

# 1 Einleitung

Das Immunsystem ist ein komplexes funktionelles System des Körpers, das der Abwehr von körperfremden Strukturen und Pathogenen dient. Verschiedene Mechanismen der Immunantwort greifen ineinander und lassen ein Geflecht von Abläufen entstehen, die in einem sensiblen Gleichgewicht zueinander stehen. Ist dieses Gleichgewicht gestört, kann es zu einer Überreaktion oder einem Versagen der Immunabwehr und damit zu einer Erkrankung des Körpers kommen. Im Falle einer übersteigerten Immunantwort spricht man von einer Autoimmunerkrankung, bei der durch das Immunsystem körpereigene Strukturen angegriffen werden.

Über Ätiologie und Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist noch vieles unbekannt, so dass die Therapie nur unspezifisch erfolgen kann. Ohne den genauen Wirkmechanismus zu kennen, hat man gute therapeutische Erfolge mit der intravenösen Gabe von hoch dosierten IgG-Antikörpern bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen erzielt (Looney & Huggins, 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Wechselwirkungen dieser therapeutisch eingesetzten IgG-Antikörper auf molekularer Ebene zu untersuchen.

## 1.1 Das humorale Immunsystem

Bei der Immunreaktion des Körpers auf körperfremde Strukturen oder Pathogene unterscheidet man die humorale und die zelluläre Immunantwort. Die humorale Immunantwort beruht im Gegensatz zu der zellulären Immunantwort auf der Abwehr von pathogenen Mikroorganismen, Toxinen oder allergenen Proteinen durch Antikörper, die von Plasmazellen sezerniert werden. Ein körperfremdes Antigen (z.B. ein Virus) wird dabei, stark vereinfacht, über den B-Zell-Rezeptor, der in seiner Struktur einem Antikörper ähnelt, an eine ruhende B-Zelle gebunden. Durch diese Bindung und durch die Wechselwirkung mit einer antigenspezifischen T-Helferzelle und dendritischen Zellen wird die B-Zelle aktiviert und zur klonalen Proliferation angeregt. Durch anschließende Differenzierung entwickelt sich die aktivierte B-Zelle entweder zu einer B-Gedächtniszelle oder zu einer antikörpersezernierenden Plasmazelle, wobei die sezernierten Antikörper dieselbe Bindungsspezifität besitzen, wie der antigenbindende B-Zell-Rezeptor.

Das körperfremde Antigen wird von den sezernierten Antikörpern gebunden und je nach Antikörpertyp durch verschiedene Mechanismen eliminiert.

## 1.2 Aufbau von Antikörpern

Die Antikörper, auch Immunglobuline genannt, gehören zu der Familie der Plasmaproteine. Biochemisch gesehen handelt es sich um Glykoproteine, die aus zwei identischen leichten (25 kd) und zwei identischen schweren (50 kd) Polypeptidketten bestehen, die über Disulfidbrücken beweglich miteinander verbunden sind. Die leichten Ketten können vom  $\lambda$ - oder vom  $\kappa$ -Typ sein, was auf die Funktion des Antikörpers aber keinen Einfluss hat. Die schweren Ketten dagegen bestimmen den Isotyp eines Immunglobulins und werden beim Menschen in  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  und  $\epsilon$  Ketten unterteilt. Man unterscheidet folglich fünf Isotypen: Immunglobulin (Ig)

M, IgD, IgG, IgA und IgE. Jeder Isotyp hat eine spezielle funktionelle Eigenschaft, die durch den Typ der schweren Kette festgelegt ist. Im Folgenden soll hier nur auf IgG, dem häufigsten Isotyp im Blutplasma, eingegangen werden.

Ein IgG-Antikörper ist ein bewegliches Molekül mit einer typischen Y-förmigen Struktur. Er kann durch proteolytische Spaltung durch das Enzym Papain in zwei identische, antigenbindende Fragmente (Fab-Fragmente; engl. *Fragment antigen binding*) und in ein drittes Fragment, das Fc-Fragment (engl. *Fragment crystallizable*) gespalten werden (siehe Abbildung 1). Ein Fab-Fragment enthält eine vollständige leichte Kette und eine halbe schwere Kette. Es kann in eine variable und eine konstante Region unterteilt werden. Die variable Region wird aus den aminoterminalen Teilen der leichten und der schweren Kette gebildet und setzt sich aus hypervariablen Bereichen und Gerüstregionen (engl. *framework regions*) zusammen. Die hypervariablen Bereiche bestimmen das Antigen, das gebunden werden kann und werden deshalb auch CDR-Regionen (engl. *complementary determining regions*) genannt (CDR 1-3). Die Gerüstregion dagegen wird durch konservierte Nukleinsäuresequenzen codiert und legt die räumliche Struktur der Antigenbindungsstelle fest.

Das Fc-Fragment ist die konstante Region eines Antikörpers und bestimmt die funktionellen Mechanismen. Es wird ausschließlich durch Anteile der schweren Ketten gebildet. Je nach Kettentyp (siehe oben) werden hier z.B. Makrophagen über Fc-Rezeptoren oder Komplement gebunden.

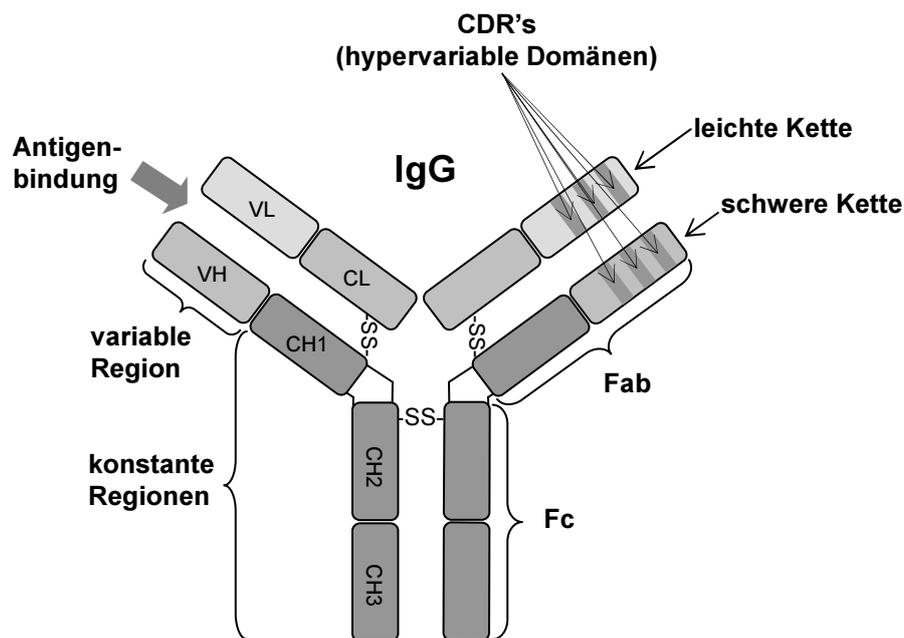


Abbildung 1 Aufbau eines IgG-Antikörpers

### 1.3 Biosynthese von Antikörpern / Entstehung der Antikörpervielfalt

Jedes Individuum muss über eine Vielzahl verschiedener Antikörpern verfügen, um effektiv gegen pathogene Strukturen vorgehen zu können. So hat der erwachsene Mensch durch den Kontakt mit zahlreichen körperfremden Antigenen ca.  $10^{11}$  verschiedene Antikörper

entwickelt, die unterschiedliche Strukturen erkennen. Die Summe der verschiedenen Antikörper eines Individuums bezeichnet man als Antikörperrepertoire.

Die große Vielfalt der Antikörper erfordert bei der Biosynthese spezielle Mechanismen, da die Kapazität des Genoms nicht ausreichen würde, um jeden Antikörper durch ein bestimmtes Gen zu codieren. Auch die Tatsache, dass die Antigenbindungsstellen durch unterschiedliche Paarungen von leichter und schwerer Kette gebildet werden, reicht allein nicht als Erklärung für die große Anzahl verschiedener Antikörperspezifitäten.

