

Aus dem  
Deutschen Rheuma-Forschungszentrum Berlin

DISSERTATION

**Analyse der B-Zellantwort im Modell der  
Glukose-6-Phosphat-Isomerase-induzierten  
Arthritis**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Jae-Yun Lee  
Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. Thomas Kamradt  
2. Prof. Dr. med. Achim Kramer  
3. Prof. Dr. rer. nat. Rolf Bräuer

Datum der Disputation: 04.04.2011

Datum der Zeugnisübergabe: 05.06.2011

*„Wenn zwei Knaben jeder einen Apfel haben und sie diese Äpfel tauschen, hat am Ende auch nur jeder einen. Wenn aber zwei Menschen je einen Gedanken haben und diese tauschen, hat am Ende jeder zwei neue Gedanken.“*

Platon

사랑하는 어머니님과 아버지께 이 논문을 바칩니다.

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Rheumatoide Arthritis</b>	<b>1</b>
1.1.1	Ätiologie und Pathogenese der RA	3
1.1.2	Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der RA	4
1.1.3	Rolle der T-Zellen und MHC-Moleküle in der Pathogenese der RA	7
1.1.4	Die Rolle der Zytokine in der Pathogenese der RA	8
<b>1.2</b>	<b>Tiermodelle der RA</b>	<b>10</b>
1.2.1	Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)	11
1.2.2	Das K/BxN-Modell	13
1.2.3	Die G6PI-induzierte Arthritis	17
<b>1.3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>21</b>
<b>2</b>	<b>Material</b>	<b>22</b>
<b>2.1</b>	<b>Mäuse</b>	<b>22</b>
<b>2.2</b>	<b>Chemikalien und Enzyme</b>	<b>22</b>
<b>2.3</b>	<b>Antikörper</b>	<b>24</b>
2.3.1	Antikörper für die Verwendung im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Epitop-Screening	24
2.3.2	Antikörper für die Verwendung im Enzyme-linked Immunosorbent Spot (ELISPOT)	24
<b>2.4</b>	<b>Peptide</b>	<b>25</b>
<b>2.5</b>	<b>Zellkulturen, Puffer und Lösungen</b>	<b>25</b>
2.5.1	Zellkulturmedien	25
<b>2.6</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>25</b>
2.6.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Sodium-Dodecyl-Sulfate)	25
2.6.2	FACS	26
2.6.3	Puffer zur Aufreinigung von rekombinanter G6PI	26
<b>2.7</b>	<b>ELISA</b>	<b>27</b>
<b>2.8</b>	<b>ELISPOT</b>	<b>27</b>
<b>2.9</b>	<b>SPOT-Synthese</b>	<b>28</b>
<b>2.10</b>	<b>Epitop-Screening</b>	<b>28</b>
<b>2.11</b>	<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>28</b>
<b>2.12</b>	<b>Geräte</b>	<b>29</b>

<b>3</b>	<b>Methoden</b>	<b>31</b>
<b>3.1</b>	<b>Methoden der Proteinbiochemie</b>	<b>31</b>
3.1.1	Überexpression der rekombinanten humanen G6PI (rhG6PI)	31
3.1.2	Aufreinigung der rhG6PI mittels Affinitätschromatographie	31
3.1.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	32
3.1.4	Enzymaktivität der G6PI	33
<b>3.2</b>	<b>Methoden der Zellbiologie</b>	<b>34</b>
3.2.1	Zellkultur	34
3.2.2	Gewinnung der Zellen aus der Milz und den Lymphknoten	34
3.2.3	Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark	35
3.2.4	Proliferationstest	35
3.2.5	ELISA	36
3.2.6	ELISPOT	38
<b>3.3</b>	<b>SPOT-Technologie</b>	<b>39</b>
3.3.1	SPOT-Synthese von Peptiden	39
3.3.2	Pepscan-Verfahren	43
<b>3.4</b>	<b>Peptidsynthese</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Tierversuche</b>	<b>44</b>
3.5.1	Immunisierung	44
3.5.2	Serum- und Blutgewinnung	45
3.5.3	Klinischer Verlauf der Arthritis	45
3.5.4	Histologie	45
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
<b>4.1</b>	<b>Kinetik und Lokalisation der B-Zellantwort gegen rhG6PI</b>	<b>47</b>
<b>4.2</b>	<b>Epitop-spezifische Analyse der Autoantikörper-Antwort gegen rhG6PI</b>	<b>49</b>
4.2.1	Identifizierung immundominanter B-Zellepitope der G6PI	50
4.2.2	Die Lage der immundominanten Epitope in der Kristallstruktur der humanen G6PI	56
4.2.3	Das immundominante Epitop rhG6PI <sub>456-476</sub> und seine pathogene Bedeutung als Hauptepitop der anti-G6PI-Antikörper	57
4.2.4	Die polyklonalen anti-G6PI-Antikörper erkennen vorwiegend lineare Epitope der rhG6PI	60
4.2.5	Niedrige Affinität der nach primärer Immunisierung mit rhG6PI produzierten Antikörper	62
<b>4.3</b>	<b>Die pathogenetische Relevanz des Peptids rhG6PI<sub>458-472</sub> als Immunogen</b>	<b>63</b>
4.3.1	Versuch einer Arthritisinduktion bei DBA/1-Mäusen durch Immunisierung mit dem Peptid rhG6PI <sub>458-472</sub>	63

4.3.2	Histologische Analyse der DBA/1-Mäuse nach Immunisierung mit dem Peptid rhG6PI <sub>458-472</sub> .....	65
4.3.3	T-Zellantwort gegen das Peptid rhG6PI <sub>458-472</sub> .....	66
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>69</b>
<b>5.1</b>	<b>Lokalisation und Kinetik der G6PI-spezifischen Plasmazellen .....</b>	<b>69</b>
<b>5.2</b>	<b>Rolle der anti-G6PI-Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis .....</b>	<b>73</b>
5.2.1	Charakterisierung der anti-G6PI-Antikörper .....	73
5.2.2	Pathogenetische Relevanz der Erkennung des immundominanten Epitops rhG6PI <sub>458-472</sub> durch anti-G6PI-Antikörper .....	76
5.2.3	Pathogenetische Relevanz der Erkennung des Epitops rhG6PI <sub>458-472</sub> als Immunogen in vivo .....	81
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>84</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>86</b>
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>89</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>98</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>100</b>
	<b>Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>102</b>

# 1 Einleitung

## 1.1 Rheumatoide Arthritis

Die Rheumatoide Arthritis (RA) ist eine chronische entzündliche Systemerkrankung des Bindegewebes mit primärem Befall der peripheren Gelenke. Mit einer Prävalenz von 1 % in der westlichen Bevölkerung ist die RA die häufigste entzündliche Gelenkerkrankung. Bei einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 30. und 50. Lebensjahr beträgt die Inzidenz dieser Autoimmunerkrankung 30/100.000 Einwohner, wobei Frauen etwa dreimal häufiger erkranken als Männer. Die RA ist durch eine chronische Entzündung in den synovialen Gelenken mit Ausbildung eines Pannus charakterisiert, der im weiteren Verlauf zur Gelenkdeformation mit Funktionsverlust führt. Eine fortgeschrittene RA führt daher häufig zur Arbeitsunfähigkeit mit stark eingeschränkter Lebensqualität (Wolfe and Hawley 1998; Gabriel 2001) und geht mit einer erhöhten Mortalität einher (Pincus, Brooks et al. 1994).

Typischerweise sind bei der RA die kleinen Gelenke der Hände und Füße symmetrisch befallen. Im frühen Stadium der Erkrankung sind vor allem die Metacarpophalangeal- (MCP) und proximalen Interphalangealgelenke der Finger (PIP), die Handgelenke, die Interphalangealgelenke der Zehen, sowie die Metatarsophalangealgelenke (MTP) der Füße betroffen, insbesondere im späten Stadium aber auch das Knie-, Sprung-, Ellenbogen-, und Schultergelenk (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Spätstadium der Rheumatoiden Arthritis mit Gelenkdeformation der Hände und Finger.** Die chronische Entzündung in den Hand- und Fingergelenken führt bei langjährigem Verlauf zu den typischen Erscheinungsbildern der MCP-Ulnardeviation, MCP-Subluxation, Schwanenhals- und Knopflochdeformität. 2010 Copyright © Cedars-Sinai, Arthritis – Rheumatoid Arthritis, Osteoarthritis and Spinal Arthritis. <http://www.cedars-sinai.edu/Patients/Health-Conditions/Arthritis--Rheumatoid-Arthritis-Osteoarthritis-and-Spinal-Arthritis.aspx>

In 25 % bis 80 % der Fälle ist die obere Halswirbelsäule befallen, was nicht selten zu neurologischen Komplikationen führen kann (Nguyen, Ludwig et al. 2004). Die Diagnose und Klassifikation der RA wird anhand des Vorliegens der Kriterien des *American College of Rheumatology* gestellt (Arnett, Edworthy et al. 1988). Sind vier der sieben Kriterien erfüllt, gilt die Diagnose einer RA als gesichert (Tab. 1). Als Systemerkrankung kann sich der Entzündungsprozess auch auf andere Organsysteme des Körpers ausbreiten und trifft häufig Patienten mit schweren Krankheitsverläufen. Extraartikuläre Manifestationen zeigen sich beispielsweise in Form von Rheumaknoten an der Haut, können aber auch Herz, Lunge, Niere, Augen und Gefäße (Klippel and Dieppe 1998; Maddison, Isenberg et al. 2004) betreffen.

Eine Sonderform der RA ist das Felty-Syndrom, das vorwiegend bei langjährigen und schweren Krankheitsverläufen auftritt. Es betrifft ca. 1 % der RA-Patienten und entwickelt sich bei Frauen dreimal häufiger als bei Männern. Das Felty-Syndrom ist durch die Triade Rheumatoide Arthritis, Splenomegalie und Leukopenie gekennzeichnet. Bei besonders schwerem Verlauf zeigen sich bei einigen Patienten zusätzlich große Unterschenkelgeschwüre.



