



Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendliche  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dieter Körholz)

**Das T-Zell kostimulatorische Molekül CD137 als potentielle  
„Zielstruktur“ in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen**

Habilitation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Dr. med. habil.

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
Dr. med. Jürgen Föll  
geboren am 30.08.1960 in Rielasingen/Worblingen

Gutachter:

- 1.
- 2.
- 3.

*Meiner Familie Evita, Jan, Katharina, Niels und Antonia in Liebe und  
Dankbarkeit gewidmet.*

## Referat und bibliographische Gestaltung

**Hintergrund:** Obwohl Autoimmunerkrankungen zu den häufigsten Erkrankungen bei Kindern und Erwachsenen in der westlichen Bevölkerung zählen, ist die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen noch weitgehend ungeklärt. Bisherige Arbeiten zeigten, dass ein Ak gegen CD137 die humorale Immunität hemmt und eine zellvermittelte Immunität steigert über direkte CD137-Rezeptor Wirkung auf verschiedenen Zielzellen. Aufgrund der zentralen Rolle von T-, B-Zellen und DCs in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen war es von Interesse die Wirkung des anti-CD137-Antikörpers auf die zellvermittelte und humorale Immunität in verschiedenen Mausmodellen für Autoimmunerkrankungen zu untersuchen. In dem Tiermodell für die RA (CIA) und dem Tiermodell für den SLE (NZB/NZW F<sub>1</sub>) wurde die Wirkung einer Immuntherapie mit einem monoklonalen, agonistischen Antikörper gegen CD137 getestet.

**Zielstellungen:** (1) Untersuchungen der Wirkung und Effizienz eines agonistischen Ak gegen CD137 auf den Krankheitsverlauf in zwei Tiermodellen (RA und SLE) für Autoimmunerkrankungen und (2) Untersuchungen zur eventuellen Induktion einer Toleranz oder Anergie gegenüber Autoantigenen; (3) Untersuchungen über einen therapeutischen Effekt einer Immuntherapie mit anti-CD137 Ak in den Tiermodellen und (4) Untersuchungen über zelluläre Wirkungen und auf den molekularen Wirkungsmechanismus einer Immuntherapie mit einem Ak gegen CD137.

**Methoden:** Immunisierung und Antikörperbehandlung von Mäusen; Virus-Infektion von Mäusen; Zelltransfer in Mäusen; Histologie; Immunhistochemie; Generierung von DCs; ELISA; Aktivitätsmessung von Zytokinen mit ELISpot; Durchflußzytometrie; Nachweis spezifischer T-Zellen mit Tetrameren; Western-Blot, RT-PCR.

**Ergebnisse:** (1) Die Behandlung mit einem Ak gegen CD137 im RA- oder SLE-Tiermodell beeinflusste entscheidend den weiteren Krankheitsverlauf. Die Behandlung hemmte effizient die Autoantikörperproduktion, die organpathologischen Veränderungen, die krankheitsspezifischen Symptome und verlängerte deutlich das Überleben der Tiere. (2) Die Behandlung der RA- und SLE-Mäuse führte bei den Tieren zu keiner generellen Hemmung des Immunsystems gegenüber Fremdanitigenen, sondern erzeugte eher eine Autoantigen spezifische Hemmung der Immunantwort. Dabei erzeugte der anti-CD137 Ak eine Anergie der T-Zellen oder vielmehr wurde die primär vorhandene Toleranz gegenüber dem Autoantigen wieder hergestellt. (3) Ein wichtiger Faktor für die Wirkung der Behandlung war der Zeitpunkt der Intervention. Durch die Behandlung von bereits an RA oder SLE erkrankten Mäusen mit dem Ak gegen CD137 konnte nicht nur die voranschreitende Autoimmunerkrankung mit den morphologischen Veränderungen in den Organen aufgehalten werden, sondern es wurden auch Regressionen der Veränderungen erreicht. (4) Die Behandlung der Mäuse mit einem Ak gegen CD137 in den verschiedenen Tiermodellen führte zu einer Vermehrung von IFN $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zu einer Vermehrung von potentiellen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen. Des Weiteren erzeugte der Antikörper eine CD4<sup>+</sup> T-Zellen und DC abhängige Verminderung von IL-2 und IL-4 und tötet keine autoreaktiven T-Zellen oder B-Zellen ab. In den Zelltransferexperimenten konnte gezeigt werden, dass der hemmende Effekt der anti-CD137 Ak Behandlung auf die Autoantikörperproduktion durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder DCs aufgehoben werden kann. In dem Tiermodell für Virusinfektionen wurden deutliche Hinweise gefunden, dass der anti-CD137 Ak in der Frühphase der Immunantwort seine Wirkung über DCs vermittelt und bei Intervention in einer bereits ablaufenden Immunantwort seine Wirkung über T-Zellen vermittelt mit einer vermehrten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. In den in vitro Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass durch die Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors auf der Oberfläche von DCs verstärkt intrazellulär STAT3-Moleküle phosphoryliert werden und es zu einer vermehrten Bildung des immunsuppressiven Moleküls IDO kommt. Diese Ergebnisse könnten auf einen eventuellen molekularen Wirkungsmechanismus der anti-CD137 Ak Behandlung hinweisen.

**Schlussfolgerungen:** Die Behandlung von RA- oder SLE- Mäusen mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 führt zu einer Hemmung des Entstehens der Autoimmunerkrankung oder bei bereits etablierter Erkrankung zu einer Hemmung des Fortschreitens oder Regression der Autoimmunerkrankung. Der Zeitpunkt der Behandlung mit einem Ak gegen CD137 ist entscheidend für die Wirkung auf die Immunantwort gegen Autoantigene oder Fremdanitigene. Entscheidend für die immunsuppressive Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den verschiedenen Tiermodellen könnte die Generierung von regulatorischen DCs durch die Aktivierung des CD137 Rezeptors und Produktion des immunsuppressiven IDO bzw. Aktivierung von STAT3-Molekülen sein.

Jürgen Föll:

Das T Zell kostimulatorische Molekül CD137 als potentielle „Zielstruktur“ in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen

Halle, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Medizinische Fakultät

Habilitationschrift, 108 Seiten, 35 z. T. farbige Abbildungen, 2007

# Inhaltsverzeichnis

<b>I. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
I.1  Zentrale und periphere Toleranzmechanismen.....	2
I.2  Pathogenese von Autoimmunerkrankungen .....	7
I.3  Die Rolle der T- und B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen .....	12
I.3.1  Die Rheumatoide Arthritis (RA).....	12
I.3.2  Der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) .....	16
I.4  Kostimulatorische Moleküle.....	20
I.4.1  Der kostimulatorische Rezeptor CD137 (4-1BB).....	22
I.5  Ziele der Arbeit.....	23
<b>II. Material und Methoden</b> .....	<b>26</b>
II.1  Mausmodell für humane RA, die Kollagen induzierte Arthritis (CIA) .....	26
II.1.1  Mäuse .....	27
II.1.2  CIA Induktion.....	27
II.1.3  Antikörper Behandlung.....	27
II. 1.4  Beurteilung und Messung der Arthritis .....	28
II. 1.5  Konzentrationsbestimmung der anti-CII Antikörper im ELISA.....	28
II. 1.6  Histologie der Gelenke .....	29
II. 1.7  Messung von Oberflächenmarkern mit dem Durchflußzytometer .....	29
II. 1.8  Nachweis von IFN- $\gamma$ produzierenden Zellen mit dem ELISpot .....	29
II. 2  Mausmodell für Systemischen Lupus Erythematodes (NZB/NZW F <sub>1</sub> ).....	30
II. 2.1  Mäuse .....	31
II. 2.2  Antikörper-Behandlung .....	31

II. 2.3	Messung von Oberflächenmarkern mit dem Durchflußzytometer .....	32
II. 2.4	Depletion von CD4+ oder CD8+ T-Zellen in vivo .....	32
II. 2.5	Nachweis von IgM und IgG anti-DNA Autoantikörpern im Serum .....	33
II. 2.6	Nachweis der Proteinurie .....	33
II. 2.7	Histologie und Immunhistologie .....	34
II. 2.8	Immunisierung mit Erythrozyten vom Schaf (SRBC) und der Nachweis spezifischer Antikörper gegen SRBC .....	34
II. 2.9	Generierung von Dendritischen Zellen (DC) .....	35
II. 2.10	Transfer von Dendritischen Zellen (DC) und CD4+ T-Zellen.....	35
II. 2.11	Transferierung von CFSE markierten T- und B-Zellen in BALB/c oder NZB/W F1 Mäuse.....	36
II. 2.12	Nachweis von IL-2 und IL-4 produzierenden Zellen mit dem ELISpot.	36
II. 3	Zusätzliche Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus einer anti-CD137-Antikörper-Behandlung .....	37
II. 3.1	Untersuchungen an einem Modell für Virusinfektionen (LCMV, „lymphocytic-choriomeningitis-virus“) .....	37
II. 3.1.1	Mäuse, Antikörper und Virus .....	37
II. 3.1.2	Nachweis von Oberflächenmarkern, Tetramer positiven T-Zellen und intrazellulärem Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ).....	38
II. 3.1.3	Generierung und Aktivierung von DCs .....	39
II. 3.1.4	Transfer von in vitro LCMV infizierten DCs und T-Zellen.....	39
II. 3.2	Untersuchungen mit humanen Zellen auf Generierung von immun modulierenden DCs .....	40
II. 3.2.1	Gewinnung und Aktivierung von humanen DCs .....	40
II. 3.2.2	Nachweis von Indoleamine 2,3 Dioxygenase in humanen DCs durch RT-PCR (Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion) und Real-Time-PCR.....	41
II. 4.	Statistische Analysen .....	41

<b>III. Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
III. 1 Wirkung eines agonistischen Antikörpers gegen CD137 in einem Mausmodell für RA (CIA) .....	42
III. 1.1 Ein Anti-CD137 Ak hemmt die humorale Immunantwort gegen CII und verhindert die Entwicklung einer Arthritis .....	42
III. 1.2 Anti-CD137 Ak hinterlässt in bCII immunisierten Mäusen eine Immunität gegen das Arthritis auslösende Antigen bCII. ....	43
III. 1.3 Eine verzögerte Behandlung mit anti-CD137 Ak schützt vor Entwicklung einer Arthritis und Produktion von Autoantikörpern gegen Kollagen ...	45
III. 1.4 Therapeutische Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung .....	46
III. 1.5 Gelenkshistologie nach anti-CD137 Ak-Behandlung.....	47
III. 1.6 Milz-Zellen aus anti-CD137 Ak-behandelten Tieren produzieren erhöhte Mengen an IFN- $\gamma$ .....	48
III. 1.7 Anti-CD137 Ak-Behandlung erhöht Anzahl CD4+, CD8+ und CD4+CD25+ T-Zellen .....	49
III. 2 Wirkung eines agonistischen Ak gegen CD137 in einem Mausmodell für den Systemischen Lupus Erythematoses (SLE).....	51
III. 2.1 Anti-CD137 Antikörper hemmt die Produktion von IgG-, aber nicht von IgM- Autoantikörpern gegen dsDNA in NZB/W F <sub>1</sub> Mäusen.....	52
III. 2.2 Anti-CD137 Ak hemmt die Entwicklung einer Immunkomplex Glomerulonephritis in NZB/W F1 Mäusen.....	54
III. 2.3 Anti-CD137 Ak blockiert die Formation von Keimzentren („germinal center“) in der Milz bei NZB/W F1 Mäusen .....	56
III. 2.4 Anti-CD137 Ak schützt die NZB/W F1 Mäuse vor Entwicklung einer Proteinurie.....	57
III. 2.5 Eine anti-CD137 Ak-Behandlung führt zu einer Einschränkung der Funktion von CD4+ Helfer T-Zellen und nicht von CD8+ T-Zellen .....	58
III. 2.6 Anti-CD137 Ak-Behandlung hemmt die IL-2 und IL-4 Produktion von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen .....	59
III. 2.7 Verkürzte Lebenszeit von NZB/W F1 CD4+ T-Zellen und CD19+ B-Zellen. ....	60
III. 2.8 Anti-CD137 Ak hemmt nicht eine bereits etablierte humorale Immunantwort gegen Fremdartigene. ....	62

III. 2.9	Anti-CD137 Ak-Wirkung ist unabhängig von der Bindung zwischen CD137 Rezeptor und CD137Ligand.....	63
III. 2.10	Transfer von „aktivierten CD4+ T-Zellen“ oder in vitro generierte DCs hemmen die suppressiven Effekte der anti-CD137 Ak-Behandlung....	64
III. 2.11	Anti-CD137 Ak-Behandlung generiert minimal erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen .....	66
III. 3	Hinweise auf einen möglichen Wirkungsmechanismus durch Beobachtungen der Wirkung von anti-CD137 Ak in einem Mausmodell für virale Infektion..	67
III. 3.1	Anti-CD137 Ak hemmt oder verstärkt die Entwicklung einer LCMV-spezifischen CD8 <sup>+</sup> Immunantwort.....	68
III. 3.2	Unterschiedliche CD137 Rezeptor-Expression auf DCs und T-Zellen im Verlauf einer LCMV-Infektion .....	70
III. 3.3	Anti-CD137 Ak hemmt die LCMV-spezifische T-Zellen Immunantwort in der „priming phase“ durch Interaktion mit dem CD137 Rezeptor auf DCs .....	72
III. 3.4	Aktivierung des CD137 Rezeptors auf DCs führt zur intrazellulären Phosphorylierung des Signaltransduktionsmoleküls STAT3. ....	74
III. 4	Untersuchung auf einen möglichen molekularen Wirkungsmechanismus einer anti-CD137 Ak-Behandlung.....	75
<b>IV.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
IV. 1.	Das Tiermodell für RA (CIA).....	77
IV. 2.	Das Tiermodell für SLE (NZB/W F1).....	80
IV. 3.	Ergebnisse aus dem Mausmodell für virale Infektionen (LCMV).....	85
IV. 4.	Ergebnisse zum Nachweis eventueller molekularer Mechanismen.....	88
IV. 5.	Wirkungsmechanismen einer anti-CD137 Ak-Behandlung .....	89
IV. 5.1	Induktion der Apoptose von (autoreaktiven) T-Zellen.....	89
IV. 5.2	Generierung von regulatorischen T-Zellen.....	90
IV. 5.3	Induktion einer CD4+ T-Zellen-Anergie.....	91
IV. 5.4	Apoptose von (autoreaktiven) B-Zellen .....	92

**V. Zusammenfassung..... 93**

- V.1 Untersuchungen der Wirkung und Effizienz eines agonistischen Ak gegen CD137 auf den Krankheitsverlauf in zwei Tiermodellen (RA und SLE) von T- und B-Zellen abhängigen Autoimmunerkrankungen ..... 93
- V.2 Untersuchungen zur eventuellen Induktion einer Toleranz oder Anergie gegenüber Autoantigenen nach einer Behandlung mit anti-CD137 Ak ..... 94
- V.3 Untersuchungen über einen therapeutischen Effekt einer Immuntherapie mit anti-CD137 Ak in den Tiermodellen ..... 95
- V.4 Untersuchungen zur zellulären Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen und virale Infektionen ..... 95
- V.5 Untersuchungen zum exakten molekularen Wirkungsmechanismus einer Immuntherapie mit einem agonistischen Ak gegen CD137..... 97

**VI. Literatur ..... 98**

**VI. Anhang ..... 109**

- 1. Thesen der Habilitation ..... 109
- 2. Tabellarischer Lebenslauf ..... 112
- 3. Erklärungen..... 113
- 4. Danksagung ..... 114



## I. Einleitung

Unser angeborenes und das adaptive Immunsystem schützen uns vor Gefahren durch Bakterien, Viren oder andere in den Körper eindringende Pathogene und den daraus eventuell resultierenden pathologischen Veränderungen oder Krankheitssymptomen. Andererseits können unerwünschte Immunantworten gegen körpereigene Proteine/Antigene (Autoantigene) zu Autoimmunerkrankungen oder gegen ansonsten harmlose Antigene (Allergene) zu Allergien führen, die Funktionen unseres Organismus beeinträchtigen oder sogar vollständig zerstören können. Es ist das Phänomen der immunologischen Toleranz, welches unseren Körper vor der Selbstzerstörung durch unser Immunsystem schützt und es ist der Verlust von immunologischer Toleranz oder körpereigenen Regulationsvorgängen, die vermutlich zur Entwicklung von Autoimmunerkrankungen oder Allergien führen (1, 110). Autoimmunerkrankungen sind Erkrankungen, die Ärzte der unterschiedlichsten Fachdisziplinen beschäftigen.

Mit einer Erkrankungshäufung in der erwachsenen westlichen Bevölkerung von ca. 0,2- bis 0,5% bei der Rheumatoiden Arthritis (RA, Kinder und Jugendliche ca. 100/100000 Kinder) und 5- bis 10 je 100000 Einwohner beim systemischen Lupus Erythematosus (SLE, Kinder und Jugendliche ca. 0,5/100000 Kinder) zählen Autoimmunerkrankungen mit zu den häufigsten Erkrankungen (3, 145, 186, 208). Sie können lokal begrenzt oder systemisch, akut oder chronisch auftreten und jedes Organ im menschlichen Körper kann davon betroffen sein. Durch die Häufigkeit und den oft chronischen Verlauf der Erkrankung müssen jährlich hohe Behandlungskosten (je nach Erkrankungsdauer und Intensität zwischen 13000.- € und 35000.-€ pro Jahr) aufgebracht werden, die eine erhebliche wirtschaftliche Belastung für unsere Gesellschaft darstellen (77) .

Trotz intensiver Forschung in den letzten Jahren und Jahrzehnten ist die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen noch weitgehend ungeklärt und damit Gegenstand fortbestehenden wissenschaftlichen Interesses. Somit ist die Erforschung neuer Zielstrukturen für alternative Behandlungsstrategien bei Autoimmunerkrankungen von allgemeinem gesellschaftlichem Interesse.

## I.1 Zentrale und periphere Toleranzmechanismen

Die Klassifizierung einer Erkrankung als Autoimmunerkrankung hängt vom Nachweis einer Immunreaktion gegen den eigenen Körper ab. Demzufolge ist Autoimmunität die Folge des Verlustes der Nicht-Entwicklung einer Immunantwort gegen körpereigene Antigene (Verlust der Toleranz) und die Folge einer unerwünschten Immunreaktion von Lymphozyten gegen körpereigene Strukturen bzw. Proteine (Autoantigene).

Autoimmunerkrankungen können durch autoreaktive B-Zellen (Produktion Autoantikörper) und/oder durch T-Zellen verursacht werden (34, 105). Gerade diese zellulären Komponenten des Immunsystems schützen unseren Körper vor eindringende Mikroorganismen oder sonstigen chemischen Substanzen. Unter anderem wird diese Funktion durch spezielle Rezeptoren auf der Oberfläche von T-Zellen („TCR“, T-Zell Rezeptor) und B-Zellen („BCR“, B-Zellrezeptor) vermittelt, welche Antigene binden, die durch spezifische MHC-Moleküle („Major-Histocompatibility-Complex“) T- oder B-Zellen präsentiert werden (siehe auch Abbildung 1). Bei der Entwicklung und Differenzierung von B-Zellen im Knochenmark und T-Zellen im Thymus kommt es durch Rekombination verschiedener Gene im menschlichen Genom (Umordnung von drei separaten Gensegmenten, „variable“-V; „diversity“-D; „joining“-J genes), unter der Kontrolle von spezifischen Genen (RAG1/2; „recombination activating genes“), zu einer Vielzahl verschiedener Möglichkeiten von spezifischen Rezeptoren auf der Oberfläche von B- und T- Zellen zur Erkennung von Antigenen. Im weiteren Verlauf einer Immunreaktion kommt es in den peripheren lymphatischen Organen (Milz, Lymphknoten, Tonsillen) durch einen Prozess, der „somatische Hypermutation“ genannt wird, zur Substitution von einzelnen Nukleotiden im Bereich der spezifischen Rezeptoren. Eine Vielzahl von Rezeptoren, die durch diese Prozesse generiert werden, hat das Potential, gegen körpereigene Antigene zu reagieren. Jeder Lymphozyt produziert nur einen einzigen Rezeptor (BCR oder TCR) auf dessen Oberfläche, und es wird geschätzt, dass ca. 20 bis 30% der T-Zellen aus dem Thymus oder 55-75% der B-Zellen aus dem Knochenmark primär eine hohe Affinität gegenüber körpereigenen Antigenen aufweisen (78, 205) (100, 192). Bei dieser hohen Anzahl von potentiell autoreaktiven Lymphozyten benötigt unser Körper ein leistungsstarkes und gut funktionierendes Regulationssystem zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegen sich selbst (80). Die Toleranz gegen körpereigene Antigene wird durch eine Vielzahl von zentralen und

peripheren zellulären Mechanismen aufrechterhalten und schützt unseren Körper vor potentiell autoreaktiven Lymphozyten (Tabelle 1).

<b>T-Zellen</b>	
<b>Thymus</b>	<b>Lymphknoten, Milz</b>
Deletion autoreaktiver T-Zellen (negative thymische Selektion)	Zelltod nach Aktivierung (AICD) durch permanente Autoantigen-Stimulation
Clonale Anergie („tuning“, biochemische oder Gen Expressions-Veränderungen)	Deletion oder Anergie durch Fehlen adäquater T-Zell Kostimulation
Wechsel des TCR („TCR- $\alpha$ -chain editing“) durch Autoantigen-Stimulation	Regulation Homöostase durch membranständige Rezeptoren (z.B. FASL, CD152)
	Immunregulatorische Zytokine (z.B. IL-7, IL-2, IL-10, TGF- $\beta$ )
	Regulatorische T Zellen (CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> Foxp3 <sup>+</sup> )
<b>B-Zellen</b>	
<b>Knochenmark</b>	<b>Lymphknoten, Milz</b>
Deletion von unreifen B-Zellen	Deletion oder Anergie bei Fehlen notwendiger T Zell Hilfe (CD40/CD40L; IL-2, IL-4, IL-5, IL-21)
Clonale Anergie („tuning“, biochemische oder Gen-Expressions-Veränderungen, lösliche Autoantigene)	Kontrolle B-Zell-Homöostase durch membranständige Rezeptoren und Zytokine (BAFF, FASL, BTLA)
Vorgang des „Rezeptor Editings“ (Wechsel V-Region durch Autoantigen-Stimulation)	Ag Rezeptor Blockade durch lösliche Autoantigene und Kompetetion mit nicht autoreaktiven BCR
	Antikörper Produktion hemmt B Zell Aktivierung („feedback“ Mechanismus)
	Hemmung durch Ausreifung (Plasmazellen, „Reifungszentrum“)

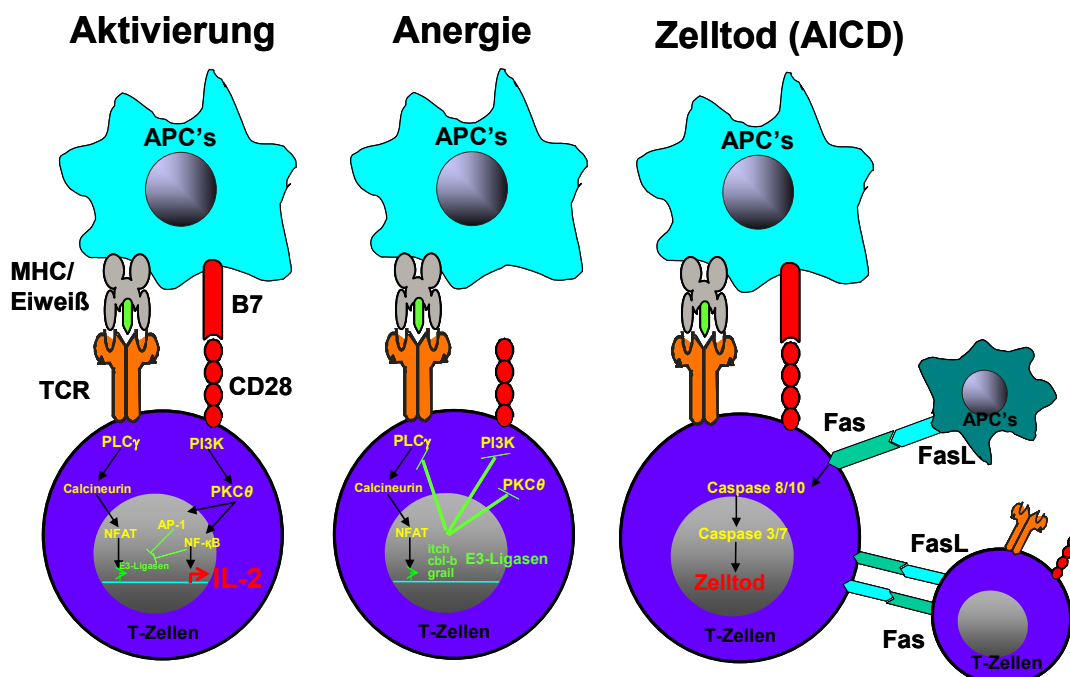
**Tabelle 1: Zentrale und periphere Toleranzmechanismen (modifiziert nach (62))**

Die drei wichtigsten zentralen Mechanismen sind „Clonale Deletion“ oder „Clonale Anergie“ und der Vorgang des „Rezeptor Editings“. Bei der „Clonalen Deletion“ (negative Selektion) werden Lymphozyten mit einem Antigenrezeptor mit Spezifität zu Autoantigenen abgetötet und verlassen nicht den Thymus oder das Knochenmark. Bei diesem Vorgang ist die Rezeptoraffinität zu dem Autoantigen nicht von entscheidender Bedeutung, solange das Autoantigen in ausreichend hoher Konzentration an der Oberfläche der Stromazellen in den zentralen lymphatischen Organen exprimiert wird. Beim Vorgang der „Clonalen Anergie“ (B- oder T-Zellen „tuning“) werden Lymphozyten in einen funktionellen Zustand versetzt, bei dem es trotz optimaler Stimulation durch Bindung des spezifischen Antigens an dessen Rezeptor nicht zu einer weiteren Aktivierung kommt (105, 107, 149, 166). Des Weiteren werden durch biochemische- oder Gen-Expressions- Veränderungen deaktivierende Moleküle generiert oder die ko-Expression von hemmenden Rezeptoren initiiert, welche Lymphozyten in einen Zustand der Anergie versetzen, in dem sie nicht mehr adäquat auf spezifische Signale (Bindung Antigen/MHC-Komplex

an TCR oder BCR) antworten können (166). Obwohl dieser Mechanismus bereits unter verschiedenen tierexperimentellen Bedingungen nachgewiesen wurde, bleibt die Existenz eines derartigen Mechanismus unter physiologischen Bedingungen beim Menschen weiterhin unklar. Ein weiterer Vorgang der zentralen Toleranz ist die Regulation von autoreaktiven Lymphozyten durch „Rezeptor Editing“. Bei diesem Vorgang kommt es bei Vorhandensein eines Signals von einem autoreaktiven Antigen Rezeptor zu einer erneuten Rekombination der Rezeptor Gensegmente (V(D)J) und zu einem neuen Rezeptor mit unterschiedlicher Antigenspezifität. Dieser Vorgang führt somit nur zu einem Ersetzen des TCR oder BCR mit keiner oder deutlich weniger Affinität zu Autoantigenen und nicht zu einer vollständigen Zerstörung der Zelle (92, 138).

Die Prozesse der zentralen Toleranzmechanismen können nicht in jedem Fall gewährleisten, dass autoreaktive Lymphozyten den Thymus oder das Knochenmark als reife, funktionelle Zellen verlassen. Außerdem werden nicht alle körpereigenen gewebsspezifischen Antigene in den zentralen lymphatischen Organen exprimiert. Aus diesen Gründen existieren noch zusätzliche periphere Toleranzmechanismen, die autoreaktive Lymphozyten regulieren, deren Aktivierung hemmen und vor Autoimmunität schützen (Tabelle 1). Die peripheren Toleranzmechanismen kontrollieren die Aktivierung von autoreaktiven reifen und funktionellen Lymphozyten durch unterschiedliche Mechanismen, wie Limitierung der Bereitstellung von immunregulatorischen Zytokinen und Wachstumsfaktoren, Generierung von inhibitorischen, membranständigen Rezeptoren, Fehlen von adäquater Kostimulation oder durch aktive Hemmung autoreaktiver Lymphozyten durch regulatorische T-Zellen (1, 62, 105). Im Gegensatz zu reifen, funktionellen Lymphozyten führt eine Aktivierung über den TCR oder den BCR bei unreifen T- und B-Zellen zu den oben beschriebenen Regulationsmechanismen der zentralen Toleranz. Bei reifen, immunologisch kompetenten Zellen führt eine Bindung eines Antigens, entweder als Antigen/MHC-Komplex bei T-Zellen oder als Antigen bzw. Antigen/Ig-Komplexe hauptsächlich bei B-Zellen, an den TCR oder BCR zu einer weiteren Aktivierung und Differenzierung der Zellen (Abbildung 1). Dabei konkurrieren autoreaktive TCR oder BCR mit Rezeptoren, die weniger Autoreaktivität haben (32). Des Weiteren benötigen B- oder T-Zellen ein kontinuierlich starkes Signal über den TCR oder BCR (Signal 1), um die Zellen am Leben zu halten. Dabei ist das weitere Überleben der B-Zellen abhängig von der ausreichenden Generierung und Bereitstellung von BAFF

(Bindung an BAFF-Rezeptor) und bei T-Zellen von Zytokinen, wie Interleukin-7 oder Interleukin-2 (8, 32, 62). Ein weiterer peripherer Regulationsmechanismus ist, dass B- oder T-Zellen zwei Signale in kurzer Reihenfolge zur weiteren vollständigen Aktivierung, Proliferation und Differenzierung benötigen (Abbildung 1). Das erste Signal (Signal 1) kommt durch Bindung des T-Zellen- oder B-Zellen-Antigenrezeptors und des MHC/Antigen Komplexes auf immunologisch kompetenten Zellen zustande. Das zweite Signal (Signal 2) wird durch kostimulatorische Moleküle auf den B- und T-Zellen nach Bindung des spezifischen Liganden auf APC's oder T-Helfer-Zellen bereitgestellt (13, 99). Das Fehlen des zweiten Signals führt zur unvollständigen Zellaktivierung und zu Zelltod oder Anergie der Zelle (Abbildung 1) (22, 36, 81, 99). Das Oberflächenmolekül CD40-Ligand (CD40L) auf T-Helfer-Zellen und der spezifische Rezeptor CD40 auf der B-Zelle sowie verschiedene Zytokine (IL-2, IL-4, IL-5, IL-21) liefern das notwendige zweite Signal für die B-Zellen-Proliferation und die Differenzierung in Antikörper produzierende „Plasma-Zellen“ (54, 93).



**Abbildung 1: Mechanismen der T-Zellen Aktivierung und der peripheren T-Zellen Toleranz (5, 94, 159)**

TCR Stimulation in Abwesenheit von Kostimulation induziert ausreichend E3-Ligasen (Itch, Cbl-b, Grail), welche zur Elimination bzw. Hemmung der Phosphorylierung anderer Kinasen (PLC $\gamma$ ...) führt. TCR Stimulation in Anwesenheit von Kostimulation induziert eine vollständige Aktivierung der T-Zelle mit IL-2 Produktion und zu einer Hemmung der E3-Ligasen. Des Weiteren führt die vollständige T-Zellen Aktivierung, bei Ausbleiben von weiteren Signalen, zu einer Expression von Apoptose-Rezeptoren (FAS, TNFR1) und zum Zelltod nach Aktivierung (AICD).

T Zellen benötigen ebenfalls zur effizienten Aktivierung ein zweites Signal, welches über verschiedene kostimulatorische Moleküle auf der Oberfläche von T-Zellen bereitgestellt wird (4, 64, 106). Die Aktivierung von T-Zellen über kostimulatorische Rezeptoren führt intrazellulär entweder zu einer Verstärkung des initialen Signals über den TCR-Komplex oder zu einer Aktivierung anderer intrazellulärer Signalwege, welche Zellteilung, Zelltod, Sekretion von Zytokinen oder Zytotoxizität von T-Zellen beeinflusst (30, 81, 194). Trotz einer Vielzahl von mittlerweile bekannten kostimulatorischen Rezeptoren ist die Interaktion des kostimulatorischen Rezeptors CD28 auf T-Zellen mit den Liganden der B7-Familie (CD80, CD86) auf „Antigen präsentierenden Zellen“ (APC's) eines der zentralsten und best untersuchten kostimulatorischen Rezeptor/Liganden-Paare (Abbildung 1) (163). Entscheidend ist, dass die Effektivität des kostimulatorischen, intrazellulären Signals überwiegend abhängt von der Quantität oder Qualität des stimulierten kostimulatorischen Rezeptors (31). Aus diesen Gründen ist es auch möglich, dass in den peripheren lymphatischen Organen nach Aktivierung und insuffizienter Hilfe durch kostimulatorische Rezeptoren oder Zytokine regulierende Oberflächenrezeptoren produziert werden, welche T- oder B-Zellen hemmen (CTLA4 bei T-Zellen, BAFF) oder abtöten (Apoptose Rezeptoren FAS/FAS-Ligand) können (50, 120, 163, 189). Ein weiterer wichtiger peripherer Mechanismus zur Aufrechterhaltung der Toleranz ist das Konzept, dass von unserem Körper regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) generiert werden zur Kontrolle autoreaktiver T- und B-Zellen (95, 177). Die Mehrheit der in unserem Körper gefundenen  $CD4^+$ - $T_{reg}$ -Zellen exprimieren konstitutiv CD25 (Alpha Kette des IL-2 Rezeptors), CTLA-4 („zytotoxische T-Lymphozyten Antigen-4) und den Transkriptionsfaktor Foxp3 („transcription faktor forkhead box protein 3). Außerdem sprechen neueste Erkenntnisse dafür, dass  $CD4^+CD25^+$ Foxp3<sup>+</sup>- $T_{reg}$ -Zellen nicht nur anergische Zellen sind und ein spezifisches Signal über den TCR zur Aktivierung benötigen, sondern auch einen autoreaktiven TCR besitzen. Der Wettbewerb um die gleichen Antigene mit autoreaktiven T- oder B-Zellen könnte einen wesentlichen Wirkungsmechanismus darstellen (95, 156). Es existieren weitere verschiedene Vorstellungen über die möglichen Wirkungsmechanismen von regulatorischen T-Zellen. Zum einen können  $T_{reg}$ -Zellen direkt oder indirekt über beteiligte APC's die Produktion von die Immunreaktion hemmenden Zytokinen (TGF- $\beta$ , IL-10,14,15) beeinflussen. Zum anderen ist durch eine Bindung von CTLA-4 auf  $T_{reg}$ -Zellen an B7 Rezeptoren (CD80, CD86) auf autoreaktive T-Zellen oder

Dendritische Zellen (DCs) die Hemmung einer Immunreaktion möglich (144). In diesem Zusammenhang ist zu bemerken, dass eine Kreuzvernetzung durch Bindung von B7-Molekülen auf DCs eine Vermehrung der Produktion von „Indoleamine 2,3-dioxygenase“ (IDO) zur Folge hat und konsekutiv eine Verminderung des Tryptophan-Stoffwechsels und eine Hemmung der T-Zellen-Aktivität (47). Des Weiteren wird eine direkte autoreaktive Zellen abtötende Wirkung von T<sub>reg</sub>-Zellen über zytotoxische, Apoptose induzierende Moleküle, wie Perforin und die Protease Granzym B, vermutet (61, 65). Ein weiterer Mechanismus zur Vermeidung von Immunreaktionen gegen Autoantigene ist das Phänomen der klonalen Ignoranz. So können bestimmte Autoantigene ausschließlich in anatomischen Lokalisationen exprimiert sein, welche sich dem Zugriff durch das Immunsystem entziehen und somit nicht erkennbar durch autoreaktive T- oder B-Zellen sind (105).

## **I.2 Pathogenese von Autoimmunerkrankungen**

Unter Autoimmunität versteht man eine Immunreaktion gegen körpereigene Antigene. Von einer Autoimmunkrankheit spricht man, wenn die Autoimmunreaktion zu einem krankhaften Zustand führt. Trotz aller medizinischen und biologischen Fortschritte in den letzten Jahren sind die exakten Ursachen einer Autoimmunerkrankung unverändert unklar. Einzig klar ist, dass autoreaktive Lymphozyten existieren, die durch ungeklärte Mechanismen aktiviert werden und pathologische Effekte an verschiedenen Zielorganen auslösen können. Dabei können unterschiedliche Gewebe Ziel der Autoaggression sein, wie bei der Multiplen Sklerose die weiße Substanz des Zentralnervensystems, beim Diabetes Mellitus die  $\beta$ -Zellen des Pankreas, bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) die unterschiedlichen Gelenkstrukturen und beim systemischen Lupus Erythematoses (SLE) die Zellkernbestandteile. Die Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz sollen unseren Körper vor einer Immunreaktion gegen sich selbst und gegen Autoimmunität schützen. Somit resultiert Autoimmunität aus dem Fehlen dieser Toleranz und kann durch einen Fehler oder Mangel an den bereits beschriebenen Toleranzmechanismen entstehen (Tabelle 1).

Hypothetisch entstehen Autoimmunerkrankungen durch das Einwirken von Umweltfaktoren, wie Infektionen, Toxine oder Ernährung, auf der Basis von genetischen Grundlagen. Epidemiologische Studien belegen den Einfluss genetischer Faktoren auf die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen (34, 80).

Die Assoziation zwischen einer Autoimmunerkrankung und der Expression von bestimmten MHC-Molekülen wurde bereits 1971 beschrieben und in der Zwischenzeit bei einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen gefunden (66, 142). Der MHC-Komplex (Abbildung 1), der beim Menschen „humanes Leukozytenantigen“ (HLA) genannt wird, umfasst eine große Familie von polymorphen Genen auf dem kurzen Arm von Chromosom 6. Dabei werden drei Gruppen von Genen unterschieden: Gruppe I umfasst die HLA-Klasse-I-Moleküle (HLA-A, HLA-B, HLA-C), Gruppe II die HLA-Klasse-II-Moleküle (HLA-DR, HLA-DP, HLA-DQ,..) und die Gene der Gruppe III, die die Faktoren des Komplementsystems kodieren (66, 184). Die Gene jedes HLA-Allels sind polymorph und die Kombination der verschiedenen HLA-Allele ist einzigartig für jedes Individuum. MHC-Moleküle sind Peptidrezeptoren und binden die Peptide in einer vom MHC-Molekül vorgesehenen Spalte. Die Bindungsstellen der Peptide in dieser Spalte (oder Grube) sind abhängig von bestimmten Aminosäuren an bestimmten Positionen. Durch die Position der Aminosäuren entsteht ein sog. Bindungsmotiv im Bereich der MHC-Spalte. Der genetische Polymorphismus der MHC-Allele wirkt sich fast ausschließlich im Bereich der Aminosäuren aus in der MHC-Spalte und hat zur Folge, dass unterschiedliche MHC-Moleküle unterschiedliche Peptide (in begrenzter Anzahl) binden und präsentieren (46). Hypothetisch kann sich eine Erklärung für eine Assoziation von bestimmten MHC-Molekülen und Autoimmunerkrankungen daraus ergeben, dass Peptide (endogene und exogene Antigene) von einem mit einer Erkrankung assoziierten MHC-Molekül präsentiert wird und zu einer autoreaktiven T-Zellaktivierung führt. So findet sich zum Beispiel bei der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) und der Rheumatoiden Arthritis (RA) eine Assoziation mit HLA-DRB1\*08 und HLA-DRB1\*04, bei der SLE eine Assoziation mit HLA-DRB1\*03 (15, 60, 67, 91). Alternativ können protektive MHC-Allele Peptide präsentieren, welche autoreaktive Lymphozyten deletieren und damit vor einer Autoimmunerkrankung schützen (115, 158). Des Weiteren könnte auch die unterschiedliche Affinität von sog. Hitzeschockproteinen (HSP's) zu verschiedenen MHC-Molekülen eine Rolle in der Pathogenese von Autoimmun-erkrankungen spielen. Gerade in der Pathogenese von entzündlichen Gelenkerkrankungen, vor allem der juvenilen Oligoarthritis, wurde die Bedeutung von HSP's wiederholt gezeigt, obwohl der genaue Pathomechanismus unbekannt bleibt (150). Andere genetische Faktoren, die in der Pathogenese von Autoimmun-erkrankungen von Bedeutung sind, sind polymorphe



Gene, die für Proteine kodieren, welche für die Prozessierung von Antigenen (Imp-2, Imp-7, „low molecular weight polypeptide“) oder für den Transport von Peptiden (tap-1, tap-2, „transporter associated with antigen processing“) verantwortlich sind (141). Außerdem wurden auch Gene gefunden, außerhalb des MHC-Komplexes, welche mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind. Im Bereich des menschlichen Genoms wurden mittlerweile verschiedene „Clusterregionen“ auf verschiedenen Chromosomen gefunden, die mit unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen korrelieren (9). Zum Beispiel beim APECED-Syndrom (Autoimmun-Polyendokrinopathie-Candidiasis-Ektodermale Dystrophie-Syndrom), das sich durch mukokutane Candidiasis, Nebenniereninsuffizienz und Hypoparathyreoidismus manifestiert (mindestens zwei der drei Symptome für die Diagnose), liegt eine Mutationen im AIRE (Autoimmunregulator)-Gen vor. Das AIRE -Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der vermutlich bei der Induktion und Erhaltung der Immuntoleranz (negative Selektion) eine Rolle spielt (181). Diese Patienten entwickeln häufig Autoimmunerkrankungen, wie Diabetes, Thyreoditis, Autoimmune Hepatitis oder Hämolytische Anämien (181).

Weitere entscheidende Bedeutung für die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen haben bestimmte Umweltfaktoren oder Infektionen. So haben z. B. eineiige Zwillinge von Patienten mit Autoimmunerkrankungen zwar ein deutlich erhöhtes Risiko für Autoimmunität, aber die Konkordanz liegt oft nur in der Größenordnung von 10-20%, und somit besteht eine große Chance, keine Autoimmunerkrankung zu entwickeln. Außerdem ändert sich die Inzidenz von bestimmten Autoimmunerkrankungen in einer Population, wenn die Mitglieder dieser Population in andere Lebensräume auswandern (33, 140). Aus diesen Beobachtungen kann abgeleitet werden, dass Umweltfaktoren einen wesentlichen Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen haben. Ein mögliches Modell, wie Autoimmunität durch z. B. Infektionen ausgelöst werden kann, ist das der sog. „Molekulare Mimikry“. Dabei werden durch strukturelle Ähnlichkeiten zwischen mikrobiellen Antigenen und Selbst-Peptiden autoreaktive T-Zellen durch eine sog. Kreuzreaktion im Rahmen einer Immunantwort gegen das Pathogen aktiviert (51). Es existieren zahlreiche Homologien bzw. Identitäten in der Aminosäuresequenz zwischen verschiedenen bakteriellen und viralen Antigenen einerseits und Antigenstrukturen aus unserem Körper andererseits, welche für eine derartige Kreuzreaktion verantwortlich sein

könnten (56, 119). Des Weiteren können Infektionen die schützenden Gewebsbarrieren aufheben und durch die Zellnekrose dazu beitragen, dass sequestrierte Antigene aus dem Zellinneren freigesetzt werden und die immunologische Ignoranz aufheben (siehe Punkt 1.1). Außerdem kann es durch mikrobielle Antigene (wie z. B. Superantigene), welche von Bakterien und Viren produziert werden können, zu einer massiven Aktivierung von potentiell autoreaktiven T-Zellen kommen (182). Sowohl lokal freigesetzte proinflammatorische Zytokine als auch kostimulatorische Moleküle am Ort der Entzündung können ebenfalls wesentlich zu einer weiteren Aktivierung von potentiellen autoreaktiven T-Zellen beitragen. In diesem Zusammenhang können auch Makrophagen die Aktivierung (Bereitstellung proinflammatorischer Zytokine und kostimulatorischer Rezeptoren, zusätzliche Antigenpräsentation) von T-Zellen positiv oder auch negativ beeinflussen und damit den Prozess der Autoimmunität aufrechterhalten (96).

Eine weitere immunologische Auffälligkeit bei vielen Autoimmunerkrankungen ist die Produktion von Autoantikörpern. Diese speziellen Autoantikörper können einen wesentlichen Beitrag in der Diagnostik und Klassifizierung von Autoimmunerkrankungen leisten (59). Autoantikörper sind Bestandteil des normalen Antikörperrepertoires und haben oft eine niedrige Affinität zu Autoantigenen. Autoantikörper im Serum von Patienten mit einer Autoimmunerkrankung weisen jedoch eine hohe Affinität zu den Autoantigenen auf und der Nachweis der somatischen Mutationen weist auf einen abgelaufenen Selektionsprozess hin. Dies unterstreicht die Notwendigkeit der Hilfe durch T-Zellen (T-Helfer-Zellen), ohne die die somatische Mutation nicht stattfinden kann (124).

Eine wesentliche Rolle bei der Kontrolle und Regulation von potentiell autoreaktiven Lymphozyten spielen kostimulatorische Moleküle. Ausschaltung der Interaktion des kostimulatorischen Rezeptors mit dessen speziellen Liganden (z. B. CD40/CD40L) verhindert z. B. im Tiermodell die Entstehung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (74). Wie schon erwähnt, ist hierbei die Interaktion zwischen CD28/CTLA-4/B7-Rezeptor/Liganden System besonders hervorzuheben (179). Das Hybridmolekül CTLA-4-Ig, ein lösliches chimäres Protein, das aus der extrazellulären Domäne von CD152 und einem Fragment des Fc-Teils von humanem IgG besteht, beeinflusst im Tiermodell die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) und die Entstehung von Diabetes (102, 152). Beim Menschen wird der klinische Einsatz von CTLA-4-Ig bereits erfolgreich bei der Psoriasis und bei der Behandlung

der „Graft versus Host Erkrankung“ (GvHD) nach einer allogenen Stammzelltransplantation eingesetzt (2). Ein weiteres chimäres Protein, bestehend aus dem CD40-Molekül, wurde bereits bei Patienten mit therapierefraktären SLE mit jedoch geringem Erfolg eingesetzt (109). Weitere Untersuchungen mit anderen Vertretern aus der sehr umfangreichen Familie der kostimulatorischen Moleküle bei T-Zellen-vermittelten Autoimmunerkrankungen, sind bereits in den ersten klinischen Prüfungen oder stehen noch aus.

