

Immunreaktionen gegen durch Quecksilber (Hg) veränderte Selbstproteine: Dosis-Wirkungsbeziehungen und Spezifität bei Mensch und Maus

E. Gleichmann, P. Griem, A. von Mikecz, M. Chen, M. Doth, M. Kubicka-Muranyi

Medizinisches Institut für Umwelthygiene an der Heinrich-Heine-Universität, Auf'm Hennekamp 50, 40225 Düsseldorf

Zusammenfassung

Bei Allergien und Autoimmunerkrankungen, einschließlich der durch Chemikalien, wie z.B. HgCl_2 , hervorgerufenen, nehmen CD4^+ -T-Lymphozyten eine Schlüsselstellung ein. T-Zellen können jedoch nicht gegen Chemikalien als solche reagieren, sondern nur gegen MHC-assoziierte Peptide. Für das Verständnis unerwünschter Immunreaktionen gegen Chemikalien sind die Mechanismen der Antigenprozessierung und -präsentation (präimmunologische Phase) aufzuklären, nach denen Chemikalien (Selbst-)Proteine verändern, so daß sie immunogen werden. In Mäusen mit dem H-2^s Haplotyp ließen sich durch HgCl_2 -Belastung Autoantikörper gegen die Kernproteine Fibrillarin und Histon induzieren, wie sie - aus unbekannter Ursache - auch bei systemischen Autoimmunkrankheiten des Menschen beobachtet werden. Aus diesen Mäusen konnten CD4^+ T-Zellhybridome mit Spezifität für diese Kernproteine isoliert werden. Während einige der T-Zellklone die Kernproteine nur erkannten, wenn diese mit HgCl_2 vorbehandelt (denaturiert) wurden, reagierten andere gegen die unveränderten Kernproteine. Diese autoimmunen T-Zellklone erkannten offenbar sog. *kryptische* Peptide der Kernantigene auf den antigenpräsentierenden Zellen HgCl_2 -behandelter Mäuse. Offensichtlich kommt es durch die HgCl_2 -Belastung zu einer abnormen Expression dieser kryptischen Selbstpeptide und somit zu autoimmunen T- und B-Zellreaktionen. Die geplante Feinanalyse der Spezifität der beschriebenen T-Zellhybridome stieß zunächst auf technische Probleme, die auf einem Mangel an biochemisch aufgereinigten Kernproteinen der Maus als benötigten Antigenen beruhen. Das Kernantigen Fibrillarin der Maus wurde daher als *rekombinantes* Protein in Bakterien exprimiert. Zusätzlich wurde damit begonnen, die immunologischen Auswirkungen einer HgCl_2 -Behandlung auf ein weiteres Selbstprotein der Maus, das Cytochrom C, zu untersuchen, da dieses kommerziell erhältlich und hinsichtlich seiner kryptischen und dominanten Peptide gut charakterisiert ist. Eine Aktivierung von autoreaktiven T-Zellen gegen Cytochrom C nach Immunisierung gegen Cytochrom C plus HgCl_2 konnte zwar gezeigt werden, war jedoch nicht in allen Experimenten reproduzierbar. Es konnte gezeigt werden, daß B10.D2 (H-2^d) Mäuse keine Non-responder bezüglich einer HgCl_2 -Exposition sind, sondern mit einer Th1-Antwort reagieren, die zu einer Interferon- γ vermittelten Suppression der Antikörperproduktion führt.

Immune reactions against self-proteins altered by mercury (Hg): Dose-response relationships and specificity in men and mice

E. Gleichmann, P. Griem, A. von Mikecz, M. Chen, M. Doth, M. Kubicka-Muranyi,

Summary

CD4^+ T-lymphocytes play a key role in allergies and autoimmune diseases, including those elicited by chemicals, e.g. HgCl_2 . However, T cells do not react against chemicals directly, but in the context of MHC-associated peptides. Better understanding of adverse immune reactions against chemicals will be achieved by elucidating the mechanisms of antigenprocessing and antigenpresentation (preimmunological phase), where chemicals may alter self-proteins and thereby render them immunogenic. Chronic HgCl_2 treatment of H-2^s mice induces formation of autoantibodies to the nuclear proteins fibrillarin and histone; identical autoantibodies occur in human systemic