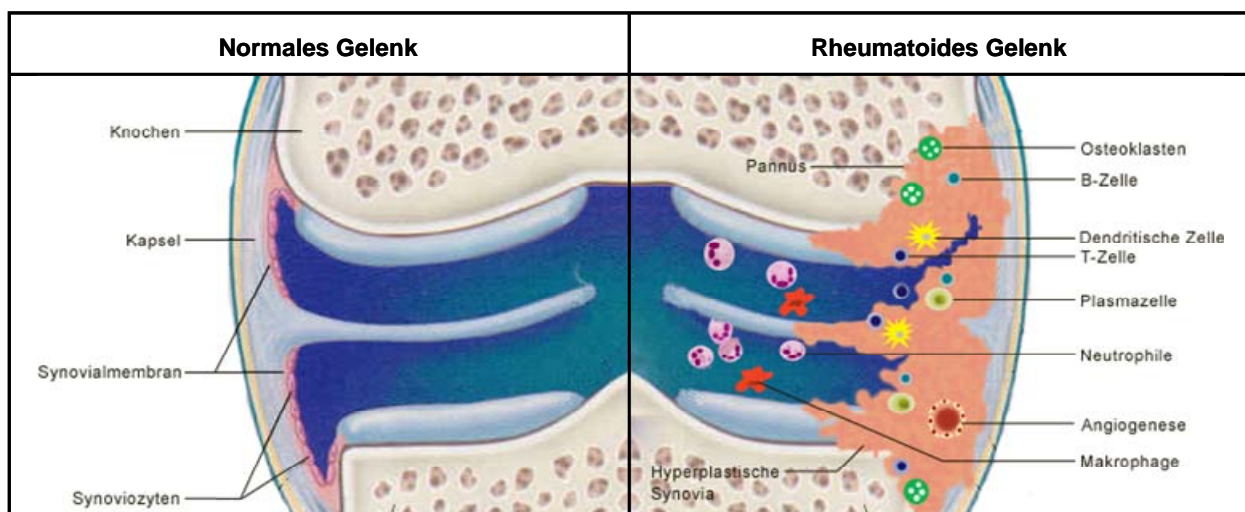
**Table 1: Die revidierten ACR-Kriterien für die Diagnose der RA (Arnett, Edworthy et al. 1988).** Die Diagnose der RA erfordert mindestens vier der sieben Kriterien, wobei die Kriterien 1 bis 4 wenigstens über einen Zeitraum von sechs Wochen auftreten müssen.

<b>Symptome und Zeichen</b>	<b>Beschreibung</b>
1. Morgensteifigkeit	In einem Gelenk während mindestens einer Stunde.
2. Arthritis in drei oder mehr Gelenkregionen	Objektiv beobachtete fluktuierende Kapselschwellung in mindestens drei von vierzehn Gelenkregionen: beidseits Metacarpophalangealgelenke (MCP), proximale Interphalangealgelenke (PIP), Hand-, Ellenbogen-, Knie, Sprung- und Metatarsophalangealgelenke (MTP).
3. Arthritis an Hand- oder Fingergelenken	Befall mindestens eines Hand-, Metacarpophalangeal- oder proximalen Interphalangealgelenks.
4. Symmetrische Arthritis	Gleichzeitig beidseitiger Befall der gleichen Gelenkregion.
5. Subkutane Rheumaknoten	Objektiv beobachtete subkutane Knoten über Knochenvorsprüngen oder gelenknahen Streckseiten.
6. Rheumafaktornachweis	Nachweis von Rheumafaktoren mit einer Methode, deren positiver Nachweis unter 5 % einer normalen Kontrollgruppe liegt.
7. Radiologische Veränderungen der Gelenke	Typische Veränderungen der dorsovolaren Handaufnahme mit gelenknaher Osteoporose und/oder Erosionen der betroffenen Gelenke.

### 1.1.1 Ätiologie und Pathogenese der RA

Trotz intensiver Bemühungen ist die Ätiologie und Pathogenese der RA nur unvollständig geklärt. Sexualhormone, genetische Prädisposition und Umweltfaktoren scheinen die Erkrankung zu beeinflussen, so dass von einem multifaktoriellen Geschehen auszugehen ist (van Boekel, Vossenaar et al. 2002; Masi, Aldag et al. 2006).

Nach derzeitigem Forschungsstand werden in einem genetisch suszeptiblen Individuum T-Zellen durch ein bisher noch nicht identifiziertes Antigen aktiviert. Als Folge dieser Initialreaktion kommt es zu einer fehlgeleiteten Immunantwort mit nachfolgender Aktivierung und Proliferation von Synovialzellen und Endothelzellen sowie einer Aktivierung und Einwanderung inflammatorischer Zellen in das Gelenk. Im Rahmen dieser Entzündungsreaktion wird die Sekretion von Zytokinen und Proteasen vor allem durch Makrophagen sowie eine Aktivierung der B-Zellen mit Produktion von Autoantikörpern induziert, die das Fortschreiten der Erkrankung weiter begünstigen.



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Gelenkveränderungen bei RA.** In einem normalen Gelenk (links) sind die artikulierenden Gelenkflächen von einer Knorpelschicht bedeckt. Die Gelenkhöhle wird von einer Gelenkkapsel umschlossen, die auf der Innenseite kontinuierlich in die Synovialmembran übergeht. Diese besteht aus lockerem Bindegewebe und einer dünnen Deckzellschicht aus Synoviozyten. Im Vergleich dazu ist in einem rheumatoiden Gelenk (rechts) die Synovialmembran massiv hypertrophiert und durch B-, T-, und Plasmazellen, sowie Makrophagen, Neutrophile und dendritische Zellen infiltriert. Die chronische Entzündung der Synovia führt im weiteren Verlauf zur Pannusformation mit Aktivierung von Osteoklasten und zur Gefäßneubildung. (Darstellung modifiziert aus: Choy and Panayi, N Engl J Med, 2001;2001 Mar 22;344(12):907-16).

### 1.1.2 Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese der RA

B-Zellen spielen in der Pathogenese der RA eine wichtige Rolle. Die Depletion von B-Zellen mit dem monoklonalen Antikörper Rituximab brachte in der Therapie der RA große Erfolge (Edwards, Szczepanski et al. 2004; Cohen, Emery et al. 2006; De Vita and Quartuccio 2006). Die Entdeckung der Rheumafaktoren (RF) im Serum von RA-Patienten führte schon früh zu der Annahme, dass es sich bei der RA um eine Autoimmunerkrankung handelt. RF sind Autoantikörper der Klassen IgE, IgM, IgA und IgG, die spezifisch den Fc-Teil von Immunglobulinen binden. Bei der RA handelt es sich meist um IgM-RF, die bei 80 % aller RA-Patienten nachweisbar, jedoch nicht

spezifisch für RA sind (Dörner, Egerer et al. 2004). Erhöhte RF-Titer finden sich beispielsweise auch bei anderen Autoimmunerkrankungen (Sjörgen-Syndrom), chronisch-entzündlichen Erkrankungen (Hepatitis C oder Tuberkulose) sowie zu einem geringen Teil auch bei gesunden Menschen (van Boekel, Vossenaar et al. 2002). Obwohl ein eindeutiger Zusammenhang zwischen der Konzentration der RF im Serum und dem Schweregrad der RA besteht, ist der zugrundeliegende Pathomechanismus der RF nicht geklärt (van Boekel, Vossenaar et al. 2002). RF sind wahrscheinlich an der Bildung großer Immunkomplexe beteiligt und begünstigen das Voranschreiten der Erkrankung, indem sie das Komplementsystem aktivieren und die Zytokinsynthese initiieren (Dörner, Egerer et al. 2004).

Bisher werden trotz geringer Spezifität nur die RF als Markerantikörper in der Diagnostik der RA verwendet. Neben den RF konnten noch eine Reihe anderer Autoantikörper im Serum von RA-Patienten detektiert werden. Der Großteil dieser Antikörper ist vermutlich nicht direkt in die Pathogenese der RA involviert. Einige dieser Autoantikörper scheinen jedoch im Vergleich zu den RF eine höhere Krankheitsspezifität zu haben, weshalb sie im Folgenden näher beschrieben werden sollen.

#### Antikörper gegen citrullinierte Antigene

Es gibt eine Vielzahl weiterer Autoantigene, die von den Autoantikörpern der RA-Patienten erkannt werden. Von besonderer Bedeutung sind hierbei Antikörper, die gegen citrullinierte Antigene gerichtet sind. Die Citrullinierung ist ein physiologischer Prozess, der durch enzymatische Desaminisierung der Aminosäure Arginin bewerkstelligt wird und eine posttranslationale Modifikation von Proteinen darstellt (Pritzker, Joshi et al. 2000). Zielantigen der Anti-Keratin-Antikörper sowie des antiperinukleären Faktors ist citrulliniertes Fillagrin (Simon, Girbal et al. 1993; Sebbag, Simon et al. 1995; Girbal-Neuhauser, Durieux et al. 1999). Weitere citrullinierte Antigene, die in der Synoviaflüssigkeit und in der entzündeten Synovia identifiziert werden konnten, sind Fibrinogen, Vimentin und  $\alpha$ -Enolase.

Der Nachweis von Antikörpern gegen citrullinierte Antigene beruht bei den derzeitigen Testsystemen auf synthetisch hergestellten, cyclischen citrullinierten Peptiden (CCP). Im Vergleich zu den RF besitzen anti-CCP-Antikörper bei ähnlicher Sensitivität von 40 % bis 75 % eine Spezifität von über 96 % in Patientenpopulationen mit etablierter Erkrankung (Bizzaro and Tampona 2008).

Neben der hohen diagnostischen Spezifität für RA stellen anti-CCP-Antikörper einen wertvollen diagnostischen Marker in der Frühdiagnostik der RA dar.

#### Anti-RA33-Antikörper

Anti-RA33-Antikörper sind gegen das heterogene Ribonukleoprotein A2 gerichtet, das beim Splicevorgang und Transport der mRNA beteiligt ist (Hassfeld, Steiner et al. 1989; Steiner, Hartmuth et al. 1992). Anti-RA33-Antikörper konnten nur bei 36 % aller RA-Patienten nachgewiesen werden, besitzen jedoch mit 90 % eine hohe Spezifität für RA (Hassfeld, Steiner et al. 1993). Trotz niedriger Sensitivität kann die Bestimmung dieses Antikörpers insbesondere bei anti-CCP-negativen Patienten oder Patienten mit niedrigtitrigem RF als diagnostisches Hilfsmittel dienen (Steiner and Smolen 2002; Nell, Machold et al. 2005). Des Weiteren finden sich anti-RA-33-Antikörper bereits im frühen Stadium der RA, so dass sie als serologischer Marker in der frühen Diagnostik der RA verwendet werden könnten.

#### Anti-Glukose-6-Phosphat-Isomerase-Antikörper

Die Glukose-6-Phosphat-Isomerase (G6PI) ist ein glykolytisches Enzym, das die Konversion von Glukose-6-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat katalysiert und das ubiquitär exprimiert wird. Die G6PI besitzt als Zytokin auch extrazelluläre Funktionen und ist identisch mit den unter „autocrine motility factor“, Neuroleukin oder „differentiation and maturation factor“ bekannten Proteinen (Chaput, Claes et al. 1988; Faik, Walker et al. 1988; Watanabe, Takehana et al. 1996; Xu, Seiter et al. 1996).

Im K/BxN-Modell exprimieren Mäuse einen transgenen T-Zellrezeptor, der ein Epitop der G6PI erkennt und zu einer spontanen Arthritis mit Produktion von arthritogenen Antikörpern gegen G6PI führt (Kouskoff, Korganow et al. 1996; Matsumoto, Staub et al. 1999). Erhöhte anti-G6PI-Titer konnten auch bei einigen RA-Patienten nachgewiesen werden (Schubert, Schmidt et al. 2002; Jouen, Vittecoq et al. 2004; Schaller, Stohl et al. 2004).

