

Aus der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie der  
Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Untersuchungen zur Funktion und Bedeutung des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptids für  
die Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dipl.-Biotechnol. Dirk Langnickel

aus Salzgitter

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Riemekasten  
2. Prof. Dr. med. H. H. Peter  
3. Prof. Dr. med. B. Manger

Datum der Promotion: 17.07.2006

## Danksagungen

Der praktische Anteil dieser Arbeit entstand während meiner Tätigkeit als Mitarbeiter in der Forschungsgruppe von Frau Dr. Riemekasten (Oberärztin in der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie), deren Labor im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ) untergebracht ist.

Im Zusammenhang mit der Bestimmung von immunologischen Parametern beim SLE erfolgte eine wissenschaftliche und technische Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Hiepe, dem leitenden Oberarzt der Klinik für Rheumatologie und Klinische Immunologie und den Wissenschaftlern am DRFZ, wie Dr. R. Manz, Dr. A. Scheffold und Dr. T. Kamradt, deren Arbeitsgruppen Erfahrungen auf dem Gebiet der Charakterisierung muriner und humaner antigenspezifischer T- und B-Lymphozyten besitzen. Allen Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppen sei herzlich für die kollegiale Arbeitsatmosphäre gedankt. Besonderer Dank gilt Philipp Enghard, Swen Langer, Sven Kracker und Robert Tripmacher, die stets engagierte Diskussionspartner für die Erörterung fachlicher Fragen gewesen sind. Ebenso gilt mein Dank auch Claudia Klein für ihre Unterstützung bei der täglichen Laborarbeit.

Ich danke Herrn Prof. Dr. A. Radbruch, dem Leiter des Deutschen Rheumaforschungszentrums Berlin (DRFZ), für die Möglichkeit, Geräte, Materialien und Strukturen des DRFZ zu nutzen. Darüber hinaus schätzte ich die fachlichen Diskurse mit ihm und die konstruktive Kritik während der Entstehung der Publikationstexte sehr.

Den größten Dank möchte ich an Frau Dr. Riemekasten, meine Betreuerin, richten, da Sie mir in schwierigen Momenten bei der praktischen Erarbeitung und auch der schriftlichen Ausarbeitung der Dissertation stets Ansporn und Vorbild war. Sie stand mir mit Rat und ihrem großen fachlichen Erfahrungsschatz zur Seite. Ich danke ihr für den fruchtbaren Ideenaustausch und die konstruktive Kritik während der Entstehung der Inhalte dieser Dissertationsschrift und den zugrundeliegenden Veröffentlichungen.

Letztlich danke ich besonders meiner Frau Katrin für Ihre Geduld mit mir, wenn ich mir keine Zeit nehmen konnte, um gemeinsamen Aktivitäten und Lebensfreuden nachzugehen und ich manchmal auch die Aufmerksamkeit für alltägliche Dinge vermissen ließ, weil mich die Ausarbeitung der Dissertation beschäftigte.

## **Erklärung an Eides Statt**

Diese Dissertation ist von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfasst worden. Sie stellt auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten dar. Benutzte Hilfsmittel sowie die Literatur sind vollständig angegeben.

---

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung der Dissertation .....	1
1.1	Abkürzungsverzeichnis .....	1
1.2	Zusammenfassung .....	2
1.3	Einleitung .....	4
1.4	Zielstellung .....	5
1.5	Methoden .....	7
1.6	Ergebnisse .....	13
1.7	Diskussion .....	18
2	Publikationsliste .....	23
3	Publikationen in voller Länge .....	25
3.1	Identification and characterization of SmD1 <sup>83-119</sup> -reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies.....	25
3.2	Intravenous Injection of a D1 Protein of the Smith proteins postpones murine lupus and induces type 1 regulatory T cells.....	37
3.3	Induction of pathogenic anti-dsDNA antibodies is controlled on the level of B cells in non-lupus prone mouse strain. ....	46
3.4	The systemic and SmD1 <sup>83-119</sup> -autoantigen-specific cytokine memory of Th cells in SLE patients. ....	57
4	Anteil des Promovends an den Publikationen.....	66
5	Curriculum Vitae.....	70

# 1 Zusammenfassung der Dissertation

## 1.1 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
APZ	antigenpräsentierende Zelle
AS	Aminosäuresequenz
CD	Differenzierungsgruppe (international standardisierte Nomenklatur für Antigene auf Zelloberflächen)
CFDA-SE	5 (6)-Carboxyfluorescein Diacetat Succinylester
CWF1	Mausmodell: Tochtergeneration einer Kreuzung aus New Zealand White und Balb/c Mausstämmen
dsDNS	doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure (-moleküle)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
ELISPOT	Enzyme linked immunosorbent assay mittels Spotnachweis
HEL	Hühnereilysozym
IFN $\gamma$	Interferon <i>gamma</i>
IL	Interleukin
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NZ	Mausstamm namens New Zealand
NZB/W F1	Lupus-Mausmodell: Tochtergeneration einer Kreuzung aus New Zealand Black und New Zealand White Mausstämmen, synonym mit Abkürzung „NZB/W“ gebraucht
PMA	Phorbolmyrestataacetat
rh	rekombinant human
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SLEDAI	systemischer Lupus erythematodes Krankheitsaktivitätsindex
SmD1	Smith Protein D1
TGF $\beta$	transformierender Wachstumsfaktor <i>beta</i>
Th = TH	T-Helferlymphozyten, die sich nach der Art ihrer Zytokinprofile in Th0, Th1 und Th2-Zellen gliedern
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor <i>alpha</i>
Tr1	T-Zellen mit regulatorischer Funktion

## 1.2 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit faßt die Ergebnisse von vier Studien [1-4] zur Rolle der C-terminalen Sequenz (AS 83-119) des ribonukleären SmD1-Proteins in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes (SLE) zusammen. Mittels dieser Studien sollten Erkenntnisse über einen möglichen therapeutischen Nutzen dieses Peptids gewonnen werden. Hierzu wurden im Lupus-Mausmodell der New Zealand Black/White (NZB/W F1) das immunogene [Studie 1] und tolerogene Potential [Studie 2] des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid charakterisiert. An nichtautoimmunen Mausstämmen wurden Untersuchungen [Studie 3] zum Bruch einer Toleranz und dem Vermögen des Peptids zur Auslösung einer Induktion SLE-ähnlicher Symptome vorgenommen. In der vierten Studie [4] erfolgte die Anreicherung und der Nachweis SmD1-peptidreaktiver T-Zellen sowie die Charakterisierung des Zytokingedächtnisses in humanen Blutproben.

Zum einen wurden autoantigenspezifische T-Zellen durchflusszytometrisch im Lupus-Mausmodell nachgewiesen. Zum anderen konnten autoantigenspezifische T-Zelllinien generiert und phänotypisch und funktionell charakterisiert werden. Mit den erzielten Ergebnissen konnte die bisher vermutete Rolle eines ribonukleären Peptids, dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid, bei der Bildung von Anti-dsDNS-Antikörpern aufgezeigt werden, der zufolge SmD1<sub>83-119</sub>-reaktive T-Zellen eine Mittlerfunktion zur Verknüpfung der Antikörperbildung gegen SmD1<sub>83-119</sub> und dsDNS-Antikörper besitzen. Die Studienergebnisse geben Hinweise auf das ubiquitäre Vorkommen dieses Autoantigens auch in nichtautoimmunen Organismus von Mäusen und Menschen und deuten auf eine gestörte Immunantwort gegen dieses Peptid in autoimmunen Individuen hin. Die Bedeutung des SmD1-Peptids für die Lupuspathogenese wird zusätzlich durch die nachgewiesene Potenz unterstützt, in nichtautoimmunen Mausmodell die Induktion von lupusähnlichen Symptomen auslösen zu können.

Außerdem wurden erstmals autoantigenspezifische regulatorische T-Zellen des Tr1-Typs beim murinen Lupus identifiziert. Bei der funktionellen Charakterisierung dieser Tr1-Zellen wurde nachgewiesen, dass sie eine durch Anti-CD3-Antikörper induzierbare Proliferation bei naiven T-Zellen hemmen können. Schließlich wurden Hinweise dafür gefunden, dass auch autoantigenspezifische B-Zellen regulatorisch tätig sein können und Autoimmunität in genetisch prädisponierten Individuen verhindern. Dies geschieht auch, wenn eine adäquate T-Zellhilfe vorliegt.

Die erzielten Resultate der Immunisierungs- und Tolerisierungsstudien in den betrachteten Lupus-Mausmodellen sowie in *in vitro* Untersuchungen an Co-Kulturen von murinen und humanen B- und T-Lymphozyten erweitern das Verständnis zum Einfluß des ribonukleären SmD1-Proteins bzw. des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptides auf die Pathogenese des SLE. Abschließend kann festgestellt werden, dass die vorliegende Dissertation die bedeutende Funktion des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptids in Abhängigkeit von dessen Verwendung als Immunogen oder Tolerogen mit der Auslösung völlig gegensätzlicher T- und B-Zellinteraktionen darstellt und die maßgebliche Funktion SmD1-reaktiver T-Zellen für die Modifikation des Zytokinmusters und der Autoantikörperbildung herausstellt.

Insbesondere die aus den Tolerisierungsstudien gewonnenen Erkenntnisse geben Hinweise auf einen potentiellen therapeutischen Nutzen des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptides. Die Toleranzinduktion wird gegenwärtig in einer Vielzahl von Erkrankungen mit definierten Antigenen erprobt. Positive Ergebnisse auf rheumatologischem Gebiet konnten schon bei der kollageninduzierten Arthritis, der rheumatoiden Arthritis und der Uveitis erzielt werden. Für die Behandlung von SLE steht mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid potentiell ein gut charakterisiertes Tolerogen zur Verfügung.



### 1.3 Einleitung

Obwohl Anti-dsDNS-Antikörper anerkannterweise eine zentrale Rolle in der Pathogenese des SLE spielen, ist bisher unklar, welche Antigene zu ihrer Entstehung beitragen. Eine hohe Belastung mit körpereigener dsDNS reicht allein für die Auslösung des Autoimmunprozesses nicht aus. Dafür spricht, dass die Immunisierungen mit reiner Plasmid-DNS oder Säugetier-DNS im Tiermodell weder bei normalen Individuen noch bei Lupus-Mäusen zum Anstieg von Anti-dsDNS-Antikörper oder zur Akzeleration der Nephritis führt.

