Thema:
Die Rolle eines SmD1Peptids bei der Entstehung von pathogenetisch bedeutsamen Autoantikörpern beim systemischen Lupus erythematodes

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Lehrbefähigung
für das Fach

Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Frau Dr. Gabriela Riemekasten
geboren am 23.1. 1965 in Magdeburg

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek
Dekan: Prof. Dr. J.W. Dudenhausen

Gutachter 1: Prof. Dr. J. Kalden, Erlangen
Gutachter 2 Prof. Dr. W. L. Gross, Bad Bramstadt

eingereicht am: 23.10.02
Öffentlich wissenschaftlicher Vortrag: 25.03.2003

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung: ... 3

1.1 Die Rolle von Anti-Sm-Antikörpe beim SLE ... 3

1.2 Mögliche Ursachen für die Induktion von Anti-Sm-Antikörpern ... 4

1.3 Potentielle Antigene zur Induktion von Anti-dsDNA-Antikörpern ... 6

1.4 Der Zusammenhang zwischen Anti-Sm- und Anti-dsDNA-Antikörpern ... 8

1.5 Die Rolle von T-Zellen und Möglichkeiten zur Modulation der T-Zellantwort ... 10

1.5.1. Möglichkeiten zur Charakterisierung von T-Zellen ... 10

1.5.2. Die Rolle von Zytokinen beim systemischen Lupus erythematodes ... 13

1.5.3. Induktion von Toleranz / Anergie ... 14

1.6 Zielstellung der Arbeit ... 16

2. Zusammenfassung der Arbeiten ... 17

3. Zusammenfassung ... 34

4. Ausblick ... 41

Quellennachweis ... 42

6. Abkürzungsverzeichnis: ... 52

7. Danksagung ... 55

8. Eidesstattliche Erklärung ... 56

1. Einleitung:

Der systemische Lupus erythematodes gilt als Prototype einer systemischen Autoimmunerkrankung, für die das Auftreten von Antikörpern gegen zelluläre, insbesondere nukleäre Bestandteile charakteristisch ist. Die Häufigkeit dieser Erkrankung wird mit einer Prävalenz von 50 je 100000 Einwohner angegeben, ist jedoch auch abhängig von ethnischen Faktoren, da sie in der asiatischen Bevölkerung und bei dunkelhäutigen Afrikanern und Afroamerikanern häufiger nachweisbar ist.

Das Haupterkrankungsalter liegt zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr, wobei Frauen etwa 10-fach häufiger von der Erkrankung betroffen sind als Männer. Beding durch ablaufende Immunreaktionen können nahezu alle Organe betroffen werden. Die Diagnose wird durch das gemeinsame Auftreten von bestimmten Symptomen und Laborparametern gestellt, wobei das American College of Rheumatology (ACR) insgesamt 11 Kriterien oder pathologische Befunde erstellt hat, von denen mindestens vier vorliegen müssen, damit die Diagnose eines SLE gestellt werden kann.

1.1 Die Rolle von Anti-Sm-Antikörpe beim SLE

Anti-Sm-Antikörper, benannt nach der ersten SLE-Patientin, bei der diese Antikörper (Ak) nachgewiesen wurden (Smith), sind spezifisch für den SLE (Tan and Kunkel, 1966) und wurden deshalb neben den Anti-dsDNA-Ak in die diagnostischen ACR-Kriterien aufgenommen. Während Anti-dsDNA-Ak in 60-83% beim SLE auftreten (Smeenk et al. 1992), wurde die Häufigkeit der Anti-Sm-Ak bisher mit ca. 10- 30% angegeben, wobei das Vorkommen abhängig ist von ethnischen Faktoren und der zum Nachweis eingesetzten Testsysteme (Abuaf et al., 1990; Riemekasten et al., 1992). Das Auftreten von Anti-Sm-Ak spricht im allgemeinen, wie auch das der Anti-dsDNA-Ak, für prognostisch ungünstigere Verläufe des SLE mit schweren Organmanifestationen wie einer Nieren- und ZNS-

Beteiligung (Takeda et al., 1989; Yasuma et al., 1990). In einer kürzlich veröffentlichten Kohorten-Studie wiesen allein SLE-Patienten mit Anti-Sm-Antikörpern eine deutlich erhöhte Mortalität auf (Peschken et al., 1999).

Anti-Sm-Antikörper erkennen sogenannte kleine, im Zellkern befindliche Ribonukleoproteinkomplexe, die sogenannten snRNPs, die zum Spleißen der pre-mRNA notwendig sind (Lerner et al., 1981). Verschiedene Proteine der snRNP können von Anti-Sm-Antikörpern gebunden werden und lassen sich durch eine SDS-Elektrophorese auftrennen. Von den bisher 9 identifizierten Sm-Proteinen (B, B'. N, D1. D2. D3, E, F und G; Lehmeyer et al, 1990) sind vor allem die Proteine B/B' und D1 die Hauptziele der Immunantwort beim SLE (Hoch et al., 1999). Da Antikörper gegen B/B' auch bei anderen Kollagenosen vorkommen können, erscheint das SmD1-Protein besonders interessant, um für den SLE spezifische Mechanismen zu untersuchen. Das SmD1-Protein wurde sequenziert (Rokeach, et al., 1988) und in den letzten Jahre die kristalline Struktur der snRNP beschrieben (Kambach et al., 1999). Im nukleinsäurefreien Zustand bilden sich spontan mehrer Komplexe aus den verschiedenen Sm-Proteinen. Des weiteren wurde für das SmD1-Protein nachgewiesen, dass der stark positiv geladene C-Terminus aus dem Ribonukleoprotein-Komplex herausragt und für Bindungen, beispielsweise von negativ geladenen Strukturen wie der DNA oder RNA, zugänglich ist (Kambach et al.,1999, McClain et al., 2002).

1.2 Mögliche Ursachen für die Induktion von Anti-Sm-Antikörpern

Die Möglichkeit zur Reaktivität gegen Autoantigene besteht in jedem normalen Individuum, da sich autoreaktive B- und T-Zellen auch in gesunden Individuen nachweisen lassen (Bockenstedt et al., 1995). Offenbar wird dort jedoch die Immunreaktion gegen Autoantigene durch periphere Toleranzmechanismen unterdrückt. Warum es beim SLE zur Durchbrechung der Toleranz und damit zur Immunantwort gegen körpereigene Strukturen wie den Sm-

Proteinen kommt, ist unklar. Für die Entstehung von Anti-Sm-Ak werden mindestens zwei verschiedene hypothetische Mechanismen diskutiert: 1. Molekulares Mimicry (Durchbrechung der Toleranz durch die Ähnlichkeit von Antigenen pathogener Organismen mit körpereigenen Strukturen) und 2. die Freisetzung von sogenannten kryptischen Epitopen.

Hinweisend auf eine mögliche Relevanz molekularen Mimikries ist die Homologie des C-terminalen $SmD1_{101-119}$ Peptids mit dem viralen Protein EBNA-2 des Epstein-Barr Virus (Incaprera et al., 1998). Eine weitere Homologie wurde zwischen dem EBNA-1 Protein und einem Peptid des Sm B/B'-Proteins nachgewiesen. In jungen Patienten mit einem SLE besteht eine signifikant erhöhte Prävalenz an EBV-Infektionen im Vergleich zu Kontrollpersonen gleichen Alters, was ebenfalls auf eine mögliche Rolle der EBV-Infektion beim SLE weist James et al., 1997).

Kryptische Epitope sind dem Immunsystem normalerweise nicht zugänglich. Es besteht Toleranz durch Ignoranz. Werden solche Epitope nun aus verschiedenen Gründen dem Immunsystem präsentiert, so entsteht eine Immunantwort. In deren Verlauf kommt es zur Ausbreitung der Antikörper-Reaktivitäten auf andere Bereiche des gleichen Proteins oder auf andere an das Protein gebundene Strukturen (Epitopspreading). Beispielsweise führte die Immunisierung mit bestimmten SmD1-Peptiden, auf denen kryptische Epitope vermutet werden, nicht nur zur Immunantwort gegen andere Epitope des SmD1-Proteins, sondern auch gegen den snRNP-Komplex (Bockenstedt et al., 1995). Interessanterweise werden insbesondere kryptische Epitope von den T-Zellen erkannt (Lehmann et al., 1992).

Die Entstehung von Anti-Sm-Ak wird ferner wesentlich vom Polymorphismus des MHC-Genlocus mitbestimmt. Immunisierungen mit verschiedenen SmD1-Peptiden des zentralen und N-terminalen Proteinanteils zeigten, dass die Induktion der Immunantwort bei verschiedenen Mäusestämmen unterschiedlich ist (Winska-Wiloch et al., 1997) und bei einigen Stämmen überhaupt nicht ausgelöst werden kann. Des weiteren scheinen bei mit Sm-

Peptiden immunisierten Mäusen neben H-2 abhängigen auch H-2-unabhängige, stammesspezifische Klasse-II-Antigene eine Rolle zu spielen (James and Harley, 1998).

1.3 Potentielle Antigene zur Induktion von Anti-dsDNA-Antikörpern

Obwohl Anti-dsDNA-Ak eine zentrale Rolle in der Pathogenese des SLE spielen, ist bisher unklar, welche Antigene zu ihrer Entstehung beitragen. Eine hohe Belastung mit körpereigener dsDNA reicht allein für die Triggerung des Autoimmunprozesses nicht aus. Dafür spricht, dass die Immunisierungen mit reiner Plasmid-DNA oder Säugetier-DNA im Tiermodell weder bei normalen Individuen noch bei Lupusmäusen zum Anstieg von Anti-dsDNA Ak (Mor et al., 1997) oder zur Akzeleration der Nephritis führt. Allerdings konnte gezeigt werden, dass bakterielle DNA, die sich von humaner DNA durch ihren hohen Anteil von CpG-Basenpaaren unterscheidet und möglicherweise noch bakterielle Proteine enthält, zu einer geringen Akzeleration der Autoimmunopathie führen kann (siehe auch 2.1.5). Um eine Autoimmunreaktion zu erreichen, sind allerdings relativ hohe Dosen von DNA und mehrfache Applikation oder Immunisierungen notwendig (Mor et al., 1997). Obwohl Anti-dsDNA-Antkörper Eigenschaften einer T-Zellreifung zeigen, konnte bisher nicht nachgewiesen werden, dass dsDNA von T-Zellen erkannt wird (Madaio e al., 2000, Pisetsky et al., 2000).

Detaillierte Untersuchungen mit humanen monoklonalen Anti-dsDNA-Antikörpern konnten zeigen, dass die Affinität zur DNA nicht gleichbedeutend ist mit der pathogenetischen Bedeutung der Anti-dsDNA-Ak (pers. Mitteilung Dr. Winkler, Erlangen). Nach kürzlich veröffentlichten Studien sinken interessanterweise im Schub des SLE die Affinitäten der Anti-dsDNA-Ak gegen ihr jeweiliges Zielantigen (Williams et al., 1999). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass DNA nicht das eigentliche Ziel der pathogenetisch bedeutsamen

Immunantwort gegen dsDNA ist oder anders ausgedrückt, dass Anti-dsDNA-Antikörper möglicherweise als Nebenprodukt des autoimmunologischen Geschehens gebildet werden.

Auf der Suche nach weiteren potentiellen Antigenen für die Induktion von Anti-dsDNA-Antikörpern wurden deshalb Protein-DNA-Komplexe zur Immunisierung verwendet. So führte die Immunisierung mit einem Komplex aus DNA und einem positiv geladenen Peptid (Fus-1) aus Trypanosomen zur Bildung von pathogenen Anti-dsDNA-Antikörpern und zur Nephritis (Desai et al., 1993). Es ist wahrscheinlich, dass weitere DNA-bindende Proteine im Komplex mit DNA pathogenetisch bedeutsame Anti-dsDNA-Antikörpern induzieren können.

Nukleosomen, die aus Histonpartikeln und DNA bestehen und bei der Apoptose entstehen, werden spezifisch von Autoantikörpern und von T-Zellen beim SLE erkannt. Die Arbeitsgruppe um Datta konnte nachweisen, dass T-Zellen, die Histon-Peptide erkennen, nicht nur eine T-Zellhilfe liefern für die Bildung von Anti-Histon- und Anti-Nukleosomen-Antikörper, sondern auch von pathogenen Anti-dsDNA-Antikörpern (Kaliyaperumal et al., 1999, Datta et al., 2000). Es erfolgt über die T-Zelle ein Spreading der Autoantikörper-Antwort. Es werden jedoch unterschiedliche Epitope der Histone in verschiedenen Modellen des SLE erkannt. In einigen Lupusmodellen wie den NZB/W-Mäusen läßt sich keine T-Zellreaktivität gegen Histon-Peptide nachweisen. Ferner läßt sich eine T-Zellreativität gegen Histone nur bei einer begrenzten Anzahl von SLE-Patienten nachweisen. Es muß demzufolge noch andere Antigene geben, die eine Rolle für die Bildung pathogenetisch bedeutsamer Anti-dsDNA-Antikörper spielen.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass Peptide auch ohne Nukleinsäuren in der Lage sind, Nukleotidsequenzen zu imitieren (Sibille et al., 1997) und ein Zielantigen für die Entstehung von Anti-dsDNA-Antikörpern darstellen. So konnten Aminosäuresequenzen identifiziert werden, die mit mehreren monoklonalen Anti-dsDNA-Antikörpern eine hochaffine Bindung eingehen. Es wurde weiterhin gezeigt, dass solche Peptide in Immunisierungsversuchen die

Bildung von pathogenen Anti-dsDNA-Ak induzieren. Damit konnte nachgewiesen werden, dass Nukleinsäuren nicht essentiell sind für die Entstehung von hochaffinen pathologischen Anti-dsDNA-Antikörpern (Putterman and Diamond, 1998).

Eine weitere Hypothese erklärt die Bildung von pathogenen Anti-dsDNA-Antikörpern aus der Aktivierung von Anti-Idiotyp-spezifischen T-Zellen, die den Autoimmunprozeß unterhält (siehe 2.1.5, Seite 9).

Zusammenfassend scheint Doppelstrang-DNA allein nicht für die Entstehung von Anti-dsDNA-Antikörpern beim SLE verantwortlich zu sein. Es ist sehr wahrscheinlich, dass entweder Proteine allein oder Protein-Nukleinsäurekomplexe zur Entwicklung von Anti-dsDNA-Antikörpern beitragen.