Ein weiterer Mechanismus für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen sind Störungen der Immunregulation durch regulatorische T-Zellen oder T-Zell Apoptose („stillen“ Zelltod). Aktivierte T-Zellen exprimieren auf ihrer Zelloberfläche einen Rezeptor (CD95, fas), über den durch einen Liganden (CD95L, fasL) Apoptose, als ein physiologischer Mechanismus zur Begrenzung der T-Zell-Aktivierung, ausgelöst werden kann. Bei Menschen führt eine angeborene Störung in diesem System (Autoimmunes Lymphoproliferatives Syndrom, ALPS oder Canale-Smith Syndrom) zu einer Lymphoproliferation und zu verschiedenen Autoimmunerscheinungen (hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, Neutropenie..), wahrscheinlich verursacht durch Akkumulation von autoreaktiven T-Zellen (154, 181). Die Immunregulation durch regulatorische T-Zellen schützt unseren Körper vor inadäquaten Immunantworten gegen fremde und körpereigene Proteine (123, 181). Mittlerweile konnte man verschiedenen Subpopulationen von Zellen mit regulatorischem Potential (z. B. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>-</sup>, NKT-, CD8<sup>+</sup>-Zellen, DCs) identifizieren, dabei sind CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub> die am besten charakterisierte und untersuchte Lymphozyten Population (95, 156, 177). Das X-chromosomal vererbte Syndrom mit Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX) wird verursacht durch eine Mutation im Foxp3-Gen. Durch die verminderte Immunregulation durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>-T<sub>reg</sub>- Zellen kommt es bei diesen Patienten sehr häufig, zusätzlich zu der ausgeprägten Enteropathie, zu Erkrankungen wie Diabetes, Thyroiditis, hämolytischen Anämien und verschiedenen Hauterkrankungen (Ekzeme, Psoriasis..) (7, 156, 177, 181). Ähnliche Symptome und Immundysfunktionen wurden auch bei Patienten mit einem Defekt im CD25-Rezeptor („CD25-deficiency“, IL-2 alpha-Kette) gefunden. Jedoch ist weiter unklar, wie diese T<sub>reg</sub>-Zellen entstehen und unterhalten werden.

Ein weiterer wesentlicher Aspekt von Autoimmunerkrankungen ist die Verschiebung des Zytokinprofils im Rahmen von Entzündungen und von autoreaktiven T-Zellen bei

Auslösung und Progression von Autoimmunerkrankungen. Demzufolge können Th1-induzierende Zytokine (IL-2, IL-12, IFN-gamma) eher die Entstehung oder den Unterhalt einer Autoimmunerkrankung begünstigen und Th2-Zytokine (IL-4, TGF- $\beta$ ) eher vor Autoimmunität schützen oder sogar Autoimmunreaktionen unterdrücken (45). Die bisher guten klinischen Erfolge in der Behandlung der RA und JIA mit einem löslichen TNF-Rezeptor-Immunglobulin-Hybrid bestätigen teilweise dieses Zytokinkonzept (132).

Zusammenfassend ist somit zu sagen, dass wahrscheinlich unter dem Oberbegriff „Autoimmunerkrankungen“ Erkrankungen summiert sind, die unterschiedlichste Ursachen haben. Es ist sehr wahrscheinlich, dass Autoimmunerkrankungen unterschiedliche Auslöser haben und wie bei der Karzinogenese von einem multifaktoriellen Geschehen ausgegangen werden muss. Jedoch zeigt sich, dass kostimulatorische Moleküle eine zentrale Rolle in der Etablierung und Aufrechterhaltung der Toleranz sowie in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen innehaben.

### **I.3 Die Rolle der T- und B-Zellen bei Autoimmunerkrankungen**

In den letzten 10 Jahren wurden in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen (z.B. bei RA oder SLE) große Fortschritte erzielt. Es wurden nicht nur neuere Medikamente eingesetzt oder aggressivere Autoimmunerkrankungen behandelt, sondern es wurden auch die Immunantwort modulierende Therapien durchgeführt, die als Ziel Moleküle (z.B. Zytokine wie TNF- $\alpha$ ) oder Zellen (anti-CD20-Ak, CTLA-4-Ig) hatten, die eine zentrale Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen spielen. Autoimmunerkrankungen zeichnen sich aus durch ihren chronischen klinischen Verlauf und ihre Abhängigkeit von aktivierten, autoreaktiven B- und T-Zellen (44, 196). Im Folgenden sollen sowohl die Rolle der B- und T-Zellen sowie beteiligter kostimulatorischer Moleküle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen als auch ihr therapeutisches Potential am Beispiel der zwei chronischen, systemischen Autoimmunerkrankungen RA und SLE dargestellt werden.

#### **I.3.1 Die Rheumatoide Arthritis (RA).**

Die RA ist eine chronische Systemerkrankung, die vorwiegend die Gelenke befällt. Trotz vieler bekannter Details in der Pathogenese der RA ist die Ätiologie weiterhin unklar. Die Prävalenz liegt ca. bei 1% in der westlichen Bevölkerung, es erkranken Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer (41, 169). Für die Diagnose einer RA

wurden verschiedene Kriterien definiert, von denen mindestens 4 für das Stellen der Diagnose zutreffen müssen. Zu diesen Kriterien gehören die Entzündung eines oder mehrere Gelenke mit Gelenkschwellung, Schmerz und/oder Bewegungseinschränkung, Morgensteifigkeit, radiologische Veränderungen an den Knochen und Gelenken, Nachweis von Rheumaknoten oder Autoantikörpern (sog. Rheumafaktor, RF), die Dauer der Symptome und das Alter (juvenile Formen, JIA) des Patienten (116). Obwohl die RA als Systemerkrankung nahezu alle Organsysteme betreffen kann, steht im Vordergrund die Manifestation an den Gelenken in Form einer fortschreitenden Gelenkzerstörung, resultierend aus einer chronischen Entzündung der Synovialmembran durch Einwanderung von Lymphozyten (T- und B-Zellen), Monozyten und DCs sowie einer chronischen entzündlichen Autoimmunreaktion, die eine Zerstörung der Knorpel- und Knochenstrukturen zur Folge hat (169). Die RA ist eine Autoimmunerkrankung mit einer voraussichtlich multifaktoriellen Ursache. Feststeht bereits, dass eine genetische Disposition (siehe 1.2) und nicht im Detail bekannte Umweltfaktoren zu einer T- und B-Zellen abhängigen Autoimmunreaktion führen (44, 196).

Obwohl der exakte pathogenetische Zusammenhang zwischen Nachweis von autoreaktiven B-Zellen mit Produktion von Autoantikörper und klinischer Manifestation einer RA unklar ist, gibt es eine Assoziation zwischen der RA und dem Nachweis von Autoantikörper wie dem sog. RF oder Ak gegen Citrullin („cyclic citrullinated peptide“, auch „CCP“). Bei 80- bis 90% der RA Patienten gelingt der Nachweis eines oder beider dieser Autoantikörper im Serum und in Bezug auf den RF korreliert dieser mit dem Krankheitsverlauf (12, 44). Trotz dieser Befunde wurde den B-Zellen eine untergeordnete Rolle zugesprochen und führte dazu, dass die Forschungsarbeiten sich auf die Rolle der T-Zellen, der Makrophagen und der Fibroblasten konzentrierten (12). Außerdem richtete sich das Forschungsinteresse wegen der guten Erfolge mit „TNF- $\alpha$ -Blockern“ verstärkt auf Monozyten/Makrophagen und deren Bedeutung für chronische Entzündungsprozesse (49). Aufgrund der guten Erfolge bei der Behandlung von therapieresistenten RA-Patienten mit einem monoklonalen Antikörper gegen den B-Zellmarker CD20 (Rituximab) wurde erst in den letzten Jahren die Funktion der B-Zellen in der Pathogenese der RA näher untersucht (42, 101). In randomisierten kontrollierten Doppel-Blind-Studien konnte die Behandlung mit dem B-Zellen depletierenden Antikörper Rituximab bei therapieresistenten RA-Patienten einen

ähnlichen Erfolg verzeichnen wie eine anti-TNF- $\alpha$  Behandlung (38, 88). Die Krankheitsaktivität, gemessen nach den ACR-Kriterien, war 2 und 4 Jahre nach Behandlung signifikant besser in der Gruppe der Patienten, die mit Rituximab und Methotrexat (ACR50 Ansprechen von 43% und 35%) oder Rituximab und Cyclophosphamid (ACR50 Ansprechen von 41% und 27%) behandelt wurden, als in den Gruppen, die nur mit Methotrexat (ACR50 Ansprechen von 13% und 5%) oder Cyclophosphamid behandelt wurden (38, 121). B-Zellen haben vielfache Funktionen in der normalen zellulären und humoralen Immunantwort und sind wesentlich beteiligt bei der Entstehung einer protektiven Immunantwort. B-Zellen sind nicht nur Vorläuferzellen für die Antikörper/Autoantikörper produzierenden Plasmazellen, sondern können auch durch Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$  oder IL-6, und immunregulatorischen Zytokinen, wie IL-10, den Krankheitsverlauf einer Autoimmunerkrankung wesentlich beeinflussen. Aufgrund dieser Beobachtungen und Funktion von B-Zellen wurden Antikörper gegen andere Oberflächenmarker von B-Zellen (CD19, CD22) hergestellt und auch bereits mit Erfolg in ersten Studien erprobt (44). Die Behandlung mit biologischen Medikamenten zur TNF- $\alpha$  Blockade (Antikörper gegen TNF- $\alpha$  oder lösliches TNF- $\alpha$ -Ig) ist mittlerweile Standard in der Behandlung von Patienten mit RA, die nicht adäquat auf die Behandlung mit Steroiden und/oder Methotrexat ansprechen. Weitere Antikörper gegen pro-inflammatorische Zytokine wie IL-6 und IL-1, Hemmung der Zytokinproduktion und B-Zellen-Aktivierung durch Hemmung des „B-Zellen-Aktivierungs-Faktor“ (BAFF) sind in der Entwicklung und teilweise bereits in klinischer Erprobung (39, 44). Eine weitere wichtige Aufgabe von B-Zellen ist die Antigenpräsentation und spielt somit auch eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (121). Die Interaktion zwischen B- und T-Zelle führt einerseits zur Aktivierung und Differenzierung der T-Zellen (über kostimulatorische Moleküle) und andererseits zur Aktivierung und Differenzierung der B-Zelle (T-Helfer-Zellen) zur Plasmazelle (Ig-Klassen „switch“) und zur spezifischen Antikörperproduktion (42). Aus diesem Grund ist die Blockade von kostimulatorischen Molekülen durch Hemmung der Bindung zwischen Rezeptor und spezifischen Ligand (Hemmung der T-Zellen-Hilfe), wie durch Hemmung der Interaktion zwischen CD40/CD40Ligand (anti-CD40Ligand Ak), ICOS/ICOSLigand oder CD28-CTLA-4/B7, ein weiterer Ansatz in der Behandlung der RA (39, 44, 109).

Ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der RA sind T-Zellen. Nach Antigen Erkennung (Signal 1) und adäquater Kostimulation (Signal 2) kommt es zu einer raschen Expansion und Proliferation von Antigen-spezifischen T-Zellen, sowie zur Generierung von sog. „Gedächtnis (memory) T-Zellen“ (196). Des Weiteren produzieren aktivierte T-Zellen Wachstumsfaktoren oder pro-inflammatorische Zytokine (z.B. IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), welche die Funktion von anderen hämatopoetischen und nicht-hämatopoetischen Zellen wesentlich beeinflussen können. Die Infiltration von T-Zellen (vorwiegend CD4<sup>+</sup> T-Zellen) in die betroffenen Gelenke unterhält durch Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen und durch adäquate Hilfe für autoreaktive B-Zellen die chronische Gelenkentzündung sowie „Palusbildung“ und „Angiogenese“. Außerdem unterhalten T-Zellen die Gewebszerstörung der Gelenke durch Generierung von Knochen zerstörenden Osteoklasten (196). Durch die zentrale Rolle von T-Zellen in der Pathogenese der RA konnten schon frühzeitig Behandlungserfolge mit Reagenzien, die die Funktion und Aktivierung von T-Zellen beeinflussen, erzielt werden. Methotrexat, Steroide oder Cyclophosphamid sind Standardmedikamente. Jedoch zeigen auch Reagenzien oder Prozeduren, die eine starke T-Zellen hemmende Wirkung haben (Cyclosporin A, Tacrolimus FK506), oder eine hämatopoetische Stammzelltransplantation einen klinischen Erfolg in der Unterdrückung der chronischen Gelenkentzündung (39, 174). Außerdem waren auch T-Zellen abtötende Antikörper gegen das CD4 Antigen sowie gegen CD52 und CD5 erfolgreich in der Unterdrückung der Gelenkentzündung. Allerdings zeigten sie teilweise zu starke Nebenwirkungen durch den langwierigen T-Zellen Verlust und die daraus resultierende Schwächung der Immunabwehr (196). Aufgrund der Notwendigkeit des Vorhandenseins eines zweiten Signals (kostimulatorisches Signal) zur vollständigen Aktivierung von T-Zellen (siehe 1.4) ist die Hemmung einer adäquaten Bindung von kostimulatorischem Rezeptor mit dessen spezifischem Liganden ein wirkungsvolles Prinzip zur Hemmung der T-Zellen-Funktion ohne Zerstörung der T-Zellen (109). Durch eine adäquate Hemmung von kostimulatorischen Molekülen würde auch die benötigte T-Zellen-Hilfe für die Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen gehemmt werden und zusätzlich den Wirkungsmechanismus verstärken. Dieses Prinzip wurde getestet mit einem Antikörper gegen das CD40Ligand-Molekül (CD154) mit teilweise klinischem Ansprechen auf die Behandlung, jedoch mit dem Effekt einer länger andauernden Immunsuppression und zum Teil schwer wiegenden Nebenwirkungen (109).

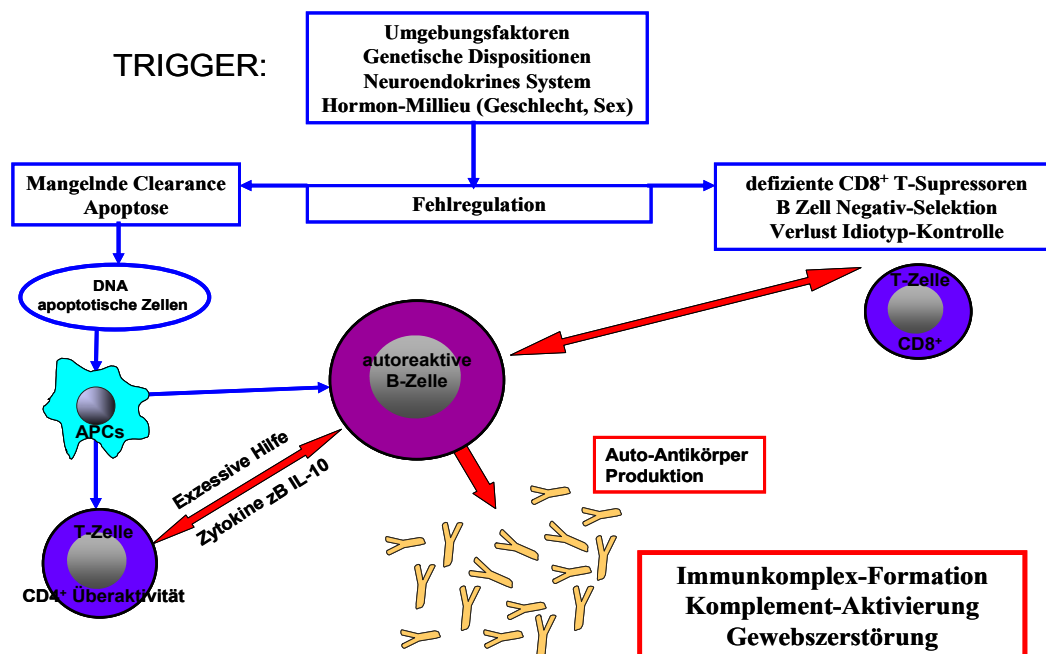
Erfolgreicher war die Hemmung des CD28/CTLA-4-CD80/CD86 Signalweges durch das rekombinante Fusion Protein CTLA-4-Ig (abatacept, siehe 1.2). In verschiedenen Tiermodellen und mehreren klinischen Studien konnte die Effizienz einer solchen Behandlung nachgewiesen werden. In Kombination mit Methotrexat oder auch bei Monotherapie zeigten abatacept behandelte Patienten eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome um 20% (ACR20), 50% (ACR50) und 70% (ACR70), eine Verbesserung der Bewegungsfunktion und Verlangsamung der radiologisch nachweisbaren Veränderungen bei keinen oder nur sehr geringen Nebenwirkungen (109, 196). Vergleichbare Ergebnisse wurden auch erzielt bei RA-Patienten, die initial nicht gut auf Methotrexat oder auf die TNF- $\alpha$ -Blockade-Therapie angesprochen hatten (196). Die Tatsache, dass sog. „memory“ T-Zellen oder aktivierte Effektor T-Zellen den CD28/B7 Signalweg nicht mehr benötigen und einige infiltrierende T-Zellen CD28<sup>-</sup> negativ sind, könnte den Eindruck vermitteln, dass die Blockade des CD28/CTLA-4-CD80/CD86 Signalweg nicht sinnvoll erscheint. Jedoch verhindert die Blockade des CD28/B7 Signalweges durch CTLA-4-Ig die primäre Aktivierung von T-Zellen, den Nachschub mit Effektor T-Zellen und reduziert deutlich die Aktivität von autoreaktiven T-Zellen. Zusätzlich blockiert sie durch Hemmung der Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen oder Blockade kostimulatorischer Signalwege den Einfluß von APS's und DCs auf den entzündlichen Krankheitsprozess (196).

### **I.3.2 Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE)**

Der systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine mehr B-Zellen als T-Zellen vermittelte, chronische entzündliche Autoimmunerkrankung, die gekennzeichnet ist durch Produktion von zahlreichen Autoantikörpern gegen Zellkernbestandteile (z.B. anti-dsDNA-Ak), verschiedene Organe und Zellsysteme (11). Die vermehrte Autoantikörperbildung führt zur Bildung und Ablagerung von Immunkomplexen, die eine Vaskulitis in den verschiedenen Organen, wie Haut, Niere, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Gelenken, Knochenmark, Muskeln und ZNS, verursachen können (23). Zur Stellung der Diagnose SLE wurden 11 verschiedene Kriterien (Haut-Schleimhautveränderungen, Schmetterlingsexanthem, Fotosensitivität, hämatologische Veränderungen, Autoantikörper, Nephritis, etc.) definiert, von denen mindestens vier nötig sind, um die Diagnose zu rechtfertigen (71). Die Ätiologie der Erkrankung ist im engeren Sinn nicht bekannt. Beobachtete familiäre Häufung der Erkrankung und die hohe Konkordanz (70%) des Auftretens bei eineiigen Zwillingen



deuten jedoch auf eine genetische Prädisposition für den SLE. Dabei zeigte sich eine besondere Evidenz für eine Assoziation mit dem SLE für Gene aus der Familie der HLA-Antigene (siehe 1.2), Faktoren des Komplementsystems und  $Fc\gamma$ -Rezeptoren ( $Fc\gamma R$ ) (187). Außerdem haben Typ-1-Interferone ( $IFN\alpha$  und  $IFN\beta$ ), verschiedene Interleukine (erhöhte Konzentrationen im Serum von IL-6, IL-10, IL-12 und IL-18) und der Tumornekrosefaktor  $\alpha$  ( $TNF-\alpha$ ) eine Bedeutung in der Ätiologie des SLE (10, 57, 118). In der engen Assoziation von Autoantikörperbildung und Manifestation der Erkrankung begründet sich der Verdacht, dass der SLE eine klassische B-Zellen vermittelte Erkrankung ist. Jedoch zeigten die Ergebnisse in verschiedenen Tiermodellen für den SLE, dass durch genetische Elimination oder Reduktion der T-Zellen mit Antikörpern der Krankheitsverlauf deutlich abgeschwächt werden konnte. Somit sind B- und T-Zellen erforderlich für das komplette Krankheitsbild des SLE. Die immunologische Dysregulation von T- und B-Zellen und der Toleranzverlust der B-Zellen spielen dabei eine entscheidende Rolle. Für diese Hypothese spricht der Nachweis von intrinsischen B-Zellen-Defekten, wie eine erniedrigte Aktivierungsschwelle für B-Zellen, eine verlängerte Lebenszeit und ein Apoptose-Defekt der B-Zellen von SLE Patienten (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses (SLE)**

Des Weiteren wurde bei T-Zellen von SLE Patienten eine Imbalance von pro- zu anti-apoptotischen Mechanismen gefunden, die zur Persistenz von autoreaktiven T-Zell-

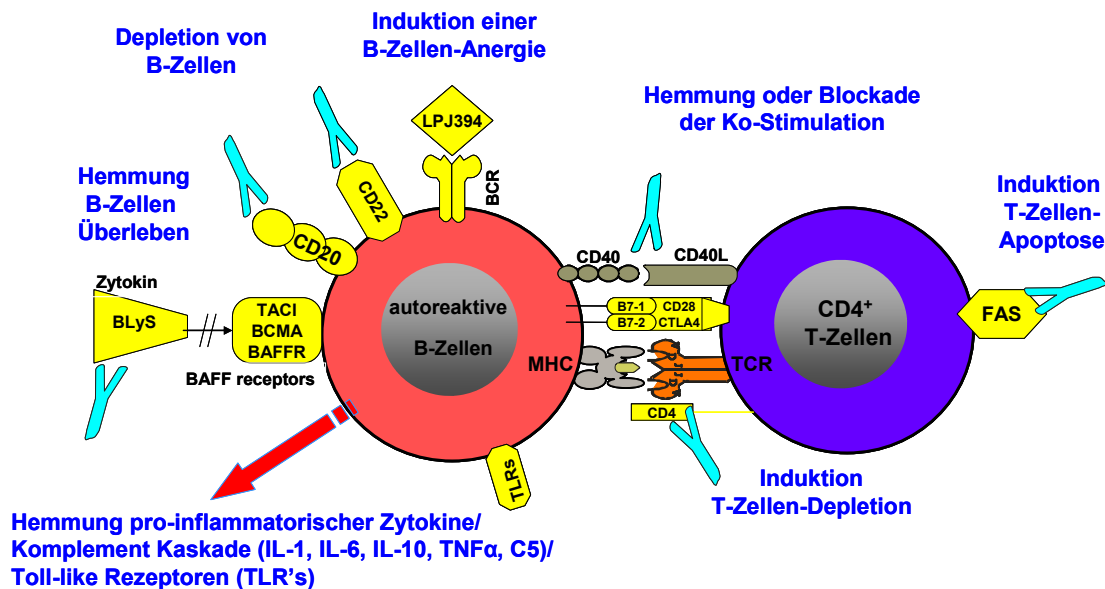
Klonen beitragen kann und die T-Zellen-Hilfe für die fortschreitende Aktivierung der B-Zellen permanent unterhält (114). Aufgrund verschiedener Ursachen (Trigger) kommt es zu einer Freisetzung von Autoantigenen. Freigesetzte Autoantigene, wie Kernproteine, DNA und RNA, werden von B-Zellen erkannt und dadurch gleichzeitig aktiviert. Durch die Interaktion mit autoreaktiven T-Zellen und die dadurch gelieferte T-Zellen-Hilfe erfolgt via Stimulation über CD40/CD40Ligand ein Isotypenwechsel hin zum IgG, zur somatischen Hypermutation und zur Ausreifung der B-Zellen zu Plasmazellen. Durch den Toleranzverlust der B- und/oder T-Zellen unter Einfluss von bestimmten HLA-Allelen, B-Zell-Rezeptor-Genen, Überwiegen von Th<sub>2</sub>-Signalen und Mangel an regulatorischen T-Zellen kommt es zur Bildung von Autoantikörpern, die zusammen mit zirkulierenden oder gewebsständigen Autoantigenen Immunkomplexe bilden. Im Folgenden kommt es zur Produktion von IFN $\gamma$  durch DCs, Erkennung der Immunkomplexe von Monozyten/Makrophagen via Fc $\gamma$ -Rezeptoren, Freisetzung von Komplementfaktoren, weiteren Rekrutierung von Entzündungszellen und zur fortwährenden Gewebsschädigung (Abbildung 2) (20).

Das Therapieprinzip beim SLE ist die Immunsuppression. Die Gabe von Kortikosteroiden zeigt bei Organmanifestationen und auch bei chronischen systemischen Entzündungszeichen eine gute Wirksamkeit. Bei schwerem klinischen Verlauf oder bei Nierenbeteiligung kommt es darüber hinaus noch zum Einsatz von weiteren Immunsuppressiva, wie Azathioprin, Methotrexat, Cyclophosphamid, Mycophenolatmofetil und Cyclosporin A (117). Aufgrund der zentralen Rolle von B- und T-Zellen in der Pathogenese des SLE sind jedoch weitere Therapie-Strategien sinnvoll, die immunpathologisch beteiligte Zellen (Abbildung 3) beseitigen oder ihre Funktion wesentlich einschränken (44, 109, 174).

In verschiedenen Tiermodellen und auch in klinischen Studien mit Standard-Therapie-resistenten SLE Patienten mit schwerer Organmanifestation wurde durch die Behandlung mit Rituximab eine deutliche Verbesserung der klinischen Symptome (Verbesserung des SLE-Aktivitäts-Index, SLEDAI), der Entzündungszeichen und der Autoantikörper-Konzentrationen erreicht, bei gleichzeitig geringen Nebenwirkungen der Behandlung. Dabei zeigte sich, dass die B-Zellen-Depletion durch Rituximab sehr unterschiedlich war und das klinische Ansprechen auf die Behandlung teilweise nicht

abhängig war von der Effizienz der Reduktion der Autoantikörper-Konzentrationen (88, 174). Über den Einsatz eines weiteren monoklonalen Antikörpers gegen die B-

Zellen spezifischen Antigene CD22 (Epratuzumab) oder CD19 gibt es bisher keine verfügbaren Daten über eventuelle therapeutische Effektivität bei Autoimmunerkrankungen (44, 174).



**Abbildung 3: Potentielle Targets einer Immuntherapie bei dem SLE (Modifiziert nach (113, 183))**

Des Weiteren zeigen erste Daten von klinischen Studien mit einem monoklonalen Antikörper gegen das „B-Zell-survival“ Molekül BlyS (Belimumab) in einem noch kurzen Beobachtungszeitraum eine Reduzierung der Autoantikörper-Titer und eine gute Verträglichkeit, jedoch keine wesentlichen Änderungen des SLEDAI in den SLE-Patienten (44, 88). Ein weiterer Ansatz ist die Reduktion der anti-dsDNA-Antikörper und die Hemmung von autoreaktiven B-Zellen durch das aus DNA-Epitopen bestehende Gebilde LJP394 (Abetimus). Der Wirkungsmechanismus von LJP394 besteht in der Bindung von zirkulierenden Anti-dsDNA-Antikörpern und einer Toleranzinduktion in autoreaktiven B-Zellen durch Kreuzvernetzung der membranständigen anti-dsDNA-Immunglobulinrezeptoren. Erste Studien mit Abetimus zeigten eine gute Verträglichkeit und Steigerung der Lebensqualität, insbesondere bei Patienten mit hohem Antikörper-Titer, und eine Stabilisierung der Nierenbeteiligung. Aufgrund der zentralen Rolle von IL-6, IL-10 und des Komplementsystems sind Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor, gegen IL-10 und gegen C5 (Eculizumab) weitere interessante biologische Arzneistoffe. In den Tiermodellen konnte bereits mit diesen Reagenzien die Progression der Erkrankung aufgehalten werden, und erste klinische Studien zeigten eine bisher gute

Verträglichkeit (88, 174). Ein weiterer Ansatz in der Therapie von SLE Patienten ist die Blockade oder Hemmung nicht nur der für die T-Zellen-Aktivierung benötigten kostimulatorischen Moleküle, sondern auch die Hemmung der von den B-Zellen benötigten T-Zellen-Hilfe zur weiteren Antikörperproduktion. Die Gabe des Fusionsproteins CTLA-4-Ig in SLE-Tiermodellen (NZB/NZW F<sub>1</sub> und MLR/lpr Mäuse) konnte signifikant die Autoantikörperproduktion hemmen, verlängerte das Überleben der Mäuse und verhinderte teilweise die Entwicklung der Lupus-Nephritis (109). Entsprechende klinische Daten beim Menschen existieren bisher noch nicht. Auch die Hemmung der Interaktion der kostimulatorischen Moleküle CD40 und CD40-Ligand durch Einsatz eines Antikörpers gegen CD40Ligand führte in verschiedenen SLE-Tiermodellen zu einem deutlichen therapeutischen Ansprechen. Jedoch zeigten die bisher durchgeführten klinischen Studien mit verschiedenen nicht humanisierten oder humanisierten anti-CD40L-Ak entweder sehr schwere Nebenwirkungen (thrombotische Komplikationen) bei geringem klinischem Ansprechen, oder es zeigte sich keine Effektivität der Behandlung bei guter Verträglichkeit (88, 109). Somit steht der Nachweis des klinischen Nutzens einer Blockade von kostimulatorischen Molekülen in der Therapie von SLE Patienten noch aus.

#### **I.4 Kostimulatorische Moleküle**

Aufgrund der immer noch unklaren Ätiologie von Autoimmunerkrankungen und der zentralen Rolle von T- und B-Zellen in der Pathogenese dieser Erkrankungen sind kostimulatorische Moleküle interessante Angriffspunkte für gezielte Interventionen in den Krankheitsverlauf von Autoimmunerkrankungen. Die Wirkung einer gezielten Blockade konnte in den unterschiedlichen Tiermodellen für Autoimmun-erkrankungen (RA, SLE, EAE) belegt werden, und auch in ersten klinischen Studien zeigte ein solches Vorgehen einen klinischen Nutzen (109).

Es ist mittlerweile anerkannt, dass Lymphozyten zwei unterschiedliche Signale zur vollständigen Proliferation und Differenzierung und zur weiteren Entfaltung ihrer Funktionen (Effektor T-Zellen, Plasmazellen) benötigen. Bereits 1970 beobachteten Bretcher und Cohn, dass B-Zellen nach Aktivierung durch Antigen Erkennung über ihren BCR entweder in Antikörper produzierende Zellen differenzieren oder in einen Zustand der funktionellen Paralyse (sog. Anergie) fallen und auch unempfindlich wurden gegen erneute Stimulation mit Antigen (13). Sie vermuteten, dass B-Zellen zwei Signale benötigen zur vollständigen Aktivierung. Das eine Signal soll durch

Bindung eines Antigens an den BCR (Ig auf der Membranoberfläche) kommen und das zweite Signal soll durch eine zweite Struktur auf der Oberfläche von B-Zellen kommen, die Zytokine oder Liganden auf der Oberfläche von APC's bindet. Bei Abwesenheit dieses zweiten Signals würden die B-Zellen keine suffizienten Aktivierungssignale erhalten und in einen Zustand der Anergie verfallen, was die B-Zelle auch unempfindlich gegenüber einer erneuten Bindung des Antigen an den BCR machen würde (13). Das war die Geburtsstunde der „Zwei-Signal-Hypothese“ für die Aktivierung von Lymphozyten. Erst 20 Jahre später konnten Lafferty und Gill beweisen, dass diese Hypothese auch für die Aktivierung von T-Zellen zutrifft (99). Des Weiteren vermuteten die Forscher, dass DCs verantwortlich sind für die Bereitstellung des zweiten Signals in der T- Zellen-Aktivierung. Somit stellte die „Zwei Signal-Hypothese“ einen möglichen Mechanismus für die Aufrechterhaltung einer peripheren Toleranz gegenüber Autoantigenen dar und dass die vollständige Aktivierung von T-Zellen zu Effektor-T-Zellen teilweise davon abhängig ist, ob T-Zellen bei der primären Antigen-Erkennung dieses zweite, kostimulatorische Signal erhalten oder nicht (99). Jenkins und Schwartz zeigten, dass in vitro Antigen-Aktivierung von T-Zellen abhängig ist von der Anwesenheit von APC's und deren vermittelten kostimulatorischen Signalen (83). Die Abwesenheit von kostimulatorischen Signalen durch APC's bei der T-Zellen Aktivierung mündete in einen Status der Anergie, welcher durch Zusatz von IL-2 aufgehoben werden konnte (36). Die Entscheidung zwischen Aktivierung und Anergie im Rahmen einer Immunantwort ist oft abhängig von der Art und Weise, wie B- oder T-Zellen Antigene erkennen, und vom „Reifestatus“ von APC's. Prinzipiell werden kostimulatorische Signale von reifen APC's („mature“) bereitgestellt, die Liganden (CD80 und CD86) für das kostimulatorische Molekül CD28 exprimieren. CD28 ist konstitutiv exprimiert auf T-Zellen und wird nach Aktivierung hochreguliert. Unreife APC's („immature“) exprimieren konstitutiv auf einem niedrigen Niveau CD86. Nach Aktivierung und „Reifung“ der APC's kommt es zu einer Hochregulation von CD86 und zusätzlicher Expression von CD80 (70, 84). Mittlerweile sind weitere kostimulatorische Rezeptoren und deren Liganden entdeckt worden. Jedoch ist keines dieser Moleküle so essentiell wichtig für die primäre T-Zellen Aktivierung und Differenzierung wie der CD28/CTLA-4-CD80/CD86 kostimulatorische Signalweg.

Die mittlerweile bekanntesten kostimulatorischen Rezeptoren können in drei größere Hauptgruppen eingeteilt werden.

- I. Immunglobulin-Superfamilie (IgS), mit CD28, CD2, „inducible T-cell co-stimulator“ (ICOS) (29, 103, 163).
- II. Zytokine Rezeptoren, mit IL-1R, IL-2R, IL-6R, IL-7R, IL-15R (30).
- III. Familie der „Tumour-Necrosis Factor Receptors“ (TNFR's), unter anderem die Rezeptoren CD27, CD30, CD40L (CD154), CD134, CD137, „Herpes-Virus Entry Mediator“ -HVEM (30, 63, 193).

Die Effektivität des kostimulatorischen, intrazellulären Signals hängt überwiegend von der Quantität oder Qualität des stimulierten kostimulatorischen Rezeptors ab. Die Existenz so vieler unterschiedlicher Moleküle, welche als „kostimulatorische Rezeptoren“ bezeichnet werden, hat zu der Hypothese geführt, dass mehrere kostimulatorische Moleküle für eine effektive T-Zellen abhängige Immunantwort (Generierung von T-Helfer-Zellen, zytotoxische T-Zellen...) benötigt werden (30, 31).

#### **I.4.1 Der kostimulatorische Rezeptor CD137 (4-1BB)**

Der kostimulatorische Rezeptor CD137, bekannt als 4-1BB (TNFRSF9), ist ein Mitglied dieser TNF-Rezeptor-Familie (146, 147). Er wird auf aktivierten T-Zellen, NK-Zellen, NKT-Zellen, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T<sub>reg</sub>-Zellen und myeloischen Zellen, wie Makrophagen, Granulozyten und Dendritischen Zellen (DC), expremiert (55, 126, 127, 198, 199). Der natürliche Ligand des CD137-Rezeptors, 4-1BB-Ligand (4-1BBL), findet sich auf ruhenden B-Zellen mit niedriger Expression und wird nach Aktivierung hochreguliert (35). Außerdem wird 4-1BB-Ligand auf aktivierten Makrophagen und aktivierten dendritischen Zellen gefunden (185). Die Aktivierung über den CD137 Rezeptor führt über die intrazellulären Signalwege „NF- $\kappa$ B“, „c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase/stress activated protein kinase“ (JNK/SAPK) und p38 zur Aktivierung der T-Zelle (16, 17, 35, 147, 157). Die Stimulation des CD137 Rezeptors mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern führt zu einer Aktivierung von hauptsächlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen, aber auch von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. In der Folge wird die Sekretion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (Th1-Zytokine) stimuliert, die Abstoßung von allogenen Haut- oder Herz-Transplantaten beschleunigt und die Erzeugung Antigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> zytotoxischer T-Zellen (CTL) verstärkt und somit die Immunantwort gegen schwach immunogene Tumoren verbessert (127, 165). Von zentraler Bedeutung ist, dass die Stimulation mit monoklonalen Antikörpern gegen CD137 vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor einem durch Aktivierung induzierten Zelltod (Activation-Induced-Cell-Death, „AICD“) schützt (76, 175). Außerdem moduliert ein Ak gegen CD137 DC-Funktion in vivo

durch T-Zellen unabhängige Produktion von Zytokinen wie IL-6 und IL-12 und steigert die Immunantwort nicht nur gegen Autoantigene sondern auch die generelle T-Zellen-Aktivierung (198). In weiteren Studien wurde gezeigt, dass durch Gabe eines agonistischen anti-CD137-Antikörpers die T-Zellen-abhängige humorale Immunantwort durch Induktion einer Anergie von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen gehemmt werden kann, wobei die Funktion der B-Zellen unbeeinflusst bleibt (129). Des Weiteren zeigte sich in diesen Versuchen, dass der erzielte Effekt nicht durch Blockade zwischen Rezeptor und Liganden zustande kam, sondern durch eine direkte Wirkung des Ak auf seine Zielzelle bzw. Rezeptor (129). Somit übte der anti-CD137 Ak seine regulatorische Fähigkeit nicht durch eine Blockade von kostimulatorischen Rezeptoren aus, sondern vermutlich eher durch direkte Stimulation der Zielzelle und konsekutiv zu einer Hemmung oder einer Aktivierung. Weitere Hinweise auf eine regulatorische Rolle des CD137-Signalwegs in der T-Zellen Aktivierung kommen aus Beobachtungen mit T-Zellen aus CD137 defizienten Mäusen (sog. „knock out Mäuse“). T-Zellen aus CD137 „knock out“ Mäusen haben im Vergleich zu T-Zellen aus normalen Mäusen eine vermehrte Sensibilität gegenüber stimulierenden Substanzen („mitogene“ Substanzen) (97).

Eine Immuntherapie mit einem Antikörper gegen CD137 verstärkt somit die zellvermittelte Immunität (CTL's), hemmt aber auch T-Helfer-Zellen und damit die humorale Immunität. Der exakte Mechanismus dieser „Dichotomie“ der Wirkung eines agonistischen anti-CD137 Antikörpers auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist weiterhin nicht im Einzelnen geklärt.

## **I.5 Ziele der Arbeit**

Bisherige Arbeiten zeigten, dass ein Ak gegen CD137 die humorale Immunität hemmt und eine zellvermittelte Immunität steigert über direkte CD137-Rezeptor Wirkung auf den verschiedenen Zielzellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen, DCs). Aufgrund der zentralen Rolle von T-, B-Zellen und DCs in der Pathogenese von verschiedenen Autoimmunerkrankungen und der bisher bekannten Wirkung eines agonistischen Antikörpers gegen CD137 (4-1BB) war es von Interesse, die Wirkung des anti-CD137-Antikörpers auf die zellvermittelte und humorale Immunität in verschiedenen Mausmodellen für Autoimmunerkrankungen zu untersuchen. In dem Tiermodell für die RA (CIA) und dem Tiermodell für den SLE (NZB/NZW F<sub>1</sub>) wurde die Wirkung einer Immuntherapie mit einem monoklonalen, agonistischen Antikörper gegen CD137

getestet (52, 53). Dies geschah auch im Hinblick auf eine mögliche therapeutische Nutzbarkeit einer derartigen Intervention in eine Autoimmunreaktion. Im Einzelnen wurden folgende Ziele verfolgt:

### **1. Untersuchungen der Wirkung und Effizienz eines agonistischen Ak gegen CD137 auf den Krankheitsverlauf, von T- und B-Zellen-abhängigen Autoimmunerkrankungen in zwei Tiermodellen (RA und SLE)**

Es wurden CIA oder SLE Mäuse mit einem monoklonalen Ak gegen CD137 behandelt und anschließend wurde der Effekt dieser Behandlung auf den Krankheitsverlauf gemessen und analysiert. Um eine Aussage zu treffen, wie potent und effizient eine derartige Immuntherapie ist, wurden Tiere entweder mit einer einzigen oder mit multiplen Injektionen von anti-CD137 Ak behandelt. Nach Behandlung wurden dann in dem Serum der Mäuse die Autoantikörper-Konzentrationen (CII-Antikörper und anti-dsDNA Ak) gemessen, sowie eine Beurteilung durchgeführt über den Grad der Organbeteiligung (Histologie von Gelenken und Nieren) und über die Krankheitsaktivität der Autoimmunerkrankung (Aktivitäts-Score bei RA und Proteinurie bei SLE).

### **2. Untersuchungen zur eventuellen Induktion einer Toleranz oder Anergie gegenüber Autoantigenen nach einer Behandlung mit anti-CD137 Ak**

In diesen Experimenten wurde getestet, ob es möglich ist, durch die anti-CD137 Ak-Behandlung eine Toleranz zu induzieren gegenüber dem Antigen, mit dem primär immunisiert wurde. Dabei wurden CIA Mäuse nach ca. 100 Tagen nach der primären Immunisierung erneut mit bCII (bovines Kollagen-II) immunisiert und anschließend erneut auf Produktion von Autoantikörpern gegen CII und Auftreten von Krankheitssymptomen analysiert.

### **3. Untersuchungen über einen therapeutischen Effekt einer Immuntherapie mit anti-CD137 Ak in den Tiermodellen**

Zur Prüfung des therapeutischen Nutzens einer anti-CD137 Ak-Behandlung, wurden CIA oder SLE Tiere behandelt, die bereits deutliche Aktivitätszeichen der Autoimmunerkrankung hatten (hoher Aktivitäts-Score oder hohe Autoantikörper-Titer im Serum). Anschließend wurden die Tiere regelmäßig auf Aktivitätszeichen ihrer Autoimmunerkrankung untersucht und die Autoantikörperkonzentrationen im Serum wurden bestimmt.



#### **4. Untersuchungen zur zellulären Wirkung eines anti-CD137 Ak in den Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen und virale Infektionen**

Aufgrund des Vorkommens des CD137 Rezeptors nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf anderen Zellen, vor allem DCs, wurde in verschiedenen Untersuchungen geprüft, welche Zellen für die autoimmun hemmende Wirkung verantwortlich sind oder ob eventuell Zellen durch den Antikörper aus dem Blut der Tiere entfernt (depletiert) werden. Es wurden bei den CIA- und bei den SLE-Tieren in regelmäßigen Abständen vor und nach anti-CD137 Ak-Behandlung die einzelnen T-Zellen-Fractionen im Blut der Tiere bestimmt, um eine eventuelle Depletion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder von B-Zellen zu erfassen. Außerdem wurden Untersuchungen durchgeführt mit Transferierung von „CFSE“ markierten Lymphozyten in NZB/NZW F1 Mäuse, um die Überlebenszeit der einzelnen Zellen nach anti-CD137 Ak-Behandlung in vivo zu bestimmen. Durch Antikörper-Depletion von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen in dem SLE Tiermodell vor der anti-CD137 Ak-Behandlung sollte herausgefunden werden, ob der Effekt von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt wird. Unter anderem sollte herausgefunden werden, ob regulatorische, immunsuppressive CD8<sup>+</sup> T-Zellen induziert werden oder ob der Effekt über Th1- oder Th2-Zytokine (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4) vermittelt wird. In weiteren Untersuchungen wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder DCs aus unbehandelten (sog. „geprimte Zellen“) erkrankten NZB/NZW F<sub>1</sub> Tieren in behandelte Tiere transferiert und anschließend wurde der Verlauf der Autoantikörperkonzentrationen im Serum der Tiere bestimmt. In diesen Versuchen sollte herausgefunden werden, ob auch DCs aktiv beteiligt sind an der Hemmung der autoreaktiven Aktivität in diesen Tieren.

Aufgrund der Beobachtung, dass der CD137 Rezeptor von Dendritischen Zellen (DC) exprimiert wird, formulierten wir eine Hypothese, warum eine anti-CD137 Ak-Behandlung eine T-Zellen abhängige Immunantwort in vivo hemmen oder verstärken kann. Aus diesem Grunde führten wir noch zusätzliche Untersuchungen durch und untersuchten die Wirkung des anti-CD137 Antikörper auf die Immunantwort gegen das pathogene Maus Virus LCMV. Es wurden Mäuse mit dem Virus infiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit dem Ak gegen CD137 behandelt. Anschließend wurde der Effekt der Behandlung durch Nachweis der spezifischen anti-Virus T-Zellen-Antwort (Tetramere und IFN $\gamma$  Nachweis) in den einzelnen Tieren bestimmt. Des Weiteren untersuchten wir die CD137 Expression auf T-Zellen und DCs im Verlauf einer viralen Infektion, um noch weitere Hinweise zu bekommen auf die

Zielzelle der anti-CD137 Ak-Behandlung. Aus diesen Untersuchungen sollten Hinweise gefunden werden, ob Zeitpunkte der Behandlungen wichtig sind für die Wirkung oder verantwortlich sind für eventuelle unterschiedliche Effekte einer anti-CD137 Ak-Behandlung.

## **5. Untersuchungen auf den exakten molekularen Wirkungsmechanismus einer Immuntherapie mit einem agonistischen Ak gegen CD137**

Aufgrund der Beobachtungen, dass DCs eine entscheidende Bedeutung haben in der Vermittlung der anti-CD137-Wirkung in den untersuchten Tiermodellen, sollten in weiteren Versuchen Hinweise auf eventuelle molekulare Wirkungsmechanismen gefunden werden. Es wurden in vitro DCs stimuliert in An- oder Abwesenheit von anti-CD137 Ak. Anschließend wurde auf das Vorhandensein von immunmodulierenden Molekülen, wie STAT3 oderIDO, in den DCs untersucht. Diese Versuche dienten dem direkten Nachweis der Generierung von immunmodulierenden DCs durch die Intervention mit einem Ak gegen CD137.

