die Allele DR1 und DR4.

Tabelle III

MHC-Bindung der Peptide humanen Ursprungs

Die Kompetition der Peptide humanen Ursprungs (H1-H6, sowie N5 und N6) wurde an den Allelen DR1Dw1 und DR4Dw4 im Vergleich zu dem Referenzpeptid S2; an dem HLA-Typ DR3 im Vergleich zu S3 gemessen.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	N5	N6	S2	S3
DR1Dw1	0%	0%	8%	0%	0%	90%	25%	11%	43%	94%	-
DR4Dw4	0%	0%	36%	0%	8%	20%	0%	10%	1%	70%	-
DR3	0%	0%	75%	0%	0%	8%	14%	11%	14%	-	92%

Wenn also Antigen präsentierende Zellen Link-Protein aufnehmen und prozessieren, was für Monozyten und B-Zellen beschrieben wurde (Martin et al., 1992), besteht eine hohe Wahrscheinlichkeit, daß sie das Epitop H3 präsentieren. Damit ist die notwendige Voraussetzung für eine kreuzreaktive T-Zell Erkennung gegeben.

Beispiel 6

Antigenspezifische Aktivierung von peripheren T-Lymphozyten aus RA-Patienten

Die Aktivierung von T-Zellen durch Antigene bzw. Mitogene läßt sich durch die Induktion verschiedener T-Zellfunktionen, wie Proliferation, Zytokinbildung oder Expression von Aktivierungs-markern (IL-2 Rezeptor, HLA-DR u.a.) qualitativ wie quantitativ erfassen. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist es, die Existenz von Peptid-spezifischen T-Zellen im peripheren Blut von Rheumapatienten (charakterisiert nach ACR-

1 Kriterien) nachzuweisen. Um dieses zu überprüfen, nutzen wir
in unserem Testsystem die Eigenschaft von T-Zellen, nach an-
tigener Stimulation zu proliferieren. Neben einem neisseria-
len Peptid, dem sogenannten γ -Peptid, wurde das Link-Peptid
5 (L40) (Tabelle VII) als Antigen in einem T-Zellprolifera-
tionstest (s.u.) verwendet, das besonders deutliche Homolo-
gien in der Aminosäuresequenz mit γ -Peptid aufweist (siehe
Beispiel 3, Figur 5). Die mononukleären Zellen (MNZ) wurden
aus heparinisierten Vollblut (20 U/ml) mit Hilfe der Ficoll-
10 Dichtegradienten-zentrifugation isoliert (Böyum, 1969). Das
Blut wurde 1:2 mit Hanks' BSS verdünnt und je 30 ml des Ge-
misches auf 15 ml Ficoll-Hypaque (Dichte 1,077 g/ml) ge-
schichtet. Nach anschließender Zentrifugation im Aus-
schwingrotor (35 min, 400 x g, 21°C) wurde das überstehende
15 Plasma steril abgesaugt und die MNZ mit Hilfe einer Pasteur-
pipette aus der Interphase geerntet. Danach wurden die MNZ
noch zweimal mit Hanks' BSS gewaschen und in einer bestimm-
ten Zellzahl in RPMI 1640 aufgenommen. Die Lebendzellzahl
wurde durch mikroskopische Auszählung in der Neubauerzähl-
20 kammer nach Trypanblaufärbung ermittelt. Die obengenannten
Peptide wurden unmittelbar vor dem Test in RPMI 1640 (ohne
Serum, + 1 % Glutamin + 50 μ g/ml Penicillin und 50 μ g/ml
Streptomycin) auf eine Konzentration von 20 μ g/ml einge-
stellt. Als bakterielles Kontrollantigen wurde Tetanustoxoid
25 (TT) verwendet, das in einer Endkonzentration von 2,5 LF/ml
vorlag. Die Proliferationsrate der MNZ wurde über den Einbau
von ^3H -Thymidin während der DNA-Synthese bestimmt.

Für den Proliferationsansatz wurden die Zellen in einer Kon-
zentration 1×10^5 Zellen/Vertiefungen in Rundboden-Mikroti-
30 terplatten zusammen mit den entsprechenden Peptiden (25
 μ g/ml) in einem Volumen von 100 μ l für 2 Stunden bei 37°C im
Kulturschrank (5 % CO_2) vorinkubiert. Anschließend wurde zu
jeder Vertiefung 50 μ l RPMI, supplementiert mit 15 %
hitzeinaktiviertem menschlichen Serum der Blutgruppe AB, zu-
gegeben und die Platten 7 Tage (bzw. 10 Tage bei Zugabe von
35 IL-2, s.u.) kultiviert. 24 Stunden vor der Ernte wurde mit

1 dem radioaktivem Isotop (^3H -markiertes Thymidin, Amersham, 0,2 $\mu\text{Ci/Vertiefung}$) markiert.

5 In einem Teil der Ansätze wurden die Zellen nach 6 Kulturtagen mit dem wachstumsfördernden Zytokin IL-2 (20 U/ml) versehen und weitere 3 Tage kultiviert, bevor diese mit ^3H -Thymidin für 24 Stunden markiert wurden. Unter Zugabe von IL-2 lassen sich auch potentiell reaktive anerge T-Zellen zur Proliferation anregen, die möglicherweise zwar durch ein ähnlichen antigenes Peptid "getriggert" werden, aber denen
10 kostimulatorische Signale fehlen (Meuer et al., 1986). Die Platten wurden nach Ablauf der Kulturzeit zunächst bei -20°C eingefroren und später mit einem Zellerntegerät auf Filtermatten aufgebracht. Die Einbaurate des radioaktiven Isotops wurde durch Flüssigkeitsszintillationsmessungen im LKB-Counter (Pharmacia) bestimmt. Von jedem Stimulationsansatz
15 wurde der Mittelwert der counts per minute (cpm) von je drei Vertiefungen (Triplicets) ermittelt.

In den Ansätzen mit den relevanten Antigenen zeigte sich, daß die T-Zellen von zwei Patienten, Nr. 3 und 5 (bei Nr. 6 gab es nur eine schwache Stimulation), der insgesamt acht
20 RA-Patienten mit dem Link-Peptid reagierten Tabelle IV.

25

30

35

Tabelle IV

Antigenspezifische Proliferation von T-Zellen.
PBMC von RA-Patienten wurden mit den angegebenen Peptiden (z.T. mit Zusatz von 20 U/ml IL-2) kultiviert und die Proliferationsraten nach 7 Tagen (bzw. 10 Tagen) bestimmt. Die hier angegebenen Zahlenwerte sind Stimulationindices, die sich aus dem Mittelwert der experimentellen cpm (+ Antigen)/Mittelwert Kontroll-cpm (ohne Antigen) errechnen. (< = Stimulationindex < 2; nd = nicht durchgeführt)

RA-Patienten:.	1	2	3	4	5	6	7	8
LINK-PEPTID	<	<	10	<	11	2	<	<
LINK PEPTID + IL-2	nd	8	7	nd	nd	3	5	3
γ-PEPTID	<	<	3	<	5	<	<	<
γ-PEPTID + IL-2	nd	4	3	nd	nd	<	<	<
Control-Antigen TT	6	20	45	4	26	4	<	3

1 Genau bei denselben Patienten ließ sich auch eine T-Zellre-
aktion auf das γ -Peptid feststellen. Interessanterweise
konnte eine Proliferation sowohl auf Link- als auch auf γ -
5 Peptid in einem Fall erst durch die Zugabe von IL-2 indu-
ziert werden (Patient Nr. 2). Die schattierten Kästchen in
der Tabelle IV dokumentieren die Übereinstimmungen der Pro-
liferationsraten als Folge der Stimulation mit dem Link-Pep-
tid bzw. γ -Peptid. Die T-Zellen dieser Spender zeigten auch
10 eine sehr gute durch Tetanustoxoid ausgelöste Proliferation,
ein Indiz für die gute antigene Stimulierbarkeit der Zellen
dieser Spender. Eine Proliferation nach Gabe von IL-2 konnte
zwar auch in den mit Link-Peptid stimulierten Zellen der Pa-
tienten 6, 7 und 8 festgestellt werden, dort ließ sich je-
15 doch keine Proliferation in Verbindung mit γ -Peptid und IL-2
nachweisen. Die Daten beweisen die Existenz von Peptid-spe-
zifischen T-Zellen im peripheren Blut von RA-Patienten, die
unter definierten Bedingungen sowohl durch das Link-Peptid
wie auch durch das homologe γ -Peptid zur Proliferation sti-
muliert werden können. Die Isolierung und Etablierung anti-
20 genspezifischer T-Zellen aus dem peripheren Blut von Rheuma-
patienten scheint unter diesen Gesichtspunkten erfolgsver-
sprechend. Allerdings ist die nähere Charakterisierung der
Patienten z.B. hinsichtlich des MHC-Alleltyps notwendig, um
gemäß der hier gezeigten bevorzugten Bindungsaffinitäten der
25 untersuchten Peptide an RA-assoziierte MHC-Allele DR1, DR4Dw4
und DR4Dw14 (Beispiel 4) eine T-Zell Reaktion *in vitro* di-
rekt zu korrelieren. Diese unter optimierten und definierten
Bedingungen isolierten und etablierten T-Zellklone ließen
sich dann hinsichtlich ihrer Kreuzreaktivität auf Link- bzw.
30 γ -Peptid testen. Mit Hilfe des Proliferationstests ließen
sich dann Bindungsmotive und potentielle T-Zellepitope des
Peptids studieren, genau definieren und als Immundiagnostika
einsetzen.

Beispiel 7**Aufnahme des α -Proteins und von IPP-Intermediaten**

Wir konnten kürzlich zeigen, daß neben der Protease als wichtiger Virulenzfaktor ein weiteres Produkt des posttranslational gespaltenen Polyproteins funktionelle Eigenschaften enthält (Pohlner et al., 1994). Dieses α -Protein kommt sowohl in allen pathogenen *Neisseria gonorrhoeae* als auch *Neisseria meningitidis* Stämmen vor. Es offenbart sehr gute Sequenz- und Strukturhomologien zu bekannten viralen und eukaryontischen Proteinen (siehe Beispiel 11/ Beispiel 12). Eine bisher einzigartige Fähigkeit des α -Proteins besteht darin, daß es durch Inkubation mit Zellen von diesen durch Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und im Kern akkumuliert werden kann. Daß dies ein spezifischer Prozeß ist wird dadurch bestätigt, daß nur wenige Zelltypen diese Kernlokalisation zulassen. Außer humanen Primärzellen, die auch *in vivo* natürliche Habitate des Pathogens darstellen, konnten bisher keine Zelllinien gefunden werden, die diese Eigenschaft besitzen. Dagegen haben aber alle getesteten Zelllinien die Möglichkeit das Protein aufzunehmen, in lysosomenähnliche Kompartimente zu transportieren und dort zu degradieren. Die Lokalisation im Kern der Wirtszelle wird, wie wir zeigen konnten, durch eine oder mehrere Kernlokalisationssignale vermittelt (Pohlner et al., 1994). Der genaue experimentelle Versuchsablauf zur Detektion dieser Lokalisation sieht folgendermaßen aus:

Die bei 30°C in DMEM 5 % FKS (foetales Kälberserum) gelagerten explantierten Corneas werden mit einem sterilen Skalpell in 16 gleichgroße Gewebestückchen geteilt und bis zu einem präkonfluenten Wachstumsstadium (80 % des Deckglases bewachsen) in 24 "Well"-Platten (Nunc, Dk) auf Deckgläschen inkubiert (Es wurden humane Corneas aus dem Interuniversity Ophthalmologic Institute, Academic Medical Center, Amsterdam verwendet). Die Orientierung der Cornea-Fragmente auf den Deckgläschen ist mit der Endothelseite nach unten. Das verbrauchte DMEM-Medium mit 5 % FKS wird jetzt gegen frisches

1 Medium ohne FKS ausgetauscht (dieser Schritt dient dazu Re-
zeptoren, die durch Serumproteine besetzt sind, frei zu ma-
chen). Nach einer Stunde Inkubation wird das Medium wiederum
5 gewechselt. Die Zellen werden nun in FKS-freiem, mit α -Pro-
tein (5 mg/ml) supplementierten Medium für weitere fünf
Stunden kultiviert (Dieses rekombinante α -Protein wurde in
einem überproduzierenden E.coli Stamm (UT 5600, OmpT⁻) als
Fusionsprotein mit "His-Tag" expremiert, über eine Nickel-
10 Agarose (Ni²⁺-NTA-Agarose, Quiagen) vom Zellysat abgetrennt
und mit Hilfe einer Affinitätschromatographie (BioRex 70,
BioRad) aufgereinigt. Physiologische Pufferbedingungen wur-
den durch Dialyse gegen 1 x PBS, ohne divalente Kationen,
erhalten. Hieran schließen sich Fixierung und Permeabilisie-
rung der Zellen an; diese Schritte erlauben es schließlich
15 eine Immunfluoreszenzmikroskopie durchzuführen:

Die Zellen werden einmal mit 1 x PBS (ohne divalente Katio-
nen) gewaschen und für 10 min mit einer 1 % Paraformaldehyd-
lösung (in 1 x PBS) fixiert. Mit einer 0,5 % Triton X-100
Lösung (in 1 x PBS) werden nun die Zellen 30 min permeabili-
20 siert. Anschließend wird die in 1 x PBS/1 % BSA verdünnte
Primär-Antikörper Lösung zwei Stunden bei Raumtemperatur
oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nichtgebundener Primär-
Antikörper wird dreimal 10 min mit 1 x PBS/0,05 % Tween 20
abgewaschen und ein Fluoreszenzfarbstoff markierter Sekun-
25 därantikörper/Protein A wird in den entsprechenden Verdün-
nungen mit den Zellen für 30 min inkubiert. Weitere drei
Waschschritte schließen sich an (In dem ersten dieser Wasch-
schritte kann man eine DAPI-Färbung durchführen). Zum Schluß
erfolgt das Eindeckeln der Gläschen mit einer 0,3 % Propyl-
30 gallat-Lösung in Glycerin. Diese so behandelten Proben sind
jetzt mehrere Monate lang ohne nennenswerte Verluste der
Fluoreszenzintensität einsetzbar.