1.4 Der Zusammenhang zwischen Anti-Sm- und Anti-dsDNA-Antikörpern

Es bestehen eine Reihe von Assoziationen zwischen Anti-Sm- und Anti-dsDNA-Antikörpern, die für eine mögliche räumliche Nähe dieser Antigene während der Entstehung der Autoantikörper sprechen. Sowohl Anti-dsDNA- als auch Anti-Sm-Ak treten bei schweren Organmanifestationen des SLE auf. Zusätzlich konnten Untersuchungen an monoklonalen sowie affinitätschromatographisch gereinigten Anti-Sm-Antikörpern Kreuzreaktivitäten mit DNA aufdecken (Bloom et al., 1993; Reichlin et al., 1994; Zhang and Reichlin, 1995). So binden mehr als die Hälfte aller monoklonalen Anti-Sm-Ak auch Einzelstrang (ss)DNA und davon wiederum ein großer Teil Doppelstrang-(ds)DNA (Retter et al., 1996). Die Arbeitsgruppe um Morris Reichlin konnte nachweisen, dass gerade mit dem SmD1-Protein kreuzreagierende Anti-dsDNA-Ak eine Nephritis induzieren.

Einen weiteren Hinweis für eine Verwandtschaft zwischen Anti-Sm-und Anti-dsDNA-Antikörpern bietet die Analyse ihrer gemeinsamen Gensequenzen, insbesondere solcher Sequenzen, die für die Antigenspezifitäten verantwortlich sind. Sowohl Anti-Sm- als auch

Anti-dsDNA-Ak benutzen gleiche VH-Gensequenzen, insbesondere der VH3-Genfamilie. Neben der Nutzung gleicher Genklassen ist zudem auffällig, dass sowohl Anti-Sm- als auch Anti-dsDNA-Ak in ihren variablen Regionen über einen ungewöhnlich hohen Anteil von kationischen Aminosäuren verfügen (Bloom et al., 1993). Untersuchungen an MRL/lpr-Mäusen, einem murinen Modell für den SLE, weisen auf eine Beteiligung von dsDNA an der Affinitätsreifung von Anti-Sm-Antikörpern hin (Retter et al., 1996).

Die Strukturanalyse der Sm-Proteine konnte nachweisen, dass das SmD1-Protein im N-Terminus aus einer helikalen Struktur besteht und der positiv geladene C-Terminus als einzelner Strang den Komplex verläßt und somit Bindungen mit negativ geladenen Strukturen wie DNA oder anderen Nukleinsäuren möglich erscheinen (Kambach et al., 1999). Das SmD1-Protein wäre somit ein möglicher Kandidat für eine Interaktion mit dsDNA (Seeman et al., 1976).

Ein Komplex aus Nukleinsäuren und dem SmD1-Protein als gemeinsames Antigen für Anti-dsDNA-Ak und Anti-Sm-Ak könnte Kreuzreaktivitäten, Assoziationen der Ak und die Nutzung gleicher Antikörperklassen erklären.

Wie bereits angeführt, können T-Zellen ein Bindeglied zwischen verschiedenen Autoantikörpern darstellen. So führten Transferversuche der Histon-spezifischen T-Zellen in prä-autoimmunen oder gesunden Individuen mit gleichem Haplotyp zu einer akzelerierten Antwort von pathogenen Anti-dsDNA-und Anti-Histon-Antikörpern (Fricke et al., 1991; Mohan et al., 1993). Peptide von anderen Ribonukleoproteinkomplexen wie dem Sm/snRNP-Komplex könnten möglicherweise ebenfalls T-Zellen aktivieren, die an der Bildung von pathogenen Anti-dsDNA-Antkörpern beteiligt sind. Geht man von einem SmD1/Nukleinsäure-Komplex aus, könnten auch SmD1-reaktive T-Zellen für die Assoziationen zwischen Anti-Sm-und anti-dsDNA-Ak verantwortlich sein.

1.5 Die Rolle von T-Zellen und Möglichkeiten zur Modulation der T-Zellantwort

Autoantikörper, wie sie beim SLE auftreten, zeigen typische Eigenschaften einer T-Zell-Abhängigkeit: die Reifung hochaffiner Autoantikörper im klinischen Verlauf über Hypermutationen, die Bildung von Gedächtniszellen und der Isotyp-Wechsel von IgM- zu IgG-Antikörpern. T-Zellen sind in der Pathogenese des SLE direkt beteiligt (Tillman et al., 1992, Voll et al., 1997). Autoimmunerkrankungen können als eine Dysbalance zwischen den verschiedenen T-Zellen und deren Zytokine aufgefaßt werden. Generell stehen dabei den proinflammatorischen Zytokinen Interferon-gamma (IFN-γ) und Tumornekrosefaktor-alpha (TNF-α) der Th-1-Zellen die Interleukine (IL)-4, -5 und -13 der Th-2-Zellen bzw. IL-10 sowie TGF-β der T3 oder T-Suppressor-Zellen gegenüber. T-Zellklone, die spezifisch Anti-dsDNA-Ak induzieren, produzieren sowohl Typ1- als auch Typ2-Zytokine (Voll et al., 1997). Die Beeinflussung des Gleichgewichts zwischen den verschiedenen T-Zellen und ihrer Zytokine könnte eine vielversprechende Therapiemöglichkeit darstellen und Mechanismen der Entstehung von pathogenetisch bedeutsamen Antikörpern aufdecken. Erfolge bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis lassen eine auf Zytokine ausgerichtete Therapie als ein erfolgreiches Konzept erscheinen.

1.5.1. Möglichkeiten zur Charakterisierung von T-Zellen

Werden T-Zellen durch Antigene und CD28-vermittelte Kostimulation aktiviert, so proliferieren sie und bilden Zytokine. Dabei korreliert die Proliferation mit der induzierten DNA-Synthese nach Antigenstimulation. In Abhängigkeit von der Syntheserate erfolgt beispielsweise der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin, der dann direkt gemessen werden kann. Aus den Überständen können u.a. die Zytokine populationsbezogen gemessen werden. Diese Methode erlaubt jedoch keine Rückschlüsse auf die Frequenz der antigen-spezifischen Zellen oder auf eine vorhandene Voraktivierung, die Intensität der DNA-

Synthese in einzelnen T-Zellen oder auf den Phänotyp der antigenspezifischen Zellen. Eine weitere Isolierung von Zellen für funktionelle Untersuchungen ist ebenfalls nicht möglich. Andere Substanzen wie BromodesoxyUridin (BrdU) werden ebenfalls in die DNA eingebaut, die Zellen können dann zusätzlich hinsichtlich ihres Phänotyps weiter untersucht werden. Diese Methode erfordert allerdings die Fixierung und die Tötung der Zellen und verhindert somit ebenfalls deren weitere funktionelle Untersuchung (Houck and Loken, 1985).

Neben der Messung der DNA-Synthese kann die Proliferation von T-Zellen auch direkt über die Markierung von Zellen mit bestimmten Farbstoffen wie Carboxyfluoresceindiacetat-succinimidylester (CFDA-SE) gemessen werden. Bei jeder Zellteilung erfolgt dann die Reduktion des Farbstoffes um 50%, was die durchflusszytometrische Identifizierung von antigenspezifischen Zellen auf Einzelzellebene erlaubt. Diese Zellen können dann für funktionelle Studien, Untersuchungen des Phänotyps oder der Zytokinantwort isoliert werden. Es gibt jedoch auch Zellen, die auf einen antigenen Reiz nicht mit einer Proliferation reagieren, sondern nur Zytokine bilden. Eine Möglichkeit zur Charakterisierung von solchen T-Zellen besteht in der Messung der Zytokinexpression und damit der Effektorfunktion dieser Zellen. Mittels ELISPOT lassen sich T-Zellen nachweisen, die auf einen antigenen Reiz ein bestimmtes Zytokin produzieren. Dabei werden die von einer einzelnen Zelle in einem bestimmten Zeitraum produzierten Zytokine an eine mit Anti-Zytokin-Antikörpern beschichtete Platte gebunden und durch eine Reaktionskette ähnlich wie beim ELISA nachgewiesen. Die Größe der Spots ist ein Ausdruck der Menge der von einer Zelle produzierten Zytokine. Die Methode zeichnet sich durch eine hohe Empfindlichkeit aus. Die Zellen können zudem weiter verwendet werden. Allerdings kann pro ELISPOT in der Regel nur ein Zytokin bestimmt werden und die Zytokin-produzierende Zelle kann phänotypisch nicht weiter charakterisiert werden. Dieser Nachteil des ELISPOT kann dadurch umgangen werden, dass nur bestimmte phänotypisch charakterisierte (z.B. $CD4^+$-)T-Zellen verwendet

werden. Des weiteren können beim ELISPOT auch mehrere Farbstoffe und Enzymkaskaden verwendet werden, um einzelne Koexpressionen nachzuweisen. Die Möglichkeiten des ELISPOTs, verschiedene Charakteristika einer einzelnen Zelle aufzuzeigen, sind jedoch begrenzt. Da der ELISPOT erst nach Kultivierung der Zellen über einen bestimmten Zeitraum erfolgt, kann keine Aussage über die Frequenz der Zellen in vivo getroffen werden.

Die genauere Charakterisierung Zytokin-produzierender Zellen ist durch die intrazelluläre Immunfluoreszenz möglich, wobei die Zellen durchflußzytometrisch gemessen werden. Die Methode erlaubt die Charakterisierung einzelner Zytokin-produzierender Zellen, wobei je nach Menge der verwendeten Farbstoffkanäle bis zu 8 verschiedene Eigenschaften einer Zelle ermittelt werden können. In jüngerer Zeit ist es möglich geworden, Zellen anhand ihrer Zytokinproduktion lebend zu isolieren und somit für funktionelle Studien verfügbar zu machen.

T-Zellen können schließlich anhand ihres Antigenrezeptors molekular charakterisiert werden. Bisher wurden üblicherweise T-Zellklone verwendet und deren T-Zellrezeptor mittels Epitopmapping charakterisiert. Der Nachteil dieser Methode liegt u.a. darin, dass nur Rezeptoren einzelner monoklonaler Zellen ermittelt werden, die möglicherweise nicht repräsentativ sind. Die Herstellung der Zellklone ist zudem aufwendig. In jüngster Zeit ist eine Methode entwickelt worden, bei der Epitope von polyklonalen, antigenspezifischen T-Zellen ermittelt werden können. Der Vorteil dieser Methode liegt unter anderem darin, dass die Herstellung monoklonaler Antikörper entfällt und z.B. beim Menschen T-Zellen aus Vollblut isoliert werden können (Kern et al., 1998).

1.5.2. Die Rolle von Zytokinen beim systemischen Lupus erythematodes

Nach bisherigen Analysen ist die Frequenz Autoantigen-spezifischer T-Zellen mit etwa 1 Zelle je 10000 sehr gering, was die Charakterisierung dieser Zellen nach ihrer Zytokinproduktion erschwert (Kuwana et al, 20001). Des weiteren sind beim SLE bisher nur wenige Peptide von Autoantigenen bekannt, die in der Lage sind, T-Zellen zu stimulieren.

Demzufolge existieren bisher keine Arbeiten, die die Zytkinexpression von direkt *ex vivo* gewonnenen Autoantigen-spezifischen Zellen beschreiben konnte. Um die Rolle der Zytokine zu ermitteln, wurden Serumspiegel von Patienten oder Zellüberstände von PBMC nach unspezifischer Stimulation untersucht und mit gesunden Spendern verglichen. Tiermodelle bieten die Möglichkeit, den Einfluß von Zytokinen direkt zu analysieren. Die Applikationen von Zytokinen oder Anti-Zytokinen bieten die Möglichkeit, den Einfluß einzelner Zytokine auf die Entwicklung des Krankheitsprozesses beim SLE zu bestimmen. Transgene Mausmodelle stellen eine weitere Möglichkeit dar, den Zytokin-Einfluß zu untersuchen. IFN-γ ist wahrscheinlich ein Schlüssel-Zytokin in der Pathogenese des SLE, was viele experimentelle Arbeiten sowohl beim humanen als auch murinen Lupus belegen (Murray et al.,1990, Prudhomme et al., 1995, Voll et al., 1997). Werden beispielsweise NZB/W-Mäuse mit IFNγ behandelt, kommt es zu einer Akzeleration der Erkrankung. Andererseits kann die Gabe eines löslichen IFNγ-Rezeptors, der den Einfluß von IFN-γ verhindert, die Krankheitsprogression verzögern (Ozmen et al.,1995, Jacob et al. 1987). Pathogenetisch bedeutende Anti-dsDNA-Antikörper sind vom IgG2a Subtyp, die durch den Einfluß von IFN-γ entstehen (Snapper et al. 1987). Die Rolle von Interleukin-4 wird kontrovers diskutiert, obwohl IL-4 die humorale Immunantwort fördert. Die Behandlung mit Anti-IL-4 führte zu einer deutlichen Verzögerung der Erkrankung in NZB/W-Mäusen (Nakajima et al., 1997), was auf eine pathogenetische Rolle des IL-4 hinweist. Andererseits konnte die Entwicklung

des murinen Lupus in IL-4-transgenen Mäusen mit anderem genetischen Hintergrund als den NZB/W-Mäusen verhindert werden (Santiago et al., 1997).

Die Rolle von IL-10 ist derzeit noch unklar. Die Serumspiegel des IL-10 korrelieren positiv mit der Krankheitsaktivität des SLE und den Anti-dsDNA-Antikörpern und negativ mit den Spiegeln der Komplementfaktoren (Park, Y.B., 1998). Die Expression von TGFß scheint beim SLE eher gering zu sein (Ohtsuka et al., 1998) und einige Experimente konnten zeigen, dass TGFß-produzierende Zellen einen protektiven Einfluß auf die Krankheitsentwicklung im murinen SLE aufweisen (Singh et al, J. Immunol. 2002). Offensichtlich besteht beim SLE ein labiles Gleichgewicht zwischen verschiedenen Zytokinen, welches im zeitlichen Verlauf schwanken kann

1.5.3. Induktion von Toleranz / Anergie

T-Zellen können durch ein Antigen spezifisch inaktiviert werden, es entsteht Toleranz des Immunsystems. Es gibt dabei verschiedene Möglichkeiten zur Induktion von Toleranz auf den Ebenen der Eliminierung, Anergisierung oder Suppression der spezifischen T-Zellen (Kamradt, et al. 2001). Die intravenöse Gabe von hohen Antigen-Dosen (100 bis 300 µg des gelösten Antigens) ist ein etabliertes Modell zur Erzeugung von Toleranz im Mausmodell (Ehl et al., 1998). In Abhängigkeit von den untersuchten Modellen besteht Toleranz durch Deletion/Anergie der Effektorzellen (Jacobs et al., 1994), durch die Bildung von regulativen T-Zellen (Hilliard et al., 1999) oder durch die Veränderung des Zytokinmusters (Valujskikh et al., 2001). Die Induktion von TGFß-produzierenden regulativen T-Zellen nach Hochdosis-Toleranz ist ebenfalls beschrieben wurden (Valujskikh et al., 2001). TGFß scheint eine Rolle bei der Bildung weiterer regulativer T-Zellen zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass regulative CD4+/CD25+ T-Zellen durch TGFß induziert werden können (Yamagiwa et al., 2001). Diese als professionell bezeichneten regulativen T-Zellen üben über Zellkontakte die

Suppression einer T-Zellantwort aus. Ferner konnte gezeigt werden, dass TGFß die Bildung von IL-10-produzierenden Zellen anregt (IL-10). Diese als Tr1-Zellen benannte Population wirkt hemmend auf die Proliferation naiver T-Zellen, wobei Koexpressionen mit IFNγ und TGFß für diesen Zelltyp beschrieben wurden (Del Prete et al., 1993, Assenmacher et al., 1996, Groux et al., 1997).