## **II. Material und Methoden**

### **II.1 Mausmodell für humane RA, die Kollagen induzierte Arthritis (CIA)**

Die CIA ist das meist eingesetzte und bekannteste Mausmodell für die RA. Die Immunisierung von sensiblen Mäusen (DBA/1) mit Rinderkollagen II in kompletten Freund's Adjuvans (CFA) führt in diesen Mäusen zu einer chronischen Entzündung, die der RA sehr ähnelt. Zu diesen Ähnlichkeiten gehören u. a. die Polyarthritis, Synovitis und die daraus resultierende Knorpel- und Knochenzerstörung (48, 136, 143). Dabei ist die synoviale Hyperplasie ein besonderes Kennzeichen der Gelenkszerstörung. Der Verlauf der Erkrankung ist wesentlich abhängig vom verwendeten Kollagentyp (bovines) sowie vom Stamm (MHC-II-Haplotypen H-2<sup>q</sup> und H2<sup>r</sup> in DBA/1 Mäuse) und Geschlecht (weibliche > männliche Tiere) der Versuchstiere. Dabei zeigte sich in verschiedenen Transfer-Experimenten von Kollagen-spezifischen T-Zellen (CD4<sup>+</sup> T-Zellen) oder Kollagen-spezifischen Ak (anti-CII Ak), dass B- und T-Zellen entscheidend an der Pathogenese der CIA beteiligt sind (160, 178). In diesen Experimenten zeigte sich, dass zwar in Abwesenheit von Autoantikörpern eine chronische Entzündungsreaktion in den Gelenken erzeugt

werden konnte, die Gelenksdestruktion jedoch nur in Anwesenheit von anti-CII Autoantikörpern hervorgerufen werden konnte (43, 72).

### II.1.1 Mäuse

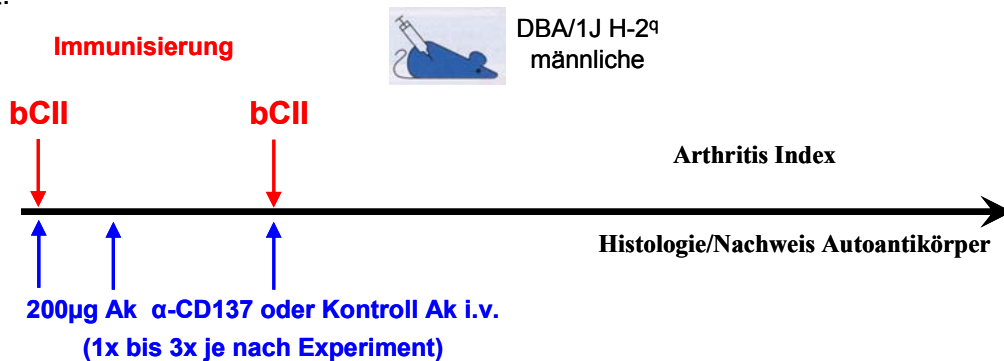
DBA/1J (H-2<sup>q</sup>) Mäuse wurden von M & B (Ry, Denmark) bezogen und unter keimarmen Bedingungen gehalten. Die Mäuse wurden im Alter von 8- bis 12 Wochen für die Experimente eingesetzt, wobei für jedes Experiment nur Tiere des gleichen Alters und Geschlechts eingesetzt wurden. Alle Tierexperimente wurden von der lokalen zuständigen Behörde geprüft und befürwortet.

### II.1.2 CIA Induktion

Zur Induktion von CIA wurde eine Emulsion aus komplettem Freund'schem Adjuvant und in 0,05 M Essigsäure gelöstem bovinen Collagen II (bCII, MD Biosciences, Zürich, Schweiz) subcutan (s.c.) an der Schwanzbasis injiziert (100 µl = 100 µg bCII,). Nach 3 Wochen (Tag 21) erfolgte ein Booster durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 100 µg bCII. Nach ca. 3-4 Wochen konnte eine beginnende Arthritis durch Schwellung und Rötung der Gelenke klinisch festgestellt werden. Die Methode erreichte eine Erkrankungsrate von 80 - 100 %.

### II.1.3 Antikörper Behandlung

Der anti-CD137 monoklonale Antikörper ist ein rat-anti-mouse-IgG<sub>2a</sub> Antikörper (3H3), der von Herrn Prof. Mittler in Atlanta hergestellt wurde (165). Die Mäuse wurden entweder mit einem Kontroll-Antikörper (9D6, rat-anti-human-CD137 mAb, IgG<sub>2a</sub>) oder dem anti-CD137 Antikörper (3H3) in einer Konzentration von 200µg i.v. behandelt.



**Abbildung 4: Immunisierungs- und Behandlungsschema der CIA Mäuse.**

Die Injektionen erfolgten, je nach Experiment, 1 x am Tag 0 oder insgesamt 3 x an den Tagen 0, 7, 21 (Abbildung 4).

## II. 1.4 Beurteilung und Messung der Arthritis

Die Tiere wurden alle zwei Tage genau auf klinische Zeichen der Arthritis und auf Veränderungen der Pfotendicke mit Hilfe eines mechanischen Tastarmmessgerätes der Fa. Kroepelin untersucht. Die klinischen Zeichen der Arthritis wurden nach einem Scoresystem eingeteilt (Abbildung 5):

- 1 = mild, Schwellung / Rötung von einem kleinen Gelenk
- 2 = moderat, Schwellung / Rötung von zwei oder mehr kleinen Gelenken und / oder einem großen Gelenk
- 3 = schwer, Schwellung der ganzen Pfote und / oder Ankylosis.

Jeder Extremität konnte ein Score bis 3 zugeteilt werden, weshalb ein maximaler Score von 12 pro Tier möglich war.



**Abbildung 5: Beispiele des Scoresystems zur Beurteilung der Arthritis.**

## II. 1.5 Konzentrationsbestimmung der anti-CII Antikörper im ELISA

Die Konzentrationsbestimmungen der anti-CII Ak im Serum der DAB/J1 Mäuse wurden mit einem ELISA der Firma MD Bioscience (MD Biosciences, Zürich, Schweiz) und nach den Anweisungen der Herstellerfirma durchgeführt. Mit Maus-Kollagen-II (mCII) beschichtete ELISA-Platten mit 96 Vertiefungen wurden über Nacht bei 4°C inkubiert mit verdünnten Serumproben (1:10000) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen eines Standardantikörpers. Nach dem Waschen mit PBS wurde ein Peroxidase-gefärbter Sekundärantikörper (Ziege anti-Maus IgG-Peroxidase) hinzugefügt und anschließend für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach folgten erneutes Waschen und Inkubation mit 100µl einer Enzym-Substrat Lösung (O-Phenylendiamin, OPD) bei Raumtemperatur über ca. 20 Min. Anschließend wurde die Reaktion mit 50µl 2.5 N Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte (OD) bei 490 nm mit einem speziellen „ELISA-Reader“ (Milenia Kinetic Analyzer, Diagnostic Products Corp., Los Angeles, USA) bestimmt. So konnte abschließend eine Standardkurve anhand der OD Werte der

Standardantikörperverdünnungen (0.5; 1; 2; 4; 8; 16 units/ml) erstellt und die Antikörperkonzentration (units/ml) ermittelt werden (SOFTmax PRO für Windows, Molecular Devices Corp., USA).

## **II. 1.6 Histologie der Gelenke**

DAB/1J Mäuse wurden getötet, beide Hüftgelenke entfernt und in 4%igem Formalin fixiert. Nach der Entkalkung der Knochen erfolgte die Einbettung der Gelenke in Paraffin und anschließende Färbung mit Hämatoxylin und Eosin.

## **II. 1.7 Messung von Oberflächenmarkern mit dem Durchflußzytometer (FACS)**

Zur Messung der Zellpopulationen in den DAB/1J Mäusen wurde die Milz aus nicht-behandelten und mit Antikörper gegen CD137 behandelten Tieren entfernt. Durch Zerkleinerung der Milz und Filterung (Durchpressen) mit Hilfe eines 70µm dicken Nylongitters (Falke, Becton Dickinson, Franklin Seen, NJ, USA) entstand eine Zellsuspension. Die in der Zellsuspension noch vorhandenen Erythrozyten wurden durch eine Erythrozytenlyse mit einer Ammoniumchloridverbindung (ACK-Puffer) entfernt. Nach dem Waschen der Zellsuspension und der Zählung der noch verbliebenen Zellen wurden die Zellen ( $1 \times 10^6$  cells/ml) mit entweder FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Ak (mAk) angefärbt.

Folgende von BD Bioscience (Heidelberg, Deutschland) erworbene mAk fanden Verwendung: Anti-CD4 mAk (KRM4-5), anti-CD8 mAk (53-6.7), anti-CD25 mAk (7D4), anti-CD45RB mAk (16A), anti-CD3 mAk (17A2) und anti-CD19 mAk (1D3). Nach 30 Min. Inkubation, mehrmaligem Waschen mit PBS und Fixation in 0.2 ml PBS den 1% Paraformaldehyd (Sigma, St. Louis, MO, USA) wurden die Zellen mit Hilfe eines FACS-Calibur gemessen und mit einem speziellen Programm (CellQuest Software, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Signale auf der Oberfläche der Zellen bestimmt und analysiert.

## **II. 1.8 Nachweis von IFN- $\gamma$ produzierenden Zellen mit dem ELISpot**

Nach der Gewinnung einer Zellsuspension durch die oben beschriebene Methode (siehe 1.10) wurde mit Hilfe eines Dichtegradienten (Lympholyte-M®, Cedarlane, Ontario, Kanada) und Zentrifugation eine Lymphozytenpopulation gewonnen.

Nach mehrmaligem Waschen und Zellzählung wurden die Zellen in Anwesenheit von mCII (0,2 mg/ml, MD Biosciences, Zürich, Schweiz) oder von Medium (RPMI

Medium) in Triplikate zu 100 µl ( $6 \times 10^5$  cells/well) auf eine mit anti-mouse-IFN- $\gamma$  vorinkubierte 96 well ELISpot-Platte (*AID, Strassberg, Deutschland*) aufgebracht. Nach Über-Nacht Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Platten gewaschen und mit einem Biotin-gebundenen Sekundärantikörper (Ratte anti-Maus IgG1 mAk) über 2- bis 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-(HRPO)-konjugierten-Streptavidin über 2h wurde die Reaktion mit Substrat Lösung (OPD) gestoppt. Erneutes Waschen und Analyse der „Spots“ mit einem speziellen „ELISpot-Reader“ (ImmunoSpot® Analyse, C.T.L Cellular Technology Ltd; Cleveland, Ohio, USA) schlossen sich an.

## **II. 2 Mausmodell für Systemischen Lupus Erythematodes (NZB/NZW F<sub>1</sub>)**

Der BWF<sub>1</sub> oder auch NZB/NZW F<sub>1</sub> Mausstamm gilt als das für den humanen SLE repräsentativste Mausmodell (187). Es handelt sich um die F<sub>1</sub> Nachkommenschaft von New Zealand Black (NZB) und New Zealand White (NZW) Mäusen. Während die Eltern lediglich eine hämolytische Anämie entwickeln (NZB) bzw. weitgehend normal sind und nur gelegentlich im Alter eine Nephritis entwickeln (NZW), hat die F<sub>1</sub> Generation eine deutlich verkürzte Lebenserwartung und entwickelt ein dem humanen SLE ähnliches Krankheitsbild. Die weiblichen NZB/NZW F<sub>1</sub>-Mäuse erkranken früher und schwerer als ihre männlichen Geschwister mit einer mittleren Überlebenszeit von 245d gegenüber 406d bei den Männchen. Außerdem wurden auf drei Chromosomen (Chromosom 1, 4 und 7) Allele (sle1, sle2, sle3/sle5) gefunden, welche mit der Manifestation der Erkrankung assoziiert sind (131, 187, 188). Das dominante klinische Merkmal ist die Glomerulonephritis, weibliche NZB/NZW F<sub>1</sub> entwickeln zwischen dem 5. und 7. Lebensmonat eine zunehmende Proteinurie. Das histologische Bild entspricht einer chronisch obliterativen Glomerulonephritis mit Proliferation von Endothel und Mesangiumzellen, obliterativen Veränderungen, Infiltration von mononukleären Zellen und granulärer Ablagerung von C3 und IgG (v.a. IgG<sub>2a</sub>) in den Glomeruli, mesangial und tubulointerstitiell. Weitere klinische Merkmale weiblicher NZB/NZW F<sub>1</sub>-Mäuse sind eine leichte Lymphadenopathie, Splenomegalie, Myokardinfarkte und Atrophie des Thymus (187). Es ist schon zu einem frühen Lebenszeitpunkt möglich, spezielle IgM Autoantikörper gegen Einzel-Strang-DNA (anti-ssDNA) im Serum von NZB/NZW F<sub>1</sub> Mäusen nachzuweisen. Erst im weiteren Verlauf der Erkrankung sind dann auch IgM Autoantikörper gegen Doppel-Strang-DNA (anti-dsDNA) nachzuweisen. In einem Alter von 3 bis 4 Monaten

kommt es bei den Tieren durch einen Immunglobulin-Klassen-Wechsel (somatische Hypermutation der B-Zellen, Ig-Klassen-Wechsel) zu einem spontanen Wechsel von IgM zu IgG anti-dsDNA Autoantikörper. Kurz nach dem Nachweis von anti-dsDNA IgG Autoantikörper entwickeln die NZB/NZW F<sub>1</sub> Mäuse eine Lupus-Nephritis mit fortschreitender renaler Pathologie (21). Die sich entwickelnde SLE-ähnliche Erkrankung ist B- und T-Zellen abhängig und kann mit immunhemmenden Medikamenten, der Blockade kostimulatorischer Moleküle oder mit einem CD4<sup>+</sup> T-Zellen abtötenden monoklonalen Ak behandelt werden (19, 75, 167, 200-202).

## II. 2.1 Mäuse

NZB/NZW F<sub>1</sub> (H-2<sup>dz</sup>) Mäuse, BALB/c und BALB/c-Rag<sup>-/-</sup> (H-2<sup>d</sup>) wurden von Jackson Laboratorien (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und unter keimarmen oder keimfreien Bedingungen gehalten. Die CD137Ligand defizienten Mäuse wurden uns freundlicherweise von Tanja Watts (Department Immunologie, Universität von Toronto, Canada) zur Verfügung gestellt. Alle Tierexperimente wurden durch das „Yerkes National Primate Research Center Animal Care and Use Committee“ (IACUC) geprüft und befürwortet. Wenn nicht anders vorgegeben, bestand jede Versuchsgruppe aus jeweils 10 Mäusen.

## II. 2.2 Antikörper-Behandlung

Der anti-CD137 monoklonale Antikörper (3H3) und der anti-CD137Ligand Antikörper (19H3), beide ein rat-anti-mouse-IgG<sub>2a</sub> Antikörper, wurden von Herrn Prof. Mittler in Atlanta hergestellt (165). Die Mäuse wurden entweder mit einem Kontroll Antikörper (9D6, rat-anti-human-CD137 mAb, IgG<sub>2a</sub>, ebenfalls von Prof. Mittler) oder dem anti-CD137 Antikörper (3H3) in einer Konzentration von 200µg i.v. behandelt (Anzahl der Injektionen je nach Experiment, siehe Abbildung 6).

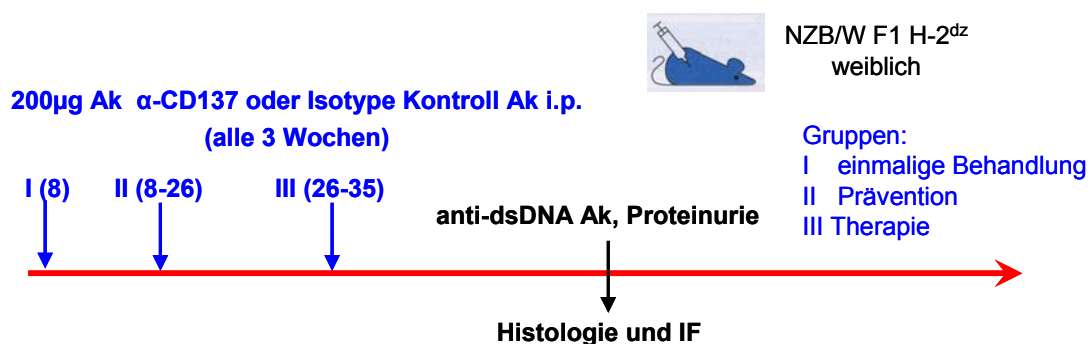


Abbildung 6: Behandlungsschema der NZB/NZW F<sub>1</sub> Mäuse

### **II. 2.3 Messung von Oberflächenmarkern mit dem Durchflußzytometer (FACS)**

Zur Messung der Zellpopulationen in den NZB/NZW F<sub>1</sub> Mäusen wurde Milz oder Blut aus nicht behandelten, mit Antikörper gegen CD137- oder mit Kontroll-Antikörper behandelten Tieren entfernt. Anschließend wurde durch Zerkleinerung der Milz und Filterung mit Hilfe eines 70µm dicken Nylongitters (Falke, Becton Dickinson, Franklin Seen, NJ, USA) eine Zellsuspension hergestellt. Die noch vorhandenen Erythrozyten wurde durch eine Erythrozytenlyse mit einer Amoniumchloridverbindung (ACK-Puffer) entfernt. Aus dem Blut wurde eine Zellsuspension nur durch Erythrozytenlyse hergestellt. Zur Pänotypisierung von generierten DCs musste keine Vorbehandlung durchgeführt werden.

Nach Waschen und Zellzählung, die Aufnahme der Zellen ( $1 \times 10^6$  cells/ml) in FACS-Medium (PBS mit 1.5% Bovinen Serum Albumin und 0.05% Natrium Azid) und anschließend Inkubation mit 10µg/ml anti-CD16/32 mAk (2.4G2) für 10 Min., zur Reduktion unspezifischer Bindungen. Anschließend wurden die Zellen mit einer optimalen Konzentration von entweder FITC-, PE-, PerCp oder APC konjugierten monoklonalen Ak angefärbt. Folgende von BD Pharmingen (St. Jose, USA) erworbene mAk fanden Verwendung: Anti-CD4 mAk (GK 1.5), anti-CD8 mAk (53-6.7), anti-CD25 mAk (7D4), anti- CD45RB mAk (16A), anti-CD3 mAk (145-2C11), anti-CD19 mAk (1D3), anti-CD11c (clone HL3) und anti-CD11b (clone M1/70). Die CD137 oder CD137L Expression auf Zellen wurde mit den FITC-konjugierten Ak 3H3 (anti-CD137) oder 19H3.1 (anti-CD137L) ermittelt, welche im Labor von Herrn Mittler selbst hergestellt wurden. Nach 30 Min. Inkubation, mehrmaligem Waschen mit PBS und Fixation in 0.2 ml PBS und 1% Paraformaldehyd (Sigma, St. Louis, MO, USA) wurden die Zellen mit Hilfe eines FACS-Calibur gemessen und mit einem speziellen Programm (CellQuest Software, BD, St. Jose, USA) die Häufigkeit des Vorkommens der einzelnen Signale auf der Oberfläche der Zellen bestimmt und analysiert.

### **II. 2.4 Depletion von CD4+ oder CD8+ T-Zellen in vivo**

Eine in vivo Depletion von CD4+ oder CD8+ T-Zellen wurde durch insgesamt vier i.p. Injektion von 500µg anti-CD4 oder anti-CD8 mAk im Abstand von 3 Tagen durchgeführt. Dabei wurde die letzte Injektion am 3. Tag vor dem Beginn des jeweiligen Experiments gegeben. Ebenfalls vor Beginn des jeweiligen Experiments wurde eine Kontrolle der Effizienz der in vivo Depletion durch FACS-Analyse mit nicht kompetentiven mAk (anti-CD4 mAk KRM4-5, anti-CD8 mAk 53-5.8)



durchgeführt. Ein Antikörper gegen Maus CD4 mAk (Ratte anti-Maus-CD4 mAk, GK1.5) und ein mAk gegen Maus CD8 (Ratte anti-Maus CD8 mAk, 53.6.7) wurde freundlicherweise von Herrn Jeff Ledbetter (Pacific Northwest, Research Institute, Seattle, Washington, USA) zur Verfügung gestellt. Durch dieses Verfahren konnten mehr als 95% der CD4+ oder CD8+ T-Zellen in den Mäusen depletiert werden.

## **II. 2.5 Nachweis von IgM und IgG anti-DNA Autoantikörpern im Serum**

Der Nachweis von Autoantikörpern im Serum von NZB/NZW F1 Mäusen wurde mit Hilfe eines modifizierten ELISA durchgeführt (s. leref6). Immunolon-2 ELISA Platten (Dynatech Laboratorien, Alexandria, USA) wurden mit 50µl (10µg/ml) methylierten BSA (bovines Serum Albumin, Sigma, St. Louis, USA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit PBS gewaschen und mit 50µl ssDNA oder dsDNA (Sigma, Chemical Co.) erneut über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach erneutem häufigen Waschen wurde über Nacht bei 4°C mit 50µl PBS+2%BSA/well geblockt und nach extensivem Waschen wurden 50µl Serumprobe/well (seriell verdünnt) aufgetragen und für 3h erneut bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden 50µl (1: 7500 verdünnt) eines Peroxidase-konjugierten-Ziege-anti-Maus-IgM oder ein Ziege-anti-Maus-IgG (γ-Ketten spezifisch)-Sekundärantikörper hinzugefügt und anschließend über Nacht bei 4°C inkubiert. Erneutes extensives Waschen und Inkubation mit 50µl einer Enzym-Substrat Lösung (O-Phenylendiamin, OPD) in Dunkelheit bei Raumtemperatur über ca. 20 Min. schlossen sich an. Anschließend wurde die Reaktion mit 50µl 2.5 N Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte (OD) bei 495 nm bestimmt. Die ermittelten Werte wurden als Mittelwerte der Dreifachbestimmungen dargestellt.

## **II. 2.6 Nachweis der Proteinurie**

Der Nachweis der Proteinurie erfolgte kolometrisch mit Hilfe von speziellen Urinstix (Albustix, Miles Inc., Elkhart, Indiana, USA). Bei dieser semiquantitativen Methode entsprach der Wert 1+ einer Proteinurie zwischen 30 bis 100mg/dl, 2+ entsprach 100 bis 300mg/dl, 3+ entsprach 300 bis 2000mg/dl und 4+ entsprach eine Proteinurie ≥ 2000mg/dl. In Übereinstimmung mit vorangegangenen Studien wurde eine signifikante Proteinurie definiert beim Vorliegen von Werten ≥ 100mg/dl (202).

## **II. 2.7 Histologie und Immunhistologie**

Die Nieren und Milzen von NZB/NZW F<sub>1</sub> Mäusen wurden in 10% Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden dann in 5 bis 6µm dünne Schichten geschnitten und anschließend mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Die Präparate wurden dann unabhängig, von zwei unterschiedlichen Veterinären untersucht und beurteilt. Die Immunkomplex-Ablagerungen in den Glomeruli der Nieren wurden mit Hilfe der Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurden die Organe, ohne vorangegangene Fixation in OCT Medium (Miles Inc.), mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die angefertigten 6µm dicken Kryoschnitte wurden auf Glass-Objektträger aufgebracht und mit Paraformaldehyd fixiert. Nach Fixation und Waschen der Präparate wurden die einzelnen Schnitte mit einem grün fluoreszierenden Pferd-Anti-Maus-IgG-Ak (Vector Laboratorien Inc., Burlingame, USA) in einer Konzentration von 10µg/ml inkubiert. Anschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskopes analysiert und dokumentiert.

## **II. 2.8 Immunisierung mit Erythrozyten vom Schaf (SRBC) und der Nachweis spezifischer Antikörper gegen SRBC**

NZB/W F<sub>1</sub> oder 4-1BBLigand defiziente Mäuse wurden an den Tagen 0 und 7 mit 10<sup>8</sup> SRBCs mit einer Injektion über die Schwanzvene gegen SRBCs immunisiert. Anschließend wurden die Tiere einmalig entweder mit einem Antikörper gegen CD137 oder mit einem Kontroll-Ak (200µg) behandelt. Den Tieren wurden Blutproben entnommen und mit einem ELISA die spezifische humorale Immunantwort gegen die SRBCs in den Tieren bestimmt. Dabei wurden SRBCs Membranen hergestellt und in einer Konzentration von 2,5µg/ml auf einer Immunolon-2 ELISA Platte (Dynatech Laboratorien, Alexandria, USA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach extensivem Waschen der Platten wurden die Serumproben in einer 1:5 Verdünnung aufgetragen und über 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurde ein Ziege-anti-Maus-IgG Sekundärantikörper (1:2000) hinzugefügt und anschließend über 30Min. bei 4°C inkubiert. Erneutes extensives Waschen und Inkubation mit 50µl einer Enzym-Substrat Lösung (O-Phenylendiamin, OPD) in Dunkelheit bei Raumtemperatur über ca. 20 Min. schlossen sich an. Anschließend wurde die Reaktion mit 50µl 2.5 N Schwefelsäure gestoppt und die optische Dichte (OD) bei

495 nm bestimmt. Die ermittelten Werte wurden als Mittelwerte der Dreifachbestimmungen dargestellt.

## **II. 2.9 Generierung von Dendritischen Zellen (DC)**

Die Herstellung von DCs erfolgte nach einer Methode von Inaba et al. (79). Nach Aspiration von Knochenmark aus dem Femur- und Tibia-Knochen von NZB/NZW F<sub>1</sub> Mäusen wurden die noch vorhandenen Erythrozyten durch eine Erythrozytenlyse mit einer Ammoniumchloridverbindung (ACK-Puffer) entfernt. Anschließend Aufnahme und Inkubation der verbliebenen Zellsuspension in komplettem Medium (RPMI 1640 und 10% FBS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 50 µM 2-Mercaptoethanol), welches mit 20ng/ml des Wachstumsfaktors GM-CSF („granulocyte macrophage colony stimulating factor“) und 4ng/ml Interleukin-4 (alle Sigma, St. Louis, USA) komplementiert war. Nicht an das Plastik der Kulturflasche adhärierende Zellen wurden anschließend entfernt und frisches Medium nach 2 und 4 Tagen hinzu gegeben. Nach insgesamt 6 Tagen Kultur wurden dann die sich in Lösung befindlichen Zellen (keine Adhäsion an Zellkultur Flasche) gesammelt und der Prozentgehalt an vorhandenen DCs mit Hilfe der Durchflußzytometrie und Bestimmung der Oberflächenmarker CD11c und CD11b (BD-Pharmingen) gemessen (ca. 90-95%).

## **II. 2.10 Transfer von Dendritischen Zellen (DC) und CD4<sup>+</sup> T-Zellen.**

Dendritische Zellen wurden, wie unter II.2.8 beschrieben, generiert und in einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen 26 Wochen alten NZB/NZW F<sub>1</sub> Mäusen über die Schwanzvene injiziert.

CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus einer aus Milz und Lymphknoten gewonnenen Zellsuspension isoliert. Anschließend wurden über eine Negativ-Selektion, unter Verwendung von an magnetische „beads“ (Eisenkugeln) gekoppelten Antikörpern gegenüber anti-CD19, anti-CD11b, anti-CD11c, anti-NK1.1 und anti-CD8 alle Zellen außer CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch die „MACS“-Methode („magnetic cell sorting“, Milteny, Deutschland) entfernt werden. Durch diese Methode konnte eine ca. 98% reine CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation hergestellt werden. Anschließend wurden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen in einer Anzahl von  $1 \times 10^7$  den Versuchstieren über die Schwanzvenen appliziert.

## **II. 2.11 Transferierung von CFSE markierten T- und B-Zellen in BALB/c oder NZB/W F1 Mäuse**

5-(und-6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidyl-Ester (CFSE) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, welcher auf Grund seiner lipophilen Beschaffenheit in Zellen diffundieren kann. Dort wird der farb- und fluoreszenzlose Farbstoff durch zelluläre Esterasen gespalten, so dass er in eine stark fluoreszierende und aminoreaktive Form übergeht und an Amine in zellulären Proteinen irreversibel bindet. Bei der Zellteilung wird jeweils die Hälfte des Farbstoffes an die Tochterzellen weitergegeben. Durch die Halbierung der Fluoreszenz lässt sich die Proliferation von Zellen bis zur ca. siebten Generation oder allgemein der Nachweis oder Verbleib von abgefärbten transferierten Zellen im Durchflußzytometer verfolgen. Es wurden T- oder B-Zellen ( $CD4^+$  und  $CD19^+$  Zellen) mit Hilfe der „MACS“-Methode (Milteny) gewonnen und anschließend mit  $10\mu\text{M}$  CFSE in PBS ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) über 10 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  angefärbt. Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen auf Vitalität geprüft (Lichtmikroskop) und über die Schwanzvene entweder BALB/c oder NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen gespritzt ( $1 \times 10^7$  Zellen).

## **II. 2.12 Nachweis von IL-2 und IL-4 produzierenden Zellen mit dem ELISpot**

Nach Gewinnung einer Zellsuspension aus Lymphknoten und durch die oben beschriebene Methode (siehe 1.10) wurde mit Hilfe eines Dichtegradienten (Lympholyte-M®, Cedarlane, Ontario, Kanada) und Zentrifugation eine Lymphozytenpopulation gewonnen. Anschließend wurde eine  $CD4^+$  T-Zellen-Population gewonnen, wie unter II. 2.10 beschrieben und in Triplikates zu  $100\ \mu\text{l}$  ( $6 \times 10^5$  cells/well) auf eine 96 well ELISpot-Platte aufgebracht. Nach 36h Inkubation im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$  wurden die Platten gewaschen und mit einem Biotin-gebundenen Sekundärantikörper gegen IL-2 oder IL-4 (BD Pharmingen) über 2- bis 3h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneuter Inkubation mit Meerrettich-Peroxidase-(HRPO)-konjugierten-Streptavidin über 2h und über 30 Min. wurde die Reaktion mit Hilfe von Substrat-Lösung (OPD) gestoppt. Erneutes Waschen und Analyse der „Spots“ mit einem speziellen „ELISpot-Reader“ (ImmunoSpot® Analyse, C.T.L Cellular Technology Ltd; Cleveland, Ohio, USA) schlossen sich an.

## **II. 3 Zusätzliche Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus einer anti-CD137-Antikörper-Behandlung**

Bis zu diesem Zeitpunkt gibt es keine ausreichende Erklärung für die beobachtete Dichotomie der Wirkung von anti-CD137 Ak auf CD4<sup>+</sup> Helfer T-Zellen und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Aufgrund der Beobachtung, dass der CD137 Rezeptor von Dendritischen Zellen (DC) exprimiert wird, formulierten wir eine Hypothese, warum eine anti-CD137 Ak-Behandlung eine T-Zellen abhängige Immunantwort in vivo hemmen oder verstärken kann (198). Deshalb führten wir noch zusätzliche Untersuchungen durch und testeten die Wirkung des anti-CD137 Antikörpers auf die Immunantwort gegen LCMV in infizierten Mäusen. Des Weiteren untersuchten wir an humanen Zellen die Möglichkeit der Generierung von regulatorischen DCs durch eine anti-CD137-Ak-Behandlung.

### **II. 3.1 Untersuchungen an einem Modell für Virusinfektionen (LCMV, „lymphocytic-choriomeningitis-virus“)**

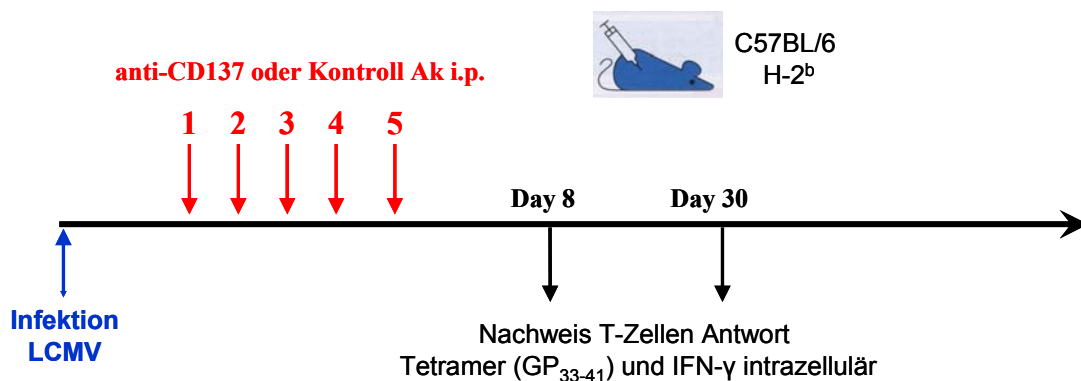
LCMV ist ein natürlicher Krankheitserreger für die Maus. Weil die T-Zellen-Antwort gegen LCMV ausführlich in Mäusen untersucht wurde, ist dieses Modell weitgehend benutzt worden, um die molekularen und zellulären Mechanismen der Virusclearance und der Viruspersistenz sowie die Regulation der primären- und sekundären Immunantwort nach einer Virusinfektion zu erforschen (86). Nach einer Infektion mit LCMV entwickeln immunkompetente Mäuse eine starke virusspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Antwort, welche die Virusinfektion eliminiert. Während einer LCMV-Infektion expandieren („expansion phase“) zuerst virusspezifische CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Dieser Expansionsphase folgt eine Phase, in der die meisten virusspezifischen T-Zellen durch Apoptose sterben („contraction phase“). Es verbleibt eine stabile virusspezifische CD8<sup>+</sup> T-Zellen („memory“ T-Zellen)-Population („memory phase“), während sich virusspezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen langsam vermindern. Das LCMV Modell wurde ausführlich zu Studien der physiologischen Beteiligung und Beeinflussung der anti-viralen Immunantwort durch kostimulatorische Moleküle benutzt (86).

#### **II. 3.1.1 Mäuse, Antikörper und Virus**

C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), BALB/c (H-2<sup>d</sup>) und immuninkompetente BALBc RAG<sup>-/-</sup> (H-2<sup>d</sup>) Mäuse wurden von den Jackson Laboratorien (Bar Harbor, Maine, USA) bezogen und unter keimarmen oder keimfreien Bedingungen gehalten. Alle Tierexperimente wurden

durch das „Yerkes National Primate Research Center Animal Care and Use Committee“ (IACUC) geprüft und befürwortet. Wenn nicht anders vorgegeben, bestand jede Versuchsgruppe aus jeweils 5 Mäusen und jedes Experiment wurde mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

Die Mäuse wurden entweder mit einem Kontroll Antikörper (9D6, rat-anti-human-CD137 mAb, IgG<sub>2a</sub>) oder mit dem anti-CD137 Antikörper (3H3) in einer Konzentration von 200µg i.p. behandelt (Zeitpunkt der Injektionen je nach Experiment, siehe Abbildung). Ein Antikörper gegen Maus CD137L mAk (Ratte anti-Maus IgG<sub>2a</sub>, 19H3) wurde ebenfalls im Labor von Herrn Prof. Mittler hergestellt (165). Die C57BL/6 Mäuse wurden i.p. mit  $2 \times 10^5$  PFU („plaque forming units“) des Armstrong CA 1371 LCMV-Stammes infiziert, welcher uns von Herrn Rafi Ahmed (Emory University, Vaccine Research Center, Atlanta, USA) zur Verfügung gestellt worden war (Abbildung 7).



**Abbildung 7: Infektions- und Behandlungsschema der C57BL/6 Mäuse**

### II. 3.1.2 Nachweis von Oberflächenmarkern, Tetramer positiven T-Zellen und intrazellulärem Interferon-gamma (IFN-γ)

Der Nachweis der Oberflächenmarker wurde mit Hilfe der FACS Methode wie unter II.2. beschrieben durchgeführt. Als Messung der virusspezifischen T-Zellen Antwort diente der Nachweis von Tetramer positiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen und des intrazellulären IFN-γ nach der Methode von Murali-Krishna et al. (134). Lymphozyten aus dem Blut (PBMCs) oder Zellen aus der Milz wurden mit Allophycocyanin-konjugierten (APC) H-2D<sup>b</sup>-Tetramere, spezifisch gegen das LCMV Peptid GP<sub>33-41</sub>, und PerCP-konjugierten anti-CD8 (53-6.7, BD-Pharmingen) Ak angefärbt und mit dem Durchflußzytometer ausgewertet (siehe II. 2.4). Die spezifischen Tetramere wurden uns freundlicherweise

von Herrn Robert Altmann (Emory University, Vaccine Research Center, Atlanta, USA) zur Verfügung gestellt. Zum Nachweis IFN- $\gamma$  produzierender Zellen wurden PBMCs oder Lymphozyten aus der Milz in vitro mit dem GP<sub>33-41</sub> Peptid für 5h inkubiert, in der Anwesenheit von Brefeldin A (Golgiplug, BD Pharmingen) zur Hemmung der Ausschleusung von IFN- $\gamma$  aus der Zelle. Anschließend wurden die Zellen mit einem PerCP-konjugierten Ak gegen CD8 und, gemäß den Anweisungen der Herstellerfirma, mit dem Cytofix/Cytoperm Anfärbungs-Kit (BD Pharmingen) intrazellulär auf IFN- $\gamma$  angefärbt. Dabei wurden ein APC-konjugierter Ak gegen IFN- $\gamma$  (Ratte anti-Maus, XMG1.1) und ein Kontroll Ak (Ratte IgG1) zur intrazellulären Färbung von IFN- $\gamma$  benutzt (beide BD Pharmingen).

### **II. 3.1.3 Generierung und Aktivierung von DCs**

Die in vitro Generierung und Analyse von DCs erfolgte wie unter II. 2.9 beschrieben. In den in vitro Aktivierungs-Experimenten wurden die DCs in RPMI-medium aufgenommen ( $1 \times 10^7$  Zellen/ml) und mit je 10 $\mu$ g/ml anti-CD137 (3H3) oder Kontroll-Ak (beides Ratte anti-Maus Ak) für ca. 15 Min. inkubiert. Nach Waschen und erneuter Aufnahme in RPMI-Medium (Biochrom, Deutschland) in der vorangegangenen Konzentration wurden 0,1 ml ( $1 \times 10^6$  Zellen) in 0,9 ml Medium aufgenommen, mit oder ohne 50 $\mu$ g/ml Ziege anti-Ratte IgG Ak (BD Pharmingen), zur Kreuzvernetzung von verbliebenen Antikörpern auf der Oberfläche von DCs. Nach erneuter 30 minütiger Inkubationen wurden die Zellen mit einem speziellen „Lyse-Puffer“, welcher auch spezielle Hemmer für Proteasen und Phosphatasen beinhaltet, zerstört. Anschließend wurden die Proteinkonzentrationen nach der Methode von Lowry bestimmt und äquivalente Mengen von Protein auf ein 10% SDS-PAGE Gel aufgebracht und elektrophoretisch aufgetrennt (130). Nach Auftrennung wurden die Proteine mit Hilfe des „Western-Blott“ Verfahrens auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen anti-STAT3 oder anti-phospho-STAT3 angefärbt (BD Pharmingen). Nach erneutem extensivem Waschen der Membran war die Darstellung der Proteine mit Hilfe der Lumineszenz- oder ECL-Methode möglich (ECL: Enhanced Chemiluminescence; (130, 197)).

### **II. 3.1.4 Transfer von in vitro LCMV infizierten DCs und T-Zellen**

Dendritische Zellen wurden, wie unter II.2.9 beschrieben, generiert und in einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in vitro über 1 Tag in Medium kultiviert, zusätzlich mit

dem LCMV infiziert in An- oder Abwesenheit von 10µg/ml anti-CD137 Ak. Anschließend wurden die Zellen in einer Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen immuninkompetenten Mäusen (BALBc RAG<sup>-/-</sup>, Jackson Laboratorien, USA) über die Schwanzvene injiziert. T-Zellen wurden aus einer aus Milz und Lymphknoten gewonnenen Zellsuspension isoliert. Anschließend wurden über eine Negativ-Selektion, unter Verwendung von an magnetische "beads" (Eisenkugeln) gekoppelten Antikörpern gegenüber anti-CD19, anti-CD11b, anti-CD11c und anti-NK1.1 alle Zellen außer T-Zellen durch die "MACS"-Methode ("magnetic cell sorting", Milteny, Deutschland) entfernt. Durch diese Methode konnte eine ca. 98% reine T-Zellpopulation (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) hergestellt werden. Anschließend wurden die T-Zellen in einer Anzahl von  $1 \times 10^7$  den Versuchstieren über die Schwanzvenen appliziert.

## **II. 3.2 Untersuchungen mit humanen Zellen auf Generierung von immun modulierenden DCs**

### **II. 3.2.1 Gewinnung und Aktivierung von humanen DCs**

PBMCs wurden mit Hilfe der Isolierung über Ficoll-Gradienten (Amersham, Deutschland) aus Blut von gesunden Spendern gewonnen. Anschließend wurde mit Hilfe der Kunststoff Adsorption (Monozyten bleiben am Boden der Kulturflaschen haften) bei 37°C über 1h eine Monozyten Anreicherung durchgeführt. Die nicht adhärenen Zellen wurden anschließend abgewaschen mit PBS und die verbliebenen Zellen in RPMI Medium (+1% AB-Serum, +1% Penizillin/Streptomycin, +1000U/ml IL-4, +800U/ml GM-CSF, R&D Systems, Deutschland) aufgenommen. Nach 3 Tagen erfolgte die erneute Zugabe von GM-CSF und IL-4. Nach 5 Tagen wurde ein sog. Reifungscocktail (10ng/ml TNF-α, 10ng/ml IL-1β, 10ng/ml IL-6, 1µg/ml PGE<sub>2</sub>, 1000U/ml IL-4, 800U/ml GM-CSF, R&D Systems, Deutschland) der Kultur zugegeben. Nach weiteren 2 Tagen in Kultur wurden die Zellen gewaschen und mit dem Durchflußzytometer untersucht auf spezifische Oberflächenmarker für Dendritischen Zellen, wie anti-CD11c (B-ly6) und anti-CD83 (HB15e). Erneutem Waschen und Zählen der DCs ( $1 \times 10^6$  Zellen/ml in RPMI-Medium) folgte die Stimulation mit 10µg/ml Antikörper gegen CD137 (26G6), CD137L (C65-485, R&D Systems) oder Kontroll-Ak (3H3). Nach 3 Tagen Stimulation und erneutem Waschen konnte die Expression vonIDO (Indoleamine 2,3 Dioxygenase) mit Hilfe der PCR-Methode analysiert werden.



### **II. 3.2.2 Nachweis von Indoleamine 2,3 Dioxygenase in humanen DCs durch RT-PCR (Reverse-Transkriptase Polymerasekettenreaktion) und Real-Time-PCR**

Die Extraktion von RNA aus DCs erfolgte mit Hilfe des TRIzol-Kits (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) entsprechend den Empfehlungen des Herstellers. Im Anschluss daran erfolgte die Herstellung von cDNA mittels der RT-PCR unter Verwendung von 1 µg RNA (photometrische Bestimmung) und 5x Reaktionspuffer (4µl), 10 mM dNTP Mix (1µl), Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (0,5µg/µl), RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas, Deutschland) und aufgefüllt auf 20µl mit DEPC-H<sub>2</sub>O (Ambion, Deutschland). Die Reaktion wurde bei 37°C für 1h durchgeführt, eine Enzymaktivierung für 5 min bei 90°C schloß sich an.

Die PCR Reaktion wurde in einem 25 µl Ansatz mit folgenden Primerkombinationen durchgeführt: β-Aktin (sense: 5'-GGCATCGTGATGGACTCCG-3', antisense: 5'-GCTGGAAGGTGGACA GCGA-3', 613 bp); IDO (sense: 5'-TCAAAGCACTGAAAG ACGCTGC-3', antisense: 5'-CC CCTGACTTATGAGAACATGG-3', 397 bp).

Die Amplifizierung der cDNA mit Hilfe der PCR erfolgte mit folgenden Zyklen in einem Thermocycler (Ependorf): β-Aktin 22 und IDO mit 27 Zyklen. Die Annealing Temperatur betrug bei den verschiedenen Ansätzen 60°C. In den 25µl Reaktionsansatz waren folgende Reagenzien enthalten: 2 µl cDNA, 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 1,5 µl 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl 10 mM dNTP Mix (Fermentas, Deutschland), 0,25 µl Primer S (25 µM), 0,25 µl Primer AS (25 µM, MWG, Deutschland), 0,2 µl aTaq (5 U/µl, Promega, Deutschland), aufgefüllt auf 25 µl mit H<sub>2</sub>O.

Die Quantitative-Real-Time-PCR mit dem QuantiTect® SYBR® Green-PCR-Kit von Quiagen wurde entsprechend den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt. Die Reaktionen erfolgte in einem Rotor-Gene RG-3000 (Corbett Research). Die vorhandene mRNA in den Zellen wurde nach der Methode von Livak und Schmittgen berechnet (112).

## **II. 4. Statistische Analysen**

Die Messergebnisse wurden als Mittelwerte – SD angegeben. Zum Vergleich der Mittelwerte aus den von einander unabhängigen Stichproben wurde eine Varianzanalyse (ANOVO) durchgeführt. Unterschiede wurden als signifikant eingestuft, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit mindestens  $p < 0,05$  betrug. Eventuelle Unterschiede in den nachgewiesenen IFN-γ Spots bei den ELISPOT Analysen wurden mit dem Student *t*-Test analysiert.