Eine weitere Klasse von humanen Primärzellen, die das α -Pro-
tein endozytieren und im Nukleus akkumulieren können sind
35 Lymphozyten und Makrophagen. Dies konnte mit mononukleären
Tellen (MNZ) aus Vollblut verschiedener Spender gezeigt wer-
den. Die MNZ werden, wie in Beispiel 6 beschrieben, über

1 eine Dichtegradientenzentrifugation isoliert, in kaltem
RPMI-Medium resuspendiert und gezählt. Zwischen 5×10^5 und
1 1×10^6 MNZ können für ein Aufnahmeexperiment eingesetzt
werden. Nach einer einstündigen Inkubation der Zellen mit
5 serumfreiem RPMI Medium erfolgt der Uptake des α -Proteins
analog der Prozedur, wie für die Cornea Zellen beschrieben.
Je nach dem Immunstatus der Spender konnte man in der Immun-
fluoreszenz vor allem bei Subpopulationen der rundkernigen
Lymphozyten oder bei nahezu allen Zellen eine Aufnahme und
10 Kernakkumulation erkennen. Der in Beispiel 8 dargestellte
immunsuppressive Effekt des α -Proteins könnte durch die hier
beschriebene Endozytosefähigkeit erklärt werden. Nach sehr
kurzer Inkubationszeit mit α -Protein (weniger als 1,5 Stun-
den) sind nur wenige Zellen mit Kernakkumulation zu finden.
15 Hier kann man aber bei vielen Zellen eine stark ausgeprägte
Oberflächenfluoreszenz feststellen. Genau wie die Hemmung
der antigeninduzierten T-Zell Proliferation durch das Tat-
Protein kann der immunsuppressive Effekt des α -Proteins auch
auf Bindung an und Hemmung des CD26 Aktivierungsmarkern von
20 T-Zellen beruhen (Gutheil et al., 1994). Die autokatalyti-
sche Prozessierung des IgA-Protease Polyproteins findet in
der extrazellulären Umgebung statt. Dieser Prozeß ist kon-
zentrationenabhängig und wird vor allem bei Überexpression im
heterologen *Escherichia coli* System beobachtet. Solch hohe
25 Konzentrationen werden in vivo bei IgA-Protease positiven
Stämmen wohl nicht erreicht.

Diese Beobachtung läßt die Schlußfolgerung zu, daß sich ein
weiterer Wirkort der proteolytischen Aktivität innerhalb von
Wirtszellen befindet. Möglicherweise gelangt eine intermedi-
äre Form des Polyproteins über die Carrierfunktion des α -
30 Proteins in Zielzellen und kann aufgrund von veränderten
zellulären Bedingungen auf dem Weg zum Kern abgekoppelt wer-
den. Beispiele hierfür geben die im Aufbau und Organisation
ähnlichen Retroviren. Bei diesen wurde bis heute die Proteo-
lyse verschiedener Zytoskelett- und Regulationselemente ge-
35 zeigt (Reviere et al., 1991).

Beispiel 8**Suppression der T-Zellantwort durch α -Protein**

Die T-Zellen sind direkt als zytotoxische T-Zellen an der Abwehr von Viren und Mikroorganismen beteiligt bzw. regulieren als sog. T-Helferzellen durch die Bildung und Sekretion von Zytokinen die zellulären und humoralen Immunreaktionen. Mikroorganismen, die wie Neisserien den menschlichen Wirt infizieren und kolonisieren, müssen koevolutiv Fähigkeiten entwickelt haben, das Immunsystem des Wirtes zu beeinflussen. Dabei erscheint die Regulation der spezifischen Immunantwort von besonderer Bedeutung zu sein. Für die Manipulation dieser Regulation gibt es einige interessante Beispiele. So inhibieren Mycobakterien die Antigenprozessierung oder beeinflussen Staphylokokken und Salmonellen die Antigenpräsentation; in beiden Fällen führt dies letztlich zu einer verminderten T-Zell Reaktion (Marrack and Kappler, 1994; Pryjma et al., 1994). Ein weiteres Beispiel von Immunsuppression wurde erstmals 1989 mit dem retroviralen Tat-Protein festgestellt (Viscidi et al., 1989; Meyaard et al., 1992). In der üblichen Funktion reguliert dieses Protein die Transkription von viralen Genen. Neuere Studien konnten jedoch zeigen, daß das Tat-Protein auch die antigenspezifische T-Zellproliferation zu hemmen vermag, ohne jedoch die polyclonale Aktivierung von T-Zellen generell zu beeinflussen (Viscidi et al., 1989). Auf die strukturelle Ähnlichkeit des bakteriellen α -Proteins mit dem viralen Tat-Protein wird noch in Beispiel 12 ausführlich eingegangen. Basierend auf dieser Übereinstimmung sollte in folgender Studie geprüft werden, inwieweit auch das α -Protein eine spezifische Inhibition der T-Zellreaktion bewirken kann. Dazu wurden MNZ aus Vollblut eines Tuberkulin-positiven Spenders, wie in Beispiel 6 beschrieben, isoliert. Als Teil des Experiments wurden zusätzlich die Monozyten durch Plastikadhärenz (1 Stunde, 37°C, 5 % CO₂, serumfrei) partiell entfernt. Die so bezeichneten Non-adhärenenten Zellen (NAZ) enthielten weniger als 2 % Monozyten. MNZ bzw. NAZ wurden auf eine Konzentra-

tion 1×10^6 Zellen/ml eingestellt und unter serumfreien Bedingungen mit dem α -Protein ($5 \mu\text{g/ml}$ in RPMI) 1h bei 37°C vorinkubiert. Die Inkubation der Zellen mit Zellkulturmedium ohne α -Protein wurde parallel als Kontrolle verwendet. Danach wurden die Zellen in Flachbodenmikrotiterplatten ($0,5 \times 10^5$ c/Vertiefung; Volumen $200 \mu\text{l}$) mit RPMI + 10 % hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum weiterkultiviert. Die T-Zellen wurden mit dem Lektin PHA ($1 \mu\text{g/ml}$) bzw. dem Antigen Tuberkulin, PPD ($10 \mu\text{g/ml}$) stimuliert, das unter den unten angegebenen Kulturbedingungen eine spezifische und starke Reaktion bereits nach 4 Kulturtagen garantiert (Lorenzen, 1992). Nach 3 Tagen Kultur wurden die Zellen mit ^3H -Thymidin ($0,2 \text{ mCi/Vertiefung}$) markiert, 18 Stunden später geerntet und mit Hilfe der Liquidszintillationszählung im LKB-beta-plate Counter gemessen. Die Auswertung dieses Experiments ist in der Tabelle V wiedergegeben.

Tabelle V

Effekt von α -Protein auf die Proliferation von T-Zellen.
 Mononukleäre Zellen (MNZ) bzw. nonadhärente Lymphozyten (NAZ) wurden für 1 h mit α -Protein oder mit Medium vorbehandelt. Anschließend werden sie mit 10 μ g/ml Tuberkulin PPD (= Purified Protein Derivative) oder 1 μ g/ml PHA (= Phytohämagglutinin) in RPMI + 10% FKS stimuliert. Die Proliferation kann nach 4 Kulturtagen durch den Einbau von Tritium markiertem Thymidin bestimmt und als cpm x 1000 angegeben werden

Ansätze	Kontrolle Medium	Stimulation	
		+ PPD	+ PHA
MNZ	ohne α -Protein	2,2	18,0
	mit α -Protein	60,4	2,9
NAZ	ohne α -Protein	1,7	19,3
	mit α -Protein	67,3	9,7

1 Die Ergebnisse sind Mittelwerte, die sich aus Dreifachbe-
stimmungen errechnen. Die PPD-induzierte T-Zellproliferation
ist nach Behandlung mit α -Protein in beiden Ansätzen deut-
lich verringert, während die polyklonale Aktivierung mit PHA
5 nicht signifikant gehemmt wurde. Dieser Versuch zeigt, daß
das neißseriale α -Protein nicht nur biochemische und zell-
biologische Ähnlichkeiten mit dem Tat-Protein aufweist, son-
dern auch immunphysiologisch ähnliche Eigenschaften besitzt.
Insbesondere die ähnliche Wirkung auf T-Zellen, bei der se-
10 lektiv die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen ge-
hemmt wird, legt den Schluß nahe, daß dieser biologische Ef-
fekt möglicherweise auf den bei beiden Proteinen festge-
stellten Kerntransport innerhalb der eukaroyntischen Zellen
beruht (siehe Beispiel 7). Eine derartige Suppression be-
15 stimmter antigenspezifischer T-Zellklone könnte z.B. durch
Ausschaltung suppressiver T-Zellen oder bestimmter Zytokin-
produzierender T-Zellen, das Gleichgewicht des immunologi-
schen Netzwerkes stören und letztlich auch zur Entstehung
und Aufrechterhaltung von Autoimmunkrankheiten wie RA bei-
20 tragen.

Beispiel 9

Schnittstellen von IgA-Protease in menschlichen Proteinen -
Fehlsteuerung der Immunantwort.

25 Die bisher bekannten Substrate der IgA-Protease sind das
menschliche Immunglobulin A und das Vorläuferprotein der
IgA-Protease selbst. Das heißt, die IgA-Protease entfaltet
eine autokatalytische Aktivität, um aus dem IPP die ver-
30 schiedenen funktionellen Einheiten herauszuschneiden. Aus
den erhaltenen Spaltprodukten können die dabei erkannten und
geschnittenen Aminosäuresequenzen bestimmt werden (Klauser
et al., 1993; Plaut et al., 1975). Sie lassen sich vereinfacht
durch das Schema Y-P-|-X-P beschreiben. Die Hydrolyse
35 der Peptidbindung durch die IgA-Protease erfolgt innerhalb
dieser linearen Erkennungssequenz, wobei die Präsenz dieser
Sequenz hinreichend ist für eine spezifische Spaltung durch

1 das Enzym (Pohlner et al., 1992). Die bisher bekannten und
verwirklichten Variationen der Erkennungssequenz sind in Ta-
belle VI gezeigt.

5

Tabelle VI

Aufstellung der Schnittstellen von Iga-Protease und der
Proteine in denen diese erkannt werden (Pohlner et al., 1992).
Die bisher bekannten Substrate der Iga-Protease sind das
10 Immunglobulin A des Menschen und die jeweiligen Iga-Protease
Vorläuferproteine selbst. Aus der Zusammenstellung der gespaltenen
Sequenzen ergibt sich als allgemeingültiges Spaltmotiv der Iga-
Protease "YP|XP", wobei (|) die hydrolysierte Bindung symbolisiert.

15

Organismus	Stamm	Protein	Schnittsequenz
Mensch	/	IgA-1	PP TP
<i>N. gonorrhoeae</i>	MS11	Iga-Protease (<i>igab</i>)	PP SP
<i>N. gonorrhoeae</i>	MS11	Iga-Protease (<i>igac</i>)	PP AP
20 <i>N. gonorrhoeae</i>	MS11	Iga-Protease (<i>igaa</i>)	PAP SP
<i>N. gonorrhoeae</i>	NG74	Iga-Protease (<i>igaa</i>)	PGP SP
<i>N. meningitidis</i>	D1941	Iga-Protease (<i>igaa</i>)	PTP SP

25

30

35

Die durch Computer-gestützte Vergleiche erhaltenen Sequenz-
daten zeigen, daß ein Anteil von 7 Prozent aller menschi-
chen Proteine eine potentielle Iga-Protease-Schnittstelle
trägt, wovon eine Auswahl interessanter Beispiele in Abbil-
dung 9 dargestellt ist. Bei einer überraschend hohen Anzahl
der gefundenen menschlichen Proteine mit Iga-Protease-
Schnittstellen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren
oder um zelluläre Rezeptoren. Es erscheint plausibel, daß
durch die Aktivität der Iga-Protease beim Wirtsorganismus
ein extrazellulärer Rezeptoranteil abgespalten wird und so
eine korrekte Signalerkennung nicht mehr möglich ist. Ande-
rerseits könnte durch Abspaltung eines intrazellulären Re-

1 zeptoranteils die Signalweitergabe verhindert werden. Beide
Fälle hätten konsequenterweise eine Fehlsteuerung der Im-
munantwort zur Folge. Eine regulatorische Fehlsteuerung von
5 Zellen auf DNA-Ebene wäre durch die Spaltung eines Transkrip-
tionsfaktors wie NF-kappa-B (Figur 9) zu erklären. Die Bil-
dung von immunogenen Proteinen oder auch die für die Im-
munantwort wichtige Proliferation bestimmter Zellen könnte
somit verhindert werden oder außer Kontrolle geraten.

10 Die durch Datenbankvergleiche in menschlichen Proteinen ge-
fundenen IgA-Protease-Schnittstellen werden tatsächlich von
dem Enzym erkannt und geschnitten, wie anhand des Leukozyten
Oberflächenmarker CD8 gezeigt werden konnte (Pohlner et al.,
1992). Zu diesem Zweck wurde ein 205 Aminosäuren langes
15 Fragment von CD8, das die potentielle IgA-Protease-Schnitt-
stelle enthielt (Figur 9), mit einem N-terminalen Teil der
MS2 Polymerase fusioniert und in *E. coli* exprimiert. Das
gereinigte Fusionsprodukt wurde durch die IgA-Protease ge-
spalten. Die N-terminale Peptidsequenzierung zeigte schließ-
lich, daß die IgA-Protease-Sequenz innerhalb des Bereiches
20 von CD8, wie vorhergesagt, erkannt und hydrolysiert worden
war.

Beispiel 10

Erzeugung kryptischer Selbstepitope

25 Eine Möglichkeit, wie es infolge einer Neisserien-Infektion
zu einer Fehlsteuerung des Immunsystems kommen kann, ist die
Elimination regulatorischer oder sensorischer Proteinen
durch die Aktivität der IgA-Protease (Beispiel 9). Eine wei-
30 tere Möglichkeit besteht in der Entstehung von Spaltproduk-
ten aus Wirtsproteinen, die als verändertes Selbst oder
Fremdpeptid erkannt werden und so die Immunantwort in eine
falsche Richtung lenken.