Die bislang publizierten Studien führten jedoch zu kontroversen Ergebnissen, so dass eine eindeutige Aussage über die diagnostische Wertigkeit der anti-G6PI-Antikörper derzeit nicht möglich ist (Schubert, Schmidt et al. 2002). Insgesamt scheint die G6PI als pathogenes Autoantigen keine wesentliche Rolle in der Entwicklung der humanen RA zu spielen. In einem Tiermodell konnte jedoch gezeigt werden, dass durch Immunisierung mit G6PI auch in genetisch unveränderten Mäusen eine Arthritis

induziert werden kann (Schubert, Maier et al. 2004). Damit steht ein Modell zur Verfügung, das die Identifizierung neuer humanrelevanter Pathomechanismen der RA ermöglicht. Obwohl im Gelenk Ablagerungen von Immunkomplexen gefunden wurden (Ishikawa, Smiley et al. 1975) ist noch nicht bewiesen, dass Antikörper gegen die eben beschriebenen Antigene pathologisch relevant sind. Daneben spielen auch Mechanismen der angeborenen Immunität eine Rolle. Seit langem ist bekannt, dass Komplement in der Synovialflüssigkeit von RA-Patienten aktiviert ist und mit einem erhöhten Verbrauch der Komplementfaktoren C3 und C4 einhergeht (Moxley and Ruddy 1987; Jose, Moss et al. 1990; Hogasen, Mollnes et al. 1995).

### **1.1.3 Rolle der T-Zellen und MHC-Moleküle in der Pathogenese der RA**

Zwillingsstudien und andere genetische Untersuchungen zeigten deutlich die Beteiligung genetischer Faktoren in der Pathogenese der RA. Die Konkordanzrate bei eineiigen Zwillingen liegt bei 10 % bis 30 % und ist gegenüber zweieiigen Zwillingen um das Vierfache erhöht (Kwoh, Venglish et al. 1996; Wandstrat and Wakeland 2001; Newton, Harney et al. 2004). Dabei konnte eine Assoziation der genetischen Suszeptibilität für RA mit bestimmten Polymorphismen der HLA-Moleküle beobachtet werden.

Mehr als 80 % der RA-Patienten exprimieren HLA-DR1- oder HLA-DR4-Subtypen, die über ein bestimmtes Sequenzmotiv verfügen und „shared epitope“ (engl.: gemeinsames Epitop) genannt wird (Gregersen, Silver et al. 1987). Es handelt sich dabei um die Aminosäuren 70 bis 74 (QK/RRAA) und 84 der b-Kette des MHC-II-Moleküls, die vermutlich für die genetische Suszeptibilität bei der RA verantwortlich sind.

Das „shared epitope“ ist möglicherweise direkt in die Pathogenese der RA involviert, indem es durch eine Strukturänderung des MHC-II-Moleküls die Interaktion zwischen T-Zelle, antigenpräsentierender Zelle und dem Antigen beeinflusst (Gregersen, Silver et al. 1987). Bestimmte HLA-Genotypen korrelieren dabei mit einem ungünstigeren Krankheitsverlauf. Das Risiko für extraartikuläre Manifestationen und Erosionen war dann signifikant erhöht, wenn für diese MHC-Proteine zwei prädisponierende Allele vorlagen (Turesson, Schaid et al. 2005).

Da die einzige bisher bekannte Funktion von MHC-Molekülen die Präsentation von Antigenen ist, die von den T-Zellrezeptoren der T-Zellen erkannt werden, kann auf eine direkte Beteiligung der T-Zellen bei der Pathogenese der RA geschlossen werden. Die Auffassung, die die T-Zellen stärker ins Zentrum der RA-Pathogenese stellt, wurde durch die Beobachtung gestützt, dass in der Synovia von RA-Patienten

mehr als 50 % des inflammatorischen Infiltrats T-Zellen sind (Van Boxel and Paget 1975; Cush and Lipsky 1988). Tatsächlich konnten in *in vitro* Proliferationsexperimenten mit T-Zellen von RA-Patienten eine Reihe potenzieller Autoantigene identifiziert werden. Dazu zählen insbesondere Kollagen II, Proteoglykane, Aggrekan, Hitzeschockproteine und andere meist gelenkspezifische Autoantigene (Firestein 2003).

Die insgesamt geringen Erfolge unterschiedlicher auf T-Zell-Inhibition gerichteter Therapien, wie zum Beispiel die Depletion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (van der Lubbe, Dijkmans et al. 1995; Kalden, Breedveld et al. 1998), führten zu der Vermutung, dass T-Zellen nur an der Induktion der Arthritis beteiligt sind. Diese Hypothese wurde vor allem durch die Detektion nur geringer Mengen T-Zell-spezifischer Zytokine wie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Interleukin-2 (IL-2) unterstützt (Firestein, Alvaro-Gracia et al. 1990; Firestein and Zvaifler 1990; Lundy, Sarkar et al. 2007).

Andererseits werden Patienten erfolgreich mit einem CTLA-4-Ig-Fusionsprotein (engl.: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4-IgG1) behandelt, das die Übertragung des kostimulatorischen Signals von den antigenpräsentierenden Zellen (APZ) auf die T-Lymphozyten verhindert. Zudem wurde kürzlich eine neue Subpopulation von T-Helferzellen (Th-Zellen) in Seren von RA-Patienten beschrieben, die durch die Produktion des hochinflammatorischen Zytokins IL-17 charakterisiert ist (Chabaud, Durand et al. 1999; Ziolkowska, Koc et al. 2000). Die Inhibition von Th17-Zellen bzw. dessen Produkt IL-17 war in Tierversuchen therapeutisch wirksam und scheint bei der Therapie der RA vielversprechend zu sein (Lubberts, Koenders et al. 2005).

#### **1.1.4 Die Rolle der Zytokine in der Pathogenese der RA**

In der Synovia von gesunden Patienten stehen die proinflammatorischen und antiinflammatorischen Zytokine in einer Art Gleichgewicht. Wird dieses komplex regulierte Zytokinnetzwerk so gestört, dass sich ein Ungleichgewicht zugunsten der proinflammatorischen Zytokine einstellt, kann sich eine Entzündung mit dem klinischen Bild einer RA entwickeln. In der Synovia von RA-Patienten gibt eine Vielzahl von Zytokinen, die überwiegend von Makrophagen oder makrophagenähnlichen Zellen bzw. Fibroblasten produziert werden (Firestein, Alvaro-Gracia et al. 1990). Dazu zählen die Zytokine IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-18, Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und GM-CSF (engl.: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor). Auffällig ist, dass nur geringe Mengen T-Zell-spezifischer Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-2 gefunden werden, obwohl über 50 % des entzündlichen Infiltrats T-Zellen sind (Firestein 2003).

Daneben werden aber auch antiinflammatorische Zytokine wie TGF- $\beta$  (engl.: transforming growth factor), IL-10 (Fava, Olsen et al. 1989; Katsikis, Chu et al. 1994; Wahl 1994) und IL-1-Rezeptroantagonist sowie das Protein SOCS3, ein Zytokinsignal supprimierendes Protein, in der Synovia exprimiert (Shouda, Yoshida et al. 2001). TNF- $\alpha$  und IL-1 scheinen dabei in der Pathogenese der RA eine zentrale Rolle einzunehmen, indem sie unter anderem die Produktion anderer inflammatorischer Zytokine beeinflussen. Es konnte gezeigt werden, dass durch Zugabe von anti-TNF- $\alpha$  *in vitro* die Expression anderer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8 und GM-CSF reduziert werden kann (Brennan, Chantry et al. 1989). Die Blockierung von IL-1 führt zu einer reduzierten Produktion von IL-6 und IL-8, nicht aber von TNF- $\alpha$  (Feldmann, Brennan et al. 1996).

Ein weiteres für die Pathogenese der RA relevantes Zytokin ist das von den TH17-Zellen produzierte IL-17. IL-17 induziert die Sekretion von IL-6, IL-8, Prostaglandin E<sub>2</sub> und G-CSF (engl.: granulocyte colony-stimulating factor) in synovialen Fibroblasten sowie die Sekretion von IL-1 und TNF- $\alpha$  in Makrophagen (Fossiez, Djossou et al. 1996; Jovanovic, Di Battista et al. 1998). Zusätzlich induziert IL-17 die durch IL-1 und TNF- $\alpha$  vermittelte Zytokinproduktion im Sinne eines Synergismus (Chabaud, Fossiez et al. 1998; Miossec 2003). Es konnte gezeigt werden, dass eine kombinierte Inhibition von TNF- $\alpha$  und IL-1 bzw. IL-17 die Produktion von IL-6 stärker supprimiert als die alleinige Blockade von TNF- $\alpha$  (Chabaud and Miossec 2001).

Es gibt es in der Synovia noch eine Vielzahl anderer Zytokine, die auf unterschiedliche Zelltypen und Gewebe einwirken. Eine besonders wichtige Funktion dieser Zytokine ist die Aktivierung von unterschiedlichen Zelltypen. Diese bewirkt bei den Makrophagen eine verstärkte Phagozytose mit Freisetzung weiterer Zytokine, bei den T- und B-Zellen die Proliferation und Differenzierung in Effektor- und Plasmazellen. Durch Chemotaxis ziehen Zytokine weitere Effektorzellen, wie z.B. neutrophile Leukozyten, an den Ort der Entzündung. Sie wirken aber auch direkt auf den Gelenkknorpel, indem sie Osteoklasten und Chondrozyten aktivieren und dadurch die Freisetzung degradierender Enzyme wie Metalloproteinasen sowie die Knochenresorption fördern.

Eine weitere wichtige Funktion von Zytokinen ist die Induktion der Expression von Zelladhäsionsmolekülen. Die Synovia von RA-Patienten zeigt eine erhöhte Expression von E-Selektin auf Endothelzellen und von VCAM-1 und ICAM-1 auf Endothelzellen und Makrophagen (Koch, Burrows et al. 1991; Tak, Thurkow et al. 1995).

Da ein Großteil der Zytokine von Makrophagen exprimiert wird, sind Makrophagen vermutlich die wichtigsten Effektorzellen der RA. Auch Synoviozyten mit fibroblast- und makrophagenähnlichen Eigenschaften könnten durch die Fähigkeit der Zytokinsekretion, Phagozytose und Antigenpräsentation an T-Zellen eine wichtige Rolle spielen (Edwards 1994).

## 1.2 Tiermodelle der RA

Tiermodelle sind in der Rheumaforschung unverzichtbar. Sie helfen spezielle Pathomechanismen oder den Einfluss bestimmter Gene zu untersuchen, aber auch neue Therapiestrategien zu entwickeln. Eines der ersten Tiermodelle war die Adjuvant-induzierte Arthritis (AA). Durch intrakutane Injektion mit *komplettem Freundschens Adjuvans* (CFA) konnte eine Arthritis in bestimmten Rattenstämmen induziert werden (Pearson 1956). Zu diesem Modell zählen auch die Immunisierungen mit den nicht immunogenen Adjuvantien Muramyldipeptid, Avridin oder Pristan (Chang, Pearson et al. 1980; Chang, Pearson et al. 1981), die von B- und T-Zellen nicht als Antigene erkannt werden, da sie über keine MHC-Komplex-bindenden Peptide (engl.: Major Histocompatibility Complex) verfügen (Holmdahl, Lorentzen et al. 2001). Das Adjuvans Pristan induziert dabei auch in Mäusen eine Arthritis (Bedwell, Elson et al. 1987; Wooley, Seibold et al. 1989).

