

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem ist in der Lage, den Körper vor körperfremden organischen Strukturen und Krankheitserregern zu schützen. Dafür verfügt es über eine angeborene und eine adaptive Abwehrfunktion (Mackay *et al.*, 2000). Die Zellen des angeborenen Immunsystems bilden eine erste Abwehr gegen Mikroorganismen mit Zelloberflächen, die aus Kohlenwasserstoffen und Polysacchariden bestehen, die sich während der Evolution kaum verändert haben und nicht in Eukaryoten vorkommen (Marchalonis *et al.*, 2002). Die Phagozyten, die im Blut zirkulieren und in die Gewebe auswandern können, sowie die Monozyten im Blut und die Makrophagen, die praktisch in allen Geweben auftreten, spielen eine entscheidende Rolle beim Auslösen der adaptiven Immunabwehr. Ihre wichtigste Funktion ist die Aufnahme von Fremdpartikeln und deren anschließende Verdauung mittels lysosomaler Enzyme (Aderem *et al.*, 1999).

Die Zellen der adaptiven Immunität, die B- und T-Zellen, besitzen im Gegensatz zu den Phagozyten jeweils einen Antigenrezeptor einer einzigen Spezifität. Hat ein Antikörper ein Antigen spezifisch gebunden, werden Phagozyten aktiviert, die das Antigen aufnehmen, abbauen und aus dem Körper entfernen. Die B-Zellen sind in der Lage, Gedächtniszellen auszubilden, die bei erneuter Infektion des gleichen Erregers schneller und effektiver reagieren können. Durch die Kombination von Gensegmenten kann eine große Anzahl von Genvariationen gebildet werden, die die Rezeptormoleküle kodieren (Mackay *et al.*, 2000).

Bei einer Invasion von Antigenen (wobei als Antigen alle Strukturen gemeint sind, gegen die das Immunsystem aktiviert werden kann) in den Körper und der Überwindung der ersten Schutzbarrieren, wie Haut und Schleimhaut des Magens und Darms, gelangen die Antigene in die peripheren lymphatischen Organe (Lymphknoten, Milz, lymphatische Organe der Schleimhäute), und werden dort den B- und T-Zellen präsentiert (Janeway *et al.*, 1997).

Tab. 1: Natürliche und adaptive Immunabwehr

Zu dem angeborenen Immunsystem gehören die Phagozyten und die natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Die NK-Zellen sind in den frühen Phasen von Virusinfektionen beteiligt. Die Effektorzellen der adaptiven Abwehr sind die B- und T-Zellen. (nach Staines *et al.*, 1997).

<i>Natürliche Abwehr</i>	<i>Adaptive Abwehr</i>
Resistenz bei wiederholter Infektion bleibt unverändert	Resistenz ist durch Exposition gesteigert
Spezifität im allgemeinen gegen alle Mikroorganismen gleich	Spezifisch für den auslösenden Mikroorganismus
Die Effektorzellen sind Phagozyten und natürliche „Killerzellen“	Effektorzellen sind Lymphozyten (B- und T-Zellen)
Effektormoleküle sind Lysozym, Komplement, Akutphaseproteine (in der Leber, für Entzündungsprozesse) und Interferone (v.a. antiviral)	Effektormoleküle sind Antikörper, Zytokine aus Lymphozyten

1.1.1. Die Rolle der T-Zellen, B-Zellen und Antikörper

Antikörpermoleküle stellen die sezernierte Form der B-Zell-Antigenrezeptoren dar und werden als Reaktion auf ein Antigen in großen Mengen synthetisiert. Sie ermöglichen eine Bekämpfung von Krankheitserregern in den extrazellulären Bereichen (z.B. Blut, Lymphe) des Körpers. Ein Antikörper besitzt die Form eines Y und ist aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten zusammengesetzt, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, (Edelman, 1973). Das Molekül besteht aus einer konstanten Region, dem unteren Teil des Y, und einer variablen Region, die durch die beiden Schenkel des Y dargestellt wird. Der konstante Teil (Fc-Domäne), der nur eine von fünf biochemisch verschiedenen Formen annehmen kann (IgG1-4, IgA1-2, IgM, IgD, IgE) bestimmt die Klasse des Antikörpers und seine funktionellen Eigenschaften. Die variablen Regionen (Fv-Domänen) des Antikörpers bilden gemeinsam die Antigenbindungsstelle und können in nahezu unendlich verschiedenen Zusammensetzungen auftreten (Porter *et al.*, 1973). Dies kommt daher, dass die Fv-Domänen der Immunrezeptoren sind in einzelnen Gensegmenten verschlüsselt (V-, D-, J- Gene), die sich erst durch somatische Rekombination zu dem Exon für die vollständige variable (V-) Region zusammensetzen. Die DNA der Keimzelle enthält zahlreiche Kopien dieser Gensegmente, von denen in rezeptortragenden Lymphozyten jedoch nur eine exprimiert wird. Dieser Vorgang läuft nur in somatischen Zellen ab und wird daher nicht vererbt (Janeway *et al.*, 1997). Die sog. CDRs (komplementaritätsbestimmende Regionen) sind die variabelsten Teile der Fv-Domäne der

Rezeptoren und für deren Vielfalt verantwortlich. Sie befinden sich an den distalen Enden der beiden variablen Domänen des Rezeptors (vgl. Abb. 1). Aus diesem Grund können im Körper ca. 10^{12} verschiedene spezifische Lymphozyten existieren (Rolink *et al.*, 1993). Auf Antigene treffende Zellen unterziehen sich einer klonalen Selektion, d.h., nach Antigenkontakt teilen sich die Lymphozyten und differenzieren in antigenspezifische Effektorzellen, die den auslösenden Krankheitserreger eliminieren. Zusätzlich werden durch somatische Hypermutation in den Genen für die V-Region bei der Reaktion von B-Zellen auf Antigene eine Vielzahl verschiedener Antikörper gebildet, von denen einige mit erhöhter Affinität binden, sodass die Affinitäten der Antikörper-Reaktion zunehmen (Mackay *et al.*, 2000). Diese Zellen werden zu Gedächtniszellen, die bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen schneller und effektiver reagieren können.

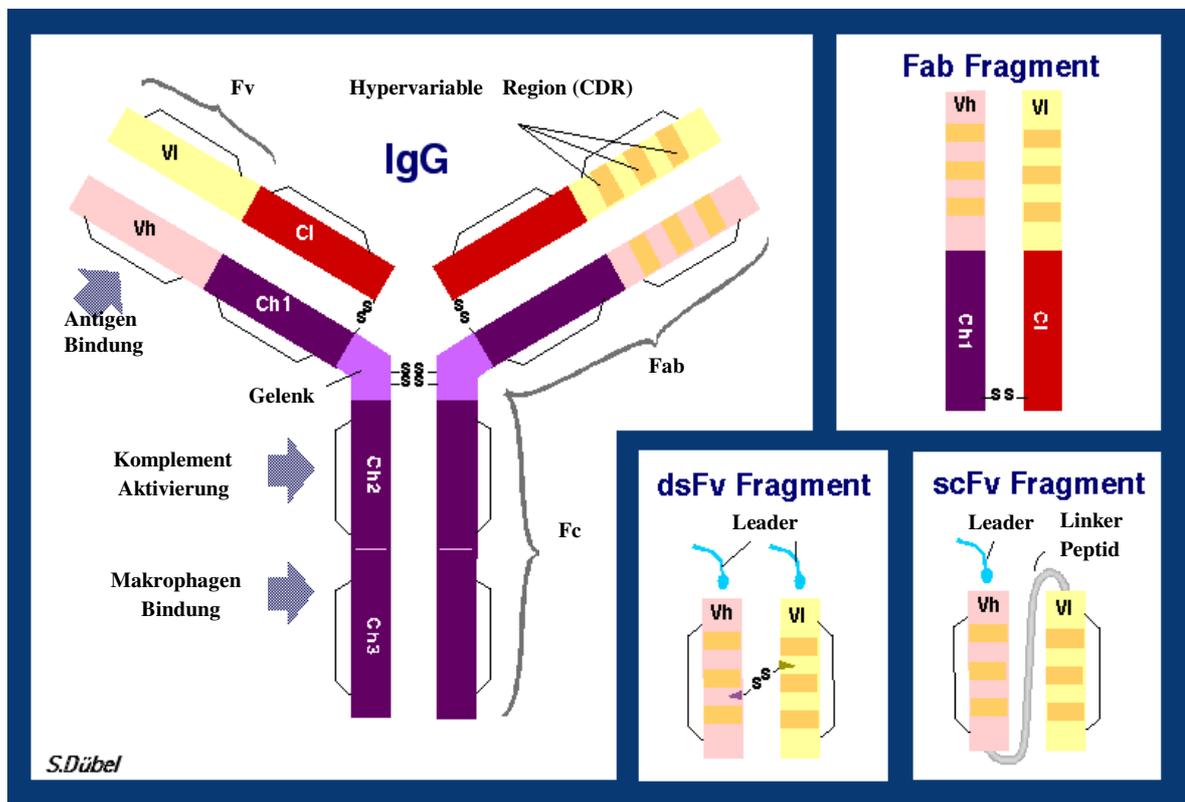


Abb. 1: Schematische Darstellung eines IgG-Antikörpers mit variabler und konstanter Region und verschiedene davon abgeleitete Antikörper-Fragmente.

In der Regel wird der Begriff rekombinante Antikörper für die Antigen-Bindungsfragmente eines Antikörpers verwendet (Fab oder Fv). Diese Fragmente enthalten keinen Fc-Bereich und besitzen daher auch keine Effektorfunktionen wie Komplementaktivierung oder Fc-Rezeptor-Bindung etc. Das Fv-Fragment ist als *single chain variable fragment* dargestellt. In diesem rekombinanten Fusionsprotein-Typ sind die beiden Antigenbindungsstellen der leichten und schweren Kette durch ein Linker-Peptid verbunden. Dadurch wird das Protein stabilisiert und es wird eine gleiche Expression beider Regionen in heterologen Organismen (z.B. *E. coli*) gewährleistet.

(Aus: http://www.tu-bs.de/institute/ibb/biotech/BT_deut/Navigation-Home.htm).

Im Gegensatz zu den B-Zellen, die auf ihrer Oberfläche viele Rezeptoren der selben Spezifität tragen, die nach Aktivierung der Zelle als Immunglobuline sezerniert werden, verfügen die T-Zellen nur über einen T-Zell-Rezeptor, der als Transmembranmolekül stets an der Oberfläche der Zelle erhalten bleibt.