autoimmune disease of unknown etiology. We were able to prepare CD4⁺ T cell hybridomas from these mice which reacted to the nuclear proteins mentioned. While some of these T cell clones reacted only to the nuclear proteins when pretreated with HgCl₂, others recognized the nuclear proteins not pretreated with HgCl₂. Indirect evidence indicated that the latter *autoimmune* T cells reacted to *cryptic* peptides of the nuclear antigens that were presented by antigen-presenting cells of HgCl₂-treated mice. Apparently, HgCl₂ treatment leads to abnormal presentation of cryptic self-peptides of these nuclear antigens on antigen-presenting cells and, hence, to autoimmune T and B cell responses. Analysis of the fine specificity of these T cell clones proved to be technically difficult, mainly because of insufficient supply of the murine nuclear proteins as antigens. Therefore, we expressed *recombinant* mouse fibrillarin in a bacterial expression system. In addition, we started to analyze the effects of chronic HgCl₂ treatment of mice on T cell recognition of another self-protein, cytochrome C, because this is commercially available its dominant and cryptic peptides have been identified. We showed the activation of autoreactive T cells against cytochrom C after immunization with cytochrome C plus HgCl₂, however this result was not reproducible in all experiments. We demonstrated that B10.D2 (H-2^d) mice are not non-responders against HgCl₂ exposure, but build a Th1 response which leads to a interferon- γ -mediated suppression of the antibody production.

A. EINLEITUNG

Die Ätiologie und initiale Pathogenese von systemischen Autoimmunerkrankungen sind unbekannt. Ansatzpunkte zur besseren Erforschung dieser Krankheiten liefern Einzelfallbeschreibungen und Tiermodelle, in denen systemische Autoimmunerkrankungen nach Exposition mit chemischen Fremdstoffen entstehen [Dayan, A.D. et al., 1990]. Das Schwermetall Quecksilber befindet sich nicht nur im Mittelpunkt der aktuellen Diskussion zur Toxizität von Zahnamalgamen, sondern induziert im Tiermodell auch Autoimmunerkrankungen. Da Autoimmunerkrankungen chronisch sind und 5% der Bevölkerung in den Industriestaaten betreffen, stellt die Erforschung der molekularen, möglicherweise durch anthropogene Fremdstoffe bedingten Ursachen dieser Erkrankungen eine der zentralen Fragestellungen in der biomedizinischen Forschung dar. So wurden u.a. Patienten beschrieben, bei denen eine SLE- oder sklerodermieartige Autoimmunkrankheit nach Belastung mit Quecksilber auftrat, und im Tiermodell (Mäuse, Ratten) induzieren Quecksilbersalze T-zellabhängige Autoimmunreaktionen [Reuter, R., et al., 1989; Kubicka-Muranyi, M., et al., 1996]. Gibt man HgCl₂ zu Kulturen mononukleärer Zellen des peripheren Blutes sensibilisierter Patienten, so kommt es fast stets zu einer starken T-Zellproliferation [Nordlind, K., and Liden, S., 1993]. Neue Befunde bei der Maus [Jiang, Y. and Möller, G., 1995; Kubicka-Muranyi, M., et al., 1995] lassen vermuten, daß es sich hierbei nicht, wie bisher angenommen, um einen mitogenen Effekt von Hg(II) handelt, sondern um spezifische T-Zellreaktionen gegen Komplexe von Hg(II) und Selbstproteinen. Aus diesen Beobachtungen ergibt sich die Frage, über welchen Pathomechanismus die Belastung mit dem Schwermetall Hg zu Autoimmunreaktionen führen kann. Aufgrund theoretischer immunologischer Überlegungen ist anzunehmen, daß diese Autoimmunreaktion nicht mit der Autoantikörperbildung durch B-Lymphozyten beginnt, sondern auf der Ebene der T-Zellen ihren Anfang nehmen muß.