35 Während über die Eigenschaften der Antigen, die von MHC-
Klasse I präsentiert werden, schon recht detaillierte Vor-
stellungen existieren (Falk et al., 1991), sind die Kennt-
nisse über gemeinsame Eigenschaften von präsentierten Pepti-

1 den an MHC-Klasse II Moleküle, zu der auch der mit RA in
Verbindung gebrachte Subtyp DR4 gehört, noch sehr vage
(Rötzschke and Falk, 1994). Nicht einmal die Länge dieser
5 Petide erwies sich bisher als einheitlich, wobei jedoch die
überwiegende Anzahl aus 14-16 Aminosäuren bestand.
Die Pool-Sequenzierung von MHC-Klasse II gebundenen Peptiden
ergab, daß ein Anteil von über 30 % der natürlichen Liganden
an Position 2, vom Aminoende her betrachtet, ein Prolin be-
10 sitzt (Rötzschke and Falk, 1994). Auch am Carboxy-Ende läßt
sich ein gehäuftes Auftreten von Prolin nachweisen. Die ter-
minale Anhäufung von Prolin-Resten ist möglicherweise auf
die reduzierte Abbaubarkeit einer solchen Aminosäuresequenz
durch Exoproteasen zurückzuführen. Dies ist also eher eine
15 Folge der Prozessierung und steht nicht im Zusammenhang mit
der Bindung an ein bestimmtes MHC-Molekül. Zwischen den ter-
minalen Prolinen befindet sich eine Kernregion von etwa 9
Aminosäuren Länge, über die die spezifische Bindung erfolgt.
Diese Bindung wird durch hydrophobe Aminosäuren vermittelt,
die sich gehäuft an den Positionen 1, 4, 6 und 9 des Peptid-
20 kerns befinden, die auch als hydrophobe Ankerpositionen be-
zeichnet werden. Ein MHC-Klasse II präsentierte Antigen be-
steht also aus einem prozessierten Peptid mit flankierenden
Prolin-Resten, das ein zentrales Kernepitop mit definierten
hydrophoben Ankerpositionen enthält (Figur 10). Die Eigen-
25 schaft an zweiter Position ein Prolin zu tragen, ist jedoch
nicht nur auf MHC-Klasse II präsentierte Peptide beschränkt.
Auch eine Reihe von Peptiden, die mit verschiedenen MHC-
Klasse I Allelen assoziiert sind, zeigen an Position 2 ein
gehäuftes Auftreten von Prolin (Engelhard, 1994).
30 Aus Tabelle VI wird deutlich, daß eine Vereinheitlichung der
bisher bekannten Schnittstellen der IgA-Protease zu dem Mo-
tiv X-P-Y-P führt, wobei X entweder Prolin oder Prolin-Ala-
nin, Prolin-Serin bzw. Prolin-Threonin-Dipeptide symboli-
siert. Die Spaltung erfolgt jedoch immer im Anschluß an das
35 zweite Prolin, so daß eines der beiden entstehenden Spalt-
produkte an Position 2 immer Prolin trägt. Damit ist eine
erste Übereinstimmung von IgA-Protease Produkten mit MHC-

1 Klasse II präsentierten Peptiden gegeben. Innerhalb der Proteine des Menschen, die Spaltstellen der IgA-Protease besitzen, gibt es Beispiele, die darüberhinaus die oben beschriebenen allgemeinen Kriterien für MHC-Klasse II präsentierte Antigene weitestgehend erfüllen (Figur 10). Daraus folgt, daß durch die Aktivität der IgA-Protease Wirtsproteine so prozessiert werden können, daß sie sich zur Präsentation durch MHC-Klasse II eignen. Diese als Folge der enzymatischen Aktivität der IgA-Protease entstehenden Selbstpeptide werden aufgrund einer fehlenden und vorher auch nicht notwendigen Toleranz als fremd erkannt und es kommt zu einer T-Zellreaktion gegen körpereigene Proteine.

Beispiel 11

15 Sequenzhomologie des β -Core mit Aspartyl-Proteasen

Die IgA-Protease wird als Teil eines Precursor-Moleküls (IPP) gebildet. Die Translokation durch die äußere Membran erfolgt mit Hilfe des C-terminalen Anteils des Precursors, dem β -Core. Während die IgA-Protease sich als Polyprotein autokatalytisch abspaltet und extrazellulär weiter reift verbleibt der β -Core in der Membran (Pohlner et al., 1987).

Die Anordnung von verschiedenen funktionellen Domänen auf einem Proteinstrang und die sequentielle Prozessierung in distinkte Proteine erinnert sehr an die Organisation viraler Elemente (Kräusslich et al., 1989). Sowohl für das Virus-Assembly aber auch für die Proteolyse inaktiver Hormonvorläufer werden Aspartyl-Proteasen benötigt (Dougherty et al., 1993). Vier verschiedene Klassen von Proteinasen sind bisher beschrieben worden:

30 Cystein-, Serin-, Metallo- und Aspartyl-Proteasen. Je nachdem welche Aminosäuresequenz im aktiven Zentrums vorkommt, werden proteolytische Enzyme den genannten vier Klassen zugeordnet. Auffällig für Aspartyl-Proteasen ist die geringe Anzahl der konservierten Reste, die notwendig sind, um katalytisch aktiv zu sein (Miller et al., 1989).

1 Eine Sequenzanalyse des β -Core mit verschiedenen vira-
len Enzymen zeigt in dem oben genannten Bereich eine hohe
Homologie (Figur 7). Sogar der Abstand zu einem weiteren
konservierten Bereich, wahrscheinlich einem Teil der zur
5 Strukturbildung beiträgt, ist genau gleich. Weiterhin bemer-
kenswert ist die hohe Variabilität außerhalb der konservier-
ten Bereiche. Auch bei nahe verwandten Viren, wie HIV-1 und
HIV-2, treten hier sehr viele nichtidentische/ nichtähnliche
Aminosäurereste auf. Zusammenfassend kann man sagen, daß der
10 β -Core hinreichende Sequenzinformationen besitzt, um eine
funktionelle und membranständige Aspartyl-Protease zu reprä-
sentieren.

 Die Familie der viralen Aspartyl-Proteasen weist eine
weitere Gemeinsamkeit auf. Dies ist die unspezifische Erken-
15 nungssequenz, die gespalten wird (Dougherty et al. 1993).
Damit nicht alle Proteine in der Umgebung unkontrolliert ge-
spalten werden, können intrazelluläre Veränderungen ein Me-
chanismus zur Regulation sein. Aspartyl-Proteasen besitzen
ein pH Optimum im sauren Bereich. In Phagozyten wird sich
20 wahrscheinlich die Wirkung einer bakteriellen Aspartyl-Pro-
tease voll entfalten und zum Überleben des intrazellulären
Bakteriums beitragen. Zusätzlich zum aktiven Kampf des Pa-
thogens gegen zelluläre Abwehrmechanismen können mit der
Protease wechselwirkende Peptide veränderte antigene Eigen-
25 schaften aufweisen, die wiederum - MHC - präsentiert - zu
einem autoreaktiven Immunsystem führen (Anomasin et al.,
1990).

Beispiel 12

30 Strukturelle und funktionelle Homologien des α -Proteins zum
retroviralen TAT-Protein

 Innerhalb der Retroviren stellen die Lentiviren eine eigene
Familie dar. Zu den Lentiviren gehören HIV, HTLV und tierpa-
35 thogene Arten, die ebenfalls Immunschwächekrankheiten her-
vorrufen. Das Genom der Lentiviren läßt sich in drei codie-
rende Bereiche einteilen: gag codiert die strukturellen Pro-

teine der inneren Hülle, env die Glykoproteine der äußeren Membran und pol Enzyme, die zur Virusreplikation notwendig sind, wie die Reverse Transkriptase, Endonuklease und eine Protease. Zusätzlich zu diesen strukturellen Genen sind regulatorische Gene, wie das tat-Gen, vorhanden, die sich bei den einzelnen Viren dieser Gruppe unterscheiden können. Die Transkription viraler Gene wird durch das tat-Genprodukt, das Tat-Protein, aktiviert. Durch die Kernlokalisationssequenz wird nach der Synthese im Zytoplasma der gerichtete Transport in den Nukleus gewährleistet. Dort wird durch die Bindung des Tat-Proteins an die TAR (transactivation responsive elements) innerhalb der LTR (long terminal repeats) der Virus-DNA die Transkription aktiviert, was schließlich zur Ausschleusung infektiöser Viruspartikel führt.

Sequenzanalysen der IPP von *N. gonorrhoeae* zeigten, daß das α -Protein, eine dem Tat-Protein ähnliche Kernlokalisationssequenz trägt (siehe Beispiel 1). Diese Kernlokalisationssequenz ist funktionell, da das α -Protein oder Fusionsproteine, die diese Sequenz des α -Proteins tragen, in den Nukleus transportiert werden (siehe Beispiel 7). Weitere strukturelle Ähnlichkeiten sind in der nachfolgenden Tabelle aufgeführt:

Vergleich	α -Protein	TAT-Protein
Größe (Aminosäuren)	102	72
Molekulargewicht (kD)	12	14
Sekundärstruktur	Dimerisierung basischer Bereich α -helicaler Bereich Kernlok.signal	Dimerisierung basischer Bereich α -helic.Bereich Kernlok.signal
Funktion	Aufnahme in die Zelle Kerntransport	Aufn. in die Zelle Kerntransport Aktivierung LTR Transkriptionsfaktor

Anhand eines eukaryontischen Zellsystems wird die Funktion des α -Proteins als Transkriptionsfaktor untersucht. Diese

1 Zellen tragen ein Genkonstrukt bestehend aus LTR des HIV
oder anderer Retroviren in Verbindung mit einem Reporter-
Gen, wie z.B. CAT oder Luciferase. Gelangt das α -Protein in
den Kern dieser Zellen und werden die LTR aktiviert, führt
5 dies in diesem Fall zur Expression der Chloramphenicol-Ace-
tyltransferase (CAT), deren Aktivität spezifisch nachweisbar
ist.

Eine Aktivität des α -Proteins als Transkriptionsfaktor
könnte sich als wichtig erweisen im Hinblick auf die Akti-
10 vierung von ERSSs. Das eukaryotische Genom trägt normaler-
weise zwischen 5 und 10 % sogenannte retrotransposable ERSSs
(*endogenous retroviral sequences*). Diese ERSSs stellen einen
wichtigen Faktor im Bereich der Reorganisation des eukaryo-
tischen Genoms dar, unbekannt ist jedoch, wie diese retrovi-
15 ralen Elemente in die eukaryotische DNA gelangt sind. Gesi-
chert ist zumindest, daß humane ERSSs per se defekte provi-
rale Elemente darstellen, die nicht mehr zur Virusproduktion
in der Lage sind. Insgesamt repräsentieren diese Elemente
jedoch ein großes Reservoir an viralen Genen, die durch Mu-
20 tationen oder Rekombinationen mit exogenen Retroviren oder
auch anderen Faktoren, wie z.B. auf endogene LTR wirkende
Transkriptionsfaktoren, aktiviert werden können (Perl et al.,
1993). So ist HRES ein dem HTLV-ähnliches endogenes retrovi-
rales Element, das funktionelle Transkriptionselemente, dar-
unter LTR, beinhaltet und somit zur Proteinexpression befäh-
25 igt ist (Banki et al., 1992). Bei Patienten mit Autoimmun-
krankheiten wie z. B. Multiple Sklerose, Sjörgen's Syndrom
und Lupus Erythematosus wurde festgestellt, daß Auto-Anti-
körper gegen das HRES vorhanden waren, d.h. HRES kann als
Autoantigen fungieren.

30 Zusätzlich konnte bei Mäusen gezeigt werden, daß ERSSs so-
genannte Superantigene codieren und hierdurch Autoimmunantwor-
ten auslösen können (Krieg et al., 1990). Superantigene sind
in der Lage, unabhängig von der antigenen Spezifität einer
T-Zelle, an die V_{β} -Kette des TCR und an den MHC II-Komplex
35 einer antigenpräsentierenden Zelle zu binden und lösen somit
eine Immunreaktion aus. Bei Patienten mit RA wurde in der

1 Synovialflüssigkeit die Expansion V_{β} -spezifischer T-Zellen
festgestellt. Es wird angenommen, daß diese Expansion V_{β} -
spezifischer T-Zellen durch Superantigene ausgelöst wurde
(Paliard et al., 1991). Neue Hinweise auf die Pathogenese
5 Rheumatoider Arthritis ergaben elektronenmikroskopische
Untersuchungen synovialer Zellen. Hier wurden bisher nicht
bekannte Retrovirus-ähnliche Partikel festgestellt. Eine Er-
klärung hierfür würde die LTR-abhängige Aktivierung endoge-
ner retroviraler Elemente bieten, die zur Expression
10 virusähnlicher Partikel führen könnte (Keyszer et al.,
1994).

Somit ist die Funktion des α -Proteins nicht nur im Hinblick
auf die LTR-Aktivierung virusinfizierter Zellen interessant,
sondern auch im Hinblick auf die mögliche Funktion als
15 Transkriptionsfaktor von ERSSs, die für die Entstehung von
Autoimmunkrankheiten verantwortlich sein können. Da ca. 50 %
der Bevölkerung im Laufe ihres Lebens immer wieder asympto-
matische Träger von *N. meningitidis* sind, und daher eine Ex-
position mit α -Protein gegeben ist, könnte die aktivierende
20 Funktion des α -Proteins auf die LTR endogener retroviraler
Elemente einen Zusammenhang zu häufig auftretenden Autoim-
munkrankheiten, wie RA, aufzeigen.

Beispiel 15

25 Opa-vermittelte Adhäsion an Proteoglykan Rezeptoren

Die erste Kontaktaufnahme humanpathogener Neisserien mit der
Wirtszelle geschieht über Oberflächenstrukturen der Bakte-
rienzelle, den Pili. Die enge Adhäsion der Bakterienzelle an
die Wirtszellmembran, die schließlich zur Invasion in die
30 Wirtszelle führt, wird auf bakterieller Seite über Opa-Pro-
teine der äußeren Membran vermittelt. Zusätzlich spielen
Opa-Proteine bei der Ausprägung der Gewebespezifität eine
zentrale Rolle (Kupsch et al., 1993). Die spezifische Adhä-
sion an Epithelzellen wird durch Opa₅₀ vermittelt, die Pro-
35 teine Opa₅₁₋₆₀ hingegen, sind für die Adhäsion an periphere
Blutlymphozyten verantwortlich. Über die Rezeptoren auf Sei-

1 ten der Wirtszellen und die molekularen Mechanismen dieser
Zellspezifität der Neisserien ist wenig bekannt. Um die zel-
lulären Komponenten zu charakterisieren wurde mittels be-
stimmter proteolytischer Enzyme und Inhibitoren die Opa-ver-
5 mittelte Adhäsion und Invasion an epitheliale Zellen inhi-
biert. Hierzu wurden die Epithelzellen vor der Infektion mit
Neisserien und folgenden Zusätzen behandelt:

10

15

20

25

30

35

Inhibitor/Wirkung	Effekt	Schlußfolgerung
Trypsin: spaltet Oberflächenproteine	Inhibition -----> Invasion	Oberflächenprotein .nvolviert ;
Tunicamycin: N-Glykosylierungs-Inhibitor	keine Inhibition ----->	N-Oligosaccharid nicht beteiligt
Natriumchlorat: inhibiert Sulfatierung von Glykoproteinen und Karbohydraten	Inhibition ----->	sulfatiertes Molekül beteiligt
p-Nitrophenyl β -D Xylopyranosid: inhibiert Synthese sulfatierter Proteoglykane	Inhibition ----->	membranständiges Proteoglykan
Heparin, Heparansulfat: kompetitive Inhibition beteiligt	Inhibition ----->	Heparansulfatproteoglykan
Inhibitor/Wirkung	Effekt	Schlußfolgerung
Chondroitin-, Dermatan-sulfat: kompetitive Inhibition	keine Inhibition ----->	Chondroitin-, Dermatan-sulfat nicht involviert
Heparitinase: spaltet Heparansulfatproteoglykan	Inhibition ----->	Heparansulfatproteoglykan beteiligt
Chondroitinase: spaltet Chondroitinsulfat	keine Inhibition ----->	Chondroitinsulfat nicht involviert

1 Hieraus folgt, daß der zelluläre Rezeptor für die Opa-ver-
mittelte Adhäsion ein membranständiges Heparansulfatproteo-
glykan darstellt. Zelloberflächen-Proteoglykane sind eine
große Familie hoch-polymorpher Glykoproteine, die entspre-
5 chend des jeweiligen Core-Proteins, der Zusammensetzung der
am Core anhängenden Glykosaminoglykanseitenketten und der
Verankerung in der Zellmembran in verschiedene Gruppen ein-
geteilt werden: in die Syndekane, Betaglykane und CD-44
(Bernfield et al., 1992). Hinweise auf die Struktur des He-
10 paransulfatproteoglykan-Rezeptors für die Opa-vermittelte
Adhäsion gaben folgende Ansätze: Über die Behandlung mit
Trypsin konnte eine 150-200 kD große Ektodomäne isoliert
werden. Weiterhin war es möglich, isolierte Proteoglykane
aktiv in Phospholipidbilayervesikeln zu rekonstituieren,
15 d.h. es muß eine hydrophobe Transmembran-Domäne vorliegen.
Anhand dieser Resultate läßt sich der zelluläre Opa-Rezeptor
der Familie der Syndekane zuordnen. Syndekane zeichnen sich
durch ein Core-Protein aus, das aus einer großen extrazellu-
lären Domäne mit einer Vielzahl möglicher Glykosaminoglykan-
20 Bindungsstellen, einer hochkonservierten, hydrophoben Trans-
membran-Domäne und einem kurzen Carboxy-terminalen zytoplas-
matischen Teil besteht.