Ein Mechanismus zur Realisierung der Antikörpervielfalt beruht auf der Tatsache, dass die Gene, die die leichte und schwere Kette codieren, aus verschiedenen Gensegmenten bestehen (siehe Abbildung 2).

Die Gensegmente, die die variable Region der leichten Kette codieren werden mit V und J bezeichnet (engl. *variabel* und *joining*). Das V-Segment bestimmt dabei die CDR1- und CDR2-Region der Antigenbindungsstelle. Die CDR3-Region wird durch das V- und das J-Segment festgelegt.

Die V-Region der schweren Kette wird durch drei Gensegmente codiert. Zusätzlich zu V und J gibt es hier noch das D-Segment (engl. *diversity*), das zwischen dem V- und dem J-Segment liegt. Es bestimmt zusammen mit dem V- und J-Segment die CDR3-Region.

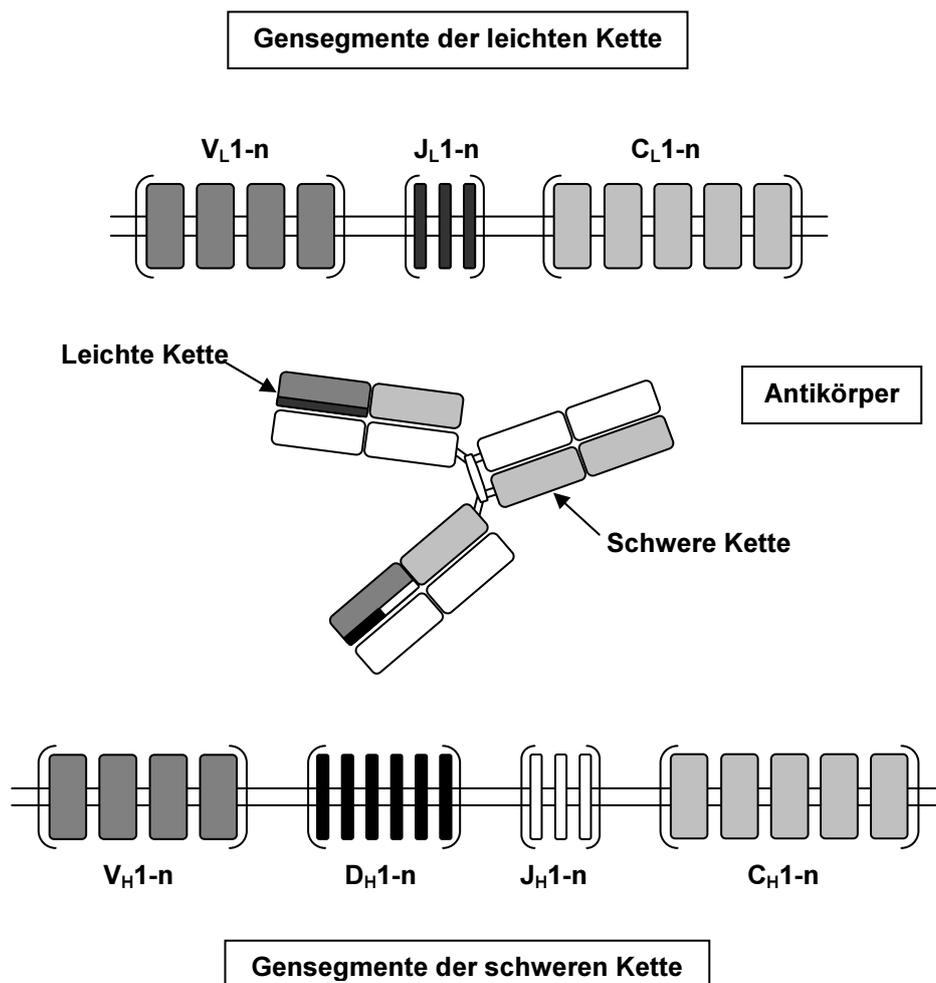


Abbildung 2 Gensegmente eines Antikörpers

Um die Vielfalt des genetischen Codes zu erhöhen, liegen diese Gensegmente in mehreren Kopien vor und können aufgrund ähnlicher DNA-Sequenzen in Familien eingeteilt werden. Bei der Verknüpfung in der B-Zelle kommt es dann zu einer zufälligen Rekombination von V-, D- und J-Segment, wobei an den Verknüpfungstellen eine zufällige Anzahl von Nukleotiden eingefügt wird, ein weiterer Mechanismus zur Erhöhung der Antikörpervielfalt.

Hat eine B-Zelle Antigenkontakt, wird sie aktiviert und beginnt zu proliferieren. In dieser Phase kann man den Prozess der somatischen Hypermutation beobachten. Es kommt dabei zu einer großen Anzahl von Punktmutationen im gesamten Bereich der variablen Region. Dies hat zur Folge, dass es auch zu Veränderungen an den antigenbindenden B-Zellrezeptoren kommt, so dass einige Mutanten das Antigen mit höherer Affinität binden als der ursprüngliche B-Zellrezeptor. Diesen Vorgang nennt man auch Affinitätsreifung. Durch diese Selektion auf stärkere Affinität findet man in der CDR1- und CDR2-Region eine hohe Anzahl an Austauschmutationen, während in den Gerüstregionen vorwiegend stille Mutationen zu finden sind. Auch dieser Mechanismus trägt dazu bei, die Diversivität der Antikörper zu erhöhen.

### 1.4 Autoimmunerkrankungen

Autoimmunerkrankungen sind gekennzeichnet durch Immunreaktionen, die von pathologischen Autoantikörpern oder autoreaktiven T-Zellen ausgehen und gegen körpereigenes Gewebe gerichtet sind.

Die Mechanismen des Immunsystems bei der pathologischen Reaktion auf körpereigene Antigene unterscheiden sich dabei prinzipiell nicht von der physiologischen Reaktion auf Infektionserreger oder Pathogene. Ein Unterschied besteht darin, dass das Immunsystem bei körpereigenen Antigenen nicht in der Lage ist, diese vollständig zu beseitigen. Es kommt daher im Gegensatz zu der physiologischen Reaktion zu einer lang anhaltenden Immunreaktion mit entsprechend starken Schädigungen des Organismus.

Die Ätiologie und Pathogenese von Autoimmunerkrankungen ist noch in vielen Details unbekannt, da sich die Erforschung aufgrund eines schleichenden Verlaufes mit einer subklinischen Phase ohne sichtbare Krankheitssymptome als schwierig erweist (Lam-Tse et al., 2002). Es hat sich gezeigt, dass Frauen weit häufiger von Autoimmunkrankheiten betroffen sind als Männer, was die Vermutung nahe legt, dass der hormonelle Status bei der Ätiologie eine gewisse Rolle spielt (Dooley & Hogan, 2003). Untersuchungen von eineiigen Zwillingen durch Brix et al. haben ergeben, dass aber auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle spielen müssen (Brix et al., 1998; Brix et al., 2000). Weiterhin haben Erbfaktoren einen starken Einfluss auf die Entwicklung von Autoimmunerkrankungen. Das gilt besonders für solche Gene, die den MHC-Typ festlegen (Lam-Tse et al., 2002). Die Beobachtung, dass bestimmten Autoimmunerkrankungen eine Infektion mit bestimmten Erregern vorausgegangen ist, läßt die Diskussion zu, ob bakterielle oder virale Infektionen eine Autoimmunreaktion auslösen können (Lindstrom, 2002). Es sind dabei verschiedene Mechanismen vorstellbar, die eine Autoimmunreaktion auslösen können. Dazu zählen zum einen das molekulare Mimikry, bei dem Antikörper gegen Infektionserreger mit körpereigenen Proteinen kreuzreagieren und zum anderen das Antigen-Adjuvanz-Prinzip, bei dem der Infektionserreger als Adjuvanz für ein körpereigenes Antigen dient. Durch verschiedene Studien an Patienten, die an rheumatoider Arthritis oder systemischem Lupus

erythematodes erkrankt sind, wurde deutlich, dass auch Faktoren wie das Rauchen, das Einnehmen bestimmter Medikamente (z.B. Interferon) und psychosozialer Stress an dem Auslösen einer Immunkrankheit beteiligt sein können (Dooley & Hogan, 2003).