Identifikation der Selbstpeptide, die den quecksilberspezifischen CD4⁺-T-Lymphozyten präsentiert werden

CD4⁺-T-Lymphozyten nehmen in der Pathogenese von Allergien und Autoimmunerkrankungen - auch der chemisch induzierten - eine zentrale Rolle ein. Auf welche Weise allerdings CD4⁺-T-Zellen durch Chemikalien aktiviert werden, ist kaum bekannt, denn T-Zellen können grundsätzlich nicht gegen Chemikalien als solche reagieren, sondern nur gegen kurze Peptide, die ihnen - im Falle der CD4⁺-Zellen - auf MHC-II-Molekülen präsentiert werden. Die durch sensibilisierende Chemikalien immunogen gemachten Selbstproteine bzw. -peptide, sind noch nicht identifiziert. Die "klassischen" Haptene, wie Trinitrophenylderivate, binden kovalent an Proteine bzw. Peptide. Im Gegensatz zu diesen bilden Metallionen mit Proteinen und Peptiden Komplexe, d.h. nichtkovalente Bindungen an mindestens zwei oder - im Falle von Hg(II) - maximal vier Liganden (= Aminosäureketten). Diese Metall-Peptid-Komplexe sind in der Regel weniger stabil als eine kovalente Bindung und können z.B. durch eine Ligandenaustauschreaktion unter Freisetzung des Peptids abgelöst werden.

Aufklärung der präimmunologischen Prozesse, die zur Quecksilber-induzierten Autoimmunität führen

Bei bestimmten Mausstämmen führen niedrige Dosen von HgCl_2 nach der Aktivierung von T-Zellen auch zur Produktion antinukleärer Autoantikörper (ANA). Wichtige induzierte antinukleäre Autoantikörper sind hierbei solche gegen das nukleoläre Protein *Fibrillarin* [Hultmann et al., 1989, Reuter et al., 1989], das mit kleinen nukleolären RNAs (snoRNAs) zum U3-Partikel komplexiert. Antinukleoläre Autoantikörper (ANoLA) gegen Fibrillarin werden auch bei Patienten mit Sklerodermie, einer systemischen Autoimmunkrankheit, gefunden. Die Zielregionen (Epitope) innerhalb des Fibrillarin-Moleküls, die von idiopathischen humanen ANoLA erkannt werden, stimmen mit denen der chemisch induzierten murinen antinukleären Antikörper überein [Lübben et al., 1996]. Diese antinukleären Antikörper eignen sich nicht nur hervorragend als Werkzeuge für die Zellbiologie, im Gegensatz zu anderen verfügbaren Tiermodellen ist bei der quecksilberinduzierten Autoimmunität das Zielantigen der Immunantwort bekannt. Daher eignet sich das murine HgCl_2 -Modell zur Aufklärung der präimmunologischen/zellbiologischen Prozesse, die die Autoimmunantwort in Patienten initiieren. Neuere Ergebnisse weisen darauf hin, daß Quecksilber direkt mit dem Selbstprotein Fibrillarin interagieren kann und dadurch dessen molekulare und antigene Eigenschaften verändert [Pollard et al., 1997].