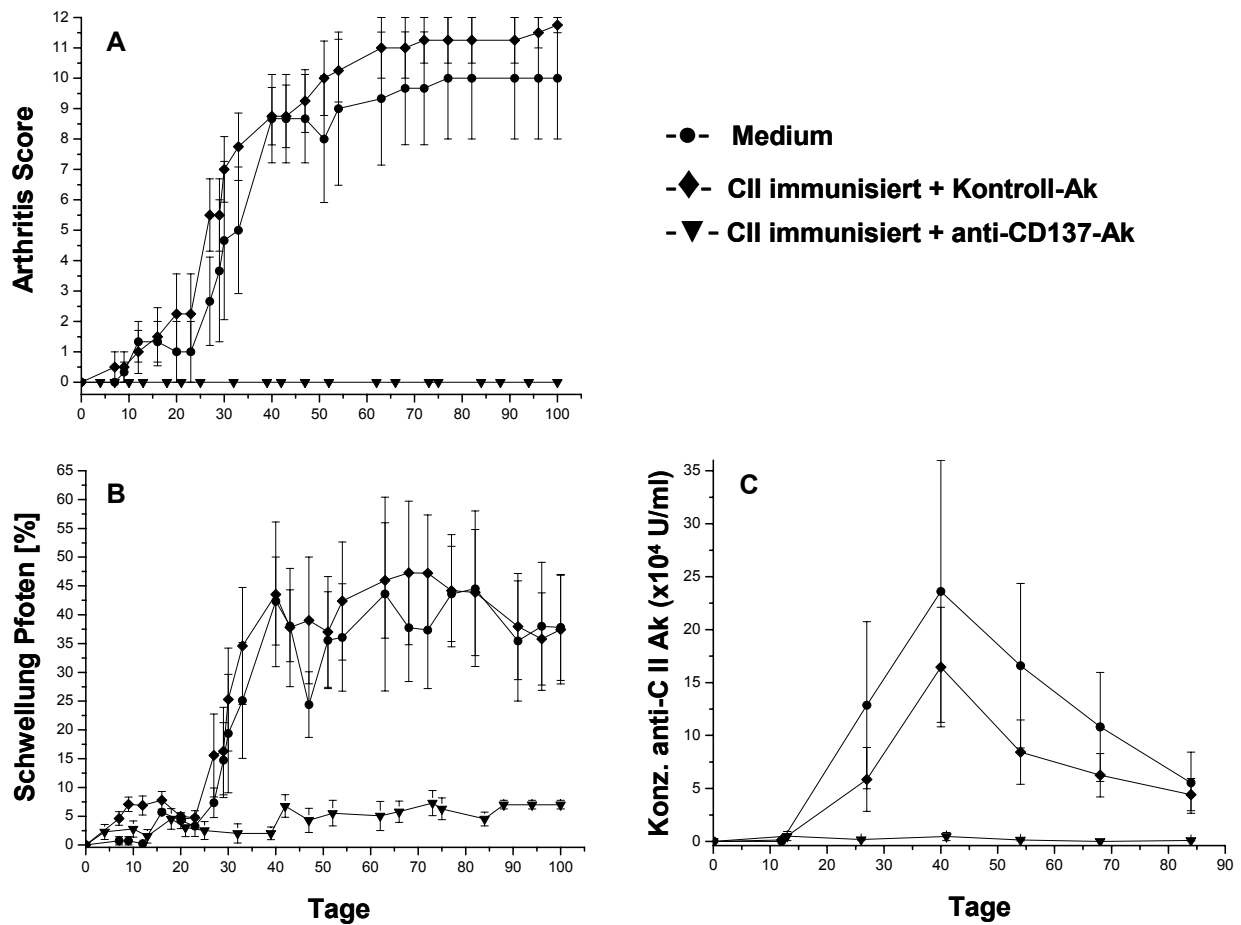
### **III. Ergebnisse**

#### **III. 1 Wirkung eines agonistischen Antikörpers gegen CD137 in einem Mausmodell für RA (CIA)**

Ziel der im Folgenden dargestellten Untersuchungen war es, die bekannten Effekte auf die humorale und zellvermittelte Immunität eines agonistischen Antikörpers gegen den kostimulatorischen Rezeptor CD137 im murinen Mausmodell für RA zu testen. Die hier dargestellten Untersuchungen sollten klären, ob eine Behandlung mit dem anti-CD137 Ak die Induktion (Prophylaxe) und/oder Progression (Therapie) der Arthritis nach Immunisierung mit bCII deutlich beeinflusst. Aus diesem Grund wurden DBA/1 Mäuse mit bCII immunisiert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit einem Antikörper gegen CD137 oder einem Kontroll-Ak behandelt. Anschließend wurden die Mäuse kontinuierlich auf Zeichen einer Arthritis untersucht (Messung Schwellung der Pfoten und Bestimmung Aktivitäts-Score) und Blut abgenommen zur Bestimmung der Autoantikörper-Titer im Serum der Mäuse. Außerdem wurde der Frage nachgegangen, ob eine Behandlung mit anti-CD137 Ak eine Immunität gegen das Krankheit auslösende Antigen (bCII) hinterlässt. Die Stimulation des CD137 Rezeptors durch monoklonale Antikörper führt hauptsächlich zu einer Aktivierung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und zu einer Sekretion von TH<sub>1</sub> Zytokinen, wie IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , und könnte Hinweis auf einen eventuellen Wirkungsmechanismus einer anti-CD137 Behandlung sein. Um Hinweise auf den Wirkungsmechanismus einer anti-CD137 Behandlung zu bekommen, wurden Untersuchungen zur Bestimmung der zellulären Veränderungen und beteiligten Zytokine während und nach einer anti-CD137 Behandlung bei den Mäusen durchgeführt.

##### **III. 1.1 Ein Anti-CD137 Ak hemmt die humorale Immunantwort gegen CII und verhindert die Entwicklung einer Arthritis**

DBA/1 Mäuse wurden mit bCII immunisiert und mit einem Kontroll-Ak (Ratte anti-human-CD137) oder einem Ak gegen CD137 (3H3) behandelt (siehe Material und Methoden). In diesen Experimenten zeigte sich, dass eine Immunisierung mit bCII mit oder ohne Kontroll-Ak bei allen Mäusen eine Arthritis induzierte und die Mäuse spezifische Autoantikörper gegen Kollagen produzierten (**Abb. 8 A, B und C**).



**Abbildung 8: CD137 Ak hemmt die humorale Immunantwort gegen bCII und verhindert die Entwicklung einer Arthritis.**

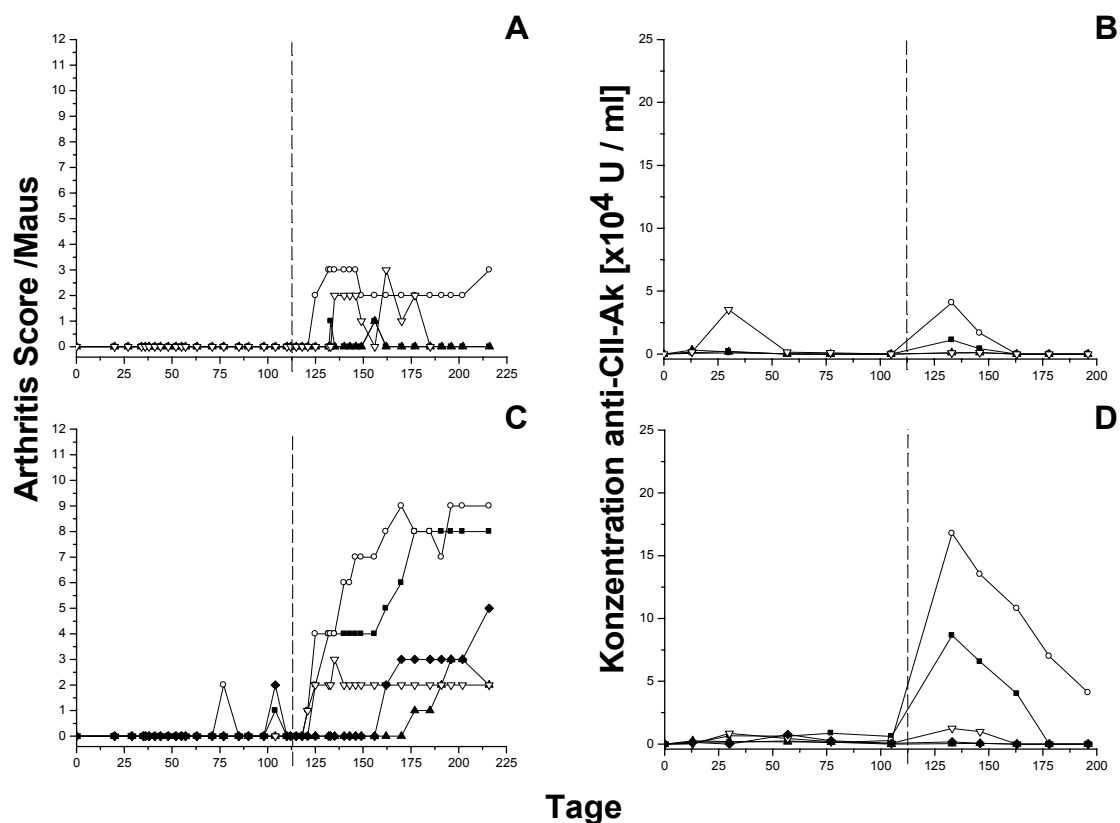
DBA/1J Mäuse (n=5 pro Gruppe) wurden mit bCII immunisiert (Tag 0 und 21) und entweder nicht weiter behandelt (-●-) oder behandelt mit drei Injektionen (Tag 0, 6 und 21) eines Kontroll-Ak (-◆-) oder mit dem anti-CD137-Ak (-▼-). Dargestellt sind der mittlere Aktivitäts-Score (A), die prozentuale Größenzunahme der Pfotendicke der Tiere (B) und die Autoantikörper Titer gegen CII im Serum der Mäuse (C) in den unterschiedlichen Behandlungsgruppen. Gezeigt wird ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

Im Gegensatz dazu zeigten Mäuse die mit bCII immunisiert wurden und mit einem Ak gegen CD137 behandelt wurden keine Zeichen einer Arthritis und produzierten keine spezifischen Antikörper gegen Kollagen (**Abb. 8 A, B, und C**). Es zeigte sich, dass die Gabe eines Ak gegen CD137 sehr wirksam das Auftreten von arthritisspezifischen Symptomen und die humorale Immunantwort gegen CII sehr effizient hemmen kann.

**III. 1.2 Anti-CD137 Ak hinterlässt in bCII immunisierten Mäusen eine Immunität gegen das Arthritis auslösende Antigen bCII.**

In den folgenden Experimenten sollte der Frage nachgegangen werden, ob immer drei Injektionen des anti-CD137 Ak notwendig sind oder ob auch eine Injektion

ausreichend ist für die Hemmung der Arthritis und die Produktion von Autoantikörpern. Außerdem war von Interesse, ob die Behandlung mit dem Ak gegen CD137 nur die momentane Autoimmunreaktion hemmt oder ob die Behandlung eine länger wirkende Immunität gegen das Arthritis auslösende Antigen hinterlässt. Aus diesem Grund wurden DAB/1 Mäuse entweder mit einer oder mit drei Injektionen des anti-CD137 Ak behandelt und anschließend über einen längeren Zeitraum auf Zeichen einer Arthritis untersucht und regelmäßig Blut abgenommen zur Bestimmung der Autoantikörper-Titer im Serum. Des Weiteren wurden die Mäuse zusätzlich am Tag 110 nach der primären Immunisierung erneut mit bCII immunisiert.



### Abbildung 9: CD137 Ak induziert eine lang anhaltende Immunität gegen bCII.

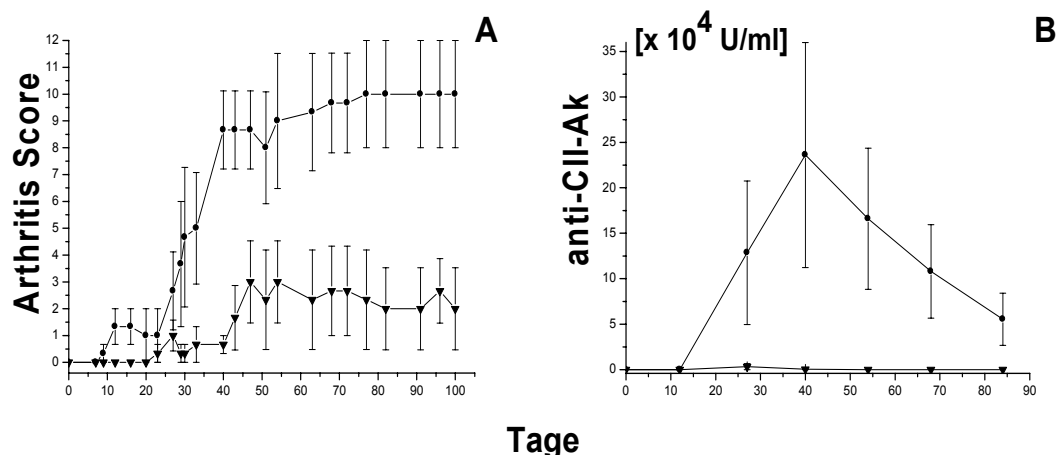
DBA/1J Mäuse (n=5 pro Gruppe) wurden mit bCII immunisiert (Tag 0 und 21) und entweder mit drei Injektionen (Tag 0, 6 und 21, **A, B**) oder mit einer Injektion (Tag 0, **C, D**) des anti-CD137-Ak behandelt. Dargestellt sind der Aktivitäts-Score (**A, C**) und die Autoantikörper Titer gegen CII im Serum der Mäuse (**B, D**). Nach 110 Tagen wurden die Tiere zusätzlich nochmals mit bCII einmalig immunisiert (vertikale Linie). Jedes Symbol repräsentiert den Verlauf bei einem Tier in den zwei unterschiedlichen Versuchsgruppen. Gezeigt wird ein Versuch repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

Die Ergebnisse, dargestellt in **Abb. 9**, zeigten, dass eine einzige Injektion am Tag der Immunisierung 3 von 5 Mäusen komplett vor der Entwicklung einer Arthritis schützte und 2 Mäuse nur eine moderate Arthritis entwickelten (**Abb. 9 C**). Im

Gegensatz dazu konnten drei Injektionen des anti-CD137 Ak alle Mäuse vor der Induktion einer Arthritis schützen (**Abb. 9 A**). Ein ähnliches Bild ergab sich in den Untersuchungen der Autoantikörper-Titer im Serum der Mäuse. Nach erneuter Exposition mit bCII erzeugte eine einzige Injektion des Antikörpers nur einen moderaten Schutz vor der Entwicklung von Autoantikörpern gegen Kollagen im Serum der Mäuse (**Abb. 9 D**). Jedoch die dreifache Injektion des Antikörpers gegen CD137 bewirkte eine komplette Protektion vor Entwicklung von Autoantikörpern gegen Kollagen nach erneuter Exposition mit bCII (**Abb. 9 B**). Zusammenfassend zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass eine dreifache Injektion des anti-CD137 Antikörpers eine lang anhaltende Immunität gegen das Arthritis auslösende Antigen bCII induziert.

### III. 1.3 Eine verzögerte Behandlung mit anti-CD137 Ak schützt vor Entwicklung einer Arthritis und Produktion von Autoantikörpern gegen Kollagen

Aufgrund der Erkenntnis, dass eine einzige Injektion des Ak gegen CD137 die Entwicklung einer Arthritis hemmt, war es von Interesse, ob eine Injektion nach der primären Immunisierung (> Tag 6) und somit nach der Initiierung einer Immunantwort gegen bCII auch einen vergleichbaren Effekt zeigt. Um das zu testen wurden DBA/1 Mäuse am Tag 14 nach der primären Immunisierung mit einer Injektion eines Ak gegen CD137 oder eines Kontroll-Ak behandelt und anschließend auf Arthritis Zeichen und Autoantikörper-Produktion im Verlauf untersucht.



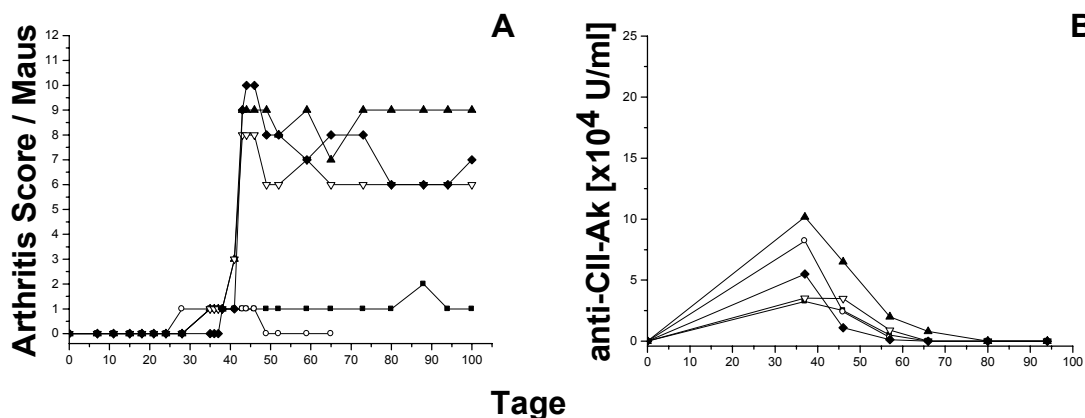
**Abbildung 10: Verzögerte CD137 Ak-Behandlung reduziert Arthritis und Autoantikörper-Produktion.**

DBA/1J Mäuse (n=5 pro Gruppe) wurden mit bCII immunisiert (Tag 0 und 21) und entweder mit einer Injektion (Tag 14) des anti-CD137-Ak (-▼-) oder eines Kontroll-Ak (-●-) behandelt. Dargestellt sind der mittlere Aktivitäts-Score (A) und die Autoantikörper-Titer gegen CII im Serum der Mäuse (B). Gezeigt wird ein Versuch, repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Versuche.

Die Ergebnisse, dargestellt in Abb. 10, zeigten, dass eine einzige Behandlung mit dem Antikörper gegen CD137 am Tag 14 nach primärer Immunisierung die Mäuse sehr effizient vor der Entwicklung einer Arthritis und vor der Entwicklung von Autoantikörpern gegen Kollagen schützt im Vergleich zu Tieren, die mit Kontroll-Ak behandelt wurden (**Abb. 10 A, B**). Jedoch fällt der Effekt auf die Hemmung der Arthritis-Zeichen der anti-CD137 Ak-behandelten Tieren etwas geringer aus im Vergleich zu Tieren, die eine dreimalige Behandlung bekamen (**Abb. 8 und 9**).

### III. 1.4 Therapeutische Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung

In den bisherigen Experimenten zeigte sich, dass eine anti-CD137 Behandlung zur Zeit der primären Immunisierung oder vor der zweiten Immunisierung die Entwicklung einer Arthritis und die Produktion von Autoantikörpern sehr effizient hemmen kann (III.1.1 bis 1.3). Aufgrund dieser Ergebnisse war es jetzt von Interesse, ob eine anti-CD137 Behandlung auch noch nach Abschluss der Immunisierung mit bCII, bei bereits vorhandenen Autoantikörpern gegen CII im Serum (Abschluss Ig-Klassen Wechsel zu IgG) und Zeichen einer Arthritis die bereits beschriebene Wirkung zeigt. Zur Untersuchung eines therapeutischen Effektes einer anti-CD137- Behandlung wurden DAB/1 Mäuse bei den ersten Zeichen des Auftretens einer Arthritis mit einer einzigen Injektion des anti-CD137 Ak oder eines Kontroll-Ak behandelt. Anschließend folgten erneute kontinuierliche Untersuchungen auf Arthritiszeichen und Nachweis von Antikörpern gegen CII im Serum der Mäuse.



**Abbildung 11: Behandlung mit anti-CD137 Ak zum Zeitpunkt der ersten Zeichen einer Arthritis beeinflusst Verlauf der Arthritis und Autoantikörper-Konzentrationen.**

DBA/1J Mäuse (n=5 pro Gruppe) wurden mit bCII immunisiert (Tag 0 und 21) und bei den ersten Zeichen der Entwicklung einer Arthritis (Arthritis Score 1) mit einer einzigen Injektion des anti-CD137-Ak behandelt (Tag 27, 3 x Tag 35, tag 37). Dargestellt sind der Aktivitäts-Score (A) und die Autoantikörper Titer gegen CII im Serum der Mäuse (B). Jedes Symbol repräsentiert den Verlauf eines Tieres in den zwei unterschiedlichen Versuchsgruppen. Gezeigt wird ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

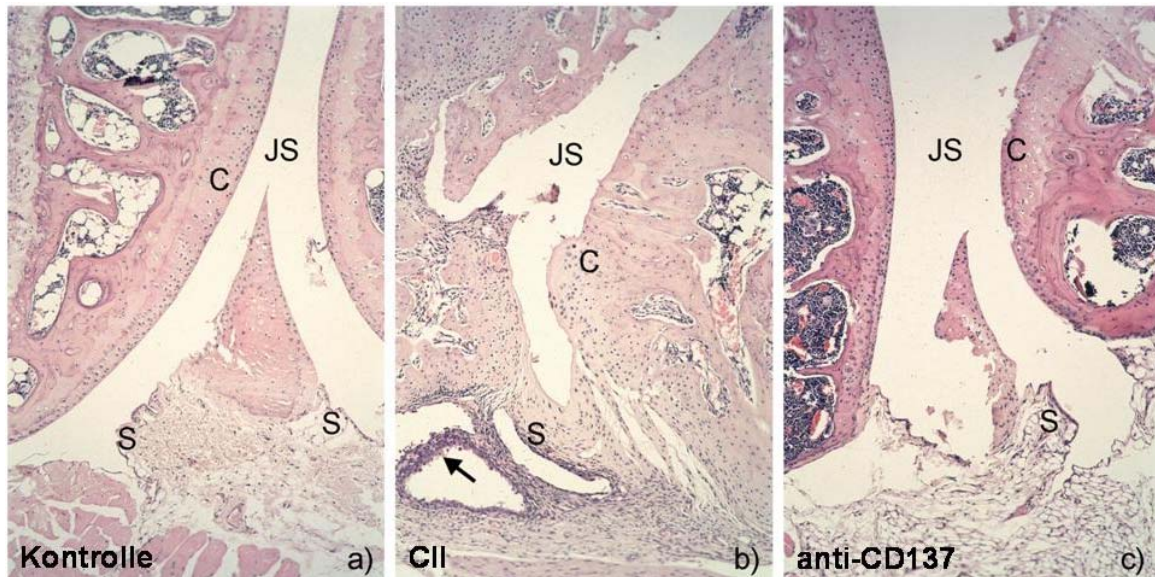
Die in der Abbildung **11** dargestellten Untersuchungen zeigten, dass anti-CD137 Behandlung zum Zeitpunkt des Beginns der Autoimmunerkrankung die Entwicklung der Arthritis 40% (2 von 5 Mäusen) der Mäuse hemmt oder vermindert in (**Abb. 11, C**). Die Autoantikörper-Titer gegen CII erreichten den üblichen Höhepunkt um den Tag 40 (**Abb. 8, C**) nach der primären Immunisierung (**Abb. 11, B**). Jedoch war der Abfall der Autoantikörper-Konzentrationen deutlich beschleunigt gegenüber den bisherigen Beobachtungen (**Abb. 11, B**).

In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass die anti-CD137 Ak-Behandlung eine deutliche Wirkung auf den Verlauf der induzierten Arthritis und auf die Autoantikörper-Konzentrationen hat, auch noch nach Initialisierung der Autoimmunreaktion und in einem bereits ablaufenden Autoimmunprozess. Diese Ergebnisse weisen auf einen eventuellen therapeutischen Nutzen einer derartigen Behandlung hin.

### **III. 1.5 Gelenkshistologie nach anti-CD137 Ak-Behandlung**

Um nicht nur den klinischen, sondern auch den morphologischen Nachweis zu führen, dass die Arthritis in den Gelenken gehemmt wurde, sind zusätzliche histologische Untersuchungen durchgeführt worden. Es wurden DAB/1 Mäuse immunisiert mit bCII und entweder nicht behandelt oder behandelt mit anti-CD137 Ak. Am Tag 89 nach der primären Immunisierung wurden die Mäuse getötet und die Gelenke histologisch auf Zeichen einer Arthritis untersucht.

Es zeigte sich in den histopathologischen Untersuchungen der Gelenke von unbehandelten Tieren mit Zeichen einer Arthritis (Arthritis Score 10) eine Zerstörung des Knorpels mit deutlicher Synovia-Proliferation und Fibroblasten-Infiltration (**Abb. 12, B**). Im Gegensatz dazu zeigten die Gelenke, die mit anti-CD137 Ak behandelt wurden, nur minimale strukturelle Veränderungen (**Abb. 12, C**) und waren vergleichbar mit Gelenken von nicht-immunisierten und nicht-behandelten Tieren (**Abb. 12, A**). In dieser Untersuchung zeigte sich, dass durch den Antikörper gegen CD137 nicht nur die klinischen Zeichen der Arthritis und die Autoantikörper Produktion, sondern auch sehr deutlich die morphologischen Veränderungen in den Gelenken während einer Arthritis gehemmt werden können.



### Abbildung 12: CD137 Ak schützt die Gelenke vor der Arthritis.

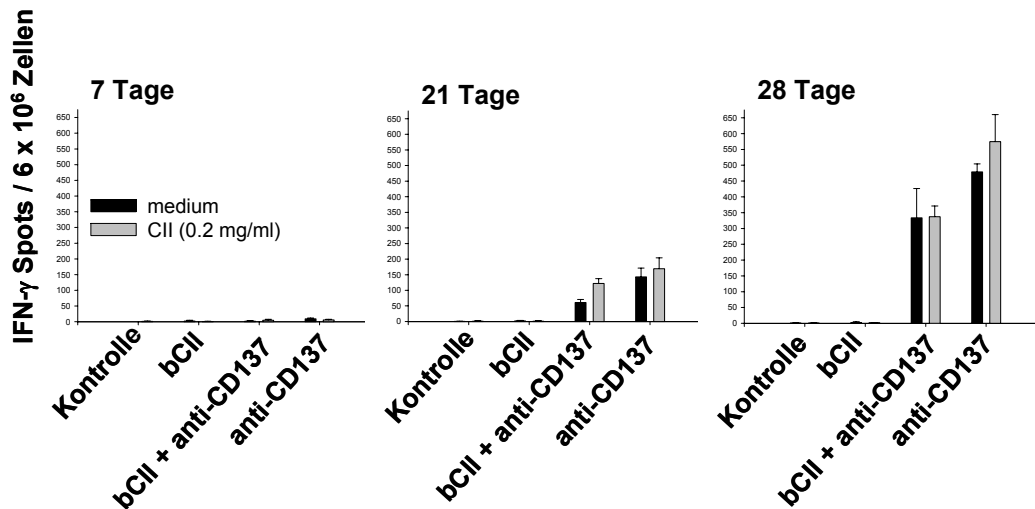
DBA/1J Mäuse wurden entweder nicht-immunisiert/behandelt (a) oder mit bCII immunisiert (Tag 0 und 21) und mit drei Injektionen (Tag 0, 6 und 21) des anti-CD137-Ak behandelt (c) oder nicht weiter behandelt (b). Am Tag 89 nach der primären Immunisierung wurden die Mäuse getötet und anschließend von den Gelenken histologische Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin und Eosin angefärbt. Es zeigten sich keine strukturellen Veränderungen in den nicht-immunisierten und behandelten Tieren (a) und in den Tieren, die mit dem Antikörper gegen CD137 behandelt wurden (c). Jedoch zeigten sich in den immunisierten Tieren, die nicht behandelt wurden, deutliche Zeichen der Zerstörung der Oberfläche des Knorpels und Proliferation von Knorpelzellen (b). In dem umgebenden Gewebe zeigten sich zusätzlich noch eine Infiltration und Proliferation von Fibroblasten und Zeichen der Synovialproliferation (Pfeil, b). Dargestellt ist ein Versuch, repräsentativ von drei unabhängig durchgeführten Versuchen. Vergrößerung x 40, Hämatoxylin und Eosin Färbung, C = Knorpel/Knorpelzellen; JS = Gelenkspalt, S = Synovia.

### III. 1.6 Milz-Zellen aus anti-CD137 Ak-behandelten Tieren produzieren erhöhte Mengen an IFN- $\gamma$ .

Die bisherigen Ergebnisse in den einzelnen Experimenten zeigten, dass ein agonistischer Antikörper gegen CD137 die Entwicklung einer Arthritis und die Autoantikörper-Produktion sehr effizient hemmen und auch eine Toleranz gegen das die Krankheit auslösende Antigen induzieren kann. Eine Stimulation des CD137-Rezeptors durch einen agonistischen Antikörper führt zur Aktivierung von hauptsächlich CD8<sup>+</sup> und in geringerem Maße von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und in Folge zur vermehrten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  (127, 165). Außerdem wurde vermutet, dass der Effekt einer Behandlung mit einem Antikörper gegen den CD137 Rezeptor durch erhöhte Produktion von IFN- $\gamma$  und eine Aktivierung von Makrophagen und Granulozyten vermittelt ist, welche zu einer Depletion von autoreaktiven B-Zellen führt (172). Aufgrund dieser Beobachtungen untersuchten wir die IFN- $\gamma$  Produktion von Zellen aus der Milz zu



unterschiedlichen Zeitpunkten nach Immunisierung mit bCII und Behandlung mit einem anti-CD137 Ak.

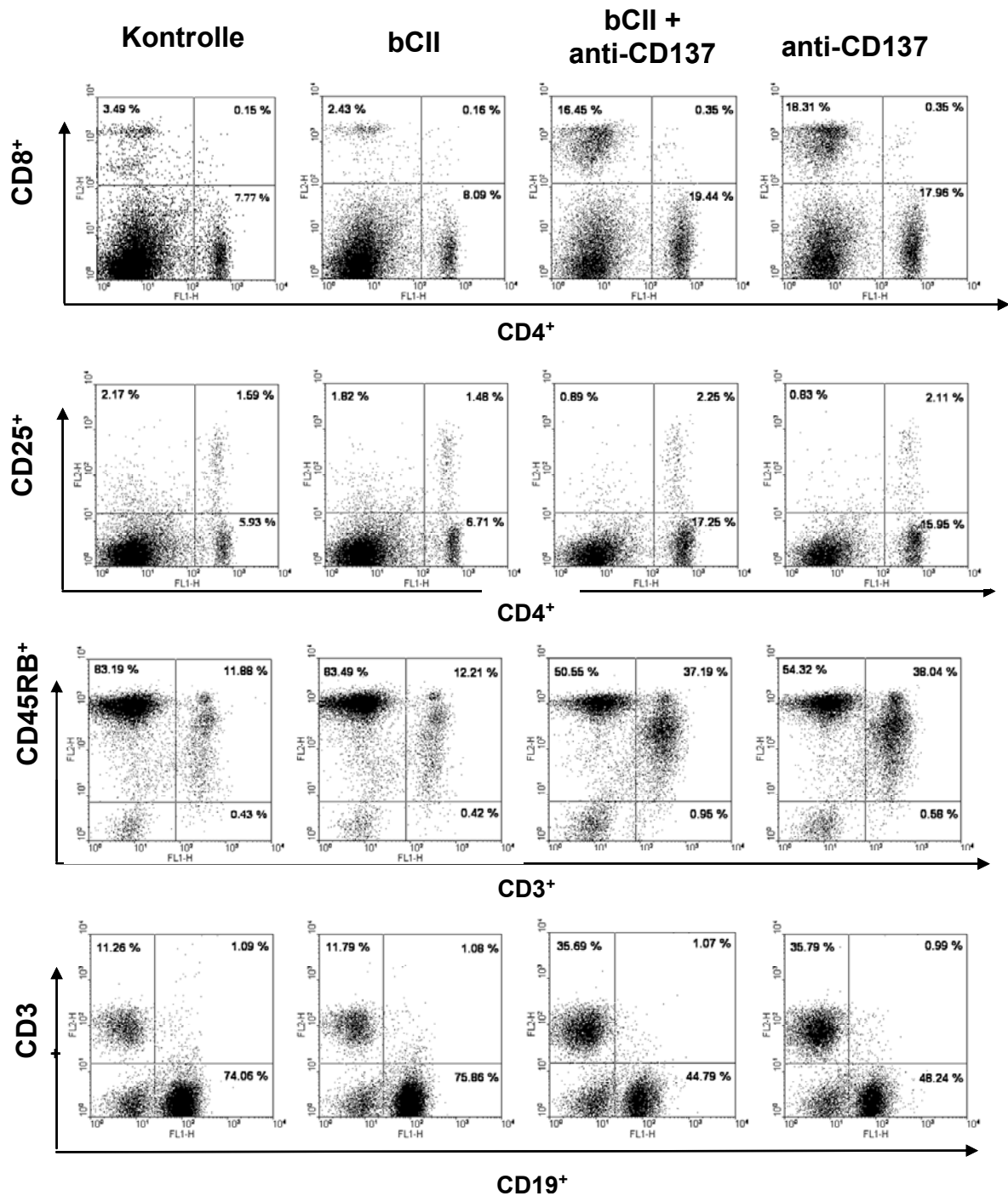


**Abbildung 13: CD137 Ak-Behandlung induziert IFN- $\gamma$  Produktion in Zellen aus der Milz.** DBA/1J Mäuse wurden entweder ohne Immunisierung mit dem anti-CD137 Ak (anti-CD137) behandelt oder mit bCII immunisiert (Tag 0 und 21) und nicht weiter behandelt (bCII) oder mit drei Injektionen (Tag 0, 6 und 21) eines Kontroll-Ak (Kontrolle) oder mit dem anti-CD137-Ak (bCII + anti-CD137) behandelt. An den Tagen 7, 21 und 28 wurden die Tiere getötet und eine Zellsuspensionen aus der Milz gewonnen zur weiteren Analyse der IFN- $\gamma$  Produktion mit Hilfe der ELISpot Analyse, wie unter Material und Methoden beschrieben. Milzzellen wurden in Anwesenheit (graue Säulen) oder in Abwesenheit (schwarze Säulen) von bCII (0,2mg/ml) kultiviert. Werte entsprechen den Mittelwerten  $\pm$  des SEM („standard error of the mean“) der gezählten Spots (spots/6 x 10<sup>5</sup> Zellen). Gezeigt wird ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

Die in der **Abbildung 13** dargestellten Untersuchungen zeigten, dass, unabhängig von der Immunisierung mit bCII, die Zellen aus der Milz nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung sehr stark IFN- $\gamma$  produzieren. Dieser Effekt war sogar noch ausgeprägter in den Zellen aus nicht immunisierten Mäusen (**Abb. 13**).

### III. 1.7 Anti-CD137 Ak-Behandlung erhöht Anzahl CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen

Um weitere Hinweise über mögliche zelluläre Wirkungsmechanismen zu erlangen, wurden weitere Untersuchungen durchgeführt zur Klärung, ob einzelne T-Zellen (CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup>) oder auch B-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung aktiviert oder eventuell depletiert werden. Aus diesem Grund wurden DAB/1 Mäuse immunisiert und entweder mit anti-CD137 Ak oder Kontroll-Ak behandelt (**III.1.4**). Anschließend wurden die unterschiedlichen Lymphozyten-Populationen mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht (vgl. Material und Methoden).



**Abbildung 14: CD137 Ak erhöht die relative Anzahl der CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen.**

DBA/1J Mäuse wurden entweder ohne Immunisierung mit dem anti-CD137 Ak (anti-CD137) behandelt oder mit bCII immunisiert (Tag 0 und 21) und nicht weiter behandelt (bCII) oder mit drei Injektionen (Tag 0, 6 und 21) eines Kontroll-Ak (Kontrolle) oder mit dem anti-CD137-Ak (bCII + anti-CD137) behandelt. Am Tag 28 nach der primären Immunisierung wurden die Tiere getötet und Zellsuspensionen aus der Milz hergestellt mit anschließender Färbung und Analyse mit Hilfe der Durchflußzytometrie, wie unter Material und Methoden beschrieben. Die Nummern in den Quadranten repräsentieren die prozentualen Anteile der einzelnen Lymphozyten-Populationen in der Analyse. Gezeigt wird ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

	Alle	CD3 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD3 <sup>+</sup> CD45 <sup>+</sup> RB <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup>	CD19 <sup>+</sup>
<b>Kontrolle</b>	54 ± 14	6,5 ± 1,9	2 ± 0,5	4,2 ± 1,1	6,4 ± 8,1	0,9 ± 0,2	40 ± 10,1
<b>bCII</b>	57 ± 4	6,7 ± 1,6	1,4 ± 0,1	4,6 ± 0,1	7 ± 0,2	0,8 ± 0,1	43,2 ± 1,6
<b>bCII + CD137-Ak</b>	100 ± 18	37,2 ± 7	16,5 ± 3	19,5 ± 4	37,2 ± 7	2,3 ± 0,4	44,8 ± 8,4
<b>CD137-Ak</b>	90 ± 10	34,2 ± 4	16,5 ± 2	16,2 ± 2	34,2 ± 4	1,9 ± 0,2	43,4 ± 5

**Tabelle 2: Effekt der anti-CD137 Ak-Behandlung auf die absolute Anzahl der Lymphozyten in der Milz.**

Versuchsaufbau des Experiments, wie unter Abb. 14 beschrieben. Am Tag 28 wurde mit Hilfe des prozentualen Anteils der einzelnen Lymphozyten-Populationen und der Zählung der Gesamtzahl der Lymphozyten in der Milz die absolute Anzahl der Lymphozyten-Population in der Milz ermittelt. Werte entsprechen den Mittelwerten ± der SD ( $\times 10^6$  Zellen/ $\mu$ l). Gezeigt wird ein Versuch, repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Versuche.

Die in der **Abbildung 14** und **Tabelle 2** dargestellten Untersuchungen zeigten, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung die relative und absolute Anzahl der T-Zellen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>) in der Milz der Tiere erhöhte (**Abb. 14, Tab. 2**). Diese Erhöhung war ausgeprägter in der CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Population als im Vergleich zu der CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Population. Außerdem stieg die Anzahl der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz nach Gabe eines Antikörpers gegen CD137. Im Gegensatz dazu verminderte sich der prozentuale Anteil der B-Zellen, wobei aber die absolute Anzahl der B-Zellen in der Milz unverändert blieb (**Abb. 14, Tab. 2**). Diese Veränderungen in der Zusammensetzung der Lymphozyten-Populationen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung war unabhängig von einer primären Immunisierung mit bCII. Die dargestellten Untersuchungen zeigten eine ausgeprägte Wirkung des Antikörpers gegen den CD137 Rezeptor auf die absolute und relative Anzahl der T-Zellen und keinen Effekt auf die B-Zellen und Makrophagen- (nicht dargestellt) Population. Von äußerstem Interesse war der geringe Anstieg der regulatorischen T-Zellen-(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) Population in den dargestellten Untersuchungen.

### **III. 2 Wirkung eines agonistischen Ak gegen CD137 in einem Mausmodell für den Systemischen Lupus Erythematoses (SLE)**

Eine gestörte B-Zell-Funktion mit Produktion von T-Zell-abhängigen Autoantikörpern und die Entwicklung einer Immunkomplex-Glomerulonephritis sind Merkmale des SLE beim Menschen sowie in dem NZB/W F<sub>1</sub> Tiermodell. Das Tiermodell für den

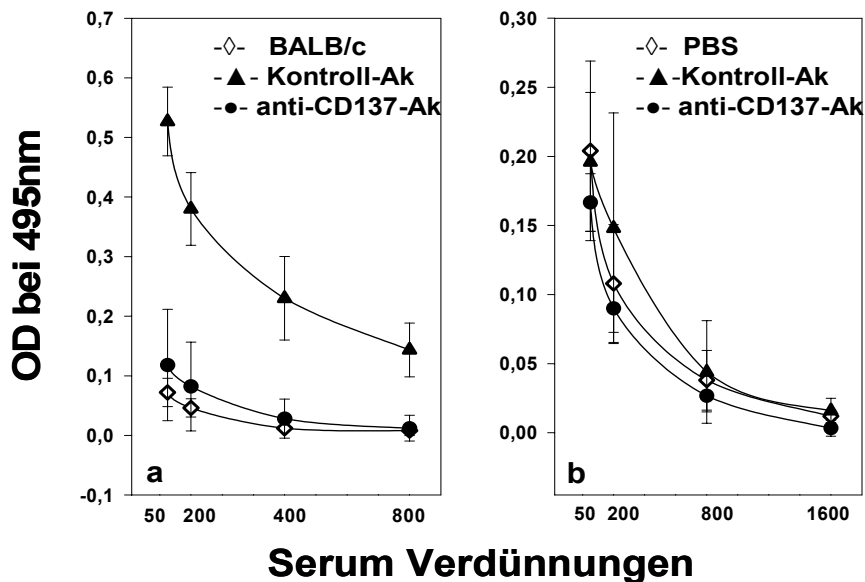
SLE unterscheidet sich wesentlich von dem CIA Tiermodell. NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse entwickeln ohne vorangegangene Immunisierung oder Behandlung eine im wesentlichen vergleichbare Erkrankung zur SLE beim Menschen. Aufgrund der genetischen Pathogenese des SLE bei NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen und der bekannten Wirkung des anti-CD137 Antikörpers auf die zelluläre und humorale Immunantwort war es von Interesse, ob eine Immuntherapie mit anti-CD137 Antikörper die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse vor der Entwicklung und eventuell sogar vor der Progression der Erkrankung, vergleichbar den Ergebnissen im CIA-Modell, schützt (127, 129). Aus diesem Grunde wurden unterschiedliche Altersgruppen von NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen mit dem Antikörper gegen den CD137 Rezeptor behandelt. Außerdem wurden histologische und immunhistologische Untersuchungen durchgeführt zur Klärung, ob eine Behandlung mit anti-CD137 Ak die morphologischen Veränderungen und Immunkomplex-Ablagerungen in den Nieren hemmen kann. Die in diesem Kapitel dargestellten Untersuchungen sollten auch mehr Hinweise bringen über den möglichen Wirkungsmechanismus der Immuntherapie mit einem anti-CD137 Antikörper. Es wurden vor allem Zell-Transfer-Experimente durchgeführt, um zu klären, welche Zellen das primäre Ziel der anti-CD137 Ak-Behandlung sind. Des Weiteren wurden Durchflußzytometer- und ELISpot-Analysen durchgeführt zu Ausschluss oder Bestätigung der erzielten zellulären Effekte in dem CIA-Tiermodell.

### **III. 2.1 Anti-CD137 Antikörper hemmt die Produktion von IgG-, aber nicht von IgM- Autoantikörpern gegen dsDNA in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen**

In diesen Experimenten wurden NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse jede 3. Woche zwischen der 14. und 26. Lebenswoche mit anti-CD137 oder Kontroll-Antikörper behandelt. Anschließend wurden bei den Mäusen die IgM- und IgG-Autoantikörper-Konzentrationen gegen dsDNA (doppelsträngige DNA) im Serum gemessen (**Abb. 15**). In weiteren Experimenten wurden Mäuse in unterschiedlichen Altersgruppen mit anti-CD137 Ak oder Kontroll-Ak behandelt. Es wurden Mäuse in der 8. Lebenswoche (einmalige Injektion), zwischen der 8. und 26. Lebenswoche und zwischen der 26. und 35. Lebenswoche alle 3 Wochen behandelt (**Abb. 16**).

Die in der Abbildung 15 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass durch die anti-CD137 Ak-Behandlung die Produktion von anti-dsDNA IgG-Autoantikörpern drastisch gesenkt bzw. verhindert wurde (**Abb. 15, a**). Jedoch hatte die anti-CD137 Ak-Behandlung keinen Einfluss auf die Produktion von IgM anti-dsDNA Autoantikörpern

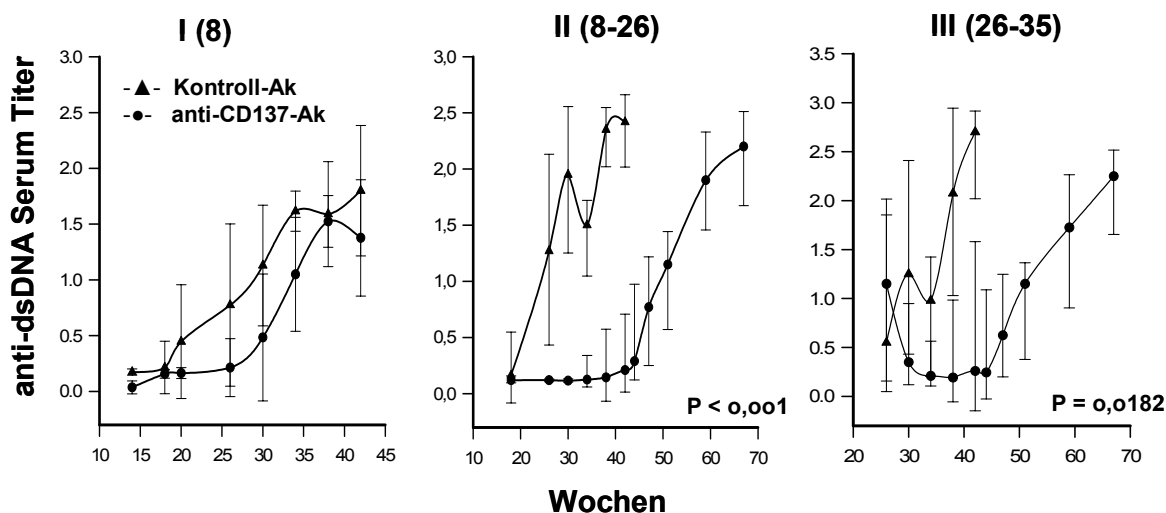
(Abb. 15, b). Dieses Ergebnis war im Einklang mit früheren Beobachtungen, die zeigten, dass durch Injektion von anti-CD137 Ak der klassische CD4<sup>+</sup> T-Zellen abhängige „Immunglobulin-Switch“ von IgM zu IgG gehemmt werden kann (129). Aufgrund dieser Ergebnisse wurden weiterführende Experimente mit Behandlung von Tieren in unterschiedlichen Altersgruppen durchgeführt.



**Abbildung 15: Hemmung von IgG- aber nicht IgM-Autoantikörper-Produktion durch anti-CD137 Ak**

NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse (n=5) wurden zwischen der 14. und 26. Lebenswoche mit anti-CD137 (●) oder mit Kontroll-Ak (▲) behandelt. In der 40. Lebenswoche Messung der IgG- und IgM-Autoantikörper gegen dsDNA mit einem ELISA für anti-dsDNA Antikörper im Serum der Tiere. Dargestellt sind die IgG- (a) und IgM- (b) Autoantikörper-Titer im Vergleich mit unterschiedlichen unbehandelten Kontrollen (◇, Serum von BALB/c Mäusen und Injektion von PBS). Werte sind aufgetragen als Mittelwert ± SD der OD bei 490 nm von dreifach Bestimmungen und unterschiedlichen Serumverdünnungen. Gezeigt wird ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

Die in der **Abbildung 16** dargestellten Versuche zeigen, dass eine einzige Injektion des anti-CD137 Ak in der 8. Lebenswoche zu einer Verzögerung des Nachweises von anti-dsDNA Autoantikörpern im Serum von NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen führt im Vergleich zu den Kontroll-Ak behandelten Tieren (**Abb. 16,I**). Jedoch führte die Behandlung mit mehreren Injektionen von anti-CD137 Ak ab der 8. Lebenswoche (alle 3 Wochen, 7 Injektionen) zu einer drastischen, signifikanten Reduzierung der anti-dsDNA Autoantikörper-Konzentrationen im Serum von NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen (**Abb. 16, II**). Im Vergleich zu 30 Wochen alten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen, die mit Kontroll-Ak behandelt wurden, erreichten anti-CD137 Ak behandelte NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse erst in der 70. Lebenswoche vergleichbare Autoantikörper-Konzentrationen im Serum. Das war ca. 30 Wochen nach der letzten anti-CD137 Ak-Gabe (**Abb. 16, II**).