T-Zellen können Peptidfragmente von intrazellulären Erregern nur erkennen, wenn sie an die Zelloberfläche von den sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APZ) gelangen und durch den MHC präsentiert werden (Garcia *et al.*, 1999). Es gibt zwei Klassen von Haupthistokompatibilitätskomplex- (*major histocompatibility complex*: MHC) Molekülen, die einer Gengruppe entsprechen, die das HLA (*human leucocyte antigen*)-System kodiert und sich durch einen ausgeprägten Polymorphismus auszeichnet (Delves *et al.*, 2000), was u.a. eine große Herausforderung für Gewebe- oder Organtransplantationen darstellt. Nur die APZs und mit den dendritischen Zellen deren wichtigste Vertreter sind in der Lage, über den MHC-Komplex Peptide eines Antigenmoleküls nach erfolgter proteolytischer Spaltung den T-Zellen zu präsentieren. Zu den T-Zellen zählen u. a. zytotoxische T-Zellen, die virusinfizierte Zellen direkt abtöten. Sie werden auch CD8+ T-Zellen genannt, aufgrund des CD8-Moleküls auf ihrer Oberfläche. Zudem existieren sogenannte T-Helferzellen, die das CD4-Molekül auf ihrer Oberfläche tragen und aufgeteilt werden können in die TH1 (T-Helfer)-Zellen, die intrazelluläre Bakterien durch die Aktivierung von Makrophagen vernichten und die TH2-Zellen, die unter anderem auch eine Rolle bei der Vernichtung extrazellulärer Erreger spielen, da sie B-Zellen aktivieren (Janeway *et al.*, 1997). T-Lymphozyten kontrollieren sich zum einen über die von ihnen produzierten Zytokine in ihrer Aktivität gegenseitig, und zum anderen regulieren sie die Funktion anderer Zellen des Immunsystems (Staines *et al.*, 1997).

Alle Reaktionen von Lymphozyten (B- und T-Zellen) auf ein Antigen erfordern ein zweites Signal von einer anderen Zelle (vgl. Abb. 2). Bei den meisten B-Zellen kommt dieses Signal von den T-Helferzellen, die die B-Zellen einerseits zur Proliferation stimulieren und andererseits zu Zellen differenzieren lassen können, die Antikörper sezernieren. Für T-Zellen kann das Signal von drei Zelltypen kommen, den dendritischen Zellen, den Makrophagen oder den B-Zellen, die alle auch als antigenpräsentierende Zellen bezeichnet werden (Staines *et al.*, 1997).

1.2. Autoimmunität und ihre Krankheiten

Das Immunsystem dient dazu, Fremdstoffe, die von außen in den Körper gelangen, mit Hilfe von verschiedenen Abwehrmechanismen zu bekämpfen (vgl. 1.1.). Wie aber ist das Immunsystem in der Lage, eine effektive Immunreaktion auf potenziell pathogene Antigene zu geben, die körpereigenen Strukturen aber zu ignorieren? Dazu werden im folgenden verschiedene Prozesse beschrieben.

1.2.1. Das Vorkommen von natürlichen Autoantikörpern

Alle Menschen und Wirbeltiere jeden Alters besitzen Autoantikörper im Blut, die auch als natürliche Autoantikörper (NAA) bezeichnet werden. Die NAAs besitzen eine kontrollierte Autoreaktivität, sodass deren Funktion die Funktion die Erhaltung der Homöostase des Immunsystems sein könnte, die einen essentiellen Aspekt des Immunsystems darstellt (Mak *et al.*, 2002; Staines *et al.*, 1997). Weitere Hypothesen für den Zweck dieser Autoantikörper im Organismus bestehen z.B. in der Eliminierung von degradierten Autoantigenen oder abgestorbenen Zellen (Grabar *et al.*, 1975). Eine andere Theorie ist die Funktion der Antikörper als Vorläufermoleküle gegen exogene Antigene, aufgrund ihrer Kreuzreaktivität mit fremden Antigenen (Naparstek *et al.*, 1986; Avrameas *et al.*, 1983).

Bei den NAAs handelt es sich um ein Autoantikörper-Repertoire in gesunden Individuen, das in jeder Altersgruppe erhalten bleibt und homogen ist zwischen den einzelnen Altersgruppen (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1995; Mouthon *et al.*, 1995, 1996). Dagegen stellt sich das IgG-Repertoire zwischen den einzelnen Individuen gegen fremde Antigene vor allem mit Zunahme des Alters als sehr heterogen dar. Dies bestärkt die Vermutung, dass das autoreaktive Antikörper-Repertoire im Laufe des Lebens bei allen Individuen einer positiven Selektion gegen ein eingeschränktes Set von Antigenen unterliegt (Lacroix-Desmazes *et al.*, 1995). Bei den entsprechenden Autoantigenen handelt es sich meist um während der Evolution konservierte Protein-Strukturen, was u. a. dadurch belegt werden kann, dass Haie ebenfalls natürliche Autoantikörper mit der gleichen Spezifität für z.B. konservierte regulatorische Moleküle besitzen (Marchalonis *et al.*, 2002). Zu den natürlichen Autoantikörpern zählen solche, die direkt gegen Oberflächenkomponenten von alternden Zellen gerichtet sind und durch die eine antikörperabhängige Phagozytose eingeleitet wird (Kay *et al.*, 1975), sowie gegen Regionen von Immunglobulinen und T-Zell-Rezeptoren. Auch regulatorische Moleküle dienen als Ziel wie z.B. Zytokine und ihre

Rezeptoren (Bendtsen *et al.*, 1998). Natürliche Autoantikörper vieler Spezies reagieren mit intrazellulären Proteinen wie HSP, Myosin, Actin und Tubulin (Pashov *et al.*, 2002).

1.2.2. Die Selbst-Toleranz-Mechanismen

Es kommt immer wieder zu Autoimmunreaktionen, die einen pathologischen Verlauf nehmen, also eine Autoimmunkrankheit auslösen. In den meisten Fällen verhindern aber Kontrollmechanismen, dass es zum Entstehen von solchen Erkrankungen kommen kann. Die Mechanismen für die Selbst-Toleranz im Organismus sind die negative Selektion und die Anergie (funktionelle Inaktivierung):

1) **Negative Selektion** (klonale Deletion) (Burnet, 1957).

Während der zufälligen Zusammenlagerung der Gene, die die Antigenrezeptoren der entstehenden Lymphozyten bilden, werden diese Lymphozyten in den zentralen lymphoiden Organen wie Thymus und Knochenmark Autoantigenen ausgesetzt. Die negative Selektion findet bei potentiell autoantigenerkennenden B- und T-Zellen statt. Dabei werden den T-Zellen Proteine, die im Thymus synthetisiert werden, von APZs, z.B. dendritischen Zellen präsentiert. Bei den B-Zellen erfolgt die negative Selektion im Knochenmark, wo das Oberflächen-IgM von unreifen B-Zellen Autoantigene mit hoher Affinität bindet und anschließend die Apoptose (programmierter Zelltod) dieser Zellen eingeleitet wird (Guerder *et al.*, 1994). Kommt es zu schwachen Interaktionen mit sehr geringer Affinität, findet eine positive Selektion statt und es kommt zur Aufnahme der Lymphozyten in das Immunrepertoire.

Generell kommt der Apoptose bei Immunantworten eine wichtige Funktion zu. Apoptose reduziert die Anzahl der angehäuften Zellen und trägt so zur Homöostase des Immunsystems bei. Für die richtige Funktion des Immunsystems sind daher eine Reihe von apoptotischen sowie "Überlebens"-Signalen wichtig, die über Zelloberflächenrezeptoren gesteuert werden. Die bekanntesten Rezeptoren gehören der TNF Rezeptor (TNFR) Superfamilie an (Mak *et al.*, 2002).

Es gibt aber einige Autoantigene, die nicht im Thymus oder Knochenmark präsentiert werden, weil sie nur in der Peripherie auftreten. Hier setzt ein weiterer Mechanismus zur Selbsttoleranz ein, der Anergie genannt wird.

2) **Anergie**

Um eine Immunabwehr auszulösen, muss zum einen ein Antigen vorhanden sein, das von APZs präsentiert wird, und zum anderen müssen durch die APZs kostimulierende Signale abgegeben werden, die die klonale Expansion der T-Zellen anregen und eine Differenzierung zu Effektor- und Gedächtniszellen bewirken (Lenschow *et al.*, 1996). Anergie bedeutet, dass eine Antigenerkennung durch Lymphozyten ohne kostimulierende Signale zu keiner Reaktion der Lymphozyten führt, da körpereigene Antigene allein weder eine Entzündungsreaktion noch eine Aktivierung von APZs stimulieren können (Matzinger *et al.*, 1994).

Eine antigenpräsentierende Zelle muss demnach Peptid-MHC-Komplexe tragen und kostimulierende Moleküle besitzen, um eine T-Zelle zu aktivieren (vgl. Abb. 2).

Manche Selbstantigene induzieren weder zentrale noch periphere Toleranz, sie werden vom Immunsystem ignoriert. Dies kommt beispielsweise bei Antigenen vor, die anatomisch gesehen in weiter Entfernung von den immunkompetenten Lymphozyten vorkommen (Ohashi *et al.*, 1991).

Die meisten der Untersuchungen zur Anergie wurden mit T-Zellen durchgeführt. Einige Autoren sind sogar der Meinung, dass die Ergebnisse auf alle Lymphozyten zutreffen (Van Parijs *et al.*, 1998). Die bekanntesten kostimulierenden Signale für T-Zellen sind die B7-Moleküle, die vom CD28-Rezeptor der T-Zellen erkannt werden, und das CD40-Molekül, das vom CD40-Liganden erkannt wird. Die wichtigste Funktion des kostimulierenden Signals ist die Synthese des T-Zell-Wachstumsfaktors Interleukin 2 (IL2), der eine Proliferation und damit Differenzierung zu Effektorzellen bewirkt (Jenkins *et al.*, 1991). Für die B-Zellen ist das bekannteste Signal-Molekül das sogenannte Cd3, das dem Komplementsystem zuzuordnen ist. Das Komplementsystem erhöht die Wirksamkeit der Phagozytose von Mikroorganismen durch Bindung von Komplementproteinen an die Oberfläche der Organismen (Law *et al.*, 1995).