B. QUECKSILBER-BELASTUNG IN VIVO UND IN VITRO

B.I. Fragestellungen

1. Welche Bestandteile (Peptide) des Cytochrom C/Fibrillarins werden von den autoreaktiven CD4^+ T-Zellen erkannt? Da *kryptische* Peptide von körpereigenen Proteinen normalerweise nicht im Immunsystem präsentiert werden, kann gegen sie auch keine immunologische Toleranz ausgebildet werden. Kommt es zur Präsentation derartiger kryptischer Peptide auf antigenpräsentierenden Zellen, kann eine autoimmune T-Zellreaktion beginnen. Solange rekombinantes Fibrillarin nicht in den für dieses Versuche benötigten Mengen zur Verfügung steht, soll untersucht werden, wie HgCl_2 die Immunogenität des Modellproteins Cytochrom C verändern kann, d.h. ob es zur Präsentation von Hg(II) -Peptid-Komplexen und/oder kryptischen Peptiden kommt. Für eine gewisse Erfolgswahrscheinlichkeit dieses experimentellen Ansatzes spricht, daß von RUUD ALBERS von der Universität Utrecht kürzlich berichtet wurde, daß die Injektion von Cytochrom C der BALB/c Maus zur Bildung von IgG-Autoantikörpern gegen dieses Selbstprotein führt, wenn es in vitro mit HgCl_2 vorbehandelt wurde [Albers, et al. 1997]. Darüber hinaus wurden von MARK MAMULA und Mitarbeitern zwei kryptische Peptide des Cytochroms C in B10.BR Mäusen beschrieben [Mamula et al. 1992 und 1993].
2. Kann rekombinantes Fibrillarin als Antigen zur Stimulation von T-Zellhybridomen hergestellt werden?
3. Wie bereits erwähnt, bedarf es für die Entstehung einer systemischen Autoimmunkrankheit infolge Hg-Belastung einer *genetischen Prädisposition*. So entwickeln bei der Maus Mäuse mit dem H-2^s -Haplotyp diese Krankheit, Stämme mit dem H-2^d -Haplotyp jedoch nicht. Hieraus ergibt sich die Frage, ob die H-2^d -Stämme völlig *resistent* gegenüber immunologischen Veränderungen einer Hg-Belastung sind oder ob sie andere immunpathologische Symptome als die einer systemischen Autoimmunkrankheit aufweisen. Es ist beschrieben, daß die durch HgCl_2 induzierbare systemische Autoimmunkrankheit vornehmlich auf einer Aktivierung der Th2-Zellen aus der Population der CD4^+ T-Zellen beruht [GOLDMAN et al. 1991, GRIEM et al. 1995]. Wir haben Hinweise darauf, daß die HgCl_2 -Belastung von H-2^d -Mäusen demgegenüber zu einer präferentiellen Aktivierung ihrer Th1-Zellen führt, also nicht auf einer *Resistenz* gegenüber HgCl_2 beruht. Es soll überprüft werden, ob eine HgCl_2 -Belastung von H-2^d -Mäusen bei diesen, im Gegensatz zu H-2^s -Mäusen, zu einer Immunsuppression führt, und ob diese durch HgCl_2 induzierte Immunsuppression auf einer vermehrten Sekretion von Interferon- γ beruht.

4. Der HgCl₂-induzierten Expression *kryptischer Peptide* des Kernproteins Fibrillarin auf MHC II-Molekülen (zur Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen) dürften zelluläre Ereignisse vorangehen (präimmunologische Phase), die sich wahrscheinlich auch *ohne* CD4⁺ T-Zellhybridome als Nachweissonden entdecken lassen. Kommt es in der präimmunologischen Phase der quecksilber-Autoimmunität zu einer gesteigerten Expression von Fibrillarin innerhalb und möglicherweise auch außerhalb des Zellkerns? Kommt es zu einer Dislokation des Fibrillarins aus dem Nukleolus in das Zytoplasma? Gelangt Fibrillarin somit in den MHC II-Prozessierungsweg für die CD4⁺ T-Zellen?

B.II. Methoden

1. Nach Immunisierung von B10.A (H-2^k) Mäusen mit HgCl₂-komplexiertem körpereigenem Cytochrom C soll zunächst die Proliferation von T-Zellen gegen Cytochrom C *in vitro* gemessen werden. Parallel dazu soll die Bildung von antinukleären Autoantikörpern gegen Cytochrom C in einem ELISA untersucht werden. Anschließend sollen T-Zellhybridome hergestellt und auf Reaktion gegen Cytochrom C getestet werden. Die dabei gefundenen cytochromspezifischen T-Zellhybridome sollen dann unter Verwendung synthetischer Cytochrom C-Peptide auf ihre Feinspezifität untersucht werden, um die Frage zu klären, ob sie Hg(II)-Peptid-Komplexe oder kryptischer Peptide erkennen.

2. Die Klonierung der murinen cDNA für Fibrillarin in geeignete prokaryontische Expressionsvektoren und die Expression, sowie Aufreinigung von rekombinantem Fibrillarin erfolgten wie vorher beschrieben [von Mikecz et al., 1995].

3. Als Parameter eines möglichen immunsuppressiven Effekts von Quecksilber wurde die Antikörperproduktion gegen Schafserythrozyten gewählt. Zum Vergleich werden sowohl H-2^s (B10.S) als auch H-2^d (B10.D2) Mäuse drei mal wöchentlich mit 0.5 mg HgCl₂/kg BW behandelt. Nach Immunisierung gegen und Booster-Injektion von Schafserythrozyten wird den Tieren nach verschiedenen Zeiträumen Blut abgenommen und der Anti-Erythrozyten-Titer im Hämagglutinationstest bestimmt. Zur Ermittlung des Einflusses von Th1-Zytokinen wurden B10.D2 Mäuse während der Zeit der Immunisierung zusätzlich mit neutralisierenden Anti-Interferon- γ -Antikörpern behandelt. Alternativ wurden B10.S Mäuse mit rekombinantem Interferon- γ behandelt.