Einen Defekt bei der Regulation des Immunsystems im Rahmen von Autoimmunkrankheiten konnten Balandina et al. bei Untersuchungen an Myasthenia gravis Patienten nachweisen. Sie zeigten, dass bei diesen Patienten die Funktionalität von bestimmten T-Zellen, die für die Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz notwendigen sind, vermindert ist (Balandina et al., 2005). Auch Defekte bei der Regulation des idiotypischen Netzwerks (Jerne, 1974) werden als Ursache für die Entstehung von Autoimmunkrankheiten diskutiert. Diese Hypothese wird durch Rückschlüsse von Untersuchungen mit therapeutisch intravenös verabreichten Antikörpern bei Patienten mit Autoimmunkrankheiten gestützt (Lacroix-Desmazes et al., 1996).

Das klinische Bild einer Autoimmunerkrankung wird durch die Art der Schädigung des Organismus durch pathologische Autoantikörper oder autoreaktive T-Zellen bestimmt. So führt eine Bindung und Zerstörung von körpereigenen, antigenträgenden Zellen zu einem Mangel an bestimmten Strukturen und es kommt zu entsprechenden Symptomen, wie z. B. zu Blutungen bei der autoimmunen Thrombozytopenie oder zu Schwäche, Dyspnoe und Tachykardie bei der autoimmunen hämolytischen Anämie, wo Thrombozyten bzw. Erythrozyten durch Autoantikörper gebunden und zerstört werden. Es kann aber auch durch Bindung von körpereigenen Antigenen zur Bildung von Immunkomplexen kommen, wie bei dem systemischen Lupus erythematodes. Die Immunkomplexe führen dann im weiteren Verlauf zu Entzündungen in der Niere, in den Gefäßen und in den Gelenken. Autoimmunbedingte Entzündungsreaktionen können weiterhin durch die Aktivierung oder das Fehlen von Zytokinen entstehen (Janeway & Travers, 1997).

Eine gewisse Sonderform bei den Autoimmunerkrankungen stellt die Bindung von Autoantikörpern an Rezeptoren dar, wie z. B. bei der Myasthenia gravis. Bei dieser Erkrankung binden Autoantikörper an den Acetylcholinrezeptor und blockieren damit die Erregungsübertragung an der neuromuskulären Endplatte. Rezeptoren können aber auch durch die Bindung von Autoantikörpern aktiviert werden, so bei der Graves`disease, wo Autoantikörper an die TSH-Rezeptoren der Schilddrüse binden, diese aktivieren und zu einer Überproduktion an Schilddrüsenhormonen führen (Janeway & Travers, 1997).

## **1.5 Therapie von Autoimmunerkrankungen**

### **1.5.1 Konventionelle Therapie**

Um die Zerstörung von körpereigenem Gewebe zu verhindern, versucht man die Immunabwehr durch die Gabe von Kortikosteroiden oder cytotoxischen Medikamenten zu unterdrücken und Entzündungsreaktionen zu hemmen. Eine unerwünschte Begleiterscheinung ist, dass nicht nur die schädigende, sondern auch die schützende Immunantwort beeinflusst wird. Die Therapie ist außerdem von zahlreichen Nebenwirkungen begleitet, da die Kortikosteroide an intrazelluläre Rezeptoren fast aller Körperzellen binden, um die Transkription spezifischer Gene zu steigern. So kommt es, neben der immunsuppressiven und entzündungshemmenden Wirkung, auch zu Flüssigkeitsstauungen

im Gewebe, Mineralverlusten in den Knochen, Gewichtszunahmen und in manchen Fällen auch zum Diabetes mellitus. Auch der Einsatz von cytotoxischen Medikamenten, wie Azathioprin und Cyclophosphamid ist nicht unproblematisch, da es durch die generelle Störung der DNA-Synthese in sich teilenden Körperzellen auch zu toxischen Effekten im gesunden Gewebe kommt. Man versucht daher die Nebenwirkungen so gering wie möglich zu halten, indem man die beiden Medikamente niedrig dosiert, dafür aber miteinander kombiniert (Janeway & Travers, 1997).

### **1.5.2 Therapie durch Antikörpergabe**

Eine mögliche Alternative zu der Therapie mit Kortikosteroiden und Cytotoxika hat man bei der Behandlung von einigen Autoimmunerkrankungen, wie z. B. der autoimmunen Thrombozytopenie oder der Myasthenia gravis gefunden. Es hat sich gezeigt, dass die intravenöse Gabe von hochdosierten Immunglobulinen der Klasse G zu therapeutischen Erfolgen führt. Im Gegensatz zu der oben beschriebenen konventionellen Therapie, ist diese Art der Behandlung aber kaum von Nebenwirkungen begleitet, so dass sie der konventionellen Therapie vorzuziehen ist (Kazatchkine & Kaveri, 2001). Der Nachteil der Behandlung mit hochdosierten Antikörpern liegt bei den hohen Kosten der Therapie (Bierling & Godeau, 2005). Desweiteren wird von Kritikern oftmals angeführt, dass es in der Literatur zwar zahlreiche Fallberichte über die erfolgreiche Anwendung von hochdosierten IgG gibt, kontrollierte Studien, mit daraus resultierenden Indikationen für den Einsatz von intravenös verabreichten, hochdosierten IgG, aber kaum durchgeführt wurden (Looney & Huggins, 2006).

### **1.5.3 Spezielle Behandlungsstrategien**

Einige Autoimmunerkrankungen werden neben der unspezifischen Therapie noch zusätzlich symptomatisch behandelt. So versucht man bei der Myasthenia gravis die Blockade der motorischen Endplatte der muskulären Nervenfasern durch Autoantikörper mit der Gabe von Acetylcholinesterase-Inhibitoren zu verhindern (Lindstrom, 2002). Bei der Rheumatoiden Arthritis bekämpft man die entzündlichen Veränderungen der Gelenke mit nichtsteroidalen Antiphlogistika und antirheumatischen Medikamenten wie Methotrexat und Hydroxychloroquine (Brod, 2002).

Eine spezielle Behandlung wird bei der Multiplen Sklerose mit schubförmigem Verlauf durchgeführt. Untersuchungen haben ergeben, dass bei der Behandlung mit Beta-Interferon die Stärke der Schübe verringert werden kann und neue Schübe hinausgezögert werden können. Zusätzlich behandelt man aber auch hier konventionell mit Kortikosteroiden und symptomatisch entsprechend der klinischen Erscheinungen (Chitnis & Khoury, 2003).

Neue Wege der spezifischen Therapie versucht man mithilfe der Gentechnik zu gehen. In Studien zur Therapie der Myasthenia gravis z.B. wird eine bakteriell hergestellte Acetylcholinrezeptor-Untereinheit dem Patienten oral oder nasal verabreicht. Man geht davon aus, dass das denaturierte Antigen keine B-Zell Antwort auslöst, sondern stattdessen eine gewisse Toleranz erzeugt wird, indem selektiv Suppressor T-Zellen induziert werden oder die Immunantwort durch Stimulation von T-Zellen und pathologisch irrelevanten B-Zellen

aufgespalten wird (Lindstrom et al., 1998; Link & Xiao, 2001; Im et al., 2000). In einem anderen Versuch wird mit einem synthetischen Mimitop der Antikörperbindungsstelle des Acetylcholinrezeptors behandelt, um die pathologischen Autoantikörper abzufangen (Venkatesh et al., 2000). Auch der therapeutische Einsatz von monoklonalen Antikörpern wird in der Literatur beschrieben. So zeigte z.B. der Antikörper Natalizumab (Tysabri®) in klinischen Studien eine sehr gute immunotherapeutische Wirkung bei der schubförmigen Verlaufsform der Multiplen Sklerose. Durch den humanisierten monoklonale Antikörper werden die Adhäsionsmoleküle der Blut-Hirn-Schranke und der T-Lymphozyten blockiert und damit das Einwandern der Lymphozyten in den Entzündungsherd verhindert. Leider wurden inzwischen auch drei Fälle von multifokaler Leukoenzephalopathie mit dem Antikörper in Verbindung gebracht (Bartt, 2006).