Die Toleranzinduktion wird in einer Vielzahl von Erkrankungen mit definierten Antigenen derzeit erprobt. Auf rheumatologischem Gebiet seien hier die Kollagen-induzierte Arthritis, die rheumatoide Arthritis und die Uveitis erwähnt. Eine wichtige Frage bei der Toleranzinduktion ist es, wie stabil die Antwort der T-Zellen ist und ob sich bereits aktivierte T-Zellen nach Ausbruch der Krankheit noch umprogrammieren lassen. Vielversprechend sind deshalb erste Ergebnisse bei Patienten mit einer bereits bestehenden, therapierefraktären Uveitis. Die orale Gabe eines synthetischen MHC-Peptids (Peptid B27 PD) führte bei einem Patienten zu einem deutlichen Rückgang der Entzündung, so dass die begleitende Steroidtherapie abgesetzt werden konnte. Damit konnte nachgewiesen werden, dass Toleranz auch nach dem Krankheitsbeginn erzeugt werden kann und somit auch beim Menschen ein therapeutisches Prinzip darstellen kann (Thurau et al., 1997).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Aus der Literaturübersicht ergeben sich eine Reihe von Fragestellungen, mit denen sich die vorliegende Arbeit befassen möchte. Folgende Schwerpunkte sollen dabei gesetzt werden:

1. Charakterisierung der autoantigenen Zielstruktur von Anti-SmD1-Antikörpern beim humanen SLE durch Einsatz von Peptiden
2. Untersuchung der Interaktionen zwischen Anti-Sm- und Anti-dsDNA-Antikörpern
3. Untersuchung der pathogenetischen Bedeutung von autoantigenen Peptiden beim SLE
4. Identifizierung und Charakterisierung autoantigen-spezifischer T-Zellen beim SLE
5. Die Beeinflussung der Immunantwort gegen Autoantigene durch Modulationen der autoreaktiven T-Zellen zur Entwicklung neuer Therapiestrategien
6. Untersuchung der Mechanismen, die zur Autoantigen-spezifischen Toleranzinduktion beim SLE führen

2. Zusammenfassung der Arbeiten

A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus.

Gabriela Riemekasten, Jeannette Marell, Grit Trebeljahr, Rolf Klein, Gert Hausdorf, Thomas Häupl, Jens Schneider-Mergener, Gerd R. Burmester, Falk Hiepe. J. Clin. Invest. 1998: 754-63.

Die vorliegende Arbeit sollte die Frage beantworten, ob nicht Teile eines definierten Autoantigens häufiger von Autoantikörpern erkannt werden und somit in der Lage sind, die Verhältnisse *in vivo* besser zu widerspiegeln als normalerweise für Testsysteme verwendete Kernextrakte oder Proteine.

Mittels Epitopmapping durch 39 überlappende Peptide mit einer Länge von je 13 Aminosäuren konnten mindestens zwei Hauptepitope des SmD1-Proteins im zentralen Teil und nahe dem C-Terminus identifiziert werden, wobei höhere Serumreaktivitäten mit Peptiden am C-Terminus beobachtet wurden. Vier unterschiedliche Peptide dieses Bereiches (mit der Aminosäuresequenz 83-99, 105-119, 95-119 sowie 83-119) wurden synthetisiert und im ELISA mit SLE-Seren getestet.

Während die kurzen Peptide nur mit einem Viertel der in diesem experimentellen Teil untersuchten 30 SLE-Seren reagierten, kam es zu außergewöhnlich hohen Frequenzen des Antikörpernachweises gegen das SmD1 83-119-Peptid. Eine Doppelbeschichtung von zwei kürzeren Peptiden des C-Terminus (mit der Aminosäuresequenz 83-99 und 95-119) zeigte im Vergleich zum SmD1 83-119-Peptid deutlich weniger Reaktivitäten, was möglicherweise auf ein Konformationsepitop schließen läßt.

Es sind dann 164 SLE-Seren sowie 267 Seren von Patienten mit anderen Erkrankungen auf ihre Autoantikörper-Reaktivität gegen das SmD1 83-119-Antigen im ELISA untersucht

worden, wobei neben verschiedenen Kollagenosen (Sjögren-Syndrom, Sklerodermie, rheumatoide Arthritis, Mischkollagenose, Primär biliäre Zirrhose) auch Seren von Patienten mit einer HIV- oder Hepatitis B-Infektion verwendet wurden. 105 gesunde Blutspender dienten als weitere Kontrolle.

Von den SLE-Patienten zeigten 70% eine Reaktivität gegen das SmD1 83-119-Peptid. Im gleichen Patientengut ließen sich Anti-dsDNA-Antikörper nur in 56% der SLE-Seren nachweisen. Trotz der hohen Sensitivität bestand eine hohe Spezifität der Anti-SmD1 83-119-Antikörper für den SLE (93%), wobei Gesunde keine Anti-SmD1 83-119-Antikörper zeigten.

Der Vergleich mit bisher verwendeten Testverfahren zum Nachweis von Anti-Sm-Antikörpern wie der Gegenstromelektrophorese, dem Immunoblot, Dot-Assay oder einem kommerziellen Anti-Sm-ELISA bestätigte die deutliche Überlegenheit des Anti-SmD1 83-119-ELISAs, wobei eine Konkordanz der Befunde bestand.

Anschließend wurden 6 SLE-Patienten im Verlauf untersucht, die mit einem schweren SLE in unsere Klinik eingewiesen wurden. Es konnte eine deutliche Abhängigkeit der Anti-SmD1 83-119-Titer von der Krankheitsaktivität nachgewiesen werden. Dabei spiegeln die Anti-SmD1 83-119-Antikörper den Krankheitsverlauf exakter wider als die parallel bestimmten Anti-dsDNA-Antikörper. Anti-SmD1 83-119-Antikörper ließen sich auch bei Patienten ohne Anti-dsDNA-Antikörper nachweisen, so dass diese Antikörper zur Verlaufskontrolle eingesetzt werden können.

Anti-SmD1 83-119-Antikörper ließen sich signifikant häufiger bei Patienten mit im ELISA nachweisbaren Anti-dsDNA-Antikörpern nachweisen ($p<0.0001$, Mann-Whitney U-Test). Damit besteht eine enge Assoziation zwischen dem Auftreten von Anti-dsDNA-Antikörpern und Anti-SmD1 83-119-Antikörpern. Einige humane monoklonale Anti-.dsDNA-Antikörper reagierten mit dem SmD1 83-119-Peptid, was als Hnweis auf Kreuzreaktionen zu deuten ist.

Ein Entfernen von Anti-dsDNA-Antikörper führte jedoch nicht zu einem signifikanten Abfall der Anti-SmD1 83-119-Antikörper-Spiegel in den untersuchten Seren.

Die Reaktion von Anti-SmD1-positiven Seren ließ sich im MOLT-4 Blot wie auch im ELISA durch Zugabe des SmD1 83-119-Peptid inhibieren, wobei das lösliche Peptid eine geringere Potenz zur Inhibition aufwies als das an die feste Phase einer ELISA-Platte gebundene Peptid, was wiederum für die Konformationsabhänigkeit des SmD1 83-119-Peptids spricht. Der hemmende Effekt des SmD1 83-119-Peptids ließ sich bei Verwendung eines rekombinant hergestellten SmD1-Proteins zeigen.

Schließlich wurden Kaninchen mit dem SmD1 83-119-Peptid immunisiert und die entstandenen Reaktivitäten im Anti-SmD1 83-119-ELISA und im Immunoblotting unter Verwendung vom MOLT-4 Extrakt und dem rekombinant hergestellten SmD1-Protein getestet. Nach Immunisierung mit dem SmD1 83-119-Peptid ließen sich nach 21 Wochen deutliche Reaktivitäten im Anti-SmD1 83-119-ELISA sowie im Immunoblotting unter Verwendung des rekombinanten SmD1-Protein nachweisen. Bei Verwendung vom MOLT-4-Extrakt als Antigenquelle im Immunoblot konnte nur in einem Drittel der Seren eine Reaktivität gegen das SmD1 83-119-Protein beobachtet werden. Damit ist erneut gezeigt worden, dass die Antigenquelle den Nachweis von Antikörpern beeinflussen kann.

Zusammenfassend konnte ein Epitope der B-Zellantwort am C-Terminus des SmD1-Proteins identifiziert werden, das mit hoher Spezifität und Sensitivität Ziel der Immunantwort beim SLE ist. Es wurde ein Test entwickelt, der die Diagnostik des SLE verbessert und die Aktivität der Erkrankung widerspiegelt. Die Assoziation mit der Krankheitsaktivität und mit Anti-dsDNA-Antikörpern spricht für eine mögliche pathogenetische Bedeutung des Peptids für den SLE. Die Ergebnisse aus dem linearen Epitopmapping sowie der Hemmversuche sprechen für ein Konformationsepitop, welches von dem SmD1 83-119-Peptid gebildet wird.

Familiality and Co-occurrence of Clinical Features of Systemic Lupus Erythematosus

Betty P. Tsao, Jennifer M. Großman, **Gabriela Riemekasten**, Noel Strong, Jatinderpal Kalsi, Daniel J. Wallace, Chung-Jen Chen, Chak S.Lau, Ellen M. Ginzler, Ros Goldstein, Kenneth C. Kalunian, John B. Harley, Frank C. Arnett, Bevra H. Hahn. Rita M. Cantor. Arthritis Rheum 2002; 46 (10): 2678-85.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluß von genetischen Faktoren auf das Auftreten von klinischen Symptomen und Laborparametern beim SLE. Geschwister von SLE-Patienten weisen ein etwa 20-40-fach höheres Risiko auf, an einem SLE zu erkranken als die Normalbevölkerung. Ziel dieser Arbeit war es, eine Risikoabschätzung für mögliche klinische Erscheinungen beim SLE vorzunehmen, sofern ein Familienmitglied erkrankt war. In einer multizentrischen Studie wurden 159 Geschwisterpaare sowie 37 Eltern-Kinder-Paare mit unterschiedlichem ethnischen Hintergrund untersucht, die an einem SLE erkrankt waren. Insgesamt wurden 15 klinische Symptome oder Laborparameter erfasst.

Die Studie führte zu folgendem Ergebnis: Sofern ein Familienmitglied an einem SLE mit einer Thrombozytopenie erkrankt war, bestand ein deutlich erhöhtes Risiko des anderen Familienmitgliedes mit SLE, auch an einer Thrombopenie zu erkranken. Das gleiche trifft zu, wenn ein Familienmitglied einen discoider Lupus, eine neurologische Erkrankung oder eine hämolytische Anämie aufwies. Geschwister erkrankten etwa im gleichen Alter an einem SLE, Kinder von betroffenen Elternteilen erkrankten früher. Bezüglich der Anti-SmD1 83-119-Antikörper war auffällig, dass die Spiegel der Anti-SmD1 83-119-Antikörper bei den Geschwisterpaaren sehr ähnlich waren. Unabhängig davon konnte die hohe Frequenz der Anti-SmD1 83-119-Antikörper auch in dieser Population mit 69,3% der untersuchten Patienten bestätigt werden. Damit waren Anti-SmD1 83-119-Antikörper die am häufigsten nachgewiesene Spezifität auch in dieser überwiegend US-amerikanischen Population von SLE-Patienten.

Casein is an Essential Cofactor in Autoantibody Reactivity Directed against the C-terminal SmD1 Peptide AA 83-119 in Systemic Lupus Erythematosus

Gabriela Riemekasten, Jeannette Marell, Christian Hentschel, Rolf Klein, Gerd-R. Burmester, Werner Schössler, Falk Hiepe. Immunobiology 2002;206: 537-545.

In dieser Arbeit wird die Rolle von Casein für die Anti-SmD1 83-119-Antikörper-Antwort ermittelt. In Vorversuchen zur Herstellung eines kommerziell erhältlichen Tests für die Bestimmung der Anti-SmD1 83-119-Antikörper ist gezeigt worden, dass die Substitution von Trockenmilch in den Blockierungslösungen oder Verdünnungsmedien der zu untersuchenden Seren die Qualität des ELISAs hinsichtlich Sensitivität und Spezifität deutlich beeinflusst. Die vorliegende Arbeit hat deshalb den Einfluss möglicher Kofaktoren untersucht, die die Anti-SmD1 83-119-Reaktivität beeinflussen. Solche Kofaktoren sind bereits für andere Autoantikörperreaktivitäten beschrieben worden. So stellt das ß2-Glycoprotein I einen wichtigen Kofaktor für die Anti-Cardiolipin-Reaktivität dar (Galli).

Es wurden verschiedene blockierende Substanzen (Trockenmilch, BSA, FCS) parallel bei der Untersuchung gleicher Seren verwendet, wobei die Überlegenheit der Trockenmilch für die Diskriminierung von positiven und negativen Seren gezeigt wurde. Um nachzuweisen, welcher Bestandteil der Trockenmilch für die Qualitätssteigerung des ELISAs verantwortlich ist, erfolgte eine Lipidextraktion der Trockenmilch. Diese hatte keinen Einfluß auf die Qualität des ELISA, was einen Proteinbestandteil als Kofaktor vermuten ließ. Die anschließende tryptische Verdauung führte zu einer deutlichen Verschlechterung der Diskriminierung und bestätigte, dass ein Kofaktor in der Proteinfraktion der Trockenmilch vorhanden sein muß, der die Anti-SmD1 83-119-Antikörper-Antwort beeinflußt. Das Phosphoprotein Casein bildet ca. 80% des Proteinanteils in der Trockenmilch, weshalb die Wahrscheinlichkeit hoch war, dass dieses Protein an der Anti-SmD1 83-119-Reaktion beteiligt ist. In der Literatur war beschrieben worden, dass Casein selbst Autoimmunphänome

induzieren kann und dass in einigen Autoimmunerkrankungen Casein von T-Zellen erkannt wird. Es finden sich ferner Arbeiten, die das Auftreten des autoimmun bedingten Diabetes mellitus Typ 1 mit dem erhöhten Konsum von Kuhmilch und damit von Casein assoziiert. Die Zugabe von reinem Casein in die Medien zur Blockierung und Verdünnung der Seren führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der Diskriminierung von positiven und negativen Anti-SmD1 83-119-Seren, so dass die Qualität des ELISA wieder vergleichbar war mit der Zugabe von Trockenmilch. Um die Mechanismen zu untersuchen, wie das Casein die Anti-SmD1 83-119-Antwort beeinflußt, erfolgten Immunisierungsversuche, wobei Kaninchen entweder mit dem SmD1 83-119-Peptid oder mit dem Casein-SmD1 83-119-Gemisch immunisiert wurden. Es ergab sich keinerlei Einfluß auf die Anti-SmD1 83-119-Reaktivität, so dass eine Rolle des Caseins als Bestandteil der antigenen Bindungsstelle der Anti-SmD1 83-119-Antikörper weitgehend ausgeschlossen wurde. Möglicherweise beeinflußt Casein die Konformation des SmD1 83-119-Peptids über Plastik-Protein oder Protein-Protein-Interaktionen, wie bereits für andere Antigene beschrieben. Welche Einflüsse *in vivo* die antigene Struktur des SmD1 83-119-Peptids beeinflussen und die Konformation entstehen lassen, die zur Bildung von Anti-SmD1 83-119-Antikörper beim SLE führt, bleibt noch unbekannt. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die hohe Sensitivität und Spezifität der Anti-SmD1 83-119-Antikörper allein auf das SmD1 83-119-Peptid beruht und dass Casein bei dem SmD1 83-119-Peptid eine Konformation erzeugt, die vergleichbar mit dem *in vivo* Ziel der Immunantwort beim SLE ist.