Anti-dsDNS-Antikörper einschließlich weiterer Autoantikörper, wie sie beim SLE auftreten, zeigen typische Eigenschaften einer T-zellabhängigen B-Zellantwort: die Reifung hochaffiner Autoantikörper im klinischen Verlauf über Hypermutationen, die Bildung von Gedächtniszellen und der Isotypwechsel von IgM- zu IgG-Antikörpern. T-Zellhilfe ist jedoch primär gegen Peptide gerichtet und nicht gegen dsDNS, weil DNS, soweit bekannt, nicht auf MHC-Klasse-II-Molekülen präsentiert wird.

In der Literatur ist beschrieben, dass auf der Suche nach potentiellen T-Zell-Antigenen für die Induktion von Anti-dsDNS-Antikörpern im Sinne eines Hapten-Carrier-Effektes Protein-DNS-Komplexe zur Immunisierung verwendet wurden. Hierbei konnten histonspezifische T-Zellen, die effiziente T-Zellhilfe zur Bildung hochaffiner, pathogener Antikörper gegen dsDNS, Chromatin, Histone und Nukleosomen gaben, identifiziert werden.

Erste Hinweise für die Bedeutung der C-terminalen Sequenz (AS 83-119) des ribonukleären SmD1-Proteins ergaben serologische Untersuchungen bei SLE-Patienten. Ungefähr 70% der Patientenserum wiesen Antikörper gegen das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid während nur 7% der Kontrollpersonen eine Reaktivität zeigten. Zudem wiesen Untersuchungen anderer Autoren eine Kreuzreaktivität zwischen den Antikörpern gegen dsDNS und SmD1 sowie eine Assoziation bei der Entstehung beider Antikörpertypen nach. In Untersuchungen der Arbeitsgruppe Riemekasten wurde Entsprechendes festgestellt: Patienten mit Anti-dsDNS-Antikörpern wiesen signifikant höhere Anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörpertiter auf als Patienten ohne Anti-dsDNS-Antikörper.

Indizien auf die Bedeutung SmD1-reaktiver T-Zellen für die Verknüpfung beider Antikörpertypen in der Lupuspathogenese konnten in früheren vor der Promotion entstandenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe gefunden werden (s. Einleitungen der Publikationen und Zielstellung der Dissertation).

## 1.4 Zielstellung

Aus der Literatur ist eine Vielzahl von identifizierten autoantigenen Strukturen bekannt, die durch Autoantikörper bei Patienten mit einem SLE erkannt werden. Die meisten zeigen eine Gemeinsamkeit hinsichtlich ihrer Herkunft: Es sind nukleäre Antigene, wie Proteinbestandteile der Nukleosomen (v.a. Histonproteine) und Polypeptide aus dem Splicingapparat. Vielfach ist die pathogenetische Bedeutsamkeit dieser einzelnen Autoantigene jedoch bislang nicht eindeutig zu belegen gewesen. Basierend auf den Vorarbeiten von Frau Dr. Riemekasten und ihrer Arbeitsgruppe hatte die hier vorliegende wissenschaftliche Arbeit die Aufgabe, die Funktion und die Bedeutung des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptids für die Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes (SLE) durch Studien an murinen Lupus-Modellen eingehender zu untersuchen und die Bewertung eines möglichen therapeutischen Nutzens des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptids abzuschätzen.

Da die Entwicklung von Autoantikörpern insbesondere gegen dsDNS-Moleküle die zentrale Rolle in Lupus einnimmt, wurde der Fokus der Studien auf Untersuchungen der Interaktionen zwischen den Haupteffektorzellen bei der Antikörperentstehung, den B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen), gelegt. Mittels der Charakterisierung der Zytokinprofile von Effektor-T-Zellen und der Autoantikörperbildung durch B-Zellen gegen dsDNS und das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid sollte die Aufklärung solcher Interaktionsmechanismen erfolgen.

In zwei Studien [1,3] sollten Hinweise auf die Richtigkeit einer Arbeitshypothese gefunden werden, der zur Folge die lupusspezifische Autoimmunität zunächst durch eine T-Zell-unabhängige Aktivierung von dsDNS-spezifischen B-Zellen über den B-Zellrezeptor oder den Toll-ähnlichen Rezeptor initiiert wird. In einem nachgeschalteten Prozess führen dann SmD1<sub>83-119</sub>-spezifische T-Zellen zur Expansion von Anti-SmD1<sub>83-119</sub>- und Anti-dsDNS-Antikörpern. Zudem sollte die Studie 3 das autoimmune Potential einer Immunisierung mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid zur Induktion von Lupussymptomen in den gesunden Mausstämmen CWF1 und Balb/c im Vergleich zum Lupus-Mausmodell NZB/W F1 untersuchen.

In einer dritten Studie [2] wurde die Eignung des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid als Tolerogen im murinen Lupus untersucht, um Hinweise auf eine Anwendung dieses Peptids für eine potentiellen SLE-Therapie zu evaluieren.

Eine weitere Studie [4] hatte die Charakterisierung der Zytokinprofile von T-Zellen des peripheren Blutkreislaufs von Gesunden und Lupus-Patienten und deren Modulation durch das SmD1-Peptid sowie deren Korrelation zu Lupussymptomen und zur Krankheitsaktivität

(SLEDAI) zum Thema. Dieser Ansatz wurde gewählt, da im SLE erhöhte Frequenzen aktivierter und affinitätsgereifter T-Zellen sowie autoreaktive T-Zellen gefunden werden, die vermutlich auf Änderungen in den T-Zelleffektorfunktionen gegenüber einem sehr begrenztem Autoantigenrepertoire beruhen. Die veränderten Effektorfunktionen können anhand der durch T-Zellen produzierten Zytokinmuster charakterisiert werden, so dass die zentrale Rolle der T-Zellhilfe seitens autoantigenspezifischer T-Zellen in der Lupuspathogenese besser verstanden werden kann.

## 1.5 Methoden

Die Studien wurden überwiegend in zwei in der humanen Lupus-Forschung anerkannten NZ-Mausmodellen vorgenommen, die beide über den gleichen MHC-Haplotyp verfügen. Zum einen wurde der NZB/W F1-Stamm gewählt, da er gut charakterisierte lupusähnliche Symptome aufweist. Zum anderen fiel die Wahl auf den CWF1-Stamm, der keine derartigen Symptome ausprägt, aber den gleichen MHC-Haplotyp ausbildet. Zudem erfolgten die Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe Riemekasten in beiden Stämmen.

Der Fokus wurde auf die Interaktionen zwischen T- und B-Zellen unter dem Einfluß des Peptids gelegt, da diesen die zentrale Rolle in der Lupuspathogenese zukommt. Hierbei wurden Versuche entworfen, die einen Vergleich der bei spontan entwickelter Immunität ablaufenden Interaktionsmechanismen mit denen bei Immunisierung und Tolerisierung ermöglichen sollten. Die Isolierung der Zellen erfolgte dabei in der Regel aus dem Milzgewebe der Versuchstiere, in seltenen Fällen wurde Lymphknotengewebe verwendet. Zellen humanen Ursprungs wurden aus dem Blut von Versuchspersonen isoliert.

### **Publikation 1: Identification and characterization of SmD1<sup>83-119</sup>-reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies.**

Es wurden drei unterschiedliche *in vitro* Experimente (B-D) zur Untersuchung des Einflusses einer Stimulation mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid auf murine T-Lymphozyten konzipiert, um die Entstehung von T-Zellhilfe, die zur Bildung von Plasmazellen mit IgG-Autoantikörperspezifitäten gegen dsDNS und SmD1<sub>83-119</sub> führt, zu ergründen sowie den Einfluß sezernierter Effektorzytokine zu beurteilen. Das Zytokinprofil naiver T-Zellen wird durch die primäre Antigenstimulation definiert. Wiederholte Stimulationen mit dem entsprechenden Antigen resultieren in der Manifestierung des definierten intrazellulären und sezernierten Zytokinprofils, dem sogenannten Zytokinedächtnis. Spätere Stimulationen können antigenunabhängig erfolgen und bewirken dennoch das Abrufen des definierten Zytokinprofils. IL-2 oder Phorbolmyrestataacetat (PMA)/Ionomycin stellen Beispiele solcher unspezifischen Abrufstimulanzen dar.

#### **A) Gewinnung definierter Zellfraktionen durch Magnetic Cell Sorting (MACS)**

Zur Gewinnung von reinen T- und B-Zellfraktionen wurden Versuchstiere die Milzen und Lymphknoten entnommen. Nach Vereinzeln der Gewebezellen mittels Siebpassage und Erythrozytenlyse wurden die erhaltenen Zellsuspensionen mit Antikörpern versetzt, die an

spezifische Oberflächenmoleküle des gewünschten Zelltyps binden. Für die Isolierung muriner T-Zellen wurden Anti-CD90-Antikörper und für murine B-Zellen Anti-B220-Antikörper verwendet. Diese Antikörper sind zusätzlich mit einem magnetischen Partikel kovalent verbunden. Beim Passieren einer speziellen Trennmatrix, die in einem statischen Magnetfeld positioniert wird, werden die antikörpermarkierten Zellen durch Magnetismus in dieser zurückgehalten. Nach Entfernung der Matrix aus dem Magnetfeld können die Zielzellen mit einer Pufferlösung aus der Matrix eluiert werden.

### **B) Nachweis antikörperbildender Plasmazellen mit Spezifitäten gegen SmD1<sub>83-119</sub> und dsDNS und sezernierter Zytokine in Co-Kulturen muriner T- und B-Zellen unter Einfluß einer SmD<sub>83-119</sub>-Stimulation**

Co-Kulturen mit T-Zellen aus dem Lymphknoten- und Milzgewebe unterschiedlich alter Mäuse, die unimmunisiert oder SmD1<sub>83-119</sub>-immunisiert waren, und B-Zellen aus dem Milzgewebe nephritischer Mäuse wurden unter Stimulation von SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid oder Kontrollantigenen (z.B. randomisiertes SmD1-Peptid) kultiviert. Nach 5 Tagen erfolgte die Untersuchung auf autoantikörperbildende Plasmazellen und die Ermittlung von sezernierten Zytokinprofilen mittels ELISPOT-Assays. B-Zelleinkulturen dienten als zusätzliche Kontrollansätze. Des Weiteren erfolgte der IgG-Antikörpernachweis in Kulturüberständen gegen SmD1<sub>83-119</sub> und dsDNS mittels ELISA.