Das bekannteste antigenspezifische Tiermodell der RA ist die Kollagen-induzierte Arthritis, bei der Ratten nach Immunisierung mit heterologem Kollagen II eine Arthritis entwickeln (Trentham, Townes et al. 1977). Eine Arthritis wird bei Ratten und Mäusen auch nach Immunisierung mit Kollagen IX, Kollagen XI (Cremer, Ye et al. 1998; Lu, Carlsen et al. 2002) und anderen gelenkspezifischen Proteinen wie COMP (engl.: Cartilage Oligomeric Matrix Protein) (Carlsen, Hansson et al. 1998), Aggrekan (Glant and Mikecz 2004) oder dem Knorpelglykoprotein gp39 (Verheijden, Rijnders et al. 1997) beobachtet.

Fortschritte in der Gentechnik ermöglichten die Entwicklung von transgenen Tiermodellen. Diese ermöglichten insbesondere die Erforschung der Rolle bestimmter Gene in der Immunpathogenese der RA. Bei dem K/BxN-Modell exprimieren die Mäuse einen transgenen T-Zellrezeptor, der ein Epitop der G6PI erkennt und über eine antikörpervermittelte Immunreaktion spontan zu einer Arthritis führt (Kouskoff, Korganow et al. 1996; Matsumoto, Staub et al. 1999).



Dieses Modell diene als theoretische Grundlage bei der Etablierung der G6PI-induzierten Arthritis. Nicht transgene Mäuse entwickeln nach Immunisierung mit humaner G6PI eine Arthritis, die im Unterschied zum K/BxN-Modell nicht durch Transfer von Antikörpern induziert werden kann (Schubert, Maier et al. 2004; Kamradt and Schubert 2005). Da es zwischen der Kollagen-induzierten Arthritis, dem K/BxN-Modell und der G6PI-induzierten Arthritis neben vielen Gemeinsamkeiten auch Unterschiede gibt, sollen diese drei Tiermodelle im Folgenden näher erläutert werden.

### 1.2.1 Die Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)

Bei der Kollagen-induzierten Arthritis entwickeln bestimmte Rattenstämme nach intrakutaner Immunisierung mit Kollagen II (CII) aus Hühnern, dem Menschen oder Gelenkknorpeln von Ratten in *komplettem* und in *inkomplettem Freundschens Adjuvans* eine Arthritis (Trentham, Townes et al. 1977). In der Maus führt die Immunisierung mit heterologem CII zu einer akuten Form der Arthritis, die selbstlimitierend ist. Die Immunisierung mit autologem CII dagegen führt nur in einigen suszeptiblen Stämmen zu einer Arthritis, die dann aber durch einen besonders schweren und chronischen Verlauf geprägt ist (Holmdahl, Andersson et al. 1989; Malfait, Williams et al. 2001).

#### 1.2.1.1 Die Rolle der T-Zellen und MHC-Moleküle in der CIA

In der CIA beobachtet man, wie auch bei der humanen RA, eine Assoziation der genetischen Suszeptibilität für RA mit bestimmten Polymorphismen der MHC-Moleküle. Mäuse mit dem Haplotyp H2-q (DBA/1 und B10.Q) und H2-r (B10.RIII) exprimieren die MHC-II-Moleküle I-A<sup>q</sup> bzw. I-A<sup>r</sup> und sind suszeptibel für die CIA. Dabei bindet das MHC-Molekül I-A<sup>q</sup> interessanterweise an dieselbe immundominante Peptidregion des CII wie die RA-assoziierten HLA-DR4-Subtypen beim Menschen (Wooley, Luthra et al. 1981; Rosloniec, Whittington et al. 1996; Kjellen, Brunsberg et al. 1998).

Die MHC-II-Assoziation und die Tatsache, dass die Blockierung von T-Zellen oder der T-Zellfunktion eine Arthritisentwicklung verhindert, führten zu der Annahme, dass T-Zellen direkt in die Pathogenese der CIA involviert sind (Brahn and Trentham 1984; Ranges, Sriram et al. 1985). Andererseits entwickeln auch CD4<sup>+</sup>-defiziente Mäuse eine Arthritis (Tada, Ho et al. 1996), so dass die genaue Rolle der T-Zellen noch weiter untersucht werden muss.

### 1.2.1.2 Die Rolle der B-Zellen und Antikörper in der CIA

Hauptfaktor in der Pathogenese der CIA scheint jedoch die Produktion von arthritogenen Autoantikörpern gegen CII zu sein. Die nach Immunisierung mit heterologem CII produzierten Antikörper binden an den Gelenkknorpel und induzieren über die Aktivierung des Komplementsystems eine Arthritis in den suszeptiblen Stämmen (Terato, Hasty et al. 1992). Anders als bei dem T-Zelltransfer konnte durch den passiven Transfer von anti-CII-Serum eine Arthritis in suszeptiblen und nicht suszeptiblen Stämmen induziert werden (Watson and Townes 1985), wobei die klinische Symptomatik der Arthritis weniger stark ausgeprägt war und generell einen mildereren Verlauf zeigte (Englert, Ferguson et al. 1986; Holmdahl, Jansson et al. 1990).

Anti-CII-Antikörper werden aber auch von einigen nicht suszeptiblen Stämmen produziert, so dass qualitative Unterschiede der Antikörper in den verschiedenen Stämmen diskutiert wurden (Wooley, Luthra et al. 1981; Holmdahl, Jansson et al. 1988). Tatsächlich kann eine Arthritis nur dann übertragen werden, wenn mindestens drei verschiedene monoklonale Antikörper mit jeweils unterschiedlicher Epitopspezifität kombiniert werden (Terato, Hasty et al. 1992; Cremer, Ye et al. 1998).

Ein weiterer Effektormechanismus der Antikörper ist die Aktivierung des Komplementsystems. Die Depletion von C3 mit dem Kobra-Venom-Faktor führte bei Ratten zu einer verzögerten Manifestation der CIA, so dass auch von einer direkten Beteiligung des Komplementsystems ausgegangen werden kann (Morgan, Clague et al. 1981). Unterstützt wurde die Hypothese durch die Beobachtung, dass DBA/1-Mäuse mit einer genetischen Deletion von den Komplementfaktoren C5, C3 oder Faktor B eine Resistenz gegen die CIA entwickeln, obwohl hohe IgG<sub>2a</sub>-Titer gegen CII gemessen werden (Hietala, Jonsson et al. 2002; Wipke, Wang et al. 2002). Daneben zeigte die Anwendung des löslichen Komplementrezeptors CR1 (CD35) in diesen Mäusen eine deutliche Reduktion von Entzündung und Arthritis (Dreja, Annenkov et al. 2000).

### 1.2.1.3 Die Rolle der Zytokine in der CIA

Auch Zytokine sind in die Pathogenese der CIA involviert. Studien zeigten, dass ähnlich der humanen RA auch in der CIA die proinflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-17 und IL-6 von entscheidender Bedeutung sind. Die Therapie mit einem Antikörper gegen TNF- $\alpha$  oder dem löslichen rekombinant humanen TNF- $\alpha$ -Rezeptor kurz vor oder nach der Manifestation der CIA führte bei Mäusen zu einer signifikanten Reduktion der Inzidenz und des Schweregrads der Arthritis (Piguet, Grau et al. 1992;

Thorbecke, Shah et al. 1992; Williams, Feldmann et al. 1992; Wooley, Dutcher et al. 1993). Auch die Anwendung von anti-IL-1-Antikörpern zeigte therapeutische Effekte bei der Maus (van den Berg, Joosten et al. 1994; Bresnihan, Alvaro-Gracia et al. 1998). Mäuse mit einer genetischen Deletion für IL-17 sind resistent gegen die Entwicklung einer CIA. IL-6-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls keine oder eine milde Arthritis (Alonzi, Fattori et al. 1998; Sasai, Saeki et al. 1999; Nakae, Nambu et al. 2003).

### 1.2.2 Das K/BxN-Modell

Das K/BxN-Modell ist ein transgenes Tiermodell, bei dem zwei Mausstämme miteinander gekreuzt werden. Der KRN-Stamm exprimiert einen transgenen T-Zellrezeptor (TZR), der im Zusammenhang mit dem MHC-II-Molekül I-A<sup>k</sup> ein Peptid der bovinen Pankreasnuklease (RNase) erkennt. Die Mäuse des NOD-Stamms (engl.: non obese diabetes) exprimieren das MHC-II-Molekül I-A<sup>g7</sup> und neigen zur Entwicklung von Autoimmunkrankheiten wie Diabetes mellitus Typ I oder Thyeroiditis (Tisch and McDevitt 1996). Die aus der Kreuzung dieser beiden Stämme entstehenden K/BxN-Mäuse entwickeln nach vier bis fünf Wochen spontan eine schwere symmetrische Polyarthritis, die der humanen RA sehr ähnlich ist (Kouskoff, Korganow et al. 1996). Dabei erkennt der transgene TZR der KRN-Maus im Kontext mit der I-A<sup>g7</sup> Präsentation die ubiquitär exprimierte G6PI, ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels.

#### 1.2.2.1 Die Rolle der T-Zellen und MHC-Moleküle im K/BxN-Modell

Bei der Entwicklung der Arthritis spielen sowohl der transgene TZR als auch das MHC-II-Molekül I-A<sup>g7</sup> eine wichtige Rolle. Eine spontane Arthritis wurde nur bei der F1-Generation einer KRNxNOD-Kreuzung beobachtet, nicht aber bei den Nachkommen einer KRNxC57BL/6- oder KRNxBALB/c-Kreuzung. Wurde jedoch der KRN-Stamm mit einem für das MHC-II-Molekül I-A<sup>g7</sup> kongenen C57BL/6-Stamm gekreuzt, so konnte wieder bei allen Nachkommen eine Arthritis beobachtet werden.