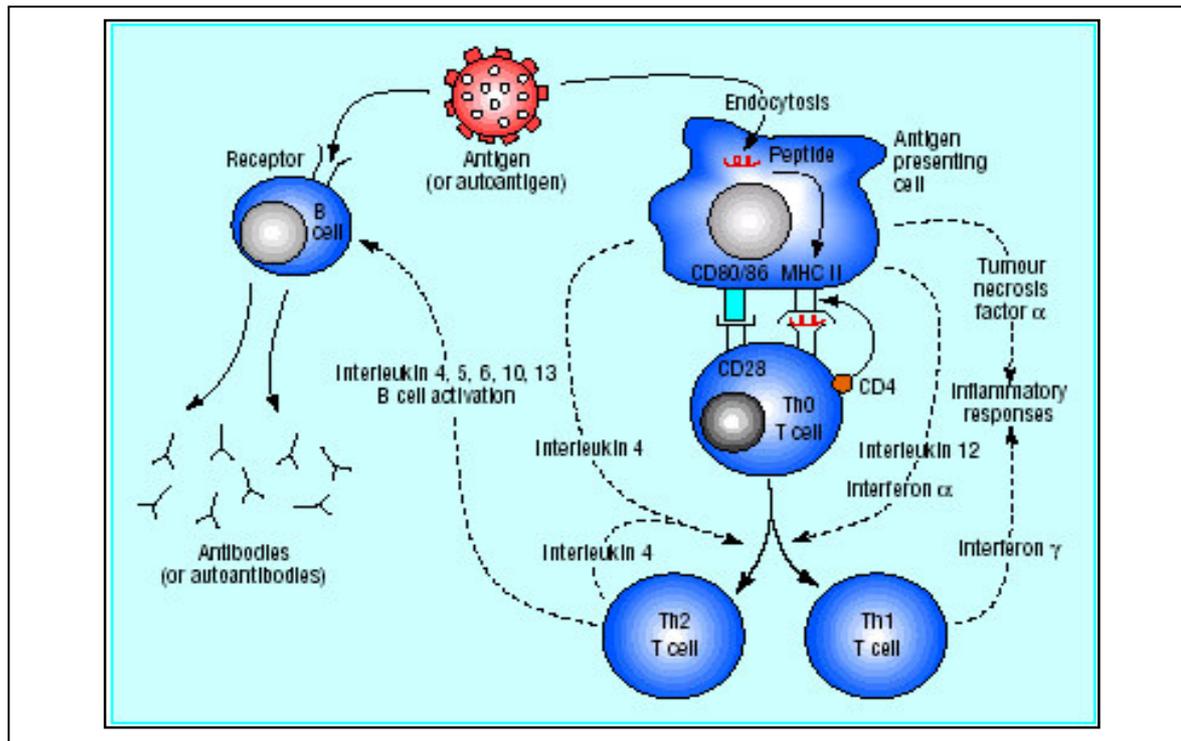


Abb. 2: Komponenten von Immun- und Autoimmun-Antworten.

Antigene oder Autoantigene werden direkt von B-Zellrezeptoren gebunden sowie von antigenpräsentierenden Zellen (z.B. dendritische Zellen) durch die mittels intrazellulärem Abbau antigenetische Peptide entstehen. Diese werden über den MHC-II-Komplex dem Rezeptor der naiven CD4 Helfer-T-Zelle präsentiert. Die Bindung wird, wie dargestellt, durch CD4-Interaktion ermöglicht. Die Bindung von CD80/86 auf der antigenpräsentierenden Zelle mit CD28 auf der T-Zelle liefert ein kostimulierendes Signal, das für die Aktivierung notwendig ist. Unter dem Einfluss von verschiedenen Zytokinen wird die naive T-Zelle zur TH1- oder TH2-Zelle. Etwas unterschiedlich sind die Bedingungen, wenn CD8-T-Zellen aktiviert werden. (aus Mackay, 2000).

1.2.3. Autoimmunerkrankungen

Spezifische Immun- und Autoimmunantworten erfolgen nach denselben Prinzipien. Dabei beinhaltet a) ein Antigen (oder Autoantigen); b) antigenpräsentierende Zellen, T- und B-Lymphozyten; c) Botenmoleküle, Zytokine, Chemokine und ihre Rezeptoren; und d) Signal- und kostimulierende Moleküle auf den Zelloberflächen (vgl. Abb. 2).

Autoimmunerkrankungen besitzen eine hohe klinische Relevanz. Es gibt mindestens 40 bekannte oder vermutete Autoimmunkrankheiten, wobei viele davon sehr häufig auftreten wie die *Hashimoto's Thyroiditis* und die Gravesche Krankheit, wobei mehr als 3 % der adulten Frauen betroffen sind. Andere bekannte Autoimmunerkrankungen sind die rheumatoide Arthritis, der insulinabhängige Diabetes oder die multiple Sklerose. Autoimmunkrankheiten sind oftmals schwer zu diagnostizieren, da der Ausbruch meist schleichend mit unspezifischen Symptomen beginnt (Mackay, 2000).

Autoimmunität bekommt erst dann eine pathologische Relevanz, wenn die Produktion großer Mengen von bestimmten IgM-Antikörpern oder von speziellen IgG-Antikörpern mit hoher Affinität erfolgt. Für viele Autoimmunkrankheiten sind autoreaktive B- und T-Zellen gegen die gleichen Target-Autoantigene gerichtet und in manchen Fällen auch gegen die gleichen immunodominanten Epitope (Manser *et al.*, 1986).

Die Neigung zur Entwicklung einer Autoimmunkrankheit scheint genetisch bedingt zu sein, wobei es mehrere Auslöser für einen Krankheitsausbruch geben kann (Mackay, 2000). Defekte bei der Lymphozyten-Regulation können zu Autoimmunerkrankungen führen, da die Mechanismen der Selbsttoleranz nicht redundant sind und daher nicht kompensiert werden können (Van Parijs *et al.*, 1998). Auf der genetischen Ebene scheint vor allem ein Zusammenhang mit den HLA-Genen (kodieren die MHC-Moleküle auf den APZs) zu bestehen (Merriman *et al.*, 1995). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Mutationen im IL2-Gen zur unkontrollierten Vermehrung von Lymphozyten führen und damit zu einer Manifestierung einer Autoimmunität (Sadlack *et al.*, 1993). Beispielsweise kommt es durch Polymorphismen in diesem Gen (IL2) verstärkt zur Ausbildung der insulinabhängigen Diabetes mellitus (Vyse *et al.*, 1996). Wenn Mutationen in den Genen, die für die Apoptose zuständig sind, vorkommen, kann das zu einer Autoimmunität führen. Als Beispiel sei eine Mutation im Zelloberflächenmolekül Fas in der Zielmembran oder im entsprechenden Fas-Liganden, der in der Membran von zytotoxischen T-Zellen oder TH1-Zellen exprimiert wird, genannt. Eine Aktivierung von Fas in der Zielzelle löst den programmierten Zelltod aus (Mackay, 2000). Eine Mutation dieses Rezeptors hingegen löst dagegen bei Kindern das autoimmune lymphoproliferative Syndrom aus (Vaishnaw *et al.*, 1999).

Weiterhin gibt es die Vermutung, dass Infektionen Initiatoren einer Autoimmunerkrankung sein können, dies vor allem bei genetisch vorbelasteten Personen. Dabei spielt möglicherweise die sogenannte molekulare Mimikry eine Rolle, bei der Antikörper oder T-Zellen, die durch eine Infektion gebildet wurden, mit körpereigenen Antigenen kreuzreagieren (Rocken *et al.*, 1992; Oldstone, 1998). Bei einer Untersuchung von Eichbaum und Mitarbeitern konnte eine Kreuzreaktivität zwischen streptococcalem M Protein und dem kardialen Myosin aufgrund von homologen Sequenzen einiger Aminosäuren aufgezeigt werden (Eichbaum *et al.*, 1994; Rose *et al.*, 1993). Bachmeier *et al.* konnten Sequenzhomologien zwischen MHC und einigen infektiösen Virusagentien sowohl bei der Myokarditis als auch bei der DCM nachweisen (Bachmaier *et al.*, 1999).

Auslöser für Autoimmunerkrankungen können z.B. auch Infektionen oder Sonnenlicht sein, wie beim systemischen Lupus erythematosus (SLE). Aber auch Medikamenten-Wirkstoffe, sowie einige Chemikalien können zu einer ausreichenden Veränderung der Wirtsmoleküle und damit zur Immunogenität führen. Eine wichtige Folge dieser durch T-Lymphozyten ausgelösten Immunreaktion ist die Nichteliminierung dieser Autoantigene und somit die Ausbildung von chronischen Entzündungen (Mackay, 2000).

Die Antikörperentdeckung kann dem Krankheitsbeginn einige Jahre vorangehen. In organspezifischen Autoimmunkrankheiten (z.B. Diabetes, Morbus Basedow), ist der Zerstörungsprozess größtenteils auf ein Organ beschränkt, und die Autoantikörper reagieren mit Autoantigenen, die nur an diesem erkrankten Zielorgan vorkommen. So werden beispielsweise bei der insulinabhängigen Diabetes körpereigene Antikörper gegen die Beta-Zellen der Langerhansinseln im Pankreas gebildet (Serreze *et al.*, 2003).

Es gibt vielfältige Therapiemöglichkeiten für Autoimmunerkrankungen. Dazu zählt unter anderem der Einsatz von monoklonalen Antikörpern oder Blockierungs-Antagonisten gegen die T-Zell-Synapsen, gegen Interaktionen zwischen kostimulierenden Molekülen und Liganden oder zwischen Zytokinen und Chemokinen mit ihren Rezeptoren. Aber auch der Austausch von Stammzellen wird bei rheumatoider Arthritis oder multipler Sklerose angewendet (Porter *et al.*, 1999).

Neben den bereits zitierten Erkrankungen, die von der Volkswirtschaft immense Aufwendungen für Diagnose und Therapie erfordern, finden nach Untersuchungen in den letzten Jahren wahrscheinlich auch im Herzen durch von Autoimmunantworten ausgelöste pathogene Prozesse statt.

1.3. Dilatative Kardiomyopathie

Die dilatative Kardiomyopathie (DCM) ist durch eine eingeschränkte systolische Funktion des Myokards und durch eine Dilatation des linken und rechten Ventrikels gekennzeichnet.