**Abbildung 16: Anti-CD137 Ak hemmt anti-dsDNA Autoantikörper Produktion in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen.**

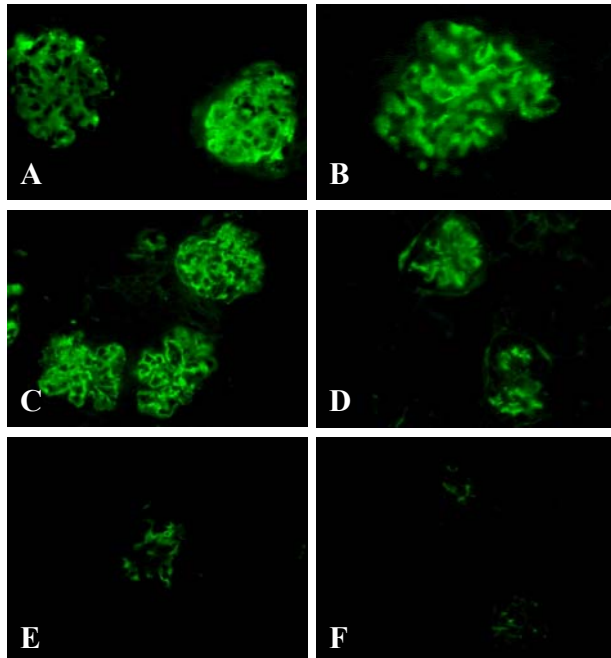
NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse (n=10) wurden entweder einmalig in der 8. Lebenswoche (I), zwischen der 8. und 26. Lebenswoche (II) oder ab der 26. Lebenswoche (III) alle 3 Wochen mit anti-CD137 Ak (●) oder mit Kontroll-Ak (▲) behandelt. Vor und nach Beginn der Behandlung wurde im Serum der NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse mit Hilfe der ELISA Methode kontinuierlich über den Beobachtungszeitraum der IgG-Autoantikörper-Titer gegen dsDNA gemessen. Werte sind aufgetragen als Mittelwert ± SD der OD bei 490 nm (Serum Verdünnung 1:100) von den einzelnen Versuchstieren in den verschiedenen Gruppen.

Es ist bekannt, dass die Manifestation der Erkrankung in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen mit nachweisbar hohen Autoantikörper-Konzentrationen gegen dsDNA im Serum ca. im 4. bis 5. Lebensmonat eintritt (168, 187). In den folgenden Untersuchungen wurde nun getestet, ob eine anti-CD137 Ak-Behandlung auch noch nach Manifestation der Erkrankung effizient sein kann. Aus diesem Grunde wurden 26 Wochen alte NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse bis zur 35. Lebenswoche jede 3. Woche mit anti-CD137 Ak behandelt (insgesamt 4 Injektionen). Es zeigte sich in diesen Untersuchungen, dass durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung die erhöhten Autoantikörper-Konzentrationen signifikant gesenkt werden konnten im Vergleich zu Tieren die mit Kontroll-Ak behandelt wurden (**Abb. 16, III**). Dieses Ergebnis deutet auf eine kontinuierlich benötigte T-Zellen-Hilfe für die Aufrechterhaltung der Produktion von Autoantikörpern gegen dsDNA in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen hin.

### III. 2.2 Anti-CD137 Ak hemmt die Entwicklung einer Immunkomplex Glomerulonephritis in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen

Ungefähr 95% der nicht behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse entwickeln im Laufe ihres Lebens eine Glomerulonephritis und der Nachweis von Immunkomplexen in den Nierenkörperchen (Glomeruli) der Nieren ist mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz-Methode möglich. Aufgrund dieser Tatsache wurden Experimente

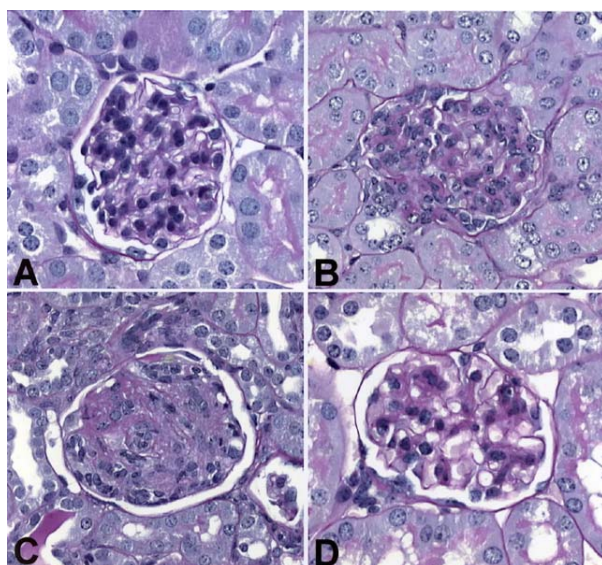
durchgeführt zum Nachweis der Wirkung des anti-CD137 Ak zum einen auf die Immunkomplex-Ablagerungen (**Abb. 17**) und zum anderen auf mögliche pathologische, morphologische Veränderungen (**Abb. 18**) in den Nieren im Vergleich zu Kontroll-Ak-behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen.



#### **Abbildung 17: Anti-CD137 Ak blockiert Immunkomplexablagerungen**

Dargestellt sind Glomeruli von 35 Wochen (**A, C, E**) und 45 Wochen (**B, D, F**) alten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen, welche entweder nicht behandelt (**A, B**), zwischen der 14. und 26. Lebenswoche alle 3 Wochen mit Kontroll-AK (**C, D**) oder mit anti-CD137 Ak (**E, F**) behandelt wurden. Anschließend Färbung der Nierenschnitte, wie unter Material und Methoden beschrieben und mit dem Fluoreszenzmikroskop bei 20-facher Vergrößerung dokumentiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch, aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

In diesen Versuchen zeigte sich, dass nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung über einen längeren Beobachtungszeitraum keine Immunkomplex-Ablagerungen nachgewiesen wurden (**Abb. 17, E, F**) im Vergleich zu unbehandelten (**Abb. 17, A, B**) und Kontroll-Ak (**Abb. 17, C, D**) behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen.



#### **Abbildung 18: Anti-CD137 Ak hemmt Glomerulonephritis**

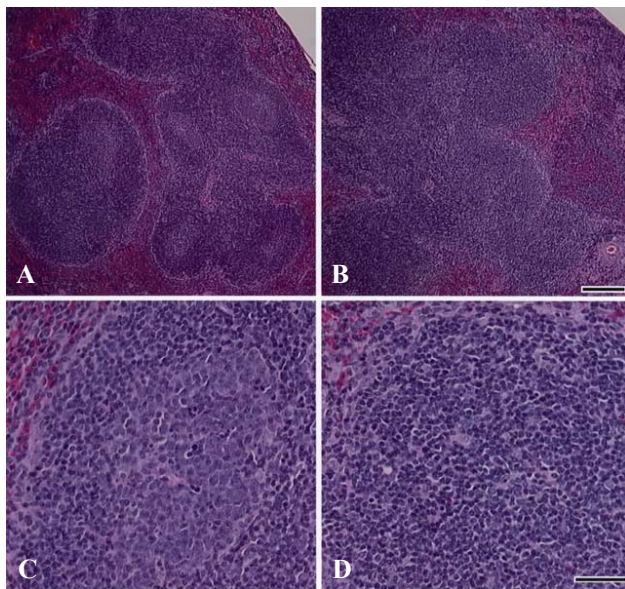
Dargestellt sind Glomeruli von einer 40 Wochen alten BALB/c Maus (**A**) und von NZB/W F<sub>1</sub> (**B, C, D**) Mäusen welche entweder nicht behandelt (**B**), zwischen der 14. und 26. Lebenswoche, alle 3 Wochen, mit Kontroll-AK (**C**) oder mit anti-CD137 Ak (**D**) behandelt wurden. Anschließend Färbung der Nierenschnitte mit H&E, wie unter Material und Methoden beschrieben, und mit dem Lichtmikroskop bei 20-facher Vergrößerung dokumentiert. Gezeigt ist ein repräsentativer Versuch, aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Dies spiegelte sich auch in den histologischen Untersuchungen der Glomeruli von NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen durch die fehlende Pathologie einer Glomerulonephritis

(Proliferation von Mesangiumzellen, Infiltration von Lymphozyten...) nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung (**Abb. 18, D**) im Vergleich zu den unbehandelten (**Abb. 18, B**) und den Kontroll-Ak behandelten (**Abb. 18, C**) NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen. Die Morphologie der Glomeruli nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung ist eher vergleichbar mit normalen BALB/c Kontroll-Tieren (**Abb. 18, A**),

### III. 2.3 Anti-CD137 Ak blockiert die Formation von Keimzentren („germinal center“) in der Milz bei NZB/W F1 Mäusen

Die Formation von Keimzentren und Reifung von B-Zellen erfolgt in sekundären lymphatischen Organen wie in der Milz.



#### Abbildung 19: Anti-CD137 Ak blockiert Keimzentren-Bildung

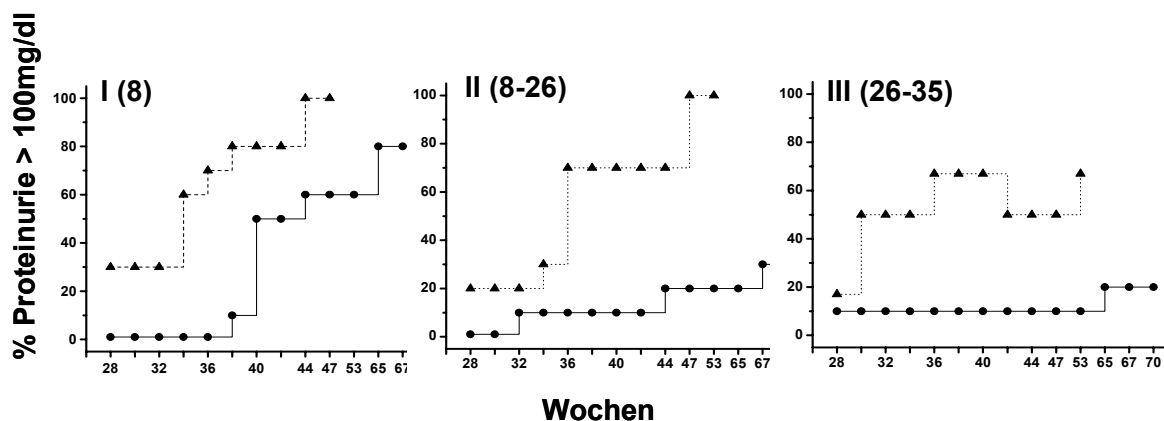
Dargestellt sind NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse, welche zwischen der 14. und 26. Lebenswoche alle 3 Wochen entweder mit Kontroll-AK (**A, C**) oder mit anti-CD137 Ak (**B, D**) behandelt wurden. Anschließend Färbung der Milz mit H&E, wie unter Material und Methoden beschrieben, und mit dem Lichtmikroskop bei 20-facher (**A, B**) und 40-facher (**C, D**) Vergrößerung fotografiert und dokumentiert. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

In diesen Keimzentren erhalten B-Zellen Reifungssignale von unter anderem T-Zellen und unterziehen sich dem Immunglobulin-Klassen-Wechsel mit anschließender Produktion von mehr Antigen spezifischen IgG Antikörpern (87). Die Formierung von Keimzentren ist ein zentraler Prozess in der Reifung von B-Zellen zu funktionellen, reifen B-Zellen (Plasmazellen), welche unabhängig von T-Zellen Antikörper produzieren und sezernieren (6). Aufgrund dieses Zusammenhangs untersuchten wir die Milz auf Formierung von Keimzentren von anti-CD137 Ak und Kontroll-Ak behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen (**Abb. 19**). In dieser Untersuchung zeigte sich, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung komplett die Formierung von Keimzentren in der Milz hemmt (**Abb. 19, b, d**), im Vergleich zu den multiplen Keimzentren, die in Kontroll-Ak (**Abb. 19, a, c**) behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen gefunden wurden.



### III. 2.4 Anti-CD137 Ak schützt die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse vor Entwicklung einer Proteinurie

Zum weiteren Verständnis der Effekte einer anti-CD137 Ak-Behandlung auf die Progression der Erkrankung in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen untersuchten wir quantitativ die Proteinurie in Kontroll-Ak- oder anti-CD137 Ak-behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen. Es wurden Mäuse in der 8. Lebenswoche (einmalige Injektion), zwischen der 8. und 26. Lebenswoche und zwischen der 26. und 35. Lebenswoche wie unter II. 2.1 behandelt. Anschließend wurde wöchentlich kolormetrisch mit Hilfe von speziellen Urinstix (siehe Material und Methoden) die Proteinurie bei den Mäusen bestimmt (**Abb. 20**).



**Abbildung 20: Anti-CD137 Ak hemmt die Entwicklung einer Proteinurie in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen.**

NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse (n=10) wurden entweder einmalig in der 8. Lebenswoche (I), zwischen der 8. und 26. Lebenswoche (II) oder ab der 26. Lebenswoche (III) alle 3 Wochen mit anti-CD137 Ak (●) oder mit Kontroll-Ak (▲) behandelt. Nach Beginn der Behandlung wöchentlich Bestimmung der Proteinurie mit Hilfe einer speziellen Urinstix-Methode. Werte sind aufgetragen als % der Mäuse mit einer Proteinurie > 100mg/dl.

Die in der **Abbildung 20** dargestellten Ergebnisse zeigten, dass bereits eine einzige Injektion des anti-CD137 Ak die Entwicklung einer Proteinurie verzögert im Vergleich zu den Kontroll-Ak-behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen (**Abb. 20, I**). Dieser Effekt war noch ausgeprägter, wenn die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse multiple anti-CD137 Ak Injektionen bekamen. In diesen Mäusen wurde die Entwicklung der Proteinurie fast vollständig gehemmt im Vergleich zu Kontroll-Ak-behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen (**Abb. 20, II**). Ein nicht in diesem Ausmaß zu erwartender Effekt wurde erzielt in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen, welche erst nach Beginn der Erkrankung und Produktion von anti-dsDNA Autoantikörper mit anti-CD137 Ak behandelt wurden (**Abb. 20, III**). Die anti-CD137 Ak-Behandlung hemmte fast vollständig und über einen längeren Zeitraum hinaus

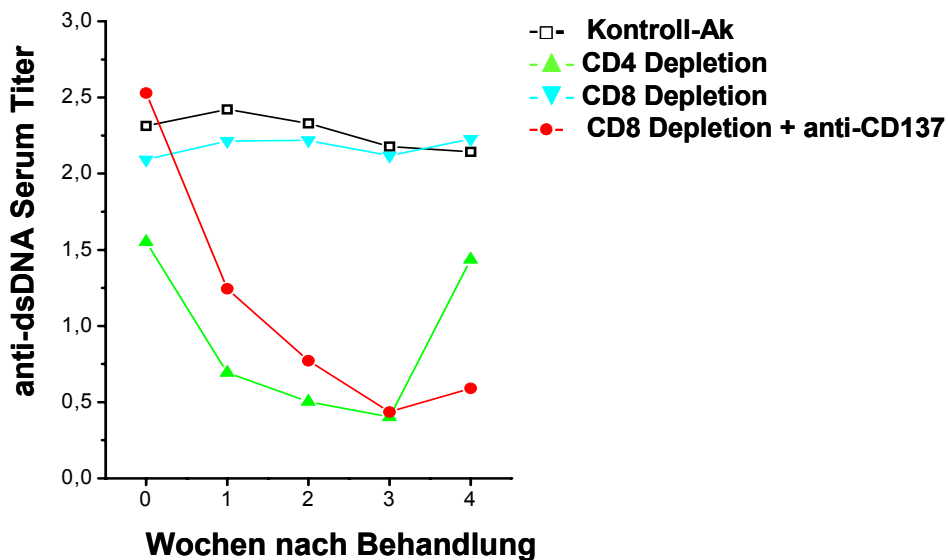
die Entwicklung einer Proteinurie in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen im Vergleich zu den Kontroll-Ak behandelten Tieren (**Abb. 20,III**). Diese Ergebnisse waren in guter Übereinstimmung mit der anti-CD137 Ak-Wirkung auf die Produktion von anti-dsDNA Autoantikörper in den verschiedenen Behandlungsgruppen (**Abb. 16**).

### **III. 2.5 Eine anti-CD137 Ak-Behandlung führt zu einer Einschränkung der Funktion von CD4<sup>+</sup> Helfer T-Zellen und nicht von CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Vorangegangene Studien zeigten, dass die Hemmung der humoralen Immunantwort nach einer anti-CD137 Behandlung durch eine Anergie von CD4<sup>+</sup> Helfer T-Zellen hervorgerufen wird (129). Des Weiteren zeigten Wofsy und Kollegen, dass durch Behandlung mit einem Antikörper, der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen depletiert, sehr effizient die Induktion einer Erkrankung gehemmt werden kann (200, 202). Um den Effekt einer anti-CD137 Ak-Behandlung auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen weiter zu untersuchen, wurde bei NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen eine in vivo Depletion von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen (siehe Material und Methoden) durchgeführt und anschließend die Autoantikörper-Konzentration im Serum bestimmt.

Die in der **Abbildung 21** dargestellten Ergebnisse zeigten, dass eine CD4<sup>+</sup> T-Zellen Depletion zu einem raschen Abfall der Autoantikörper-Konzentrationen führte (**Abb. 21**). Der Abfall der Autoantikörper-Konzentration gegen dsDNA nach Entfernung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen war in diesen Versuchen vergleichbar mit der Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung, wenn auch von geringerer Dauer (**Abb. 21**). Eine CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Depletion hatte keine Wirkung auf die anti-dsDNA Autoantikörper-Konzentrationen in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen (**Abb. 21**).

Um der Frage nachzugehen, ob CD8<sup>+</sup> T-Zellen einen Einfluss auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen haben und die Wirkung des anti-CD137 Ak eventuell über CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt wird, wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen durch Ak-Behandlung entfernt und anschließend mit anti-CD137 Ak behandelt. In diesem Versuch zeigte eine vorangegangene CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Depletion keinen Einfluss auf die anti-CD137 vermittelte Hemmung der anti-dsDNA Autoantikörper-Produktion in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen (**Abb. 21**). Diese Ergebnisse bestätigten die Ergebnisse von vorangegangenen Studien, die zeigten, dass eine Hemmung der T-Zell-abhängigen humoralen Immunantwort durch anti-CD137 Ak auch in Mäusen möglich ist, welche keine funktionellen CD8<sup>+</sup> T-Zellen ( $\beta_2$ -defiziente Mäuse) besitzen (129).



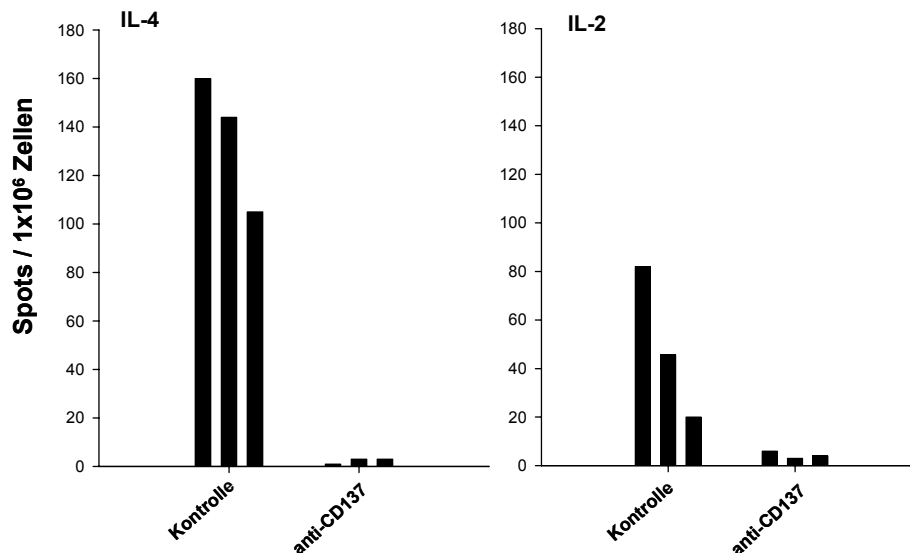
**Abbildung 21: Entfernung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, aber nicht von CD8<sup>+</sup> T-Zellen, hemmt die anti-dsDNA Autoantikörper-Produktion in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen**

In 40 Wochen alten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen (n=5) wurden entweder durch Antikörper Behandlung in vivo die CD4<sup>+</sup> (▲) oder die CD8<sup>+</sup> (▼) T-Zellen entfernt. Außerdem wurden NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse mit Kontroll-Ak (□) oder nach in vivo CD8<sup>+</sup> T-Zellen Depletion mit anti-CD137 Ak (●) behandelt. Vor und nach Beginn der Behandlung wurde im Serum der NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse mit Hilfe der ELISA Methode kontinuierlich über den angegebenen Beobachtungszeitraum der IgG-Autoantikörper-Titer gegen dsDNA gemessen. Werte sind aufgetragen wie unter Abbildung 16. Dargestellt ist ein repräsentativer Versuch, aus drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

### III. 2.6 Anti-CD137 Ak-Behandlung hemmt die IL-2 und IL-4 Produktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen

Die Entwicklung einer humoralen Immunantwort kann durch Th<sub>1</sub>- oder Th<sub>2</sub>-Zytokine reguliert werden. Wie bereits erwähnt kann eine Stimulation des CD137-Rezeptors durch einen agonistischen Antikörper zur vermehrten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-2, IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ , führen (127, 129, 165). Jedoch konnte auch gezeigt werden, dass Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch CD137Ligand zu einer vermehrten in vitro Produktion von für die T-Zellen-Aktivierung und Antikörper-Produktion essentiellen Zytokinen, wie IL-2 und IL-4 führt (18). Aus diesem Grund untersuchten wir die Zytokine-Produktion von NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen vor und nach einer Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137.

In diesen Versuchen beobachteten wir in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen eine erhöhte Interleukin-4 (IL-4) und Interleukin-2 (IL-2) Produktion von hauptsächlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den ersten 9 Lebensmonaten. Nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung stellten die CD4<sup>+</sup> T-Zellen diese IL-4 und IL-2 Produktion ein, ohne zu einem Th1 Phänotyp (Produktion von IFN- $\gamma$ ) zu wechseln (**Abb. 22**).



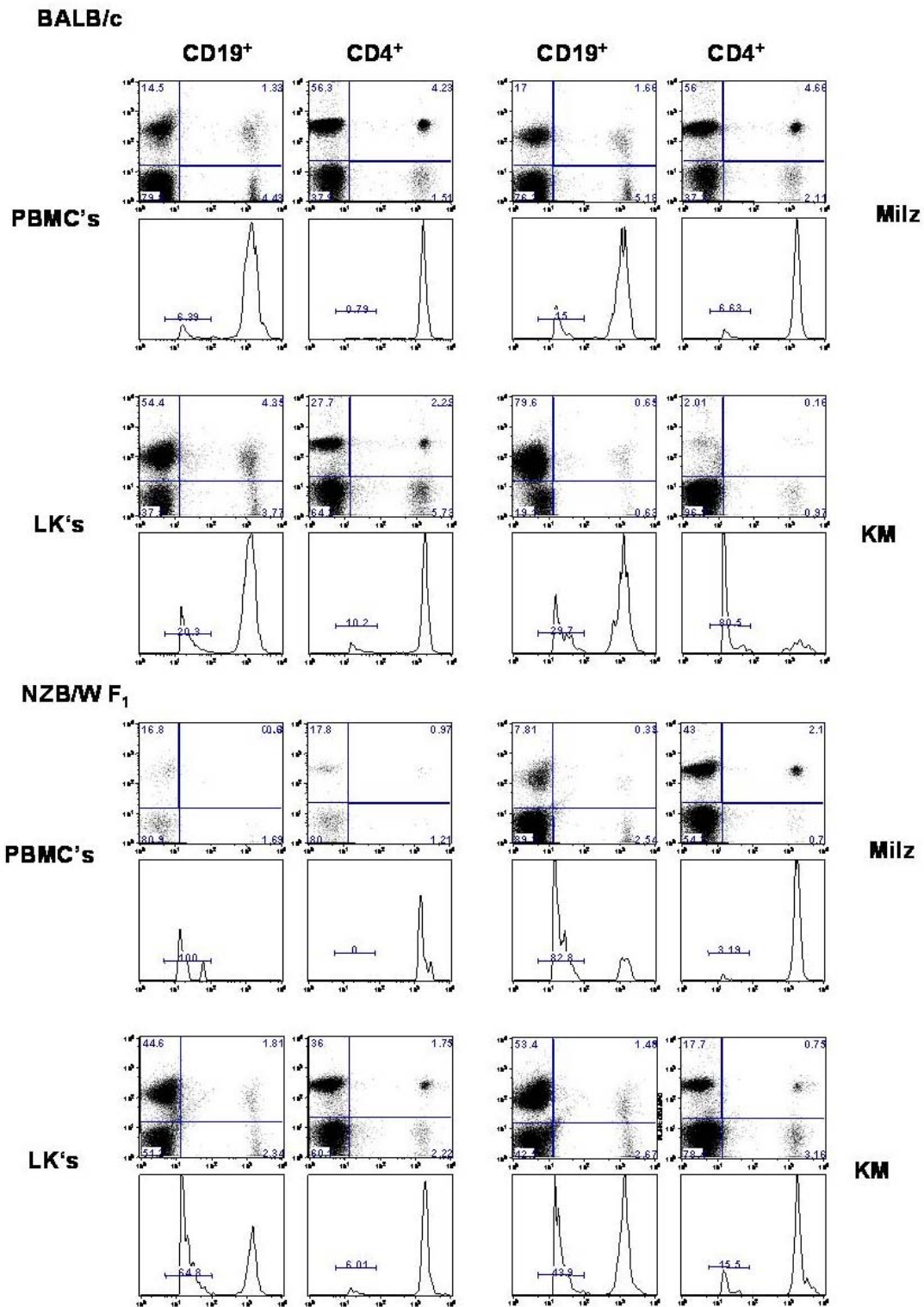
### Abbildung 22: Anti-CD137 Ak hemmt IL-2 und IL-4 Produktion

Dargestellt sind NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse, die in der 20. Lebenswoche einmalig entweder mit Kontroll-Ak oder mit anti-CD137 Ak behandelt wurden. Anschließend wurde nach 5 Tagen mit Zellen aus der Milz und den Lymphknoten ELISpot-Assays durchgeführt auf Produktion von IL-2 und IL-4. Dargestellt ist die Zytokin-Produktion von einzelnen Mäusen. Versuch ist repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

### III. 2.7 Verkürzte Lebenszeit von NZB/W F<sub>1</sub> CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen.

Die bisherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass B-Zellen in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen kontinuierlich T-Zellen-Hilfe benötigen, um die Autoantikörper-Produktion aufrecht zu erhalten. Eine mögliche Erklärung dieser Beobachtung könnte sein, dass T- und B-Zellen von NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen eine beschleunigte Erneuerungsrate haben und somit eine kontinuierliche T-Zellen-Hilfe bei der humoralen Immunantwort von neu produzierten B-Zellen in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen benötigt wird. Um Hinweise auf das Überleben und die Verteilung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen zu bekommen, wurden Transferexperimente mit CFSE gefärbten Zellen durchgeführt. Es wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus NZB/W F<sub>1</sub> und BALB/c Mäusen mit CFSE angefärbt und in gleichaltrige Mäuse injiziert. Anschließend wurden die Mäuse nach 3 Tagen post-Transfer getötet und mit Hilfe der Durchflußzytometrie wurden verschiedene Organe (PBMC, Milz, Lymphknoten und Knochenmark) untersucht auf CFSE gefärbte Zellen.

Die Ergebnisse- dargestellt in **Abbildung 23**, zeigen, dass CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen aus NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen im Vergleich zu normalen BALB/c Mäusen eine verkürzte Lebenszeit in der Blutzirkulation und in den untersuchten lymphatischen Organen besitzen (**Abbildung 23**). Außerdem konnte, im Gegensatz zu den BALB/c Mäusen, eine erhöhte Infiltration von CFSE positiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen und wenige



**Abbildung 23: Überleben und „Homing“ von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und CD19<sup>+</sup> B-Zellen**

T- und B-Zellen aus 26 Wochen alten BALB/c und NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen wurden mit dem Farbstoff CFSE gefärbt und anschließend in gleichaltrige BALB/c oder NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse injiziert. Nach 3 Tagen wurden die verschiedenen lymphatischen Organe (PBMC=Lymphozyten, Milz, LK=Lymphknoten, KM= Knochenmark) mit Hilfe der Durchflußzytometrie nach CFSE-positiven Zellen untersucht. Dargestellt ist die CFSE-Fluoreszenzintensität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD19<sup>+</sup> B-Zellen und der Verlust an CFSE-Fluoreszenzintensität (Histogramme) als Hinweis auf weitere Proliferation der CFSE-positiven Zellen. Der linke „Peak“ in den Histogrammen repräsentiert bereits tote oder absterbende Zellen. Dargestellt ein Versuch, repräsentativ für zwei unabhängig durchgeführte Versuche.

CD19<sup>+</sup> B-Zellen in den Nieren von NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

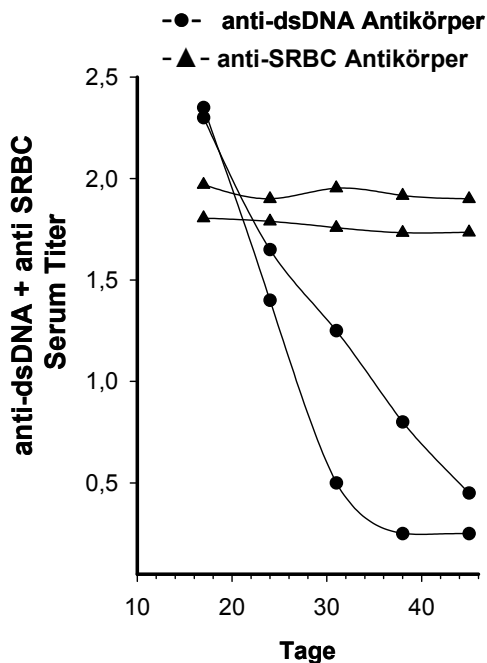
In weiteren Experimenten wurde die Möglichkeit untersucht, ob durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder B-Zellen direkt oder indirekt abgetötet werden. Es wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen aus NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen mit CFSE angefärbt und in gleichaltrige NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse transferiert. Während des Zeitpunktes des Transfers wurden die Mäuse entweder mit dem anti-CD137 Ak oder mit einem Kontroll-Ak behandelt. 5 Tage nach Transfer der Zellen wurden die Mäuse getötet und mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Prozentzahl der CFSE-gefärbten CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen in den verschiedenen lymphatischen Organen ermittelt. Diese Experimente ergaben keine Hinweise darauf, dass der Antikörper gegen CD137 CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder B-Zellen in vivo abtötet (Ergebnisse nicht dargestellt).

### **III. 2.8 Anti-CD137 Ak hemmt nicht eine bereits etablierte humorale Immunantwort gegen Fremdantigene.**

Frühere Berichte zeigten, dass die Hemmung einer T-Zellen abhängigen humoralen Immunantwort gegen Fremdantigene durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung nur zum Zeitpunkt des primären Antigen-Kontaktes möglich ist. Nach Abschluss der Bildung von spezifischen IgG-Ak (Immunglobulin Klassen Wechsel) hatte der anti-CD137 Ak keinen Einfluss mehr auf die Ak-Bildung (129). Unsere bisherigen Ergebnisse zeigten, dass die Gabe von anti-CD137 Ak zu einer Hemmung der Produktion von Autoantikörpern führt und in der Folge zu einer Hemmung der Autoimmunerkrankung, unabhängig vom Zeitpunkt der Applikation. Somit besteht ein wesentlicher Unterschied in der Wirkung des anti-CD137 Ak auf die Hemmung einer humoralen Immunantwort gegen Fremdantigene und Autoantigene. Aus diesem Grund untersuchten wir den Einfluss von anti-CD137 Ak auf die humorale Immunantwort gegen Fremdantigene in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen. NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse wurden mit Schafserythrozyten (SRBC) immunisiert und zu einem Zeitpunkt nach Vollendung des „Antigen priming“ mit anti-CD137 oder Kontroll-Ak behandelt. Anschließend wurden die Antikörpertiter gegen SRBC und dsDNA im Serum der Tiere bestimmt.

Die in der **Abbildung 24** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass durch die Immunisierung mit SRBC die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse Antikörper gegen SRBC entwickeln. Eine anti-CD137 Ak-Behandlung nach erfolgreicher Immunisierung („Isotyp switch“

zu IgG Antikörper) hatte keinen Einfluß auf die etablierten Antikörper-Titer gegen SRBC in den Mäusen (**Abb. 24**). Jedoch die T-Zellen-abhängige humorale Immunantwort gegen Autoantigene (dsDNA) konnte durch die anti-CD137 Ak-Behandlung erfolgreich gehemmt werden (**Abb. 24**).

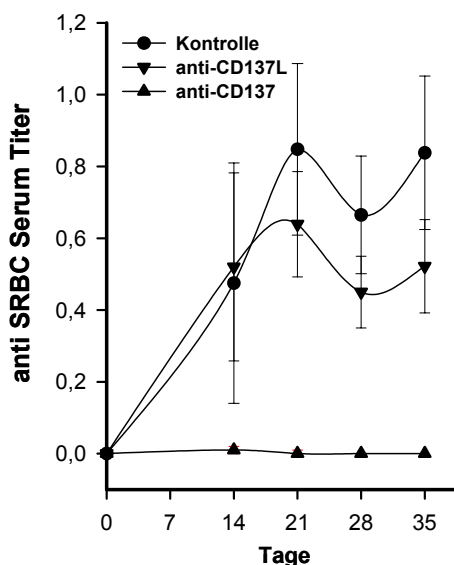


**Abbildung 24: Anti-CD137 Ak hemmt nicht eine bereits etablierte Immunantwort gegen Fremantigene.**

26 Wochen alte NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse wurden mit SRBCs immunisiert (Tag 0 +10) und einmalig am Tag 16 nach Immunisierung mit anti-CD137 Ak behandelt. Anschließend wurden im Serum der NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse die Antikörper-Titer gegen anti-SRBCs (▲) oder anti-dsDNA (●) bestimmt. Dargestellt ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

### III. 2.9 Anti-CD137 Ak-Wirkung ist unabhängig von der Bindung zwischen CD137 Rezeptor und CD137Ligand

Die Unterbrechung der Bindung zwischen Rezeptor und Ligand wäre eine mögliche Erklärung für die immunsuppressive Wirkung des anti-CD137 Ak auf die Bildung von spezifischen Antikörpern von B-Zellen.



**Abbildung 25: Anti-CD137 Ak immunsuppressive Wirkung unabhängig von CD137Ligand**

26 Wochen alte CD137Ligand defiziente („CD137 knock out“) Mäuse wurden mit SRBCs immunisiert (Tag 0 +10) und einmalig am Tag der primären Immunisierung (Tag 0) mit anti-CD137 (▲), anti-CD137Ligand (▼) oder Kontroll- (●) Ak behandelt. Anschließend wurden im Serum der NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse die Antikörper-Titer gegen anti-SRBC bestimmt. Dargestellt ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

Um weitere Hinweise zu bekommen, ob der immunsuppressive Effekt einer anti-CD137 Ak-Behandlung durch die Hemmung der Rezeptor-Liganden-Bindung zustande kommt, wurden CD137Ligand-defiziente Mäuse mit SRBC immunisiert und anschließend mit einem Ak gegen CD137, CD137 Ligand oder Kontroll-Ak behandelt. Die Ergebnisse in **Abbildung 25** zeigen, dass die Immunisierung mit SRBC zu einer starken humoralen Immunantwort gegen SRBC in den CD137Liganden-defizienten Mäusen führt. Des Weiteren führt eine anti-CD137 Ak-Behandlung zum Zeitpunkt der primären Immunisierung zu einer Hemmung der Antikörperbildung gegen das Fremdartigen (**Abb. 25**). Eine Antikörper-Behandlung gegen CD137Ligand zeigte, wie erwartet, keinen Effekt auf die humorale Immunantwort (**Abb. 25**). Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass die immunsuppressive Wirkung des anti-CD137 Ak nicht über eine Hemmung der Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand vermittelt wird. Anzumerken ist, dass in anderen Versuchen mit BALB/c Mäusen eine anti-CD137Liganden Ak-Behandlung nach Immunisierung mit SRBC zu einer eher verstärkten Immunantwort gegen das Fremdartigen führte (Ergebnisse nicht dargestellt).

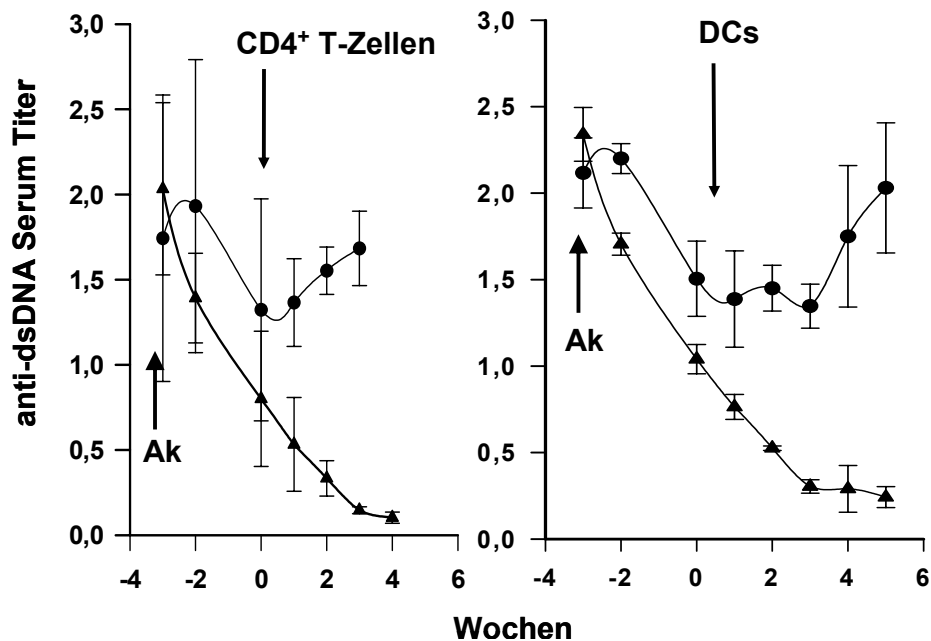
### **III. 2.10 Transfer von „aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen“ oder in vitro generierte DCs hemmen die suppressiven Effekte der anti-CD137 Ak-Behandlung**

Dendritische Zellen (DCs) sind Instrumente zur Aktivierung von T-Zellen auf spezielle Antigene („priming“). Es wurde gezeigt, dass gewisse Populationen von DCs funktionelle CD137 Rezeptoren auf ihrer Oberfläche tragen (167). Aufgrund dieser Beobachtungen ist es möglich, dass die Hemmung der humoralen Immunantwort durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung während der immunologischen Interaktion zwischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und DCs stattfindet. Somit sind DCs oder aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mögliche Ziele der anti-CD137 Ak-Behandlung. Um diese Hypothese weiter zu untersuchen, wurden entweder CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen mit erhöhten Autoantikörper-Titer („primed CD4<sup>+</sup> T-Zellen“) oder in vitro generierte DCs in NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse transferiert, welche zwei Wochen zuvor mit anti-CD137 Ak behandelt wurden. Anschließend wurden wöchentlich die anti-dsDNA Autoantikörper-Titer im Serum bestimmt.

Das Ergebnisse, dargestellt in **Abbildung 26**, zeigten, dass der Transfer von „primed“ CD4<sup>+</sup> T-Zellen in anti-CD137 Ak-behandelten NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen den Effekt einer Hemmung der Produktion von Autoantikörpern aufhebt (**Abb. 26, links**). Aus dem



Knochenmark gewonnene und in vitro generierte DCs haben einen eher unreifen, nicht vor-stimulierten „naiven“ Funktionszustand. Durch den Transfer dieser eher unreifen DCs in anti-CD137 Ak-behandelte NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse wurde die Hemmung der humoralen Immunantwort aufgehoben und die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse produzierten wieder Autoantikörper gegen dsDNA (**Abb. 26, rechts**).



**Abbildung 26: Transfer von „primed“ CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder „naiven“ DCs hebt die Hemmung der humoralen Immunantwort durch anti-CD137 Ak in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen auf.**

26 Wochen alte NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse (n=10) wurden einmalig mit anti-CD137 Ak behandelt. Nach 4 Wochen wurden die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse nicht weiter behandelt (▲) oder injiziert mit  $1 \times 10^7$  CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**links**) aus NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen mit hohem Autoantikörper-Titer oder mit  $1 \times 10^6$  in vitro generierte CD11c<sup>+</sup> DCs (**rechts**, 15-30% CD137 positiv). Die aus Knochenmark gewonnenen DCs und CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden hergestellt, wie unter Material und Methoden beschrieben. Werte sind aufgetragen als Mittelwert  $\pm$  SD der OD bei 490 nm (Serum Verdünnung 1:100) von den einzelnen Versuchstieren in den verschiedenen Gruppen. Dargestellt ein Versuch, repräsentativ für drei unabhängig durchgeführte Versuche.

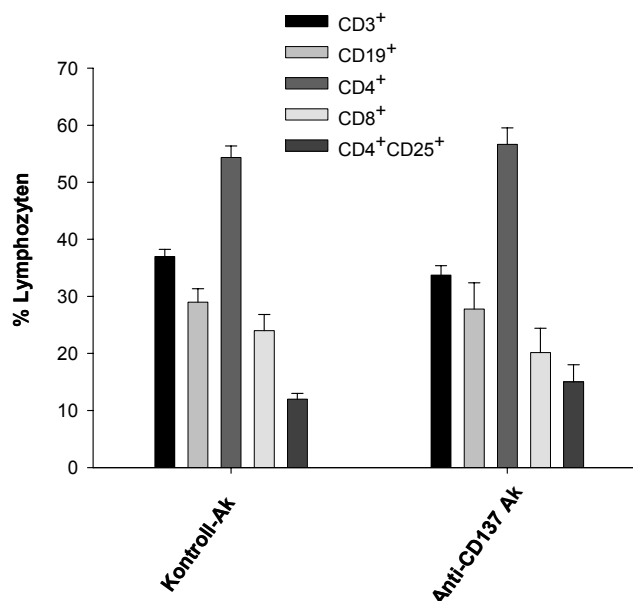
Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass durch den Transfer von nicht anti-CD137 Ak-behandelten DCs oder CD4<sup>+</sup> T-Zellen die Anergie von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen aufgehoben werden kann und die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse wieder beginnen, Autoantikörper zu produzieren (**Abb. 26**). Des Weiteren ist es möglich, dass der anti-CD137 Ak die Interaktion zwischen DCs und CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen im Rahmen der antigenspezifischen Aktivierung hemmt. Eine mögliche Konsequenz eines derartigen Wirkungsmechanismus wären die beobachtete Anergie der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, fehlende

Keimzentrenbildung in der Milz, fehlende Antigen spezifische T-Zellen-Hilfe und eventuell die Generierung von regulatorischen T-Zellen.

### III. 2.11 Anti-CD137 Ak-Behandlung generiert minimal erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen

Um zu bestimmen, ob nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung die Anzahl der B- oder T-Zellen sich entscheidend verändert oder eventuell regulatorische T-Zellen ( $CD4^+CD25^+$  T-Zellen) generiert werden, wurden NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse mit hohem Autoantikörper-Titer und beginnender Proteinurie einmalig mit Kontroll-Ak oder mit anti-CD137 Ak behandelt. Anschließend wurden an den Tagen 3 und 21 die Lymphozytenpopulationen in der Milz mit Hilfe der Durchflußzytometrie untersucht (dargestellt in Abb. 27, repräsentativ Tag 21).

Wie in der **Abbildung 27** dargestellt, war zu keinem Zeitpunkt der Messungen (Tag 3 nicht dargestellt) eine signifikante Änderung der T- oder B-Zellen-Population der anti-CD137 Ak-behandelten Mäuse darzustellen, im Gegensatz zu den Kontroll-Ak-behandelten Tieren (**Abb. 27**).



**Abbildung 27: Keine Veränderungen der T- oder B-Zellen-Anzahl durch anti-CD137 Ak**  
 26 Wochen alte NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse (n=10) wurden einmalig mit anti-CD137 Ak behandelt. Anschließend wurde in der Milz der NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse an den Tagen 3 und 21 nach der Behandlung mit Hilfe der Durchflußzytometrie die Anzahl der T-Zellen ( $CD3^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^+$ ), der B-Zellen ( $CD19^+$ ) und von potentiellen regulatorischen T-Zellen ( $CD4^+CD25^+$ ) bestimmt. Repräsentativ dargestellt Mittelwert  $\pm$  SD am Tag 21 von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die einzige zu bemerkende Veränderung in den Lymphozytenpopulationen war eine leicht vermehrte Anzahl von potentiellen immunsuppressiven  $CD4^+CD25^+$  regulatorischen T-Zellen (**Abb. 27**). Transfer von positiv angereicherten  $CD4^+CD25^+$  T-Zellen aus anti-CD137 Ak-behandelten NZB/W F1 Mäusen ergab weder Veränderungen in den Autoantikörperkonzentrationen im Serum noch in der Entwicklung einer Proteinurie (nicht dargestellte Ergebnisse).

### **III. 3 Hinweise auf einen möglichen Wirkungsmechanismus durch Beobachtungen der Wirkung von anti-CD137 Ak in einem Mausmodell für virale Infektionen**

In den Experimenten im CIA und SLE Maus-Modell konnten wir zeigen, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung nicht nur die Produktion von pathogenen Autoantikörpern hemmt, sondern auch die klinischen Zeichen einer Arthritis oder Glomerulonephritis reduziert werden und die Mäuse signifikant länger leben. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Antikörper gegen CD137 eine Anergie in den  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen verursacht. Außerdem ist es möglich, dass der Antikörper entscheidend in die Interaktion zwischen DCs und  $CD4^+$  T-Zellen eingreift und somit immunsuppressiv auf  $CD4^+$  T-Helfer-Zellen wirkt. Des Weiteren ist es möglich, dass der Ak gegen CD137 beteiligt ist an der Generierung von potentiell immunsuppressiven regulatorischen T-Zellen. Aufgrund dieser Beobachtungen war es von äußerstem Interesse, weitere Hinweise auf einen möglichen Wirkungsmechanismus einer anti-CD137 Ak-Behandlung zu bekommen. Aus diesem Grund führten wir noch zusätzliche Untersuchungen durch und untersuchten die Wirkung des anti-CD137 Antikörpers auf die Immunantwort gegen das pathogene Maus-Virus LCMV (Lymphozytic-Chorio-Meningitis-Virus). LCMV ist ein natürlicher Krankheitserreger der Maus. Nach einer Infektion mit LCMV entwickeln immunkompetente Mäuse eine starke virusspezifische  $CD8^+$  T-Zellen-Antwort, welche die Virusinfektion eliminiert. Während einer LCMV Infektion expandieren („expansion phase“) zuerst virusspezifische  $CD8^+$  und  $CD4^+$  T-Zellen. Diese Expansionsphase ist gefolgt von einer Phase, in der die meisten virusspezifischen T-Zellen durch Apoptose sterben („contraction phase“). Es verbleibt eine stabile virusspezifische  $CD8^+$  T-Zellen- („memory“ T-Zellen) Population („memory phase“) und virusspezifische  $CD4^+$  T-Zellen vermindern sich langsam. Das LCMV Modell wurde ausführlich zu Studien der

physiologischen Beteiligung und Beeinflussung der anti-viralen Immunantwort durch kostimulatorische Moleküle benutzt (86).