T cell reactivity against the SmD183-119 C-terminal peptide in patients with systemic lupus erythematodes

By Gabriela Riemekasten, Catarina Weiß, Sandra Schneider, Andreas Thiel, Anne Bruns, Frank Schumann, Stefan Bläß, Gerd-R. Burmester, and Falk Hiepe. Annals of Rheumatic Diseases 2002 Sep;61(9):779-85.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob das SmD1 83-119–Peptid auch von humanen T-Zellen erkannt wird. Zu diesem Zweck wurden aus dem heparinisierten Blut von 32 SLE-Patienten sowie 29 Kontrollpersonen die peripheren Blutmonozyten (PBMC) gewonnen und mit und ohne dem SmD1 83-119-Peptid oder mit dem gesamten SmD1-Protein kultiviert. Die durch das Antigen induzierte Stimulation der Zellen wurde mittels Proliferationstest gemessen, wobei radioaktiv markiertes Thymidin in sich teilende Zellen eingebaut wird und damit einer Messung zugänglich ist. Als positive Kontrolle wurden die Zellen mit PHA stimuliert. Um den Einfluß von dsDNA auf die T-Zellproliferation zu analysieren, wurde einigen Kulturen zusätzlich zu dem SmD1 83-119-Peptid oder dem rekombinanten Protein dsDNA zugesetzt. Es sollte untersucht werden, ob Nukleinsäuren einen Einfluß auf die Frequenz der reaktiven T-Zellen ausüben.

Die Kinetik der Proliferation gibt Aufschluss darüber, welche Zellen sich teilen. Sofern möglich, wurde die Proliferation der Zellen mittels Flow-Zytometer gemessen, wobei eine durch das SmD1-Peptid induzierte intrazelluläre Zytokinanwort gemessen wurde.

Schließlich wurde untersucht, ob die Fähigkeit der SmD1 83-119-induzierten T-Zellproliferation mit klinischen Symptomen der Patienten oder der Aktivität korreliert. Soweit möglich, wurden die MHC-Klassen I und II von den Patienten ermittelt und diese mit der Fähigkeit zur T-Zellproliferation verglichen.

Von den PBMC der 32 SLE-Patienten zeigten 6 keine Reaktion auf PHA, so dass diese Zellen als anerg angesehen werden müssen. Bei den PBMC der Kontrollgruppe zeigten nur zwei keine Reaktion auf PHA. Demnach waren die Lymphozyten von 28 SLE-Patienten und von 27 Kontrollpatienten der weiteren Untersuchung zugänglich. Von den 28 SLE-Patienten zeigten 11 (39%) eine durch das SmD1 83-119-Peptid-induzierte Stimulation der T-Zellen, während in der Kontrollgruppe nur zwei (ein gesunder Proband und ein Patient mit einer ANA-positiven RA) eine Stimulation zeigten. Die durch das SmD1 83-119-induzierte Lymphozytenproliferation des gesunden Spenders war jedoch sehr gering. Das gesamte SmD1- Protein bewirkte in 10 der 28 PBMC (32%) von SLE-Patienten eine Stimulation. Die Lymphozyten eines gesunden Probanden zeigten ebenfalls eine schwache Reaktion auf das Protein. Damit ist eine T-Zellantwort gegen das SmD1 83-119-Peptid sowie gegen das SmD1-Protein relativ spezifisch für den SLE.

Die Zugabe von dsDNA zum SmD1 83-119-Peptid oder zum SmD1-Protein erhöht die Frequenz der Patienten mit einer T-Zellantwort noch, so dass ca. 63% der Patienten entweder gegen das SmD1 83-119-Peptid, das SmD1-Protein, SmD1 83-119 plus DNA oder SmD1-Protein plus dsDNA eine Proliferation von Blutmonozyten zeigen. Die Proliferationsraten waren erwartungsgemäß an den ersten 7 Tagen am höchsten, wobei die stärkste Proliferation nach drei Tagen gemessen wurde. Bei einigen Patienten kam es auch zu einer Proliferation nach 12 Tagen, wobei sich hier möglicherweise andere Zellen als T-Zellen teilen.

Sowohl Patienten mit und ohne SmD1 83-119-induzierter T-Zellproliferation wiesen Anti-SmD1 83-119-Antikörper auf. Des weiteren besteht kein Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer SmD1 83-119-induzierten T-Zellproliferation und dem Auftreten von Anti-dsDNA-Antikörpern und mit der Krankheitsaktivität.

Demgegenüber ließen sich Assoziationen zwischen dem Auftreten einer SmD1 83-119-induzierten T-Zellproliferation und bestimmten klinischen Manifestationen nachweisen.

Patienten mit SmD1 83-119-induzierter Proliferation wiesen signifikant häufiger eine Herz- (Myokarditis, Arrhythmien, Perikarditis) oder Lungenbeteiligung (Pleuritis, Lungenfibrose) auf. Möglicherweise reflektieren diese Manifestationen eher zelluläre Immunvorgänge, während die signifikante Assoziation zwischen einer Nierenbeteiligung und dem Nachweis von Anti-SmD1 83-119-Ak eher auf humorale Mechanismen zurückgeführt werden kann.

Die Proliferation als Antwort auf das SmD1 83-119-Peptid lässt sich auch zytometrisch nachweisen. Bei einer SLE-Patienten ließen sich 15% aller proliferierenden Zellen auf die Stimulation mit dem SmD1 83-119-Peptid zurückführen. Weiterhin konnte eine durch das SmD1 83-119-induzierte TNFα-Produktion nachgewiesen werden. Allerdings war diese Patienten bezüglich des SLE über mehrere Jahre beschwerdefrei.

In der vorliegenden Arbeit konnte somit der Nachweis erbracht werden, dass bei Patienten mit einem SLE eine T-Zellreaktivität gegenüber dem SmD1 83-119-Peptid besteht und dass diese mit klinischen Manifestationen assoziiert ist. Diese T-Zellreaktivität ist relativ spezifisch für den SLE. Es konnte ferner gezeigt werden, dass dsDNA die Frequenz der Patienten mit SmD1-reaktiven T-Zellen erhöht, was erneut dafür spricht, dass ein Komplex aus dsDNA und dem SmD1-Protein bzw. einem Teil dieses Proteins Ziel der Immunantwort beim SLE ist.

Aus der positiven T-Zellantwort ergeben sich gleichermaßen Ansätze für eine mögliche spezifische Therapie des SLE, sofern es uns gelingt, die Mechanismen der spezifischen Toleranzinduktion besser zu verstehen. Die Modulation SmD1 83-119-spezifischer T-Zellen wäre eine mögliche therapeutische Option in der Behandlung des SLE, die zukünftig zu einer besseren und risikoärmeren Therapie des SLE führen könnte.

Strong acceleration of murine lupus by injection of the SmD1(83-119) peptide.

Gabriela Riemekasten, Annegret Kawald, Catharina Weiß, Andrea Meine, Jeannette Marell, Rolf Klein, Berthold Hocher, Christian Meisel, Gert Hausdorf, Rudi Manz, Thomas Kamradt, Gerd-R. Burmester, Falk. Hiepe. Arthritis Rheum. 2001, 44(10):2435-2445.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die pathogenetische Bedeutung des SmD1 83-119-Peptids beim systemischen Lupus erythematodes zu untersuchen. Bei der in vorigen Arbeiten beschriebenen Assoziation zwischen Anti-dsDNA-Antikörpern und Anti-SmD1 83-119-Antikörpern war die Frage interessant, ob das SmD1 83-119-Peptid die Bildung von pathogenetisch bedeutsamen Anti-dsDNA-Antikörpern beeinflusst. Deshalb wurde mit den NZB/W-Mäusen ein Mausmodell gewählt, bei dem es spontan im Alter von ca. 16 Wochen zur Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern und zur Antikörper-vermittelten Glomerulonephritis kommt, die im Alter von etwa 50 Wochen zum Tode führt. Bei diesem Mausmodell waren Anti-Sm-Antikörper nicht oder nur selten beschrieben. Parallel wurden gesunde Mäuse mit dem gleichen genetischen MHC-Typ (CWF1-Mäuse) sowie andere gesunde Mäuse (BALB/c) immunisiert, um mögliche genetische Faktoren für die Entwicklung der Antikörper nachzuweisen. Als Antigen wurde das an einen Träger (KLH) kovalent gebundene SmD1 83-119-Peptid verwendet, wobei verschiedene Immunisierungs-Protokolle (einmalig mit 300µg oder dreifach mit 100, 50 und 50µg pro Injektion) untersucht wurden. Die Kopplung an KLH war notwendig, da Peptide allein nur eine unzureichende Immunreaktion induzieren können. Als Kontrollantigene wurden das rekombinant hergestellte SmD1-Protein (mit und ohne KLH), eine KLH-gekoppeltes randomisiertes Peptid mit der gleichen Aminosäurezusammensetzung wie das SmD1 83-119-Peptid, aber mit zufälliger Aminosäuresequenz, Ovalbumin, KLH und Kochsalz verwendet. Die Immunisierung erfolgte

im Alter von ca. 12 Wochen, also bei NZB/W-Mäusen in einem Alter, wo die Erkrankung noch nicht nachweisbar ist. Monatlich wurde den Mäusen Blut zur Gewinnung von Serum oder Plasma abgenommen, um Kreatinin, Harnstoff sowie Anti-dsDNA-Antikörper und Anti-SmD1 83-119-Antikörper zu bestimmen. Des weiteren wurden die Seren von den einzelnen Gruppen exemplarisch im Immunoblotting untersucht, um auch andere Spezifitäten von Autoantikörpern zu bestimmen. Zusätzlich erfolgten monatlich an drei aufeinanderfolgenden Tagen Urinuntersuchungen auf Proteinurie. Ein Teil der Mäuse wurde im Alter von 6 Monaten getötet, wobei dann die Nieren histologisch und immunhistologisch aufgearbeitet wurden. Bei einem weiteren Teil der Mäuse wurde jeweils vor und nach der Immunisierung die T-Zellantwort gegen das SmD1 83-119-Peptid gemessen, wobei die Proliferation von Splenozyten innerhalb der ersten 3-7 Tage mittels Einbau von radioaktiven Thymidin gemessen wurde.

Die Immunisierung mit dem SmD1 83-119-Peptid beschleunigte die Entwicklung von Anti-dsDNA-Antikörpern und der Glomerulonephritis, so dass es zu einer signifikanten Verkürzung des Überlebens der NZB/W-Mäuse kam. Die Seren von den mit dem SmD1 83-119-Peptid behandelten Mäusen zeigten im Immunoblotting eine Vielzahl von weiteren Banden, was auf einen Einfluss des SmD1 83-119-Peptids auf andere Antikörperspezifitäten schließen lässt. Bei den mit Kontrollantigenen immunisierten Mäusen ließ sich kein oder nur ein geringer Effekt auf die Anti-dsDNA-Antwort oder auf den Krankheitsverlauf nachweisen. In gesunden Mausstämmen konnten weder Anti-SmD1 83-119- oder Anti-dsDNA-Antikörper induziert werden. Des weiteren traten keine SLE-assoziierten Symptome oder eine Nephritis auf. Damit wurde erstmals ein Einfluss des SmD1 83-119-Peptids auf die Generierung von Anti-dsDNA-Antikörper gezeigt.

Die histologischen und immunhistologischen Untersuchungen bestätigten das Auftreten einer beschleunigten Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis in den NZB/W-Mäusen,

nicht jedoch in den gesunden Mausstämmen. Die Proliferationstests zeigten im Vergleich zu den gesunden Mausstämmen eine deutliche T-Zellreaktivität gegen das SmD1 83-119-Peptid in NZB/W-Mäusen. Die Immunisierung konnte in NZB/W-Mäusen die T-Zellreaktivität noch steigern, nicht jedoch bei den CWF1- oder BALB/c-Mäusen. Demzufolge scheint bei den NZB/W-Mäusen eine fundamentale, möglicherweise SLE-spezifische Störung der T-Zellantwort vorzuliegen. Da Anti-SmD1 83-119-Antikörper trotz der Immunisierung inkonstant auftraten, wurde die Hypothese erstellt, dass das SmD1 83-119-Peptid ähnlich einem Hapten möglicherweise solche T-Zellen aktivieren kann, die eine Hilfe für die Entstehung von Anti-dsDNA-Antikörpern liefern. Geht man von einem Komplex zwischen dsDNA und dem SmD1 oder dem SmD1 83-119-Peptid als gemeinsamen Antigen von Anti-dsDNA-Antikörpern und Anti-Sm-Antikörpern aus, könnte dsDNA von B-Zellen und das SmD1 83-119-Peptid von T-Zellen erkannt werden. Dies wäre ein neues Modell, welches die Interaktion zwischen Anti-SmD1 83-119-Antikörper und Anti-dsDNA-Antikörper erklärt.

Zusammenfassend wurde hier in einem Tiermodell des SLE erstmals die pathogenetische Bedeutung des SmD1 83-119-Peptids und ein Zusammenhang zwischen dem SmD1-Peptid und Anti-dsDNA-Antikörper demonstriert. Es gab erste Anzeichen dafür, dass SmD1 83-119-reaktive T-Zellen an der Bildung von pathogenetisch bedeutsamen Anti-dsDNA-Antikörpern und damit an der Pathogenese des beteiligt sind.

Identification and characterization of SmD1$_{83-119}$-reactive T cells that give T cell help for pathogenic anti-dsDNA antibodies

Gabriela Riemekasten*[‡], Fanny M. Ebling[‡], George Karpouzas[‡], Jatinderpal Kalsi[‡], Gunda Herberth*, Dirk Langnickel*, Betty Tsao[‡], Peter Henklein[#], Sven Langer, Gerd-R. Burmester*, Andreas Radbruch[§], Falk Hiepe[§*], and Bevra H. Hahn. Arthritis Rheum 2003;48: 475-485.