Ebenso wurde eine Arthritis beobachtet, wenn bei der Kreuzung BALB/c-Mäuse verwendet wurden, die transgen für A<sub>β</sub><sup>g7</sup> waren und daher I-A<sup>g7</sup> exprimierten (Kouskoff, Korganow et al. 1996). Da das MHC-II-Molekül I-A<sup>g7</sup> für die Arthritsentwicklung von entscheidender Bedeutung ist, sind vermutlich auch die KRN-TZR tragenden T-Zellen direkt in die Pathogenese involviert. Die Entwicklung einer Arthritis konnte verhindert werden, wenn die Mäuse bis spätestens fünf Tage vor der

klinischen Manifestation mit einem anti-CD4-Antikörper behandelt wurden. Die Blockade von CD4 zu einem späteren Zeitpunkt hatte keinen therapeutischen Effekt, was für eine frühe Beteiligung der T-Zellen in der Pathogenese spricht.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Arthritsentwicklung nur von dem transgenen TZR und nicht von weiteren endogenen TZR abhängt. Im Vergleich zu den KRN-Mäusen sind RAG-defiziente KRN-Mäuse (engl.: recombinase-activating gene) nicht in der Lage, zusätzliche endogene TZR zu exprimieren und besitzen daher ausschließlich T-Zellen mit dem transgenen TZR. Knochenmark von KRN- oder RAG<sup>-/-</sup>-KRN-Mäusen wurde in bestrahlte C $\alpha^0$ /BxN-Mäuse transferiert, die bis auf eine Mutation den Nachkommen einer C57BL/6xNOD-Kreuzung entsprechen. Die Mutation in der  $\alpha$ -Kette des TZR führt bei C $\alpha^0$ /BxN-Mäusen dazu, dass sie zwar ein normales B-Zellkompartiment, nicht aber eigene T-Zellen besitzen. Nach dem Knochenmarktransfer wurde in allen Empfängermäusen eine Arthritsentwicklung beobachtet, was zeigt, dass allein der transgene TZR für die Erkrankung verantwortlich ist (Mangialaio, Ji et al. 1999).

#### 1.2.2.2 Die Rolle der B-Zellen und anti-G6PI-Autoantikörper im K/BxN-Modell

Die Arthritsentwicklung hängt nicht nur von den T-Zellen, sondern auch von den B-Zellen und den von ihnen produzierten Antikörpern ab. K/BxN-Mäuse, die aufgrund einer  $\mu$ MT<sup>0</sup>-Mutation keine reifen B-Zellen besitzen, entwickelten keine Arthritis (Kouskoff, Korganow et al. 1996).

RAG<sup>-/-</sup>-C57BL/6-Mäuse, die weder B- noch T-Zellen besitzen, entwickelten nach einem Transfer von Milzzellen aus K/BxN-Mäusen eine Arthritis. Wurden jedoch vor dem Transfer die B-Zellen aus der Milzeinzelsuspension eliminiert, so waren die Empfängermäuse resistent gegen Arthritis (Mangialaio, Ji et al. 1999). Auch CD40-defiziente K/BxN-Mäuse zeigten keine Arthritis. Dies spricht dafür, dass B-Zellen für ihre arthritogene Funktion T-Zellhilfe benötigen (Mangialaio, Ji et al. 1999; 2002).

Durch den Transfer von Serum oder aufgereinigtem Immunglobulin G (IgG) susceptibler K/BxN-Mäuse in Empfängermäuse war es möglich, eine Arthritis zu induzieren. Anders als bei der Spontanarthritis wurde bei der Serumtransfer-induzierten Arthritis nach 15 bis 30 Tagen eine deutliche Abnahme der klinischen Symptomatik beobachtet. Auch die histologische Untersuchung der Gelenke am Tag 35 nach dem Serumtransfer zeigte keine Zeichen einer Arthritis (Mangialaio, Ji et al. 1999). Dass die Arthritis durch wiederholte Injektionen von Serum aufrecht erhalten werden

konnte, spricht für die Existenz arthritogener IgG-Antikörper im K/BxN-Modell. Die Inkubation von Gewebe mit Serum zeigte tatsächlich eine Bindung der IgG-Antikörper an ein 55 kD schweres Protein, welches als Glukose-6-Phosphat-Isomerase identifiziert werden konnte und auch von den transgenen T-Zellen erkannt wird (Matsumoto, Staub et al. 1999).

Eine hohe Frequenz G6PI-spezifischer B-Zellklone konnte in der Milz und anderen Lymphorganen detektiert werden. Eine Arthritis konnte aber nur dann induziert werden, wenn mindestens zwei verschiedene monoklonale anti-G6PI-Antikörper vom Isotyp IgG1 mit jeweils unterschiedlicher Epitopspezifität eingesetzt wurden (Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002). Je mehr verschiedene monoklonale Antikörper injiziert wurden, desto stärker war die Arthritis ausgeprägt. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass wie bei der CIA die Bildung großer Immunkomplexe von entscheidender Bedeutung ist.

Nur wenige Minuten nach intravenöser Gabe von gereinigten anti-G6PI-Antikörpern wurden diese in den distalen Gelenken der vorderen und hinteren Extremitäten der Mäuse lokalisiert (Wipke, Wang et al. 2002). Weiterhin konnte extrazelluläre G6PI an der Knorpeloberfläche der Gelenke detektiert werden, die überwiegend in Form von Immunkomplexen zusammen mit IgG und dem Komplementfaktor C3 vorlag (Matsumoto, Maccioni et al. 2002).

### 1.2.2.3 Die Rolle des Komplementsystems und Fc-Rezeptoren im K/BxN-Modell

Durch Transferexperimente konnten weitere Effektormechanismen der Antikörper identifiziert werden. Einer dieser Mechanismen ist die Bindung der Antikörper an Fc-Rezeptoren (FcR). Diese verbinden die Antigen-spezifität der Antikörper mit den Antigen-unspezifischen Effektormechanismen der Fc $\gamma$ R-exprimierenden Effektorzellen und stellen ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptativen Immunsystem dar.

Fc $\gamma$ R<sup>-/-</sup>-Mäuse, die keine funktionellen aktivierenden Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RIII exprimieren, entwickeln nach Serumtransfer keine Arthritis. Dabei konnte mit Fc $\gamma$ RIII<sup>-/-</sup>-Mäusen gezeigt werden, dass dieser Rezeptor entscheidend für die Arthritisentwicklung ist (Ji, Ohmura et al. 2002). Mäuse, die Fc $\gamma$ RI<sup>-/-</sup> sind, entwickeln eine Arthritis vergleichbar mit den Wildtyptieren (Ji, Gauguier et al. 2001; Ji, Ohmura et al. 2002). Die Rolle der Fc $\gamma$ RII ist bisher nicht vollständig geklärt. In einer Studie, die von Corr und Crain durchgeführt wurde, entwickelten Fc $\gamma$ RII<sup>-/-</sup>-Mäuse im Vergleich zu den Wild-

typen nach Serumtransfer schneller eine Arthritis (Corr and Crain 2002), während in einer anderen Studie kein Einfluss der Fc $\gamma$ RII auf die Arthritisentwicklung beobachtet werden konnte (Ji, Gauguier et al. 2001). Jedoch sind die über die Fc $\gamma$ RIII vermittelten Funktionen absolut notwendig, um eine Arthritis mit Hilfe von Antikörpern zu transferrieren. Neben den Fc-Rezeptoren ist auch das Komplementsystem bei der Arthritisentwicklung beteiligt.

Mäuse, die defizient für die Komplementfaktoren B, C3, C5 oder den C5a-Rezeptor (C5aR) sind, entwickelten nach Serumtransfer von K/BxN-Mäusen keine Arthritis (Ditzel 2004). Eine zentrale Rolle spielt dabei der Komplementfaktor C5. Wildtypen, die nach einem Serumtransfer erkrankt waren, konnten erfolgreich mit einem monoklonalen Antikörper gegen C5 behandelt werden. Der rechtzeitige Einsatz der Therapie konnte sogar die Entwicklung einer Arthritis verhindern (Ji, Ohmura et al. 2002). Da Mäuse mit einer genetischen Depletion der Komplementfaktoren C1q oder C4 nach Serumtransfer eine Arthritis entwickeln, scheint der klassische Weg der Komplementkaskade pathologisch nicht relevant zu sein (Ji, Ohmura et al. 2002). Im Gegensatz dazu wird dem alternativen Weg der Komplementkaskade eine wichtige Rolle in der Arthritisentwicklung zugeschrieben. Nur wenige Mäuse, die defizient für den Faktor B sind, entwickeln eine Arthritis, die dann aber auch nur sehr schwach ausgeprägt ist (Ji, Ohmura et al. 2002).

Im K/BxN-Modell ist der Haupteffektormechanismus der Komplementaktivierung vermutlich die Aktivierung des C5aR durch C5a. Die zusätzliche Aktivierung des Fc $\gamma$ RIII führt dann zur Aktivierung anderer Effektorzellen wie Makrophagen, Mastzellen und Neutrophilen, die durch Freisetzung von Zytokinen, Chemokinen oder degradierenden Enzymen den Krankheitsprozess fördern. Es ist bekannt, dass insbesondere Neutrophile und Mastzellen direkt in die Pathogenese involviert sind. So zeigen die beiden mastzelldefizienten Mausstämme S1/S1<sup>d</sup> und W/W<sup>v</sup> nach Serumtransfer eine Resistenz gegen Arthritis (Lee, Friend et al. 2002). Werden den W/W<sup>v</sup>-Mäusen jedoch *in vitro* generierte Mastzellen übertragen, so sind die Mäuse nach einem Serumtransfer wieder suszeptibel für Arthritis.

Neutrophile Leukozyten können bereits 48 Stunden nach Serumtransfer in den betroffenen Gelenken der Empfängermause detektiert werden. Mäuse, die keine neutrophilen Leukozyten besitzen, sind ebenfalls resistent gegen eine Arthritisentwicklung. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen Neutrophile ist es sogar möglich, eine durch

K/BxN-Serumtransfer induzierte Arthritis therapeutisch zu behandeln (Wipke and Allen 2001).

#### 1.2.2.4 Die Rolle der Zytokine im K/BxN-Modell

Bei der humanen RA spielen insbesondere TNF- $\alpha$  und IL-1 eine zentrale Rolle. Diese Zytokine beeinflussen auch im K/BxN-Modell den Verlauf der Arthritis. IL-1R<sup>-/-</sup>-Mäuse, bei denen sowohl die IL-1a als auch IL-1b vermittelten Signalwege blockiert sind, zeigten nach Transfer von K/BxN-Serum keine Arthritis (Ji, Pettit et al. 2002).

Anders als bei der humanen RA kann durch die Gabe von anti-TNF- $\alpha$ -Antikörpern der Arthritisverlauf nicht beeinflusst werden (Kyburz, Carson et al. 2000; Ji, Pettit et al. 2002). Da jedoch nach Serumtransfer in TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup>-Mäusen eine reduzierte Inzidenz beobachtet wurde, wird dem Zytokin TNF- $\alpha$  eine wichtige, aber nicht unabdingbare Rolle in der Arthritisentwicklung zugesprochen (Ji, Pettit et al. 2002). IL-6 dagegen scheint nicht in die Pathogenese der Arthritis involviert zu sein. IL-6<sup>-/-</sup>-Mäuse entwickelten nach Serumtransfer eine Arthritis, die sowohl in der Inzidenz als auch im Verlauf kaum einen Unterschied zu der Arthritis in Wildtypen zeigte (Ji, Pettit et al. 2002).