### **C) Analyse von Zelltypanteilen und intrazellulärer Zytokinprofile von T-Zellen mittels Durchflußzytometrie**

T-Zellen wurden aus dem Milzgewebe von unmanipulierten und SmD1<sub>83-119</sub>-immunisierten Mäusen hinsichtlich der Veränderung ihres Zytokinprofils in Abhängigkeit von der Stimulation mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid oder Kontrollantigenen und Stimulanzen (z.B. Anti-CD3-Antikörper, PMA/Ionomycin) nach Kurzzeitinkubation (6h) untersucht. Während der Stimulationsphase wurden die T-Zellen nach 3 Stunden durch den Zusatz von Brefeldin A an der Sezernierung von Zytokinen gehindert, so dass eine intrazelluläre Anreicherung der Zytokine stattfand. Zum Nachweis wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern markiert, die Spezifitäten für charakteristische Zelltypoberflächenmoleküle und Zytokine aufwiesen. Damit die gegen die Zytokine gerichteten Antikörper ins Zellinnere eindringen und durchflußzytometrisch detektiert werden konnten, erfolgte die Perforierung der Zellwände mit einem speziellen Reagenz.

### **D) Etablierung und Charakterisierung von SmD1<sub>83-119</sub>- und Ovalbumin<sub>323-339</sub>-Peptid-(OVA<sub>323-339</sub>-Peptid) reaktiven Langzeit-T-Zelllinien**

Die Frequenzen autoantigenspezifischer Lymphozyten ist auch in autoimmunen Individuen sehr gering. Zur genauen Charakterisierung autoantigenspezifischer T-Zellen, wie z.B. SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiver T-Zellen ist daher eine *in vitro* Anreicherung solcher Zellen sinnvoll. Entsprechende Methoden zur Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen sind in der Literatur beschrieben. Nach Optimierung der Kultivierungsbedingungen gelang die Etablierung von SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiver T-Zellen aus unbehandelten NZB/W F1-Mäusen (Isolierung s. A) durch einen alternierenden Stimulationszyklus mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid, IL-2 und anschließender Ruhephase sowie unter Anwesenheit von teilungsunfähigen antigenpräsentierenden Zellen (bestrahlte APZ). Die Überlebensdauer dieser Zelllinien betrug 5 Monate. Als Kontrollzelllinien wurden in entsprechender Weise OVA<sub>323-339</sub>-Peptid-spezifische T-Zellen kultiviert. Eine Charakterisierung der T-Zelllinien erfolgte anhand der Ermittlung der T-Zellhilfefunktion zur Entstehung autoantikörperbildender Plasmazellen nach SmD1<sub>83-119</sub>-Stimulation mittels ELISPOT-Assay sowie der intrazellulären Zytokinprofile der T-Zellen nach antigenunabhängiger Stimulation durch Anti-CD3-Antikörper- oder PMA/Ionomycin (s. C).

#### **E) Beurteilung einer Nierengewebsschädigung**

Als gängiger Parameter hierfür gilt der Proteinnachweis im Urin, der mittels kommerziell erhältlicher Teststreifen erfolgte. Zur genaueren Analyse manifestierter Nierengewebsschädigungen können immunhistologische Methoden genutzt werden. Entsprechende Untersuchungen im Rahmen der Publikationen [2] und [3] sind durch einen Kooperationspartner durchgeführt worden.

#### **Publikation 2: Intravenous Injection of a D1 Protein of the Smith proteins postpones murine lupus and induces type 1 regulatory T cells.**

Zur Ermittlung der tolerogenen Wirkung des SmD1<sub>83-119</sub> Peptids wurden 5 verschiedene Experimente (F-J) mit dem Tiermodell der NZB/W F1-Mäuse durchgeführt:

#### **F) Auswirkung der Hochdosistolerisierung mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid auf das Überleben junger NZB/W F1-Mäusen**

Diese Tolerisierungsstudie wurde an jungen NZB/W F1-Mäusen (6-10 Wochen) durchgeführt, da diese noch keine manifestierte Lupussyptomatik besaßen. Den Versuchstieren wurde über 5 Monate hinweg einmal monatlich intravenös SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid verabreicht, während Kontrollgruppen physiologische Natriumchloridlösung oder randomisiertes Peptid erhielten. Zur Beurteilung der Lupusmanifestation wurden die Anti-dsDNS-, Anti-SmD1<sub>83-119</sub>-

Antikörper- und Proteinurieentwicklung sowie die Überlebensrate bestimmt. Zudem wurde das Nierengewebe 6 Monate alter Versuchstiere immunhistologisch untersucht.

#### **G) Untersuchung der Rolle der T-Zellhilfe bei der Anti-dsDNS-Antikörperproduktion nach Tolerisierung mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid**

Die Versuchstiere erhielten zunächst eine einmalige Grundtolerisierung. Um zusätzlich den Einfluß eines nachfolgenden messbaren Kontaktes mit dem Autoantigen im Rahmen einer Lupusmanifestation im autoimmunen Organismus zu simulieren, wurden einige Tiere 1 und/oder 3 Wochen nach Tolerisierung mit Peptid subkutan immunisiert. Kontrollgruppen erhielten nach gleichem Behandlungsschema physiologische Natriumchloridlösung (Saline) oder randomisiertes Peptid. Die T-Zellisolierung erfolgte aus dem Milzgewebe eine Woche nach der letzten Immunisierung (s. A). Zur Untersuchung der T-Zellhilfe wurde ein Teil der gewonnenen T-Zellen mit B-Zellen nephritischer Mäuse in ELISPOT-Kulturen kultiviert. Der andere Teil wurde nach einer Kurzzeitstimulationen (6h) hinsichtlich der intrazellulären Zytokinprofile analysiert (s. C).

#### **H) Zelltransferexperimente zum Nachweis regulatorischer Funktion von T-Zellen aus tolerisierten NZB/W F1-Mäusen**

T-Zellen hochdosistolerisierter oder mit Saline (s. G) behandelter pränephritischer Mäuse wurden isoliert (s. A) und in unbehandelte Empfängertiere intravenös übertragen. Einer dritten Gruppe wurde nur Saline injiziert. Anschließend erfolgte ein Überlebensmonitoring der Empfängermäuse mit regelmäßiger Bestimmung der serologischen Autoantikörpertiter gegen SmD1<sub>83-119</sub> und dsDNS mittels ELISA.

#### **I) Generierung von Kurzzeit-T-Zelllinien mit regulatorischem Potential (IFN $\gamma$ <sup>+</sup>/IL-10<sup>+</sup>)**

Die Spendermäuse der entsprechenden T-Zellen erhielten eine SmD1<sub>83-119</sub>-Grundtolerisierung und wurden nachfolgend zweimal subkutan mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid immunisiert (s. A). Zwei Kontrollgruppen erhielten statt des Peptids intravenös physiologische Natriumchloridlösung und anschließend zwei subkutane Immunisierungen mit Peptid bzw. zwei subkutane Gaben von Natriumchloridlösung. Eine Woche nach der letzten Injektion wurden T-Zellen aus den Milzgeweben gewonnen und *in vitro* unter Verwendung eines modifizierten Protokolls nach *Barrat et al.* kultiviert. Diesen Wissenschaftlern gelang es, *in vitro* aus murinen und humanen CD4<sup>+</sup>-T-Zellpopulationen durch die Verwendung der immunsuppressiven Substanz Dexamethason und Vitamin D3 regulatorische T-Zellen zu generieren. In der vorliegenden Arbeit wurden die T-Zellen in Anwesenheit bestrahlter APZ (s. Publikation 1) unter Einfluß verschiedener Stimulanzen (Antikörper gegen CD3 und CD28, Vitamin-D3, Dexamethason)

und SmD1<sub>83-119</sub> für 4 Tage kultiviert. Nach 4-tägiger stimulanzenfreier Kultivierungsphase mit IL-2-angereichertem Medium folgte die abschließende Testung auf regulatorische Potentiale der verschiedenen Kulturen im Proliferationsinhibitionstest. Regulatorische T-Zellen können in Anwesenheit von teilungsunfähigen APZs naive T-Zellen (CD4<sup>+</sup>/CD62L<sup>+</sup>) an einer Anti-CD3-induzierten Zellteilung hindern. Um diesen Effekt nachzuweisen, wurden die zu untersuchenden T-Zellen einmalig mit einer Markersubstanz, CFDA-SE, die sich in das Desoxyribonukleinsäuregerüst sich teilender Zellen einlagert, kurzzeitig inkubiert. Die Zellen jeder neuen Generation enthalten weniger Markersubstanz. Im Durchflußzytometer kann die Abnahme der Markersubstanz anhand einer Abfolge von Signalen, welche einzelnen Generationen entsprechen, detektiert werden.

#### **J) Generierung einer Langzeit-T-Zelllinie mit regulatorischem Potential**

Das experimentelle Vorgehen gleicht demjenigen in der 1. Publikation (Methode C). Jedoch wurden die T-Zellen nicht aus unbehandelten, sondern aus SmD1<sub>83-119</sub>-immunisierten Mäusen verwendet (Isolierung s. A). Neben der Bestimmung des Zytokinprofils und der Fähigkeit zur Antikörperhilffunktion im Vergleich zu anderen T-Zelllinien wurde auch die Zellteilungsaktivität charakterisiert, die durch Stimulation mit SmD1<sub>83-119</sub> und mit anderen Kontrollantigenen auslösbar ist. Die Zellteilungsaktivität wurde auch hier mittels der Markersubstanz, CFDA-SE, sichtbar gemacht (s. I).

#### **Publikation 3: Induction of pathogenic anti-dsDNA antibodies is controlled on the level of B cells in non-lupus prone mouse strain.**

Ziel der Arbeit war der Vergleich der Lupussymptomentwicklung in zwei gesunden Mausstämmen (CWF1 und Balb/c) gegenüber dem Lupus-Mausmodell NZB/W F1 nach Immunisierung mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid. Da eine Immunantwort entscheidend durch die Art der antigenpräsentierenden MHC-Moleküle mitbestimmt wird, wurde der CWF1-Mausstamm als nichtautoimmuner Stamm gewählt, da dieser den gleichen MHC-Haplotyp (H-2<sup>d/z</sup>) wie der Lupus-Mausstamm trägt. Der Balb/c-Mausstamm hingegen weist den MHC-Haplotyp H-2<sup>d/d</sup> auf und erfüllt damit den Zweck eines genetisch unabhängigen Kontrollstammes.