### **1.6 Intravenös verabreichtes Immunglobulin der Klasse G**

Intravenös verabreichte Immunglobuline der Klasse G, kurz IVIG genannt, wurden ursprünglich für die Therapie von humoralen Immundefizienzen, wie dem primären oder sekundären Antikörpermangel, entwickelt und eingesetzt. Als Paul Imbach 1981 entdeckte, dass auch die autoimmune, idiopathische Thrombozytopenie (AITP) erfolgreich mit IVIG behandelt werden kann (Imbach et al., 1981), eröffnete er damit eine Alternative in der Behandlung der AITP. Seitdem wurden, wie bereits oben erwähnt, zahlreiche Fallberichte über die erfolgreiche IVIG-Therapie von verschiedenen autoimmunen und entzündlichen Erkrankungen veröffentlicht, obwohl für die meisten Krankheiten kontrollierte Studien zur Wirksamkeit fehlen (Kazatchkine & Kaveri, 2001).

Die Herstellung bzw. Gewinnung der Immunglobulinpräparate erfolgt aus dem Plasma von 3.000 bis 60.000 gesunden Blutspendern durch Ethanol-Fraktionierung bei niedrigem pH (sog. Cohn Fraktionierung). Bei der Fraktionierung werden andere Serum-Proteine entfernt, so dass intaktes IgG mit Spuren von IgA, IgM, IgD und IgE zurückbleibt (Nowak-Wegrzyn & Lederman, 1999). Die Verteilung der IgG-Subklassen in den Immunglobulinpräparaten korreliert dabei mit der Verteilung der IgG-Subklassen im menschlichen Serum. Da die Cohn Fraktionierung nur eine nahezu vollständige Separierung von Immunglobulinen und anderen Proteinen zulässt, können in den IVIG Präparaten Spuren von bestimmten Zytokinen, sowie von anderen löslichen Plasmabestandteilen nachgewiesen werden (Lam et al., 1993; Blasczyk et al., 1993).

Die Halbwertszeit der infundierten Immunglobuline beträgt bei immunkompetenten Personen ca. 3 Wochen. Die Therapie wird in der Regel gut vertragen, weniger als 5 % der Patienten zeigen milde Nebenwirkungen wie Kopfschmerzen, Schüttelfrost, Übelkeit oder Glieder- und Muskelschmerzen (Kazatchkine & Kaveri, 2001). Lediglich bei Patienten mit bestimmten Vorerkrankungen, wie renaler Insuffizienz, Gefäßveränderungen und Migräne besteht ein größeres Risiko, dass es zu ernsthaften Zwischenfällen, wie Nierenversagen, Thromboembolie oder aseptischer Meningitis kommen kann (Brannagan, 2002).

#### **1.6.1 Wirkungsweise von IVIG**

Die Wirkungsweise von IVIG ist viel diskutiert, aber bisher nicht eindeutig geklärt. Sie scheint komplex, wobei in der Literatur zwischen immunmodulatorischen Wirkungen, die von den

antigenbindenden Fab-Fragmenten, ausgehen, und zwischen Wirkungen, die durch den Fc-Teil vermittelt werden, unterschieden wird. Man geht davon aus, dass aber auch mehrere Mechanismen nebeneinander für den therapeutischen Effekt von IVIG verantwortlich sein können.

### 1.6.1.1 Fc-vermittelte Effekte

Fc-vermittelte Effekte werden oft im Zusammenhang mit der autoimmunen, idiopathischen Thrombozytopenie (AITP) postuliert. Holt et al. konnte zeigen, dass die Wirksamkeit der IVIG-Therapie den Erfolg einer Milzentfernung bei AITP Patienten vorhersagen kann (Holt et al., 2003). Man geht daher davon aus, dass IVIG an den Fc-Rezeptoren auf den Zellen der Milz angreift. Der therapeutische Effekt scheint dabei in einer Sättigung der Fc $\gamma$ -Rezeptoren auf den Makrophagen der Milz und einer damit verbundenen Inhibition der antikörperabhängigen zellulären Zytotoxizität zu liegen (Sewell & Jolles, 2002; Dalakas, 1997). Man unterscheidet drei Klassen von Fc $\gamma$  Rezeptoren auf den Zellen der Milz: Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII. Fc $\gamma$ RI bindet ungebundenes IgG, während Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII IgG-Komplexe binden. Ericson et al. konnte zeigen, dass das Blocken von Fc $\gamma$ RI keinen Effekt bei der AITP hat (Ericson et al., 1996). Clarkson et al., Flesch et al. und Vossebeld et al. dagegen konnten demonstrieren, dass das Blocken von Fc $\gamma$ RII und Fc $\gamma$ RIII zu einem Anstieg der Thrombozytenzahl bei AITP-Patienten führt (Clarkson et al., 1986; Flesch et al., 1997; Vossebeld et al., 1997). Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung von Bussel und Teeling, dass ein kleiner IVIG- Anteil Dimere und Multimere bildet, welche eine größere Effektivität bei der Behandlung der AITP besitzen, als Monomere (Bussel, 2000; Teeling et al., 2001). Man kann sich daher zwei voneinander unabhängige Mechanismen der Fc-Rezeptor-Blockade vorstellen:

1. IVIG bildet Dimere und Multimere, die an die Fc-Rezeptoren binden
2. IVIG bindet Wirtsantigene, bildet somit Immunkomplexe, die dann kompetitiv die Fc-Rezeptoren blockieren (Lazarus & Crow, 2003).

Samuelsson et al. konnten im Maus-Modell der AITP folgendes zeigen: Binden Thrombozyten-Antikörper-Komplexe an Fc $\gamma$ RIII, dann wird ein Phagozytose-aktivierendes Signal ausgelöst. Binden die Immunkomplexe an Fc $\gamma$ RIIB, dann wird dieses Signal inhibiert und die Phagozytose von Thrombozyten-Antikörper-Komplexen verhindert. Die Wirkung von IVIG könnte dabei auf die Induktion von inhibitorischen Fc-Rezeptoren (Fc $\gamma$ RIIB) zurückzuführen sein (Crow et al., 2003). Dabei induzieren die Fc-Teile von IVIG die Oberflächenexpression von Fc $\gamma$ RIIB auf den Makrophagen der Milz wodurch das Gleichgewicht zwischen inhibierenden und aktivierenden Fc-Rezeptoren verschoben wird. Die Notwendigkeit der Fc $\gamma$ RIIB-Rezeptoren für die therapeutische Wirkung von IVIG wurde durch genetische Deletion und Fc $\gamma$ RIIB-blockende monoklonale Antikörper bewiesen (Samuelsson et al., 2001).

Ein anderer Ansatz zur Erklärung der therapeutischen Wirkung von IVIG geht von einem intrazellulären Fc-Rezeptor, dem sogenannten FcRn, aus. Antikörper, die nach Pinozytose an FcRn binden, sind vor dem Katabolismus im Lysosom geschützt und werden an der Zelloberfläche wieder freigesetzt. Werden nun die FcRn-Rezeptoren durch IVIG gesättigt, dann erhöht sich damit die Abbaurate der pathologischen Autoantikörper, woraus eine temporäre Verbesserung des Gesundheitszustandes des Patienten resultiert (Yu & Lennon, 1999; Hansen & Balthasar, 2002).