#### 1.2.3 Die G6PI-induzierte Arthritis

Bei der G6PI-induzierten Arthritis entwickeln genetisch unveränderte Mäuse nach Immunisierung mit nativer oder denaturierter heterologer G6PI eine symmetrische periphere Polyarthrit. Im genetisch suszeptiblen DBA/1-Stamm betrug die Inzidenz der G6PI-induzierten Arthritis über 90 %. Die klinischen Zeichen manifestierten sich etwa neun Tage nach Immunisierung und waren am 14. Tag maximal ausgeprägt. Ein ähnlicher Verlauf der Arthritis wurde mit leicht reduzierter Inzidenz auch nach Immunisierung mit autologer G6PI beobachtet (Schubert 2005). Mit diesem Modell wurde somit erstmalig gezeigt, dass eine Autoimmunreaktion gegen ein ubiquitär exprimiertes Antigen eine organspezifische Erkrankung in nicht transgenen Mäusen induzieren kann (Schubert 2005).

#### 1.2.3.1 Die Rolle der MHC-Moleküle in der G6PI-induzierten Arthritis

Die Immunisierung unterschiedlicher Mausstämmen mit humaner G6PI führte nur in dem DBA/1-Stamm zu einer Arthritis. Dieser exprimiert den MHC-Haplotyp H2-q und ist auch für die CIA suszeptibel. B10.Q-Mäuse dagegen, die denselben MHC-Haplotyp

exprimieren, waren resistent, so dass bei der G6PI-induzierten Arthritis keine eindeutige Assoziation der genetischen Suszeptibilität mit bestimmten Polymorphismen der MHC-Moleküle beobachtet werden konnte (Schubert, Maier et al. 2004).

Es gibt dennoch Hinweise, dass der MHC-Locus für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis von Bedeutung ist. Die in dieser Arbeit verwendeten B10.Q-Mäuse wurden von *Jackson Laboratories* bezogen und besaßen eine natürliche Mutation im Tyk2-Gen. Da diese Mäuse auch resistent gegen die CIA sind, wird dieser Mutation eine Arthritis-protective Wirkung zugeschrieben (Shaw, Boyartchuk et al. 2003). B10.Q-Mäuse von anderen Anbietern dagegen entwickelten nach Immunisierung mit heterologer G6PI eine schwach ausgeprägte Arthritis. Mäuse vom C3H.Q-Stamm zeigten sogar eine chronisch verlaufende Arthritis (Bockermann, Schubert et al. 2005). Zudem wird bei DBA/2-Mäusen, die bis auf die Expression des MHC-Haplotyps H2-d dem DBA/1-Stamm genetisch sehr ähnlich sind, eine Resistenz gegen Arthritis beobachtet, was für eine ähnliche Rolle des MHC-Locus wie bei der CIA spricht.

#### 1.2.3.2 Die Rolle der T-Zellen und Zytokine in der G6PI-induzierten Arthritis

Die Beteiligung des MHC-Locus an der Arthritisentwicklung lässt den direkten Schluss zu, dass auch T-Zellen bei der Arthritisentwicklung beteiligt sind. Nach Restimulation der T-Zellen mit G6PI konnte nur in den Zellen der drainierenden Lymphknoten der genetisch suszeptiblen DBA/1-Mäuse eine Proliferation gemessen werden (Schubert 2005). Die T-Zellen der SWR- und B10.Q-Mäuse zeigten keine Proliferation, obwohl sie ebenfalls den MHC-Haplotyp H2-q exprimieren und den T-Zellen demnach dieselben Epitope präsentiert werden müssten wie bei dem DBA/1-Stamm. Da SWR-Mäuse 50% des  $V_b$ -Gens nicht besitzen und deshalb einen T-Zelldefekt aufweisen (Behlke, Chou et al. 1986), spricht der Befund dafür, dass  $CD4^+$ -T-Zellen eine wichtige Rolle für die Arthritisentwicklung spielen.

Bei den in diesem Experiment verwendeten B10.Q-Mäusen handelte es sich ebenfalls um die Tiere von *Jackson Laboratory*. Die Mutation im Tyk2-Gen könnte auch Einfluss auf das Proliferationsverhalten der T-Zellen haben. Eine Behandlung der Tiere mit dem  $CD4^+$ -depletierenden Antikörper YTS191.1 vor Manifestation der klinischen Symptomatik verhinderte die Entwicklung der Arthritis fast vollständig und zeigte auch bei bereits voll etablierter Arthritis eine rasche und schnelle Remission (Schubert 2005).



CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sind daher nicht nur für die Induktion, sondern auch für die Effektorphase der G6PI-induzierten Arthritis notwendig. Daneben werden aber auch die von den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen produzierten Zytokine benötigt. In den drainierenden Lymphknoten werden TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-17 exprimiert, während in der Milz hauptsächlich TNF- $\alpha$ , viel IL-6 und nur wenig IL-17 produziert werden (Schubert 2005). Wie bei der CIA konnte auch bei der G6PI-induzierten Arthritis die Inzidenz durch Blockierung von TNF- $\alpha$  reduziert werden. Nur 30 % der Mäuse erkrankten an Arthritis, wenn sie direkt nach Immunisierung mit humaner G6PI mit dem löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptor Etanercept behandelt wurden (Schubert 2005). Anders als bei der CIA zeigte die Anwendung von Etanercept bei bereits eingetretener Arthritis keinen therapeutischen Effekt, so dass die durch TNF- $\alpha$  vermittelten Effekte wahrscheinlich nur an der Induktion beteiligt sind (Schubert 2005).

#### 1.2.3.3 Die Rolle der B-Zellen und Komplementfaktoren in der G6PI-induzierten Arthritis

Im suszeptiblen DBA/1-Stamm können sechs Tage nach Immunisierung mit rekombinant humaner G6PI (rhG6PI) hohe Antikörpertiter gegen G6PI detektiert werden. Die Titer erreichen nach neun Tagen ihr Maximum und sind auch nach Abklingen der klinischen Symptomatik bis zum 30. Tag hochtitrig nachweisbar (Schubert, Maier et al. 2004).

Im Gegensatz zum K/BxN-Modell konnte die G6PI-induzierte Arthritis nicht durch Transfer von aufgereinigten Immunglobulinen in Empfängerermäuse übertragen werden (Schubert, Maier et al. 2004). Eine frühe Depletion von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen vor dem Zeitpunkt der Immunisierung führte zu einer fast vollständigen Unterbindung der Antikörperproduktion. Die anti-G6PI-Titer von DBA/1-Mäusen dagegen, die am sechsten und neunten Tag nach Immunisierung mit depletierenden Antikörpern gegen CD4 behandelt wurden, unterschieden sich nicht von den Titern der G6PI-immunisierten und nicht behandelten Tiere. Die CD4-depletierten Tiere zeigten dabei weder klinisch noch histologisch Zeichen einer Arthritis (Schubert, Maier et al. 2004; Schubert 2005). Auch nicht suszeptible Stämme produzieren hohe anti-G6PI-Titer (Schubert, Maier et al. 2004).

Diese Befunde und die Tatsache, dass CD4<sup>+</sup>-T-Zellen für die Effektorphase benötigt werden, sprechen gegen die Induzierbarkeit der G6PI-induzierten Arthritis einzig durch anti-G6PI-Antikörper, schließen jedoch eine pathogene Bedeutung der Antikörper

per nicht zwangsläufig aus. Eine wichtige Effektorfunktion von Antikörpern ist die Bindung an Fc-Rezeptoren, die zur Proliferation von B-Zellen, Phagozytose bei Makrophagen und zur Degranulation von Mastzellen führt. DBA/1-Mäuse, die keine aktivierenden Fc $\gamma$ RI und Fc $\gamma$ RIII exprimierten, entwickelten eine Arthritis mit reduzierter Inzidenz und milderem Verlauf (Schubert, Maier et al. 2004). DBA/1-Mäuse dagegen, die defizient für den inaktivierenden Fc $\gamma$ RIIB waren, entwickelten zu 100 % eine Arthritis, die durch einen chronischen Verlauf geprägt war (Schubert, Maier et al. 2004). Da die einzig bekannte extrazelluläre Funktion der FcR die Bindung von Antikörpern ist, wurde damit indirekt bewiesen, dass Antikörper für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis von entscheidender Bedeutung sind (Schubert 2005).

Neben den FcR ist auch das Komplementsystem ein wesentliches Bindeglied zwischen angeborener und humoraler Immunität. Der Komplementfaktor C5 nimmt dabei eine zentrale Stellung in der Komplementkaskade ein. Alle Induktionswege der Komplementkaskade münden über die Aktivierung des Komplementfaktors C5 in die Initiierung der Effektormechanismen wie Zytolyse und Chemotaxis. Die Inhibition des Komplementfaktors C5 mit dem monoklonalen anti-C5-Antikörper BB5.1 (Frei, Lambris et al. 1987) bewirkte in dem DBA/1-Stamm eine reduzierte Inzidenz und einen verzögerten milderen Verlauf der Arthritis (Schubert 2005). Antikörper tragen somit sowohl über die Fc $\gamma$ R-übermittelten Signale als auch durch die Aktivierung der Komplementkaskade entscheidend zur Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis bei.

### 1.3 Zielsetzung der Arbeit

In der G6PI-induzierten Arthritis führt die Immunisierung mit der ubiquitär exprimierten G6PI in naiven DBA/1-Mäusen zu einer Arthritis. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine zelluläre und humorale Autoimmunantwort gegen ein systemisches Antigen auch in genetisch unveränderten Mäusen eine organspezifische Autoimmunkrankheit induziert. Im Gegensatz zum transgenen K/BxN-Modell ist es hier nicht möglich, durch Transfer von Antikörpern eine Arthritis in Empfängermausen zu induzieren. Sogar bei den nicht suszeptiblen Stämmen werden vergleichbar hohe Serumtiter gegen G6PI gefunden. Diese Befunde sprechen gegen eine Induzierbarkeit der G6PI-induzierten Arthritis einzig durch Antikörper, nicht aber gegen deren generelle pathogene Bedeutung.

Viele von Antikörpern vermittelte Effektorfunktionen werden von Zellen ausgeübt, die über Fc-Rezeptoren (FcR) verfügen. Diese verbinden die Antigen-Spezifität der Antikörper mit den antigen-unspezifischen Effektormechanismen der FcR-exprimierenden Zellen und stellen damit ein Bindeglied zwischen dem angeborenen und dem adaptativen Immunsystem dar. Es konnte gezeigt werden, dass FcR für die Arthritisentwicklung wichtig sind (Schubert, Maier et al. 2004). Dies führte zu der Annahme, dass auch Antikörper in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis von entscheidender Bedeutung sind. Bisher ist jedoch nicht geklärt, welche Rolle Antikörper und B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis spielen. Ziel der Arbeit ist es, die pathogenetische Rolle der B-Zellen in der G6PI-induzierten Arthritis weiter zu definieren.