Versuche mit Neisserien-Mutanten zeigten, daß die Proteogly-
kan-abhängige Adhäsion über ein bestimmtes Opa-Protein ver-
25 mittelt wird (van Putten et al., 1994). Wurden
Neisserienstämme verwendet, die jeweils nur ein Opa-Protein
produzieren, war nur die Mutante, die das Invasion-assozi-
ierte Opa-Protein (opa₅₀) exprimierte, dazu in der Lage, an
die isolierte Ektodomäne des Proteoglykans von Epithelzellen
30 zu binden. Die Epithelzellen des Urogenitaltraktes und der
Cornea, die natürlichen Habitate von Neisserien, exprimieren
Syndecan-1, d.h. auch in vivo wird die Invasion von Epithel-
zellen über die Bindung von Opa₅₀ an zelluläres Syndecan-1
vermittelt. Die Interaktion von bakteriellem Opa₅₀-Protein
und zellulärem Syndecan-1 nimmt somit eine Schlüsselrolle im
35 Infektionsverlauf ein. Diese spezifische Wechselwirkung zw-
ischen pathogenem Organismus und seiner Wirtszelle bietet

1 verschiedene Ansätze zur Entwicklung von Arzneimitteln. Zum
einen können Teile des Opa₅₀-Proteins als Impfstoffe einge-
setzt werden, die zur Bildung von spezifischen Antikörpern
gegen die adhäsive Domäne von Opa₅₀ führen, somit die Adhäsion
5 und Invasion von Neisserien verhindern, und dadurch vor
einer Infektion schützen. Zum anderen ist die Gabe kompeti-
tiver Inhibitoren denkbar, die die Infektion mit Neisserien
ebenfalls durch Inhibition der Adhäsion verhindern.

Jedoch sind Arzneimittel gegen Neisserien-Infektionen
10 nicht nur wichtig im Hinblick auf primäre Krankheits-
symptome, sondern vor allem in Hinblick auf sekundäre Spät-
schäden, wie die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten; d.h.
Vakzine gegen Neisserien könnten auch Vakzine gegen be-
stimmte Autoimmunkrankheiten wie z. B. die Rheumatoide Ar-
15 thritis bedeuten.

Beispiel 17

Immundiagnostik

20 Die immunogenen Eigenschaften der hier verwendeten Link- und
neisserialen γ -Peptide, die sich in eindrucksvoller Weise an
der Stimulation von peripheren mononukleären Zellen aus
Rheumapatienten zeigte (Beispiel 6), eröffnen auch interes-
sante Anwendungsmöglichkeiten als Immundiagnostika. Aufgrund
25 der antigenen Eigenschaften des γ -Peptids ist es denkbar,
daß infolge einer Infektion mit Neisserien auch Peptid-spe-
zifische "Memory" T-Zellen gebildet werden, die demnach bei
Verwendung des entsprechenden Peptides im sensitiven T-Zell-
proliferationstest nachgewiesen werden könnten.

30 Unter der Annahme des molekularen Mimikry zwischen dem
neisserialen γ -Peptid und dem Link-Peptid, entstanden bei
Spendern mit entsprechender genetischer Disposition des MHC
(z.B. HLA DR4Dw4, HLA DR1) auch kreuzreaktive, potentiell
autoaggressive T-Zellen, die dann auch mit dem Link-Peptid
35 reagieren könnten. Diese T-Zellen verursachten auf Grund
ihrer geringen Zahl und ihrer fehlenden "Homing"-Mechanis-
men, aber möglicherweise auch durch aktive Immunsuppression

1 zunächst keine Erkrankung. Dennoch könnten, als Folge einer
Sekundärinfektion, bei dem z.B. durch Superantigene eine
große Population von T-Zellklonen reaktiviert werden, auch
derartige kreuzreaktiven T-Zellpopulationen zur Vermehrung
5 angeregt werden, eine kritische Anzahl überschreiten und die
Befähigung erlangen, ihr pathogenes Potential zu entfalten.
In diesem Zusammenhang sollten sich unter bestimmten Umstän-
den bereits früher, vor der eigentlichen Manifestation der
Erkrankung, peptidspezifische T-Zellen im peripheren Blut
10 von gesunden Spendern, die den entsprechenden MHC-Haplotyp
exprimieren, nachweisen lassen. Diese T-Zellen werden dann
in vitro, ähnlich wie die T-Zellen der RA-Patienten (Bei-
spiel 6), durch die Antigene zur Proliferation stimuliert.
Die Proliferation wird analog den Bedingungen unter Beispiel
15 6 mittels ^3H -Thymidineinbau während der DNA-Synthese gemes-
sen. In der Tat wurde unter 15 verschiedenen, äußerlich ge-
sunden Blutspendern eine Person gefunden, dessen PBMC sowohl
mit dem Link-Peptid wie auch mit dem γ -Peptid reagierten.
Der Stimulation-Index für das Link-Peptid betrug nach 7 Ta-
20 gen und 10 Tagen (+IL-2): 6; für das γ -Peptid: 2 (7 Tage nur
 γ -Peptid) bzw. 8 (10 Tage γ -Peptid + IL-2), sowie für das
Kontrollantigen Tetanustoxoid: 7. Interessanterweise leidet
dieser Spender an leichten rheumatischen Beschwerden ohne
jedoch eine Arthritis bereits zu diesem Zeitpunkt entwickelt
25 zu haben. Dies und der bis jetzt noch unbekannte MHC-Subtyp
lassen die Schlußfolgerung zu, daß mit Hilfe der Peptid-spe-
zifischen Proliferation von T-Zellen ein Risiko für eine
eventuell zu einem späteren Zeitpunkt auftretende Entwick-
lung von RA eingeschätzt werden kann und entsprechende Ge-
30 genmaßnahmen, die im Zusammenhang mit diesem Patentanspruch
stehen, ergriffen werden könnten.

Beispiel 18

Sequenzhomologien des IPP mit viralen Genprodukten

35 Bei Retroviren entstehen eine Reihe funktioneller Proteine
durch Spaltung eines Vorläuferproteins, wobei die dafür ver-

antwortliche Protease ein Bestandteil des Vorläufers Polyproteins ist (Kräusslich et al., 1989). Darin besteht also eine strukturelle Ähnlichkeit zwischen retroviralen Elementen und dem IgA-Protease-Precursor. Um Ähnlichkeiten auch auf Ebene der Primärstruktur nachzuweisen, wurden Sequenzvergleiche des IPP mit Genprodukten von Retroviren unter Verwendung der Wisconsin Sequence Analysis Package von GCG (Genetics Computer Group Inc.) durchgeführt. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Datenbank mit dem Namen Retrovirus angelegt, in der die Aminosäuresequenzen der bis zu diesem Zeitpunkt in der Swissprot-Datenbank abgelegten retroviralen Elemente zusammengeführt wurden. In einem anderen Ansatz wurden die Nukleotidsequenzen von 53 verschiedenen Retrovirusgenomen in einer Datenbank mit dem Namen Virus zusammengefaßt und mit Hilfe des Computers in allen möglichen Leserahmen translatiert. Mit Hilfe der Fasta facility (Pearson and Lipman; 1988) und unter Verwendung des Algorithmus von Wilbur und Lipman (1977) wurde in diesen Datenbanken nach Ähnlichkeiten zu den funktionellen Einheiten des IPP von *Neisseria gonorrhoeae* MS11 gesucht. Die größte Übereinstimmung zeigte sich beim Vergleich des α -Proteins mit dem Polyprotein des tomatoe ringspot virus. Hier waren in einem Bereich, der den Aminosäuren 179-232 des Polyproteins entsprach, 54 % der Aminosäuren an den identischen Positionen konserviert. Eine weitere unerwartet hohe Sequenzhomologie ließ sich zwischen der Aminosäuresequenz des γ -Peptids und eines Nef-Proteins des HIV-1 (Accessionnummer: P04603) finden. Hier waren von 25 Aminosäuren 36 % identisch konserviert und darüberhinaus 44 % mit ähnlichen Eigenschaften erhalten, wodurch sich eine Ähnlichkeit dieser Sequenzabschnitte von insgesamt 80 % ergab. Desweiteren zeigten sich Sequenzhomologien zwischen dem β -Core und dem Env-Protein verschiedener Retroviren, aber auch wie in Beispiel 11 dargestellt zur retroviralen Aspartylprotease. Das α -Protein zeigte Homologien zu verschiedenen Polyprotein-Vorläufern und zum Tat-Protein, auch über den Bereich des Kerntranslationssignals hinaus. Ebenso zeigte das γ -Peptid Homologien

1 zu einer Reihe von NEF-Proteinen und einem Polyprotein des
2 *Grapewine Fanleaf Virus* (GFLV) Eine Eigenschaft nahezu aller
3 gefunden Sequenzhomologien des IPP mit retroviralen Protei-
4 nen war, daß sich die konservierten identischen Aminosäuren
5 in Bereichen befanden, die lokal konzentriert sind und zu-
6 sätzlich eine hohe Anzahl von ähnlichen Aminosäuren aufwei-
7 sen. Somit konnten also Sequenzabschnitte von hoher Ähnlich-
8 keit gefunden werden, die von Bereichen ohne Sequenzüberein-
9 stimmungen umgeben waren. Eine solche Clusterung der Se-
10 quenzhomologien wäre erklärbar durch eine Entstehung oder
11 eine Veränderung des IPP infolge von Rekombination mit re-
12 troviralen Elementen.

Beispiel 19

15 Stimulierung des viralen SV-40 Promotors

16 Eine wichtige funktionelle Aktivität des α -Proteins läßt
17 sich durch folgendes Experiment ableiten. In Kotransfektio-
18 onsstudien, wobei ein Plasmid das α -Protein kodiert und das
19 zweite Plasmid den Neomycin-Resistenzmarker enthält, konnte
20 erstmals eine Wirkung des α -Proteins auf Transkriptionsebene
21 beobachtet werden. Nach der Transfektion beider Vektoren in
22 die Maus L(TK-) Fibroblastenzelllinie waren alle auf Antibio-
23 tika-resistenz selektierten Klone auch α -Protein positiv
24 (Langenberg, 1993). Obwohl das α -Protein kodierende Plasmid
25 nur in gleicher Menge mit dem Selektionsmarkerplasmid ko-
26 transfiziert wurde (1-5 mg Quiagen-DNA) war jeder Neomycin-
27 resistente Klon aber auch α -Protein positiv. Unsere Vermu-
28 tung geht dahin, daß das α -Protein, da es in diesem System
29 konstitutiv expremiert wird, die Transkription vom SV-40
30 Promotor, der die Antibiotika-Resistenz kontrolliert, ver-
31 stärkt. Im Bereich des SV-40 Promotors befinden sich mehrere
32 Sequenzen, von denen die Transkription aktiviert werden kann
33 (McKnight and Tjian, 1986). Zelluläre Proteine, wie die
34 Transkriptionsfaktoren SP1 und CTF, binden hier in sequenz-
35 spezifischer Art und Weise. Aber auch Faktoren, die die
36 Transkription indirekt durch Bindung an Transkriptionsfakto-

1 ren beeinflussen sind bekannt. Das große T-Antigen des SV-40
Virus aktiviert zum Beispiel den viralen späten Promotor
durch Bindung/Modifizierung eines Wirtsproteins. Ähnliche
Transaktivierungseffekte konnten für das HIV Tat-Protein ge-
5 zeigt werden (Kessler and Mathews, 1991).

Beispiel 20

Induzierung eines "Germinal vesicle breakdown" (GVBD) in
reifen *Xenopus* Oozyten durch die IgA-Protease Aktivität.