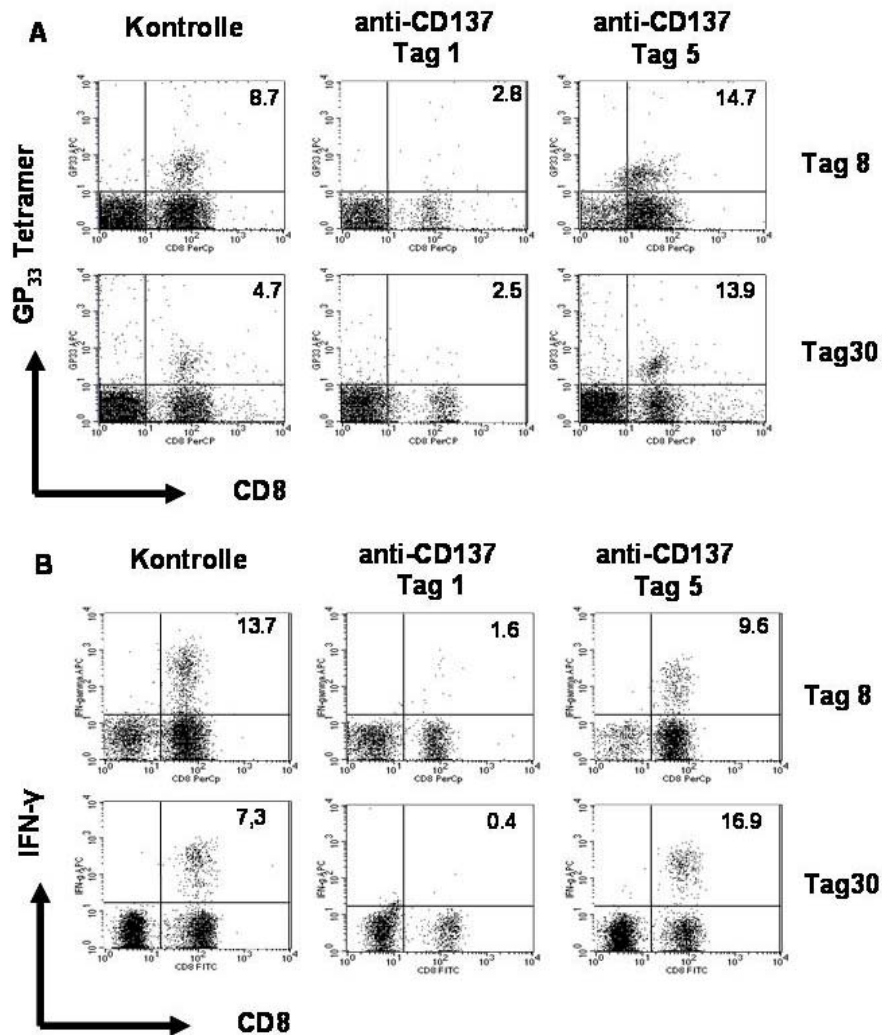
### **III. 3.1 Anti-CD137 Ak hemmt oder verstärkt die Entwicklung einer LCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> Immunantwort**

In diesen Versuchen wurden C57BL/6 (BL/6) Mäuse mit LCMV infiziert und an den Tagen 1 bis 5 nach der Infektion mit anti-CD137 Ak oder einem Kontroll-Ak behandelt (**Abb. 28 + 29**). Anschließend wurden am Tag 8 (Maximum der Expansionsphase) und am Tag 30 (Memoryphase) nach Infektion mit LCMV die spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen gegen ein bekanntes immundominantes LCMV-spezifisches Antigen bzw. Peptid (GP33) bestimmt. Der Nachweis LCMV-spezifischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte mit GP33 spezifischen Tetramere oder durch den Nachweis von IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Inkubation mit dem LCMV-spezifischen Peptid (ICC-Assay).

Die Ergebnisse, dargestellt in **Abbildung 28**, zeigen, dass eine frühe anti-CD137 Ak-Behandlung (Tag1) zu einer Hemmung der LCMV spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Immunantwort oder eine spätere Behandlung (Tag 5) zu einer Verstärkung der Immunantwort führt. Dies war nachweisbar durch eine Verminderung der Anzahl Tetramer positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen (**Abb. 28 A**) und IFN- $\gamma$ -produzierender (**Abb. 28 B**) CD8<sup>+</sup> T-Zellen an den Tagen 1 nach Infektion mit LCMV. Im Gegensatz dazu führte eine anti-CD137 Ak-Behandlung am Tag 5 nach LCMV-Infektion zu einer Vermehrung LCMV-spezifischer T-Zellen (**Abb. 28 A + B**).

Dieses Ergebnis bestätigte erneut unsere Ergebnisse, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung die T-Zellen-abhängige Immunantwort hemmen kann, wenn der Antikörper in der Phase der Immunisierung („priming phase“) und der Antigen-Präsentation durch Antigen-präsentierende Zellen (APCs, DCs) gegeben wird (18abschb). Nach dieser initialen Phase einer Immunantwort sollte keine Hemmung der T-Zellen-abhängigen Immunantwort mehr auftreten. Um diese zeitabhängige Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung weiter zu untersuchen wurden C57BL/6 Mäuse mit LCMV infiziert und an den Tagen 1, 2, 3, 4 und 5 nach Infektion mit anti-CD137 Ak oder mit einem Kontroll-Ak behandelt. Anschließend wurde, wie bereits erwähnt, die Anzahl Tetramer-positiver CD8<sup>+</sup> T-Zellen und IFN- $\gamma$ -produzierender CD8<sup>+</sup> T-Zellen am Tag 8 nach Infektion mit LCMV im peripheren Blut (PBMCs)

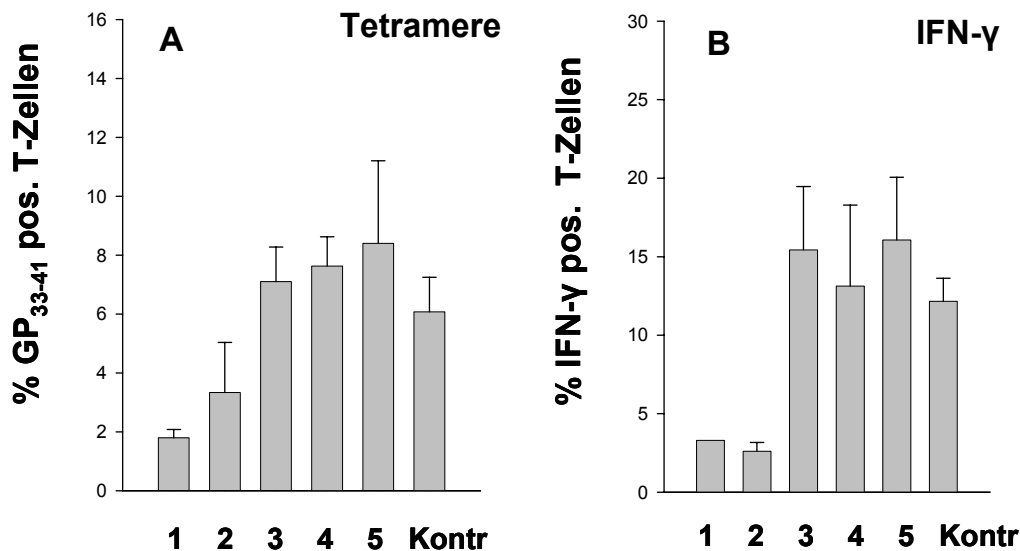
bestimmt (**Abb. 29**). Analysen von T-Zellen aus der Milz oder den Lymphknoten zeigten



**Abbildung 28: Zeitpunkt-abhängige Wirkung der Anti-CD137 Ak-Behandlung auf die spezifische Immunantwort**

C57BL/6 Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  PFU LCMV infiziert und einmalig mit anti-CD137 Ak oder Kontroll-Ak an den Tagen 1 oder 5 nach Infektion behandelt. Anschließend wurden in den PBMCs mit Hilfe der Durchflußzytometrie die spezifischen T-Zellen gegen das LCMV-Virus bestimmt. Dargestellt GP33 Tetramer-spezifische T-Zellen (**A**) und IFN- $\gamma$ -produzierende T-Zellen, stimuliert mit dem LCMV-spezifischen GP33-Peptid (**B**). Dargestellt ein Versuch, repräsentativ für mehrmalige, unabhängig durchgeführte Versuche.

In diesem Experiment zeigte sich, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung nach LCMV Infektion in den ersten zwei Tagen nach Infektion die Entwicklung einer spezifischen anti-LCMV-Immunantwort hemmt (GP33-Tetramere und IFN- $\gamma$  spezifische T-Zellen). Eine verzögerte Gabe von anti-CD137 Ak bis zum 3. Tag nach Infektion hatte einen geringen positiven Effekt auf die Entwicklung einer spezifischen anti-LCMV-Immunantwort (**Abb. 29 A + B**).



**Abbildung 29: Anti-CD137 Ak-Behandlung hemmt oder verstärkt die spezifische Immunantwort gegen LCMV**

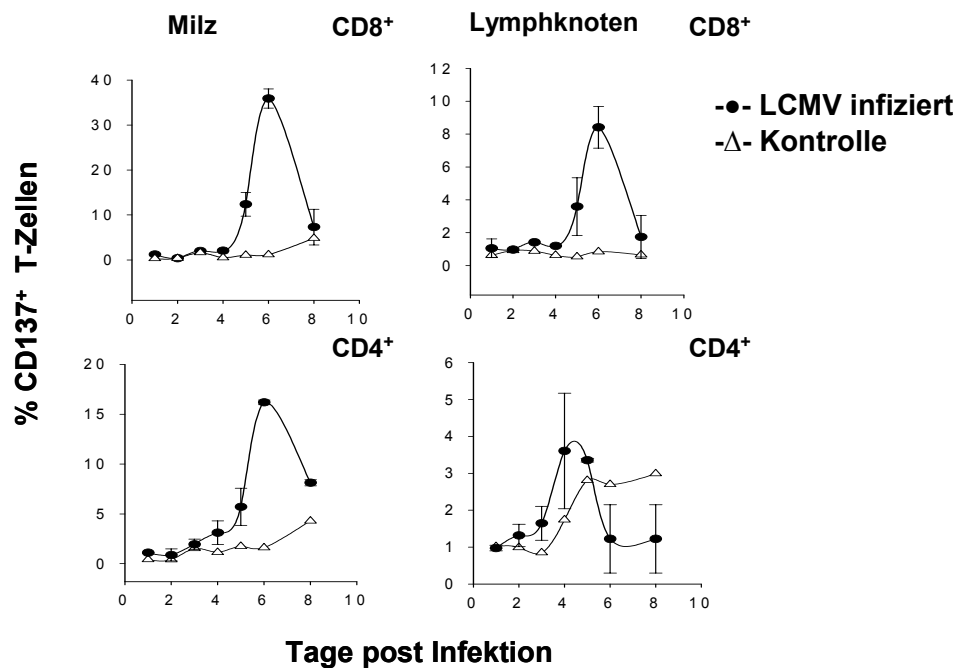
C57BL/6 Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  PFU LCMV infiziert und einmalig mit anti-CD137 Ak oder Kontroll-Ak an den Tagen 1, 2, 3, 4 oder 5 nach Infektion behandelt. Anschließend wurden in den PBMCs mit Hilfe der Durchflußzytometrie die spezifischen T-Zellen gegen das LCMV-Virus am Tag 8 nach LCMV-Infektion bestimmt. Dargestellt GP33 Tetramer spezifische T-Zellen (A) und IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen, stimuliert mit dem LCMV spezifischen GP33-Peptid (B). Repräsentativ dargestellt: Mittelwert  $\pm$  SD von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

### III. 3.2 Unterschiedliche CD137 Rezeptor-Expression auf DCs und T-Zellen im Verlauf einer LCMV-Infektion

Um weitere Hinweise auf den Wirkungsmechanismus zu finden und um besser die unterschiedlichen Effekte einer anti-CD137 Ak-Behandlung auf die Immunantwort nach LCMV Infektion zu verstehen, wurden C57BL/6 Mäuse mit LCMV infiziert und anschließend die Expression des CD137 Rezeptors auf DCs und T-Zellen ( $CD4^+$  und  $CD8^+$ ) an den Tagen 1 bis 8 nach Infektion mit LCMV mit Hilfe der Durchflußzytometrie in Milz und Lymphknoten untersucht. Außerdem wurden DCs aus Knochenmark generiert und in vitro auf Expression eines CD137 Rezeptors nach einer LCMV-Infektion untersucht.

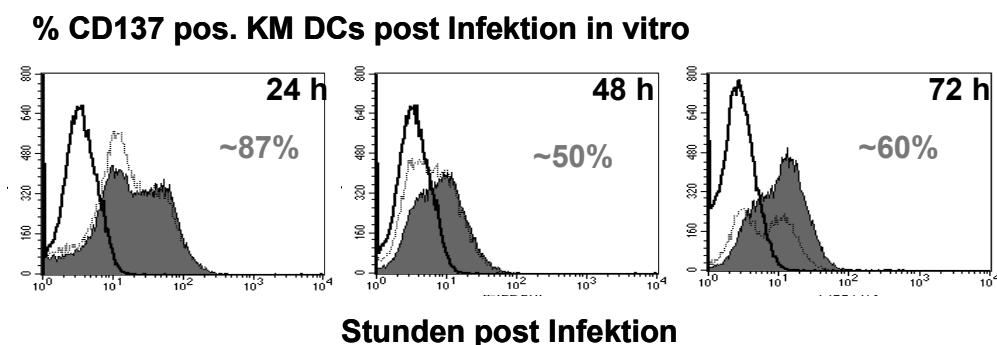
Die in der **Abbildung 30** dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in den untersuchten Organen die Expression des CD137 Rezeptors auf den T-Zellen in den ersten Tagen nach LCMV-Infektion nur sehr minimal nachweisbar war (ca. 1%). Jedoch stieg rasch der prozentuale Anteil der CD137 Rezeptor-positiven  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T-Zellen in der Milz und in den Lymphknoten im weiteren Verlauf der LCMV-Infektion (**Abb. 30**). Nach ca. 4 Tagen war ein deutlicher Anstieg der CD137 Rezeptor-positiven T-Zellen

in den lymphatischen Organen zu verzeichnen. Dabei waren keine wesentlichen Unterschiede in den CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen Populationen nachweisbar (**Abb. 30**). Im Gegensatz dazu exprimieren in vitro generierte DCs aus dem Knochenmark in den ersten 24h nach einer LCMV-Infektion sehr viel CD137 Rezeptor (ca. 85%) auf ihrer Oberfläche (**Abb. 31**). Anschließend fällt der prozentuale Anteil der CD137 Rezeptor-positiven DCs auf 40- bis 50% in den nächsten 2 Tagen (**Abb. 31**).



**Abbildung 30: CD137 Rezeptor auf der Oberfläche von T-Zellen im Verlauf einer LCMV-Infektion**

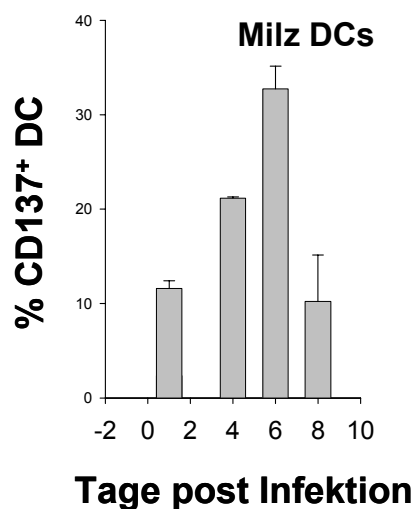
C57BL/6 Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  PFU LCMV infiziert. Anschließend wurde auf der Oberfläche von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz und den Lymphknoten mit Hilfe der Durchflußzytometrie die CD137 Rezeptor-Expression im Verlauf der LCMV-Infektion bestimmt. Repräsentativ dargestellt ein Versuch von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.



**Abbildung 31: CD137 Rezeptor auf DCs aus dem Knochenmark im Verlauf einer in vitro LCMV-Infektion**

Von C57BL/6 Mäusen wurde Knochenmark gewonnen. Anschließend wurden in vitro DCs generiert. Nach Infektion mit  $2 \times 10^5$  PFU LCMV wurde auf der Oberfläche der Dcs mit Hilfe der Durchflußzytometrie die CD137 Rezeptor-Expression im Verlauf der LCMV-Infektion bestimmt. Repräsentativ dargestellt ein Versuch von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Ergänzende Untersuchungen von DCs aus der Milz, dargestellt in **Abbildung 32**, zeigen, dass in den ersten Tagen nach einer LCMV-Infektion die Expression des CD137 Rezeptors bei ca. 10% der untersuchten Zellen nachweisbar ist (**Abb. 32**). Im weiteren Verlauf der LCMV-Infektion kommt es zu einer kontinuierlichen Zunahme der CD137 Rezeptor-positiven DC-Population. Dieser Anstieg ist bis Tag 6 nach primärer Infektion zu beobachten, mit anschließendem Abfall der CD137 Rezeptor-positiven DCs (**Abb.32**).



**Abbildung 32: CD137 Rezeptor auf DCs aus der Milz im Verlauf einer LCMV-Infektion**

C57BL/6 Mäuse wurden mit  $2 \times 10^5$  PFU LCMV infiziert. Anschließend wurde auf der Oberfläche der Dcs in der Milz mit Hilfe der Durchflußzytometrie die CD137 Rezeptor-Expression im Verlauf der LCMV-Infektion bestimmt. Repräsentativ dargestellt ein Versuch von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

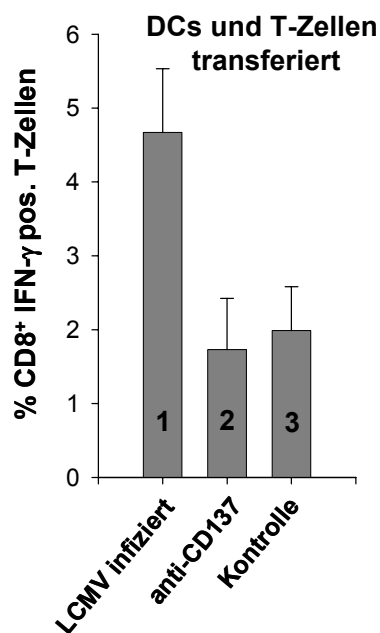
### III. 3.3 Anti-CD137 Ak hemmt die LCMV-spezifische T-Zellen Immunantwort in der „priming phase“ durch Interaktion mit dem CD137 Rezeptor auf DCs

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass der Effekt einer anti-CD137 Ak-Behandlung nach einer LCMV-Infektion abhängig ist vom Zeitpunkt der Gabe des Antikörpers. Dies deutet darauf hin, dass der Antikörper gegen CD137 in der frühen Phase der LCMV Infektion, der Phase der Antigen-Präsentation durch APCs oder DCs („priming phase“), seine hemmende Wirkung ausübt, entweder über Beeinflussung der Interaktion zwischen DCs untereinander oder zwischen DCs und T-Zellen. Die Ergebnisse der Expression des CD137 Rezeptors auf DCs und T-Zellen wiesen weiter darauf hin, dass in der späteren Phase nach einer LCMV-Infektion der positive Effekt einer anti-CD137 Ak-Behandlung vermutlich hauptsächlich über CD137 Rezeptoren auf T-Zellen ausgeübt wird.

Um mehr Aufschlüsse über den zugrunde liegenden Wirkungsmechanismus und das primäre „Target“ der anti-CD137 Ak-Behandlung zu bekommen, wurden Zell-Transfer-Experimente mit T- und B-Zellen-defizienten Mäusen durchgeführt. Es wurden aus dem Knochenmark von LCMV-infizierten C57BL/6 Mäusen DCs



generiert und anschließend *in vitro* mit anti-CD137 Ak oder Kontroll-Ak behandelt. Außerdem wurden aus LCMV-infizierten Mäusen PBMCs gewonnen und anschließend mit der „MACS“ Methode ausschließlich die T-Zellen angereichert (Material und Methoden). In dem in Abbildung 33 dargestellten Versuch wurden DCs und T-Zellen in unterschiedlichen Kombinationen in immun-inkompetente ( $RAG^{-/-}$ , BALB/c, H-2<sup>d</sup>) Mäuse transferiert. Am 8. Tag nach Transferierung wurden die  $RAG^{-/-}$ -Mäuse auf LCMV-spezifische T-Zellen in der Milz und im peripheren Blut untersucht (**Abb. 33**).



**Abbildung 33: Interaktion des anti-CD137 Ak mit dem CD137 Rezeptor auf DCs**

Aus nicht infizierten C57BL/6 Mäusen wurde Knochenmark zur Generierung von DCs und aus der Milz wurden T-Zellen ( $CD4^{+}$  und  $CD8^{+}$ ) gewonnen. Anschließend wurden die DCs mit LCMV *in vitro* infiziert und entweder mit Kontroll-Ak (1) oder mit anti-CD137 Ak behandelt (2) und zusammen mit den T-Zellen in  $RAG^{-/-}$  Mäuse transferiert. Außerdem wurden zur weiteren Kontrolle nicht infizierte DCs aus nicht LCMV-infizierten Mäusen zusammen mit den T-Zellen in  $RAG^{-/-}$  Mäuse transferiert (3). Dargestellt sind IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen, stimuliert mit LCMV-spezifischem GP33-Peptid am 8. Tag nach Transferierung. Repräsentativ dargestellt Mittelwert  $\pm$  SD von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Die Ergebnisse, dargestellt in **Abbildung 33**, zeigen, dass der negative oder hemmende Effekt einer anti-CD137 Ak-Behandlung in der „priming phase“ höchstwahrscheinlich durch Interaktion des Antikörpers mit Rezeptoren auf DCs zustande kommt (**Abb. 33, 2**). DCs aus LCMV-infizierten Mäusen, die *in vitro* vor Transferierung mit anti-CD137 Ak behandelt wurden (**Abb. 33, 2**), haben einen hemmenden Effekt auf die Entwicklung einer LCMV-spezifischen T-Zellen-Immunantwort im Gegensatz zu den mit Kontroll-Ak-behandelten DCs (**Abb. 33, 1**). Der Effekt der anti-CD137 Ak-behandelten DCs ist vergleichbar mit DCs, die aus nicht LCMV-infizierten Mäusen gewonnen wurden (**Abb. 33, 3**) und keine weitere Unterstützung oder Aktivierung einer spezifischen LCMV-Immunantwort liefern können. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass durch die Interaktion des anti-CD137 Ak mit dem CD137 Rezeptor auf DCs die Zellen wesentlich beeinflusst werden in ihrer Funktion. DCs, vorbehandelt mit einem Antikörper gegen CD137,

verlieren ihre Fähigkeit, adäquat T-Zellen Antigen-spezifisch zu aktivieren und eine Antigen-spezifische T-Zellen-Immunantwort zu initiieren. Der beobachtete positive Effekt auf eine Antigen-spezifische T-Zellen-Immunantwort durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung wird am wahrscheinlichsten durch eine direkte Wirkung des Antikörpers auf die Antigen-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt, unter anderem durch Hemmung des Zelltodes nach Aktivierung (76, 175).

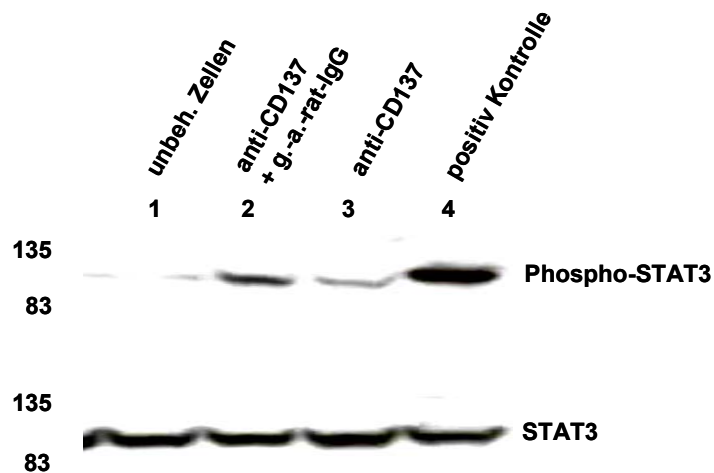
### **III. 3.4 Aktivierung des CD137 Rezeptors auf DCs führt zur intrazellulären Phosphorylierung des Signaltransduktionsmoleküls STAT3.**

STAT-Moleküle („signal transducers and activators of transcription“) sind Signaltransduktionsmoleküle für eine Vielzahl von Zytokin-Rezeptoren. Nach Phosphorylierung von intrazellulären STAT-Molekülen kommt es zur Bildung von Homo- und Heterodimeren, die in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktor fungieren (104). STAT3 ist ein wichtiger Faktor der Signalübermittlung von den Zytokin-Rezeptoren IL-6 und G-CSF und hat verschiedene Effekte in einer Vielzahl von Geweben (104). In Keimzentren führt die Aktivierung von STAT3 zu einer Blockierung der B-Zellen-Entwicklung. STAT3-Aktivierung durch IL-10 führt zur Entwicklungshemmung von DCs und Hemmung der Expremierung von Oberflächenrezeptoren wie CD83 und CD86 (27, 153).

Aufgrund unserer bisherigen Ergebnisse, dass anti-CD137 Ak für DC Reifung hemmt und eine T-Zellen „Anergie“ induziert, war es von Interesse, ob eine anti-CD137 Ak-Behandlung in DCs eine intrazelluläre Aktivierung des STAT3 Moleküls verursacht. Aus diesem Grund wurden DCs aus BL/6 Mäusen in vitro mit anti-CD137 Ak oder Kontroll-Ak behandelt. Anschließend wurden die DCs lysiert und mit Hilfe der „Western-Blot“-Methode (siehe Material und Methoden) auf das Vorhandensein von phosphorylierten STAT3-Molekülen untersucht (**Abb.34**).

Das in der **Abbildung 34** dargestellte Ergebnis zeigt, dass nach Bindung von anti-CD137 Ak an den CD137-Rezeptor auf DCs es zu einer Phosphorylierung und Aktivierung des intrazellulären STAT3-Moleküls kommt (**Abb. 34**).

Des Weiteren wurde die Phosphorylierung von intrazellulären STAT3-Molekülen weiter verstärkt durch Quervernetzung der anti-CD137 Ak-CD137 Rezeptor-Bindung auf der Oberfläche von DCs (**Abb. 34**). Vergleichbare Untersuchungen auf die Phosphorylierung von STAT1-Molekülen zeigten keine Veränderungen (Ergebnisse nicht dargestellt).

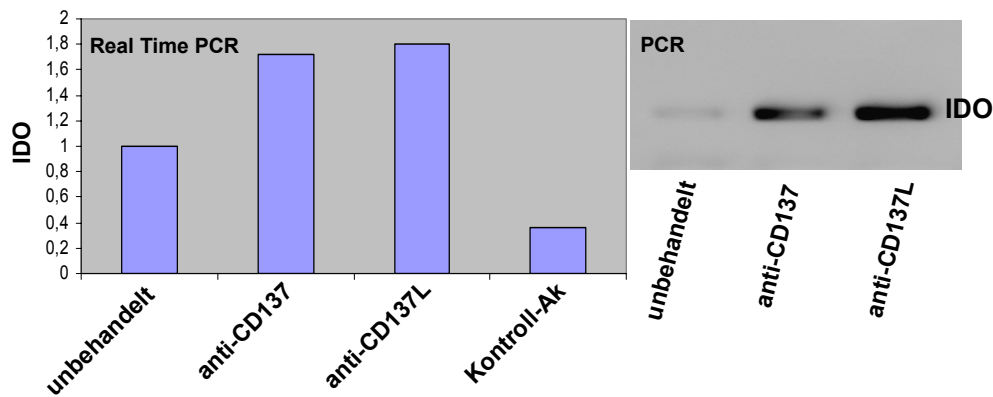


**Abbildung 34: Vernetzung des CD137 Rezeptors auf DCs führt zu einer intrazellulären Phosphorylierung von STAT3**

DCs, gewonnen aus C57BL/6 Mäusen, wurden *in vitro* mit anti-CD137 Ak allein oder in Kombination mit einem Sekundär-Ak („goat-anti-rat-IgG) zur Quervernetzung behandelt. Als Positiv-Kontrolle diente ein Zelllysat mit bekannter positiver STAT3-Phosphorylierung. Anschließend wurden die DCs lysiert, die intrazellulären Proteine mit einem SDS-Polyacrymid-Gel aufgetrennt, auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und inkubiert mit Ak gegen nicht-phosphoryliertes und phosphoryliertes STAT3-Molekül. Dargestellt ein repräsentativer Versuch von zwei unabhängig durchgeführten Versuchen.

### III. 4 Untersuchung auf einen möglichen molekularen Wirkungsmechanismus einer anti-CD137 Ak-Behandlung

Aufgrund der Beobachtungen, dass DCs eine entscheidende Bedeutung in der Vermittlung der anti-CD137-Wirkung in den untersuchten Tiermodellen haben, sollten in weiteren Versuchen Hinweise auf eventuelle molekulare Wirkungsmechanismen gefunden werden. In diesem Zusammenhang wurde berichtet, dass in Mausmodellen für die Arthritis (CIA) und die Uveitis/Retinitis (EAU) eine indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-abhängige Hemmung der Autoimmunität durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung gefunden worden ist (24, 172). IDO ist ein Tryptophan-abbauendes Enzym, welches durch Eingriff in den T-Zellen-Stoffwechsel immunsuppressiv wirkt und Toleranz vermittelt (133). Des Weiteren wurde gezeigt, dass immunmodulierende Moleküle wie CTLA-4 auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen oder CTLA-4-Ig und Zytokine, wie IFN- $\gamma$ , vermehrte IDO Produktion in DCs induzieren können (133, 161). Somit könnten IDO abhängige Mechanismen sehr wichtig sein für die Aufrechterhaltung der Toleranz bei Transplantationen oder Autoimmunerkrankungen. Aus diesem Grund wurden DCs generiert und *in vitro* mit anti-CD137 Ak oder Kontroll-Ak behandelt. Anschließend wurde mit Hilfe der PCR-Methode der Gehalt an IDO in den DCs ermittelt.



**Abbildung 35: Vernetzung des CD137 oder CD137L Rezeptors auf DCs führt zu einer vermehrten Produktion von IDO RNA**

DCs, gewonnen aus humanen PBMCs, wurden in vitro mit anti-CD137, anti-CD137L Ak oder Kontroll-Ak behandelt. Anschließend wurden die DCs lysiert, RNA gewonnen und mit Hilfe der PCR und der „real time PCR“ der Gehalt an IDOcodierender RNA bestimmt. Dargestellt ein repräsentativer Versuch von drei unabhängig durchgeführten Versuchen.

Wie in der **Abbildung 35** dargestellt, führt eine anti-CD137 Ak-Behandlung von DCs zu einer raschen Vermehrung von IDOcodierender RNA in den DCs im Vergleich zu unbehandelten oder Kontroll-Ak-behandelten DCs (**Abb. 35**).

Diese Ergebnisse zeigten erneut, dass DCs eine entscheidende Bedeutung haben in der Vermittlung der anti-CD137 Ak-vermittelten immunsuppressiven Wirkung und das intrazelluläre Enzym IDO an der die Immunantwort hemmenden Wirkung entscheidend beteiligt ist.

## **IV. Diskussion**

Aufgrund der zentralen Rolle von T- und B-Zellen oder DCs in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und der bisher bekannten Wirkung eines agonistischen Antikörpers gegen CD137 (4-1BB) wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung eines anti-CD137-Antikörpers auf die zellvermittelte und humorale Immunität in den Mausmodellen für die Rheumatoide Arthritis (CIA) und den systemischen Lupus Erythematoses (NZB/NZW F<sub>1</sub>) untersucht (52, 53). Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Beobachtung, dass eine Immuntherapie mit einem Antikörper gegen CD137 die zellvermittelte Immunität (CTL's) verstärkt, jedoch die T-Zellen-abhängige humorale Immunität hemmen kann, wenn der Ak in der frühen Phase der Immunisierung („priming Phase“) appliziert wird (108, 122). Die Hemmung der T-Zellen-abhängigen humoralen Immunantwort wird dabei vermutlich durch Induktion einer Anergie von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen vermittelt, wobei die Funktion der B-Zellen unbeeinflusst bleiben soll (129). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Wirkung, Effizienz und therapeutisches Potential einer anti-CD137 Ak-Behandlung in verschiedenen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen zu testen. Es wurde untersucht, ob eine anti-CD137 Ak-Behandlung eine Anergie von T-Helfer-Zellen verursacht und eine Hemmung der Immunantwort gegen Autoantigene, vergleichbar mit den Effekten bei Fremdantigenen. Außerdem wurden Untersuchungen durchgeführt, um Hinweise auf die zellulären und molekularen Wirkungsmechanismen einer Behandlung mit anti-CD137 Ak in den verschiedenen Tiermodellen zu bekommen.

### **IV. 1. Das Tiermodell für RA (CIA)**

Die Induktion einer Arthritis in DAB/1 Mäusen ist abhängig von der Aktivierung von T-Helfer-Zellen und B-Zellen (73, 160, 178). Außerdem ist es möglich, durch Transfer von T-Helfer-Zellen oder Serum aus erkrankten Mäusen die Arthritis in nicht mit Kollagen immunisierte Mäuse zu transferieren (72, 85, 170). Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung die Produktion von Kollagen spezifischen Autoantikörpern und die makroskopischen sowie mikroskopischen Zeichen einer Arthritis im CIA Tiermodell hemmt. Von großer Bedeutung ist, dass die anti-CD137 Ak-Behandlung eine lang wirkende Immunität oder Toleranz gegen das Arthritis auslösende Antigen hinterlässt und im Falle der Applikation nach Beendigung

der Immunisierung mit Kollagen eine therapeutische Wirksamkeit auf den weiteren Verlauf der Arthritis zeigt. Der Antikörper gegen CD137 fällt dabei in eine Kategorie von verschiedenen immun-modulatorischen Reagenzien (Ak oder Fusionsproteine gegen Rezeptor/Ligand-Systeme CD40/CD40Ligand, CD28/B7-Moleküle-CTLA-4 OX40/OX40Ligand, TACI), die eine immunsuppressive Wirkung auf die Entwicklung der Arthritis im CIA Tiermodell haben (40, 98, 190, 195, 204). Jedoch haben diese Reagenzien gemeinsam, dass sie hauptsächlich wirksam sind in der Verhinderung der Induktion der Arthritis und keine Wirksamkeit mehr zeigen nach Etablierung der Arthritis (98, 204). Der anti-CD137 Ak unterscheidet sich wesentlich von diesen immun-modulatorischen Reagenzien dadurch, dass der anti-CD137 Ak auch eine Wirksamkeit zeigt, wenn bereits Zeichen einer Arthritis vorhanden sind und er eine lang anhaltende Toleranz hinterlässt gegenüber dem Arthritis auslösenden Antigen. Dieser lang anhaltende therapeutische Effekt der anti-CD137 Ak-Behandlung übersteigt bei weitem die bekannte Halbwertszeit und Verweildauer des Antikörpers in den Mäusen und lässt vermuten, dass durch die Beeinflussung des CD137/CD137Ligand Systems ein aktiver und lang anhaltender immunsuppressiver Mechanismus etabliert wurde (129). Verschiedene Studien zeigten, dass ein Antikörper gegen CD137 Proliferation und Aktivität von hauptsächlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen (weniger CD4<sup>+</sup> T-Zellen) durch Hemmung des Zelltodes nach Aktivierung verstärkt (76, 126, 165, 175). Unsere Ergebnisse in dem CIA Tiermodell zeigten eine starke Vermehrung von CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> T-Zellen und eine geringe Vermehrung von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> doppelt positiven T-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung. Außerdem wurde eine antigenunabhängige erhöhte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokine INF- $\gamma$  nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung gefunden, vermutlich produziert hauptsächlich durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Über die Existenz von autoimmunitätregulierenden CD8<sup>+</sup> Antigen-spezifischen T-Zellen ist mehrfach berichtet worden, und die Generierung von CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung wurde bereits in anderen Untersuchungen vermutet (129). In diesem Zusammenhang wurden CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-Zellen in Menschen und in einem Tiermodell für Autoimmunerkrankungen charakterisiert (26, 28, 111, 137). Jedoch im Gegensatz zu unseren gefundenen erhöhten INF- $\gamma$  Werten, hemmten die CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> regulatorischen T-Zellen die INF- $\gamma$  Produktion von antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch einen Mechanismus, der abhängig war von direktem Zellkontakt und der Präsenz von APCs (137). Des Weiteren ist es mittlerweile allgemein anerkannt, dass vom Körper CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> doppelt positive regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>) generiert werden

und durch unterschiedliche Wirkungsmechanismen autoreaktive T- oder B-Zellen kontrollieren (95, 177). Die dargestellten Ergebnisse im CIA Tiermodell zeigten eine geringe, aber konstante Erhöhung der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung. Über den Einfluss des CD137-Systems auf die Generierung von immunsuppressiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen gibt es bisher kontroverse Berichte (25, 206). Von uns durchgeführte Transferexperimente mit CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> doppelt positiven regulatorischen T-Zellen aus anti-CD137 Ak-behandelten Mäusen in SLE erkrankte NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse zeigten keine Wirkung auf die Autoantikörperproduktion oder auf die Entwicklung der Autoimmunerkrankung (nicht dargestellte Ergebnisse).

Wie schon berichtet, konnten wir eine Erhöhung von IFN- $\gamma$  nach anti-CD137 Ak-Behandlung im CIA Tiermodell feststellen und es ist bekannt, dass durch Injektionen mit rekombinanten IFN- $\gamma$  es möglich ist, die Entwicklung einer Arthritis im CIA Modell zu hemmen. Jedoch sind kontinuierliche tägliche Gaben von IFN- $\gamma$  notwendig, um die Arthritisentwicklung auf längere Sicht zu verhindern (204). In diesem Zusammenhang wurde von einer Inaktivierung und Depletion von autoreaktiven B-Zellen durch Makrophagen in einem SLE Tiermodell berichtet, die aktiviert wurden durch IFN- $\gamma$  produzierende T-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung (172). Diese Ergebnisse sind bezüglich der erhöhten IFN- $\gamma$  Werte in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen, jedoch zeigten unsere Ergebnisse nur eine relative und keine absolute Veränderung der B-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung. Des Weiteren wurde im CIA Tiermodell von einer Generierung und Expansion von IFN- $\gamma$  produzierenden CD11c<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung berichtet (161). In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass durch die vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion von CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach anti-CD137 Ak-Behandlung eine vermehrte Produktion vonIDO (indoleamin 2,3 dioxygenase) in Makrophagen und DCs induziert wurde.IDO ist ein sehr stark immunsuppressiv wirkendes Enzym, welches durch Wirkung auf den Tryptophan-Stoffwechsel die T-Zellen-Aktivität hemmt. Es wurde von den Autoren vermutet, dass die Hemmung der Antigen-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der Arthritis nach anti-CD137 Ak-Behandlung durch einen IFN- $\gamma$  und IDO abhängigen Mechanismus vermittelt wird. Jedoch war eine direkte Induktion von IDO oder IFN- $\gamma$  in CD11c<sup>+</sup>-DCs durch Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors mit Hilfe eines Ak gegen CD137 nach Angaben der Autoren in vitro nicht möglich (161). Aus diesem Grund wurde eine indirekte Beeinflussung der erhöhten IDO Expression in DCs und Makrophagen durch die IFN- $\gamma$  Produktion von CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach anti-CD137 Ak-Behandlung

vermutet. Diese Beobachtung steht in Kontrast zu unseren Ergebnissen, bei denen eine vermehrte Produktion vonIDO-spezifischer RNA nach Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors mit Hilfe eines Ak gegen CD137 auf humanen DCs gefunden wurde. Anzumerken ist, dass die Kreuzvernetzung von CD137Ligand auf der Oberfläche von humanen DCs ebenfalls ein IDO-spezifisches Signal induzierte. Die Unterschiede der dargestellten Ergebnisse sind vermutlich auf die unterschiedlichen verwendeten Antikörper und die unterschiedlichen verwendeten DCs (murine gegenüber humane) und deren Herstellung zurückzuführen. Außerdem führt die Aktivierung des CD137 Rezeptors auf DCs zu einer vermehrten Sekretion von IL-6 und IL-12 und zu einer vermehrten Stimulierung und Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen (55, 198). Aufgrund dieser Beobachtung ist es möglich, dass der anti-CD137 Ak indirekt auch T-Zellen aktiviert zur vermehrten Produktion von IFN- $\gamma$  (hauptsächlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen) über vermehrte IL-12 Produktion von DCs und Bereitstellung von hoch regulierten T-Zellen aktivierenden Molekülen (kostimulatorische Moleküle) auf der Oberfläche von DCs. In diesem Zusammenhang konnte über die immunsuppressive Wirkung von IFN- $\gamma$  modifizierten DCs in einem Tiermodell für die multiple Sklerose (EAE) in Ratten berichtet werden (203). Außerdem konnte gezeigt werden, dass eine prophylaktische oder therapeutische anti-CD137 Ak-Behandlung in einem Tiermodell für allergische Atemwegserkrankungen (Asthma bronchiale) die Entwicklung oder die Progression der Erkrankung deutlich hemmen kann (148). In diesem Tiermodell war die anti-CD137 Ak-Behandlung sehr stark abhängig von IFN- $\gamma$  produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Zusammenfassend sind unsere Ergebnisse der Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung im CIA Tiermodell in Übereinstimmung mit der Vorstellung der Induktion von immun-modulatorischen und -regulatorischen Zellen. Es ist zu vermuten, dass der Antikörper gegen CD137 seine immunsuppressive Wirkung über einen IFN- $\gamma$  und/oder IDO abhängigen Mechanismus vermittelt.

#### **IV. 2. Das Tiermodell für SLE (NZB/W F1)**

Der systemische Lupus Erythematoses ist eine CD4<sup>+</sup> T- und B-Zellen abhängige Multiorgan Autoimmunerkrankung. In Versuchen mit einem Antikörper gegen CD4<sup>+</sup> T-Zellen zeigte sich, dass die Entwicklung von Autoantikörpern in NZB/WF<sub>1</sub> Mäusen sehr stark von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen abhängig ist. In diesen Versuchen wurde durch die Entfernung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht nur die Produktion von spezifischen Autoantikörpern gehemmt, sondern auch die Entwicklung und Progression der



Autoimmunerkrankung. Jedoch war die Dauer der Wirkung dieser Behandlung befristet auf die Phase der Depletion von den CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Nach Rekonstitution der T-Helfer-Zellen erkrankten die NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse erneut (75, 167, 200-202). Vergleichbare Ergebnisse wurden mit Antikörpern gegen CD40Ligand auf T-Helfer-Zellen oder mit dem CTLA-4-Ig-Fusionsprotein in den SLE Mausmodellen erzielt (155, 191). Alle diese Experimente hatten gemeinsam, dass die Wirkung der Behandlung befristet war auf die Wirkung und Verweildauer der immun-modulatorischen Reagenzien und die Autoimmunerkrankung in den SLE Mäusen wurde nicht über einen längeren Zeitraum gehemmt. Außerdem waren bisherige erfolgreiche Behandlungen in den Tiermodellen sowie in der Behandlung vom Menschen vergesellschaftet mit einer globalen Immunsuppression und einer erhöhten Infektionsgefahr (109). Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen, dass ein Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 prophylaktisch und therapeutisch die SLE ähnliche Autoimmunerkrankung in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen hemmen und unabhängig vom Zeitpunkt der Behandlung das Überleben dieser Mäuse verlängern kann. Entscheidend war dabei nicht die sehr effiziente makroskopische und mikroskopische Hemmung der Autoimmunerkrankung schon durch eine einmalige Behandlung mit einem anti-CD137 Ak, sondern dass auch eine bereits bestehende Autoimmunerkrankung in ihrer Progression gehemmt wurde und die Behandlung dabei nicht immunsuppressiv wirkte auf Fremdartigene. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung die Induktion und Progression der SLE in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen hemmen kann und gleichzeitig keinen hemmenden Effekt auf die humorale Immunantwort gegen Fremdartigene (z.B. Schaferythrozyten) hatte. Des Weiteren konnten wir zeigen, dass die Wirkung des anti-CD137 Ak bei weitem länger anhält als über die bekannte Verweildauer des Ak im Serum und vermutlich auch eine Immunität (oder Toleranz) vermittelt gegen Autoantigene in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen. Damit unterscheidet sich die Wirkung des Ak gegen CD137 wesentlich von anderen immunmodulatorischen Reagenzien und folgende grundsätzliche Fragen über die Wirkung des Ak gegen CD137 resultierten aus den Beobachtungen: Warum hat ein Antikörper gegen CD137, der die Immunantwort gegen Autoantigene hemmt, gleichzeitig aber keinen immunsuppressiven Effekt in der Immunantwort gegen Fremdartigene zeigt, einen therapeutischen Effekt auf die Autoimmunerkrankung in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen? Wie ist der exakte immunsuppressive Mechanismus der anti-CD137 Ak-Behandlung, durch den

die Autoantikörperproduktion und die Induktion und Progression der Autoimmunerkrankung in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen gehemmt wurde?