Ziel dieser Arbeit war es, SmD1 83-119-spezifische T-Zellen beim murinen SLE zu identifizieren, ihren Effekt auf die Synthese von Anti-dsDNA-Antikörpern *in vitro* nachzuweisen und sie phänotypisch und hinsichtlich ihrer Zytokinexpression zu charakterisieren. Es sollten SmD1 83-119-spezifische T-Zellinien generiert und sowohl fnktionell als auch phänotypisch charakterisiert werden. Es wurden für diese Fragestellungen verschiedene Techniken einschließlich Autoantigen-spezifische ELISPOTs, ELISAs für den Nachweis von Zytokinen und Autoantikörpern, ein Westernblot, Zytokin-spezifische ELISPOTs sowie die Flow-Zytometrie zur Charakterisierung der SmD1 83-119-spezifischen T-Zellen verwendet. Der Einfluß des SmD1 83-119-Peptids auf die Synthese von Anti-dsDNA-Ak ist zu verschiedenen Zeitpunkten während der Krankheitsentwicklung gemessen worden, ebenso die Expression der Zytokine. Die SmD1 83-119-spezifischen T-Zellinien wurden aus unbehandelten 8-10 Wochen alten NZB/W-Mäusen generiert. Als Kontrollantigen wurde Ovalbumin verwendet, wobei diese T-Zellinie nach Immunisierung der NZB/W-Mäusen mit Ovalbumin hergestellt wurden.

Das SmD1 83-119-Peptid führte in Kulturen von B und T-Zellen aus NZB/W-Mäusen zum 2-3-fachen Anstieg der Anti-dsDNA-Antikörper-Antwort im Vergleich zur Basalsekretion von T- und B-Zellen ohne das Peptid. Der Vergleich mit Peptiden, von denen ebenfalls bekannt war, dass sie die Anti-dsDNA-Antikörper-Antwort erhöhen können, zeigte die

außerordentlich hohe Potenz des SmD1 83-119-Peptids für die Stimulation der Anti-dsDNA-Antikörper. Eine Immunisierung mit dem SmD1 83-119-Peptid erhöhte die Anti-dsDNA-Antikörper-Antwort auf das 5-6-fache im ELISPOT, wobei die Wirkung des SmD1 83-119-Peptids altersabhängig war. Interessanterweise ließen sich Anti-SmD1 83-119-Antikörper in den Zellkulturen von unbehandelten Mäusen nicht nachweisen. Dies war nur der Fall, wenn man die Zeit der Kultur verlängert oder wenn man die Anti-SmD1 83-119-Antwort nach Immunisierung mit dem Peptid bestimmt.

Der Anstieg der Anti-dsDNA-Antikörper ging mit einer erhöhten Interferon-γ und Interleukin-4-Sekretion einher, welche im Zytokin-ELISPOT gemessen wurden. Außerdem ließ sich in jungen NZB/W-Mäusen eine deutliche Vermehrung der IL-10 und TGFß-Produktion nachweisen. Die durch das SmD1 83-119-Peptid induzierte Zytokinexpression ist altersabhängig. Während der Erkrankung kommt es zum Überwiegen der Expression von Interferon γ und IL-2 (also der inflammatorischen Th-1-Antwort), während die Interleukin-4 Expression (Th-2-Antwort) abnimmt. In Kulturüberständen aus unbehandelten Mäusen ließen sich mittels Zytokin-ELISA keine erhöhten Zytokine nachweisen. Die Durchflußzytometrie zeigte ebenfalls keine Erhöhung Zytokin-produzierender Zellen als Antwort auf das SmD1 83-19-Peptid. Dies lässt sich möglicherweise mit der niedrigen Frequenz der SmD1 83-119-reaktiven T-Zellen erklären.

Anders ist es jedoch, wenn man die Zytokine nach Immunisierung mit dem SmD1 83-119-Peptid bestimmt. In diesem Fall lässt sich die erhöhte IFNγ-Produktion auch in Zellüberständen mittels ELISA und flowzytometrisch nachweisen, was für die dominante Rolle dieses Zytokins spricht. Allerdings ist die Frequenz der SmD1 83-119-spezifischen T-Zellen mit ca. 0.1% sehr gering.

Nach Immunisierung verringerte sich die Zahl der TGFß-produzierenden T-Zellen, ebenfalls war die IL-10 Expression im Vergleich zu unbehandelten NZB/W-Mäusen erniedrigt. Die

genannten Veränderungen ließen sich auch nach Immunisierung von älteren Mäusen nachweisen, die Effekte waren allerdings geringer.

Die SmD1 83-119-spezifischen T-Zellinien, nicht jedoch OVA-spezifische Linien, erhöhten die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern in Zellkulturen um das 40-80-fache im Vergleich zu T-Zellen von unbehandelten Mäusen. Bei der phänotypischen Charakterisierung der SmD1 83-119-spezifischen T-Zellen waren mehr als 90% der Zellen CD4+.

Auffällig war wiederum die hohe Rate der IFNγ-Expression. Nach unspezifischer Stimulation mit Anti-CD3 ließ sich in etwa 90% der proliferierenden Zellen eine Expression von Interferon-γ nachweisen, wobei die Proliferation zytofluometrisch mittels CFDA-SE-Färbung gemessen wurde. Auffällig war weiterhin ein hoher Anteil an Zellen, die eine Koexpression mit IL-4 und Interferon-γ aufwiesen. Nach unspezifischer Stimulation betrug der Anteil dieser doppelt-positiven T-Zellen ca. 55%. Solche doppelt-positiven Th0-Zellen sind bereits beim SLE beschrieben wurden. OVA-spezifische T-Zellinien zeigten keine Vermehrung der Koexpression und SmD1 83-119-spezifische T-Zellinien, die hauptsächlich eine IFNγ-Expression ohne Koexpression mit IL-4 zeigten, wiesen keine vermehrte Anti-dsDNA-Antikörper-Antwort auf. Dies unterstützt die Vermutung, dass $IFN\gamma^{+}/IL\text{-}4^{+}$-T-Zellen eine Rolle bei der Bildung von pathogenen Antikörpern spielen. Da während der Krankheitsaktivität des SLE sowohl inflammatorische (Th-1-gerichtete) als auch humorale (Th-2-gerichtete) Mechanismen beteiligt sind, könnten Th0 Zellen mit einer Koexpression von IFNγ und IL-4 eine Verbindung zwischen humoraler und inflammatorischer Immunantwort darstellen.

Zusammenfassend wurden erstmals SmD1 83-119-reaktive T-Zellen identifiziert und phänotypisch charakterisiert und ihr Einfluß auf die Anti-dsDNA-Antikörper-Antwort direkt demonstriert. Es wurde ein neues Modell für die Generation von pathogenetisch bedeutsamen Anti-dsDNA-Antikörpern erstellt (siehe Zusammenfassung).

I.v. injection of a SmD1 peptide postpones anti-dsDNA Ab generation and murine lupus.

By Gabriela Riemekasten*, A. Meine*, F. Ebling[‡], B. Hocher[+], S. Krause*, C. Weiß*, T. Muzzulini[§], G.R. Burmester*, B. Hahn[‡], F. Hiepe*[§]. Accepted for oral presentation in the ACR-Meeting October 2002, New Orleans, Publikation in Vorbereitung

Es sollte nun untersucht werden, ob SmD1 83-119 reaktive T-Zellen auch so moduliert werden können, dass sie die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern verhindern oder vermindern, was einer spezifische Toleranzinduktion entspricht. In dieser Arbeit wurden NZB/W-Mäusen hohe intravenöse SmD1 83-119-Dosen (600-1000µg/Monat) in verschiedenen Behandlungsprotokollen verabreicht und der Verlauf der Erkrankung sowie die Veränderung der Zytoinantwort untersucht.

Hohe intravenöse Dosen des SmD1 83-119-Peptids führten zum signifikant verlängerten Überleben von NZB/W-Mäusen. Die verbesserte Lebensdauer ging mit einem deutlichen Abfall von Anti-dsDNA-Antikörpern und von Anti-SmD1 83-119-Antikörpern im Vergleich zu altersgleichen mit Kochsalz behandelten Mäusen einher. Die Nierenretentionsparameter und die Proteinurie waren signifikant niedriger in den SmD1 83-119-behandelten Mäusen, histologisch fand sich eine geringer ausgeprägte Glomerulonephritis in den behandelten Mäusen. Der *in vivo* beobachtete Effekt ließ sich auch *in vitro* nachweisen, wobei im ELISPOT gezeigt wurde, dass die i.v.-Gabe vom SmD1 83-119-Peptid im Vergleich zu gesunden Mäusen die T-Zellhilfe für die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörper unterdrückt. Die Zugabe von unbehandelten T-Zellen führte nicht zu einer T-Zellhilfe für die bildung von anti-dsDNA-Antikörper, was auf regulative Möglichkeiten der T-Zellen hinweist. Diese konnten durch Transferexperimente bestätigt werden, da das Einspritzen von „toleranten“ T-Zellen in den Empfängertieren zur deutlich verringerten Bildung von Anti-dsDNA-Antikörper führte. Damit konnte erstmals die Bildung von regulativen T-Zellen beim SLE nach

Hochdosis-Toleranz nachgewiesen werden. Eine Toleranz ließ sich *in vitro* auch bei bereits erkrankten Mäusen nachweisen. Ferner spielt es für die Toleranzinduktion keine Rolle, ob das SmD1 83-119-Peptid intravenös oder subkutan verabreicht wurde.

Eine Woche nach der intravenösen Gabe des Peptids kam es zum Abfall der Zytokine IFNγ, IL-2, IL-4, während die IL-10-Expression unverändert blieb. TGFß-produzierende Zellen wurden hingegen hochreguliert. Werden NZB/W-Mäuse nach einer Hochdosis-Therapie mit dem SmD1 83-119-Peptid zu einem späteren Zeitpunkt untersucht, so besteht eine deutliche Erhöhung von Tr1-T-Zellen mit einer IFNγ und IL-10-Produktion. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen die *in vitro*- Proliferation naiver T-Zellen verhindern. Schließlich gelang erstmals die Gewinnung von SmD1 83-119-reaktiven IGNγ+/IL-10+-regulativen T-Zellen durch bestimmte Kulturbedingungen nach Toleranzinduktion und die Generierung einer SmD1 83-119-spezifischen T-Zellinie mit gleichem Phänotyp. Damit wurde eine Grundlage gelegt für zukünftige Autoantigen-spezifischen T-Zelltherapien.

Zusammenfassend ist in dieser Arbeit erstmals gezeigt worden, dass das SmD1 83-119-Peptid die Krankheit direkt modulieren kann und eine Autoantigen-spezifische Toleranz zu einer Verbesserung der Erkrankung führt. Es konnten durch eine Peptidbehandlung direkt Veränderungen im Zytokin Milieu nachgewiesen werden. Erstmals gibt es Belege für das Vorhandensein von regulativen T-Zellen beim SLE und ihrer Möglichkeit, diese *in vivo* und *in vitro-zu* generieren. Damit wurde ein erster Schritt für eine T-Zell-gerichtete Autoantigen-spezifische Therapie getan.

3. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde ein Autoantigen am C-Terminus des SmD1-Proteins identifiziert, gegen das die Mehrzahl der SLE-Patienten Autoantikörper aufweist. In unserer Kohorte von 164 SLE-Patienten fanden sich Anti-SmD1 83-119-Peptid-Antikörper in 70% der Patienten, die somit häufiger als andere Autoantikörper einschließlich Anti-dsDNA-Antikörper nachweisbar waren. Die hohe Frequenz der Anti-SmD1 83-119-Antikörper beim SLE wurde zu einem späteren Zeitpunkt auch in einer anderen Kohorte von mehr als 270 SLE-Patienten mit unterschiedlicher ethnischer Zusammensetzung bestätigt. Anti-SmD1 83-119-Antikörper zeigten eine hohe Spezifität für den SLE (93%) und ließen sich bei den Kontrollgruppen (z.B. Sjögren-Syndrom, Mischkollagenose) nur selten und in niedrigen Titern nachweisen. Gesunde Probanden oder HIV-Patienten zeigten keine Anti-SmD1 83-119-Antikörper. Untersuchungen zur Feinspezifität der Anti-SmD1 83-119-Antikörper sowie Hemmversuche mit dem SmD1 83-119-Peptid lassen ein Konformationsepitop vermuten, welches von den Anti-SmD1 83-119-Antikörpern erkannt wird. Die hohe Frequenz der Anti-SmD1 83-119-Antikörper spricht für ein kryptisches Epitop innerhalb des SmD1 83-119-Proteins, da Antikörper gegen das gesamte SmD1 83-119-Peptid wesentlich seltener nachgewiesen werden. Welche Vorgänge *in vivo* zur Bildung des Konformationsepitoes führen, die dann von den Autoantikörpern erkannt werden können, ist unbekannt. Möglicherweise führen spezifische Protein-Nukleinsäure-Wechselwirkungen zur Bildung der Konformation, die zur Erkennung von Autoantikörpern notwendig ist. *In vitro* konnte Casein identifiziert werden, welches über Protein-Protein-Interaktionen oder Plastik-Protein-Interaktionen die spezifische Konformation des SmD1 83-119-Peptids bewirkt, welche von Anti-SmD1 83-119-Antikörpern erkannt wird. Eine direkte Rolle des Caseins bei der Erkennung des SmD1 83-119 Peptids durch Anti-SmD1 83-119-Antikörper konnte nicht nachgewiesen werden.