4. Für die Untersuchungen zur Expression von Fibrillarin fanden proteinbiochemische und zellbiologische Methoden Anwendung [von Mikecz et al., 1997]. Humane epitheliale Zellen wurden in Kultur gebracht und mit subtoxischen Konzentrationen HgCl₂ (50 μ M) für vier Stunden belastet. Die Zellen wurden geerntet, mit Polyacrylamid-Gelelektrophoresepuffer lysiert und die Proteine mittels Proteingelelektrophorese entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Fibrillarin wurde im Immunoblot nachgewiesen und die Quantität/Qualität des Proteins anhand der Bandenintensität festgestellt. Für die subzelluläre Lokalisation von Proteinen wurden humane epitheliale Zellen ebenfalls *in vitro* auf Objektgläsern kultiviert und mit subtoxischen HgCl₂-Konzentrationen belastet. Die Zellen wurden fixiert und die Lokalisation von Proteinen mittels indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt.

B.III. Resultate

1. Nach Immunisierung von B10.A (H-2^k) Mäusen gegen das unveränderte Selbstprotein Cytochrom C in komplettem Freund's Adjuvans, war in T-Zellproliferationstests keine Reaktion gegen das ganze Protein oder die beiden in der Literatur beschriebenen kryptischen Peptide zu beobachten. Dieses entspricht in der Literatur beschriebenen Beobachtungen an MRL +/+ Mäusen (MAMULA et al. 1992). Entgegen den in der Literatur für B10.BR Mäuse (ebenfalls H-2^k) beschriebenen Ergebnissen, war nach Koimmunisierung gegen eine Mischung aus Pferde-Cytochrom C und Maus-Cytochrom C keine autoreaktive T-Zellproliferation in den benutzten B10.A Mäusen zu sehen. Nach Immunisierungen gegen mit HgCl₂ versetztes Maus-Cytochrom C waren die Ergebnisse bislang uneinheitlich. Während in einem Experiment eine Proliferation von autoreaktiven Milz- und Lymphknoten-T-Zellen gegen Cytochrom C deutlich nachweisbar war, waren die Ergebnisse in zwei weiteren Versuchen nur schwach positiv und in einem vierten negativ. Das Ergebnis nach

Immunisierung mit der fünffachen Menge an Cytochrom C war ebenfalls negativ. Nach Immunisierung der Mäuse gegen die kryptischen Peptide anstelle des ganzen Proteins, war in beiden Fällen eine Proliferation der T-Zellen gegen intaktes Cytochrom C zu sehen, was auf die Aktivierung autoreaktiver T-Zellen deutet. Interessanterweise war nur in einem Fall auch eine In-Vitro-Reaktion gegen das für die Immunisierung benutzte Peptid zu sehen.

2. Die biochemische Aufreinigung ausreichender Mengen des nukleolären Fibrillarins, das als Antigen zur Restimulation autoreaktiver CD4⁺ T-Zellen und - nach der Hybridisierung - entsprechend der T-Zellhybridome eingesetzt werden kann, ist arbeitsintensiv und kostspielig. Deshalb wurde *rekombinantes* Fibrillarin der Maus in Bakterien produziert. Die cDNA des mäuseichen Fibrillarin ist in prokaryontischen Expressionsvektoren des pGEX-Systems als Fusionsprotein mit der Glutathion-S-Transferase kloniert, in Bakterien exprimiert und das Fusions-Protein aufgereinigt worden. Das rekombinante Protein weist bisher keine erkennbaren Unterschiede zu dem nativen Fibrillarin auf, soweit mit Westernblot unter Verwendung fibrillarinspezifischer Antikörper untersucht.