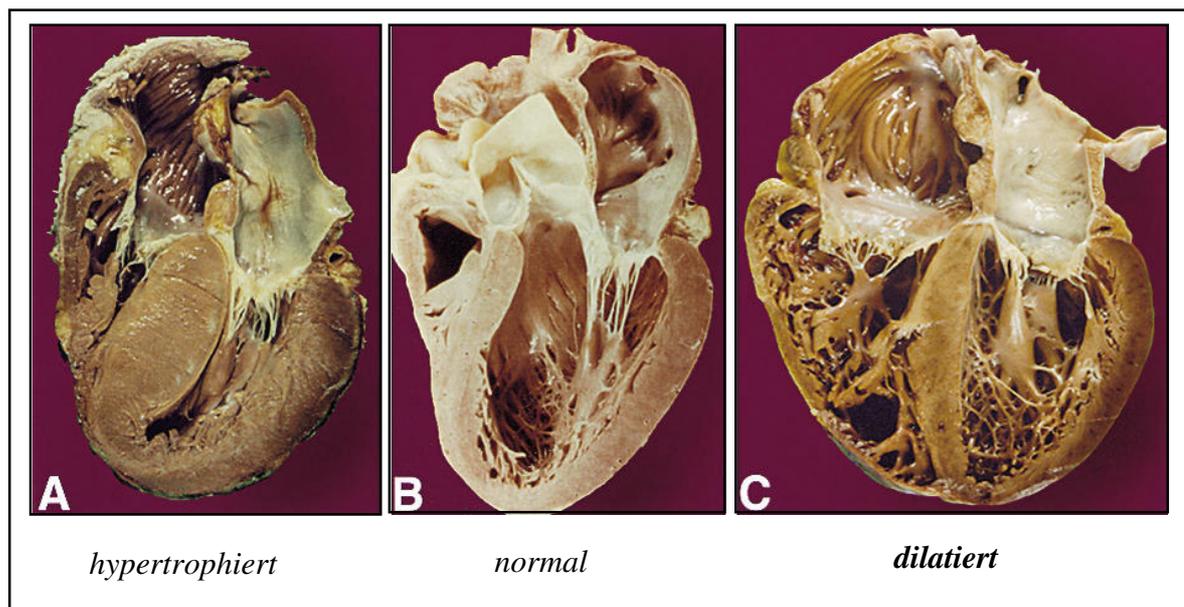


Abb. 3: Abgebildet sind menschliche Herzen, die A: hypertrophiert, B: normal und C: dilatiert sind.

A: Gut zu erkennen ist die starke Verdickung des Myokards des linken Ventrikels gegenüber dem normalen Herzen. C: Bei dieser Abbildung erkennt man die starke Zunahme des Ventrikelvolumens (Dilatation) des linken und rechten Ventrikels. (aus Review: Seidman and Seidman, 2001).

Nach WHO-Kriterien (1995 veröffentlicht) wird die DCM bedingt durch mehrere Ursachen: sie kann idiopathisch, genetisch, viral (vor allem durch Coxsackie B-Viren), autoimmun oder immunbedingt und assoziiert mit einer viralen Infektion verursacht werden (Richardson *et al.*, 1995; Caforio *et al.*, 2002).

Bei 30 % der Patienten liegen vererbte Mutationen vor, die zu Polymorphismen in den Genen für Struktur- (z.B. Dystrophin, Lamin) und Sarkolemmproteinen (z.B. schwere Kette des β -Myosins, kardiales Troponin T) führen (Towbin und Bowles, 2002). Zur Zeit sind 15 verschiedene Genorte bekannt, auf denen bislang 8 potentielle Krankheitsgene identifiziert wurden (Kamisago *et al.*, 2000). Die autosomal dominante DCM ist die häufigste ererbte Form (Michels *et al.*, 1992), bei ihr wurden drei krankheitsrelevante Gene, das kardiale Aktin, das Desmin und das Gen für Lamin A/C identifiziert (Sinagra *et al.*, 2001; Bowles *et al.*, 2000). Seltener wird die DCM autosomal rezessiv oder X-chromosomal vererbt (Mestroni *et al.*, 1999). Die meisten der Mutationen wirken auf die Myozyten, beispielsweise durch eine verminderte Kraftübertragung auf benachbarte Myozyten bei Mutationen in zytoskeletalen Proteinen (Kamisago *et al.*, 2000) oder durch Verminderung der Myozytenzahl bei einer Mutation im Lamin-Gen (Hutchison *et al.*, 2000).

Bei einem Viertel der Patienten ist die Myokarditis viral bedingt (Pankuweit *et al.*, 2000). Bei ihnen kann durch *In-situ*-Hybridisierung bzw. RT-PCR (reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion) enterovirale RNA in Myokardbiopsien detektiert werden (Pauschinger *et al.*, 1999). Oftmals basiert die DCM auch auf einer Myokarditis, die initial häufig durch eine Virusinfektion ausgelöst wird (Pankuweit *et al.*, 2000). Nach dieser Theorie sind DCM und Myokarditis unterschiedliche Stadien der gleichen myokardialen Grunderkrankung (Pauschinger *et al.*, 1999; Kühl *et al.*, 1996; Kuwai *et al.*, 1987).

Zahlreiche Befunde weisen daraufhin, dass bei DCM-Patienten Störungen der humoralen (Antikörper) und zellvermittelten (T-Zellen) Immunität vorliegen (Klappacher, *et al.*, 1993). Dies konnte durch die Detektion von gegen spezifische kardiale Antigene gerichteten Autoantikörpern (vgl. 1.3.1.), sowie durch die Aktivierung der zellulären Immunantwort mit Bildung von zytotoxischen T-Lymphozyten aufgrund von inflammatorischen Prozessen, gezeigt werden (Limas *et al.*, 1995; Limas *et al.*, 1989; Schulze *et al.*, 1990). Ausgehend von dieser Tatsache wird die DCM in der sie beschreibenden Literatur auch zum Teil als Autoimmunkrankheit angesehen (Schultheiss *et al.*, 1986, Caforio *et al.*, 1992). Da es sich bei der DCM um ein sehr heterogenes Krankheitsbild handelt, sind bei den meisten Patienten höchstwahrscheinlich mehrere Ursachen für einen Krankheitsbeginn und deren Verlauf zu finden. So kann eine genetische Disposition und eine Virus- oder Chlamydieninfektion (Bachmaier *et al.*, 1999) mit nachfolgender molekularer Mimikry gleichermaßen ein Auslöser sein. Es wurde festgestellt, dass Autoantikörper häufig auch bei nahen Verwandten von DCM-Patienten vorkommen und möglicherweise ein Auslösen der Krankheit bewirken können. Ähnlich ist auch der Krankheitsverlauf der insulinabhängigen Diabetes beschreibbar, bei der das Vorkommen von Antikörpern gegen die Langerhans-Zellen dem Krankheitsbeginn mehrere Jahre vorangeht (Baekkeskov *et al.*, 1987).

Merkmale bei Patienten mit autoimmuner Form der Myokarditis/DCM sind demnach: familiäre Anhäufungen der Erkrankung, eine abnormale Expression von HLA Klasse II-Genen auf kardialem Endothelium, sowie eine Detektion von organ- und krankheitsspezifischen kardialen IgG-Autoantikörpern im Serum von betroffenen Patienten und ihren symptomfreien Verwandten (Caforio *et al.*, 2002). Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Immunprozesse während des Krankheitsverlaufes aktiv bleiben (Staudt *et al.*, 2001).

Die DCM wird medikamentös durch Hemmung gegen das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System mit sog. ACE-Hemmern, sowie gegen das sympathische Nervensystem mit β -Blockern, sowie mit Diuretika und Digitalis therapiert, wobei es trotzdem noch eine Einjahresmortalitätsrate von 5-10 % gibt (CIBIS-II, 1999; MERIT-HF, 1999). Häufig ist die Herztransplantation die einzige therapeutische Maßnahme für diese Patienten. Da die Anzahl der Spenderherzen begrenzt ist, sind alternative Therapiekonzepte für die Behandlung der DCM gesucht.

Myokardiale Entzündungen können z.B. durch die Immunadsorptionstherapie (vgl. 1.3.2.) mit nachfolgender IgG-Substitution vermindert werden (Staudt *et al.*, 2001). Auch bei anderen Autoimmunerkrankungen (rheumatoide Arthritis) konnte die Immunadsorptionstherapie (vgl. 1.3.2.) erfolgreich angewendet werden (Sasso *et al.*, 2001).

1.3.1. Spezifische Autoantikörper gegen kardiale Proteine

Die pathophysiologische Relevanz der Autoantikörper in der DCM ist derzeit noch nicht vollständig geklärt. Es gibt Hinweise, dass Autoantikörper Veränderungen im Myokard initiieren, die zu einer DCM führen. Außerdem können Autoantikörper durch Interaktion mit Zellbestandteilen den myokardialen Metabolismus und die Myokardkontraktilität beeinträchtigen. Diese Ergebnisse weisen auf eine aktive Rolle der Autoantikörper in der Pathogenese hin, was gleichzeitig bedeutet, dass sie vermutlich nicht nur Epiphänomene oder Marker eines zugrundeliegenden Autoimmunprozesses repräsentieren. (Staudt *et al.*, 2001; Matsui *et al.*, 1997; Schulze *et al.*, 1990). Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass kardiotope Antikörper die Herzfunktion negativ beeinflussen (Schulze *et al.*, 1990) oder dass eine Immunisierung von Kaninchen mit Peptiden des β_1 -Rezeptors zur Entwicklung einer DCM führt (Matsui *et al.*, 1997). Die Autoantikörper können Erkennungsmarker für die Erkrankung darstellen, was als wichtige Grundlage für die Diagnostik genutzt werden kann und teilweise bereits auch genutzt wird (Caforio *et al.*, 1996, 1997). Weiterhin weisen ungefähr 20 % der krankheitsfreien Familienmitglieder von DCM-Patienten ebenfalls herzspezifische Autoantikörper auf (Caforio *et al.*, 1994, 1995; Bilinska *et al.*, 1996). Diese Personen sind klinisch zwar asymptomatisch, zeigen aber oft eine linksventrikuläre Dysfunktion, was die Hypothese unterstützen würde, dass Autoantikörper frühe Marker für ein mögliches Erkrankungsrisiko sind (Caforio *et al.*, 1994, Limas *et al.*, 1992). Es ist aber davon auszugehen, dass neben dem Vorliegen von Autoantikörpern noch zusätzliche

Veränderungen wie z.B. Mutationen beim Target Protein oder Veränderungen in der Antigenpräsentation notwendig sind, bevor es zu einem tatsächlichen Ausbrechen der Krankheit kommt (Stangl *et al.*, 2000). Bei der Diagnostik auf Basis von Autoantikörpern muss bedacht werden, dass Autoantikörper in geringem Maße auch bei hypertropher Kardiomyopathie (Peukert *et al.*, 1999) und bei Hypertonie auftreten, vor allem gegen α_1 -Rezeptor und Angiotensin-1-Rezeptor. Es konnten einige Autoantikörper gegen kardiale zelluläre Proteine identifiziert werden, wobei nähere Untersuchungen an Autoantikörpern erfolgten, die gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren wie β_1 -adrenerge (Jahns *et al.* 1999; Limas *et al.*, 1989) und muskarinerge Rezeptoren (M_2) gerichtet sind (Fu *et al.*, 1994). Ungefähr 35 % der DCM-Patienten besitzen Antikörper gegen den M_2 -Rezeptor (Fu *et al.*, 1994). Für den β_1 -Rezeptor variieren die Angaben zwischen 30-90 %. Insgesamt 57 % der Patienten haben Antikörper gegen beide Rezeptoren. Außerdem wurden Antikörper gegen Membranbestandteile (Maisch *et al.*, 1990) und gegen mitochondriale Proteine, vor allem gegen den *ADP/ATP-Carrier* der inneren mitochondrialen Membran nachgewiesen (Schulze *et al.*, 1990; Schultheiss *et al.*, 1993). Diese Autoantikörper gegen den *ADP/ATP-Carrier* könnten z.B. zu einer Störung des Myokardmetabolismus und des Energiehaushaltes führen (Liao *et al.*, 1996). Zusätzlich fand man Autoantikörper gegen *Myosin light-chain-1*, α - und β -*Myosin heavy-chain*-Isoformen, Tropomyosin und HSP60 (Caforio *et al.*, 1992, 1994; Latif *et al.*, 1993). Bei α -Myosin handelt es sich um ein ausschließlich kardiales Protein, wohingegen das β -Myosin ventrikulär und skeletal vorkommt und somit bei Untersuchungen mit Myosin Kreuzreaktionen auftreten könnten.