#### **K) Immunisierungsstudien mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid zum Monitoring von Lupussymptomen**

CWF1-, Balb/c- und NZB/W F1-Mäuse erhielten in 14-tägigem Abstand eine Grundimmunisierung und eine Boosterung mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid. CWF1-Kontrollgruppen wurden nach entsprechendem Schema physiologische Natriumchloridlösung, Hühnereilysozym-Peptid (HEL-Peptid), SmD1<sub>83-119</sub> mit dsDNS-Zusatz oder randomisiertes SmD1-Peptid



verabreicht. NZB/W F1- und Balb/c-Kontrollgruppen erhielten nur randomisiertes SmD1-Peptid. Zur Messung der Reaktivität gegenüber den verabreichten Agenzien wurde die Entwicklung von SmD1<sub>83-119</sub>- und Anti-dsDNS-Antikörper im Serum und von Proteinurie im Urin bestimmt.

#### **L) Ermittlung der Hilfefunktion von CWF1-T-Zellen unter Einfluß von SmD1<sub>83-119</sub>**

Charakterisiert wurde die Hilfefunktion von T-Zellen, die aus dem Milzgewebe von SmD1<sub>83-119</sub>-immunisierten Mäusen und von salinebehandelten Kontrollmäusen gewonnen wurden (s. A). Hierzu wurden 5-tägige Co-Kulturen aus T- und B-Zellen unter Stimulation von SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid angelegt, wobei die Zellen der verschiedenen Mausstämme in syngenen und nichtsyngenen Ansätzen miteinander kombiniert wurden. Durch ELISPOT-Analysen wurde die Hilfefunktion der T-Zellen beurteilt (s. B).

#### **Publikation 4: The systemic and SmD1<sup>83-119</sup>-autoantigen-specific cytokine memory of Th cells in SLE patients.**

#### **M) Anreicherung von SmD1<sub>83-119</sub>-spezifischen T-Zellen aus Blutproben von Lupus-Patienten und gesunden Spendern zur Erstellung einer Korrelation des T-Zellen-Zytokinprofils zur Autoantikörperentwicklung gegen dsDNS und SmD1<sub>83-119</sub> sowie zur Krankheitsaktivität (SLEDAI)**

Die Studie wurde mit Blutproben aus 37 Lupus-Patienten und 14 gesunden Spendern durchgeführt. Alle Lupus-Patienten erfüllten die Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) und waren zusätzlich auch gemäß des SLEDAI hinsichtlich der ausgeprägten SLE-Symptome charakterisiert.

Die Fraktionen der peripheren Blutmonozyten (PBMZ) wurden mittels Ficollgradient aus Vollblut gewonnen. Zur Anreicherung SmD1<sub>83-119</sub>-spezifischer (autoantigenspezifischer) T-Helferzellen wurden die PBMZ-Fraktionen 22 Tage unter Zugabe von SmD1<sub>83-119</sub>-Antigen, rh-IL-2 und gammastrahleninaktivierten, teilungsunfähigen Füllzellfraktionen kultiviert. Die Kontrollansätze (Mediumkontrolle) ohne Antigenstimulation erhielten nur Zugaben an IL-2 und Füllzellfraktionen. Die Zytokinprofile wurden am Tag der Isolierung (*ex vivo*) und zum Kultivierungsende intrazellulär in den T-Zellen bestimmt. Hierzu erfolgte zunächst eine Kurzzeitstimulation (6h) der Kulturen mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid im Fall der *ex vivo* Bestimmung und mit PMA/Ionomycin für die Bestimmung am Kultivierungsende (s. C).

## 1.6 Ergebnisse

In der ersten und dritten Studie wurden Hinweise zur Unterstützung der Arbeitshypothese gefunden, der zur Folge die lupusspezifische Autoimmunität zunächst durch Plasmazellen mit einer Spezifität für Anti-dsDNS-Antikörper initiiert werden kann und eine nachfolgende Ausbreitung im Organismus unter Beteiligung autoantigenspezifischer T-Zellen wie SmD1-spezifische T-Zellen geschieht. Die Ergebnisse der Untersuchungen zum Potential des SmD1-Peptids zur Induktion in nichtautoimmunen Individuen [ebenfalls Studie 3] bekräftigen die pathogenetische Bedeutung dieses Peptids beim SLE. Die Studie an Blutproben von SLE-Patienten und gesunden Probanden [4] ließ erkennen, dass diese bedeutende Rolle des Peptids auch im humanen SLE vorliegen könnte. Demgegenüber deuten die Toleranzstudien [2] aber auch den Nutzen einer spezifischen SmD1<sub>83-113</sub>-Peptidbehandlung für den Verlauf einer SLE-Erkrankung an.

Die *in vitro* Untersuchungen in Immunisierungsstudien [1] im autoimmunen Lupus-Mausmodell, NZB/W F1, erbrachten den Nachweis, dass das Hilfspotential von T-Zellen solcher Mäuse für die Autoantikörperbildung durch eine Stimulation mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid modifizierbar ist. Kulturansätze von T- und B-Zellen aus immunisierten und nichtimmunisierten Mäusen reagierten gleichermaßen mit einem signifikanten Anstieg der Anti-dsDNS- und Anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörperbildung auf eine SmD1<sub>83-119</sub>-Stimulation. In Kontrollansätzen wurden keine signifikanten Erhöhungen beobachtet. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass eine Abhängigkeit vom Immunisierungsstatus besteht, da Zellansätze immunisierter Tiere höheres Vermögen zur IgG-Antikörperbildung zeigten, was durch eine Peptidstimulation *in vitro* noch zusätzlich gesteigert wurde. Entsprechendes konnte auch bei immunisierten nichtautoimmunen CWF1-Mäusen beobachtet werden [3]. Zudem lag eine zeitliche Abfolge beider Antikörperbildungsprozesse vor, da das Auftreten einer Anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörperbildung etwas verzögert gegenüber der Anti-dsDNS-Antwort nachgewiesen werden konnte [1,3].

Die Ergebnisse der Studie [3] erbrachten zusätzlich die Erkenntnis, dass durch eine SmD1<sub>83-119</sub>-Immunsierung auch in nichtautoimmunen CWF1-Mäuse eine signifikante Induktion von Anti-SmD1- und Anti-dsDNS-Antikörper sowie eine beginnende Nephritis erzeugt werden kann. Einige Mäuse zeigten sogar einen diffusen Haarausfall. Dagegen führte die Immunisierung eines zweiten nichtautoimmunen Mausstammes, Balb/c, ebenso wenig wie die Kontrollgruppenimmunisierungen zu einer Autoantikörper- oder Nephritisinduktion. Die *in*

*in vitro* Experimente ergaben außerdem den eindeutigen Nachweis von Anti-dsDNS- und SmD1<sub>83-119</sub>-spezifischen B-Zellen in CWF1-Mäusen. Dabei war zu erkennen, dass eine Immunisierung die Zahl der *in vitro* nachzuweisenden autoantikörperproduzierenden Plasmazellen erhöhte. Denn es wurde eine Zunahme an Plasmazellen unter co-kultivierten T- und B-Zellen dann gefunden, wenn die T-Zellen oder beide Zelltypen von SmD1<sub>83-119</sub>-immunisierten Mäusen stammten. Dieses Ergebnis unterstützt die für SmD1<sub>83-119</sub>-reaktive T-Helferzellen vermutete prominente Rolle im Lupus. Erfolgte die Restimulation zusätzlich zum Peptid gleichzeitig auch mit dsDNS, so nahm die Zahl der Anti-dsDNS-Spots weiter zu. Eine Differenzierung zu Plasmazellen blieb aus, wenn B-Zellen des nichtautoimmunen CWF1-Stammes allein kultiviert wurden.

Bezüglich der Hilfefunktion für die Anti-dsDNS-Antikörperproduktion stellte sich heraus [3], dass T-Zellen der nichtautoimmunen CWF1-Mäuse eine gleich gute oder gar eine bessere Hilfefunktion gegenüber NZB/W-B-Zellen ausübten als die T-Zellen des autoimmunen Mausstammes selbst. Hierbei schien jedoch die Restimulation mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid von großer Bedeutung zu sein. Im Gegensatz dazu zeigten NZB/W-T-Zellen keine entsprechende Eigenschaft in einer Interaktion mit CWF1-B-Zellen.

Die Fähigkeit der B-Zellen, sich *in vitro* zu antikörpersezernierenden Plasmazellen zu entwickeln, war stammabhängig sehr verschieden. B-Zellen der nichtautoimmunen CWF1-Mäuse zeigten in Einzelzellkulturen ohne das Vorhandensein von T-Zellen keine spontane Antikörperbildung, während bei NZB/W-B-Zellen eine solche in geringer Zahl nachweisbar war. Tendenziell konnte auch in den Co-Kulturen Gleiches beobachtet werden: Autoantikörperspezifische Plasmazellen wurden in Kulturen mit B-Zellen aus CWF1-Mäusen in geringerer Anzahl trotz adäquater Hilfefunktion syngener T-Zellen nachgewiesen als in Kulturen mit NZB/W F1-B-Zellen.

Neben der Beeinflussung der Autoantikörperbildung zeigten Zytokin-ELISPOT-Analysen [1], dass als weiterer Parameter für das autoimmune Geschehen im Lupus auch die Zytokinprofile muriner T-Zellen durch das SmD1-Peptid signifikant verändert wurden. Altersunabhängig ergab sich bei T-Zellen bedingt durch eine SmD1<sub>83-119</sub>-Immunisierung eine gesteigerte Expression der proinflammatorischen Zytokine von Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und Interleukin-2 (IL-2) im Vergleich zu Kontrolltieren. Altersabhängig erwies sich dagegen eine Zunahme an T-Zellen mit Produktion von IL-4-, IL-10- und transformierendem Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF $\beta$ ), da derartige Veränderungen nur in jungen pränephritischen Mäusen beobachtet werden konnten. Erst durchflußzytometrische Untersuchungen machten es möglich, die anfänglich nur

in ELISPOT-Analysen nachgewiesenen SmD1-peptidbedingten Zytokinprofiländerungen T-Zellen zu zuordnen und damit die Existenz der SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiver T-Zellen im murinen Modellsystem zu bestätigen [1,2].