3. Während die Behandlung von B10.S Mäusen mit HgCl₂ keinen Einfluß auf die Produktion von Anti-Erythrozyten-Antikörpern zeigte, war in B10.D2 Mäusen am Anfang des Beobachtungszeitraumes eine deutliche Suppression der Antikörperantwort zu beobachten. Durch Behandlung der B10.D2 Mäuse mit Anti-Interferon- γ -Antikörpern wurde der suppressive Effekt von Quecksilber vollständig unterdrückt. Die Behandlung von B10.S Mäusen mit rekombinantem Interferon- γ führte zu einer Suppression der Antikörperantwort, die der durch in B10S Mäusen vergleichbar war. Zusammenfassend zeigte sich, daß B10.D2 (H-2^d) Mäuse keinesfalls Non-responder bezüglich einer Exposition sind, sondern mit einer Th1-Antwort reagieren. Die produzierten Th1-Zytokine führen zu einer teilweisen Suppression der Th2-abhängigen Antikörpersynthese. Die Suppression konnte anstatt mit HgCl₂ auch direkt mit rekombinantem Interferon- γ ausgelöst werden und durch Behandlung mit neutralisierenden Anti-Interferon- γ -Antikörpern verhindert werden. Diese Beobachtungen lassen den Schluß zu, daß die HgCl₂ induzierte Immunsuppression durch die Produktion von Interferon- γ und die damit ausgelöste Verschiebung zu einer Th1-Antwort vermittelt wird. Die Ergebnisse wurden veröffentlicht in DOTH et al. 1997.

4. Der HgCl₂-induzierten Expression *kryptischer Peptide* des Kernproteins Fibrillarin auf MHC II-Molekülen (zur Erkennung durch CD4⁺ T-Zellen) dürften zelluläre Ereignisse vorangehen (präimmunologische Phase), die sich wahrscheinlich auch *ohne* CD4⁺ T-Zellhybridome als Nachweissonden entdecken lassen. So könnte es unter HgCl₂-Belastung zu folgenden Ereignissen kommen:

- einer *gesteigerten Expression* von Fibrillarin innerhalb und möglicherweise auch außerhalb des Kerns;
- einer *Dislokation* des Fibrillarin von Nukleolus in das Zytoplasma und somit in den MHC II-Prozessierungsweg für die CD4⁺ T-Zellen;
- einer Komplexierung des intra- und extrazellulären Fibrillarin mit Hg(II), die zu verändertem Abbau (= Antigenprozessierung) dieses Selbstproteins führen würde.

Zur Untersuchung dieser Annahmen haben wir ein in Vitro Zellkultursystem entwickelt, daß eine Belastung von humanen epithelialen Zellen mit Schwermetallen und die darauffolgende biochemische und zellbiologische Analyse von Proteinen erlaubt. Belastet man humane Epithelzellen mit subtoxischen Konzentrationen HgCl₂ (50 μ M), so bleibt die Gesamtmenge an Fibrillarin zwar unverändert, es zeigt sich jedoch eine qualitative Änderung, d.h. neben der üblichen 34 kD Form von Fibrillarin taucht eine zweite Form bei 30 kD auf. Bei der 30 kD-Form des Fibrillarin kann es sich um ein proteolytisches Produkt oder um ein komplexiertes Protein mit anderen Laufeigenschaften handeln. Neben den molekularen Eigenschaften ändert sich nach HgCl₂-Belastung auch die subzelluläre Lokalisation von Fibrillarin. Während Fibrillarin in unbehandelten Interphasezellen ausschließlich im Nukleolus lokalisiert ist, verteilt es sich nach HgCl₂-Belastung aus dem Nukleolus in das Nukleoplasma um. Diese dramatische Umverteilung (Dislokation) der subzellulären Lokalisation scheint in einer Zeitkinetik mit den molekularen Veränderungen des Fibrillarins einherzugehen. Da die Zielantigene einer Immunantwort von der Proteinstruktur determiniert werden, können Änderungen im molekularen Kontext (Proteolyse, veränderte Konformation oder subzelluläre Umverteilung) eine effizientere Antigenpräsentation von vorher kryptischen Determinanten bewirken und somit die Toleranz des Immunsystems gegen Selbstantigene durchbrechen. Im Rahmen des

Projektes sollen daher zukünftig die Mechanismen untersucht werden, die zu den biochemischen Veränderungen von Fibrillarin nach HgCl₂-Belastung führen: findet Proteolyse/Antigenprozessierung von Fibrillarin statt? Zudem soll die Frage beantwortet werden, ob die Umverteilung des Fibrillarins in der Zelle zu einer physischen Nähe mit der Antigenprozessierungs- und Antigenpräsentationsmaschinerie der Zelle führt.