Folgende Fragen sollen dabei beantwortet werden:

- I. Wann und wo werden die G6PI-spezifischen Antikörper produziert?
- II. Welche Epitope der G6PI werden von den anti-G6PI-Antikörpern der suszeptiblen und nicht suszeptiblen Stämme erkannt?
- III. Welche pathologische Relevanz haben die von den anti-G6PI-Antikörpern erkannten Epitope für die Arthritogenität der Antikörper?
- IV. Gibt es Epitope, die gleichzeitig von autoreaktiven B- und T-Zellen erkannt werden?

## 2 Material

### 2.1 Mäuse

Die verwendeten Mäuse wurden unter SPF-Bedingungen (engl.: specific pathogen free) von der Versuchstierzucht Marienfelde des Bundesinstituts für Risikobewertung (BfR) gezüchtet. Folgende Mäuse wurden eingesetzt:

DBA/1	H2-q Haplotyp
B10.Q	H2-q Haplotyp Die Mäuse wurden von Jackson Laboratories bezogen.
BALB/c	H2-d Haplotyp
C57BL/6	H2-b Haplotyp

### 2.2 Chemikalien und Enzyme

Acetanhydrid	Merck
Acrylamid/Bisacrylamid 37.5:1 (2,6% C)	Biorad
Agar	Roth
Agarose	Gibco
2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP)	Sigma-Aldrich
Aminosäurelösungen	Bachem Chemie / Novabiochem
Ampicillin	Roth
2-Mercaptoethanol	Sigma
Blocking Buffer (10fach)	Sigma
5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat (BCIP)	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma
Komplettes Freundesches Adjuvans (CFA)	Sigma
Coomassie G-250	Sigma
Dichlormethan (DCM)	Merck
N,N-Dimethylformamid (DMF)	Merck
Dimethylacetamid (DMA)	Merck

N-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA)	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Roth
Essigsäure	Sigma
Ethanol	Roth
Ether	Merck
Ethidiumbromid	Biorad
Glycerin	Roth
Glycin	Sigma
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Sigma
Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure-Puffer (HEPES-Puffer)	PAA Laboratories
Imidazol	Sigma
IPTG dioxanfrei	Roth
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Luminol	Interchim
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich
Methanol	Roth
N-Methyl-imidazol	Merck
Microscint	Packard
Natriumchlorid (NaCl)	Roth
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure (Ni-NTA)	Qiagen
1-Methyl-2-pyrrolidon (NMP)	Merck
Orange G	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
Penicillin	PAA Laboratories
Phenol	Merck
Piperidin	Merck

Polyethylenglykol 20000	Merck
Protein G Sepharose 4 Fast Flow	Amersham Biosciences
RPMI-1640	PAA Laboratories
Saccharose	Merck
SDS-PAGE Standard (Low range)	Biorad
Streptavidin-Alkalische Phosphatase	Roche
Streptomycin	PAA Laboratories
Tris Buffered Saline, 10fach (TBS)	Sigma
N,N,N,N-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Trifluoethansäure (TFA)	Merck
[methyl- <sup>3</sup> H]Thymidin	Amersham Biosciences
Triisobutylsilan (TIBS)	Merck
Tetramethylbenzidin-Tabletten (TMB)	Sigma
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Roth
Triton X-405	Sigma-Aldrich
Trypan Blue solution (0,4%)	Sigma
Tween-20	Merck-Schuchardt
Zitronensäure	Merck

## 2.3 Antikörper

### 2.3.1 Antikörper für die Verwendung im Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) und Epitop-Screening

Ziege anti-Maus-IgG-POD	Sigma; spezifisch für den Fc-Teil von IgG und konjugiert mit Meerrettich-Peroxidase
-------------------------	--

### 2.3.2 Antikörper für die Verwendung im Enzyme-linked Immunosorbent Spot (ELISPOT)

Ziege-anti-Maus-IgG-Biotin (polyklonal)	Southern Biotech
---	------------------

## 2.4 Peptide

Das G6PI-Peptid mit den Aminosäureresten 458 bis 472 wurde im Institut für Medizinische Immunologie, Charité Berlin, hergestellt und mir für diese Arbeit von Herrn Professor J. Schneider-Mergener zur Verfügung gestellt.

Die Sequenz des G6PI-Peptids ist:

D L E R L L P H K V F E G N R

## 2.5 Zellkulturen, Puffer und Lösungen

### 2.5.1 Zellkulturmedien

Kulturmedium (KM)	RPMI-1640 10 % FCS (fetales Kälberserum) 100 mM HEPES 50 µM 2-Mercaptoethanol 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
Waschmedium (WM)	RPMI-1640 RPMI-1640 5 % Kulturmedium
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) 25 Kapseln/l	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 100 µg/ml Ampicillin

## 2.6 Puffer und Lösungen

### 2.6.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (Sodium-Dodecyl-Sulfate)

10x Laufpuffer	30 g/l Tris-Chlorwasserstoff (TrisHCl) 144 g/l Glycin 10 g/l SDS
3x Probenpuffer	0,77 g Dithiothreitol (DTT) 1 g SDS 4 ml 1M Tris/HCl pH 6,8

	5 ml Glycerin 0,3 ml Bromphenolblau ad 17 ml H <sub>2</sub> O
Coomassie-Lösung	1,6 g Coomassie G-250 500 ml Methanol 500 ml Eisessig
Entfärbelösung	430 ml Methanol 70 ml Eisessig 500 ml H <sub>2</sub> O

### 2.6.2 FACS

FACS-Puffer (PBA)	PBS 1 % (w/v) BSA 0,5 % NaN <sub>3</sub>
Lysispuffer	10 mM KHCO <sub>3</sub> 155 mM NH <sub>4</sub> Cl 0,1 mM EDTA
PFA	2 % in PBS
Saponin-Puffer	0,5 % (w/v) Saponin in PBA

### 2.6.3 Puffer zur Aufreinigung von rekombinanter G6PI

Lysispuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 10 mM Imidazol pH 8,0
Waschpuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 20 mM Imidazol pH 8,0
Elutionspuffer	50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 300 mM NaCl 150 mM Imidazol pH 8,0



## 2.7 ELISA

Bindungspuffer: Phosphate Buffered Saline (PBS)	137,0 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,1 mM Na <sub>2</sub> HP O <sub>4</sub> pH 7,2
Blockpuffer	PBS 0,5 % BSA
Inkubationspuffer (PBT)	PBS 0,5 % BSA 0,05 % Tween-20
Waschpuffer	PBS 0,05 % Tween-20
TMB-Puffer	0,2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0,1 M Zitronensäure auf pH 5,0 eingestellt

## 2.8 ELISPOT

Bindungspuffer	PBS
Blockpuffer	PBS 3 % BSA
Waschpuffer	PBS 3 % BSA 0,01 % Tween-20
AMP-Puffer	95 ml 2-Amino-2-methyl-1-propanol (AMP) 0,1 ml Triton X-405 150 mg/ml MgCl <sub>2</sub> 900 ml H <sub>2</sub> O pH 10,25 eingestellt mit HCl
Entwicklungspuffer	8 mg BCIP 8 ml 2-AMP-Puffer 2 ml geschmolzene Agarose

## 2.9 SPOT-Synthese

Blocklösung I	DMA 2 % Acetanhydrid
Blocklösung II	DMA 2 % Acetanhydrid 1 % DIPEA
Abspaltlösung I	1 ml destilliertes Wasser 2,5 ml Dichlormethan (DCM) 0,5 g Phenol 45 ml Trifluoethansäure 1,5 ml Triisobutylsilan (TIPS)
Abspaltlösung II	1 ml destilliertes Wasser 22,5 ml Dichlormethan (DCM) 0,5 g Phenol 15 ml Trifluoethansäure 1,5 ml Triisobutylsilan (TIPS)

## 2.10 Epitop-Screening

Waschpuffer: Tris Buffered Saline (TBS)	50 mM Tris 137,0 mM NaCl 2,7 mM KCl pH 8,0 mit HCl
Inkubationspuffer	TBS 0,05 % Tween 20
Blockierungspuffer	5 ml Blocking Buffer (10fach) 5 ml TBS (10fach) 2,5 g Saccharose
Luminol	1 ml Uptilight HRP Blot Reagent A 1 ml Uptilight HRP Blot Reagent B

## 2.11 Verbrauchsmaterialien

Acrylküvetten	Roth
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce

Combitips, Reaktionsgefäße	Eppendorf
Dialyseschlauch	Roth
Filterplatten (Unifilter GF7B), Abdeckklebetiketten, Versiegelungsfolie	Packard
Handschuhe, Kimwipes	Kimberly Clark
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences
Kanülen, Spritzen	HSW, Braun
MiniCollect Röhrchen	Greiner
Pasteurpipetten	Brand
Petrischalen, Zellkulturflaschen, 96- und 48-Muldenplatten, ELISA Platten, Reagents Reservoir, Plastikpipetten	Corning/Costar
Phosphohexose Isomerase Kit	Sigma
Quarzküvette	Hellma
Sterifilter 0,45µm und 0,2µm, 15- und 50 ml Propylenröhrchen	Saarstedt
Whatman®50 Filterpapiere	Whatman
Nitrozellulosemembran Optitran 0,45 µM	Schleicher-Schuell
Zellsiebe (cell strainer) 70 µM	Falcon

## 2.12 Geräte

Auto-Spot Robot 222 XL Pipettierroboter	Abimed
Agarosegelelektrophoresekammer	Peqlab
β-Szintillationszähler	Topcount NXT von Packard
ELISA-Lesegerät	Spectra Max 250 von Molecular Devices
Feinwaage	Sartorius
French-Press	American Instruments
Heizblock	Roth
Inkubatoren mit Schüttler	TH 25 von Edmund Bühler B6 von Heraeus BB16CU von Heraeus
Kühlschränke und Gefrierschränke	Liebherr

	Heraeus Herafreeze
Lumi-Imager™	Boehringer Mannheim GmbH
Magnetrührer	IKA RCTbasic
Mikroskope	Olympus CK30 Zeiss
Netzgerät	Biorad PowerPac 300
pH-Meter	Knick Calimatic 766
Photometer	UV-1202 von Shimadzu
Pumpe	Miniplus2 von Gilson
Schreiber	Colora Recorder 1100
SDS-PAGE Elektrophoresekammer	Biorad
Sterilbank	HeraSafe von Heraeus
Trockenschrank	T6030 von Heraeus
Ultraschallgerät	Sonoplus HD70 von Bandelin
UV-Spektrometer	Uvicord SII von Pharmacia
Zellerntegerät	Harvester Filtermate 196 von Packard
Zentrifugen	Megafuge 1.0 von Heraeus Megafuge 1.0R von Heraeus Biofuge 13R von Heraeus Biofuge 22R von Heraeus Biofuge pico von Heraeus RC-5B von Sorvall

## 3 Methoden

### 3.1 Methoden der Proteinbiochemie

#### 3.1.1 Überexpression der rekombinanten humanen G6PI (rhG6PI)

Methode: Auf dem zur Überexpression verwendeten Plasmid pQE100S ist das Gen *lacIq* lokalisiert. Dieses Gen codiert für das lac-Repressor-Protein, welches durch Bindung an den lac-Operator die Expression der durch den lac-Operator kontrollierten Gene inhibiert. Diese Inhibition wird durch Zugabe von Isopropyl-thio- $\beta$ -D-galactopyranosid (IPTG) verhindert. IPTG bindet an den Repressor, wodurch es zu einer Konformationsänderung kommt, die zur Dissoziation des Repressors vom Operator führt und die Expression des Gens induziert.