Es konnte gezeigt werden, dass durch einen Transfer von peripheren Blutleukozyten von Patienten auf Mäuse eine Myokarditis bei den Tieren ausgelöst wird (Schwimmbeck *et al.*, 1995). Darüber hinaus wurde durch Injektion von Antikörpern gegen α -Myosin bei Mäusen eine Myokarditis bzw. eine DCM ausgelöst (Neu *et al.*, 1987; Liao *et al.*, 1995). Zudem konnte verdeutlicht werden, dass durch eine aktive Immunisierung bei Kaninchen gegen Epitope des muskarinergen Rezeptors und des β_1 -Adrenorezeptors funktionelle und morphologische Veränderungen ähnlich der DCM induziert werden können (Fu *et al.*, 1996). Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Autoantikörper eine entscheidende Rolle bei der DCM spielen. Stangl *et al.* schränkt ein, dass es noch nicht ausreichend geklärt ist, ob die ausschließliche Präsenz der Autoantikörper für die Progression der Krankheit ausreicht. Vermutlich ist eine zusätzliche Voraussetzung die genetische Prädisposition

(Stangl *et al.*, 2000). Fu *et al.* hingegen ist der Überzeugung, dass man, wenn man die vorhandenen Daten von *in vitro* und *in vivo* Studien zur dilatativen Kardiomyopathie zusammenfaßt, aussagen kann, dass eine Subgruppe von DCM autoimmun bedingt ist. Zudem impliziert die Heterogenität dieser Erkrankung, dass verschiedene Subgruppen von DCM verschiedene Pathogenesen haben können (Fu *et al.*, 2002).

1.3.2. Immunadsorptions- und IgG-Substitutionstherapie (IA/IgG)

Wenn kardiotope Antikörper die Herzfunktion negativ beeinflussen, sollte eine Entfernung dieser Immunglobuline zu einer Verbesserung der hämodynamischen Situation führen. Mittels des extrakorporalen Immunadsorptionsverfahrens ist es möglich, Immunglobuline aus dem Blut zu entfernen. Dabei wird Plasma von den anderen Blutbestandteilen getrennt und mit einer physiologischen Natriumchlorid-Lösung über spezielle Adsorbersäulen geleitet, um dann wieder mit den Blutbestandteilen vereinigt zu werden. Dieses Verfahren wurde auch schon erfolgreich bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der endokrinen Ophthalmopathie (*thyroid-associated ophthalmopathy*) (Prophet *et al.*, 2001), der Typ 1 Diabetes (Seidel *et al.*, 1998) oder bei dem systemischen Lupus erythematosus (SLE) angewendet (Graninger *et al.*, 2002).

Die Adsorbersäulen bestehen aus Sepharose, die mit Fc-gekoppelten polyklonalen Antikörpern gegen humanes Immunglobulin bzw. mit Protein A beschichtet sind. Immunglobuline aller Subklassen, Immunglobulinfragmente und Immunkomplexe aus dem Plasma binden an die Schafantikörper und werden somit entfernt. Hierbei wird allerdings die Subklasse IgG3 nicht so effektiv aus dem Blut entfernt, da die Reaktivität von IgG3 zum Protein A geringer ist als bei den anderen IgG-Subklassen (Hadji-Ghasemi *et al.*, 2003). Die Eliminierung des IgG3 hängt damit vom Gesamt-IgG-Level im Blut ab, was bedeutet, dass eine längere Immunadsorptionsdauer zu einer verbesserten IgG3-Eliminierung führt, da dann die Gesamtantikörperkonzentration im Blut niedriger ist (Staudt *et al.*, 2002). In der Veröffentlichung von Staudt *et al.* wurde beschrieben, dass die IA in monatlichen Abständen bis zum 3. Monat wiederholt wurde. Parallel zu den hämodynamischen Verbesserungen stieg bei den meisten Patienten auch die linksventrikuläre Auswurfraction, d.h., es konnte allgemein eine Stabilisierung der myokardialen Funktion erzielt werden, sowie eine Reduktion der Inflammation im Myokardgewebe (Staudt *et al.*, 2001).

Stangl und Mitarbeiter haben zur Untersuchung der Auswirkungen der IA auf den Patienten den β_1 -Rezeptor-Autoantikörper als Marker verwendet, da er bei 70-90 % der DCM-Patienten auftritt (Dörffel *et al.*, 1997) und sich bei der Immunadsorption extrahieren läßt. Nach der Immunadsorptionstherapie konnte eine Abnahme der Immunglobulinkonzentration, sowie ein Abfall der Aktivität der β_1 -Rezeptor-Autoantikörper gemessen werden (Stangl *et al.*, 2000). Allgemein kam es zu frühen und anhaltenden hämodynamischen Fortschritten, was durch einen Anstieg des kardialen Index (CI) veranschaulicht wird (Felix *et al.*, 2000; Dörffel *et al.*, 1997).

Das Säuleneluat wurde an isolierten, spontan schlagenden kultivierten Kardiomyozyten von Ratten getestet. An den Kardiomyozyten wurde der Ca^{2+} -Transient und die Zell-Kontraktion ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei Verwendung des Säuleneluats von DCM-Patienten der Ca^{2+} -Transient und die Zell-Kontraktion sanken, im Vergleich zum Einsatz von Eluat von gesunden Probanden (Felix *et al.*, 2002). Anhand dieses Versuches konnte beispielsweise auch gezeigt werden, dass Autoantikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor die adrenerge Signalkaskade beeinflussen (Wallukat *et al.*, 2000). Durch selektive Bindung üben diese Antikörper einen positiven chronotropen und einen negativen ionotropen Effekt auf die Rattenkardiomyozyten aus, d.h., sie steigern die Herzfrequenz und senken die Kontraktionskraft des Myozyten. Als Epitope dieser Antikörper konnte die erste und zweite extrazelluläre Schleife des Rezeptors identifiziert werden (Wallukat *et al.*, 1995a, b).

Zusätzlich zur Verringerung der Entzündungszellen nach der IA/IgG-Therapie erfolgt auch eine Abnahme in der Expression von HLA-Genen. Diese Antigene spielen eine wichtige Rolle in der Regulierung der Immunantwort, weil den T-Zellen Peptide von HLA-Klasse-II-Antigenen präsentiert werden können. Es ist auch bekannt, dass die Anfälligkeit, an DCM zu erkranken u.a. mit spezifischen HLA-Allelen zusammenhängt (Harcombe *et al.*, 1999). Allerdings sind noch nicht alle Mechanismen, die die positiven Effekte der IA/IgG-Therapie auslösen, erforscht.

1.3.4. Welche Rolle spielt IgG3 bei der autoimmunen DCM?

Kardiale Antikörper gehören der IgG-Fraktion an. Es gibt verschiedene IgG-Subklassen (IgG1, 2, 3, 4), die sich immunologisch und funktionell unterscheiden. Antikörper, die Effektorfunktionen auslösen und vornehmlich immunregulatorisch aktiv sind, sind IgG1 und IgG3 (Bruggemann *et al.*, 1987). Die Komplementaktivierung wird am effektivsten

durch den IgG3-Subtyp gesteuert, sowie in geringerem Ausmaß auch durch IgG1. Zudem fungieren die IgG3-Antikörper auch besser als Mediatoren zur viralen Neutralisation und antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität als IgG1 Antikörper (Torfason *et al.*, 1987). Die Plasmakonzentration von IgG3 ist deutlich geringer als bei IgG1 (IgG3: 1 mg/ml, IgG1: 9 mg/ml) und die Halbwertszeit im Serum ist zwei Drittel kürzer als bei allen anderen Subklassen (IgG3: 7 Tage, IgG1: 21 Tage) (Janeway *et al.*, 1997).

Staudt *et al.* konnten durch eine Vergleichsstudie die Rolle des IgG3 hervorheben. Die Studie war so angelegt, dass zwei verschiedene Adsorbersäulen bei der Immunadsorptionstherapie verwendet wurden, wobei die gängige Säule mit Protein A bestückt war, das eine hohe Affinität zu IgG1, 2, 4 besitzt und eine zweite Säule war mit anti-IgG behaftet, das eine gute Affinität zu allen IgG-Subklassen (IgG1, 2, 3 und 4) besitzt. Nach Entfernung der Immunglobuline aller Subklassen mit der anti-IgG-Säule konnte gezeigt werden, dass unter anderem eine anhaltende hämodynamische Verbesserung sowie eine Steigerung der linksventrikulären Auswurffraktion erzielt werden konnte, im Gegensatz zu der Verwendung der Protein A-Säule (Staudt *et al.*, 2002).

Diese Einschätzungen konnten auch durch andere bestätigt werden wie von Warraich *et al.*. Sie haben mittels ELISA die Häufigkeit und Reaktivität von Autoantikörpern gegen Myosin für IgM und alle IgG-Subtypen bei verschiedenen Herzkrankheiten evaluiert. Dabei konnte ein erhöhter Level von IgG3-Antikörpern bei der DCM festgestellt werden (Warraich *et al.*, 2002; 1999).

1.4. Detektionsmethoden zur Erkennung von Autoantikörpern

Die Autoantikörper, die bei Autoimmunerkrankungen auftreten, spielen eine wichtige Rolle in der Diagnostik und Klassifizierung der Krankheit sowie bei der Identifizierung von potentiellen therapeutischen Targets (von Mühlen und Tan, 1995). Zur Untersuchung von Autoantikörpern wurden häufig Proteine aus Gewebeextrakten mittels 2D-Gelelektrophorese voneinander getrennt und auf Membranen übertragen (Latif *et al.*, 1993). Zur Charakterisierung schon bekannter Antikörper werden Immunfluoreszenzmethoden verwendet.