C. SCHLUSSFOLGERUNGEN

Aus diesem Zwischenbericht geht hervor, daß die geplanten Versuche noch keineswegs zu einem Abschluß gekommen sind. Es wird versucht, die aufgetretenen technischen Schwierigkeiten bei der Gewinnung Quecksilber-spezifischer T-Lymphozyten zu beseitigen bzw. durch Änderung des Versuchsansatzes zu umgehen. In den Mittelpunkt des Interesses ist neben der Untersuchung Quecksilber-spezifischer T-Lymphozyten, die Untersuchung der initialen zellbiologischen Prozesse getreten, die in der präimmunologischen Phase der Quecksilber-induzierten Autoimmunität eine Rolle spielen. Zu diesem Zwecke ist ein in Vitro Testsystem aufgebaut worden, das es ermöglicht, Zellen mit Schwermetallen zu belasten und das Schicksal von Monitorproteinen, insbesondere dem Autoantigen Fibrillarin, zu verfolgen. Initiale Resultate zeigen in der Tat eine dramatische Umverteilung der Lokalisation des Autoantigen Fibrillarin in der Zelle nach Quecksilberbelastung. Unserer Modellvorstellung entsprechend ermöglicht diese Umverteilung eine physische Nähe des Fibrillarins zur Antigenprozessierungs- und Antigenpräsentationsmaschinerie der Zelle und somit die Präsentation von Fibrillarinpeptiden an die T-Lymphozyten. Hier ergibt sich auch die Attraktivität des gewählten Versuchsansatzes, da die in Vitro gewonnenen Erkenntnisse über die präimmunologische Phase der Quecksilber-induzierten Autoimmunität, mit den Quecksilber-spezifischen T-Lymphozyten als "read out" überprüft werden können.

D. VERÖFFENTLICHUNGEN

D.I. VERÖFFENTLICHUNGEN ANDERER AUTOREN

DAYAN, A.D., HERTEL, R.F., HESELTINE, E., KAZANTIS, G., SMITH, E.M. AND VAN DER VENNE, M.T.: Immunotoxicity of Metals and Immunotoxicology. Plenum Press, New York, London, (1990).

SILMAN, A.J.: Epidemiology of scleroderma. *Ann. Rheum. Dis.* **50**: 846-863 (1991).

SCHRALLHAMMER-BENKLER, K., J. RING, B. PRZBILLA, M. MEURER, M. LANDTHALER: Acute mercury intoxication with lichenoid drug eruption followed by mercury contact allergy and development of antinuclear antibodies. *Acta Derm. Venerol. (Stockh.)* **72**: 294-296 (1992).

MAMULA, M. J., R. H. LIN, C. A. JANEWAY, JR., J. A. HARDIN: Breaking T cell tolerance with foreign and self co-immunogens. A study of autoimmune B and T cell epitopes of cytochrome c. *J. Immunol.* **149**: 789-795 (1992).

NORDLIND, K., S. LIDEN: In vitro lymphocyte reactivity to heavy metal salts in the diagnosis of oral mucosal hypersensitivity to amalgam restorations. *Br. J. Dermatol.* **128**: 38-41 (1993).

ENESTRÖM, S., P. HULTMAN: Does amalgam affect the immune system? A controversial issue. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **106**: 180-203 (1995).

JIANG; Y., AND G. MÖLLER. In vivo effects of HgCl₂ on murine lymphocytes. 1. Preferable activation of CD4(+) T cells in a responder strain. *J. Immunol.* **154**: 3138-3146. (1995).

ALBERS, R., A. BROEDERS, A. VAN DER PIJL, W. SEINEN, R. PIETERS: The use of reporter antigens in the popliteal lymph node assay to assess immunomodulation by chemicals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **143**: 102-109 (1997).

MAMULA, M. J.: The inability to process a self-peptide allows autoreactive T cells to escape tolerance. *J. Exp. Med.* **177**: 567-571.