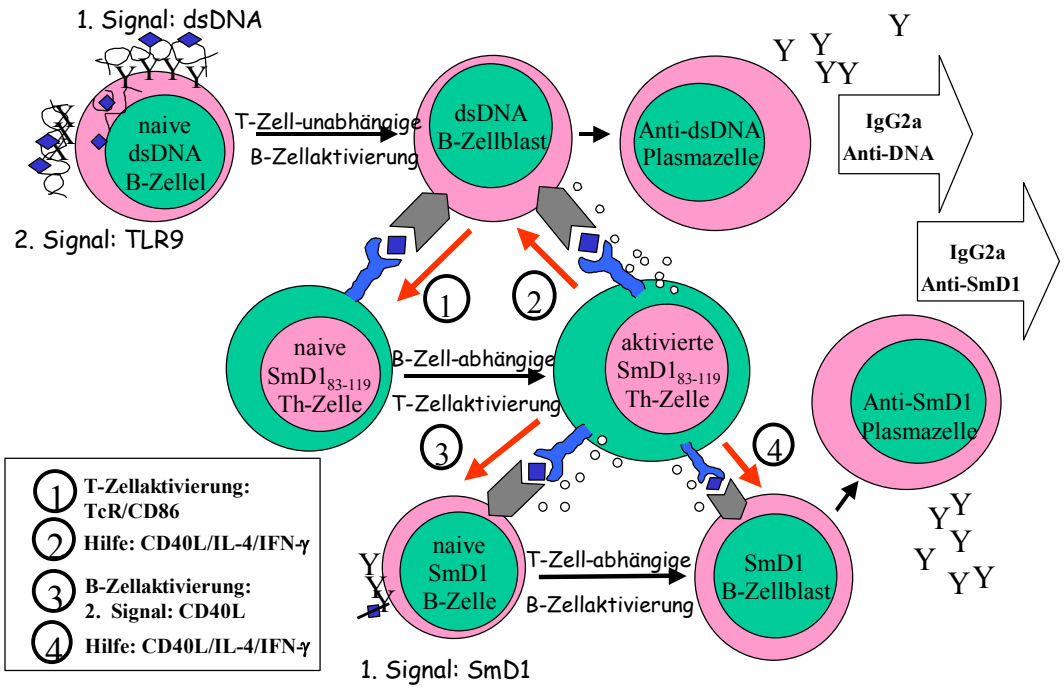
Es bestand eine deutliche Assoziation zwischen Anti-SmD1 83-119-Antikörpern und Anti-dsDNA-Antikörpern. In Patienten mit Anti-dsDNA-Antikörpern ließen sich Anti-SmD1 83-119-Antikörper signifikant häufiger nachweisen. Verlaufsuntersuchungen der Anti-SmD1 83-119-Antikörper-Titer bei SLE-Patienten zeigten eine Abhängigkeit der Titer mit der Krankheitsaktivität. Ebenso wie bei den Anti-dsDNA-Antikörpern wurden hohe Antikörper-Spiegel bei aktiven Krankheitsverläufen beobachtet. Es konnte gezeigt werden dass verschiedene humane monoklonale Antikörper gegen dsDNA ebenfalls mit dem SmD1 83-119-Antikörper reagieren. Kreuzreaktionen zwischen Anti-dsDNA-Antikörpern und Anti-SmD1 83-119-Antikörper können jedoch nicht allein die hohe Frequenz der Anti-SmD1 83-119-Antikörper erklären. Wenn man über eine mit dsDNA beschichtete Säule die Anti-dsDNA-Antikörper entfernt, so ändert sich die Höhe der Anti-SmD1 83-119-Antikörper nur unwesentlich. Demzufolge sind andere Mechanismen für die Interaktion zwischen Anti-dsDNA- und Anti-SmD1 83-119-Antikörpern verantwortlich.

Das SmD1 83-119 Peptid stellt ein Hauptziel der Immunantwort beim SLE dar. Es lag deshalb die Frage nahe, ob dieses Peptid eine pathogenetische Bedeutung für den SLE besitzt, weshalb Tierversuche unternommen wurden. Das SmD1 83-119-Peptid führte in NZB/W-Mäusen, einem Tiermodell, bei dem spontan im Laufe des Lebens eine Nephritis entsteht, die mit dem Auftreten von Anti-dsDNA-Antikörper assoziiert ist, zu einer deutlichen Akzeleration der Anti-dsDNA-Ak-Entwicklung und der Nephritis, was durch histologische und laborchemische Untersuchungen bestätigt wurde. Anti-SmD1 83-119 Antikörper ließen sich nur inkonstant nachweisen. In gesunden Mäusestämmen kam es zu keiner Entstehung eines SLE oder zu Autoimmunphänomenen. Möglicherweise verhindern spezifische Suppressionsmechanismen die Generierung von Autoantikörpern. Mit der verstärkten Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern in Lupus (NZB/W)-Mäusen wurde jedoch erstmals gezeigt, dass das SmD1 83-119-Peptid an der Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern beteiligt ist.

In NZB/W-Mäusen, nicht jedoch in gesunden Mäusestämmen, existieren bereits unabhängig von Manipulationen SmD1 83-119-reaktive T-Zellen, die auf eine *in vitro*-Stimulation mit dem SmD1 83-119-Peptid mit einer Proliferation reagieren. Demzufolge könnte das SmD1 83-119-Peptid über Autoantien-spezifische T-Zellen eine Rolle bei der Entwicklung des SLE spielen.

Die SmD1 83-119-reaktiven T-Zellen konnten identifiziert werden, wobei es gelang, diese direkt *ex vivo* zu charakterisieren und phänotypisch zu beschreiben. Es wurde *in vitro* nachgewiesen, dass SmD1 83-119-reaktive T-Zellen eine T-Zellhilfe für die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern liefern. SmD1 83-119 reaktive T-Zellen produzieren als Antwort auf die *in vitro*-Stimulation mit dem SmD1 83-119-Peptid IFNγ und IL-4. In jungen NZB/W-Mäusen lässt sich auch eine TGFß- und IL-10-Expression durch das SmD1 83-119-Peptid induzieren. Die Zytokin-Expression SmD1 83-119-reaktiver T-Zellen ist abhängig vom Alter der Mäuse und damit von der Entwicklung des Krankheitsprozesses. In erkrankten Tieren dominiert die IFNγ-Antwort; TGFß- oder IL-10-produzierende T-Zellen, denen eine mögliche protektive Rolle zugeschrieben wird, lassen sich dann nicht mehr nachweisen. Wenn man NZB/W-Mäuse mit dem SmD1 83-119-Peptid immunisiert, kommt es zu einer verstärkten T-Zellhilfe für die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern, die mit einer deutlich vermehrten Expression von IFNγ und IL-4 einhergeht, während die TGFß und IL-10-Expression abnimmt. Damit konnte gezeigt werden, dass sich durch Aktivierung einer Autoantigen-spezifischen T-Zelle das Zytokinmuster beeinflussen lässt.

Mit der Identifizierung von SmD1 83-119-reaktiven T-Zellen wurde ein neues Modell für die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörper und für die Interaktion zwischen Anti-Sm- und Anti-dsDNA-Antikörpern geschaffen, welches in der folgenden Abbildung dargestellt ist:



SmD1 83-119 reaktive T-Zellen geben eine T-Zellhilfe für die Bildung von Anti-dsDNA- und erst später für die Bildung von Anti-SmD1 83-119-Antikörpern.

Eine zentrale Rolle für die Präsentation von Autoantigenen scheinen deshalb die Anti-dsDNA-spezifischen B-Zellen zu spielen, die zwei Signale für ihre Aktivierung erhalten: 1. über die Kreuzvernetzung des spezifischen Rezeptors (Antikörper mit der Anti-dsDNA-Spezifität bindet dsDNA), wobei hier angenommen wird, dass ein dsDNA/Sm-Komplex existiert und 2. über einen Antigen-unabhängigen Mechanismus, z.B. über die Aktivierung eines Toll-like-Rezeptor (TLR), der bekanntermaßen methylierte DNA binden kann. Die aktivierte B-Zelle kann nun ihrerseits das SmD1-Peptid über den MHC-Rezeptor den T-Zellen präsentieren und diese zur Zytokinproduktion aktivieren. Die T-Zellhilfe führt nun zum Klassenwechsel bei den Anti-dsDNA-Ak. Zusätzlich kann die Aktivierung der SmD1 83-119-reaktiven T-Zellen nun auch Anti-SmD1 83-119-spezifische B-Zellen aktivieren, denen primär das zweite Signal fehlt. Dieses Modell würde erklären, warum es in Zellkulturen primär zur Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern kommt und erst bei Verlängerung der Kulturzeit zur Bildung von Anti-SmD1 83-119-Antikörpern.

Die weitere Charakterisierung SmD1 83-119-reaktiver T-Zellen gelang mit der Herstellung SmD1 83-119-reaktiver T-Zellinien aus jungen unbehandelten NZB/W-Mäusen. Die hohe Potenz dieser T-Zellen, die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern in Zellkulturen zu verstärken, geht mit einer hohen Frequenz von Zellen mit einer Koexpression von IL-4 und IFNγ und damit von TH1- wie auch Th-2 Zytokinen einher. Mit der Existenz dieser doppelt-positiven T-Zellen kann die Aktivierung von sowohl inflammatorischen (Th-1 getriggerte Antwort) als auch von humoralen (Th-2 getriggerte Antwort) Mechanismen beim SLE erklärt werden.

SmD1 83-119-reaktive T-Zellen lassen sich auch so beeinflussen, dass die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörper in NZB/W-Mäusen verzögert wird. Es konnte gezeigt werden, dass hohe intravenöse Dosen des SmD1 83-119-Peptids die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern und die Nephritis verzögern. Die verringerte T-Zellhilfe für Anti-dsDNA-Antikörper ließ sich auch *in vitro* feststellen, wenn man T-Zellen aus Mäusen gewinnt, die eine Woche vorher eine hohe intravenöse SmD1 83-119-Dosis erhalten hatten.

Eine Woche nach Toleranzinduktion sinkt die Zahl der IL-4-, IL-10- und IFNγ-exprimierenden Zellen im Vergleich zu unbehandelten oder mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Mäusen. Andererseits kam es zu einer vermehrten Aktivierung von TGFß-produzierenden Zellen. Kokulturen von „toleranten“ T-Zellen mit „normalen“ (aus unbehandelten Mäusen stammenden) T-Zellen führten nicht zu einer T-Zellhilfe für Anti-dsDNA-Antikörper, was für die Bildung von regulativen T-Zellen spricht. Die regulative Wirkung dieser Zellen wurde ferner durch Transferversuche von „toleranten T-Zellen“ in NZB/W-Mäuse nachgewiesen. Ein adoptiver Transfer von T-Zellen nach Toleranzinduktion führte bei den Empfänger-Mäusen zu einer deutlich verringerten Anti-dsDNA-Ak-Antwort, nicht jedoch in Mäusen, die physiologiche Kochsalzlösung oder T-Zellen aus unbehandelten Mäusen erhalten hatten. Schließlich konnten beim SLE regulative Autoantigen-spezifische T-

Zellen nachgewiesen, phänotypisch charakterisiert sowie *in vitro* angereichert werden. Damit erfolgte ein erster Schritt für eine Autoantigen-spezifische Therapie durch regulative T-Zellen.

SmD1 83-119-reaktive T-Zellen lassen sich auch beim Menschen nachweisen. In einer ersten Untersuchung von 28 SLE-Patienten ließen sich SmD1 83-119-spezifische T-Zellen in 39% nachweisen, während SmD1 83-119-reaktive T-Zellen nur sehr selten mit wesentlich niedrigeren Proliferationsraten in gesunden Probanden gefunden wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die T-Zellreaktivität mit bestimmten Krankheitssymptomen einhergeht. Patienten mit einer positiven Proliferation infolge der *in vitro* Stimulation mit dem SmD1 83-119-Peptid zeigten häufiger eine Lungen- oder eine Herzbeteiligung. Die positive T-Zellreaktivität hatte jedoch keinen Einfluss auf das Vorhandensein und die Titer der Anti-SmD1 83-119- sowie Anti-dsDNA-Antikörper oder auf die Krankheitsaktivität. Möglicherweise spielen bei bestimmten Krankheitsmanifestationen zelluläre Mechanismen eine größere Rolle, während beispielsweise die Nierenbeteiligung eher von humoralen Mechanismen abhängt, worauf die starke Assoziation von Anti-SmD1 83-119-Antikörpern mit dem Auftreten einer Nierenbeteiligung hinweisend ist. Mit der Identifizierung von SmD1 83-119-reaktiven T-Zellen beim humanen SLE bietet sich die Möglichkeit, ähnlich wie im Tiermodell eine Antigen-spezifische Immunsuppression zu erreichen. Das SmD1 83-119-Peptid ist ein vielversprechendes Antigen für die Induktion einer Toleranz und eröffnet somit neue Therapiemöglichkeiten beim SLE.

Mit dem SmD1 83-119-Peptid wurde ein wichtiges und spezifisches Zielantigen des SLE identifiziert, das sowohl von T- als auch B-Zellen erkannt werden kann und eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SLE zu besitzen scheint. SmD1 83-119-reaktive T-Zellen spielen, zumindest im murinen SLE, eine Rolle bei der Bildung von pathogenen Anti-dsDNA-Antikörper, indem sie die T-Zellhilfe für dsDNA-spezifische B-Zellen liefern. Damit wurde

ein neues Modell für die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern geschaffen, was die bisher nachgewiesenen Assoziationen zwischen Anti-dsDNA- und Anti-Sm-Antikörpern erklären kann. Erstmals konnte in Autoantigen-spezifischen T-Zellen direkt *ex vivo* die Expression von Zytokinen nachgewiesen werden, ohne dass langwierige Kulturverfahren eingeschaltet werden mussten. SmD1 83-119-spezifische T-Zellen, die in der Lage sind, dsDNA-spezifische B-Zellen zu aktivieren, weisen eine Koexpression von IFNγ und IL-4 auf, was die Aktivierung von sowohl humoralen (Th2-) als auch inflammatorischen (Th1-gerichteten) Mechanismen beim SLE erklären könnte. Gleichzeitig konnten SmD1 83-119-spezifische regulatorische T-Zellen identifiziert werden, die die Bildung von Anti-dsDNA-Antikörpern hemmen können. Wir konnten im murinen Modell nachweisen, dass die Induktion einer Toleranz die Zytokinexpression von Autoantigen-spezifischen T-Zellen verändert. Der Nachweis von SmD1 83-119-reaktiven T-Zellen beim Menschen ermutigt zur Annahme, dass beim Menschen ähnliche Mechanismen wir im Tiermodell vorliegen und dass eine autoantigenspezifische Therapie über die Aktivierung von immunregulativen T-Zellen durch das SmD1 83-119-Peptid möglich scheint.

4. Ausblick

Die SmD1 83-119-spezifische Toleranzinduktion könnte eine mögliche Therapiealternative zur immunsuppressiven Therapie beim SLE darstellen und das Auftreten von derzeitigen Behandlungs-bedingten Nebenwirkungen reduzieren. Ein erstes Ziel ist es, humane SmD1 83-119-spezifische T-Zellen näher zu charakterisieren. Folgende Möglichkeiten können in Zukunft geprüft werden:

1. Durch Leukapherese könnten T-Zellen aus SLE-Patienten gewonnen und unter solchen Bedingungen kultiviert werden, dass *ex vivo* regulativen SmD1 83-119-spezifischen T-Zellen entstehen. Der Patient erhält nun seine toleranten T-Zellen zurück, die dann im Organismus die pathologische Autoimmunreaktion unterdrücken sollen. Für diese Technik sollten verschiedener Kulturverfahren untersucht werden.
2. Eine intravenöse Gabe des SmD1 83-119-Peptids als monomeres Peptid oder alternativ eines Tetramer könnte auch beim Menschen zur Toleranzinduktion verwendet werden. Die Potenz des SmD1 83-119-Peptids könnte möglicherweise dadurch erhöht werden, dass über Peptidbibliotheken ein künstliches Peptid entwickelt wird, dass von SmD1 83-119-reaktiven B- und T-Zellen erkannt wird. Dieses Peptid könnte als Tetramer ebenfalls zur Toleranzinduktion eingesetzt werden.
3. Könnte das SmD1 83-119-Peptid auch für die orale Toleranzinduktion verwendet werden, wobei hier wiederum Tierversuche im ersten Schritt notwendig sind. Ein Forschungsschwerpunkt beim murinen Lupus soll untersuchen, ob sich SmD1 83-119-spezifische T-Zellen im entzündeten Gewebe aufhalten und vor Ort zur Aktivierung von B-Zellen, ähnlich einem Keimzentrum, führen. Wir haben bereits SmD1 83-119-reaktive T-Zellen im Nierengewebe von NZB/W-Mäusen identifiziert. Es werden Therapieansätze geprüft, die die Akkumulation von SmD1 83-119-spezifischen Zellen im Nierengewebe verhindern sollen.