**1.6.1.2 Fab-vermittelte Effekte**

Aufgrund der kurzen Halbwertszeit von IVIG geht man heute davon aus, dass eine Wirkung über die Fc-Teile alleine nicht ausreicht, um die therapeutische Effizienz von IVIG zu erklären. Vor allem therapeutische Langzeitwirkungen von 6 Monaten und länger (Imholz et al., 1988) lassen sich nicht schlüssig interpretieren. Aus diesem Grund scheinen auch die Fab-Anteile der IgG eine entscheidende Rolle spielen. Folgende Fab-vermittelte Wirkungen werden in der Literatur beschrieben:

a) Effekte auf B-Zellen und Antikörper (antiidiotypische Interaktionen)

Dammacco et al. konnten beobachten, dass Langzeiteffekte der IVIG-Therapie bei der AITP mit einer erniedrigten Autoantikörper-Produktion verbunden sind (Dammacco et al., 1986). Dieses Phänomen erfordert eine Regulation der autoreaktiven B-Zellen. Im Maus-Versuch konnte Vassilev zeigen, dass spezifische autoreaktive B-Zellen durch IVIG herunterreguliert werden (Vassilev et al., 1999). Antiidiotypische Antikörper aus IVIG, d.h. Antikörper, die gegen die Bindungsstelle eines anderen Antikörpers oder deren benachbarter Region gerichtet sind (siehe Abbildung 3), könnten dabei an den B-Zell-Rezeptor der autoreaktiven B-Zellen binden und damit negative (hemmende) Signale induzieren (Diegel et al., 1994; Uher & Dickler, 1986).

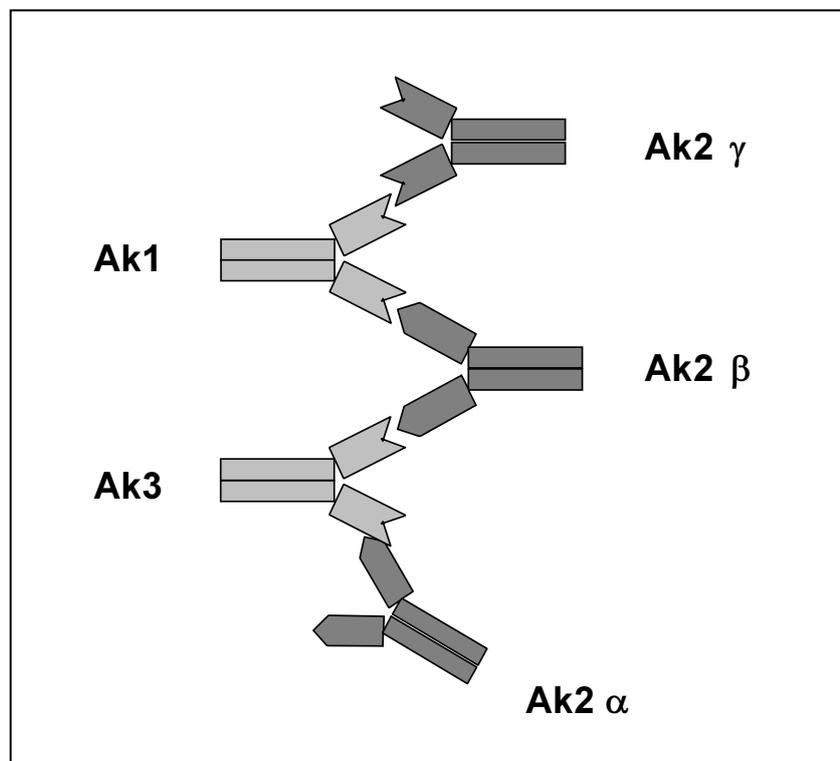


Abbildung 3 antiidiotypische Antikörper (Ak)

Ein kurzzeitiger therapeutischer Effekt von IVIG könnte durch die Neutralisation von Autoantikörpern durch antiidiotypische Antikörper aus IVIG gegeben sein (Sultan et al., 1984; Rossi et al., 1991; Kazatchkine et al., 1994; Dietrich & Kazatchkine, 1990; Lopez et al., 2000). In Experimenten konnten Rossi et al. und Ronda et al. säulenchromatographisch nachweisen, dass IVIG und Fab-Fragmente, die aus IVIG gewonnen wurden, in der Lage sind, Autoantikörper über antiidiotypische Bindung zurückzuhalten (Rossi et al., 1989; Ronda et al., 1994).

Es ist weiterhin durch Vassilev et al. und Hurez et al. gezeigt worden, dass IVIG auch Antikörper gegen CD4 und CD5 enthalten (Vassilev et al., 1993; Hurez et al., 1994). Interessanterweise ist CD5 auf T-Zellen, aber auch auf einer bestimmten Gruppe von B-Zellen, die an der Produktion von Auto-Antikörpern beteiligt sein sollen, exprimiert. Die Regulierung einer Autoimmunerkrankung durch IVIG wäre demnach auch auf diesem Weg vorstellbar.

### b) Effekte auf T-Zellen

Im Rahmen von Untersuchungen zum Einfluss von IVIG auf T-Zellen konnte man beobachten, dass IVIG die Anzahl von T-Helferzellen reduzieren (Tsubakio et al., 1983) und Adhäsions-Moleküle auf T-Zellen modulieren kann (Koffman & Dalakas, 1997). Langzeiteffekte von IVIG waren außerdem mit einer gesteigerten T-Supressorfunktion verbunden (Delfraissy et al., 1985).

### c) Effekte auf das Zellwachstum

Es wurden verschiedene in vitro Studien durchgeführt, in denen der Einfluss von IVIG auf bestimmte Zellpopulationen untersucht wurde. Amran et al. und Van Schaik et al. konnten nachweisen, dass IVIG die Proliferation von aktivierten B- und T-Lymphozyten, sowie von autonom wachsenden humanen Zelllinien inhibieren kann (Amran et al., 1994; Van Schaik et al., 1992). In Bezug auf Endothelzellen war es sogar möglich, die Aussage zu konkretisieren: IVIG ist in der Lage die Proliferation von Endothelzellen zeit- und dosisabhängig zu hemmen. Wahrscheinlich geschieht dieses durch einen Zell-Zyklus-Arrest in der  $G_0/G_1$  Phase. Interessanterweise waren hier Fab- und Fc-Fragmente gleichermaßen wirksam (Xu et al., 1998).

Bayry et al. konnte durch in vitro Versuche mit dendritischen Zellen zeigen, dass IVIG in der Lage ist, die Reifung, die Differenzierung und die Funktion von dendritischen Zellen zu inhibieren. Es wird dabei die IL-12 Sekretion der dendritischen Zellen vermindert und die IL-10 Sekretion verstärkt. Kostimulierende Moleküle auf den dendritischen Zellen werden herunterreguliert und die Zytokin-Sekretion moduliert. Als Folge wird die autoreaktive T-Zell-Aktivierung und T-Zell-Proliferation gehemmt. Auch hier wurde beobachtet, dass Fab- und Fc-Fragmente gleichermaßen an der Regulation beteiligt waren (Bayry et al., 2003).

Über dendritische Zellen konnte in vitro auch die Apoptose von T-Lymphozyten beeinflusst werden. IVIG war dabei in der Lage, bestimmte Signalmoleküle auf den dendritischen Zellen, die essentiell für die „Rettung“ von T-Lymphozyten vor dem Fas-vermittelten apoptotischen Zelltod sind, herunterzuregulieren und damit die Apoptose von T-Lymphozyten zu steigern (Bayry et al., 2003).