Ein 2D-Gel trennt Proteine nach isoelektrischem Punkt und Molekulargewicht und dient dazu, mehrere tausend Proteine auf einem Gel gleichzeitig zu visualisieren und somit den

gleichzeitigen Nachweis eines größtmöglichen Bereiches von beispielsweise kardialen Proteinen zu gewährleisten. Die Identifizierung der Proteine erfolgt anschließend durch massenspektrometrische Methoden (Hanash, 2001). Durch den Vergleich von anderen Krankheiten (z.B. ischämische Herzerkrankungen) oder gesunden Biopsien, lassen sich erhöhte und erniedrigte Protein-Expressionslevel charakterisieren. Zudem wurden auf 2D-Immunoblots bereits Serumscreening-Versuche durchgeführt (Pohlner *et al.*, 1997).

Der Nachteil dieser Methoden liegt darin, dass zum einen gering exprimierte Proteine durch die Auftrennung kompletter Zellextrakte und darin enthaltenen stark exprimierten Proteinen überlagert werden können. Zum anderen besteht eine große Redundanz einiger Proteine (z.B. Tubulin), wodurch die Interaktion von Autoantikörpern mit anderen, weniger häufig vertretenen Proteinen möglicherweise schwerer zu detektieren ist (Hanash, 2003).

Die indirekte Immunfluoreszenz ist eine wichtige lichtmikroskopische Technik zur Charakterisierung von zellulären Strukturen, (z.B. Zellkern, Lysosomen, Zytoskelett) aber auch zur Darstellung dynamischer Prozesse in der Zelle. Hierbei werden gebundene Antikörper durch fluoreszierende Anti-Immunglobuline bestimmt (Radbruch *et al.*, 1995). Auf diese Weise können bekannte DCM-Autoantikörper und damit die relevanten Autoantigene direkt an Herzzellen unter normalen und pathologischen Bedingungen untersucht werden.

1.4.1. Proteinarrays und Serumscreening

Mikroarrays sind geordnete, miniaturisierte Anordnungen einer Vielzahl von immobilisierten Reagenzien (DNA, Proteine, Peptide, Kohlenhydrate), die anschließend mit einer Probe in Kontakt gebracht werden (Haab *et al.* 2001; Weller *et al.*, 2003). Proteinarrays sind entsprechende Anordnungen mit meist denaturierten immobilisierten Proteinen, da native Proteine oft instabil sind (Weller *et al.*, 2003). Diese Arrays können unterschiedliche Oberflächen haben wie Polyacrylamid und Agarose oder aber chemisch modifizierte Glas- oder Plastikoberflächen wie Aldehyd oder Poly-L-Lysin (Angenendt *et al.*, 2002).

Mit der Aufschlüsselung des menschlichen Genoms, sowie das vieler anderer Organismen, ist eine Vielzahl an Genen identifiziert worden (Kukar *et al.*, 2002). Der Zahl von 30.000 – 40.000 humanen Genen steht ca. die fünffache Menge an verschiedenen tatsächlich exprimierten Proteinen gegenüber. Dies geschieht vorwiegend durch verschiedene zelluläre

Prozesse wie alternative Spleißvorgänge, sowie posttranslationale Modifikationen (Acetylierungen, Glykosylierungen etc.). Die Untersuchung des Proteoms ist wichtig zum Verständnis und für die Diagnose vieler Krankheiten, sowie zur Identifizierung neuer therapeutischer Targets (Pandey und Mann, 2000). Die Untersuchungen auf Proteinarrays erlauben eine Hochdurchsatz-Analyse von Proteinen und ihren potentiellen Funktionen, sowie die Bestimmung möglicher Interaktionen zwischen Proteinen und Liganden (Lueking *et al.*, 1999).

Die Identifizierung von spezifischen pathogenen Autoantikörper-Antworten ist wichtig für die Diagnose, die Klassifizierung und die Prognose von Autoimmunkrankheiten. Dazu ist ein umfassendes Profiling von Autoantikörpern notwendig, durch das bessere Einsichten in die Pathophysiologie der Autoimmunität erfolgen kann und somit neue Behandlungsstrategien, wie z.B. die spezifische Antigen-Toleranz-Therapie, erfolgen können (Brocke *et al.*, 1996, Critchfield *et al.*, 1994). Die Nutzung von Proteinarrays kann daher in der Autoimmundiagnostik große Vorteile mit sich bringen. Mit Hilfe von Proteinarrays kann das Vorhandensein bzw. das Fehlen und die Spezifität des Antikörperrepertoires, das in Autoimmunkrankheiten vorkommt, dargestellt werden, wobei man die Proben gegen alters- und geschlechtsgleiche Kontrollen abgleicht (Haab *et al.*, 2001). Es wurden beispielsweise bei Patienten, die an rheumatischen Erkrankungen leiden, hohe Titer von Antikörpern gegen verschiedene nukleäre Proteine detektiert (Joos *et al.*, 2000).

Da beim Serum- oder Plasmascreening die Untersuchungen gegen denaturierte Proteine erfolgen, werden vornehmlich Autoantikörper detektiert, die kontinuierliche (lineare) Epitope erkennen. Viele dieser Antikörper sind jedoch auch in der Lage, an Epitope nativer Proteine zu binden. Bei der Impfstoffherstellung wird dasselbe Verfahren angewendet, wobei man synthetische Peptide als Impfstoffe verwendet, die die Bildung von Antikörpern gegen Proteinepitope eines Pathogens anregen sollen (Janeway *et al.*, 1997).

Die Erfassung von Autoantigenen kann durch das Screenen mit Seren, aber auch anderen Körperflüssigkeiten wie Liquor oder Synovialflüssigkeit von Autoimmunpatienten auf Proteinarrays erfolgen. Dabei kann man nicht nur mögliche neue Autoantigene identifizieren, sondern auch generell Autoimmunerkrankungen bzw. deren Subtypen diagnostizieren anhand von vorhandenen spezifischen Autoantikörpern (Robinson *et al.*, 2002). Robinson *et al.* haben einen Autoantigen-Array mit 196 verschiedenen Molekülen

erstellt, die vor allem spezifisch mit Autoantikörpern von Patienten mit autoimmunen rheumatischen Erkrankungen reagieren. Diese Arrays wurden mit Serum-Gemischen von unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen inkubiert. Dabei konnte u. a. gezeigt werden, dass Antigenerkennung mit dem fluoreszenzmarkierten zweiten Antikörper noch im Nanogramm-Bereich erfolgen und der Antigenarray 4-8 mal sensitiver bei der Detektion von Autoantikörpern ist als die ELISA-Technik.

Im momentanen Stand der Technik sind die Vorteile von Protein-Mikroarray-Applikationen im Vergleich zu den bisher verwendeten Techniken wie ELISA, der Western-Blot-Analyse oder dem Radioimmunoassay der Einsatz geringerer Probenvolumina und die parallele Detektion von Antigenen auf einem Array.

1.5. Herstellungsverfahren von Antikörpern

Antikörper spielen eine große Rolle bei immunologischen Untersuchungen und der Diagnose von Krankheiten, da sich Antikörper gegen ein ausgewähltes Antigen herstellen lassen. Dazu können mono- oder polyklonale Antikörper verwendet werden, wobei die monoklonalen im Gegensatz zu den polyklonalen gegen nur ein Epitop des Proteins gerichtet sind (Aigner *et al.*, 1997). Das Immunsystem bildet durch die zufällige Anordnung der V-Gensegmente ein Repertoire von unreifen B-Zellen, die jeweils eine einzige Antikörperspezifität auf ihrer Oberfläche präsentieren. Durch Antigenkontakt werden von den B-Zellen zum einen Antikörper sezerniert und zum anderen langlebige Gedächtniszellen gebildet. Dabei werden die V-Gene der Antikörperrezeptoren der Gedächtniszellen einer Hypermutation unterzogen, durch die eine Affinitätsreifung dieser Antikörper erfolgt. Diese Reifung nimmt mit erneuter Immunisierung von Wirbeltieren zu. Das Herstellungsverfahren von monoklonalen Antikörpern, die von einem einzigen B-Zell-Klon produziert werden setzt aber noch weitere Prozesse voraus. Sie können z.B. erzeugt werden, indem man durch Fusion von einer immortalen Myelomzelle mit einer nach Immunisierung gebildeten Plasmazelle aus der Milz von Mäusen hybride, immortale antikörperbildende Zellen erzeugt und den gewünschten Klon selektiert (Janeway *et al.*, 1997).

Abgesehen von der Herstellung der Antikörper in Hybridomazellen, gibt es seit einigen Jahren den alternativen Weg des Screenings synthetischer Phagenantikörper-Bibliotheken

(Phage Display-Technologie), bei dem im Grunde die Selektionsstrategien des Immunsystems nachgeahmt werden (Sheets *et al.*, 1998). Beim Antikörper Phage Display lassen sich gewünschte monoklonale Antikörper mit der gewünschten Spezifität aus einem großen V-Gen-Repertoire selektieren, und auf der Oberfläche filamentöser Phagen präsentieren (Lu *et al.*, 1999). Jeder Phage präsentiert nur eine Antikörperspezifität, die Phagen werden durch Antigenbindung selektiert und schließlich werden lösliche Antikörperfragmente von infizierten Bakterien gebildet. Wie im Immunsystem können die V-Gene einer zufälligen Mutation unterworfen werden und die hochaffinen Mutanten selektiert werden. Dadurch lassen sich Antikörperfragmente einer definierten Spezifität sowohl gegen fremde Antigene als auch gegen Autoantigene isolieren (Marks *et al.*, 1992; Hoogenboom *et al.*, 1992).

Der Vorteil bei dieser Methode besteht in dem geringeren Zeitaufwand, den geringeren Kosten, sowie der Umgehung von Tierversuchen. Darüber hinaus lassen sich im Phage Display direkt humane Antikörper-Sequenzen verwenden, wodurch Antikörper erhalten werden können, die in Tieren aufgrund der Toleranzmechanismen nicht immunogen sind (Nissim *et al.*, 1994; Winter *et al.*, 1994.). Die Nachteile sind im hohen Selektionsaufwand und im Erhalt von vielen unspezifischen Antikörpern zu suchen.

1.5.1. Phage Display

1990 konnte McCafferty erstmals zeigen, dass Antikörper-Fragmente auf der Oberfläche von filamentösen Phagen (Bakteriophagen) durch Fusion der variablen Antikörper Gene mit einem Phagen-Hüllprotein präsentiert werden konnten (McCafferty *et al.*, 1990). Bakteriophagen (z.B. fd, f1 und M13) sind Viren, die gramnegative Bakterien (z.B. *E. coli*) infizieren können. Diese Infektion wird durch das in den Bakterien vorhandene F-Episom ermöglicht. Die Bakteriophagen gehören zur Familie der Inoviridae und weisen eine einzelsträngige DNA (*single strand*, ssDNA) auf. Sie sind nicht lytische Phagen, d.h., sie zerstören nach Freisetzung der reproduzierten Phagen die Bakterienzellen nicht.