POLLARD, K.M., D.K. LEE, C.A. CASIANO, M. BLÜTHNER, M. JOHNSON AND E.M. TAN. The autoimmunity-inducing xenobiotic mercury interacts with the autoantigen fibrillarin and modifies its molecular and antigenic properties. *J. Immunol.* **158**: 3521-3528. (1997).

D.II. EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

REUTER, R., G. TESSARS, H.W. VOHR, E. GLEICHMANN AND R. LÜHRMANN. Mercuric chloride induces autoantibodies against U3 small nuclear ribonucleoprotein in susceptible mice *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **86** : 237-241. (1989).

OCHEL, M., H.-W. VOHR, C. PFEIFFER, E. GLEICHMANN: IL-4 is required for the IgE and IgG1 increase and IgG1 autoantibody formation in mice treated with mercuric chloride. *J. Immunol.* **146**: 3006-3011 (1991).

GOLDMAN, M., PH. DRUET, E. GLEICHMANN: T_H2 cells in systemic autoimmunity: insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol. Today* **12**: 223-227 (1991).

RÖGER, J., D. ZILLIKENS, G. BURG, E. GLEICHMANN: Overlap syndrome in a patient with long-standing exposure to mercury. *Eur. J. Dermatol.* **2**: 168-170 (1992).

KUBICKA-MURANYI, M., O. BEHMER, M. UHRBERG, H. KLONOWSKI, E. GLEICHMANN: Murine systemic autoimmune disease induced by mercuric chloride (HgCl₂): Hg-specific helper T cells react to antigen stored in macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.* **15**: 151-161 (1993).

KUBICKA-MURANYI, M., R. GOEBELS, C. GOEBEL, J. UETRECHT, E. GLEICHMANN: T lymphocytes ignore procainamide, but respond to its reactive metabolites in peritoneal cells: demonstration by the adoptive transfer popliteal lymph node assay. *Tox. Appl. Pharmac.* **122**: 88-94 (1993).

VAN VLIET, E., M. UHRBERG, C. STEIN, E. GLEICHMANN: MHC control of IL-4-dependent enhancement of B cell Ia expression and Ig class switching in mice treated with mercuric chloride. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **101**: 392-401 (1993).

LÜBBEN, B., N. ROTTMANN, M. KUBICKA-MURANYI, E. GLEICHMANN, R. LÜHRMANN: The specificity of disease-associated anti-fibrillarin autoantibodies compared with that of HgCl₂-induced autoantibodies. *Mol. Biol. Reports* **20**: 63-73 (1994).

KUBICKA-MURANYI, M., P. GRIEM, B. LÜBBEN, N. ROTTMANN, R. LÜHRMANN, E. GLEICHMANN: Mercuric chloride-induced autoimmunity in mice involves upregulated presentation by spleen cells of altered and unaltered nucleolar self antigen. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **108**: 1-10 (1995).

GRIEM, P., E. GLEICHMANN: Metal-induced autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **7**: 831-838 (1995).

VON MIKECZ, A.H., , P.H. HEMMERICH, H.-H. PETER, U. KRAWINKEL. Autoantigenic epitopes on eukaryotic L7. *Clin. Exp. Immunol.* **100**: 205-213. (1995).

KUBICKA-MURANYI, M., J. KREMER, N. ROTTMANN, B. LÜBBEN, R. ALBERS, N. BLOKSMA, R. LÜHRMANN, E. GLEICHMANN: Murine systemic autoimmune disease induced by mercuric chloride: T helper cells reacting to self proteins. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **109**: 11-20 (1996).

DOTH, M., M. FRICKE, F. NICOLETTI, G. GAROTTA, M.-L. VAN VELTHYSEN, J. A. BRUIJN, E. GLEICHMANN: Genetic differences in immune reactivity to mercuric chloride (HgCl₂): immunosuppression of H-2^d mice is mediated by interferon-gamma (IFN-γ). *Clin. Exp. Immunol.* **109**:149-156 (1997).

VON MIKECZ, A., K. KONSTANTINOV, D. BUCHWALD, L. GERACE AND E.M. TAN. High frequency of autoantibodies to insoluble cellular antigens in chronic fatigue syndrome. *Arthritis and Rheum.* **40**: 295-305. (1997).