Eine andere in vitro Studie von Prasad et al. zeigte, dass IVIG den apoptotischen Zelltod von humanen Mono- und Lymphozyten über den Fas-vermittelten Weg direkt induzieren kann. Die Induktion ist dabei dosisabhängig und das Vorkommen von anti-Fas Molekülen in IVIG wichtig. Eine mögliche Erklärung wäre, dass anti-Fas Moleküle an aktivierte, autoreaktive T- und B-Zell Klone binden, die Fas auf ihrer Oberfläche exprimieren und damit die Apoptose der Zellen induziert wird. Prasad et al. konnten in diesem Zusammenhang auch zeigen, dass die Induktion durch intakte IVIG Moleküle stärker war, als durch Fab-Fragmente, die aus IVIG gewonnen wurden (Prasad et al., 1998).

Im Gegensatz dazu fanden Aktas et al. durch Untersuchungen, die den Einfluß von IVIG bei Multiple Sklerose-Patienten beleuchten sollten, heraus, dass IVIG nicht über die Fas-vermittelte Apoptose auf autoreaktive T-Zellen einwirkt. Sie beobachteten, dass IVIG in derselben Weise wie Interferon- $\beta$  die Proliferation von autoantigenen T-Zellen inhibiert (Aktas et al., 2001).

#### d) Andere immunmodulatorische Effekte

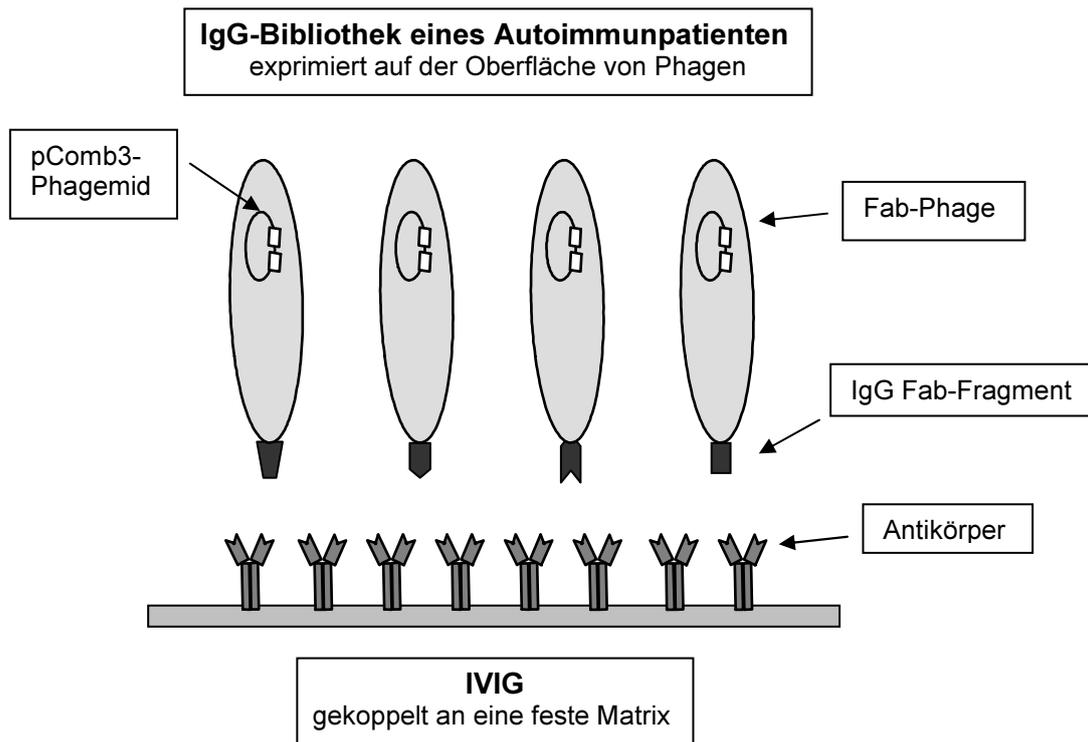
Untersuchungen zum Einfluss von IVIG auf die Zytokin-Regulation haben gezeigt, dass IVIG in der Lage ist, in die Produktion von Zytokinen und Zytokin-Antagonisten einzugreifen. Auch Zytokin-Rezeptor-Level können durch IVIG beeinflusst werden (Andersson et al., 1994; Andersson et al., 1993; Ruiz de Souza et al., 1995; Aukrust et al., 1994). Wird die Expression von Entzündungsmediatoren durch Zytokine induziert, dann ist IVIG in der Lage, die Expression herunterzuregulieren (Xu et al., 1998). Es wird davon ausgegangen, dass die antiinflammatorische Wirkung von IVIG primär auf diesen Mechanismen beruht.

Verschiedene Arbeitsgruppen haben gezeigt, dass IVIG auch Antikörper enthält, die bakterielle Toxine neutralisieren können (Leung, 1996; Ashkenazi et al., 1988; Leung et al., 1991). Besonders im Hinblick auf die Therapie des Kawasaki-Syndroms ist dies interessant, da man hier davon ausgeht, dass durch IVIG das als T-Zell-Superantigen agierende Staphylokokken-Toxin neutralisiert wird (Takei et al., 1993; Leung et al., 1987).

Ergebnisse von in vivo Experimenten an Tiermodellen und Beobachtungen bei Patienten, die mit IVIG behandelt wurden, zeigen, dass durch IVIG, insbesondere durch die Bindung von Komplement an das Fc-Fragment, die Deposition von aktiviertem Komplement verhindert bzw. reduziert wird. Als Folge wird die Bildung des MAC (*membranolytic attack complex*) verhindert und die komplement-vermittelte Zell-Lyse inhibiert (Basta et al., 1989; Frank et al., 2000; Sewell & Jolles, 2002; Dalakas, 2002).

### 1.6.2 Spezielle Untersuchungen zur antiidiotyischen Wirkungsweise von IVIG

Im Rahmen der Untersuchung der antiidiotyischen Effekte von IVIG auf das Immunsystem gelang der Arbeitsgruppe von PD Dr. Peter Fischer mithilfe der Phagen-Display-Technik und antiidiotyischen Biopanning auf IVIG (siehe 1.7 und Abbildung 4) erstmals die Klonierung und molekulare Analyse von thrombozytenbindenden IgG-Fab-Fragmenten von AITP Patienten (Jendreyko et al., 1998; Fischer et al., 1999).



**Abbildung 4** Versuchsaufbau des antiidiotypischen Biopanning mittels IVIG und präzipitierten Fab-Phagen einer IgG-Bibliothek eines Autoimmunpatienten

Die Sequenzierung der Fab-Fragmente ergab, dass diese überwiegend von der  $V_H$ -4 Genfamilie abstammten. Betrachtete man jedoch alle nicht-thrombozyten-bindenden, IVIG-gebundenen Fab, dann ergab sich, dass die  $V_H$  Keimbahn-Gensegmente 3-30 und 3-23 den häufigsten genetischen Ursprung der variablen Region der schweren Kette darstellten (Jendreyko et al., 1998). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Anwendung derselben Technik bei anderen Krankheitsbildern (systemischer Lupus erythematoses; Kawasaki-Syndrom) und bei einer gesunden Person ebenfalls zu einer Selektion von Fab-Fragmenten durch IVIG führt, die überwiegend von den Keimbahn-Genloci 3-30 und 3-23 abstammen (Hoffmann et al., 2000; Osei et al., 2000; Leucht et al., 2001).

Interessanterweise zeigte sich bei den Untersuchungen, dass die CDR3-Region und die leichten Ketten der Fab-Fragmente wenig Einfluss auf die Selektion durch IVIG haben (Hoffmann et al., 2000; Osei et al., 2000).

Diese Tatsachen, in Zusammenhang mit den oben bereits erwähnten langfristigen therapeutischen Erfolgen von IVIG, lassen auf eine grundlegende Bedeutung schließen und führen zu der Hypothese, dass IVIG neben der direkten Bindung von Autoantikörpern auch über eine B-Zell-Superantigen-artige Funktion auf die Regulation des B-Zell Repertoires einwirken. Regulatorische antiidiotypische Antikörper aus IVIG könnten dabei außerhalb der CDR-Regionen an eine genetisch familiär-konservierte Gerüstregion (z.B.  $V_H$  3-30 codiert) des B-Zell Rezeptors binden und damit eine große Anzahl von B-Zellen über den Zellrezeptor regulieren. Vorstellbar wäre hierbei eine Aktivierung des gesunden B-Zell Repertoires oder eine Inaktivierung von autoreaktiven B-Zellen.