10 Mikroinjektion in *Xenopus laevis* Oozyten ist eine häufig
verwendete Methode, um Wirkmechanismen von einzelnen Protei-
nen zu analysieren. Man verwendet für solche Studien meist
sogenannte Stadium VI Oozyten, die in ihrer Reifung bis zur
15 Einleitung der ersten meiotischen Teilung fortgeschritten
sind. Eine solche vollständig gewachsene Eizelle ist an der
Grenze zwischen G2 und M-Phase im Zellzyklus gestoppt (Ford,
1985). Durch die Wirkung von Hormonen, zum Beispiel Proge-
steron, wird diese Arretierung im Entwicklungsprozeß in vivo
20 aufgehoben und in der Oozyte läuft die Meiose I bis zur Me-
taphase der Meiose II ab, in welcher die Eizelle dann bis
zur Befruchtung bleibt (Merriam, 1971). Die in diesem Bei-
spiel beschriebenen Injektionen von IGA-Protease führten in
den Stadium VI Oozyten zu folgenden phänotypischen Verände-
25 rungen (Rauber, 1991). Die Oozyten bekamen circa 3 Stunden
nach den Injektionen einen sichtbaren, hellen Fleck im
dunklen animalen Pol. Nach längerer Inkubation veränderte
sich ihre charakteristische Hell-Dunkel Färbung zu einem
Flecken- oder Streifenmuster und schließlich starben sie ab.
30 Gleichzeitig konnte man sehen, daß nach dreistündiger Inku-
bation keine scharfe Trennung zwischen Nukleus und Zyto-
plasma vorhanden war; statt dessen hatte der Kern eine ver-
änderte ovale bis langgestreckte Form und lag innen an der
Zytoplasmamembran im dunklen Pol. Derartige Veränderungen
35 werden in der Literatur als "Germinal vesicle breakdown" be-
schrieben, der auftritt wenn der Entwicklungsstopp der Sta-
dium VI Oozyten durch Hormonwirkung aufgehoben wird. Durch

den Einsatz eines spezifischen Inhibitors der IgA-Protease konnte gezeigt werden, daß der GVBD durch die proteolytische Aktivität der IgA-Protease hervorgerufen wird. Das synthetische Peptid R-boroPro-OH mit einem modifiziertem Prolin (Prolylboronat) lagert sich im aktiven Zentrum ein (Bachovchin et al., 1990). Durch die Imitation eines Substrat-Übergangszustandes bleibt der Inhibitor fest gebunden wird aber praktisch nicht gespalten. Nach Vorinkubation der IGA-Protease mit dem Peptidinhibitor und anschließender Injektion in die Oozyten konnte kein GVBD beobachtet werden. Die Injektionen von IGA-Protease und Protease-Inhibitor Molekülen in Oozyten des Krallenfrosches wurde folgendermaßen durchgeführt: Das Ovar, oder je nach Menge der benötigten Oozyten nur Teile davon, wurde in MBS-H Puffer (88 mM NaCl, 1 mM KCl, 2,4 mM NaHCO₃, 0,8 mM MgSO₄, 0,33 mM Ca(NO₃)₂, 0,41 mM CaCl₂, 10 mM Hepes pH 7.4, supplementiert mit je 10 mg/ml Benzylpenicillin und Streptomycin) gewaschen, mit zwei Pinzetten zerkleinert und durch Zugabe von Kollagenase (2 mg/ml) so lange inkubiert bis mehr als 90 % der Oozyten vereinzelt waren. Anschließend wurden die Oozyten nochmals zur Entfernung der Kollagenase in MBS-H Puffer gewaschen. Alle Injektionsexperimente wurden auf einer temperierten Stahlplatte (20°C) durchgeführt. Die Injektionsapparatur bestand aus einer Hamilton-Spritze, die über einen Secura Perfusor mit einem konstantem Vorschub betrieben werden konnte und einer ausgezogenen Glaskpillare, die in einem Mikromanipulator eingepaßt war. Über einen Teflonschlauch war die Kapillare mit der Spritze verbunden, dieser war zur Druckübertragung mit einem inerten Öl gefüllt.

Die großen und kontrastreichen Stadium VI Oozyten wurden in den Vertiefungen einer Glasplatte unter MBS-H Puffer so ausgerichtet, daß in sie in den hellen Pol injiziert werden konnte, ohne den Kern in der dunklen Hälfte zu verletzen. Mit Hilfe von Microladern, dünn ausgezogenen Pipettenspitzen (Eppendorf), wurden circa 10 µl Proteinlösung in Intrazellulärpuffer (50 mM Tris-Cl pH 7.5, 2 mM CaCl₂, 0,1 % NP-40) vom hinteren Ende her in die Kanüle geladen, und diese luft-

blasenfrei in die Apparatur eingepaßt. Dann wurden bei einem
konstantem Ausstrom von 10 nl/s Aliquots von 50 nl pro Oo-
zyte injiziert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit von 3
bis 12 Stunden wurden die Oozyten in 5 % TCA fixiert und bis
zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

Tabelle VII

In MHC-Bindungassays und in T-Zell-Aktivierungsexperimenten eingesetzte Peptide

Name	Herkunft	Sequenz	Länge	verwendet in:
P1	γ -Peptid	SPAANTASQAQKATQTDGAQIAKPQNIIVVA	30-mer	MHC-Bindungassays
P2	γ -Peptid	TDGAQIAKPQNIIVVA	15-mer	"
P3	γ -Peptid	QKATQTDGAQIAKPQ	15-mer	"
P4	γ -Peptid	TASQAQKATQTDGAQ	15-mer	"
P5	γ -Peptid	SPAANTASQAQKATQ	15-mer	"
P6	γ -Peptid	VKPAPSPAANTASQA	15-mer	"
H1	Link-Protein	GRYNLNFHEAQQACL	15-mer	"
H2	Link-Protein	DQDAVIAISFDQLYDAWR	17-mer	"
H3	Link-Protein	HPTKLTIDEAVQACL	15-mer	"
H4	Link-Protein	NDGAQIAKVGQIFAAWK	17-mer	"
H5	Proteoglycan	QNSAIIATPEQLQAAYE	17-mer	"
H6	Proteoglycan	TRYSLTFEAAQQACP	15-mer	"
H7	Proteoglycan	GTGAVIASPEQLQAAYE	17-mer	"
N5	Proteoglycan	SPEKFTTFQEAAN	12-mer	"
N6	Proteoglycan	SRYTILNFEAAQK	12-mer	"
S1	unbek.	LPSYEEALSLS	12-mer	"
S2	Selbstprotein (EPI)	SGPLKAEIAQRLE	13-mer	"
S3	Influenza-Hemagglutinin	KTIAVDEEARR	11-mer	"
T1	γ -Peptid	SPAANTASQAQKATQTPGAQIAKPQNIIVVAPP	32-mer	T-Zellassays
T2	Link-Protein	HPTKLTIDEAVQACLNDGAQIAKVGQIFAAWK	32-mer	T-Zellassays

1

Beispiel 21

Menschliches naso-pharyngeales Gewebe stellt ein weiteres Zielgewebe für die spezifische Aufnahme und Kernlokalisation des alpha-Proteins dar.

5

10

15

20

25

30

35

Wie in Beispiel 7 beschrieben, besitzt das von Neisserien sekretierte alpha-Protein funktionelle Kernlokalisationssequenzen. Wird das alpha-Protein von transfizierten Zellen exprimiert, so reichert es sich spezifisch im Kern an. Zusätzlich ist das alpha-Protein jedoch dazu in der Lage, von außen in Zellen einzudringen und anschließend im Kern zu akkumulieren. Dies geschieht allerdings nur in ganz bestimmten Zellen von Primärkulturen bestimmter humaner Gewebe. Auffallend ist hierbei, daß es sich um Gewebe handelt, die gleichzeitig auch Zielgewebe für die Infektion mit Neisserien darstellen. Wie in Beispiel 7 beschrieben, zeigt ein bestimmtes "Subset" von Zellen aus primären Zellkulturen humaner Cornea und ein bestimmtes "Subset" humaner mononukleärer Blutzellen Aufnahme von außen und Kernlokalisation des alpha-Proteins. Ein weiteres Zielgewebe stellt Gewebe aus dem humanen naso-pharyngealen Bereich dar. Zu Aufnahmeversuchen mit dem alpha-Protein werden hierbei chirurgisch entfernte Nasen-Polypen verwendet, die, um die natürliche Mikroflora zu entfernen, primär mit Antibiotika-haltigem Medium (DMEM, 250 E/ml Penizillin/Streptomycin, 5 µg/ml Fungizone, 25 mM Hepes, 100 µg/ml Gentamycin, 50 mg/ml Nystatin) behandelt werden. Hierzu wird das Gewebe in diesem Medium von anhängendem Fett und Bindegewebe befreit und anschließend in ca 2 mm² große Stücke zerlegt. Danach wird frisches Medium dazugegeben und die Gewebestücke über Nacht bei 37°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wird dieses Medium durch Zugabe von frischem Antibiotika-Medium, dem 10 % FCS zugesetzt wurde, ersetzt. Am folgenden Tag wird das Antibiotika-Medium entfernt und die Gewebestücke einzeln auf mikroskopische Deckgläser in Gewebekulturplatten mit 24 Vertiefungen gesetzt. Sobald sich die Gewebestücke festgesetzt haben (nach 5h bis über Nacht bei 37°C im Inkubator), wird

1 Kulturmedium (DMEM/Ham's F12 1:1, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Strepomycin, 1 % Fungizone, 2.5 % Hepes, 0.4 % Methylcellulose) dazugegeben. Diese Kulturen werden ca. 1-2 Wochen
5 mit Medienwechsel 2x pro Woche inkubiert. Sind die Deckgläser zu mindestens 20 % mit Zellen bewachsen, werden sie zu den Versuchen verwendet. Der Nachweis der alpha-Protein-Aufnahme und Kernlokalisation wird anschließend, wie in Beispiel 7 im Fall der Primärkultur aus Cornea beschrieben, durchgeführt. Es zeigt sich dann, daß auch in diesem Fall,
10 wie in Primärkulturen der Cornea, nur ein ganz bestimmtes "Subset" der Zellen dazu in der Lage ist, das alpha-Protein von außen aufzunehmen und im Kern zu akkumulieren. Auch hier, wie im Fall der Primärkulturen aus der Cornea, findet keine Kernlokalisation mehr statt, sobald der Zellverband
15 durch Passagieren aufgetrennt wird.

Beispiel 22

Einzelne synthetische Peptide definieren verschiedene funktionelle Bereiche des alpha-Proteins.

20

Das alpha-Protein wird, wie in den Beispielen 7 und 21 beschrieben, von vielen Zellen aufgenommen, jedoch dann in Vesikeln degradiert. Bei einigen wenigen Zellen bestimmter Gewebe führt die spezifische Aufnahme zur Akkumulation im
25 Kern, was auf einen spezifischen Aufnahmemechanismus schließen läßt, der von einem ganz bestimmten Zelltypus/-status abhängig ist.

Die Eingrenzung funktioneller Bereiche des alpha-Proteins wurde anhand folgender definierter synthetischer Peptide
30 durchgeführt:

Verwendete alpha-Proteine:

- alpha 1 aus Stamm Neisseria gonorrhoeae MS11
- alpha 2 aus Stamm Neisseria gonorrhoeae R16
- 35 - schwarz unterlegte Bereiche:

5

10



20

Sequenz: SPQANQAEELRQQAKAEQVKRQQAAEA EKVA

25

Sequenz: **OPORRKRRL**AAPQDYMAVSQ**DRPKRRGHR**SVQQNNVEIAQAQ

30

Kernlokalisationssequenzen Nr. 1 und 2

35

Sequenz: AKQKAEAEKARELARQKAEESHQANA KPKRRRRRAILPR

Kernlokalisationssequenz Nr. 4

1

Peptid D: aus R16

Aminosäuren 139 - 178

Länge 40 Aminosäuren

5

FITC-gekoppelt

Sequenz: AELAHRQEA KRKA AESAKRKA EEEEEHRQTAQ SQPQRKR

Kernlokalisationssequenz Nr. 3

Struktur:

10

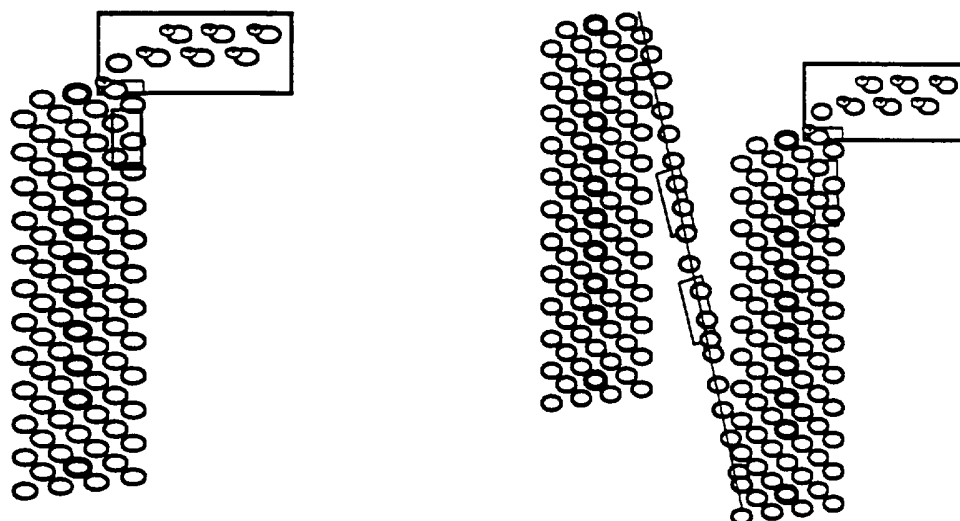
alpha-Protein MS11:

R16

Die Rahmen repräsentieren die Kernlokalisationssequenzen.

15

20



25

Die Aufnahme und Lokalisation der Peptide A-D in primären Zellkulturen aus humaner Cornea wurde auf die gleiche Weise durchgeführt wie mit dem kompletten alpha-Protein (siehe Beispiele 7 und 21). Dementsprechend wurden folgende Ergebnisse ausschließlich in den gleichen Zellen beobachtet, die auch Zielzellen für das komplette alpha-Protein darstellen.

30

Ergebnisse:

Peptid A: aus MS11, ohne Kernlokalisationssequenz

→ kein positives Signal in der Immunfluoreszenz

→ keine Kernlokalisation

35

→ keine Bindung an Zellen oder Matrix

- 1 Peptid C: aus MS11, Kernlokalisationssequenz Nr. 4
→ Spezifische Bindung an die Zelloberfläche bestimmter Zellen
→ Kernlokalisation
- 5 Peptid B: aus R16, Kernlokalisationssequenzen Nr. 1 und 2
→ Spezifische Bindung an die über bestimmten Zellen liegende extrazelluläre Matrix
→ Kernlokalisation
- 10 Peptid D: aus R16, Kernlokalisationssequenz Nr. 3
→ Spezifische Bindung an die Zelloberfläche bestimmter Zellen
→ Kernlokalisation
- 15 Diese Ergebnisse lassen zwei Schlußfolgerungen zu:
1. (siehe Peptide A und C): Spezifische Matrixfaktoren vermitteln die rezeptorspezifische Bindung, die zur Kernlokalisation führt.
 2. (siehe Peptide B und D): Bestimmte Zellen exprimieren
- 20 einen spezifischen Rezeptor (dessen Expression eventuell abhängig von bestimmten Matrixfaktoren beeinflusst wird), der zur Aufnahme und Akkumulierung des alpha-Proteins im Kern führt.

25

Beispiel 23

Die spezifische Transportfunktion des alpha-Proteins

30

Wie in den Beispielen 7, 21 und 22 beschrieben, dringt das alpha-Protein nur in bestimmte Zellen bestimmter Gewebe in den Kern vor. Diese spezifische Funktion läßt sich verwenden, um in diese Zellen ganz gezielt entweder DNA, Proteine oder andere Substanzen über Kopplung mit dem alpha-Protein oder mit einzelnen Peptiden aus dem alpha-Protein einzubringen.

35

1 Z. B. wird ein Peptid aus dem alpha-Protein (siehe Beispiel
22) mit Polylysin gekoppelt. An Polylysin bindet sehr effek-
tiv DNA (Wagner et al., 1990). Auf diese Weise wird der Vek-
tor pSV3neo (Berg, 1982), der die SV40 Large T-Region co-
5 diert, spezifisch in kernlokalisation-positive Zellen einge-
bracht. Die Expression des SV40 Large T führt zur Immortali-
sierung der Zellen und somit zur Generierung einer Zelllinie.