Ansatzweise konnte auch für den menschlichen Organismus die Existenz solcher SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiver T-Zellen beobachtet werden. In *in vitro* Experimenten mit humanen peripheren Blutmonozyten [4] war nach Peptidstimulation eine Anreicherung SmD1-reaktiver T-Zellen möglich, was an einer Zunahme an T-Zellen abgelesen werden konnte, die als positiv für den Aktivierungsmarker CD25 identifiziert wurden. Die Auswertung der ermittelten Zytokinprofile ergab, dass durch die *in vitro* Stimulation mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid ein sehr heterogenes Zytokinmuster innerhalb der T-Zellhelferpopulationen erzeugt wurde. Deutliche Unterschiede zu den Kontrollkulturen ohne SmD1<sub>83-119</sub>-Peptidstimulation waren nicht erkennbar. Tendenziell konnte jedoch eine Erhöhung der Anteile IFN $\gamma$ - und IL-4-exprimierender T-Zellen nach SmD1<sub>83-119</sub>-Peptidstimulation beobachtet werden.

Deutlicher trat jedoch hervor, dass das Zytokingedächtnis der T-Zellen die Krankheitsaktivität (SLEDAI) und den Status der humoralen Antwort zu reflektieren scheint. Ein Anstieg des SLEDAI bei Patienten ließ eine Korrelation zur Vermehrung von T-Zellfraktionen mit der Expression proinflammatorischer Zytokine wie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  nach einer 22-tägigen Kultivierung unter SmD1-Peptidstimulation erkennen. So wurden erhöhte Frequenzen IFN $\gamma$ -exprimierender T-Zellen positiv mit beiden Serumantikörpern gegen SmD1<sub>83-119</sub> und dsDNS korreliert. Außerdem war ein Anstieg der Anteile TNF $\alpha$ -positiver T-Zellen in SLE-Patienten mit aktivem SLEDAI und erhöhten Serumtitern für Anti-dsDNS-Antikörpern erkennbar. Bezüglich der IL-10-Expression wurde jedoch eine umgekehrte Korrelation zur Krankheitsaktivität festgestellt. Außerdem wiesen die Überstände von Blutmonozytenkulturen, in denen ein T-Zellenzytokingedächtnis für IL-10 nachgewiesen wurde, geringe Autoantikörpertiter auf. Beide zuletzt angeführten Ergebnisse können als Hinweis interpretiert werden, dass IL-10-exprimierende T-Zellen der Pathogenese des SLE entgegenwirken.

Eindeutigere Hinweise auf das tolerogene Potential des SmD1-Peptids wurden in der Tolerisierungsstudie [2] zum murinen Lupus erzielt. Als intravenös verabreichtes Hochdosisimmunogen induziert das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid im Lupus-Mausmodell eine signifikante Verzögerung und Reduktion der Autoantikörperproduktion sowie einen Anstieg der Überlebensrate gegenüber Kontrolltieren. Zudem wurden keine erhöhten serologischen

Ureatiter, nur eine milde Proteinurie und deutlich geringere Nierengewebschädigungen in den tolerierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollgruppen gefunden.

Die ELISPOT-Resultate unterstrichen das Ergebnis der Überlebensstudie und zeigten, dass T-Zellen aus tolerierten Mäusen eine geringere Hilfeleistung zur Bildung Anti-dsDNS-spezifischer Plasmazellen gaben als T-Zellpopulationen aus Kontrollmäusen. Eine nachfolgende Immunisierung konnte bei tolerierten Tieren diese Toleranz der T-Zellen nicht aufheben.

Die T-Zellen in tolerierten Mäusen ließen altersabhängig unterschiedliche regulatorische Potentiale erkennen. In jungen tolerierten Mäusen (7 Wochen) wurden T-Zellen gefunden, die eine erniedrigte IFN $\gamma$ , IL-4-, IL-2-, IL-10- und eine erhöhte TGF $\beta$ -Produktion besaßen. Andererseits wurde in älteren tolerierten Mäusen (14 und 29 Wochen) eine zunehmende Fraktion von IFN $\gamma$ - und IL-10-doppelpositiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen nachgewiesen. Damit ähnelte das Zytokinprofil dieser Zellen stark dem regulatorischer T-Zellen vom Typ-I (Tr1). In gleichaltrigen unmanipulierten Mäusen hingegen waren diese doppelpositiven T-Zellen nur in sehr geringer Zahl zu detektieren und nahmen zudem noch mit Zunahme der entzündlichen Prozesse im Nierengewebe ab.

Der positive Effekt einer Hochdosistolerisierung mit SmD1-Peptid konnte auch in einem Zelltransferexperiment [2] nachgewiesen werden. Nach dem Transfer von T-Zellen aus tolerierten Mäusen in unmanipulierte Empfängermäuse zeigten diese eine Verzögerung in der Anti-dsDNS-Antikörpertiterentwicklung und eine längere Überlebenszeit als Tiere von den Vergleichsgruppen, die keine T-Zellen oder T-Zellen aus salinebehandelten Spendermäusen erhalten hatten.

In Studie 2 gelang erstmalig nach Behandlung der Versuchstiere mit SmD1<sub>83-119</sub> die Generierung SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiver Kurzzeit- und Langzeit-T-Zelllinien murinen Ursprungs. Die T-Zellen einiger dieser Zelllinien besaßen charakteristische Merkmale regulatorischer T-Zellen (Tr-Zellen), wie die kombinierte Expression der Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 zusammen mit der Sekretion von IFN $\gamma$  und IL-10.

Unter den etablierten Kurzzeit-T-Zelllinien aus den SmD1<sub>83-119</sub> tolerierten Mäusen zeigten mehrere verschiedenartig stimulierte Kulturen diese oben genannten Charakteristika von Tr-Zellen verbunden mit der Fähigkeit, die Anti-CD3-aktivierte Zellteilung von naiven T-Zellen zu stoppen. Eine Aufhebung der Hemmwirkung wurde erst durch eine starke Verschiebung des Zellverhältnisses mit einem Übergewicht von 9:1 an naiven T-Zellen möglich. Hierzu gehörten T-Zellen aus Kulturen, die mit Vitamin-D3 und Dexamethason sowie mit Antikörpern gegen

CD3 und CD28 stimuliert worden waren, aber auch solche, deren Stimulation nur allein mit SmD1<sub>83-119</sub> und IL-2 erfolgte. Diese Ergebnisse stellten erstmalig die Übertragbarkeit des *Barrat et al.* Protokolls (s. Methode I) auf die Generierung regulatorischer T-Zellen im Lupus unter Einfluß des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptids heraus. Die Bedeutung der Tolerisierung der Versuchstiere wird beim Vergleich mit entsprechenden Kulturen aus Tieren ohne Immunisierung deutlich. Diese besaßen keinerlei Potential zur Hemmung der Proliferation bei naiven T-Zellen trotz gleicher Kulturbedingungen.

Auch die T-Zellen einer der etablierten Langzeit-T-Zelllinien [2] waren für die Oberflächenmarker CD4 und CD25 positiv und doppelpositiv für die Sekretion von IFN $\gamma$  und IL-10. Diese Zelllinie entstammte aus SmD1-immunisierten Tieren und zeigte eine spezifische Proliferation nach SmD1<sub>83-119</sub>-Stimulation nicht aber gegenüber Kontrollpeptiden. Trotz ihrer SmD1<sub>83-119</sub>-Reaktivität zeichnete sich diese T-Zelllinie durch ihr geringes Potential, zur Autoantikörperbildung gegen dsDNS und SmD1<sub>83-119</sub> beizutragen, aus. Zum einen erbrachten Antikörper-ELISPOT-Analysen trotz Stimulation mit SmD1<sub>83-119</sub> nur geringe Spotzahlen für Plasmazellen mit Spezifitäten gegen SmD1 und dsDNS, zum anderen wiesen Kulturüberstände dieser Zelllinie nur eine geringe autoimmune Reaktivität auf, wodurch die Regulatorfunktion dieser T-Zellen bestätigt wurde.

Demgegenüber unterstützte eine in der ersten Studie etablierte SmD1<sub>83-119</sub>-reaktive T-Zelllinie die Plasmazellenbildung und damit die Autoantikörperproduktion. Mit der Co-Expression von IL-4 und IFN $\gamma$  wies diese T-Zelllinie ein eindeutiges Merkmal von T-Helferzellen auf, deren Wirkung beim murinen Lupus proinflammatorischer Natur ist.

## 1.7 Diskussion

Frühere *in vivo* Experimente deuteten zwar bereits an, dass SmD1<sub>83-119</sub>-spezifische T-Helferzellen eine entscheidende Rolle in der SLE-Pathogenese besitzen, doch nun wurden Belege dafür gefunden, dass dieser Einfluß über die Modifikation der Antikörperbildung und des Zytokinprofilgleichgewichts unter T-Helferzellpopulationen ausgeübt wird [1,3]. Zum einen wurden in *in vitro* Kulturen ohne T-Zellen trotz Peptidstimulation nur wenige dsDNS- und SmD1<sub>83-19</sub>-spezifische Plasmazellen gebildet [3]. Zum anderen zeigten sich nach einer SmD1-Peptidimmunisierung in Versuchstieren in einem früheren Lebensalter als bei Kontrolltieren ein Anstieg in der Frequenz IL-4- und IFN $\gamma$ -produzierender T-Zellen [1] sowie eine Beschleunigung der Autoantikörperbildung gegen dsDNS und eine schneller fortschreitende Proteinurie. Die durchflußzytometrische Untersuchung der Zytokinprofile einer SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiven T-Zelllinie ergab eine Co-Expression von IL-4 und IFN $\gamma$ , also einem gemischten Th1- und Th2-Charakter, der in Fachkreisen als ein für T-Helferzellen typisches Muster (Th0) anerkannt ist [1]. Die Existenz eines solchen Zelltyps könnte im SLE pathogenetisch bedeutsam sein: Die Expression von IFN $\gamma$  bewirkt das Fortschreiten des entzündlichen Geschehens und die Sekretion von IL-4 steht im Einklang mit dem beobachteten gesteigerten Hilfepotential dieser T-Zellen für die Bildung von Autoantikörpern. Die Assoziation von Serumantikörpern gegen SmD1<sub>83-119</sub> und dsDNS mit T-Zellen mit einem IFN $\gamma$ -Gedächtnis bei Lupus-Patienten unterstreicht die Bedeutung dieses proinflammatorischen Zytokins beim SLE [4].