Quellennachweis

ABUAF, N., JOHANET, C., CHRETIEN, P., ABSALON, B.I., HOMBERG, J.C., AND BURI, J.F. (1990). Detection of autoantibodies to Sm antigen in systemic lupus erythematosus by immunodiffusion, ELISA and immunoblotting: variability of incidence related to assays and ethnic origin of patients. Eur.J.Clin.Invest**. 20**, 354-359.

ALTMAN, J.D., MOSS, P.H., GOULDER, P.R., BAROUCH, D.H., MCHEYZER-WILLIAMS, M.G., BELL, J.I., MCMICHAEL, A.J., AND DAVIS, M.M. (1996). Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes [published erratum appears in Science 1998 Jun 19;**280(5371**):1821]. Science **274**, 94-96.

ASSENMACHER, M., SCHEFFOLD, A., SCHMITZ, J., SEGURA, C.J., MILTENYI, S., AND RADBRUCH, A. (1996). Specific expression of surface interferon-gamma on interferon-gamma producing T cells from mouse and man. Eur.J.Immunol. **26**, 263-267.

ASSENMACHER, M., SCHMITZ, J., AND RADBRUCH, A. (1994). Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. Eur.J.Immunol. **24**, 1097-1101.

BARAKAT, S., BRIAND, J.P., WEBER, J.C., VAN, R.M., AND MULLER, S. (1990). Recognition of synthetic peptides of Sm-D autoantigen by lupus sera. Clin.Exp.Immunol. **81**, 256-262.

BENDIGS, S., SALZER, U., LIPFORD, G.B., WAGNER, H., AND HEEG, K. (1999). CpG-oligodeoxynucleotides co-stimulate primary T cells in the absence of antigen-presenting cells. Eur.J.Immunol. **29**, 1209-1218.

BLOOM, D.D., DAVIGNON, J.L., COHEN, P.L., EISENBERG, R.A., AND CLARKE, S.H. (1993). Overlap of the anti-Sm and anti-DNA responses of MRL/Mp-lpr/lpr mice. J.Immunol. **150**, 1579-1590.

BOCKENSTEDT, L.K., GEE, R.J., AND MAMULA, M.J. (1995). Self-peptides in the initiation of lupus autoimmunity. J.Immunol. **154**, 3516-3524.

DEL PRETE G., M. DE CARLI, F. ALMERIGOGNA, M.G. GIUDIZI, R. BIAGIOTTI, AND S. ROMAGNANI. 1993. Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production. J. Immunol. **150:**353-360.

DESAI, D.D., KRISHNAN, M.R., SWINDLE, J.T., AND MARION, T.N. (1993). Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice. J.Immunol**. 151**, 1614-1626.

DÖRNER, T., FEIST, E., WAGENMANN, R., KATO, T., YAMAMOTO, K., NISHIOKA, K., BURMESTER, G.R., AND HIEPE, F. (1996). Anti-52 kDa Ro(SS-A) autoantibodies in different autoimmune diseases preferentially recognize epitopes on the central region of the antigen. J.Rheumatol**. 23**, 462-468.

EBLING FM, TSAO BP, SINGH RR, SERCARZ E, HAHN BH. A peptide derived from an autoantibody can stimulate T cells in the (NZB x NZW)F1 mouse model of systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum. 1993 Mar**;36(3**):355-64.

EHL S., P. AICHELE, H. RAMSEIER, W. BARCHET, J. HOMBACH, H. PIRCHER, H. HENGARTNER, AND R.M. ZINKERNAGEL. 1998. Antigen persistence and time of T-cell tolerization determine the efficacy of tolerization protocols for prevention of skin graft rejection. Nat Med **4**:1015-9.

FEIST, E., DÖRNER, T., KUCKELKORN, U., SCHMIDTKE, G., MICHEEL, B., HIEPE, F., BURMESTER, G.R., AND KLOETZEL, P.-M. (1996). Proteasome -type subunit C9 is a primary target of autoantibodies in sera of patients with myositis and systemic lupus erythematosus. J.Exp.Med**. 184,** 1313-1318.

FRICKE, H., MENDLOVIC, S., BLANK, M., SHOENFELD, Y., BEN-BASSAT, M., AND MOZES, E. (1991). Idiotype specific T-cell lines inducing experimental systemic lupus erythematosus in mice. Immunology **73**, 421-427.

GALLI M, P. COMFURIUS, C. MAASSEN, H. C. HEMKER, M. H. DE BAETS, P. J. VAN BREDA-VRIESMAN, T. BARBUI, R. F. ZWAAL, AND E. M. BEVERS. 1990. Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. Lancet 30; **335**: 1544.

GREGERSON, D.S., OBRITSCH, W.F., AND DONOSO, L.A. (1993). Oral tolerance in experimental autoimmune uveoretinitis. Distinct mechanisms of resistance are induced by low dose vs high dose feeding protocols. J.Immunol. **151,** 5751-5761.

GROUX H., A. O'GARRA, M. BIGLER, M. ROULEAU, S. ANTONENKO, J.E. DE VRIES, AND M.G. RONCAROLO. 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. Nature **389**:737-742.

HACKER, H., MISCHAK, H., MIETHKE, T., LIPTAY, S., SCHMID, R., SPARWASSER, T., HEEG, K., LIPFORD, G.B., AND WAGNER, H. (1998). CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. EMBO J**. 17**, 6230-6240.

HIEPE, F., KIESSIG, S.T., YAMAMOTO, K., PROKOP, G., MIELKE, F., LUKOWSKY, A., SCHLAAK, B., MIYAMOTO, T., AND APOSTOLOFF, E. (1990). Nachweis von Autoantikörpern gegen extrahierbare nukleäre Antigene (ENA) bei Autoimmunerkrankungen des rheumatischen Formenkreises mittels Immunoblotting - Vergleich mit der Gegenstromelektrophorese. Z.Rheumatol**. 49**, 304-309.

HIEPE, F., MARELL, J., HENTSCHEL, C., RIEMEKASTEN, G., KLEIN, R., AND SCHÖSSLER, W. (1999). Casein is an essential cofactor in autoantibody reactivity directed to the C-terminal SmD1 peptide in systemic lupus erythematosus (SLE). Arthritis Rheum. Vol. 42**, 9 (Suppl**), p.111.

HILLIARD B., E.S.VENTURA, AND A. ROSTAMI. 1999. Effect of timing of intravenous administration of myelin basic protein on the induction of tolerance in experimental allergic encephalomyelitis. Mult Scler **5**:2-9.

HIRAKATA, M., CRAFT, J., HARDIN, J.A. (1993). Autoantigenic epitopes of the B and D polypeptides of the U1 snRNP. Analysis of domains recognized by the Y12 monoclonal anti-Sm antibody and by patient sera. J. Immunol. **150**: 3592-3601.

HOCH, SO, EISENBERG, RA, SHARP GC. Diverse antibody recognition patterns of the multiple SmD antigen polypeptides. Clin. Immunol. 1999**;92(2**):203-8.

HOUCK, D.W. AND LOKEN, M.R. (1985). Simultaneous analysis of cell surface antigens, bromodeoxyuridine incorporation and DNA content. Cytometry **6,** 531-538.

INCAPRERA, M., RINDI, L., BAZZICHI, A., AND GARZELLI, C. (1998). Potential role of the Epstein-Barr virus in systemic lupus erythematosus autoimmunity. Clin.Exp.Rheumatol. **16**, 289-294.

JAMES, J.A., GROSS, T., SCOFIELD, R.H., AND HARLEY, J.B. (1995). Immunoglobulin epitope spreading and autoimmune disease after peptide immunization: Sm B/B'-derived PPPGMRPP and PPPGIRGP induce spliceosome autoimmunity. J.Exp.Med. **181**, 453-461.

JAMES, J.A. AND HARLEY, J.B. (1998). A model of peptide-induced lupus autoimmune B cell epitope spreading is strain specific and is not H-2 restricted in mice. J.Immunol. **160**, 502-508.

JAMES JA, KAUFMAN KM, FARRIS AD, TAYLOR-ALBERT E, LEHMAN TJ, HARLEY JB. An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. J Clin Invest. 1997 Dec 15;**100(12**):3019-26.

JAMES, J.A., MAMULA, M.J., AND HARLEY, J.B. (1994). Sequential autoantigenic determinants of the small nuclear ribonucleoprotein Sm D shared by human lupus autoantibodies and MRL lpr/lpr antibodies. Clin.Exp.Immunol**.** **98**, 419-426.

JACOB CO, VAN DER MEIDE PH, MCDEVITT HO. In vivo treatment of (NZB × NZW) F1 lupus-like nephritis with monoclonal antibody to g interferon. J Exp Med 1987;**166:**798–803.

JACOBS, M.J., VAN DEN HOEK AE, VAN DE PUTTE LB, AND VAN DEN BERG WB (1994). Anergy of antigen-specific T lymphocytes is a potent mechanism of intravenously induced tolerance. Immunology **82**, 294-300.

KALIYAPERUMAL, A., M.A. MICHAELS, S.K. Datta. Antigen-specific therapy of murine lupus nephritis using nucleosomal peptides: tolerance spreading impairs pathogenic function of autoimmune T and B cells. 1999*;* J. Immunol. **1162**: 5775-5783.

KAMBACH, C., WALKE, S., YOUNG, R., AVIS, J.M., DE, L.F., RAKER, V.A., LUHRMANN, R., LI, J., AND NAGAI, K. (1999). Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. Cell **96,** 375-387.

KAMRADT, T, MITCHISON, NA. (2001). Advances in Immunology: T cell tolerance and autoimmunity. N Engl J Med. Mar 1**;344(9**):655-64.

KERN, F., SUREL, I.P., BROCK, C., FREISTEDT, B., RADTKE, H., SCHEFFOLD, A., BLASCZYK, R., REINKE, P., SCHNEIDER-MERGENER, J., RADBRUCH, A., WALDEN, P., AND VOLK, H.D. (1998). T-cell epitope mapping by flow cytometry. Nat.Med**. 4**, 975-978.

KUWANA M, FEGHALI CA, MEDSGER TA JR, WRIGHT TM. Autoreactive T cells to topoisomerase I in monozygotic twins discordant for systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 2001 Jul**;44(7):**1654-9.

LEHMANN, P.V., FORSTHUBER, T., MILLER, A., AND SERCARZ, E.E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. Nature **358**, 155-157.

LEHMEIER, T., FOULAKI, K., AND LUHRMANN, R. (1990). Evidence for three distinct D proteins, which react differentially with anti-Sm autoantibodies, in the cores of the major snRNPs U1, U2, U4/U6 and U5. Nucleic.Acids.Res. **18**, 6475-6484.

LERNER MR, BOYLE JA, HARDIN JA, STEITZ JA. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. Science. 1981 Jan 23**;211(4480**):400-2.

LIPFORD, G.B., HEEG, K., AND WAGNER, H. (1998). Bacterial DNA as immune cell activator. Trends.Microbiol. **6**, 496-500.

MADAIO, M.P., S.K. DATTA. 2000. Major peptide autoepitopes for nucleosome-specific T cells of human SLE. Journal Club. American Journal of Kidney Diseases **35** : 992-996.

MANZ, R., ASSENMACHER, M., PFLUGER, E., MILTENYI, S., AND RADBRUCH, A. (1995). Analysis and sorting of live cells according to secreted molecules, relocated to a cell-surface affinity matrix. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **92**, 1921-1925.

MARELL, J., KLEIN, R., RIEMEKSTEN, G., TREBELJAHR, G., SCHNEIDER-MERGENER-J., BURMESTER, G.R., HIEPE, F. (1999). Epitope recognition after immunization of rabbits with recombinant SmD1 protein and the C-terminal SmD1 peptide. Clin.Exp. Rheumatol., Vol 17: 1-34, abstract 109.

MCCLAIN MT, RAMSLAND PA, KAUFMAN KM, JAMES JA. Anti-sm autoantibodies in systemic lupus target highly basic surface structures of complexed spliceosomal autoantigens. J Immunol. 2002 Feb 15;**168(4**):2054-62.

MILTENYI, S., MULLER, W., WEICHEL, W., AND RADBRUCH, A. (1990). High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry **11** , 231-238.

MOHAN, C., ADAMS, S., STANIK, V., AND DATTA, S.K. (1993). Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus. J.Exp.Med. **177,** 1367-1381.

MOR, G., SINGLA, M., STEINBERG, A.D., HOFFMAN, S.L., OKUDA, K., AND KLINMAN, D.M. (1997). Do DNA vaccines induce autoimmune disease? Hum.Gene Ther **8**, 293-300.

MURRAY, L.J., R. LEE, AND C. MARTENS. 1990. In vivo cytokine gene expression in T cell subsets of autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mouse. Eur. J. Immunol**. 20**:163-170.

NAKAJIMA A, HIROSE S, YAGITA H, OKUMURA K. (1997). Roles of IL-4 and IL-12 in the development of lupus in NZB/W F1 mice. J Immunol**. 1;158(3**):1466-72.

OHTSUKA K, GRAY JD, STIMMLER MM, TORO B, HORWITZ DA. Decreased production of TGF-beta by lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. J Immunol. 1998 Mar 1;**160(5):**2539-45.

OU, Y., SUN, D., SHARP, G.C., AND HOCH, S.O. (1997). Screening of SLE sera using purified recombinant Sm-D1 protein from a baculovirus expression system. Clin.Immunol.Immunopathol. **83**, 310-317.

OZMEN, L., D. ROMAN, M. FOUNTOULAKIS, G. SCHMIDT, B. RYFFEL, AND G. GAROTTA. (1995.) Experimental therapy of systemic lupus erythematosus: treatment of NZB/W mice with mouse soluble interferon-gamma receptor inhibits the onset of glomerulonephri-tis. Eur. J. Immunol**. 25**:6-12.

PARK YB, LEE SK, KIM DS, LEE J, LEE CH, SONG CH. Elevated interleukin-10 levels orrelated with disease activity in systemic lupus erythematosus. Clin Exp Rheumatol. 1998 May-Jun;**16(3):**283-8.

PESCHKEN, C.A., WINNIPEG J.E.M. (1999). Anti-Sm antibody increases the likehood of death in systemic lupus erythematosus. Poster of ACR-Meeting Nov. 1999, Boston, USA.

PISETSKY DS. Immune responses to DNA in normal and aberrant immunity. Immunol Res. 2000;**22(2-3**):119-26. Review.