10

15

20

25

30

35

1 Zitierte Literatur

- Atlan et al. (1994) Res. Immunol. 145: 165-183
Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol 215: 403-410
Anomasarin et al. (1990) J. Vir. 64: 3179-3184
5 Argow et al. (1989) Clin. Exp. Imm.: 190-197
Bachovchin et al. (1990) J. Biol. Chem. 256: 3738-3743
Banki et al., (1992) PNAS 89: 1939-1943
Benz and Schmidt, (1989), Inf. Imm. 57: 1506-1511
Berg, (1982) J. Mol. Appl. Genet. 1: 327-341
10 Bernfield et al., (1992) Annu. Rev. Cell Biol. 8, 365-393
Bläß (1994) BioEngineering 2/94, 10. Jahrgang., pp. 42-45
Böyum et al., (1968) Scand.J.Clin.Lab.Invest. 97: 77-89
Dougan et al., (1991) Mol. Mic. 5: 409-417
Dougherty et al., (1993) Microbiol.Rev. 57: 781-822
15 Engelhard, (1994) Curr Biol 6: 13-23
Facijs and Meyer, (1993) Mol. Microbiol. 10: 699-712
Falk et al., (1994) Immunogen. 38: 161-162
Falk et al., (1991) Nature 351: 291-296
Frankel and Pabo, (1988), Cell 55: 1189-1193
20 Gorga et al., (1987) J. Biol. Chem. 262: 16087
Halter, (1993) Diplomarbeit an der Universität Tübingen
Held et al., (1993) J. Exp. Med. 177: 359-366
Herrmann und Kalden (1994) J. Virol. Methods 46: 333-348
Itescu et al., (1990) Ann. Intern. Med. 112: 3-10
25 Jacob, McDevitt and Talar (Ed.), (1991), Academic Press, San
 Diego: 7-31
Kalbacher et al., (1992) J. Chromatogr. 548: 343
Keyszer et al., (1994) Stem Cells, 12, 75 - 86
Kimura et al., (1992) Tissue Antigens 40: 5-12
30 Klauser et al., (1993) BioEssays 15:799-805
Kräusslich et al., (1989) PNAS 87:807-811
Krieg et al., (1990) J. Clin. Invest. 86: 809-816
Kropshofer et al., (1993) PNAS 90: 403
Kupsch et al., (1993) EMBO J. 12: 641-650
35 Lorenzen, (1992) Promotionsarbeit in Kiel
Marrack and Kappler, (1994) Cell 76: 323-332
Martin et al., (1991) Biochem. J. 280: 679

- 1 Meuer and Meyer zum Büschenfelde, (1986) J.Immunol.142:
4106-4112
Meyaard et al., (1992) Eur.J.Immunol. 22: 2729-2732
Meyer et al., Deutsche Patentanmeldung P 43 36 530.2
- 5 Miller et al., (1989) Nature 337: 576-577
Mitchison (1993) Fundamental and Clinical Immunol. 1: 197-
200
Nakahama et al., (1986) Nucleic Acids Res. 14: 5843-5855
Normark und Jonsson, PCT-Anmeldung WO 92/13 871
- 10 Paliard et al., (1991) Science 253: 325 - 329
Paruchuri et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 333-
337
Pearson and Lipman (1988) PNAS 85: 2444-2448
Perkins et al., (1989) J. Mol. Biol. 206: 737
- 15 Perl et al., (1993) Trends in Microbiol. 1: 153-156
Plaut et al., (1975) Science 190: 1103-1105
Pohlner et al. (1993) Gene 130: 121
Pohlner et al., (1992) Biotech. 10: 799-804
Pohlner et al., (1987) Nature 325: 458-462.
- 20 Pohlner et al., (1994) Manuscript in preparation
Pryjma et al., (1994) Infect. Immun. 62: 1961-1967
Rheumatic Disease Clinics of North America 18: 741
Riviere et al., (1991) Nature 350: 625-626
Robertson und Meyer (1992) Trends Genet. 8: 422-427
- 25 Roudier et al., (1988) Scand J Immunology 27: 367-371
Röttschke and Falk, (1994) Curr. Biol 6: 45-51
Rudel T., (1994) Dissertation, Universität Tübingen
Schmitt and Haas, (1993) Mol. Mic. 12: 307-319
Sinigaglia and Hammer, (1994) Curr. Immun. 6: 52-56
- 30 Smith and Waterman, (1981) J. Mol. Biol 147: 195-197
Tisch et al. (1994) Behring Inst. Mitt. 94: 171-178
van Putten, J.P.M. und Paul, S., zur Veröffentlichung einge-
reicht
Viscidi et al., (1989) Science 246: 1606-1608
- 35 de Vries et al., (1990) Springer
Wagner et al., (1990) Proc. Natl. Acad. Sci 87: 3410-3414
Wiesmüller et al., (1989) Vaccine 7: 29

- 1 Williams, R.C. (1992) In: Encyclopedia of Immunology, Hrg.
Roitt und Delves, pp. 1339-1343
Wiertz, J.H.J. (1993) Dissertation, CIP-gegevens Koninklijke
Bibliotheek, Den Haag, ISBN 90-393-0399-1
5 Wordsworth et al., (1992) Am. J. Hum. Genet. 51: 585-591
Zhang et al. (1993) Science 261:1451-1454

10

15

20

25

30

35

1

P a t e n t a n s p r ü c h e

5

1. Arzneimittel zur Prophylaxe oder Behandlung von Autoimmunkrankheiten und/oder viralen Erkrankungen, dadurch gekennzeichnet, daß das Arzneimittel Stoffe oder Zellen enthält, die mit der natürlichen Funktion von bakteriellen Polyproteinen (BPPs) oder Bestandteilen davon oder mit den sie produzierenden Bakterien interferieren.

10

2. Arzneimittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Interferieren eine Inhibierung ist.

15

3. Arzneimittel nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Stoffe oder Zellen umfassen:

(a) bakterielle Polyproteine (BPPs) oder Bestandteile davon;

20

(b) immunkompetente Zellen oder immunologisch aktive Moleküle, die spezifisch sind für die BPPs oder die Bestandteile davon, für entsprechende homologe Peptide menschlicher Proteine, durch Wirkung der BPPs gebildete autoreaktive Peptide, durch die Wirkung der BPPs induzierte, von Viren bzw. endogenen Viren codierte Peptide oder zu derartigen viralen Peptiden homologe menschliche Peptide;

25

(c) nicht-pathogene oder nicht-pathogen gemachte Bakterien oder Bestandteile davon,

(d) Infektionshemmer;

30

(e) Stoffe, die die biologische Aktivität von BPPs inhibieren;

(f) Peptide oder Peptidanaloga, die Peptide aus MHC-Molekülen aufgrund einer hohen Bindungsaffinität verdrängen, deren Präsentation zu einer Autoimmunkrankheit führt.

35

(g) Stoffe, die die BPP- oder BPP-Bestandteil-induzierende Virusaktivierung inhibieren; oder

- 1 (h) Stoffe, die die Virus-bedingten Autoimmunreaktionen
inhibieren, wobei diese Reaktionen durch BPPs oder
deren Bestandteile induziert werden.
- 5 4. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch
gekennzeichnet, daß die Prophylaxe eine Immunisierung
umfaßt.
- 10 5. Arzneimittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet,
daß die Immunisierung eine aktive Immunisierung ist.
6. Arzneimittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet,
daß die Immunisierung eine passive Immunisierung ist.
- 15 7. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch
gekennzeichnet, daß die Autoimmunkrankheit rheumatoide
Arthritis ist.
- 20 8. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch
gekennzeichnet, daß die die BPP produzierenden Bakterien
zur Gattung Neisseria gehören.
- 25 9. Arzneimittel der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeich-
net, daß die virale Erkrankungen durch HIV induziert
wurde.
10. Arzneimittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet,
daß die durch HIV induzierte Krankheit AIDS ist.
- 30 11. Arzneimittel nach Anspruch 5, wobei zur Immunisierung
kapselspezifische Impfstoffe gegen Meningokokken-Infek-
tionen verwendet werden.
- 35 12. Arzneimittel nach Anspruch 5, wobei die Impfstoffe auf
der Basis der Proteine der äußeren Membran von Bakterien
der Gattung Neisseria hergestellt werden.

- 1 13. Arzneimittel nach Anspruch 12, wobei das Protein ein Porin ist.
- 5 14. Arzneimittel nach Anspruch 5, wobei die Impfstoffe auf der Basis der Adhesine der Neisserien hergestellt werden.
- 10 15. Arzneimittel nach Anspruch 14, wobei das Adhesin ein PilC-Protein ist.
- 15 16. Arzneimittel nach Anspruch 6, wobei die passive Immunisierung mit spezifischen Antikörpern oder T-Zellen erfolgt, die gegen Membrankomponenten oder Adhesinen von BPP-produzierenden Bakterien, vorzugsweise Neisserien gerichtet sind.
- 20 17. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei als Infektionshemmer Antibiotika oder Rezeptoranaloga zu Rezeptoren menschlicher Zellen, an die pathogene Bakterien binden können oder Liganden, die spezifisch für die Rezeptoren einer Bakterienoberfläche sind, kompetitive Peptide, oder nicht-pathogene oder attenuierte Neisserien sind.
- 25 18. Arzneimittel nach Anspruch 17, wobei das kompetitive Peptid PilC ist.
- 30 19. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 18, wobei das BPP IPP ist.
20. Arzneimittel nach Anspruch 19, wobei die IGA-Proteaseaktivität des IPP spezifisch gehemmt wird.
- 35 21. Arzneimittel nach Anspruch 19, wobei die Aspartylproteaseaktivität der β -Domäne des IPP spezifisch gehemmt wird.

- 1 22. Arzneimittel nach Anspruch 19, wobei die Aufnahme des α -
Peptids in menschliche Zellen oder deren Nukleus gehemmt
wird.
- 5 23. Arzneimittel nach einem der Ansprüche 1 bis 22, wobei
die Folgen der Infektion durch BPP-bildende Bakterien
durch Immunreaktion gegen BPP-bildende, insbesondere IPP
bildende Zellen, BPP, insbesondere IPP oder deren
Spaltprodukte inhibiert werden.
- 10 24. Arzneimittel nach Anspruch 23, wobei IPP-spezifische
Peptide-präsentierende Zellen von T-Zellen eliminiert
werden.
- 15 25. Arzneimittel nach Anspruch 23, wobei IPP-spezifische
Peptide-präsentierende Zellen von monoclonalen Antikör-
pern eliminiert werden.
- 20 26. Arzneimittel nach Anspruch 24, wobei antigenspezifische
suppressive T-Zellen verwendet werden.
- 25 27. Arzneimittel nach Anspruch 24, wobei anti-T-Zell-
RezeptorAntikörper zum Ausschalten von T-Zellen, die
eine Spezifität für BPPs oder Bestandteile davon, für
entsprechende homologe Peptide menschlicher Proteine,
durch Wirkung der BPP-Genprodukte gebildete autoreaktive
Peptide, durch die Wirkung der BPP-Genprodukte
induzierte, von Viren bzw. endogenen Viren codierte
Peptide oder zu derartigen viralen Peptiden homologe
30 menschliche Peptide aufweisen.
- 35 28. Diagnostische Zusammensetzung für den Nachweis des
ätiologischen Agens von Autoimmunkrankheiten und/oder
viralen Erkrankungen und/oder für den Nachweis der Kon-
trolle der Wirkung von Arzneimittel enthaltend
(a) Oligonucleotide bzw. Primer, die für BPP codierende
Gene spezifisch sind,

- 1 (b) Antikörper, die spezifisch für BPPs oder Bestand-
teile davon oder BPP bildende Bakterien sind;
(c) Substrate, die zum Nachweis der biologischen Aktivi-
tät der BPPs eingesetzt werden können; und/oder
5 (d) Antigene, die von Antikörpern gemäß Merkmal (b) ge-
bunden werden.

29. Diagnostische Zusammensetzung für den Nachweis und die
Überwachung des Verlaufs von BPP-induzierten Autoimmun-
10 krankheiten und/oder viralen Erkrankungen und/oder für
den Nachweis der Kontrolle der Wirkung von Arzneimit-
teln, enthaltend

- (a) Peptide, die autoreaktive immunkompetente Zellen
spezifisch stimulieren,
15 (b) Antikörper, die spezifisch sind für BPP-induzierte
virale Antigene oder Viren;
(c) Oligonucleotide bzw. Primer, die für BPP codierende
Gene spezifisch sind;
(d) Antikörper, die für BPP-bildende Bakterien oder de-
20 ren Antigene spezifisch sind;
(e) Antigene, die von Antikörpern gemäß (b) oder (d)
spezifisch gebunden werden; und/oder
(f) Substrate, die von viralen Genprodukten umgesetzt
werden, wobei die viralen Genprodukte von BPPs indu-
25 ziert worden sind.

30. Peptid, das ein Spaltprodukt eines IPP von Neisseria
meningitidis ist und eine der in Figur 1 dargestellte
Aminosäuresequenz aufweist.

30

31. Peptid, das ein Spaltprodukt eines BPP, vorzugsweise
eines IPP oder ein Fragment davon ist, oder ein
menschliches Homologes dazu ist, wobei das BPP,
vorzugsweise das IPP oder das Fragment davon oder das
35 menschliche Homologe erhältlich ist durch Computer-
gestützten Vergleich von BPP-, vorzugsweise IPP-Sequen-
zen mit Proteindatenbanken oder translatierten

1 Nucleinsäuredatenbanken von menschlichen Sequenzen oder
umgekehrt, wobei mindestens 6 Aminosäuren in einem
Abschnitt von 10 Aminosäuren zwischen den
5 Vergleichssequenzen identisch sind.

32. Peptid nach Anspruch 31, das eine in Tabelle VII, Fig.
2, Fig. 3 oder Fig. 8 dargestellte Aminosäuresequenz
aufweist.

10 33. Menschliches Peptid, das durch Einwirkung eines BPP,
vorzugsweise eines IPP oder eines Spaltproduktes davon
entsteht, ausgenommen die IgA₁-Spaltprodukte.

15 34. Virales Peptid, das durch Einwirkung eines BPP,
vorzugsweise eines IPP oder eines Spaltproduktes davon
entsteht.

20 35. Peptid, das ein virales Peptid, das durch die Einwirkung
eines BPP entstanden ist, oder ein menschliches Homolo-
ges dazu ist, wobei die virale Peptidsequenz durch
Computer-gestützten Vergleich mit Proteindatenbanken
oder translatierten Nucleinsäuredatenbanken von
menschlichen Sequenzen oder umgekehrt erhältlich ist und
25 wobei mindestens 6 Aminosäuren in einem Abschnitt von 10
Aminosäuren zwischen den Vergleichsequenzen identisch
sind.