Durch die beiden Studien [1] und [3] konnten damit Hinweise auf die Richtigkeit der Arbeitshypothese gefunden werden, die ein Konzept zur Verknüpfung von kleinen ribonukleären Proteinen (sRNP) und dsDNS über die T-Zellerkennung darstellt. Diese Hypothese erklärt die Beziehung der Antikörperantworten gegen dsDNS und gegen SmD1 zueinander, indem den dsDNS-spezifischen B-Zellen eine entscheidende Aktivierungsfunktion für die SmD1<sub>83-119</sub>-spezifischen T-Zellen zugeschrieben wird. Die *in vitro* gefundene verzögerte Immunantwort gegen das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid gegenüber der Bildung von Anti-dsDNS-Antikörpern [1] spricht dafür, dass schon *in vivo* vorhandene und von bereits erkrankten Mäusen gewonnene dsDNS-spezifische B-Zellen zunächst T-zellunabhängig durch dsDNS-assoziierte Proteine wie SmD1 über den B-Zellrezeptor oder den tollähnlichen Rezeptor-9, dessen Funktion zunehmend als bedeutend in der Lupuspathogenese angesehen wird, aktiviert werden können. Hieraus gehen potente B-Zellen hervor, die dsDNS assoziierte

Peptide, wie SmD1<sub>83-119</sub>, effektiv antigenspezifischen T-Zellen präsentieren. Die derart aktivierten SmD1<sub>83-119</sub>-spezifischen T-Zellen können im Gegenzug durch die Sekretion von Zytokinen Hilfe für die Entwicklung von Plasmazellen und die Produktion von hochaffinen Autoantikörpern gegen SmD1<sub>83-119</sub> und dsDNS geben.

Weitergehende Immunisierungsstudien mit nichtautoimmunen Mausstämmen [3] belegten die große Potenz des SmD1-Peptid und die Notwendigkeit von SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiven T-Helferzellen zur Initiierung eines Toleranzbruches und der Induktion von Autoantikörpern gegen dsDNS in gesunden Individuen. In Experimenten anderer Autoren zur Induktion von Autoimmunität gegen Lupusantigene gelang nur selten die Auslösung von Lupussympomen wie Proteinurie. In vielen Fällen wurden diese Antigene in Kombination mit dem multiplen Antigenpeptid (MAP) eingesetzt, um eine Verstärkung der Immunogenität hervorzurufen. Die vorliegende Studie benutze dieses Mittel nicht und gibt damit Hinweise auf die bedeutende Rolle eines einzelnen Antigen, wie SmD1<sub>83-119</sub>, in der Initiierung des Lupus.

Ferner zeigten die Ergebnisse der Studie [3] einen möglichen Erklärungsansatz zur Induktion der Autoimmunität auf. In den ELISPOT-Analysen wurde beobachtet, dass die Fähigkeit zu Autoantikörperbildung bei B-Zellen des nichtautoimmunen CWF1-Stammes gegenüber denjenigen von NZB/W-Lupus-Mäusen deutlich vermindert ist, obwohl auch T-Zellen des nicht-autoimmunen Stammes nachweislich in der Lage waren, gute T-Zellhilfe zu leisten. Dieses Ergebnis deutet an, dass B-Zellen bei der Regulation der T-Zellhilfe und der Autoimmunität in genetisch prädisponierten Individuen, wie CWF1-Mäusen, tätig sein können. Entscheidend hierbei scheint die Klasse der MHC-Moleküle zu sein, denn sowohl die NZB/W F1-Lupus-Mäuse als auch der nicht-autoimmune CWF1-Stamm besitzen den gleichen MHC-Haplotyp (H-2<sup>d/z</sup>). Entsprechende regulatorische Funktionen von B-Zellen sind für ein anderes Lupus-Mausmodell bereits von anderen Autoren beschrieben worden.

Zusätzlich zum Potential der Induktion von Autoimmunität besitzt das ungebundene bzw. nicht mit Adjuvant applizierte SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid auch eine tolerogene Wirkung. Nach intravenöser Hochdosisgabe erzeugt es die im autoimmunen NZB/W F1-Mausstamm fehlende Toleranz gegenüber dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid. Damit deuten die Ergebnisse der Tolerisierungsstudien [2] das Vorhandensein eines sehr spezifischen Toleranzmechanismus an, der nur vom SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid nicht aber von Kontrollpeptiden initiiert werden konnte. Das SmD1-Peptid stellt eines der wenigen in der Literatur beschriebenen Lupusantigene dar, das nicht nukleosomalen Ursprungs entstammt und gleichzeitig dennoch ein tolerogenes Potential besitzt. Verschiedene



Ursachen für die positive Wirkung der Tolerisierung mit SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid sind denkbar. So scheint die Modulation der Zytokinprofile von T-Zellen eng mit der Entstehung regulatorischer T-Zellen verknüpft zu sein [1,2,4]. In verschiedenen Autoimmunerkrankungen konnten bereits Zytokinprofilveränderungen in Th1 und Th2-Zellen nach Hochdosistolerisierung festgestellt werden, die möglicherweise eine Voraussetzung für die Generierung von regulatorischen T-Zellen und/oder die Deletion/Anergie von Effektor-T-Zellen (T-Helferzellen) darstellen. Auch intravenös hochdosiertes SmD1<sub>83-119</sub> wirkt ähnlich. Es reduziert in jungen tolerisierten Mäusen die Frequenz der T-Zellen, die proinflammatorische Zytokine wie IFN $\gamma$ , IL-4 und IL-2 produzieren, selbst wenn eine Restimulation mit dem Peptid erfolgt. Dieses Ergebnis deutet an, dass Deletion und Anergie von Effektor-T-Zellen durch SmD1<sub>83-119</sub> induziert werden können [2]. Entsprechende Reduktionen der Spotzahlen in dsDNS-Antikörper-ELISPOT-Assays waren nachweisbar [2]. Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang die gegensätzliche Wirkung des SmD1-Peptids im Rahmen einer Immunisierung, bei der es zur Vermehrung IFN $\gamma$ -, IL-4- und IL-2-produzierenden T-Zellen kommt. Zusammen betrachtet zeigen die Resultate somit an, dass die Form des verabreichten Peptids, als lösliches Peptid oder in Verbindung mit einem Adjuvanz, ausschlaggebend ist.

Nach einer Tolerisierung mit SmD1<sub>83-119</sub> scheinen sich mit zunehmender Lebensdauer im Organismus tolerisierter Mäuse Bedingungen auszubilden, welche die Entwicklung regulatorischer T-Zellen des Typ Tr1 ermöglichen. Mit dem Transfer einer T-Zellfraktion aus tolerisierten NZB/W F1-Mäusen in unbehandelte Mäuse gelang eine Toleranzübertragung und die Inhibierung von T-Helferzellen im Empfängerorganismus. Dieses Ergebnis kann erstmalig als Nachweis interpretiert werden, dass auch SmD1<sub>83-119</sub>-spezifische T-Zellen aus tolerisierten Mäusen eine regulatorische Funktion übernehmen können. Außerdem machte die Generierung von T-Zelllinien die Charakterisierung solcher regulatorischen T-Zellen möglich. Die Co-Expression der für regulatorische Tr1-Zellen charakteristischen Zytokine IFN $\gamma$  und IL-10 aus SmD1<sub>83-119</sub> tolerisierten Mäuse konnte klar belegt werden [2]. Neben der gezielten Anreicherung von IL-10-positiver T-Zellen *in vitro* konnte ein erhöhtes Vorkommen solcher Zellen auch in jungen und nur leicht nephritischen NZB/W-Mäusen nach Peptidimmunisierung [1] gefunden werden. Die Beobachtung, dass IFN $\gamma$  und IL-10 doppelpositive T-Zellen auch noch mehrere Monate nach der Tolerisierung in den Versuchstieren wiedergefunden wurden, weist auf einen langfristigen Effekt auf das Zytokinprofil hin, der durch eine SmD1<sub>83-119</sub>-Tolerisierung erzielt werden konnte.

Insbesondere gilt die regulatorische Bedeutung von IL-10 zur Unterdrückung von proinflammatorischen Th1-Antworten und der Proliferation von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sowie für die Abschaltung antigenpräsentierender Zellen als anerkannt. Damit haben derartige Tr1-Zellen das Potential, Immunreaktionen, auch diejenigen beim Lupus, zu unterbinden, was in Studie 2 auch nachgewiesen wurde.

Hinweise für den protektiven Einfluß von IL-10 konnten auch in der Humanstudie [4] erkannt werden. Hier korrelierten höhere Anteile IL-10-produzierender T-Zellen mit einer geringeren Krankheitsaktivität und niedrigen Anti-dsDNS- und Anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörpertitern in Kulturüberständen, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Autoantikörperreduktion nicht nur symptomatisch war, sondern spezifisch autoreaktive T-Helferzellen mit einem Zytokingedächtnis für IL-10 betraf. Möglicherweise gehören die hier gefundenen Gedächtniszellen für IL-10 in die Klasse der regulatorischen T-Zellen, was aber einer Klärung durch eine funktionelle Analyse in zukünftigen Forschungsarbeiten vorbehalten bleibt.

Insbesondere die *in vivo* aber auch die *in vitro* Experimente der zweiten Studie führen den Beweis, dass das Autoantigen SmD1 bzw. SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid selbst als Tolerogen verabreicht, zur Bildung regulatorischer T-Zellen führen kann. Für systemische entzündlichen Infektionen, Tuberkulose und Lyme-Krankheit konnten solche regulatorischen T-Zellen bereits früher gefunden werden.

Die Analyse des T-Zellgedächtnisses für die Zytokinproduktion [1,2,4], die organismusspezifisch oder infolge einer Stimulation durch Autoantigene beim Lupus gegenüber gesunden Individuen verändert sein kann, trägt zum Verständnis über autoreaktive T-Zellen im systemischen Lupus erythematoses bei. Die skizzierte zentrale Rolle für das SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid im murinen und humanen Lupus läßt vermuten, dass bestimmte T-Zellen schon *in vivo* durch einen Kontakt mit diesem allgegenwärtigen Autoantigen ein Zytokingedächtnis ausgeprägt haben könnten. Entsprechende Studien [1,2,4] zeigten, dass die Antigenstimulation mit SmD1<sub>83-119</sub> zu einer Veränderung der Zytokinprofile durch Anreicherung SmD1<sub>83-119</sub>-spezifischer T-Zellen geführt hat.