Das Virus besteht aus fünf verschiedenen Proteinen, wobei das Protein P8 das Haupt-Hüllprotein mit ca. 2700 Kopien darstellt. Von den restlichen vier Proteinen existieren jeweils ungefähr fünf Kopien (vgl. Abb. 4). Die Infektion erfolgt über den bakteriellen F-Pilus, durch den die Übertragung der Virus-ssDNA in den Wirtsorganismus erfolgt. In der Bakterienzelle findet die Umwandlung in eine doppelsträngige DNA statt, damit die

Replikation, Transkription und Translation möglich ist. Die neuentstandene virale ssDNA wird anschließend in eine Phagenhülle verpackt und aus dem Wirtsorganismus ausgeschleust.

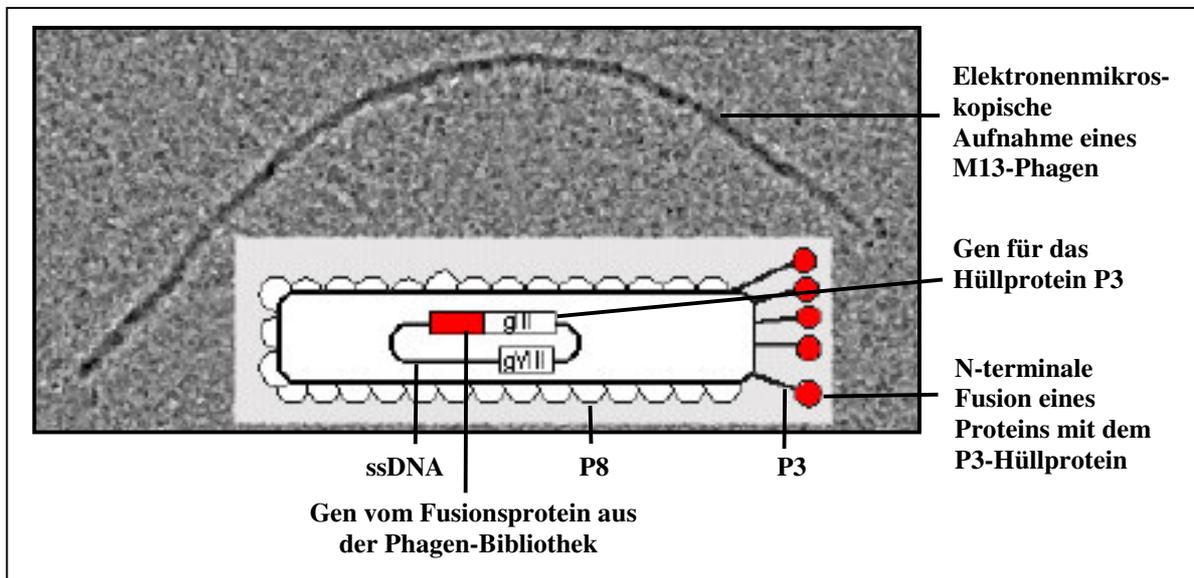


Abb. 4: Elektronenmikroskopische (oberer Teil des Bildes) und schematische Darstellung (unterer Teil des Bildes) eines filamentösen M13-Bakteriophagen.

Die Darstellung verdeutlicht die Lage der wichtigsten Hüllproteine P8 und P3. Im Genom des Phagen ist das Gen für das „Display-Protein“ aus der Phagen-Bibliothek (rot gekennzeichnet) mit dem P3-Gen fusioniert, sodass es mit ihm zusammen exprimiert wird und auf der Phagenoberfläche präsentiert werden kann. (http://www.igb.fhg.de/WWW/GF/Pharma/dt/GFPH_208_Phagedisplay.dt.html).

Beim Phage Display erfolgt die Expression von rekombinanten Antikörperfragmenten, wobei es sich anfänglich um scFv's (*single chain variable fragment*) handelte, bei denen variable schwere und variable leichte Domänen durch ein flexiblen Polypeptid-Abstandshalter (*linker*) verbunden sind (McCafferty *et al.*, 1990). Später gab es Fab (*fragment antigen binding*)-Fragmente, die durch den konservierten Teil eine höhere Stabilität aufweisen (McCafferty *et al.*, 1990; Garrad *et al.*, 1991) sowie Antikörper-Derivate wie dsFv's (*disulfid variable fragment*) (McGuinness *et al.*, 1996) (vgl. Abb. 1). Aber auch andere Proteine wie beispielsweise Enzyme (Soumillion *et al.*, 1994), die mit Phagen-Hüll-Proteinen fusioniert sind (Lu *et al.*, 1999) können auf den Phagen präsentiert werden. Meistens wird eine N-terminale Fusion mit dem Hüllprotein P3 oder P8 angestrebt, wobei aber die Fusionen mit P3 bevorzugt wird, da die Affinität zum Antigen höher ist als bei der P8-Fusion (aufgrund der höheren Anzahl der Hüllproteine ist bei P8 dafür die Avidität höher) (Hoogenboom und Chames, 2000). Durch die Entwicklung des Phagemid-

Vektors (Mead und Kemper, 1998), bei dem Phagen- und Plasmid-Merkmale kombiniert wurden, ist eine Selektion dieser rekombinanten Proteine möglich. Das Phagemid besitzt einen Bakterien- und Phagen-Replikationsursprung, ein Phagen-Verpackungs-Signal und eine Antibiotikum-Resistenz für die Selektion von Inserts enthaltenden *E. colis*. Da dem Phagemid alle anderen Phagengene fehlen, ist zur Vermehrung ein Helfer-Phage (z.B. M13-K07) notwendig, der die notwendigen Gene für die Partikel-Zusammensetzung besitzt. Helferphagen sind mutierte Wild-Typ Phagen mit einem defekten Replikationsursprung und defektem Verpackungssignal. Daher wird nur das Phagemid repliziert und effizient verpackt, nicht aber das Helferphagen-Genom (Hoogenboom *et al.*, 1991).

1.5.1.1. Möglichkeiten von Quellen für Phagen-Bibliotheken

Eine Phage Display-Bibliothek wird über PCR aus einer großen Anzahl von variablen Antikörpergen-Regionen aus leichten und schweren Ketten von meist Immunglobulin M der B-Zellen kloniert oder auf synthetischem Wege durch Oligonukleotid-Klonierung (Hoogenboom und Chames, 2000). Die Bibliothek kann aus unterschiedlichen Quellen stammen, wie z.B. von immunisierten Tieren, erkrankten Patienten, gesunden Menschen (naiv) oder synthetisch kloniert. Die Quelle, aus der die Gene der variablen Domänen stammen, bestimmt die Spezifität und Häufigkeit der antigenspezifischen Klone in der Bibliothek, sowie die Qualität (Affinität, Häufigkeit von Nukleotidmutationen) der selektierten Klone. Der Vorteil der naiven und synthetischen Bibliotheken besteht in ihrer großen Diversität, sogar gegen nichtimmunogene Moleküle oder toxische Substanzen (Winter *et al.*, 1994). Die synthetischen Bibliotheken bestehen im allgemeinen aus bis zu 10^{12} rekombinanten Phagen (Strachan *et al.*, 2002).

Bei den immunisierten Antikörper-Bibliotheken werden nur Antikörper gegen das in der Immunisierung eingesetzte Antigen erhalten, wobei es sich um hochaffine Antikörperbindungen handelt. Dabei wird die mRNA, die aus den B-Zellen isoliert wird, in der cDNA-Synthese eingesetzt und anschließend die Gene der schweren und leichten Ketten amplifiziert und in einen Oberflächen-Display Vektor kloniert. Diese Art von Bibliotheken werden in der Regel von immunisierten Tieren erhalten. Es besteht aber auch die Möglichkeit menschliche krankheitsabhängige Antikörper-Bibliotheken von Patienten mit Autoimmunkrankheiten (Fischer *et al.*, 1999), mit Krebs (Graus *et al.*, 1998) oder mit Allergien zu erstellen (Davies *et al.*, 2000). Die naiven und synthetischen Bibliotheken

wurden hingegen konstruiert, um Antikörper gegen alle erdenklichen Targets zu erhalten, ohne eine Immunisierung durchführen zu müssen. Dabei werden die naiven Bibliotheken aus natürlich zusammengesetzten V-Gen Pools von gesunden Individuen erzeugt, sodass die entstandene Diversität größtenteils mit der Keimbahn-Diversität übereinstimmt. Die V-Gen-Pools werden mit spezifischen Primern amplifiziert und in funktionelle Antikörper-Fragmente (scFv oder Fab) wieder zusammengesetzt und in einen Display-Vektor kloniert. Synthetische Bibliotheken werden durch das Klonieren der CDR enthaltenden Gensegmente der verschiedenen Familien der schweren und/oder leichten Ketten generiert und *in vitro* durch PCR zusammengesetzt (Nissim *et al.*, 1994). Durch diese Methode können völlig neue Antikörper entstehen. Synthetische Bibliotheken können auch zusammengesetzt sein aus einem löslichen VH- und VL-Gerüst mit stellenweise zufälligen CDR's. Die Diversität wird hierbei durch Oligonukleotide eingeführt, die Veränderungen nur an gewünschten Stellen verursachen wie beispielsweise an wichtigen Antigenbindungsstellen (Knappik *et al.*, 2000; Pini *et al.*, 1998).

1.5.1.2. Die Phagen-Selektion

Da das Genprodukt auf der Oberfläche des Bakteriophagen präsentiert wird, kann es an ein potentiell Zielmolekül binden. In Kombination mit stringenten Selektionsbedingungen ist es möglich, Antikörper zu isolieren, die eine hohe Bindungsaffinität für ein bestimmtes Antigen aufweisen. Da das Genprodukt mit dem dafür kodierenden Gen gekoppelt ist, können angereicherte Klone isoliert, in Bakterienzellen amplifiziert und ihre DNA-Sequenz charakterisiert werden. Phagen, die nicht oder nur schlecht an das Target binden, lassen sich von der Oberfläche leicht wegwaschen, während gut bindende Phagen erst durch einen Überschuss an freiem Antigen oder für die Bindung sehr ungünstigen pH-Bedingungen losgelöst werden. Die Phagen mit hoher Bindungsaffinität zu dem Target-Protein werden erneut zur Bakterieninfektion eingesetzt, in denen anschließend die Phagen-Amplifizierung stattfindet (vgl. Abb. 5).