30 36. Peptid nach einem der Ansprüche 30 bis 35, das ein von
einem Antikörper erkanntes Epitop darstellt.

37. Peptid nach einem der Ansprüche 30 bis 35, wobei das
Peptid nach MHC-Präsentation von einer T-Zelle erkannt
wird.

35 38. Verfahren zur Hemmung oder Aktivierung der Transkription
viral codierter Polypeptide, dadurch gekennzeichnet, daß
man Stoffe, vorzugsweise Biomoleküle, vorzugsweise

1 Proteine, DNA, RNA oder Anti-Sense-RNA oder synthetisch
hergestellte Moleküle, vorzugsweise therapeutisch
wirksame Moleküle in eukaryontische, vorzugsweise
5 menschliche Zellen oder deren Zellkern unter Verwendung
eines IgA- α -Proteins einschleust.

39. In vitro-Verfahren zur Clonierung und Vermehrung von
menschlichen T-Zellen, deren T-Zellrezeptor MHC-prä-
sentierte IPP-Fragmente spezifisch erkennt, wobei man
10 die T-Zellen in Gegenwart von BPPs oder Bestandteilen
davon, entsprechenden homologen Peptiden menschlicher
Proteine, durch Wirkung eines BPPs gebildeten
autoreaktiven Peptiden, durch die Wirkung eines BPPs
aktivierten, von Viren bzw. endogenen Viren codierten
15 Peptiden oder zu derartigen viralen Peptiden homologen
menschlichen Peptiden unter üblichen Bedingungen
stimuliert.

40. In vitro-Verfahren zur Clonierung und Vermehrung im-
munosuppressiver T-Zellen, die T-Zellen supprimieren,
20 welche in MHC-präsentierte abgeleitete Fragmente spezi-
fisch erkennen, wobei man die T-Zellen in Gegenwart von
BPPs oder Bestandteilen davon, entsprechenden homologen
Peptiden menschlicher Proteine, durch Wirkung eines BPPs
25 gebildeten autoreaktiven Peptiden, durch die Wirkung
eines BPPs aktivierten, von Viren bzw. endogenen Viren
codierten Peptiden oder zu derartigen viralen Peptiden
homologen menschlichen Peptiden unter üblichen
Bedingungen stimuliert.

41. Verfahren zur Diagnose einer Autoimmunerkrankung oder
einer Prädisposition dazu, vorzugsweise von rheumatoider
Arthritis, dadurch gekennzeichnet, daß man in einem T-
Zell-Proliferationstest ein IPP, ein Spaltprodukt eines
35 IPP oder ein Fragment davon oder ein menschliches
Homologes dazu auf Proliferation von reaktiven T-Zellen
testet.

1
42. Verfahren nach Anspruch 41, dadurch gekennzeichnet, daß
das Spaltprodukt oder Fragment davon, oder das menschliche
Homologe dazu die in Tabelle VII dargestellte Aminosäuresequenz aufweist.
5

43. Verfahren zum Nachweis von BPPs oder der sie bildenden
Bakterien, dadurch gekennzeichnet, daß man eine Polymerasekettenreaktion (PCR) mit für BPP-Gene spezifischen
Primern durchführt, und das PCR-Produkt durch DNA-Sequenzanalyse oder andere übliche Verfahren wie
Gelelektrophorese auf BPP-spezifische Sequenzen untersucht.
10

15
44. Verfahren zum Nachweis der BPP-abhängigen Aktivierung
von Viren oder viralen Elementen, dadurch gekennzeichnet, daß man eine PCR mit für die viralen Gene
spezifischen Primern durchführt, und das PCR-Produkt
durch DNA-Sequenzanalyse oder andere übliche Verfahren
wie Gelelektrophorese auf BPP-spezifische Sequenzen
untersucht oder die Aktivität der viralen reversen
Transkriptase oder anderer viraler Enzyme mißt.
20

25
45. Verwendung eines alpha-Proteins oder analogen Peptides
für das Targeting biologisch wirksamer Substanzen in
Zielzellen oder Zielgewebe.

46. Verwendung nach Anspruch 45, wobei die Zielzellen bestimmte Zellen des menschlichen Blutes darstellen.
30

47. Verwendung nach Anspruch 45, wobei die Zielzellen bestimmte Zellen der menschlichen Schleimhaut (z.B. des Nasopharynx) darstellen.
35

Figur 1:

DNA-Sequenz von *iga α 3*, *Neisseria meningitidis* D1941

```

1   AGCCCGCAGG CAAATCAAGC CGAAGAAGCA AAACGCCAAC AAGCAAAAGC
51  GGAGCAAGTG AAGCGTCAGC AAGCAGAGGC AGAAAAGTCG CACATCAAAA
101 AGACGAAGAA GCGAAACGCC AGCAAGATGC CTTGGCCCGC CAACAAGCAG
151 AGCAAGAACG TCAACGATTG GAAGCCGAAC GCCAAGCTGC CGAAATTGCC
201 AAACAAAAG CAGAAGCCGA AGAAGCGAAA CGCCGAGCCG CTGAAGCAAA
251 ACGCCAAGCT GCCGAACCTG CACGCCAACA AGAAGAAGCA CGAAAAGCTG
301 CAGAGTTGGC TGCTAAGCAA AAAGCGGAAA CTGAACGCAA AGCAGCAGAA
351 ATTGCCGAGC AAAAAGCGGA AGCCGAACGT GAAGCCGCCG AACTTGCAAA
401 GCAAAAGGCG GAAGAAGAAG GTCGCCAAGC AGCACAATCT CAACCCAAAC
451 GTCGTAACCG CAGGGCTATA CCACCG

```

Aminosäuresequenz von *Iga α 3*, *Neisseria meningitidis* D1941

```

-1  SPQANQAEAA KRQQAQAEQV KRQQAEEAEKV AHQKAEEAKR QQDALARQQA
51  EQERQRLEAE RQAAEIAKQK AEAEEAKRRA AEIAEQKAAA EEAKRQAAEL
101 ARQQEEARKA AELAAKQKAE TERKAAEIAE QKAEAEREAA ELAKQKAEED
151 GRQAAQSQPK RNRRAIPP

```

DNA-Sequenz von *iga α 4*, *Neisseria meningitidis* B1939

```

1   AGCCCGCAGG CAAATCAAGC CGAAGAAGCA AAACGCCAAC AAGCAAAAGC
51  GGAGCAAGTG AAGCGTCAGC AAGCAGAAGC AGAGCGTAAA TCGGCAGAGT
101 TAGCAAAACA AAAAGCAGAA GCCGAACGCG AAGCAAGAGA GCTGGCGACC
151 CGCCAAAAG CAGAACAAGA ACGCAGCAGC GCCGAACCTG CACGTCGACA
201 TGAAAAAGAA CGCGAAGCGG CAGAGTTGTC GGCAAAACAA AAAGTCGAAG
251 CCGAACGTGA GGCTCAAGCA TTGGCGGTAC GCCGAAAAGC AGAAGCCGCA
301 GAGGCAAAAC GACAAGCTGC AGAGCTTGCA CGCCGGCATG AAAAAGAACG
351 CGAAACGGCA GAGTTGTCGG CAAAACAAAG GGTCGGGGAA GAGGAACGCC
401 GTCAAACAGC CCAATCCCAG CCGCAACGCC GCAAACGCCG TGCCGCACCG
451 CAGGATTATA TGGCAGCTTC CCAAGACCGT CCTAAACGCC GCGGACACCG
501 TTCGGTACAG CAAAACAATG TGGAAATTGC CCAAGCCCAA GCAGAATTG
551 CGCGCCGACA GCAGGAAGAA CGCAAAGCGG CAGAGTTGTT GGCAAAACAA
601 AGGGCAGAAG CCGAACGTGA GGCTCAAGCA TTGGCTGCGC GCCGAAAAGC
651 AGAAGCCGAA GAGGCAAAAC GCCAAGCTGC CGAACTTGCA CATCGCCAGG
701 AAGCAGAACG CAAAGCGGCA GAATTGTCGG CAAACCAAAA AGCCACAGCT
751 GAAGCCCAAG CATTTGGCGGC ACGCCAACAA AAAGCCCTTG CGCGTCAACA
801 GGAAGAAGCA CGAAAAGCTG CAGAGTTAGC CGTCAAACAA AAAGCGGAAA
851 CCGAACGCAA AACC GCCGAA CTTGCCAAGC AAAGGGCAGC AGCCGAAGCA
901 GCAAAACGCC AGCAAGAAGC TCGCCAGACC GCCGAACCTG CACGTCGTCA
951 AGAAGCGGAA CGCCAAGCAG CAGAGTTGTC GGCAAAACAA AAAGCCGAAA
1001 CAGATCGAGA AGCGGCAGAA TCGGCGAAAC GAAAAGCTGA GGAAGAAGAG
1051 CACCGTCAAG CAGCCCAATC CCAGCCGCAA CGCCGAAAAC GCCCTGCCGC
1101 ACCTCAGGAT TATATGGCAG CTTCCCAAAA TCGTCCGAAA CGTCGCGGAC
1151 GCAGATCTAC TCTGCCGGCA CCGCCC

```

2/12

Aminosäuresequenz von *Iga_{Q4}*, *Neisseria meningitidis* B1939

```

1  SPQANQAEEA KRQQAQAEQV KRQQAEEAERK SAELAKQKAE AEREARELAT
51  RQKAEQERSS AELARRHEKE REAAELSAKQ KVEAEREQAQ LAVRRKAEEA
101 EAKRQAAELA RRHEKERETA ELSAKQRVGE EERRQTAQSQ PQRKRRRAAP
151 QDYMAASQDR PKRRGHRVSVQ QNNVEIAQAQ AELARRQEE RKAELLAKQ
201 RAEAREQAQ LAARRKAEEA EAKRQAAELA HRQEAERKAA ELSANQKATA
251 EAQALAAARQ KALARQEEA RKAELAVKQ KAETERKTAE LAKQRAAAEA
301 AKRQQEARQT AELARRQEA RQAELSAKQ KAETDREAAE SAKRKAEEEE
351 HRQAAQSQPQ RRKRPAAPQD YMAASQNRPK RRGRRSTLPA PP

```

DNA-Sequenz von *iga_{γ2}*, *Neisseria meningitidis* B1939

```

1  TCTCCTGCCA CAAACACGGC TTCTCAAGCA CAAAAGGCAA CACAAACGGA
51  CGGTGCACAA ATTGCCAAGC CTCAAAATAT CGTCGTCGCA CCACCT

```

DNA-Sequenz von *iga_{γ2}**, *Neisseria meningitidis* D1941

```

1  TCTCCTGCCA CAAACACGGC TTCTCAAGCA CAAAAGGCAA CACAAACGGA
51  CGGTGCACAA ATTGCCAAGC CTCAAAATAT CGTCGTCGCA CCGCCT

```

Aminosäuresequenz von *Iga_{γ2}*, *Neisseria meningitidis* D1941 und B1939

```

1  SPATNTASQA QKATQTDGAQ IAKPQNIVVA PP

```

DNA-Sequenz von *iga_{γ3}*, *Neisseria meningitidis* Ng17/84

```

1  TCTCCTGCCA CAAACACGGC TTCTCAAGCA CAAACGGACG GTGCACAAAT
51  TGCCAAGCCT CAAAATATCG TCGTCGCACC ACCT

```

Aminosäuresequenz von *Iga_{γ3}*, *Neisseria meningitidis* Ng17/84

```

1  SPATNTASQA QTDGAQIAKP QNIVVAPP

```

DNA-Sequenz von *iga_{γ4}*, *Neisseria meningitidis* B48

```

1  TCTCCTGCCA CAAACACGGC TTCTCAAGCA CAAACGGACA GTCCACAAAT
51  YCCAAGCCT CAAAATATCG TCGTCGCACC GCCT

```

Aminosäuresequenz von *iga_{γ4}*, *Neisseria meningitidis* B48

```

1  SPATNTASQA QTDSPQIPKP QNIVVAPP

```

3/12

Figur 2:

Iga _p Laminin b2	595 E E A R K N A M N H K 1131 E E A R K L A E R H K
Iga _{α1} Laminin b2	1042 E E A R K A A E 1131 E E A R K L A E
Iga _{α1} Laminin b2	999 A E E A L R 1131 A E E A L R
Iga _p Laminin a	575 A P M P E N G V 1181 A P A P E N G V
Iga _p Laminin a	427 V G D G T V I 2824 V G D G T M L
Iga _{γ1} IgE Rezeptor	960 S P A A N T A S 130 S L G A N T A S
Iga _{γ1} Hs47	963 A N T A S Q A Q K A 86 A T T A S Q A - K A
Iga _{γ1} Rsmb	962 A A N T A S Q A Q K A T Q 155 A A A T A S I A G A P T Q
Iga _p Proteoglykan	525 N S L S V H S I 27 N S L S V - S I
Iga _p Proteoglykan	250 D S G S P 2008 D S G S P
Iga _p Tubulin α1	277 Y G K K S W Q E W N I Y 161 Y G K K S K L E F S I Y
Iga _{α1} Nfh	1038 A R Q Q E E A R K A A 189 A R Q R E E A E A A A
Iga _{α2} Coxb	*122 A Q A L R A R 14 A Q A L R A R
Iga _{α4} Parathymosin	*73 A A E L S A K Q K V E 8 A A E L S A K D L K E