Die in der Humanstudie [4] gefundene Korrelation der Krankheitsaktivität zur Expression von TNF $\alpha$ - und IL-10-Expression durch T-Helferzellen könnte ein Beleg für das Zytokingedächtnis bei autoreaktiven T-Zellen wie SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiven T-Zellen darstellen. Die Ähnlichkeiten im Zytokinprofil zwischen den SmD1<sub>83-119</sub> und den Kontrollansätzen legen die Vermutung einer *in vivo* begonnenen und *in vitro* fortgesetzten permanenten Stimulation mit Autoantigen und folgender Anreicherung antigenspezifischer T-Zellen nahe, wie sie von

anderen Autoren in Experimenten mit B-Zellenkulturen in Anwesenheit von Nukleosomen beobachtet wurde.

Die unmittelbare Verknüpfung des Zytokingedächtnisses von SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiven T-Zellen mit den Autoantikörpertitern deutet auch für den humanen SLE auf die wichtige Funktion von SmD1<sub>83-119</sub> als Autoantigen und als determinierendes und repräsentatives Autoantigen im SLE hin, das auch *in vivo* T-Zellabnormitäten induzieren kann.

Die Bedeutung des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid als relevantes Antigen für die Lupuspathogenese wird durch die Erkenntnis bestärkt, dass es eine hohe Homologie zu einem in der Literatur umfassend charakterisierten initialen Auslöserantigen, dem nukleären Epstein Barr Virus Antigen-1 (EBNA-1), besitzt [3]. Diese Homologie verursacht nachweislich eine Kreuzreaktivität der Antikörper gegen ein SmD1<sub>95-119</sub>-Peptid und EBNA-1. Mehrere unabhängige epidemiologische Studien konnten eine signifikant höhere Inzidenz für das Vorkommen von Antikörper gegen EBV-Proteine in Lupus-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisen. Weitergehende Expressionsstudien EBNA-1 resultierten sogar in der Bildung von Antikörpern gegen dsDNS und Sm-Proteinanteile.

Abschließend kann festgestellt werden, dass in Abhängigkeit von der Verwendung des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptids als Immunogen oder Tolerogen völlig gegensätzliche T- und B-Zellinteraktionen ausgelöst werden, wodurch die maßgebliche Funktion SmD1-reaktiver T-Zellen für die Modifikation des Zytokinmusters und der Autoantikörperbildung im Lupus herausgestellt wird.

## 2 Publikationsliste

### Publikationen der Promotion (Ausdrucke der Publikationen sind im 3. Kapitel angefügt.)

1. Riemekasten G, Langnickel D, Ebling FM, Karpouzas G, Kalsi J, Herberth G, Tsao BP, Henklein P, Langer S, Burmester GR, Radbruch A, Hiepe F, Hahn BH. Identification and characterization of SmD1<sup>83-119</sup>-reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies. *Arthritis Rheum*, 2003;48(2):475-85.
2. Riemekasten G, Langnickel D, Enghard P, Undeutsch R, Humrich, Ebling FM, Hocher B, Humaljoki T, Neumayer H, Burmester GR, Hahn BH, Radbruch A, Hiepe F. Intravenous Injection of a D1 Protein of the Smith proteins postpones murine lupus and induces type 1 regulatory T cells. *J Immunol*, 2004, 173(9): 5835-42. 1. Autorenschaft: Riemekasten u. Langnickel
3. Langnickel D, Enghard P, Klein C, Undeutsch R, Hocher B, Manz R, Burmester GR, Riemekasten G. Induction of pathogenic anti-dsDNA antibodies is controlled on the level of B cells in non-lupus prone mouse strain. *J Clin Immunol*, 2006, 26: 86-95.
4. Langer S, Langnickel D, Enghard P, Undeutsch R, Burmester GR, Hiepe F, Radbruch A, Riemekasten G. The systemic SmD1<sup>83-119</sup>-autoantigen-specific cytokine memory of Th cells in SLE patients. *Rheumatology (Oxford,)* 2006 Jul 31 [Epub ahead of print].

### Weitere Publikationen (nicht Bestandteil der Promotion)

5. Enghard P, Langnickel D, Riemekasten G. T-cell cytokine imbalance towards production of IFN- $\gamma$  and IL-10 in NZB/W F1 lupus-prone mice is associated with autoantibody levels and nephritis. *Scand J Rheumatol*, 2006 May-June, 35(3): 209-16.

### Publizierte Abstracts

Riemekasten G, Langnickel D, Enghard P, Meine A, Hocher B, Krause S, Weiß C, Muzzulini T, Burmester GR, Hiepe F. Immune tolerance to the SmD1<sub>83-119</sub> peptide postpones development of murine lupus. Eur. Conference on Lupus, Athen 2002, March

Riemekasten G, Meine A, Langnickel D, Enghard P, Ebling FM, Hocher B, Krause S, Muzzulini T, Burmester GR, Hahn BH, Radbruch A, Hiepe F. I.v. injections of SmD1<sub>83-119</sub> peptide postpones murine lupus in NZB/W F1 mice. ACR 2002, Vortrag.

Riemekasten G, Langnickel D, Enghard P, Meine A, Hocher B, Krause S, Weiß C, Muzzulini T, Burmester GR, Hiepe F. Immune tolerance to the SmD1<sub>83-119</sub> peptide postpones development of murine lupus by regulatory T cells. EULAR 2003, Lissabon.

Riemekasten G, Meine A, Langnickel D, Enghard P, Ebling FM, Hocher B, Krause S, Muzzulini T, Burmester GR, Hahn BH, Radbruch A, Hiepe F. I.v. injections of SmD1<sub>83-119</sub> peptide postpones murine lupus in NZB/W F1 mice by regulatory T cells. EULAR 2004, Berlin, Vortrag

**Folgende Manuskripte wurden auf Kongressen vorgestellt:**

Langnickel D., Enghard P, Meine A, Hiepe F, Riemekasten G. Induction of autoantibodies in healthy mouse strains by the C-terminal peptide of SmD1 83-119. 6. Congress on Autoantibodies. Dresden, 4.-7. September 2002. Inhalt der 3. Publikation.

Enghard P, Langnickel D, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Riemekasten G. Cytokine balance in the NZB/W F1 murine model of SLE. EWRR, Berlin, Februar 2004. Inhalt der 5. Publikation.

Enghard P, Langnickel D, Manz R, Hiepe F, Radbruch A, Riemekasten G. Characterization of kidney infiltrating T cells in NZB/W F1 lupus mice by flow cytometry. 7<sup>th</sup> International Lupus Congress May 2004, New York.

### **3 Publikationen in voller Länge**

#### **3.1 Identification and characterization of SmD1<sup>83-119</sup>-reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies.**

Riemekasten G, Langnickel D, Ebling FM, Karpouzas G, Kalsi J, Herberth G, Tsao BP, Henklein P, Langer S, Burmester GR, Radbruch A, Hiepe F, Hahn BH. Arthritis Rheum, 2003;48(2):475-85.

Nachfolgende Seiten 26-36.

### **3.2 Intravenous Injection of a D1 Protein of the Smith proteins postpones murine lupus and induces type 1 regulatory T cells.**

Riemekasten G, Langnickel D, Enghard P, Undeutsch R, Humrich, Ebling FM, Hocher B, Humaljoki T, Neumayer H, Burmester GR, Hahn BH, Radbruch A, Hiepe F. *J Immunol*, 173(9): 5835-42.

1. Autorenschaft: Riemekasten u. Langnickel

Nachfolgende Seiten 38-45

### **3.3 Induction of pathogenic anti-dsDNA antibodies is controlled on the level of B cells in non-lupus prone mouse strain.**

Langnickel D, Philipp Enghard P, Klein C, Undeutsch R, Hocher B, Manz R, Burmester GR, Riemekasten G. J Clin Immunol, 2006, 26: 86-95.

Nachfolgende Seiten 47-56.



### **3.4 The systemic and Smd1<sup>83-119</sup>-autoantigen-specific cytokine memory of Th cells in SLE patients.**

Langer S, Langnickel D, Enghard P, Undeutsch R, Burmester GR, Hiepe F, Radbruch A, Riemekasten G. Rheumatology (Oxford,) 2006 Jul 31 [Epub ahead of print].

Nachfolgende Seiten 58-65.

## 4 Anteil des Promovends an den Publikationen

Die nachfolgende Erklärung legt die individuellen Beiträge der Autoren zu den einzelnen Publikationen dar. Die Reihenfolge entspricht der Chronologie ihres Erscheinens. Durch eine unterschriebene Erklärung, die dem „Antrag auf Zulassung zur Publikationspromotion“ beigelegt worden war, wurde bereits die Richtigkeit dieser Angaben beurkundet. Diese Erklärung belegt, dass die erzielten Resultate im wesentlichen auf meiner Arbeit beruhen und ihre Verwendung innerhalb dieser Dissertation gerechtfertigt ist.

### 1. Publikation → Anteil = 50 Prozent

#### *Identification and Characterization of SmD1<sup>83-119</sup>-Reactive T Cells That provide T Cell Help for Pathogenic Anti-Double-Stranded DNA Antibodies*

*Gabriela Riemekasten, Dirk Langnickel, Fanny M. Ebling, George Karpouzas, Jatinderpal Kalsi, Gunda Herberth Betty P. Tsao, Peter Henklein, Sven Langer, Gerd-R. Burmester, Andreas Radbruch, Falk Hiepe, Bevra H. Hahn*

#### G. Riemekasten:

- Ergebnisse (Tab. 1 u. Abb. 1-3), Text und Abbildungen präpariert
  - Durchführung der Immunisierungsstudie und Gewinnung der murinen T und B-Zellen
  - Konzeption, Durchführung und Auswertung der Antikörper- und Zytokin-ELISPOT-Experimente mit T- und B-Zellen
  - Entdeckung der Hauptantigensequenz im SmD1-Protein
- mit A. Radbruch Modellentwicklung zur Entstehung von Autoantikörpern
- Verfasser des Manuskriptes und korrespondierender Autor

#### D. Langnickel

- Ergebnisse (Abb. 4-6), Text und Abbildungen präpariert
  - Durchführung der Immunisierungsstudie und Gewinnung der murinen T und B-Zellen
  - erstmaliger *ex vivo* Nachweis SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiver T-Zellen mittels Durchflußzytometrie
  - Konzeption und Generierung von T-Zelllinien unterschiedlicher Spezifitäten: SmD1<sub>83-119</sub>- und OVA-Peptid<sub>323-339</sub>-reaktiven T-Zelllinien
  - erstmalige Identifikation von SmD1<sub>83-119</sub>-reaktiven T-Zelllinien mit Hilfefunktion für die Autoantikörperbildung gegen dsDNS