Die Hypothese wird bestärkt durch das Ergebnis einer Untersuchung, die zeigt, dass nach einer Therapie mit IVIG eine Vielzahl von IVIG-bindenden B-Zell-Klonen aktiviert wurde (Leucht et al., 2001).

Versuche zum Vergleich der Bindungseigenschaften von IVIG mit den Bindungseigenschaften von bereits bekannten B-Zell Superantigenen, wie dem Protein A von *Staphylococcus aureus* oder dem gp120 Hüllprotein des HIV-1 Virus (Silverman, 1997) ergaben, dass die Bindungsstellen von IVIG nicht mit den Bindungsstellen von Protein A oder Glykoprotein 120 identisch sind (Osei et al., 2000).

### 1.7 Das Phagen Display System

Das Phagen Display System ist gekennzeichnet durch eine kombinierte Darstellung des Genotyps und des Phänotyps eines Proteins. Die codierenden Gensegmente eines Proteins werden dabei mit dem Gen für ein Phagenhüllprotein in einem Phagemid-Expressionsvektor verknüpft. Nach der Transfektion von *Escherichia coli* (*E.coli*) Bakterien und der Infektion mit geeigneten Helferphagen werden die in den Phagemidvektor klonierten Gene exprimiert und die rekombinanten Proteine auf der Oberfläche der replizierten Phagen präsentiert.

Der im Labor von Carlos F. Barbas im Skripps Research Institut, La Jolla, Californien entwickelte Phagemid-Expressionsvektor pComb3H ermöglicht die Herstellung von Phagen, die auf ihrer Oberfläche ein funktionelles Fab-Fragment präsentieren. Die codierende DNA für die leichte und schwere Kette wird dabei in das Genom des Vektor eingefügt, wobei durch die Kopplung der codierenden Sequenzen des Fd-Fragments der schweren Kette und des gIII Gens der Phagenhülle die Darstellung des Fab-Fragments auf der Phagenoberfläche nach der Expression erreicht wird. Die leichte Kette ist nicht mit der Phagenhülle verankert, sondern lagert sich nach der Expression über Disulfidbrücken an die schwere Kette an (Barbas & Burton, 1993; Barbas et al., 1991; Barbas & Lerner, 1991).

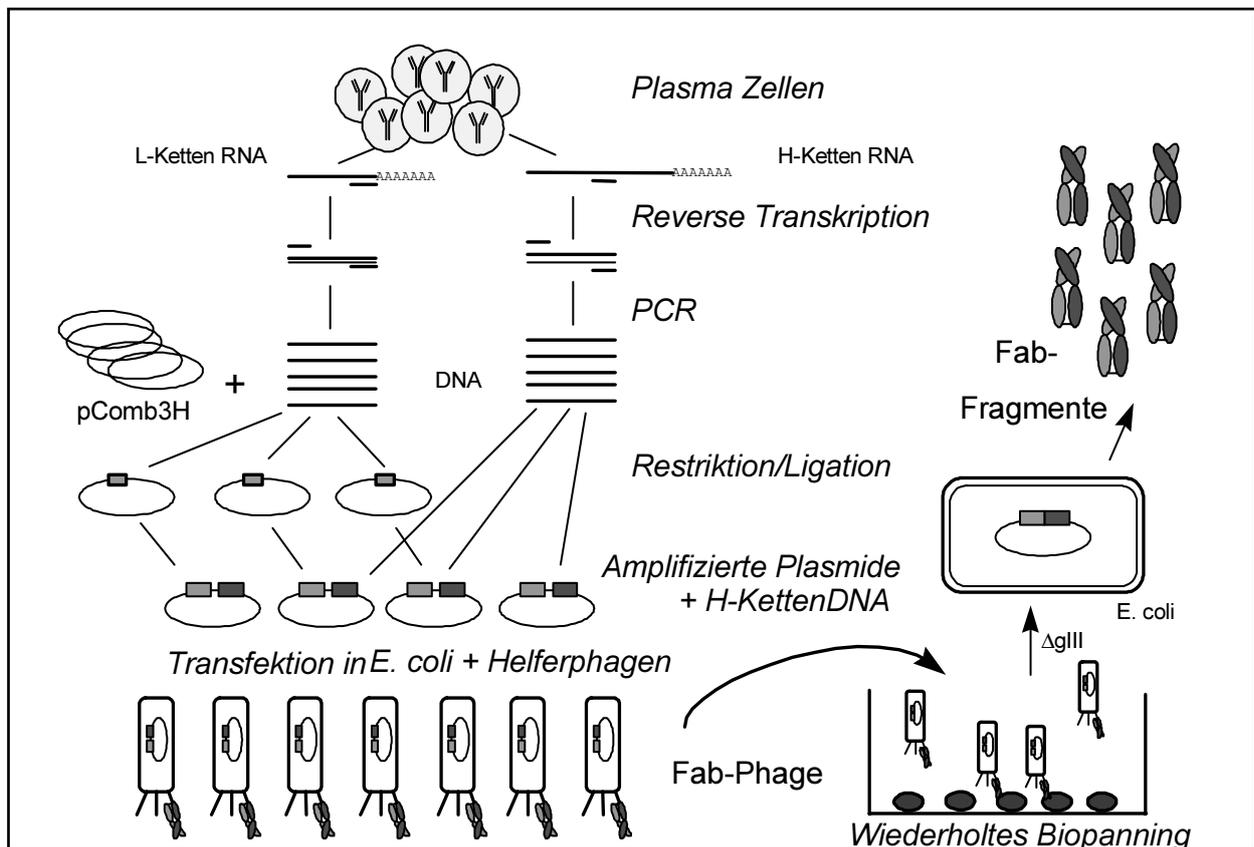
Kloniert man Fab-Fragment-codierende DNA, die aus einer Vielzahl von Plasmazellen eines Individuums gewonnen wurde, in das pComb3H-Phagen-Expressions-System, dann erhält man einen Fab-Phagen Pool, der bis zu  $10^8$  unterschiedliche Fab-Fragmente präsentiert, die so genannte kombinatorische Phagen-Display Bibliothek. Die präsentierten Fab-Fragmente repräsentieren dabei das Antikörper-Repertoire des Individuums, von dem die Plasmazellen gewonnen wurden.

Für die Erstellung einer Fab-Phagen-Bibliothek wird aus Plasmazellen gewonnene mRNA in DNA umgeschrieben. Mittels PCR und spezifischen Primern werden die DNA für die leichten Ketten und die DNA für die schweren Ketten unabhängig voneinander amplifiziert und in den pComb3H-Vektor kloniert. Um die Fab-Phagen zu exprimieren, werden *E. coli* Bakterien mit dem leichten und schweren Kette kodierenden Vektor transformiert. Nach dem Amplifizieren der infizierten *E.coli* Kultur wird durch Zugabe von Helferphagen die Produktion von Fab-Phagen induziert, wobei durch Antibiotika-Resistenzen ein Selektionsvorteil der Fab-Phagenproduzierenden *E.coli* erreicht wird. Die produzierten Fab-Phagen werden anschließend durch Sedimentation der *E.coli* Bakterien und Präzipitation des Phagenüberstandes aus der *E.coli* Kultur isoliert.

Im anschließenden Biopanning können aus der kombinatorischen Phagen-Display Bibliothek diejenigen Fab-Phagen isoliert werden, die in Wechselwirkung mit einem fixierten Liganden treten. Dabei werden ca.  $10^{12}$  Fab-Phagen mit dem Liganden inkubiert und nicht gebunden

Fab-Phagen anschließend durch wiederholte Waschungen entfernt. Im nachfolgenden Elutionsschritt werden die spezifisch gebundenen Fab-Phagen vom Liganden gelöst. Die eluierten Fab-Phagen werden über Nacht in *E. coli* amplifiziert und nach Präzipitation in einer neuen Biopanning-Runde eingesetzt. Durch wiederholte Biopanning-Runden können so spezifisch gebundene Fab-Phagen angereichert werden.