Der wesentliche Unterschied in der Aktivierung unseres Immunsystems durch Fremdartigene oder durch Autoantigene ist unter anderem die Dauer der Präsentation des Antigens. Bei Autoimmunreaktionen besteht eine chronische Aktivierung des Immunsystems durch kontinuierlich vorhandene Autoantigene. Im Gegensatz dazu sind Immunreaktionen gegenüber Fremdartigenen in der Regel von akuter und kurzer Dauer. Analog zu früheren Beobachtungen konnten wir in dieser Arbeit auch in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen zeigen, dass nach Etablierung einer humoralen Immunantwort gegen Schafserythrozyten als Fremdartigen die Antikörperproduktion durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung nicht mehr beeinflussbar ist (52, 129). Des Weiteren zeigte sich, dass B-Zellen und in einem geringeren Ausmaß auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine verkürzte Lebenszeit in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen haben. Diese Ergebnisse sprechen eher für das Vorhandensein von kurz lebenden, antigen-spezifische Antikörper (IgG-Ak) produzierende B-Zellen (Plasmazellen), die eine kontinuierliche T-Zellen-Hilfe zur Aufrechterhaltung der Autoantikörperproduktion benötigen. Diese Einschätzung wird unterstützt durch die Tatsache, dass kurz nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung durch das Fehlen einer adäquaten CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Hilfe es zu keiner Formierung von Keimzentren in der Milz kommt. Im Gegenteil: Nach Beendigung und Etablierung von länger lebenden Plasmazellen und Formierung von Keimzentren in den lymphatischen Organen hat eine anti-CD137 Ak-Behandlung keinen Effekt mehr auf die Antikörperproduktion (129). Jedoch sprechen die neueren guten Behandlungserfolge mit einem Antikörper gegen CD20 (Rituximab) bei RA- und SLE-Patienten für eine entscheidende Beteiligung von eher kürzer lebenden B-Zellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen, da CD20 normalerweise nicht auf Ak-produzierenden B-Zellen (Plasmazellen) exprimiert wird (42, 109, 113). Es ist sehr wahrscheinlich, dass der Antikörper gegen CD137 in gleicher Weise hemmend eingreift in die Entwicklung einer humoralen Immunantwort gegen Fremdartigene oder Autoantigene. Jedoch ist der Zeitpunkt des Eingreifens in die Entwicklung einer humoralen Immunantwort von entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Tatsache das B-Zellen keinen CD137 Rezeptor exprimieren, ist es sehr wahrscheinlich, dass der Ak gegen CD137 eventuell früh in den antigenspezifischen Aktivierungsprozess des Immunsystems an T-Zellen oder DCs angreift.

T-Helfer-Zellen benötigen antigenspezifische Aktivierungssignale von antigen-präsentierenden DCs, und B-Zellen benötigen im Rahmen der Formierung von Keimzentren in der Milz Reifungs-Signale von aktivierten T-Helfer-Zellen. Es wurde gezeigt, dass Kostimulation mit einem Antikörper gegen CD137 vorwiegend CD8<sup>+</sup> und in einem geringeren Ausmaß CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert und IFN- $\gamma$  produzierende spezifische Effektor T-Zellen (zytotoxische T-Zellen) produziert (18, 127, 165). Außerdem wurde gezeigt, dass ein Antikörper gegen CD137 die CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen-abhängige humorale Immunantwort, CD8<sup>+</sup> T-Zellen unabhängig, hemmen kann (129). Diese Beobachtungen stimmen mit unseren Ergebnissen überein. Wir konnten zeigen, dass eine CD8<sup>+</sup> T-Zellen-Depletion aus den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen keinen Einfluss hatte auf die Autoantikörperproduktion und keinen Einfluss hatte auf die Hemmung der Autoantikörper Produktion durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung. Jedoch wurde, wie bereits mehrmals berichtet, durch eine Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen die Autoantikörperproduktion drastisch gesenkt (52, 200). Des Weiteren wurde bereits berichtet, dass CD137 erst nach Aktivierung auf T-Zellen gefunden wurde und auf DCs konstitutiv ein funktioneller CD137 Rezeptor gefunden wurde (198). Entscheidend für die Interpretation der Ergebnisse ist, dass der Antikörper gegen CD137 nicht die Interaktion zwischen CD137 Rezeptor-CD137Ligand blockiert und in gleicher Weise die humorale Immunantwort in Mäusen hemmt, bei denen kein CD137Ligand-Molekül vorhanden ist. Aus diesen Gründen könnte der Antikörper gegen CD137 primär Zellen beeinflussen, die an der Initiierung der Immunantwort beteiligt sind oder deren Signalwege in ihrer Wirkung modifizieren. Wir konnten in der hier dargestellten Arbeit zeigen, dass nach Transfer von bereits aktivierten oder „geprimten“ CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder DCs die immunsuppressive Wirkung auf die humorale Immunantwort durch den anti-CD137 Ak aufgehoben werden kann (52). Somit ist es denkbar, dass DCs oder aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen mögliche Angriffspunkte sind in der anti-CD137 Ak-Behandlung. Die möglichen Konsequenzen eines derartigen Wirkungsmechanismus wären die beobachtete Anergie der CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die fehlende Keimzentrenbildung in der Milz, die fehlende Antigen spezifische T-Zellen Hilfe und eventuell die Generierung von regulatorischen T-Zellen. In Bezug auf die Generierung von regulatorischen T-Zellen konnten wir in unseren Experimenten nur eine geringe und nicht signifikante Erhöhung von potentiellen regulatorischen immunsuppressiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen finden. Außerdem konnte in durchgeführten Transferexperimenten mit diesen induzierten CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen nach anti-CD137

Ak-Behandlung kein immunsuppressiver Effekt nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

In einem anderen Tiermodell für den SLE (Fas defiziente, MRL/lpr Mäuse) zeigten Sun und Mitarbeiter, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung die Lymphadenopathie und die Autoimmunerkrankung in diesen Mäusen blockiert und die Lebenszeit wesentlich verlängert. Die Autoren zeigten, dass die Depletion von autoreaktiven B-Zellen und der pathognomonischen CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> negativen T-Zellen durch eine starke Erhöhung und Produktion von IFN- $\gamma$  nach der anti-CD137 Ak-Behandlung zustande kommt (172). Diese Beobachtung steht in Kontrast zu unseren Ergebnissen, bei denen wir keine vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$  verzeichnen konnten, und es wurde in verschiedenen Untersuchungen keine Depletion von autoreaktiven B-Zellen nachgewiesen. In der hier dargestellten Arbeit konnten wir vielmehr in den NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen eine erhöhte Interleukin-4 (IL-4)- und Interleukin-2 (IL-2)-Produktion in den ersten 9 Lebensmonaten nachweisen, und nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung wurde die IL-4- und IL-2-Produktion eingestellt, ohne zu einem Th<sub>1</sub> Phänotyp (Produktion von IFN- $\gamma$ ) zu wechseln. Es ist ausreichend bekannt, dass IFN- $\gamma$  eine essentielle Rolle in der Pathogenese der SLE spielt und T-Zellen kostimuliert mit CD137 Ak zu einer vermehrten Produktion von IFN- $\gamma$  führt (69, 165, 172). Außerdem konnten wir im CIA Tiermodell eine vermehrte antigenunspezifische Produktion von IFN- $\gamma$  nach anti-CD137 Ak-Behandlung nachweisen. Jedoch im NZB/W F<sub>1</sub> Tiermodell für den SLE konnten wir nach anti-CD137 Ak-Behandlung zu keinem Zeitpunkt eine Depletion oder Aktivierung von T-Zellen beobachten, und es wurde keine vermehrte Produktion des Th<sub>1</sub>-Zytokins IFN- $\gamma$  gefunden. Gründe für die grundsätzlichen Unterschiede in der beobachteten Wirkung der anti-CD137 Ak-Behandlung liegen voraussichtlich in den doch sehr unterschiedlichen Tiermodellen. Die Untersuchungen an den MRL/lpr Mäusen haben grundlegend beigetragen zu unserem Verständnis über den Prozess der CD95 vermittelten Apoptose und die Rolle der Apoptose in der Eliminierung von autoreaktiven T-Zellen, die unseren zentralen Toleranzmechanismen entkommen. Jedoch sind die klinischen Zeichen der SLE ähnlichen Erkrankung in dem NZB/W F<sub>1</sub> Tiermodell sehr unterschiedlich zur klinischen Manifestation der Autoimmunerkrankung beim Menschen. Unter anderem haben NZB/W F<sub>1</sub> Mäuse keine lymphoproliferative Erkrankung, sondern haben eher eine Lymphopenie und zeigen keinerlei Defekt in ihren Apoptosemechanismen. Des Weiteren ist die Pathogenese der Autoimmunerkrankung im CIA (Immunisierung mit Fremdanigen) und im NZB/W F<sub>1</sub>

Tiermodell (genetischer Hintergrund) grundsätzlich verschieden, und unterschiedliche Effekte sind zu erwarten nach Eingreifen in die entstehende pathologische Immunantwort mit einem Antikörper gegen CD137. Es ist anzumerken, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung in gesunden Mäusen zu verschiedenen immunologischen Abnormalitäten führt, unter anderem zu einer Lymphadenopathie, Anämie, Hepatomegalie, Vermehrung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und einer IFN- $\gamma$  und CD8<sup>+</sup> T-Zellen abhängigen Depletion von B-Zellen (139).

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass bereits eine minimale Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 zu einer Hemmung der Induktion oder der Progression der SLE ähnlichen Autoimmunerkrankung in den NZB/W F1 Mäusen führt. Außerdem konnten wir zeigen, dass die normale Immunantwort gegenüber Fremddantigenen intakt bleibt und nur die Immunantwort gegen die Autoantigene gehemmt wird. Des Weiteren hemmt der Antikörper gegen CD137 vermutlich sehr frühzeitig, in der Initiierung der Immunantwort, die Interaktion zwischen T-Zellen und DCs, die zu einer Anergie der CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen führt oder zur Generierung von regulatorischen T-Zellen.

#### **IV. 3. Ergebnisse aus dem Mausmodell für virale Infektionen (LCMV)**

Entscheidend für das Verständnis der Generierung von regulatorischen Zellen und der zu beobachtenden „Dichotomie“ der Wirkung eines anti-CD137 Ak ist, dass nicht nur T-Zellen, sondern auch andere immun-modulatorische Zellen wie DCs, Makrophagen, regulatorische T-Zellen oder NK-Zellen, CD137 exprimieren und eventuell beteiligt sind bei der Induktion einer Anergie von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Des Weiteren ist bekannt, dass der CD137 Rezeptor auf unterschiedlichen Zellen entweder konstitutiv (DCs) oder erst nach Aktivierung exprimiert wird (55, 126, 127, 198). Somit könnte auch der Zeitpunkt der Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 entscheidend sein für dessen Wirkung auf eine sich entwickelnde Immunantwort. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse in CIA- und SLE-Tiermodellen gingen wir von der Hypothese aus, dass die Hemmung der antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Immunantwort durch einen Prozess während der primären Aktivierungsphase von T-Zellen („priming Phase“) reguliert wird. Wir vermuteten, dass bei der initialen Interaktion von DCs mit T-Zellen zur Generierung einer Ag spezifischen Immunantwort ein Prozess in den DCs durch die anti-CD137 Ak-Behandlung eingeleitet wird, welcher die spezifische Aktivierung der T-Zellen hemmt. Um diese Hypothese zu testen, führten wir noch zusätzliche Untersuchungen durch. Wir untersuchten die Wirkung des anti-CD137 Antikörpers

auf die Immunantwort gegen das pathogene Maus-Virus LCMV zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurde bereits gezeigt, dass der CD137/CD137Ligand-Signalweg in der Initiierung einer spezifischen anti-viralen Immunantwort eine wichtige physiologische Rolle spielt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Effizienz der Generierung von LCMV-spezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach einer Vakzinierung mit LCMV spezifischen Peptiden durch die Behandlung mit einem CD137 Ak deutlich gesteigert werden kann (176). Außerdem sind CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen zwar nicht entscheidend beteiligt an der Entwicklung der primären anti-viralen Immunantwort, jedoch essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer adäquaten CD8<sup>+</sup> T-Zellen-„memory“-Immunantwort (82, 164, 171, 180). Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 in der primären Phase der Infektion mit dem mauspathogenen Virus LCMV zu einer vollständigen Hemmung der Entwicklung einer LCMV-spezifische Immunantwort führt. Im Gegensatz dazu konnte eine Behandlung mit dem anti-CD137 Ak nach der primären Phase der Virusinfektion die LCMV-spezifische Immunantwort verstärken. Die Abhängigkeit der Wirkung des anti-CD137 Ak auf die virus-spezifische Immunantwort vom Zeitpunkt der Behandlung spiegelte sich wieder in der unterschiedlichen Expression des CD137 Rezeptors im Verlauf einer LCMV-Infektion. Wir konnten zeigen, dass im Verlauf einer LCMV-Infektion initial nur auf den DCs (oder auch APCs) und auf T-Zellen erst nach Aktivierung (nach mehreren Tagen) der CD137 Rezeptor nachweisbar war. Außerdem konnten wir durch entsprechende Transferexperimente von DCs und T-Zellen in immun-inkompetente Mäuse nachweisen, dass der primäre Angriffspunkt des anti-CD137 Ak auf den DCs liegt und in den DCs einen Prozess in Gang bringt, der eine Hemmung der T-Zellen-Aktivierung bzw. eine „Anergie“ der CD4<sup>+</sup> T-Zellen verursacht. Es konnte gezeigt werden, dass eine anti-CD137 Ak-Behandlung zum Zeitpunkt des Vorhandenseins von eher unreifen DCs (Initiale Phase) im Verlauf einer Virusinfektion zu einer Hemmung der virusspezifischen Immunantwort führt. Jedoch nach der Initialen Phase der Virusinfektion und der Existenz von reifen (maturen) DCs führt eine Behandlung mit einem anti-CD137 Ak zu einer Verstärkung der virusspezifischen Immunantwort. Es ist anzunehmen, dass die anti-CD137 Ak-Wirkung in der ersten Phase der Immunantwort hauptsächlich durch einen Effekt auf unreife DCs vermittelt wird, durch einen Mechanismus, der bisher noch unbekannt ist. Anzunehmen sind eine eventuelle Regulierung der Präsentation von weiteren kostimulatorischen

Molekülen (CD80, CD86) oder eine Generierung von regulatorischen T-Zellen, obwohl wir in unseren Versuchen keine weiteren immunsuppressiven Zellen gefunden haben. In diesen Zusammenhang konnten wir durch Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors auf aktivierten DCs eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung des intrazellulären STAT3 Moleküls nachweisen. STAT-Moleküle („signal transducers and activators of transcription“) sind Signaltransduktionsmoleküle für eine Vielzahl von Zytokin-Rezeptoren. Nach Phosphorylierung von intrazellulären STAT-Molekülen kommt es zur Bildung von Homo- und Heterodimeren, die in den Zellkern wandern und dort als Transkriptionsfaktor fungieren (104). In Keimzentren führt die Aktivierung von STAT3 zu einer Blockierung der B-Zellen-Entwicklung. STAT3-Aktivierung durch IL-10 führt zur Entwicklungshemmung von DCs und Hemmung der Expressierung von Oberflächen-Rezeptoren, wie CD83 und CD86 (27, 153). Diese Beobachtungen stehen in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen im SLE-Tiermodell hinsichtlich der Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung auf die Interaktion von DCs und T-Zellen im Rahmen einer beginnenden Immunantwort. Unsere hier dargestellten Ergebnisse zeigten weiterhin, dass nach Reifung der DCs und Aktivierung von T-Zellen die Wirkung der anti-CD137 Ak-Behandlung vermutlich hauptsächlich durch die vermehrte Expression von CD137 Rezeptoren auf den aktivierten T-Zellen vermittelt wird und die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vor Apoptose oder dem aktivierungsabhängigen Zelltod (AICD) geschützt werden (175). Diese bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, dass die immunsuppressive Wirkung des CD137 Ak auf die humorale und die virus-spezifische Immunantwort durch unreife (immature) DCs vermittelt wird. Außerdem konnten wir zum ersten Mal in diesen Experimenten zeigen, dass nicht nur die Art der Immunantwort (chronisch oder akut), sondern auch der Zeitpunkt des Eingreifens auf eine bereits ablaufende bzw. beginnende Immunantwort mit einem Antikörper gegen CD137 entscheidend ist für die weitere Wirkung und die erzielten Effekte auf das Immunsystem. Des Weiteren unterstützen diese Ergebnisse einen möglichen Mechanismus, durch den CD137Ligand-exprimierende B-Zellen die Interaktion von unreifen DCs und T-Zellen am Beginn einer Immunantwort beeinflussen und eher in T-Zellen eine Toleranz induzieren als T-Zellen zu aktivieren. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung unterstützt, dass eine anti-Tumor-Vakzinierung mit den verschiedenen Tumor-peptiden in B-Zellen-defizienten oder B-Zellen-depletierten Mäusen deutlich effizienter ist als in Mäusen mit B-Zellen (14, 151).

#### **IV. 4. Ergebnisse zum Nachweis eventueller molekularer Mechanismen**

Es konnte mit den bisherigen Ergebnissen gezeigt werden, dass DCs eine entscheidende Bedeutung in der Vermittlung der anti-CD137 Ak-Wirkung auf eine Immunantwort haben. Außerdem wurde in verschiedenen Untersuchungen eine Induktion des in T-Zellen Tryptophan-abbauenden, immunsuppressiven Enzyms IDO (Indoleamin 2,3 dioxygenase) nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung gefunden (24, 161). IDO ist ein wichtiger immunologischer Regulator für die Aufrechterhaltung der T-Zellen-Toleranz (zelluläre Toleranzmechanismen), zum Beispiel zur Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber einem Feten im Rahmen einer Schwangerschaft und bei der CTLA-4 vermittelten Toleranz bei Transplantationen und Autoimmunerkrankungen (128). Außerdem konnte gezeigt werden, dass verschiedene pro-inflammatorische Mediatoren, wie Endotoxine und IFN- $\gamma$ , eine vermehrte Expression von IDO in den verschiedenen Geweben und Zellen induzieren können (128). Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass durch die Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors auf unreifen humanen DCs es zu einer vermehrten Expression des immunsuppressiven IDO kommt. Somit könnte ein IDO abhängiger Mechanismus verantwortlich sein für die immunsuppressive Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den verschiedenen Tiermodellen für eine Autoimmunerkrankung. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen der Hemmung der humoralen Immunantwort und konsekutiv der Autoimmunerkrankung im CIA Tiermodell (161). Su und Mitarbeiter konnten zeigen, dass durch die vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion von T-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung eine vermehrte Produktion von IDO in Makrophagen und DCs induziert wurde. Jedoch berichteten die Autoren, dass sie nach anti-CD137 Ak-Behandlung von DCs in diesen Mäusen keine IDO Expression gefunden haben (161). Als Erklärung für die gefundenen Unterschiede in den Experimenten sind unterschiedliche Aktivierungszustände (unterschiedliche Reife) der DCs denkbar und dass auf den eher reiferen „maturen“ DCs durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung kein IDO mehr induziert werden kann. Außerdem sind Unterschiede in den verwendeten Antikörpern und den Nachweismethoden für IDO mögliche weitere Erklärungen für die nicht nachweisbare IDO Expression nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung.



## **IV. 5. Wirkungsmechanismen einer anti-CD137 Ak-Behandlung**

Eine mittlerweile Vielzahl von Untersuchungen hat gezeigt, dass der Antikörper gegen CD137 eine potente, das Immunsystem modulierende Funktion besitzt und in den verschiedenen CD4<sup>+</sup> T-Zellen- und B-Zellen-abhängigen Tiermodellen für organspezifische oder systemische Autoimmunerkrankungen sowohl eine prophylaktische als auch eine therapeutische Wirkung zeigt (52, 53, 148). Inzwischen wurden verschiedene Mechanismen für die Hemmung der Autoimmunität verantwortlich gemacht, wobei die vermehrte Produktion des pro-inflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  bei den folgenden diskutierten Möglichkeiten eine wichtige Rolle spielt:

### **IV. 5.1 Induktion der Apoptose von (autoreaktiven) T-Zellen**

Die Untersuchungen über die Wirkung eines agonistischen Antikörpers gegen den CD137 Rezeptor zeigten eine Hemmung der Funktion von vor allem CD4<sup>+</sup> T-Zellen in verschiedenen Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen (161, 162, 173). Sun und Mitarbeiter zeigten bei Mäusen mit einem transgenen TCR (DO11.10 Mäuse), spezifisch gegen das OVA-Peptid (Hühnereinweiß), dass eine Behandlung mit einem agonistischen Ak gegen CD137 zu einer initialen Aktivierung und Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen führt mit anschließender Depletion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch Apoptose (173). Vergleichbare Ergebnisse wurden in einem experimentellen Tiermodell für die Uveitis berichtet. In diesen Untersuchungen zeigten T-Zellen aus den Lymphknoten 4-bis 5 Tage nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung, im Gegensatz zu den IgG behandelten Tieren, eine vermehrte Proliferation und Produktion von Zytokinen (IFN- $\gamma$ , GM-CSF, IL-2). Jedoch 10 Tage nach anti-CD137 Ak-Behandlung wurden eine verminderte Proliferation, reduzierte Produktion von Zytokinen und eine vermehrte Apoptose Rate der T-Zellen in den Tieren festgestellt (162). Des Weiteren führte eine anti-CD137 Ak-Behandlung in einem Tiermodell für die chronische GvHD („Graft versus Host disease“) in der initialen Phase zu einer Aktivierung und Proliferation von donor-spezifischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen, gefolgt von einer vermehrten Apoptose und massiven Reduzierung der Anzahl der donor CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Milz (90). Die Untersuchungen über die Rolle des CD137/CD137-Ligand-Signalwegs bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen-abhängigen Immunantworten zeigten, dass ein Antikörper gegen CD137 initial zu einer Vermehrung und Aktivierung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und im Voranschreiten der Immunantwort über eine vermehrte Induktion des Zelltodes von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach Aktivierung (AICD) zu einer Reduzierung der T-Helfer-Funktion führt. Außerdem sind diese Beobachtungen

vergleichbar mit den Ergebnissen der Experimente in FAS-defizienten Mäusen (SLE-Tiermodell) und in gesunden Mäusen (139, 172). In beiden Untersuchungen konnte eine IFN- $\gamma$ -abhängige Proliferation von T-Zellen gefunden werden mit anschließender starker Reduktion von potentiell autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen zeigten eine vergleichbare IFN- $\gamma$  abhängige Wirkung der anti-CD137 Ak-Behandlung auf die Aktivierung und Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im CIA Tiermodell, jedoch keine vermehrte Reduzierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch vermehrten Zelltod in Folge der anti-CD137 Ak-Behandlung. Im SLE-Tiermodell war grundsätzlich, unabhängig von einer anti-CD137 Ak-Behandlung, ein vermehrter Umsatz an CD4<sup>+</sup> T-Zellen und B-Zellen nachweisbar und kein vermehrter Zelltod von autoreaktiven T-Zellen nach Behandlung mit dem Antikörper gegen CD137.

#### **IV. 5.2 Generierung von regulatorischen T-Zellen**

In einem Arthritis Tiermodell (CIA) wurde über die Induktion von antigen-abhängigen CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nach Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 berichtet. Die Aktivierung dieser Subpopulation von T-Zellen benötigte nicht nur CD137 kostimulatorische Signale, sondern auch CII Antigen-Präsentation. Der Transfer von CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen aus CD137 Ak-behandelten Mäusen in gesunde naive Mäuse hemmte die CII spezifische CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Immunantwort und verhinderte die Entwicklung einer CIA in den Mäusen (161). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde eine Induktion von immunsuppressiven CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen vermutet, die spezifisch CD4<sup>+</sup> T-Zellen-abhängige Immunantworten hemmen. Des Weiteren wurde gefunden, dass die CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen vermehrt IFN- $\gamma$  produzieren und keine sonstigen immunsuppressiven Zytokine wie TGF- $\beta$ , IL-4 oder IL-10. Außerdem führte die Blockade von IFN- $\gamma$  in anti-CD137 Ak behandelten Mäusen zu einer Hemmung der immunsuppressiven Wirkung des anti-CD137 Ak und zu einer Progression der CIA in den Mäusen (161). Eine Verbindung zwischen IFN- $\gamma$  und der Hemmung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Funktion konnte in der IFN- $\gamma$  abhängigen vermehrten Expression vonIDO und iNOS (induzierbare Nitrit Oxid Synthetase) in Makrophagen und DCs gefunden werden. In diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 im CIA Tiermodell zu einer massiven Expansion von IFN- $\gamma$  produzierenden CD11c<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen führt. Des Weiteren führt die vermehrte Produktion von IFN- $\gamma$  zu einer vermehrten Expression von IDO in

Makrophagen und DCs. Durch die vermehrte Produktion vonIDO werden ein vermehrter Katabolismus von Tryptophan und die Produktion des Metaboliten „Kynurenine“ verursacht. Letztere kann Antigen aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen abtöten und somit eine Hemmung der Autoimmunerkrankung verursachen (161).

Im Gegensatz zum CIA Tiermodell wurde in einem SLE Tiermodell (MRL/lpr Mäuse) eine vermehrte Expansion von IFN- $\gamma$ -produzierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach anti-CD137 Ak-Behandlung gefunden. Eine Blockade von IFN- $\gamma$  führte zu einer Hemmung der anti-CD137 Ak vermittelten Hemmung der Autoantikörperproduktion (172). Im Kontext dieser Beobachtung wurde gezeigt, dass Kreuzvernetzung bzw. Aktivierung von Liganden von Toll-Like-Rezeptoren (TLR) und CD137 in vivo zu einer massiven Expansion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt, wobei die CD137 kostimulierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu einer TGF- $\beta$  abhängigen Hemmung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen führen (135). Trotz Nachweises eines funktionellen CD137 Rezeptors auf CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> positiven regulatorischen T-Zellen (T<sub>reg</sub>) gibt es über den Einfluss des CD137-Systems auf die Generierung von immunsuppressiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>reg</sub>-Zellen bisher kontroverse Berichte (25, 58, 125, 206). Berichte von anderen Arbeitsgruppen und unsere eigenen Erfahrungen zeigten, dass in den bisher beobachteten Tiermodellen keine immunsuppressiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nach anti-CD137 Ak-Behandlung gebildet werden (25, 52).

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten im CIA-Tiermodell eine Vermehrung von IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Jedoch konnten wir keinen Nachweis finden für spezifische CD8<sup>+</sup> regulatorische T-Zellen, die spezifisch die CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Funktion hemmen. Außerdem fanden wir im SLE-Tiermodell keine vergleichbaren Veränderungen in Bezug auf Generierung von regulatorischen T-Zellen wie im MRL/lpr-Tiermodell.

#### **IV. 5.3 Induktion einer CD4<sup>+</sup> T-Zellen-Anergie**

In den ersten Studien mit einem agonistischen Antikörper gegen CD137 konnte gezeigt werden, dass durch Gabe des anti-CD137 Ak die T-Zellen-abhängige humorale Immunantwort durch Induktion einer Anergie von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen gehemmt werden kann, wobei die Funktion der B-Zellen unbeeinflusst bleibt (129). Es wurde weiterhin vermutet, dass der agonistische Antikörper gegen CD137 in vivo die Generierung von funktionellen CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen hemmt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten, dass ein Antikörper gegen CD137 in NZB/W F<sub>1</sub> Mäusen keine massive Reduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, wie in MRL/lpr Mäusen, verursacht und die anti-CD137 Ak vermittelte Hemmung der Autoimmunerkrankung nicht CD8<sup>+</sup> T-Zellen-abhängig ist. Somit gibt es keinen Hinweis auf Generierung von regulatorischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach anti-CD137 Ak-Behandlung. Außerdem wurde gezeigt, dass nach anti-CD137 Ak-Behandlung T-Zellen vermindert IL-2 und IL-4 produzieren und nach adoptiven Transfer von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder DCs aus unbehandelten Mäusen die Wirkung der anti-CD137 Ak-Behandlung aufgehoben werden kann. Diese Ergebnisse lassen eher die Induktion einer Anergie von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung vermuten.

#### **IV. 5.4 Apoptose von (autoreaktiven) B-Zellen**

Im MRL/lpr-Tiermodell wurde nach anti-CD137 Ak-Behandlung eine massive Apoptose-Rezeptoren unabhängige (FAS und TNF) Reduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und der Anzahl von B-Zellen, aber vor allem auch von anti-DANN-produzierenden B-Zellen beobachtet. Aufgrund der Beobachtung, dass auf B-Zellen bisher kein CD137 Rezeptor gefunden wurde, ist der beobachtete Effekt nach anti-CD137 Ak-Behandlung vermutlich nicht zurückzuführen auf eine direkte Wirkung auf B-Zellen, sondern lässt eher einen indirekten Effekt vermuten. Es wurde in B6/lpr Mäusen gezeigt, dass anti-CD137 Ak-Behandlung zu einer vermehrten Produktion von IFN- $\gamma$  führt und zu einer IFN- $\gamma$ -abhängigen Depletion von autoreaktiven B-Zellen (172). Außerdem ist bekannt, dass IFN- $\gamma$  Makrophagen aktiviert und diese durch indirekte und direkte Mechanismen Lymphozyten abtöten können (37, 68). Des Weiteren konnte auch durch anti-CD137 Ak aktivierte humane Monozyten eine vermehrte Apoptose von B-Zellen induziert werden, und eine anti-CD137 Ak-Behandlung führte in einem Tiermodell für die chronische GvHD zu einer vermehrten Apoptose von empängerspezifischen autoreaktiven B-Zellen (89, 90). Im Zusammenhang zu diesen Beobachtungen zeigen CD137Ligand-transgene Mäuse eine selektive Verminderung von B-Zellen, eine Vermehrung von Makrophagen, niedrige zirkulierende IgG Spiegel und eine reduzierte humorale Immunantwort (207). Außerdem zeigen neuere Studien über die Wirkung eines Antikörpers gegen CD137 in normalen BALB/C-Mäusen ebenfalls eine massive IFN- $\gamma$ - und CD8<sup>+</sup> T-Zellen-abhängige Reduktion von B-Zellen (139). Diese Studien lassen einen Wirkungsmechanismus vermuten, bei dem es durch die Beeinflussung des

CD137-Signalweges zu einer vermehrten Produktion von IFN- $\gamma$  durch T-Zellen kommt und durch erhöhte IFN- $\gamma$  Spiegel Makrophagen aktiviert werden. Die aktivierten Makrophagen verursachen wiederum eine vermehrte Apoptose von autoreaktiven B-Zellen, was eine verminderte Produktion von Autoantikörpern und eine Hemmung der Autoimmunerkrankung bewirkt.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigten zwar im CIA-Tiermodell eine vermehrte IFN- $\gamma$  Produktion, jedoch im CIA-, SLE- oder im LCMV-Tiermodell konnte keine Verminderung der B-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung gefunden werden.

## **V. Zusammenfassung**

Autoimmunerkrankungen zählen zu den häufigsten Erkrankungen bei Kindern und Erwachsenen in der westlichen Bevölkerung. Durch den oft chronischen Verlauf der Erkrankung sind die Behandlungskosten erheblich. Obwohl die exakte Pathogenese von Autoimmunerkrankungen noch weitgehend ungeklärt ist, spielen sowohl autoreaktive T-Zellen und B-Zellen als auch DCs eine entscheidende Rolle in der Entwicklung einer Autoimmunerkrankung. Aufgrund der bisher bekannten Wirkung eines agonistischen Antikörpers gegen CD137 (4-1BB) auf die T-Zellen- und B-Zellen-vermittelten Immunantworten war es von Interesse, die Wirkung eines anti-CD137-Antikörpers auf die zellvermittelte und humorale Immunität in verschiedenen Mausmodellen für Autoimmunerkrankungen zu untersuchen. Im Tiermodell für die RA (CIA) und im Tiermodell für den SLE (NZB/NZW F<sub>1</sub>) wurde die Wirkung einer Immuntherapie mit einem monoklonalen, agonistischen Antikörper gegen CD137 getestet (52, 53, 148).

Die Zielstellungen der Arbeit waren folgende:

### **V.1 Untersuchungen der Wirkung und Effizienz eines agonistischen Ak gegen CD137 auf den Krankheitsverlauf in zwei Tiermodellen (RA und SLE) von T- und B-Zellen abhängigen Autoimmunerkrankungen**

Es wurden CIA- oder SLE-Mäuse mit einem monoklonalen Ak gegen CD137 behandelt. Anschließend wurde der Effekt dieser Behandlung auf den Krankheitsverlauf gemessen und analysiert. Nach Behandlung wurden dann im Serum der Mäuse die Autoantikörperkonzentrationen (CII-Antikörper und anti-dsDNA Ak) gemessen, der Grad der Organbeteiligung (Histologie von Gelenken und Nieren) und die Aktivität der

Autoimmunerkrankung (Aktivitäts-Score bei RA und Proteinurie bei SLE) beurteilt. Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse konnten zeigen, dass bereits durch eine einmalige Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 die Induktion der Autoimmunerkrankung entscheidend gehemmt und der weitere Krankheitsverlauf der Autoimmunerkrankungen im CIA- und dem SLE-Tiermodell beeinflusst wird. Durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung konnten effizient die Autoantikörperproduktion und vor allem die pathologischen morphologischen Veränderungen in den beteiligten Organen (Gelenke und Nieren) im CIA- und SLE-Tiermodell gehemmt werden. Außerdem konnten durch die Hemmung der krankheitsauslösenden Autoantikörperproduktion nicht nur die krankheitsspezifischen Symptome (Proteinurie) gehemmt werden, sondern auch das Überleben der Tiere deutlich verlängert werden.

## **V.2 Untersuchungen zur eventuellen Induktion einer Toleranz oder Anergie gegenüber Autoantigenen nach einer Behandlung mit anti-CD137 Ak**

In den meisten bekannten Studien mit immun-modulierenden Reagenzien war die Wirkung der Behandlung befristet auf die Wirkungs- und Verweildauer der immun-modulierenden Substanz in den Tieren, und die Autoimmunerkrankung konnte nicht über einen längeren Zeitraum gehemmt werden. Außerdem waren bisherige erfolgreiche Behandlungen von Autoimmunerkrankungen vergesellschaftet mit einer globalen Immunsuppression und einer erhöhten Infektionsgefahr. In der vorliegenden Arbeit wurde getestet, ob es möglich ist, durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung eine länger wirkende Toleranz gegenüber dem krankheitsauslösenden Antigen zu induzieren und ob dabei eine generalisierte Immunsuppression auch gegenüber Fremdartigen hervorgerufen wurde.

Wir konnten in den verschiedenen Tiermodellen zeigen, dass durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung eine Anergie oder Toleranz gegenüber den Autoantigenen induziert wird. Diese hervorgerufene immunsuppressive Wirkung überschritt deutlich die bekannte Halbwertszeit des Antikörpers im Blut von Mäusen. Außerdem konnten wir nachweisen, dass durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung eine autoantigen-spezifische Hemmung und keine generelle Hemmung der Immunantwort gegenüber Fremdartigen oder eine allgemeine Infektionsgefahr induziert wurden. Es wurden auch keine weiteren schwer wiegenden Nebenwirkungen durch die Antikörper-Behandlung beobachtet. Der entscheidende Faktor für die Hemmung der Immunantwort gegenüber einem bestimmten spezifischen Antigen war der Zeitpunkt

der Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137. Insgesamt konnten wir durch die anti-CD137 Ak-Behandlung in den CIA- und SLE-Mäusen die primär vorhandene Toleranz gegenüber den Autoantigenen wieder herstellen und dadurch in den Tieren die Autoimmunerkrankung erfolgreich behandeln.

### **V.3 Untersuchungen über einen therapeutischen Effekt einer Immuntherapie mit anti-CD137 Ak in den Tiermodellen**

Bisher bekannte Untersuchungen mit kostimulatorischen immunsuppressiven Reagenzien und verschiedenen immun-modulierenden Antikörpern zeichneten sich dadurch aus, dass sie hauptsächlich wirksam waren in der Verhinderung der Induktion der Autoimmunerkrankung und keine Wirksamkeit mehr zeigten nach Etablierung der Autoimmunerkrankung. Entscheidend für einen eventuellen klinischen Einsatz eines Antikörpers gegen CD137 war die Frage, ob eine derartige Immuntherapie einen therapeutischen Effekt hat. Es sollte geprüft werden, ob durch eine anti-CD137 Ak-Behandlung eine bereits bestehende Autoimmunerkrankung und die dazugehörige humorale Immunantwort gehemmt werden kann. Unsere in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse zeigen sehr eindrücklich, dass durch die anti-CD137 Ak-Behandlung auch eine bereits etablierte oder voranschreitende Autoimmunerkrankung in den beiden Tiermodellen erfolgreich therapeutisch gehemmt werden kann. Außerdem konnten durch die anti-CD137 Ak-Behandlung die morphologischen Veränderungen in den beteiligten Organen aufgehalten und teilweise auch eine Regression der Veränderungen hervorgerufen werden.

### **V.4 Untersuchungen zur zellulären Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den Tiermodellen für Autoimmunerkrankungen und virale Infektionen**

Es ist bekannt, dass nicht nur auf T-Zellen, sondern auch auf anderen immunologisch agierenden Zellen, wie DCs, ein funktioneller CD137 Rezeptor vorkommt. Bisherige Untersuchungen über den möglichen Wirkungsmechanismus einer anti-CD137 Ak-Behandlung zeigten sehr unterschiedliche Möglichkeiten einer eventuellen Wirkung einer derartigen Immuntherapie auf. Insbesondere ist es weiterhin unklar, welche Zelle mit einem funktionellen CD137 Rezeptor das primäre Ziel einer Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 ist. Des Weiteren sollten in diesen Untersuchungen Hinweise gefunden werden, ob eine anti-CD137 Ak-

Behandlung die Generierung von immunantwortregulierenden Zellen vermittelt oder ob der Effekt über immunregulatorische Th<sub>1</sub>- oder Th<sub>2</sub>-Zytokine vermittelt wird.

Die in dieser Arbeit demonstrierten Ergebnisse zeigten, dass eine Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 im CIA-Tiermodell eine starke Vermehrung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen verursacht und eine Erhöhung der Produktion von IFN- $\gamma$  durch die T-Zellen induziert. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen wurde im SLE Tiermodell durch die anti-CD137 Ak-Behandlung eine Reduktion der Produktion von IL-2 und IL-4 hervorgerufen, und die Hemmung der Autoantikörperproduktion war abhängig von CD4<sup>+</sup> T-Zellen und von DCs. Obwohl in beiden Tiermodellen eine Vermehrung von potentiellen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T-Zellen nach einer anti-CD137 Ak-Behandlung gefunden wurde, konnten wir keine immunsuppressive Wirkung dieser Zellen auf die Autoantikörperproduktion in den Tiermodellen nachweisen. Entscheidend für einen möglichen Angriffspunkt oder einen eventuellen Wirkungsmechanismus einer Behandlung mit einem Antikörper gegen CD137 war die Beobachtung, dass durch Transfer von bereits aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder unbehandelten DCs in SLE-Mäuse der Effekt einer anti-CD137 Ak-Behandlung aufgehoben werden kann. In zusätzlichen Untersuchungen in einem Tiermodell für Virusinfektionen konnten wir Hinweise für einen möglichen Wirkungsmechanismus der anti-CD137 Ak-Behandlung finden. Wir konnten in diesem Tiermodell zeigen, dass die Wirkung des Antikörpers auf die Generierung von virusspezifischen T-Zellen entscheidend abhängig ist vom Zeitpunkt der Behandlung oder des Eingreifens in eine antigenspezifische Immunantwort und von der Kinetik der Expression eines funktionellen CD137 Rezeptor auf immunkompetente Zellen. Es konnte dargestellt werden, dass in der ersten Phase einer spezifischen Immunantwort gegen ein bestimmtes Antigen die Wirkung des Antikörpers gegen CD137 hauptsächlich über DCs vermittelt wird. Im Fortschreiten der Immunantwort wird dann die Wirkung hauptsächlich über CD137 Rezeptoren auf T-Zellen vermittelt, und die Gabe des Antikörpers gegen CD137 führt bei T-Zellen zu einer vermehrten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen. Außerdem wird durch die anti-CD137 Ak-Behandlung das Überleben der T-Zellen durch Hemmung des Zelltodes nach Aktivierung (AICD) verlängert. Des Weiteren fanden wir in unseren Untersuchungen zu keinem Zeitpunkt einen Hinweis auf ein vermehrtes Abtöten von autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder B-Zellen. In diesen Experimenten konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass nicht nur die Art der Immunantwort (chronisch oder akut), sondern auch der Zeitpunkt des Eingreifens auf eine bereits ablaufende bzw. beginnende



Immunantwort mit einem Antikörper gegen CD137 entscheidend ist für die weitere Wirkung und die erzielten Effekte auf das Immunsystem. Des Weiteren haben in unseren Ergebnissen DCs eine entscheidende Rolle in der möglichen Wirkung eines Antikörpers gegen CD137 auf eine Immunantwort gegen Autoantigene oder auch Fremdartigene gespielt.

#### **V.5 Untersuchungen zum exakten molekularen Wirkungsmechanismus einer Immuntherapie mit einem agonistischen Ak gegen CD137**

Die bisher erzielten Ergebnisse demonstrierten eine entscheidende Rolle von DCs in der möglichen Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den untersuchten Tiermodellen. Aufgrund der Beobachtungen, dass DCs eine entscheidende Bedeutung haben, sollten in weitergehenden Untersuchungen Hinweise auf eventuelle molekulare Wirkungsmechanismen gesucht werden.

In dieser Arbeit zeigten wir durch in-vitro-Untersuchungen eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung des intrazellulären STAT3 Moleküls durch eine Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors auf DCs. STAT-Moleküle sind signalvermittelnde Moleküle für eine Vielzahl von auf der Zelloberfläche vorhandene Rezeptoren für Zytokine. Nach Phosphorylierung fungieren intrazelluläre STAT-Moleküle als Transkriptionsfaktor. Außerdem führt die Aktivierung von STAT3 in Keimzentren zu einer Blockierung der B-Zellen-Entwicklung und zu einer durch IL-10 vermittelten Entwicklungshemmung von DCs und Hemmung der Expressierung von kostimulatorischen Rezeptoren. Außerdem konnten wir zum ersten Mal zeigen, dass nicht nur durch indirekte Mechanismen eine vermehrte Bildung des immunsuppressiven Moleküls IDO in DCs hervorgerufen werden kann, sondern auch durch eine direkte Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors auf DCs. Somit könnte die Generierung von regulatorischen DCs durch die Aktivierung des CD137 Rezeptors und Produktion des immunsuppressiven IDO bzw. Aktivierung von STAT3-Molekülen verantwortlich sein für die immunsuppressive Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den verschiedenen Tiermodellen für eine Autoimmunerkrankung.

## VI. Literatur

1. **Abbas, A. K., J. Lohr, B. Knochel, V. Nagabhusanam.** 2004. T cell tolerance and autoimmunity. *Autoimmun Rev* **3**:471-5.
2. **Abrams, J. R., M. G. Lebowitz, C. A. Guzzo, B. V. Jegasothy, M. T. Goldfarb, B. S. Goffe, A. Menter, N. J. Lowe, G. Krueger, M. J. Brown, R. S. Weiner, M. J. Birkhofer, G. L. Warner, K. K. Berry, P. S. Linsley, J. G. Krueger, H. D. Ochs, S. L. Kelley, S. Kang.** 1999. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* **103**:1243-52.
3. **Andersson Gare, B.** 1999. Juvenile arthritis--who gets it, where and when? A review of current data on incidence and prevalence. *Clin Exp Rheumatol* **17**:367-74.
4. **Antonia, S. J., M. Extermann, R. A. Flavell.** 1998. Immunologic nonresponsiveness to tumors. *Crit Rev Oncog* **9**:35-41.
5. **Arnold, R., D. Brenner, M. Becker, C. R. Frey, P. H. Krammer.** 2006. How T lymphocytes switch between life and death. *Eur J Immunol* **36**:1654-8.
6. **Aruffo, A., D. Hollenbaugh, L. H. Wu, H. D. Ochs.** 1994. The molecular basis of X-linked agammaglobulinemia, hyper-IgM syndrome, and severe combined immunodeficiency in humans. *Curr Opin Hematol* **1**:12-8.
7. **Baecher-Allan, C., D. A. Hafler.** 2006. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**:203-16.
8. **Barthlott, T., G. Kassiotis, B. Stockinger.** 2003. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J Exp Med* **197**:451-60.
9. **Becker, K. G., R. M. Simon, J. E. Bailey-Wilson, B. Freidlin, W. E. Biddison, H. F. McFarland, J. M. Trent.** 1998. Clustering of non-major histocompatibility complex susceptibility candidate loci in human autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9979-84.
10. **Bennett, L., A. K. Palucka, E. Arce, V. Cantrell, J. Borvak, J. Banchereau, V. Pascual.** 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* **197**:711-23.
11. **Benseler, S. M., E. D. Silverman.** 2005. Systemic lupus erythematosus. *Pediatr Clin North Am* **52**:443-67, vi.
12. **Berek, C.** 2005. [Do B cells play an important role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis?]. *Z Rheumatol* **64**:383-8.
13. **Bretscher, P., M. Cohn.** 1970. A theory of self-nonsel discrimination. *Science* **169**:1042-9.
14. **Brodt, P., J. Gordon.** 1978. Anti-tumor immunity in B lymphocyte-deprived mice. I. Immunity to a chemically induced tumor. *J Immunol* **121**:359-62.
15. **Brunner, H. I., E. Ivaskova, J. P. Haas, A. Andreas, E. Keller, J. Hoza, S. Havelka, S. Scholz, G. Sierp, E. D. Albert.** 1993. Class I associations and frequencies of class II HLA-DRB alleles by RFLP analysis in children with rheumatoid-factor-negative juvenile chronic arthritis. *Rheumatol Int* **13**:83-8.
16. **Cannons, J. L., Y. Choi, T. H. Watts.** 2000. Role of TNF receptor-associated factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase activation during 4-1BB-dependent immune response. *J Immunol* **165**:6193-204.
17. **Cannons, J. L., K. P. Hoeflich, J. R. Woodgett, T. H. Watts.** 1999. Role of the stress kinase pathway in signaling via the T cell costimulatory receptor 4-1BB. *J Immunol* **163**:2990-8.
18. **Cannons, J. L., P. Lau, B. Ghuman, M. A. DeBenedette, H. Yagita, K. Okumura, T. H. Watts.** 2001. 4-1BB ligand induces cell division, sustains survival, and enhances effector function of CD4 and CD8 T cells with similar efficacy. *J Immunol* **167**:1313-24.