#### FM. Ebling, G. Karpouzas, J. Kalsi, BP Tsao, BH. Hahn

- Technische Unterstützung bei Arbeiten im Labor von Bevra Hahn (Universität des Staates Kalifornien/ Los Angeles/ USA) und Diskussionspartner

#### G. Herbert, P. Henklein, GR. Burmester, F. Hiepe, S. Langer, A. Radbruch

- teilweise Anleitung zur technischen Durchführung der Durchflußzytometrie

- Herstellung und Aufreinigung des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptides
- Überlassung von Ressourcen wie Räumlichkeiten und Arbeitsgeräten u. -material (z.B. Durchflußzytometer und entsprechende Antikörper)
- Diskussionspartner und teilweise am Review des Manuskripts beteiligt

## **2. Publikation → Anteil = 50 Prozent**

### ***Intravenous Injection of a D1 Protein of the Smith Proteins Postpones Murine Lupus and Induces Type 1 Regulatory T Cells***

*Gabriela Riemekasten, Dirk Langnickel, Philipp Enghard, Reinmar Undeutsch, Jens Humrich, Fanny M. Ebling, Berthold Hocher, Tiina Humaljoki, Hans Neumayer, Gerd-R. Burmester, Bevra H. Hahn, Andreas Radbruch, and Falk Hiepe*

#### **G. Riemekasten**

- Ergebnisse (Abb. 1-3) resultieren aus dem Forschungsaufenthalt im Labor von B. Hahn, Text und Abbildungen präpariert
  - Durchführung der Immunisierungsstudie und Gewinnung der murinen T und B-Zellen
  - Konzeption, Durchführung und Auswertung der Antikörper- und Zytokin-ELISPOT-Experimente mit T- und B-Zellen
- Konzeptionelle Planung der Arbeit und Korrespondierender Autor
- erstmaliger Nachweis der tolerogenen Wirkung des SmD1<sub>83-119</sub>-Peptids im Mausmodell

#### **D. Langnickel**

- Ergebnisse (Abb. 4-8), Text und Abbildungen präpariert
  - Durchführung der Immunisierungsstudie und Gewinnung der murinen T und B-Zellen
  - Generierung von T-Zelllinien unterschiedlicher Spezifitäten
  - Konzeption, Durchführung und Auswertung der Charakterisierung von T-Zelllinien mit Hilfefunktion für die Autoantikörperbildung oder regulatorischem Potential:
    - Antikörper-Analyse mittels ELISPOT und Western Blot
    - Durchflußzytometrie-Experimente zur Bestimmung intrazellulärer Zytokin- und extrazellulärer Oberflächenmarkerprofile
    - Durchführung und Konzeption der Proliferations- und Proliferationsinhibitionstests
  - erstmalige Identifikation von SmD1<sub>83-119</sub>-spezischen T-Zelllinien mit inhibitorischer Wirkung auf die Teilungsaktivität naiver T-Zellen
- gleichberechtigter Erstautor

#### **GR. Burmester, F. Hiepe, A. Radbruch**

- Überlassung von Ressourcen wie Räumlichkeiten und Arbeitsgeräten u. -material
- Diskussionspartner

- teilweise am Review des Manuskripts beteiligt

P. Enghard, R. Undeutsch, J. Humrich, T. Humaljoki

- Mitglieder der Arbeitsgruppe Riemekasten und Diskussionspartner

BH. Hahn, FM. Ebling

- Technische Unterstützung bei Arbeiten im Labor von Bevra Hahn
- Diskussionspartner

B. Hocher, H. Neumayer

- Gewebsuntersuchungen (Teil der Abb. 2)

### **3. Publikation → Anteil = 90 Prozent**

***Induction of pathogenic anti-dsDNA antibodies is controlled on the level of B cells in a non lupus prone mouse strain***

*Dirk Langnickel, Philipp Enghard, Claudia Klein, Reinmar Undeutsch, Berthold Hocher, R. Manz, G.R. Burmester, Gabriela Riemekasten*

D. Langnickel

- alle Ergebnisse der Publikation, Text und Abbildungen präpariert
  - Durchführung der Immunisierungsstudie und Monitoring der SLE-Marker
  - Gewinnung der murinen T und B-Zellen
  - Konzeption, Durchführung und Auswertung der T und B-Zell-Co-Kultivierungen
  - erstmalige Induktion von Lupus Symptomen in nicht-autoimmunen Mäusen
  - erstmaliger *in vitro* Nachweis einer effizienten Hilfefunktion von T-Zellen aus nicht-autoimmunen Mäusen für Autoantikörperbildung gegen dsDNS nach Immunisierung mit Autoantigen ohne MAP-Gerüst

P. Enghard, C. Klein, R. Undeutsch

- Mitglieder der Arbeitsgruppe Riemekasten und Diskussionspartner
- Hilfe bei Durchführung der Elispotanalysen

B. Hocher

- Gewebsuntersuchungen

R. Manz, GR. Burmester

- Diskussionspartner
- Zuverfügungstellung von Ressourcen
- teilweise Review und hilfreiche Hinweise zur Formulierung im Endstadium des Manuskripts

#### G. Riemekasten

- teilweise Konzept der Publikation
- Leiterin der Arbeitsgruppe und erfahrene Diskussionspartnerin
- Revision und hilfreiche Hinweise zur Formulierung des Manuskripts

#### **4. Publikation Anteil 40% (noch nicht veröffentlicht)**

##### *The Systemic and SmD1<sup>83-119</sup>-Autoantigen-specific Cytokine Memory of TH Cells in SLE Patients*

Swen Langer, Dirk Langnickel, Philipp Enghard, Reinmar Undeutsch, Gerd-R. Burmester, Falk Hiepe, Andreas Radbruch, Gabriela Riemekasten

#### S. Langer

- Durchführung der Experimente
- teilweise Auswertung der Experimente

#### D. Langnickel

- Weitergabe der Techniken zur Etablierung von T-Zelllinien
- teilweise Ideengebung und Konzeption
- Durchführung der Experimente, insbesondere Zellkultivierung
- Review und hilfreiche Hinweise zur Formulierung im Endstadium des Manuskript

#### P. Enghard, R. Undeutsch

- Mitglieder der Arbeitsgruppe Riemekasten und Diskussionspartner

#### GR. Burmester, F. Hiepe, A. Radbruch

- Diskussionspartner
- Überlassung von Ressourcen
- teilweise Review und hilfreiche Hinweise zur Formulierung im Endstadium des Manuskripts

#### G. Riemekasten

- teilweise Ideengebung und Konzeption
- Akquise der Spender
- Auswertung der Experimente und Statistik
- Abfassung des Manuskriptes

## 5 Curriculum Vitae

### Zur Person

Name: Dirk Langnickel  
Geburtsdatum: 13.02.1970  
Geburtsort: Salzgitter-Bad  
Anschrift: Lange Straße 17/1  
D-88471 Laupheim  
Staatsangehörigkeit: deutsch

---

### Beruf und Promotion

seit November 2002 Mitarbeiter des Unternehmens Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG in Biberach an der Riss, Abteilung Biopharmazeutische Produktion: Prozessbegleitung für die Herstellung therapeutischer Proteine zur Behandlung von Multipler Sklerose, Tumoren, Herzinfarkten und rheumatoider Arthritis (Enbrel-Produktion) und RSV-Infektionen.

seit Aug. 2001 - Promotionsarbeit in der Arbeitsgruppe Prof. Hiepe/ Fr. Dr. Riemekasten an der Klinik für Rheumatologie und klinische Immunologie der Charité in Kooperation mit dem Deutschen Rheumaforschungszentrum (DRFZ) Berlin Thematischer Schwerpunkt: Systemischer Lupus erythematoses (SLE)

Nov. 1999 - Juli 2001 Innovationsassistent bei der Seramun Diagnostica GmbH in Dolgenbrodt bei Berlin mit den Schwerpunkten Markteinführung von Immunoblots, Membranassay- und ELISA-Entwicklung und -produktion

---

### Fortbildungen während der Promotionsbearbeitung

April 2002 - Juli 2002 zertifizierte Fortbildung der ZEBET [Zentralstelle zur Erfassung und Bewertung von Ersatz- und Ergänzungsmethoden zum Tierversuch des Bundesinstituts für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV)] an der HU Berlin zum Thema: Tierversuche und Alternativmethoden, Abschlußprüfung am 18.07.02

März 2002 1-wöchige Fortbildung an der Universität Würzburg zum Thema: Neuere Methoden der Zellanalytik (FACS-Analytik)

---

**Studium/ Berufsausbildung**

- Okt. 1998 - Sep. 1999 Erstellung der Diplomarbeit bei der Firma Rhein Biotech GmbH in Düsseldorf, Thema: „Generierung und Charakterisierung von rekombinanten Hefestämmen für die Herstellung von Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1ra) zur Behandlung von rheumatoider Arthritis“
- Okt. 1997 - Mai 1998 Studienarbeit bei der Bayer AG in Köln Abteilung Tiergesundheit/Verfahrensentwicklung II, Thema: „Untersuchungen zur Aufkonzentrierung des bovinen respiratorischen Syncytial-Virus (BRSV) mittels Querstromfiltration“
- Feb. 1994 - Juli 1994 Tätigkeit als studentische Hilfskraft in Institut für Molekularbiologie der TU Braunschweig, Tätigkeitsbereich: tierische Zellkulturtechnik und molekularbiologische Experimente
- Okt. 1993 - Okt. 1999 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Braunschweig, Abschluß mit Diplom
- 

**Laborantentätigkeit**

- Juni 1993 - Okt. 1993 Berufstätigkeit als Biologielaborant bei der Firma Schering AG im Werk Charlottenburg im Bereich des Screening von Mikroorganismen zur Steroidhormonproduktion
- Sep. 1990 - Juni 1993 Ausbildung zum Biologielaboranten bei der Schering AG in Berlin
- 

**Schulbildung**

- 1983 - 1990 Besuch des Gymnasiums in Salzgitter-Bad, Abitur im Mai 1990
- 1981 - 1983 Besuch der Orientierungsstufe in Salzgitter-Gebhardshagen
- 1977 - 1981 Besuch der Grundschule in Salzgitter-Gebhardshagen
- 

Laupheim, August 2006