4/12

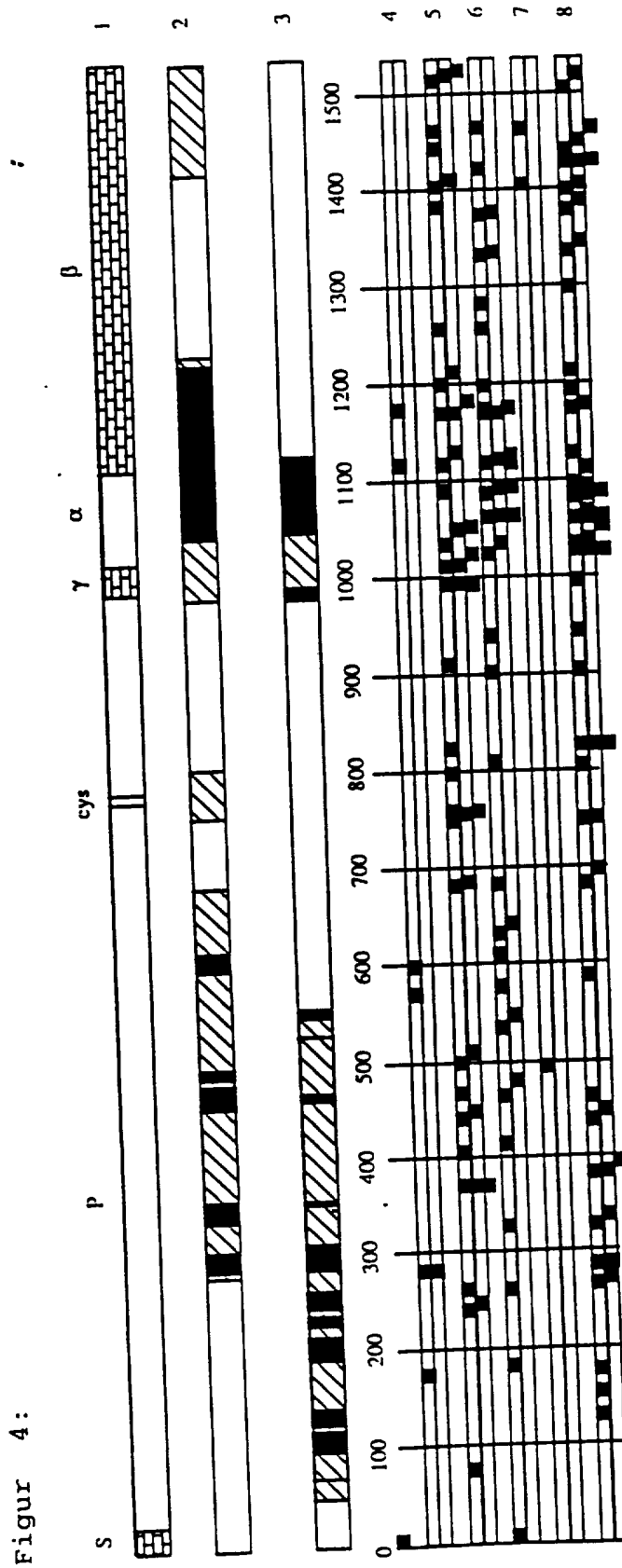
Iga α 2 Moesin	127 A R R K A E A E E A K 339 A K E R Q E A E E A K
Iga ρ T-Zell Granzyme a	249 G D S G S P L 210 G D S G S P L
Iga ρ Leukozyten Elastase	246 G V - L G D S G S P L 196 G V C F G D S G S P L
Iga ρ Chymotrypsinogen b	446 A F S Q V G I V S 224 A W T L V G I V S
Iga ρ Chymotrypsinogen b	374 A N N D I T W L 117 V N N D I T L L
Iga ρ Fibronektin	720 G R N V S D I T A N 1363 G I D F S D I T A N
Iga ρ Tenascin	722 N V S D I T A 1443 N V S D I T P
Iga ρ Tenascin	726 I T A N I T 1805 V T A N I T
Iga ρ Oxyb	727 T A N I T A T D 138 T A N I T V E D
Iga ρ Ig alpha-2 konstant	726 I T A N I T A T D N 202 L T A N I T K S G N
Iga ρ Cadherin 5	725 D I T A N I T 527 D N T A N I T
Iga β 1 Centromer Autoantigen b	1148 R Q A T Q F H S 219 R Q A T Q R L S
Iga β 1 IgE konstante Region	1229 M A S T Q S I L 171 L A S T Q S E L
Iga β 1 Fibrinogen gamma-b u. -a	1425 F K V G N L T V K P L L S A A Y F A 291 F K V G P E A D K Y R L T Y A Y F A

5/12

Figur 3:

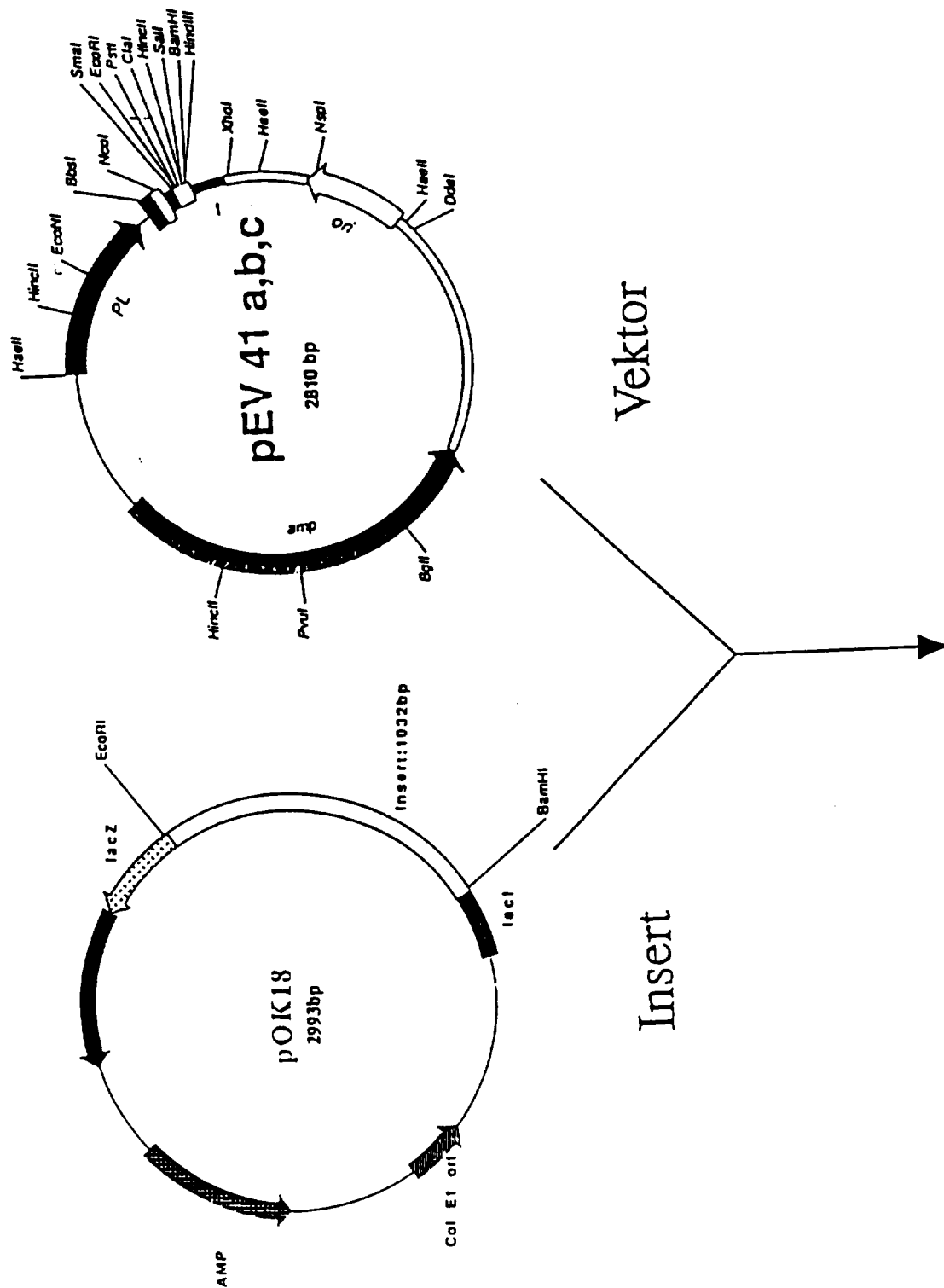
γ-peptide	Neisseria	S	P	A	A	N	T	A	S	Q	A	Q	K	A	T	Q	T	D	G	A	Q	I	A	K	P	Q	N	I	V	A	P	P	*	
									*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	
link protein	¹⁶⁸ G	R	Y	N	L	N	F	H	E	A	Q	Q	A	C	L	D	Q	D	A	V	I	A	S	F	D	Q	L	Y	D	A	W	R	22%	
	²⁶⁶ H	P	T	K	L	T	Y	D	E	A	V	Q	A	C	L	N	D	G	A	Q	I	A	K	V	G	Q	I	F	A	A	W	K	40%	
proteoglycan tandem repeat G1	¹⁷² T	R	Y	T	L	D	F	D	R	A	Q	R	A	C	L	Q	N	S	A	I	I	A	T	P	E	Q	L	Q	A	A	Y	E	25%	
	²⁷⁰ S	P	E	K	F	T	F	Q	E	A	A	N	E	C	R	R	L	G	A	R	L	A	T	T	G	H	V	Y	L	A	W	Q	25%	
proteoglycan tandem repeat G2	⁴⁹⁷ T	R	Y	S	L	T	F	F	E	E	A	Q	Q	A	C	P	G	T	G	A	V	I	A	S	P	E	Q	L	Q	A	A	Y	E	31%
	⁵³⁷ R	L	E	Q	F	T	F	Q	E	A	L	E	F	C	E	S	H	N	A	T	A	-	T	T	G	Q	L	Y	A	A	W	S	13%	
	human																																	
fibroblast proteoglycan precursor (versican)	¹⁵⁸ S	R	Y	T	L	N	F	F	E	A	A	Q	K	A	C	L	D	V	G	A	V	I	A	T	P	E	Q	L	F	A	A	Y	E	34%
	²⁵⁷ V	P	S	K	F	T	F	E	E	A	A	K	E	C	E	N	Q	D	A	R	L	A	T	V	G	E	L	Q	A	A	W	R	22%	
glial hyaluronate binding protein	¹⁰³ Q	K	A	C	L	D	V	G	A	I	A	T	A	C	L	D	V	G	A	V	I	A	T	P	E	Q	L	F	A	A	Y	E	25%	

6/12

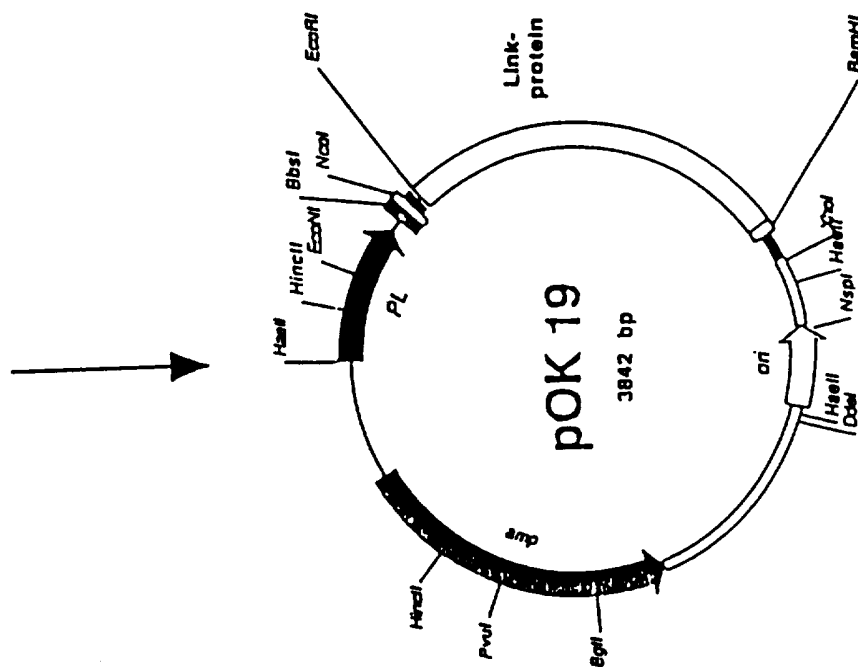


7/12

Figur 5:



Figur 5 (Fortsetzung):



9/12

Figur 6:

1 DHLSDNYTLD HDRAIHQAE NGPHLLLEAE QAKVFSHRGG NVTLPCKFYR
51 DPTAFGSGIH KIRIKWTKLT SDYLKEVDVF VSMGYHKKTY GGYQGRVFLK
101 GGSDDASLV ITDLTLEDYG RYKCEVIEGL EDTTVVVALD LQDVVFPYFP
151 RLGRYNLNEH EAOOACLDOD AVIASFDOLY DAWRGGLDWC NAGWLSDGSV
201 QYPITPPREP CGGQNTVPGV RNYGFWDKDK SRYDVFCFTS NFNGRFYYLI
251 HPTKLTIDEA VOACLNDGAO IAKVGOIFAA WKILGYDRCD AGWLADGSVR
301 YPISRPRRRC SPTEAAVRV GFDPKKHKLY GVYCFRAYN*

10/12

Figur 7:

IgA-1	115STPPTPS PSTPPTSPS CCHPRLS ¹²⁸
Cd8	135AKPTTTP APRPPTPAPT IASQPLS ¹⁵⁸
Cd6	89GGAEAAS QLAPPTPELP PPPAAGN ¹¹²
MsF	106MMASHYK QHCPPTPETS CATQIIT ¹¹⁹
Kol	565PGPPGPP AVMPPTPPPQ GEYLPDM ⁵⁸⁸
Tf-g	144GHASPHL FTFPPTPPKD VSPDPSL ¹⁶⁷
Nf-kappa-b	749AQNTMEP PLTPPSPAGP GLSLGDT ⁷⁷²
Cyt R-b	556PAASDLP TEQPPSPQPG PPAASHT ⁵⁷⁹
Mse55	263AATPTGP AANPPAPAAS STPHGHC ²⁸⁶
Il-11	146RLALPQP PPDPPAPPLA PPSSAWG ¹⁶⁹
TNF R1	438EEALCGP AALPPAPSL R ⁴⁵⁵
CC10	121VFTVTRQ THQPPAPNSL IRFNAVL ¹⁴⁴
Cd2	302HRVQHQP QKRPPAPSGT QVHQKKG ³²⁵
rfx	81VPAPSQPT GAPTPSPAPQ QYIVVTV ¹⁰⁵
CD45	16DTEVFVTG QSPTPSPTGL TTAKMPS ⁴⁰

11/12

Figur 8:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16		
X	P	X	X	X	Ac	X	X	Ac	X	Ac	X	Ac	X	P	P	P	(1)
T	P	A	P	T	I	A	S	Q	P	L	S	L	R	P			CD8 (2)
A	P	N	S	L	I	R	F	N	A	V	L	T	N	P			CC10 (3)

12/12

Figur 9:

MMTV 173 AYIEEQPVEV LLDTGADDSI VAGIELGPNY T....PKIVG GIG
HTLV-2 42 AHVEGQPVEV LLDTGADDSI VAGVELGSNY S....PKIVG GIG
SIV 84 IKIGGQLKEA LLDTGADDTV LEEMNLPGKW K....PKMIG GIG
CIV 93 VKVEGQLCEA LLDTGADDTV IERIQLQGLW K....PKMIG GIG
HIV-2 117 IYLNRRFLG LLDTGADKTC IAGRDWPANW PIHQTESSLQ GLG
HIV-1 68 IFVNGHPIKF LLDTGADITI LNRKDFQIGN SIENGKQNMI GVG
FIV 55 VLINDTPLNV LLDTGADTSV LTTAHY...N RLKYRGRKYQ GTG
EIV 93 MGQTPQPTQA LLDTGADLTV IPQTLVPG.. PVKLHDTLIL GAS
RRP 69 HAKTGVKLVF LLDTGADISI LKENSDFSN IQITNKINIQ GIG
IgA-P 1253 SDAMASTQSI LLDTGAYLTR HIAQSRADA EKNSVWMSNT GYG