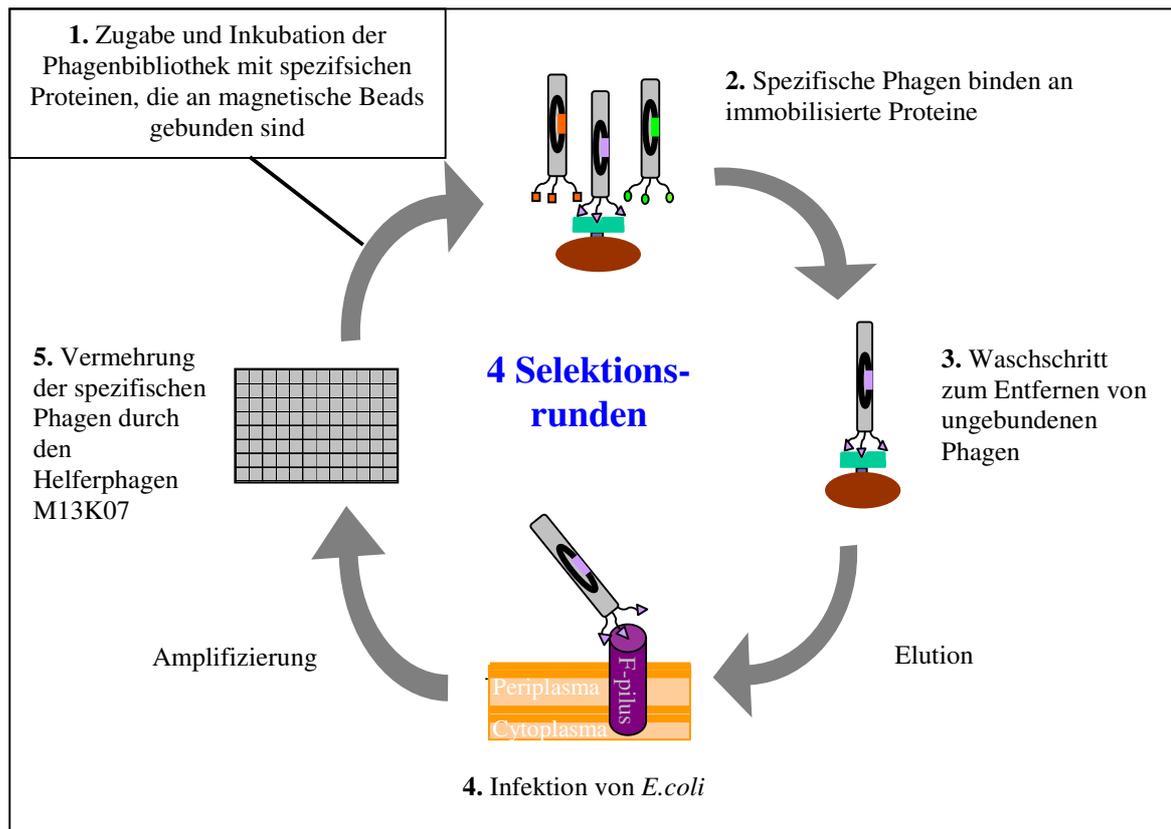


Abb. 5: Übersicht der Phagenselektion (Biopanning).

Die Selektionsschritte müssen viermal wiederholt werden, um eine spezifische Phagenanreicherung zu erhalten.

Da nach einer Selektionsrunde nur ein polyklonales Subset von Phagen isoliert werden kann, sind vier bis fünf Selektionsrunden notwendig, um eine Anreicherung von spezifischen Phagen zu erreichen, die nur einen Typ von Antikörper auf ihrer Oberfläche exprimieren, welche eine starke Bindung zu dem Target-Protein zeigen. Die Affinität muß für diese Antikörper über den Hintergrundsignalen der unspezifisch bindenden Phagen liegen. Die klonale Anreicherung spezifischer Phagen durch mehrere Selektionsrunden hat neben dem Vorteil hoher Affinität den Nachteil des Verlustes der Diversität und damit werden nur wenige Proteinepitope durch subklonierte Phagen nachgewiesen (vgl. Abb. 6).

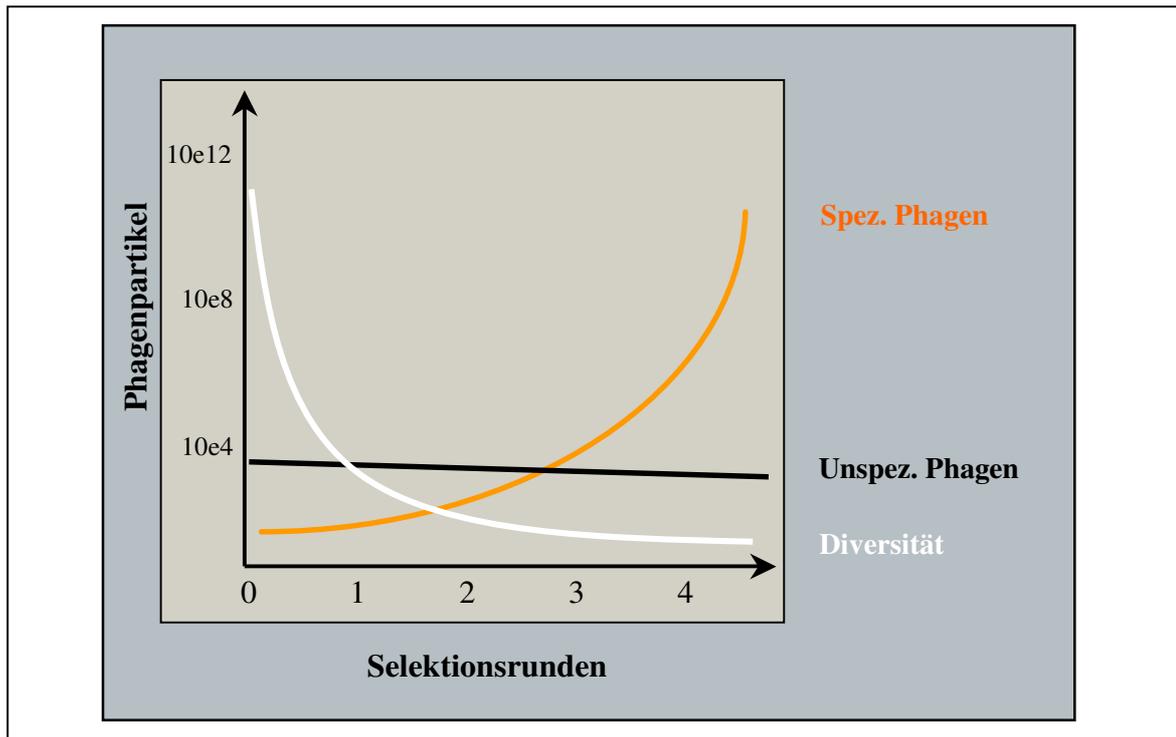


Abb. 6: Verhältnis von Spezifität und Diversität während der Phagenselektion.

Mit steigender Anzahl der Selektionsrunden steigt die Menge an spezifischen Phagen und die Anzahl der unspezifisch bindenden Phagen minimiert sich. Allerdings sinkt gleichzeitig die Diversität der Klone (aus Dissertation von Zoltán Konthur).

1.6. Zielsetzung

Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Typen einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) werden im Rahmen dieser Arbeit zwei unterschiedliche Strategien verfolgt, die zur Untersuchung der Krankheit beitragen sollen.

Im ersten Teil der Arbeit sollen Antikörper mittels Phage Display gegen differentiell exprimierte Gene bei der idiopathischen DCM generiert werden. Der Nachweis der differentiellen Expression dieser Arbeit erfolgte direkt an den erkrankten Herzmuskelzellen von Patienten, wobei die Genexpressionsprofile erstellt wurden, indem komplexe Mischungen von RNAs oder ssDNAs aus Gewebe auf DNA-Chips hybridisiert wurden (Grzeskowiak *et al.*, 2003). Die Ergebnisse der differentiellen Expression sollen in dieser Arbeit auf Proteinebene, mittels Phagenantikörper-Herstellung, sowie deren Validierung mit Hilfe der Immunhistochemie, bestätigt werden. Das Phage Display hat gegenüber der herkömmlichen Hybridoma-Technik den Vorteil, dass es weniger zeitaufwendig ist,

Tierversuche umgangen werden können und Antikörper produziert werden können, die in Wirbeltieren nicht immunogen sind (Liu *et al.*, 2002).

Die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit könnten einen Beitrag zur Entwicklung von neuen diagnostischen und therapeutischen Maßnahmen für die Herzinsuffizienz leisten, da die Untersuchungen ein besseres Verständnis der pathophysiologischen Veränderungen und deren zeitliche Entwicklung vermitteln könnten.

Der zweite Abschnitt der Arbeit fokussiert die autoimmune Form der DCM. Zahlreiche Befunde verdeutlichen, dass bei diesen DCM-Patienten Störungen der humoralen und zellvermittelten Immunität vorliegen (Klappacher *et al.*, 1993). Die Detektion von Autoantikörpern, die gegen spezifische kardiale Proteine gerichtet sind und die Aktivierung der zellulären Immunantwort mit Bildung von T-Lymphozyten aufgrund von inflammatorischen Prozessen (Limas *et al.*, 1989, 1995; Schulze *et al.*, 1990), weisen auf eine autoimmune Form der DCM hin.

In diesem Zusammenhang sollen potentielle Autoantigene bei der autoimmunen Form der DCM unter Verwendung einer cDNA-Expressionsbibliothek, kombiniert mit Protein-Mikroarrays identifiziert werden (Cahill, 2000; Lueking *et al.*, 2001). Wie bereits Robinson *et al.* bestätigt haben, sind Mikroarrays mit Autoantigenen eine geeignete Methode, um Autoantikörper von Patienten mit autoimmunen Erkrankungen zu ermitteln bzw. neue Autoantigene damit zu erfassen (Robinson *et al.*, 2002). Mit dieser Methode ist es möglich, Autoimmunerkrankungen bzw. ihre Subtypen anhand von vorhandenen spezifischen Autoantikörpern zu diagnostizieren, möglicherweise auch bei Fällen, wenn die klinischen Symptome heterogen sind oder wenn in der frühen Krankheitsphase die Symptome zum Teil noch uneindeutig sein können. Die Größe und Komplexität des Proteoms verlangt zudem die Anwendung von Hochdurchsatz-Methoden. Die Effektivität dieser Methoden wurde in der vorliegenden Arbeit berücksichtigt, indem eine rekombinante Expressionsbibliothek mit mehr als 37.800 exprimierenden Klonen zum Einsatz kam.