Das Phagen Display System macht es möglich, im Anschluß an das Biopanning die codierenden DNA-Sequenzen der gebundenen Fab-Fragmente direkt zu sequenzieren und zu analysieren (Jendreyko et al., 1998; Hoffmann et al., 2000; Osei et al., 2000; Leucht et al., 2001). Für experimentelle oder therapeutische Zwecke ist es durch das pComb3H-System außerdem möglich, nach Deletion des Genfragments für das pIII Protein die selektierten Fab-Fragmente als lösliche Proteine in *E. coli* Bakterien zu produzieren. Die nach der Expression in einem *E. coli* Lysat vorliegenden Fab-Fragmente sollten vor der weiteren Verwendung in einem weiteren Schritt säulenchromatographisch aufgereinigt werden (Barbas & Burton, 1993).



(Fischer, 1997)

Abbildung 5 Phagen Display- / Biopanning-Technik

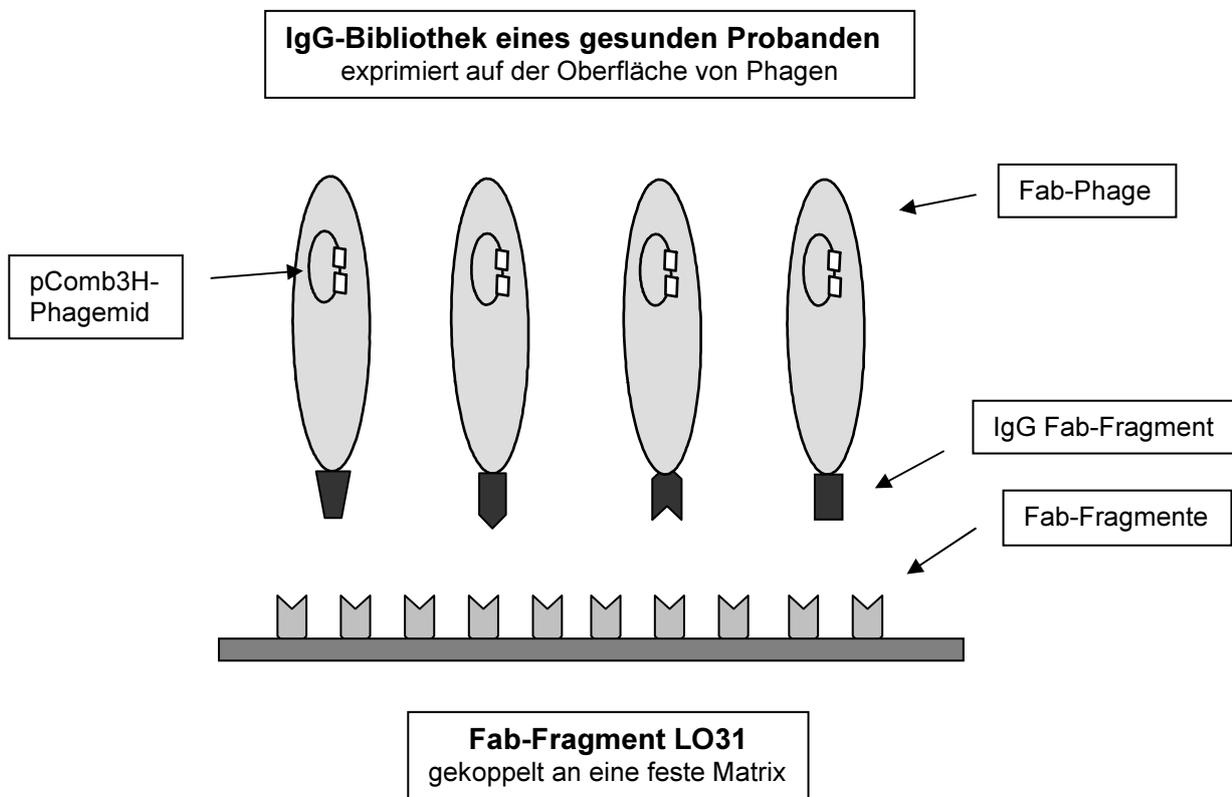
**1.8 Ziel der Arbeit**

Um genauere Aussagen über potentiell regulatorische IVIG-Moleküle machen zu können und durch rekombinante Produktion der therapeutisch relevanten Antikörper aus IVIG eine mögliche klinische Relevanz zu erreichen, war es Ziel dieser Arbeit, die regulatorischen Antikörper mit Hilfe des Phagen Display Systems und antiidiotypischen Biopannings zu isolieren. Im weiteren Verlauf der Arbeit sollten die isolierten Fab-Fragmente durch Sequenzierung und Bindungstests näher charakterisiert werden.

Da auch in der Veterinärmedizin Autoimmunerkrankungen wie die idiopathische Thrombozytopenie, die primäre immunhämolytische Anämie oder der systemische Lupus erythematosus vor allem bei Klein- aber auch bei Großtieren beschrieben werden (Lewis & Meyers, 1996; Putsche et al., 2005; Larson et al., 1983; Kohn et al., 2006; Gershwin, 2005), ist die Übertragung des Versuchsansatzes in den Veterinärbereich denkbar.

Wie in der Humanmedizin werden auch in der Veterinärmedizin Autoimmunerkrankungen aufgrund von fehlender Ätiologie und Pathogenese mit Kortikosteroiden und cytotoxischen Medikamenten behandelt. Eine Therapie mit IVIG wird nicht durchgeführt, da dieses für die Veterinärmedizin nicht zur Verfügung steht.

Für die Isolation der regulatorischen Antikörper aus IVIG sollte in dem antiidiotypischen Biopanning folgender Versuchsaufbau gewählt werden (siehe Abbildung 6):



**Abbildung 6** Versuchsaufbau des antiidiotypischen Biopanning mittels Fab-Fragment LO31 und präzipitierten Fab-Phagen einer IgG-Bibliothek eines gesunden Probanden

Als „Köder“ (Ligand) für die Selektion der regulatorischen Antikörper sollte das Fab-Fragmente LO31 eingesetzt werden. Es wurde in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Peter Fischer isoliert (Jendreyko et al., 1998) und zeichnete sich durch folgende Eigenschaften aus:

- Es wurde über Phagendisplay und Selektion mit IVIG von einer Patientin mit chronischer AITP und systemischem Lupus erythematoses gewonnen.
- Es bindet Thrombozyten.
- Der genetische Ursprung der schweren Kette ist V<sub>H</sub> 3-30.

Das Fab-Fragment LO31 sollte, als Vorbereitung für das Biopanning, mit dem pComb3H-System in *E.coli* hergestellt, säulenchromatographisch aufgereinigt und an eine feste Matrix gebunden werden.

Als Bindungspartner für das Fab-Fragment LO31 sollte im Biopanning eine IgG-Fab-Phagen-Bibliothek eines gesunden Probanden eingesetzt werden (Hoffmann et al., 2000). Diese sollte im Biopanning eine Teilmenge von IVIG repräsentieren, aus dem potentiell regulatorische Antikörper isoliert werden.

Nach dem Biopanning sollten die selektierten Fab-Phagen durch Sequenzierung strukturell und durch die Bestimmung der Bindungseigenschaften funktionell charakterisiert werden.

Für die Bindungstests sollten Fab-Fragmente, die in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Peter Fischer bereits isoliert und sequenziert wurden und einen unterschiedlichen genetischen Ursprung aufweisen, als lösliche Fab-Fragmente in *E.coli* hergestellt und säulenchromatographisch aufgereinigt werden.