19. **Carteron, N. L., C. L. Schimenti, D. Wofsy.** 1989. Treatment of murine lupus with F(ab')<sub>2</sub> fragments of monoclonal antibody to L3T4. Suppression of autoimmunity does not depend on T helper cell depletion. *J Immunol* **142**:1470-5.
20. **Chan, T. M., K. C. Tse, C. S. Tang, M. Y. Mok, F. K. Li.** 2005. Long-term study of mycophenolate mofetil as continuous induction and maintenance treatment for diffuse proliferative lupus nephritis. *J Am Soc Nephrol* **16**:1076-84.
21. **Channing, A. A., T. Kasuga, R. E. Horowitz, E. L. Dubois, H. B. Demopoulos.** 1965. An ultrastructural study of spontaneous lupus nephritis in the NZB-BL-NZW mouse. *Am J Pathol* **47**:677-94.
22. **Chen, L., P. S. Linsley, K. E. Hellstrom.** 1993. Costimulation of T cells for tumor immunity. *Immunol Today* **14**:483-6.
23. **Childs, S. G.** 2006. The pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Orthop Nurs* **25**:140-5; quiz 146-7.
24. **Choi, B. K., T. Asai, D. S. Vinay, Y. H. Kim, B. S. Kwon.** 2006. 4-1BB-mediated amelioration of experimental autoimmune uveoretinitis is caused by indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanisms. *Cytokine* **34**:233-42.
25. **Choi, B. K., J. S. Bae, E. M. Choi, W. J. Kang, S. Sakaguchi, D. S. Vinay, B. S. Kwon.** 2004. 4-1BB-dependent inhibition of immunosuppression by activated CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T cells. *J Leukoc Biol* **75**:785-91.
26. **Colovai, A. I., Z. Liu, R. Ciubotariu, S. Lederman, R. Cortesini, N. Suci-Foca.** 2000. Induction of xenoreactive CD4<sup>+</sup> T-cell anergy by suppressor CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells. *Transplantation* **69**:1304-10.
27. **Corinti, S., C. Albanesi, A. la Sala, S. Pastore, G. Girolomoni.** 2001. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol* **166**:4312-8.
28. **Cosmi, L., F. Liotta, E. Lazzeri, M. Francalanci, R. Angeli, B. Mazzinghi, V. Santarlasci, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani, F. Annunziato.** 2003. Human CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> thymocytes share phenotypic and functional features with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory thymocytes. *Blood* **102**:4107-14.
29. **Coyle, A. J., J. C. Gutierrez-Ramos.** 2001. The expanding B7 superfamily: increasing complexity in costimulatory signals regulating T cell function. *Nat Immunol* **2**:203-9.
30. **Croft, M.** 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* **3**:609-20.
31. **Croft, M.** 2003. Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**:265-73.
32. **Cyster, J. G., S. B. Hartley, C. C. Goodnow.** 1994. Competition for follicular niches excludes self-reactive cells from the recirculating B-cell repertoire. *Nature* **371**:389-95.
33. **Dahlquist, G.** 1998. The aetiology of type 1 diabetes: an epidemiological perspective. *Acta Paediatr Suppl* **425**:5-10.
34. **Davidson, A., B. Diamond.** 2001. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* **345**:340-50.
35. **DeBenedette, M. A., A. Shahinian, T. W. Mak, T. H. Watts.** 1997. Costimulation of CD28<sup>-</sup> T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J Immunol* **158**:551-9.
36. **DeSilva, D. R., K. B. Urdahl, M. K. Jenkins.** 1991. Clonal anergy is induced in vitro by T cell receptor occupancy in the absence of proliferation. *J Immunol* **147**:3261-7.
37. **Ding, A. H., C. F. Nathan, D. J. Stuehr.** 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* **141**:2407-12.
38. **Dorner, T.** 2006. Crossroads of B cell activation in autoimmunity: rationale of targeting B cells. *J Rheumatol Suppl* **77**:3-11.

39. **Dörner, T.** 2006. Crossroads of B Cell Activation in Autoimmunity: Rationale of Targeting B Cells. *J Rheumatol* **33**:3-11.
40. **Durie, F. H., R. A. Fava, T. M. Foy, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, R. J. Noelle.** 1993. Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* **261**:1328-30.
41. **Edwards, C. J.** 2005. Immunological therapies for rheumatoid arthritis. *Br Med Bull* **73-74**:71-82.
42. **Edwards, J. C., G. Cambridge.** 2006. B-cell targeting in rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* **6**:394-403.
43. **Edwards, J. C., G. Cambridge.** 2001. Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* **40**:205-11.
44. **Eisenberg, R., D. Albert.** 2006. B-cell targeted therapies in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**:20-7.
45. **Falcone, M., N. Sarvetnick.** 1999. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr Opin Immunol* **11**:670-6.
46. **Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, H. G. Rammensee.** 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* **351**:290-6.
47. **Fallarino, F., U. Grohmann, K. W. Hwang, C. Orabona, C. Vacca, R. Bianchi, M. L. Belladonna, M. C. Fioretti, M. L. Alegre, P. Puccetti.** 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* **4**:1206-12.
48. **Feldmann, M., F. M. Brennan, R. N. Maini.** 1996. Rheumatoid arthritis. *Cell* **85**:307-10.
49. **Feldmann, M., P. Charles, P. Taylor, R. N. Maini.** 1998. Biological insights from clinical trials with anti-TNF therapy. *Springer Semin Immunopathol* **20**:211-28.
50. **Feldmann, M., L. Steinman.** 2005. Design of effective immunotherapy for human autoimmunity. *Nature* **435**:612-9.
51. **Flavell, R. A., D. A. Hafler.** 1999. Autoimmunity. What is the turning point? *Curr Opin Immunol* **11**:635-7.
52. **Foell, J., S. Strahotin, S. P. O'Neil, M. M. McCausland, C. Suwyn, M. Haber, P. N. Chander, A. S. Bapat, X. J. Yan, N. Chiorazzi, M. K. Hoffmann, R. S. Mittler.** 2003. CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. *J Clin Invest* **111**:1505-18.
53. **Foell, J. L., B. I. Diez-Mendiondo, O. H. Diez, U. Holzer, P. Ruck, A. S. Bapat, M. K. Hoffmann, R. S. Mittler, G. E. Dannecker.** 2004. Engagement of the CD137 (4-1BB) costimulatory molecule inhibits and reverses the autoimmune process in collagen-induced arthritis and establishes lasting disease resistance. *Immunology* **113**:89-98.
54. **Foy, T. M., A. Aruffo, J. Bajorath, J. E. Buhlmann, R. J. Noelle.** 1996. Immune regulation by CD40 and its ligand GP39. *Annu Rev Immunol* **14**:591-617.
55. **Futagawa, T., H. Akiba, T. Kodama, K. Takeda, Y. Hosoda, H. Yagita, K. Okumura.** 2002. Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int Immunol* **14**:275-86.
56. **Galvin, J. E., M. E. Hemric, K. Ward, M. W. Cunningham.** 2000. Cytotoxic mAb from rheumatic carditis recognizes heart valves and laminin. *J Clin Invest* **106**:217-24.
57. **Gattorno, M., P. Picco, G. Barbano, F. Stalla, M. P. Sormani, A. Buoncompagni, R. Gusmano, C. Borrone, V. Pistoia.** 1998. Differences in tumor necrosis factor-alpha soluble receptor serum concentrations between patients with Henoch-Schonlein purpura and pediatric systemic lupus erythematosus: pathogenetic implications. *J Rheumatol* **25**:361-5.

58. **Gavin, M. A., S. R. Clarke, E. Negrou, A. Gallegos, A. Rudensky.** 2002. Homeostasis and anergy of CD4(+)CD25(+) suppressor T cells in vivo. *Nat Immunol* **3**:33-41.
59. **Genth, E., R. Mierau.** 1997. Autoantibodies in systemic rheumatic disorders clinical and diagnostic relevance. *Rev Rhum Engl Ed* **64**:149S-152S.
60. **Gladman, D. D., M. B. Urowitz, G. A. Darlington.** 1999. Disease expression and class II HLA antigens in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **8**:466-70.
61. **Gondek, D. C., L. F. Lu, S. A. Quezada, S. Sakaguchi, R. J. Noelle.** 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol* **174**:1783-6.
62. **Goodnow, C. C., J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, C. G. Vinuesa.** 2005. Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity. *Nature* **435**:590-7.
63. **Gravestain, L. A., J. Borst.** 1998. Tumor necrosis factor receptor family members in the immune system. *Semin Immunol* **10**:423-34.
64. **Greenfield, E. A., K. A. Nguyen, V. K. Kuchroo.** 1998. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* **18**:389-418.
65. **Grossman, W. J., J. W. Verbsky, W. Barchet, M. Colonna, J. P. Atkinson, T. J. Ley.** 2004. Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* **21**:589-601.
66. **Grumet, F. C., A. Coukell, J. G. Bodmer, W. F. Bodmer, H. O. McDevitt.** 1971. Histocompatibility (HL-A) antigens associated with systemic lupus erythematosus. A possible genetic predisposition to disease. *N Engl J Med* **285**:193-6.
67. **Haas, J. P., H. Truckenbrodt, C. Paul, J. Hoza, S. Scholz, E. D. Albert.** 1994. Subtypes of HLA-DRB1\*03, \*08, \*11, \*12, \*13 and \*14 in early onset pauciarticular juvenile chronic arthritis (EOPA) with and without iridocyclitis. *Clin Exp Rheumatol* **12 Suppl 10**:S7-14.
68. **Haendeler, J., A. M. Zeiher, S. Dimmeler.** 1999. Nitric oxide and apoptosis. *Vitam Horm* **57**:49-77.
69. **Halstead, E. S., Y. M. Mueller, J. D. Altman, P. D. Katsikis.** 2002. In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8+ T cell responses. *Nat Immunol* **3**:536-41.
70. **Harding, F. A., J. G. McArthur, J. A. Gross, D. H. Raullet, J. P. Allison.** 1992. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* **356**:607-9.
71. **Hochberg, M. C.** 1985. The incidence of systemic lupus erythematosus in Baltimore, Maryland, 1970-1977. *Arthritis Rheum* **28**:80-6.
72. **Holmdahl, R., L. Jansson, A. Larsson, R. Jonsson.** 1990. Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies. *Scand J Immunol* **31**:147-57.
73. **Holmdahl, R., L. Klareskog, K. Rubin, E. Larsson, H. Wigzell.** 1985. T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. *Scand J Immunol* **22**:295-306.
74. **Howard, L. M., S. D. Miller.** 2004. Immunotherapy targeting the CD40/CD154 costimulatory pathway for treatment of autoimmune disease. *Autoimmunity* **37**:411-8.
75. **Humbert, M., P. Galanaud.** 1990. B-lymphocyte hyperreactivity and differentiation factors of T-lymphocytes in systemic lupus erythematosus. *Ann Med Interne (Paris)* **141**:213-6.
76. **Hurtado, J. C., Y. J. Kim, B. S. Kwon.** 1997. Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. *J Immunol* **158**:2600-9.

77. **Huscher, D., S. Merkesdal, K. Thiele, H. Zeidler, M. Schneider, A. Zink.** 2006. Cost of illness in rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis and systemic lupus erythematosus in Germany. *Ann Rheum Dis* **65**:1175-83.
78. **Ignatowicz, L., J. Kappler, and P. Marrack.** 1996. The repertoire of T cells shaped by a single MHC/peptide ligand. *Cell* **84**:521-9.
79. **Inaba, K., M. Inaba, N. Romani, H. Aya, M. Deguchi, S. Ikehara, S. Muramatsu, R. M. Steinman.** 1992. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**:1693-702.
80. **Jacobson, D. L., S. J. Gange, N. R. Rose, N. M. Graham.** 1997. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol* **84**:223-43.
81. **Janeway, C. A., Jr., K. Bottomly.** 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell* **76**:275-85.
82. **Janssen, E. M., E. E. Lemmens, T. Wolfe, U. Christen, M. G. von Herrath, S. P. Schoenberger.** 2003. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* **421**:852-6.
83. **Jenkins, M. K., R. H. Schwartz.** 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med* **165**:302-19.
84. **Jenkins, M. K., P. S. Taylor, S. D. Norton, K. B. Urdahl.** 1991. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J Immunol* **147**:2461-6.
85. **Kadowaki, K. M., H. Matsuno, H. Tsuji, I. Tunru.** 1994. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol* **97**:212-8.
86. **Kaech, S. M., E. J. Wherry, R. Ahmed.** 2002. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* **2**:251-62.
87. **Kelsoe, G.** 1996. The germinal center: a crucible for lymphocyte selection. *Semin Immunol* **8**:179-84.
88. **Keystone, E.** 2005. B cell targeted therapies. *Arthritis Res Ther* **7 Suppl 3**:S13-8.
89. **Kienzle, G., J. von Kempis.** 2000. CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int Immunol* **12**:73-82.
90. **Kim, J., W. S. Choi, S. La, J. H. Suh, B. S. Kim, H. R. Cho, B. S. Kwon, B. Kwon.** 2005. Stimulation with 4-1BB (CD137) inhibits chronic graft-versus-host disease by inducing activation-induced cell death of donor CD4+ T cells. *Blood* **105**:2206-13.
91. **Komata, T., N. Tsuchiya, M. Matsushita, K. Hagiwara, K. Tokunaga.** 1999. Association of tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2) polymorphism with susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Tissue Antigens* **53**:527-33.
92. **Kouskoff, V., D. Nemazee.** 2001. Role of receptor editing and revision in shaping the B and T lymphocyte repertoire. *Life Sci* **69**:1105-13.
93. **Kovanen, P. E., W. J. Leonard.** 2004. Cytokines and immunodeficiency diseases: critical roles of the gamma(c)-dependent cytokines interleukins 2, 4, 7, 9, 15, and 21, and their signaling pathways. *Immunol Rev* **202**:67-83.
94. **Kroczeck, R. A., H. W. Mages, A. Hutloff.** 2004. Emerging paradigms of T-cell co-stimulation. *Curr Opin Immunol* **16**:321-7.
95. **Kronenberg, M., A. Rudensky.** 2005. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature* **435**:598-604.

96. **Kummerle-Deschner, J. B., M. K. Hoffmann, D. Niethammer, G. E. Dannecker.** 1998. Pediatric rheumatology: autoimmune mechanisms and therapeutic strategies. *Immunol Today* **19**:250-3.
97. **Kwon, B. S., J. C. Hurtado, Z. H. Lee, K. B. Kwack, S. K. Seo, B. K. Choi, B. H. Koller, G. Wolisi, H. E. Broxmeyer, D. S. Vinay.** 2002. Immune responses in 4-1BB (CD137)-deficient mice. *J Immunol* **168**:5483-90.
98. **Kyburz, D., D. A. Carson, M. Corr.** 2000. The role of CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic K/BxN mouse model of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **43**:2571-7.
99. **Lafferty, K. J., A. J. Cunningham.** 1975. A new analysis of allogeneic interactions. *Aust J Exp Biol Med Sci* **53**:27-42.
100. **Laufer, T. M., J. DeKoning, J. S. Markowitz, D. Lo, L. H. Glimcher.** 1996. Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* **383**:81-5.
101. **Leandro, M. J., J. C. Edwards, G. Cambridge.** 2002. Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion. *Ann Rheum Dis* **61**:883-8.
102. **Lenschow, D. J., S. C. Ho, H. Sattar, L. Rhee, G. Gray, N. Nabavi, K. C. Herold, J. A. Bluestone.** 1995. Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse. *J Exp Med* **181**:1145-55.
103. **Lenschow, D. J., T. L. Walunas, J. A. Bluestone.** 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol* **14**:233-58.
104. **Levy, D. E., C. K. Lee.** 2002. What does Stat3 do? *J Clin Invest* **109**:1143-8.
105. **Li, L., V. A. Boussiotis.** 2006. Physiologic regulation of central and peripheral T cell tolerance: lessons for therapeutic applications. *J Mol Med* **84**:887-99.
106. **Liebowitz, D. N., K. P. Lee, C. H. June.** 1998. Costimulatory approaches to adoptive immunotherapy. *Curr Opin Oncol* **10**:533-41.
107. **Lineberry, N., C. G. Fathman.** 2006. T cell anergy: where it's LAT. *Immunity* **24**:501-3.
108. **Linsley, P. S., W. Brady, M. Urnes, L. S. Grosmaire, N. K. Damle, J. A. Ledbetter.** 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* **174**:561-9.
109. **Liopsis, S. N., P. P. Sfikakis.** 2004. Costimulation blockade in the treatment of rheumatic diseases. *BioDrugs* **18**:95-102.
110. **Liston, A., S. Lesage, D. H. Gray, R. L. Boyd, C. C. Goodnow.** 2005. Genetic lesions in T-cell tolerance and thresholds for autoimmunity. *Immunol Rev* **204**:87-101.
111. **Liu, Z., S. Tugulea, R. Cortesini, N. Suci-Foca.** 1998. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *Int Immunol* **10**:775-83.
112. **Livak, K. J., T. D. Schmittgen.** 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**:402-8.
113. **Looney, R. J., J. Anolik, I. Sanz.** 2004. B cells as therapeutic targets for rheumatic diseases. *Curr Opin Rheumatol* **16**:180-5.
114. **Looney, R. J., J. Anolik, I. Sanz.** 2004. B lymphocytes in systemic lupus erythematosus: lessons from therapy targeting B cells. *Lupus* **13**:381-90.
115. **Luhder, F., J. Katz, C. Benoist, D. Mathis.** 1998. Major histocompatibility complex class II molecules can protect from diabetes by positively selecting T cells with additional specificities. *J Exp Med* **187**:379-87.

116. **Lunt, M., D. P. Symmons, A. J. Silman.** 2005. An evaluation of the decision tree format of the American College of Rheumatology 1987 classification criteria for rheumatoid arthritis: performance over five years in a primary care-based prospective study. *Arthritis Rheum* **52**:2277-83.
117. **Macdermott, E., A. Adams, T. Lehman.** 2007. Review: Systemic lupus erythematosus in children: current and emerging therapies. *Lupus* **16**:677-83.
118. **Magnusson, V., B. Nakken, A. I. Bolstad, M. E. Alarcon-Riquelme.** 2001. Cytokine polymorphisms in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Scand J Immunol* **54**:55-61.
119. **Malkiel, S., L. Liao, M. W. Cunningham, B. Diamond.** 2000. T-Cell-dependent antibody response to the dominant epitope of streptococcal polysaccharide, N-acetylglucosamine, is cross-reactive with cardiac myosin. *Infect Immun* **68**:5803-8.
120. **Marrack, P., J. Kappler.** 2004. Control of T cell viability. *Annu Rev Immunol* **22**:765-87.
121. **Martin, F., A. C. Chan.** 2004. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* **20**:517-27.
122. **Marx, J. L.** 1982. Monoclonal antibodies in cancer. *Science* **216**:283-5.
123. **Mason, D., F. Powrie.** 1998. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr Opin Immunol* **10**:649-55.
124. **McHeyzer-Williams, L. J., L. P. Malherbe, M. G. McHeyzer-Williams.** 2006. Helper T cell-regulated B cell immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* **311**:59-83.
125. **McHugh, R. S., M. J. Whitters, C. A. Piccirillo, D. A. Young, E. M. Shevach, M. Collins, M. C. Byrne.** 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**:311-23.
126. **Melero, I., J. V. Johnston, W. W. Shufford, R. S. Mittler, L. Chen.** 1998. NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol* **190**:167-72.
127. **Melero, I., W. W. Shuford, S. A. Newby, A. Aruffo, J. A. Ledbetter, K. E. Hellstrom, R. S. Mittler, L. Chen.** 1997. Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat Med* **3**:682-5.
128. **Mellor, A. L., D. H. Munn.** 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* **4**:762-74.
129. **Mittler, R. S., T. S. Bailey, K. Klussman, M. D. Trailsmith, M. K. Hoffmann.** 1999. Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell anergy. *J Exp Med* **190**:1535-40.
130. **Mittler, R. S., B. M. Rankin, P. A. Kiener.** 1991. Physical associations between CD45 and CD4 or CD8 occur as late activation events in antigen receptor-stimulated human T cells. *J Immunol* **147**:3434-40.
131. **Morel, L., E. K. Wakeland.** 1998. Susceptibility to lupus nephritis in the NZB/W model system. *Curr Opin Immunol* **10**:718-25.
132. **Moreland, L. W., S. W. Baumgartner, M. H. Schiff, E. A. Tindall, R. M. Fleischmann, A. L. Weaver, R. E. Ettliger, S. Cohen, W. J. Koopman, K. Mohler, M. B. Widmer, C. M. Bloesch.** 1997. Treatment of rheumatoid arthritis with a recombinant human tumor necrosis factor receptor (p75)-Fc fusion protein. *N Engl J Med* **337**:141-7.
133. **Munn, D. H.** 2006. Indoleamine 2,3-dioxygenase, tumor-induced tolerance and counter-regulation. *Curr Opin Immunol* **18**:220-5.



134. **Murali-Krishna, K., J. D. Altman, M. Suresh, D. J. Sourdive, A. J. Zajac, J. D. Miller, J. Slansky, R. Ahmed.** 1998. Counting antigen-specific CD8 T cells: a reevaluation of bystander activation during viral infection. *Immunity* **8**:177-87.
135. **Myers, L., C. Takahashi, R. S. Mittler, R. J. Rossi, A. T. Vella.** 2003. Effector CD8 T cells possess suppressor function after 4-1BB and Toll-like receptor triggering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:5348-53.
136. **Myers, L. K., E. F. Rosloniec, M. A. Cremer, A. H. Kang.** 1997. Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* **61**:1861-78.
137. **Najafian, N., T. Chitnis, A. D. Salama, B. Zhu, C. Benou, X. Yuan, M. R. Clarkson, M. H. Sayegh, S. J. Khoury.** 2003. Regulatory functions of CD8+CD28-T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* **112**:1037-48.
138. **Nemazee, D.** 2006. Receptor editing in lymphocyte development and central tolerance. *Nat Rev Immunol* **6**:728-40.
139. **Niu, L., S. Strahotin, B. Hewes, B. Zhang, Y. Zhang, D. Archer, T. Spencer, D. Dillehay, B. Kwon, L. Chen, A. T. Vella, R. S. Mittler.** 2007. Cytokine-mediated disruption of lymphocyte trafficking, hemopoiesis, and induction of lymphopenia, anemia, and thrombocytopenia in anti-CD137-treated mice. *J Immunol* **178**:4194-213.
140. **Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez, B. G. Weinshenker.** 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* **343**:938-52.
141. **Nussbaum, A. K., T. P. Dick, W. Keilholz, M. Schirle, S. Stevanovic, K. Dietz, W. Heinemeyer, M. Groll, D. H. Wolf, R. Huber, H. G. Rammensee, H. Schild.** 1998. Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:12504-9.
142. **Olsen, N. J., L. F. Callahan, R. H. Brooks, E. P. Nance, J. J. Kaye, P. Stastny, T. Pincus.** 1988. Associations of HLA-DR4 with rheumatoid factor and radiographic severity in rheumatoid arthritis. *Am J Med* **84**:257-64.
143. **Palmer, D. G.** 1995. The anatomy of the rheumatoid lesion. *Br Med Bull* **51**:286-95.
144. **Paust, S., L. Lu, N. McCarty, H. Cantor.** 2004. Engagement of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:10398-403.
145. **Pelkonen, P. M., H. J. Jalanko, R. K. Lantto, A. L. Makela, M. A. Pietikainen, H. A. Savolainen, P. M. Verronen.** 1994. Incidence of systemic connective tissue diseases in children: a nationwide prospective study in Finland. *J Rheumatol* **21**:2143-6.
146. **Pollok, K. E., Y. J. Kim, J. Hurtado, Z. Zhou, K. K. Kim, B. S. Kwon.** 1994. 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti-mu-primed splenic B cells. *Eur J Immunol* **24**:367-74.
147. **Pollok, K. E., Y. J. Kim, Z. Zhou, J. Hurtado, K. K. Kim, R. T. Pickard, B. S. Kwon.** 1993. Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J Immunol* **150**:771-81.
148. **Polte, T., J. Foell, C. Werner, H. G. Hoymann, A. Braun, S. Burdach, R. S. Mittler, G. Hansen.** 2006. CD137-mediated immunotherapy for allergic asthma. *J Clin Invest* **116**:1025-36.
149. **Powell, J. D.** 2006. The induction and maintenance of T cell anergy. *Clin Immunol* **120**:239-46.
150. **Prakken, A. B., W. van Eden, G. T. Rijkers, W. Kuis, E. A. Toebes, E. R. de Graeff-Meeder, R. van der Zee, B. J. Zegers.** 1996. Autoreactivity to human heat-shock protein 60 predicts disease remission in oligoarticular juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* **39**:1826-32.
151. **Qin, Z., G. Richter, T. Schuler, S. Ibe, X. Cao, T. Blankenstein.** 1998. B cells inhibit induction of T cell-dependent tumor immunity. *Nat Med* **4**:627-30.

152. **Racke, M. K., D. E. Scott, L. Quigley, G. S. Gray, R. Abe, C. H. June, P. J. Perrin.** 1995. Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis. *J Clin Invest* **96**:2195-203.
153. **Reljic, R., S. D. Wagner, L. J. Peakman, D. T. Fearon.** 2000. Suppression of signal transducer and activator of transcription 3-dependent B lymphocyte terminal differentiation by BCL-6. *J Exp Med* **192**:1841-8.
154. **Rieux-Laucat, F., F. Le Deist, A. Fischer.** 2003. Autoimmune lymphoproliferative syndromes: genetic defects of apoptosis pathways. *Cell Death Differ* **10**:124-33.
155. **Sabahi, R., J. H. Anolik.** 2006. B-cell-targeted therapy for systemic lupus erythematosus. *Drugs* **66**:1933-48.
156. **Sakaguchi, S., M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, T. Nomura.** 2006. Foxp3<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* **212**:8-27.
157. **Saoulli, K., S. Y. Lee, J. L. Cannons, W. C. Yeh, A. Santana, M. D. Goldstein, N. Bangia, M. A. DeBenedette, T. W. Mak, Y. Choi, T. H. Watts.** 1998. CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J Exp Med* **187**:1849-62.
158. **Schmidt, D., J. Verdaguer, N. Averill, P. Santamaria.** 1997. A mechanism for the major histocompatibility complex-linked resistance to autoimmunity. *J Exp Med* **186**:1059-75.
159. **Schmitz, M. L., D. Krappmann.** 2006. Controlling NF-kappaB activation in T cells by costimulatory receptors. *Cell Death Differ* **13**:834-42.
160. **Seki, N., Y. Sudo, T. Yoshioka, S. Sugihara, T. Fujitsu, S. Sakuma, T. Ogawa, T. Hamaoka, H. Senoh, H. Fujiwara.** 1988. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* **140**:1477-84.
161. **Seo, S. K., J. H. Choi, Y. H. Kim, W. J. Kang, H. Y. Park, J. H. Suh, B. K. Choi, D. S. Vinay, B. S. Kwon.** 2004. 4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. *Nat Med* **10**:1088-94.
162. **Shao, H., Y. Fu, T. Liao, Y. Peng, L. Chen, H. J. Kaplan, D. Sun.** 2005. Anti-CD137 mAb treatment inhibits experimental autoimmune uveitis by limiting expansion and increasing apoptotic death of uveitogenic T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**:596-603.
163. **Sharpe, A. H., G. J. Freeman.** 2002. The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* **2**:116-26.
164. **Shedlock, D. J., H. Shen.** 2003. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* **300**:337-9.
165. **Shuford, W. W., K. Klussman, D. D. Tritchler, D. T. Loo, J. Chalupny, A. W. Siadak, T. J. Brown, J. Emswiler, H. Raecho, C. P. Larsen, T. C. Pearson, J. A. Ledbetter, A. Aruffo, R. S. Mittler.** 1997. 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8<sup>+</sup> T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cell responses. *J Exp Med* **186**:47-55.
166. **Singh, N. J., R. H. Schwartz.** 2006. Primer: mechanisms of immunologic tolerance. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**:44-52.
167. **Sobel, E. S., V. N. Kakkanaiah, M. Kakkanaiah, R. L. Cheek, P. L. Cohen, R. A. Eisenberg.** 1994. T-B collaboration for autoantibody production in lpr mice is cognate and MHC-restricted. *J Immunol* **152**:6011-6.
168. **Steward, M. W., F. C. Hay.** 1976. Changes in immunoglobulin class and subclass of anti-DNA antibodies with increasing age in N/ZBW F1 hybrid mice. *Clin Exp Immunol* **26**:363-70.

169. **Strunk, J., U. Lange, U. Muller-Ladner.** 2005. Rheumatoid arthritis. *Dtsch Med Wochenschr* **130**:1761-8; quiz 1769-72.
170. **Stuart, J. M., F. J. Dixon.** 1983. Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J Exp Med* **158**:378-92.
171. **Sun, J. C., M. J. Bevan.** 2003. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science* **300**:339-42.
172. **Sun, Y., H. M. Chen, S. K. Subudhi, J. Chen, R. Koka, L. Chen, Y. X. Fu.** 2002. Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nat Med* **8**:1405-13.
173. **Sun, Y., X. Lin, H. M. Chen, Q. Wu, S. K. Subudhi, L. Chen, Y. X. Fu.** 2002. Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* **168**:1457-65.
174. **Sykes, M., B. Nikolic.** 2005. Treatment of severe autoimmune disease by stem-cell transplantation. *Nature* **435**:620-7.
175. **Takahashi, C., R. S. Mittler, A. T. Vella.** 1999. Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J Immunol* **162**:5037-40.
176. **Tan, J. T., J. K. Whitmire, K. Murali-Krishna, R. Ahmed, J. D. Altman, R. S. Mittler, A. Sette, T. C. Pearson, C. P. Larsen.** 2000. 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J Immunol* **164**:2320-5.
177. **Tang, Q., J. A. Bluestone.** 2006. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev* **212**:217-37.
178. **Taylor, P. C., C. Plater-Zyberk, R. N. Maini.** 1995. The role of the B cells in the adoptive transfer of collagen-induced arthritis from DBA/1 (H-2q) to SCID (H-2d) mice. *Eur J Immunol* **25**:763-9.
179. **Thompson, C. B., J. P. Allison.** 1997. The emerging role of CTLA-4 as an immune attenuator. *Immunity* **7**:445-50.
180. **Thomsen, A. R., J. Johansen, O. Marker, J. P. Christensen.** 1996. Exhaustion of CTL memory and recrudescence of viremia in lymphocytic choriomeningitis virus-infected MHC class II-deficient mice and B cell-deficient mice. *J Immunol* **157**:3074-80.
181. **Torgerson, T. R.** 2006. Regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Springer Semin Immunopathol* **28**:63-76.
182. **Torres, B. A., H. M. Johnson.** 1998. Modulation of disease by superantigens. *Curr Opin Immunol* **10**:465-70.
183. **Vasoo, S., G. R. Hughes.** 2005. Theory, targets and therapy in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **14**:181-8.
184. **Vernet, C., I. Sidibe, P. Pontarotti.** 1992. [Organization of the chromosomal region of the major human histocompatibility complex]. *Pathol Biol (Paris)* **40**:822-30.
185. **Vinay, D. S., B. S. Kwon.** 1998. Role of 4-1BB in immune responses. *Semin Immunol* **10**:481-9.
186. **von Koskull, S., H. Truckenbrodt, R. Holle, A. Hormann.** 2001. Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective study. *Ann Rheum Dis* **60**:940-5.
187. **Wakeland, E. K., K. Liu, R. R. Graham, T. W. Behrens.** 2001. Delineating the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Immunity* **15**:397-408.
188. **Wakeland, E. K., A. E. Wandstrat, K. Liu, L. Morel.** 1999. Genetic dissection of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol* **11**:701-7.
189. **Walker, L. S., A. K. Abbas.** 2002. The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* **2**:11-9.

190. **Wang, H., S. A. Marsters, T. Baker, B. Chan, W. P. Lee, L. Fu, D. Tumas, M. Yan, V. M. Dixit, A. Ashkenazi, I. S. Grewal.** 2001. TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nat Immunol* **2**:632-7.
191. **Wang, X., W. Huang, L. E. Schiffer, M. Mihara, A. Akkerman, K. Hiromatsu, A. Davidson.** 2003. Effects of anti-CD154 treatment on B cells in murine systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **48**:495-506.
192. **Wardemann, H., S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, M. C. Nussenzweig.** 2003. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* **301**:1374-7.
193. **Watts, T. H.** 2005. TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses. *Annu Rev Immunol* **23**:23-68.
194. **Watts, T. H., M. A. DeBenedette.** 1999. T cell co-stimulatory molecules other than CD28. *Curr Opin Immunol* **11**:286-93.
195. **Webb, L. M., M. J. Walmsley, M. Feldmann.** 1996. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur J Immunol* **26**:2320-8.
196. **Weyand, C. M., J. J. Goronzy.** 2006. T-cell-targeted therapies in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* **2**:201-10.
197. **Whitehead, T. P., L. J. Kricka, T. J. Carter, G. H. Thorpe.** 1979. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin Chem* **25**:1531-46.
198. **Wilcox, R. A., A. I. Chapoval, K. S. Gorski, M. Otsuji, T. Shin, D. B. Flies, K. Tamada, R. S. Mittler, H. Tsuchiya, D. M. Pardoll, L. Chen.** 2002. Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J Immunol* **168**:4262-7.
199. **Wilcox, R. A., D. B. Flies, G. Zhu, A. J. Johnson, K. Tamada, A. I. Chapoval, S. E. Strome, L. R. Pease, L. Chen.** 2002. Provision of antigen and CD137 signaling breaks immunological ignorance, promoting regression of poorly immunogenic tumors. *J Clin Invest* **109**:651-9.
200. **Wofsy, D.** 1993. Treatment of murine lupus with anti-CD4 monoclonal antibodies. *Immunol Ser* **59**:221-36.
201. **Wofsy, D., N. Y. Chiang, J. S. Greenspan, T. H. Ermak.** 1988. Treatment of murine lupus with monoclonal antibody to L3T4. I. Effects on the distribution and function of lymphocyte subsets and on the histopathology of autoimmune disease. *J Autoimmun* **1**:415-31.
202. **Wofsy, D., W. E. Seaman.** 1985. Successful treatment of autoimmunity in NZB/NZW F1 mice with monoclonal antibody to L3T4. *J Exp Med* **161**:378-91.
203. **Xiao, B. G., X. C. Wu, J. S. Yang, L. Y. Xu, X. Liu, Y. M. Huang, B. Bjelke, H. Link.** 2004. Therapeutic potential of IFN-gamma-modified dendritic cells in acute and chronic experimental allergic encephalomyelitis. *Int Immunol* **16**:13-22.
204. **Yoshioka, T., A. Nakajima, H. Akiba, T. Ishiwata, G. Asano, S. Yoshino, H. Yagita, K. Okumura.** 2000. Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* **30**:2815-23.
205. **Zerrahn, J., W. Held, D. H. Raulet.** 1997. The MHC reactivity of the T cell repertoire prior to positive and negative selection. *Cell* **88**:627-36.
206. **Zheng, G., B. Wang, A. Chen.** 2004. The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* **173**:2428-34.
207. **Zhu, G., D. B. Flies, K. Tamada, Y. Sun, M. Rodriguez, Y. X. Fu, L. Chen.** 2001. Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-1BB (CD137) ligand/I-Ealpha-transgenic mice. *J Immunol* **167**:2671-6.
208. **Zink, A., W. Mau, M. Schneider.** 2001. [Epidemiological and public health aspects of inflammatory rheumatic systemic diseases]. *Internist (Berl)* **42**:211-6, 219-22.

## **VI. Anhang**

### **1. Thesen der Habilitation**

#### **Das T-Zell kostimulatorische Molekül CD137 als potentielle „Zielstruktur“ in der Behandlung von Autoimmunerkrankungen**

Obwohl Autoimmunerkrankungen zu den häufigsten Erkrankungen bei Kindern und Erwachsenen in der westlichen Bevölkerung zählen, ist die Pathogenese von Autoimmunerkrankungen noch weitgehend ungeklärt. Entscheidend bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen sind sowohl autoreaktive T-Zellen oder B-Zellen als auch Antigen präsentierende Zellen wie DCs oder Monozyten/Makrophagen. Die bisher bekannte Wirkung eines agonistischen Antikörpers gegen das kostimulatorische Molekül CD137 (4-1BB) auf die T-Zellen- und B-Zellen- vermittelten Immunantworten impliziert eine Wirkung auf die zellvermittelte oder humorale Pathogenese von Autoimmunerkrankungen. Der Einfluss von humoralen oder zellulären immunologischen Reaktionen bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen ist bisher ebenso unzureichend gelöst wie die Wirkung einer Immuntherapie mit einem monoklonalen, agonistischen Antikörper gegen CD137.

1. Die Behandlung mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 hemmt die Entstehung oder beeinflusst entscheidend den Krankheitsverlauf der Autoimmunerkrankung im CIA- und SLE-Tiermodell.
2. Durch die anti-CD137 Ak-Behandlung wird effizient die Autoantikörperproduktion in den CIA- und SLE-Mäusen gehemmt. Aufgrund der mangelnden Autoantikörperproduktion wird die pathologischen morphologischen Veränderungen in den beteiligten Organen (Gelenke und Nieren) oder die krankheitsspezifischen Symptome (Proteinurie) gehemmt und das Überleben der Tiere deutlich verlängert.
3. Die Behandlung von CIA- und SLE-Mäusen mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 erzeugt eine Anergie, oder es wird die primär vorhandene Toleranz gegenüber dem krankheitsauslösenden Autoantigen wieder hergestellt.

4. Die Behandlung von CIA- und SLE-Mäusen mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 erzeugt keine generelle Hemmung der Immunantwort gegenüber Fremdanitigenen oder induziert eine allgemeine Infektionsgefahr, sondern erzeugt eine eher Autoantigen-spezifische Hemmung der Immunantwort.
5. Der Zeitpunkt der Behandlung mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 ist entscheidend für die Wirkung der Behandlung.
6. Die Behandlung von bereits erkrankten CIA- und SLE-Mäusen mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 kann eine bereits etablierte oder voranschreitende Autoimmunerkrankung in den beiden Tiermodellen erfolgreich hemmen. Morphologische Veränderungen in den beteiligten Organen werden aufgehalten und es werden sogar Regressionen der pathologischen Veränderungen erreicht.
7. Die Behandlung von CIA-Mäusen mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 erzeugt eine Vermehrung von IFN- $\gamma$  produzierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen.
8. Die Behandlung von SLE-Mäusen mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 erzeugt eine CD4<sup>+</sup> T-Zellen- und DCs-abhängige Hemmung der Autoantikörperproduktion und eine Verminderung der Produktion von IL-2 und IL-4.
9. Die Behandlung von CIA- oder SLE-Mäusen mit einem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 erzeugt eine Vermehrung von potentiellen regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-T-Zellen ohne direkten Nachweis einer immunsuppressiven Wirkung dieser Zellen auf die Autoantikörperproduktion.
10. Der hemmende Effekt einer anti-CD137 Ak-Behandlung auf die Autoantikörperproduktion in SLE-Mäusen kann durch Transfer von bereits aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder unbehandelten DCs aufgehoben werden.

11. Die Ergebnisse in dem Tiermodell für Virusinfektionen zeigen, dass die Wirkung des Antikörpers auf die Generierung von virusspezifischen T-Zellen entscheidend abhängig ist vom Zeitpunkt der Behandlung und von der Kinetik der Expression eines funktionellen CD137 Rezeptors auf immunkompetente Zellen.
12. In der ersten Phase einer Immunantwort vermittelt der anti-CD137 Ak seine Wirkung hauptsächlich über DCs. Im Fortschreiten der Immunantwort wird die Wirkung hauptsächlich über CD137 Rezeptoren auf T-Zellen vermittelt mit einer vermehrten Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen.
13. In dem Tiermodell für Virusinfektionen wird durch die anti-CD137 Ak-Behandlung das Überleben der T-Zellen durch Hemmung des Zelltodes nach Aktivierung (AICD) verlängert.
14. Die Behandlung mit dem Antikörper gegen das kostimulatorische Molekül CD137 erzeugt in keinem der verschiedenen Tiermodelle eine Verminderung der Anzahl von autoreaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder B-Zellen.
15. DCs haben eine entscheidende Rolle in der Wirkung eines Antikörpers gegen CD137 auf eine Immunantwort gegen Autoantigene oder Fremdartigene.
16. Durch die anti-CD137 Ak-vermittelte Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors auf DCs in vitro wird eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung des intrazellulären STAT3 Moleküls erzeugt, die verantwortlich sein kann für die immunsuppressive Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den verschiedenen Tiermodellen.
17. Durch die anti-CD137 Ak-vermittelte Kreuzvernetzung des CD137 Rezeptors auf DCs in vitro kommt es zur vermehrten Bildung des immunsuppressiven Moleküls IDO in DCs, welche mitverantwortlich sein kann für die immunsuppressive Wirkung einer anti-CD137 Ak-Behandlung in den verschiedenen Tiermodellen.

## 2. Tabellarischer Lebenslauf

**Name:** Jürgen Lothar Benno Föll  
**Geboren:** 30. August 1960 in Rielasingen/Konstanz  
**Familienstand:** Verheiratet, 4 Kinder

### Schulbildung

1966 – 1975 *Grund- und Hauptschule in Singen*  
1977 – 1979 *Gewerblich Technische Berufsfachschule in Tübingen*  
1979 – 1982 Technisches Gymnasium in Tübingen (Abitur 1982)

### Hochschulbildung

3/1984 – 11/1990 Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen.

### Dissertation

1989 - 1993 Experimentelle wissenschaftliche Doktorarbeit im Fachbereich *Medizin bei Prof. Dr. Werner Rosendahl, Universitätskinderklinik Tübingen.*

### Berufliche Stationen

4/1991 – 9/1992 Arzt im Praktikum in der Abteilung für Kinderchirurgie bei Prof. Dr. P. Schweizer und in der Abteilung für Kinderkardiologie bei Prof. Dr. J. Apitz, Universitätskinderklinik Tübingen.

9/1993 – 6/2000 Wissenschaftlicher Angestellter und Ausbildung zum Facharzt für Kinderheilkunde in der Universitätskinderklinik Tübingen.

7/2000-7/2002 Postdoctoral research fellow, DFG-Stipendiat im Labor von Prof. Dr. Mittler, „vaccine research center“, emory university, Atlanta, U.S.A., über den Einfluss von kostimulatorische Rezeptoren (CD137 bei Autoimmunerkrankungen und Tumorerkrankungen).

Seit 2003 Wissenschaftlicher Angestellter an der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg, Abt. Pädiatrische Hämatologie, Onkologie und Immunologie (Prof. Dr. med. S. Burdach, Prof. Dr. med. G. Horneff, Prof. Dr. med. R. Grabitz und Prof. Dr. med. D. Körholz).

Halle, den 23. Januar .2008

Jürgen Föll



### **3. ERKLÄRUNGEN**

#### **I. SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Habilitationsschrift selbstständig angefertigt habe und versichere, dass ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

#### **II. ERKLÄRUNG ÜBER FRÜHERE HABILITATIONSVERSUCHE**

Zusätzlich erkläre ich hiermit, dass es keine früheren Habilitationsversuche gab, weder mit dieser Arbeit noch mit einer anderen, weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg noch an einer anderen Universität.

Halle, den 23. Januar 2008

Dr. Jürgen Föll

#### **4. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich gerne denjenigen meinen aufrichtigen Dank aussprechen, die mir auf meinem bisherigen akademischen Weg mit Rat und Tat zur Seite standen und damit direkt oder indirekt zum Gelingen der Habilitation beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Robert Mittler in Atlanta für seine Unterstützung und die Möglichkeit, über zwei Jahre in seinem Labor experimentelle, immunologische Forschung zu betreiben. Er gab mir durch seine Anregungen und durch die inspirative und kontinuierliche Diskussionskultur die Gelegenheit und das Wissen, diese Arbeit zu erstellen. Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern seiner Arbeitsgruppe danken für unendlich viel Einsatz, Unterstützung und Geduld mit dem „german doctor“. Die Arbeit im Labor von Herrn Mittler war getragen durch einen hohen Teamgeist, Freundlichkeit und eine hohe Produktivität. In diesem Zusammenhang möchte ich Megan McCausland, Jennifer Brunch, Liguu Niu und Becker Hewes erwähnen, ohne deren Hilfe und Einsatz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke allen Kooperationspartnern im „Emory Vaccine Center“ in Atlanta, insbesondere Rafi Ahmed, John Altman, Chris Ibegbu, Guido Silvestri und der Forschungsgruppe von Dr. Christian Larsen und Dr. Thomas Pearson (Department of Surgery, Emory Clinic) für die außerordentliche Unterstützung während meines Aufenthaltes in Atlanta.

Ein weiterer besonderer Dank gilt Herrn Prof. Günther Dannecker und den Mitarbeitern in seinem Forschungslabor in Tübingen. Die wissenschaftliche Zusammenarbeit in seinem Labor prägte wesentlich mein Interesse an immunologischen Fragestellungen und mein wissenschaftliches Denken.

Ich möchte mich bedanken bei allen Mitarbeitern in den verschiedenen Arbeitsgruppen, die hier nicht explizit erwähnt wurden und dennoch meine Arbeit direkt oder indirekt unterstützt haben.

Ich möchte meinen akademischen klinischen Lehrern danken, insbesondere Prof. Dietrich Niethammer (Tübingen), Prof. Stephan Burdach (Halle, jetzt München), Prof.

Gerd Horneff (Halle, jetzt St. Augustin) und Prof. Dieter Körholz (Halle) für die Möglichkeit, neben meiner klinischen Tätigkeit auch meinen wissenschaftlichen Interessen nachzugehen.

Ich möchte mich bedanken bei allen meinen Kolleginnen und Kollegen in Tübingen, Atlanta und Halle für jede Form der Unterstützung dieser Arbeit.

Einen ganz besonderen Dank gilt Herrn Dr. Martin Staeger und seinem Forschungslabor für die langjährige vielseitige Unterstützung. Ohne seine Mitarbeit und die immer währenden kritischen und konstruktiven Diskussionen wäre diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden.

Mein Dank gilt der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die mich als Postdoktorand zwei Jahre förderte, um meine immunologische Ausbildung und meine Forschungsarbeiten in einem exzellenten immunologischen Zentrum in Atlanta durchzuführen.

Ein weiterer Dank gilt Frau Hentschel für die abschließende engagierte Durchsicht und letzter Korrektur meiner Habilitationsarbeit.

„Last but not least“ gilt mein besonderer Dank meiner Familie Evita, Jan, Katharina, Niels und Antonia, die mich mit ihrem immerwährenden, liebevollen Verständnis durch die letzten Jahre begleitet haben.