PRUD'HOMME GJ, KONO DH, Theofilopoulos AN. Quantitative polymerase chain reaction analysis reveals marked overexpression of interleukin-1, interleukin-10, and interferon-gamma mRNA in the lymph nodes of lupus-prone mice. Mol Immunol 1995**;32:**495-503.

PUTTERMAN, C. AND DIAMOND, B. (1998). Immunization with a peptide surrogate for double-stranded DNA (dsDNA) induces autoantibody production and renal immunoglobulin deposition. J.Exp.Med. **188**, 29-38.

REICHLIN, M., MARTIN, A., TAYLOR-ALBERT, E., TSUZAKA, K., ZHANG, W., REICHLIN, M.W., KOREN, E., EBLING, F.M., TSAO, B., AND HAHN, B.H. (1994). Lupus autoantibodies to native DNA cross-react with the A and D SnRNP polypeptides. J.Clin.Invest. **93**, 443-449.

RETTER, M.W., COHEN, P.L., EISENBERG, R.A., AND CLARKE, S.H. (1996). Both Sm and DNA are selecting antigens in the anti-Sm B cell response in autoimmune MRL/lpr mice. J.Immunol. **156**, 1296-1306.

RIEMEKASTEN, G., F.HIEPE: Differenzierung von Autoantikörpern gegen extrahierbare nucleäre Antigene mittels Immunoblotting bei verschiedenen Kollagenosen. Zeitsch. Ärzt.Fortb**.5/92**.

RIEMEKASTEN, G., F. HIEPE, J. MARELL: Peptide des Antigens Sm-D und ihre Verwendung, insbesondere für die Diagnostik des SLE. Patent-Nr. 195 38 968.9

RIEMEKASTEN, G., F.HIEPE: Differenzierung von Autoantikörpern gegen extrahierbare nucleäre Antigene mittels Immunoblotting bei verschiedenen Kollagenosen. Zeitsch. Ärzt.Fortb**.5/92**.

RIEMEKASTEN, G., MARELL, J., TREBELJAHR, G., KLEIN, R., HAUSDORF, G., HAUPL, T., SCHNEIDER-MERGENER, J., BURMESTER, G.R., AND HIEPE, F. (1998). A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. J.Clin.Invest. **102**, 754-763.

RIEMEKASTEN, G., C. WEIß, S. SCHNEIDER, A. MEINE, A. THIEL, A. BRUNS, S. BLÄß, G.R. BURMESTER, AND F. HIEPE. T cell reactivity against the SmD183-

119 C-terminal peptide in patients with systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis. 2002 Sep**;61(9):**779-85.

RIEMEKASTEN, G, KAWALD, A, WEIß, C, MEINE, A, MARELL, J, KLEIN, H, HOCHER, B, MEISEL, C, HAUSDORF, G, MANZ, R, KAMRADT, T, BURMESTER, GR, HIEPE, F. Strong acceleration of murine lupus by injection of the SmD183-119 peptide. Arthritis Rheum. 2001, **44(10):** 2435-2445.

RIEMEKASTEN, G., C. HENTSCHEL, J. MARELL, R. KLEIN, F. HIEPE. Casein is an essential cofactor in autoantibody reactivity directed to the C-terminal SmD1 peptide in systemic lupus erythematosus. Journal of Immunobiology, in press.

RIEMEKASTEN, G., F. EBLING, G. KARPOUZAS, J. KALSI, G. HERBERTH, D. LANGNICKEL, B. TSAO, GERD-R. BURMESTER, A. RADBRUCH, F. HIEPE, AND B. HAHN. Characterization of SmD183-119-reactive T cells that give T cell help for pathogenic anti-dsDNA antibodies. Arthritis Rheum, in press.

RIEMEKASTEN, G., D. LANGNICKEL, P. ENGHARD, A. MEINE, B. HOCHER, S. KRAUSE, C. WEIß, T. MUZZULINI, G.R. BURMESTER, F. HIEPE. Immune tolerance to the SmD183-119 peptide postpones development of murine lupus. Accepted abstract for the ACR-Meeting 2002, Submitted to Journal of Exp. Medicine

ROKEACH, L.A., HASELBY, J.A., AND HOCH, S.O. (1988). Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **85**, 4832-4836.

SABBATINI, A., DOLCHER, M.P., MARCHINI, B., BOMBARDIERI, S., AND MIGLIORINI, P. (1993). Mapping of epitopes on the SmD molecule: the use of multiple antigen peptides to measure autoantibodies in systemic lupus erythematosus. J.Rheumatol**. 20**, 1679-1683.

SANTIAGO, M.L., FOSSATI, L., JACQUET, C., MULLER, W., IZUI, S., REININGER, L. Interleukin-4 protects against a genetically linked lupus-like autoimmune syndrome. J. Exp. Med. 1997: **185**;65-70.

SCHMITZ, J., ASSENMACHER, M., AND RADBRUCH, A. (1993). Regulation of T helper cell cytokine expression: functional dichotomy of antigen-presenting cells. Eur.J.Immunol. **23,** 191-199.

SEEMAN, N.C., ROSENBERG, J.M., AND RICH, A. (1976). Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. **73**, 804-808.

SIBILLE, P., TERNYNCK, T., NATO, F., BUTTIN, G., STROSBERG, D., AND AVRAMEAS, A. (1997). Mimotopes of polyreactive anti-DNA antibodies identified using phage-display peptide libraries. Eur.J.Immunol. **27,** 1221-1228.

SINGH, R.R., EBLING, F.M., SERCARZ, E.E., AND HAHN, B.H. (1995). Immune tolerance to autoantibody-derived peptides delays development of autoimmunity in murine lupus. J.Clin.Invest. **96,** 2990-2996.

SINGH RR, F.M. EBLING, D.A. ALBUQUERQUE, V. SAXENA, V. KUMAR, E.H. GIANNINI, T.N. MARION, F.D. FINKELMAN, AND B.H. HAHN. 2002. Induction of autoantibody production is limited in nonautoimmune mice. J Immunol. **169**:587-94.

SMEENK-R., HYLKEMA, M. (1992). Detection of antibodies to DNA: a technical assessment. Mol.Biol.Rep. **17(1):** 71-9.

SNAPPER CM, PAUL WE. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. Science 1987 May 22**;236**(**4804**):944-7.

SUN, S., KISHIMOTO, H., AND SPRENT, J. (1998). DNA as an adjuvant: capacity of insect DNA and synthetic oligodeoxynucleotides to augment T cell responses to specific antigen. J.Exp.Med**. 187**, 1145-1150.

TAKEDA, Y., WANG, G.S., WANG, R.J., ANDERSON, S.K., PETTERSSON, I., AMAKI, S., AND SHARP, G.C. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay using isolated (U) small nuclear ribonucleoprotein polypeptides as antigens to investigate the clinical significance of autoantibodies to these polypeptides. Clin.Immunol.Immunopathol. **50,** 213-230.

TAN, E.M. AND KUNKEL, H.G. (1966). Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. J.Immunol. **96,** 464-471.

THURAU, S.R., DIEDRICHS-MOHRING, M., FRICKE, H., ARBOGAST, S., AND WILDNER, G. (1997). Molecular mimicry as a therapeutic approach for an autoimmune disease: oral treatment of uveitis-patients with an MHC-peptide crossreactive with autoantigen--first results. Immunol.Lett. **57,** 193-201.

TILLMAN, D.M., JOU, N.T., HILL, R.J., AND MARION, T.N. (1992). Both IgM and IgG anti-DNA antibodies are the products of clonally selective B cell stimulation in (NZB x NZW)F1 mice. J.Exp.Med**. 176**, 761-779.

VALUJSKIKH, A.M A.M. VANBUSKIRK, C.G. OROSZ, AND P.S. HEEGER. 2001. A role for TGFß and B cells in immunologic tolerance after intravenous injection of soluble antigen. Transplantation **72**: 685-693.

VOLL, R.E., ROTH, E.A., GIRKONTAITE, I., FEHR, H., HERRMANN, M., LORENZ, H.M., AND KALDEN, J.R. (1997). Histone-specific Th0 and Th1 clones derived from systemic lupus erythematosus patients induce double-stranded DNA antibody production. Arthritis Rheum. **40**, 2162-2171.

WILLIAMS, R.C.J., MALONE, C., BLOOD, B., AND SILVESTRIS, F. (1999). Anti-DNA and anti-nucleosome antibody affinity--a mirror image of lupus nephritis? J.Rheumatol. **26,** 331-346.

WINSKA-WILOCH, H., MULLER, S., KATZ, D.R., WILKINSON, L., HUTCHINGS, P.R., AND ISENBERG, D.A. (1997). Immunogenic properties of synthetic fragments of Sm-D protein in normal and lupus mice. Lupus. **6,** 656-667.

XIAO, B.G. AND LINK, H. (1997). Mucosal tolerance: a two-edged sword to prevent and treat autoimmune diseases. Clin.Immunol.Immunopathol**. 85**, 119-128.

YASUMA, M., TAKASAKI, Y., MATSUMOTO, K., KODAMA, A., HASHIMOTO, H., AND HIROSE, S. (1990). Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. J.Rheumatol**. 17**, 469-475.

YAMAGIWA, S., J.D. GRAY, S. HASHIMOTO, AND D.A. HORWITZ. 2001. A role for TGF-ß in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human periphery blood. J. Immunol**. 166**:7282-7289.

ZHANG, W. AND REICHLIN, M. (1995). IgM anti-A and D SnRNP proteins and IgM anti-dsDNA are closely associated in SLE sera. Clin.Immunol.Immunopathol. **74**, 70-76.

6. Abkürzungsverzeichnis:

AFC	Antibody Forming Cells, beim ELISPOT verwendeter Begriff für Antikörper-sezernierende Plasmazellen
Ag	Antigen
AK	Antikörper
BALB/c	gesunder Mausstamm
BSA	Bovines Serum Albumin
CFA	K(C)omplettes Freundsches Adjuvans
CFDA-SE	Carboxyfluorescein-diacetat-succinimidylester, Farbstoff, der sich an DNA anlagert und Zellteilungen sichtbar macht
CpG	methylierte DNA-Sequenzen, häufiger bei bakterieller DNA zu finden
CWF1	Kreuzung aus BALB/c-Mäusen und NZW-Mäusen, tragen ähnliche MHC wie NZB/W-Mäuse, sind jedoch gesund
Dot-Blot	Immunoblot-Untersuchung, bei der das Antigen, gegen das die zu untersuchenden Antikörper gerichtet sind, an Zellulose gekoppelt ist
dsDNA	Doppelstrang-DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay, Test zur Bestimmung von Antikörpern
ELISPOT	Enzyme Linked Immunospot-Assay, Anstelle einer Farbmakierung wie beim ELISA können Spots gesehen werden, eignet sich zum Nachweis von AK-produzierenden Zellen oder zum Nachweis von Zellen, die ein bestimmtes Zytokin exprimieren

Epitopmapping	Herausfinden der Zielstrukturen von Antikörpern oder T-Zellrezeptoren durch Verwendung kleinerer Peptide eines größeren Antigens
FCS	Fetales Kälber (Calf) Serum
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Humane Leukozytenantigene
Ig	Immunglobulin
IFA	Inkomplettes Freundsches Adjuvans
IL	Interleukin
KLH	Keyhole Limped Hemocyanin, Carrier zur Verbesserung der Immunreaktion
MAP	M-assoziiertes Protein
MRL/lpr	Mausmodell des Lupus, bei der neben einer Glomerulonephritis eine ausgeprägte Lymphadenopathie besteht, ursächlich liegt eine Mutation am FAS-Rezeptor, bedeutend für die Apoptose, vor.
MHC	Major histocompability complex
NZB/W	Kreuzung zwischen New Zealand Black (NZB) und New Zealand White-Mäuse, ein weiteres Lupusmodell, bei dem spontan eine Glomerulonephritis ähnlich wie der Lupusnephritis beim Menschen entsteht
OVA	Ovalbumin
PBMC	Periphere Blutmonozyten
PHA	Phythämagglutinin-Reaktion
RA	Rheumatoide Arthritis
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate

SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	SLE Disease Activity Index, eine Meßgröße für die Krankheitsaktivität des SLE
Sm	Abkürzung für Smith, erste Patientin, bei der Antikörper gegen das Smith-Antigen gefunden wurde. Später stellte sich heraus, dass dieses Antigen Teil des snRNP-Komplexes ist
SmD1	Protein D1 des snRNP-Komplexes
SNF1-Mäuse	Maus-Modell des SLE, F1-Generation der Kreuzung zwischen NZB x SWR, Immunkomplexnephritis, Auftreten von Anti-dsDNA-Ak und anti-Histon-Ak
snRNP	small nuclear ribonucleoprotein
TNF	Tumornekrosefaktor
VH	variable Region der schweren Kette
ZNS	Zentrales Nervensystem

7. Danksagung

Ohne die Unterstützung meiner Familie, insbesondere ohne meinen Ehemann Lothar Riemekasten, wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Kollegen und Co-Autoren, die am Zustandekommen der hier dargestellten Publikationen beteiligt waren.

Vielen Dank meinen Kollegen in der Klinik, die mich zum wissenschaftlichen Arbeiten ermutigt haben.

Besonderer Dank gilt meinem Mentor Falk Hiepe, der mir selbständiges wissenschaftliches Arbeiten vermittelt hat und mich mit vielen Ratschlägen begleitet hat. Seine vielfältige Förderung und seine uneingeschränkte Hilfsbereitschaft haben die Habilitation ermöglicht.

Mein Klinikdirektor Gerd.-R. Burmester hat mir durch Fordern und Fördern entscheidende Impulse für meine wissenschaftliche Laufbahn gegeben. Das Klima in der Klinik und die von ihm aufgebauten Strukturen haben nicht unwesentlich zum Erfolg der Arbeit beigetragen.

Andreas Radbruch hat seine innovativen Technologien großzügig zum Allgemeingut gemacht. Ohne diese Instrumente hätten viele der gestellten Fragen nicht beantwortet werden können. Seine Ratschläge und Kommentare haben mir vielfach neue Wege und Möglichkeiten gezeigt.

Bevra Hahn und Fanny Ebling haben wir meinen Auslandseinsatz durch ihre großzügige Gastfreundschaft ermöglicht und ihre breiten Erfahrungen ohne Vorbehalte weitergegeben. Die Unterstützung ihrer Gruppe hat mir entscheidende Erfahrungen bereitet.

Den Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe möchte ich für die konstruktiven Dialoge und die gute Zusammenarbeit danken.

Vielen Dank auch den Medizinisch-Technischen Assistenten im Labor, die mir die ersten Schritte im Labor beigebracht haben. Zu nennen sind Kollegen, die bereits aus Altersgründen ausgeschieden sind wie Frau Götze.

8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt:

- dass keine staatsanwaltlichen Ermittlungen gegen mich anhängig sind
- dass weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde
- dass die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfasst und die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden
- dass die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften sowie die Literatur vollständig angegeben sind
- dass mir die geltene Habilitationsordnung bekannt ist.

....

Datum Unterschrift