Durchführung: Der transformierte Expressionsstamm *E.coli* BL21(DE3) mit dem Vektor zur Überexpression von rhG6PI (pQE100S hG6PI) wurde von David Schubert zur Verfügung gestellt. Für die Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin mit dem entsprechenden transformierten Expressionsstamm angeimpft und über Nacht bei 37 °C im Schüttler kultiviert. Die über Nacht kultivierte Bakterienkultur wurde in 2 l LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin transferiert und erneut bei 37 °C inkubiert. Bei einer optischen Dichte (OD) von 0,55 – gemessen bei 600 nm – wurde die Proteinexpression durch Zugabe von 4 ml IPTG (1 M) in die Bakterienkultur induziert. Die Bakterienkultur wurde für weitere 3 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 4 °C und 5000 x g für 15 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet für die weitere Aufarbeitung bei -20 °C eingefroren.

#### 3.1.2 Aufreinigung der rhG6PI mittels Affinitätschromatographie

Methode: Die im *E.coli*-Stamm überexprimierte G6PI enthält am N-Terminus eine Markierung aus sechs Histidinresten (His-Tag). Das Prinzip der Aufreinigung der Proteine beruht auf der hohen Affinität dieser Histidinreste zu der Nickel-nitrilo-tri-essigsäure (NTA)-Matrix. Die NTA bildet einen Chelatkomplex mit dem Nickel, indem sie vier der sechs Ligandenbindungsstellen in der Koordinationsphäre des Nickelatoms besetzt. Die beiden freien Ligandenbindungsstellen interagieren mit dem His-Tag des Proteins, wodurch dieses an die Säule gebunden wird. Anschließend kann durch schrittweise

Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer das Protein von der Säule verdrängt und eluiert werden. Das Prinzip beruht dabei auf chemischer Ähnlichkeit zwischen Imidazol und Histidin.

Durchführung: Die gesamte Aufreinigung wurde auf Eis bzw. bei 4 °C durchgeführt. Das gefrorene Bakterienpellet der Expressionskultur wurde mit 20 ml Lysispuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Bakterien über eine French-Press aufgeschlossen und das Lysat für 1 h bei 13000 x g und 4 °C zentrifugiert, um die schweren Zellfragmente zu pelletieren. Der Überstand wurde auf 100 ml mit Lysispuffer verdünnt und in eine mit Lysispuffer äquilibrierte Ni-NTA-Säule (Säulenvolumen: 5 ml) gegeben.

Die Durchflussgeschwindigkeit betrug während der gesamten Aufreinigung ca. 1 ml/min. Anschließend wurde die Säule mit 100 ml Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit ca. 50 ml Elutionspuffer. Das Eluat wurde über Nacht gegen PBS dialysiert (MWCO 14000). Zur Aufkonzentrierung wurde die Proteinlösung im Dialyseherschlauch in PEG20000 eingelegt. Die konzentrierte Proteinlösung wurde anschließend steril filtriert und die Konzentration über das *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit* bestimmt. Die Reinheit der Präparation wurde in einem 12 %igen SDS-Gel überprüft.

### 3.1.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die Reinheit der G6PI-Aufreinigung wurde über SDS-PAGE bestimmt. Standardmäßig wurde ein 12 %iges SDS-Polyacrylamidgel gegossen:

Trenngel 12 %	
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	8,0 ml
Aqua dest.	6,6 ml
1,5 M Tris pH 8,8	5,0 ml
10 % SDS	0,2 ml
10 % APS	0,2 ml
TEMED	8 µl

Sammelgel 5 %	
30 % Acrylamid/Bisacrylamid	0,83 ml
Aqua dest.	3,4 ml
1,0 M Tris pH 6,8	0,63 ml
10 % SDS	0,05 ml
10 % APS	0,05 ml
TEMED	5 µl

Die Proteinproben (5 µg bis 10 µg) wurden im Verhältnis 1:3 mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, für 5 min. bei 95 °C denaturiert und anschließend aufgetragen.

Zur späteren Bestimmung der Größe der Banden wurde zusätzlich ein Proteinstandard aufgetragen. Der Gellauf wurde bei 200 V durchgeführt. Nachdem der Farbmärker das Gel verlassen hatte, wurde der Lauf gestoppt und die im SDS-Page aufgetrennten Proteine durch eine Coomassie-Färbung im Gel fixiert und sichtbar gemacht. Zum Anfärben wurden die Gele über Nacht unter Schütteln in eine Coomassie-Färbelösung gelegt. Anschließend wurden die Gele kurz mit Wasser gespült und so lange in Entfärberlösung geschüttelt bis die erwünschte Intensität erreicht war. Die Gele wurden dokumentiert und auf einem elektronischen Datenträger festgehalten.

### 3.1.4 Enzymaktivität der G6PI

Methode: Die G6PI ist ein Enzym der Glykolyse, das die Umwandlung von Glukose-6-phosphat zu Fruktose-6-phosphat katalysiert. Die Enzymaktivität der G6PI wurde indirekt über die Oxidation von Glukose-6-phosphat zu 6-Phosphoglukonat bestimmt, eine Reaktion die von der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase katalysiert wird. Dabei findet eine Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  statt, die photometrisch bei 340 nm verfolgt werden kann. Nach dem Gesetz von Lambert und Beer ist die Konzentrationsänderung von  $\text{NADH}$  proportional zur Absorptionsänderung. Es gilt:

$$\Delta c_{\text{NADH}} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{\epsilon_{\text{NADH}} \cdot d} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}} \cdot \text{mmol} \cdot \text{cm}}{6,22 \cdot \text{l} \cdot 1 \cdot \text{cm}} = \frac{\Delta A_{340\text{nm}}}{6,22} \cdot \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$$

$$\Delta c_{\text{NADH}} = \text{Konzentrationsänderung der NADH in } \frac{\text{mmol}}{\text{l}}$$

d = Schichtdicke der Küvette in cm

$$\epsilon = \text{molarer Extinktionskoeffizient des NADH in } \frac{\text{l}}{\text{mmol} \cdot \text{cm}}$$

$\Delta A_{340\text{nm}}$  = Absorptionsänderung bei 340nm pro Minute.

Eine Einheit (U) ist dabei als die Enzymmenge definiert, die 1  $\mu\text{mol}$  Fruktose-6-phosphat zu Glukose-6-phosphat pro Minute bei 25 °C umsetzt.

Durchführung: Die Enzymaktivität der nativen bzw. denaturierten G6PI wurde mit einem *Phosphohexose Isomerase Kit* ermittelt. Die Reaktionslösung wurde nach An-

gaben des Herstellers angesetzt und auf Raumtemperatur erwärmt. Zur Bestimmung der Enzymaktivität der rekombinanten G6PI wurde die jeweilige Proteinlösung mit PBS auf eine Konzentration von je 5 µg/ml gebracht. Anschließend wurden 666 µl der Reaktionslösung in eine Quarzküvette überführt. Der Beginn der Messung wurde durch Zugabe von 22 µl G6PI markiert und die Änderung der Absorption bei 340 nm über 8,5 min. photometrisch verfolgt und die Enzymaktivität bestimmt.

## **3.2 Methoden der Zellbiologie**

### **3.2.1 Zellkultur**

Bei der Kultivierung von Zellen wurden bestimmte Verhaltensregeln beachtet, um steriles Arbeiten zu gewährleisten. Zur Gewinnung von Zellen aus der Milz und den Lymphknoten wurden die Scheren und Pinzetten für 5 min. abgekocht und anschließend in 70 % Ethanol eingelegt. Sämtliche anderen Geräte, Puffer und Medien wurden autoklaviert oder steril filtriert. Beim Umgang mit eukaryotischen Zellen wurde ausschließlich unter der Sterilbank gearbeitet. Die eukaryotischen Zellen wurden immer bei 37 °C, einer Luftfeuchtigkeit von 95 % sowie einer CO<sub>2</sub> Konzentration von 5 % mit Kulturmedium (KM) kultiviert.

### **3.2.2 Gewinnung der Zellen aus der Milz und den Lymphknoten**

Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet. Der Körper der Maus wurde zunächst sorgfältig mit 70 % Ethanol besprüht. Mit einem medianen Längsschnitt am Bauch wurde das Peritoneum freigelegt und durch einen Schnitt entlang des linken Rippenbogens eröffnet. Die dann sichtbare Milz wurde mit Hilfe einer Pinzette gelöst und in Waschmedium (WM) aufgenommen. Anschließend wurden die inguinalen, poplitealen, axillären und paraaortalen Lymphknoten dargestellt, mit einer Pinzette entfernt und ebenfalls in WM aufgenommen.

Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurden die Organe mit Hilfe eines Stemfels durch ein Nylon-Sieb mit einer Maschenweite von 79 µm gepresst und in 50 ml WM überführt. Das Homogenat wurde nun bei 470 x g und 4 °C für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet resuspendiert. Das Lymphknotenhomogenat wurde mit 10 ml KM aufgefüllt und erneut durch ein Zellsieb (70 µm) gegeben. In der Neubauer-Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt und das Homogenat mit KM auf eine bestimmte Konzentration gebracht. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension abgenommen, 1:10 mit Trypanblau verdünnt und auf eine Neubauer-Zähl-



kammer aufgetragen. Im Gegensatz zu toten Zellen sind vitale Zellen in der Lage, diesen Farbstoff auszuschließen. Daher erscheinen unter dem Mikroskop tote Zellen blau wie der Hintergrund, während vitale Zellen sich hell darstellen und in 16 Feldern eines Quadrats ausgezählt werden können (n). Die Gesamtzahl der vitalen Zellen ergibt sich dann aus der folgenden Formel:

$$\text{Gesamtzellzahl} = n \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10 \text{ (Volumen)} \times 10^4.$$

Da in der Milz auch viele Erythrozyten enthalten sind, die sich nicht durch die Zentrifugierung entfernen lassen, wurde bei dem Milzhomogenat nach der Resuspension zusätzlich eine Erythrozytenlyse durchgeführt. Dabei nutzt man die geringere osmotische Stabilität der roten Blutkörperchen gegenüber der der weißen, um gezielt die Erythrozyten mit einem hyposmolaren Puffer zu zerstören. Dazu wurde das Milzhomogenat mit 10 ml Erythrozytenlysepuffer versetzt und für 8 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Während der Lyse wurde die Zellsuspension über ein 70 µm-Zellsieb gegeben, um Zelldebris zu entfernen. Die Lyse wurde durch Zugabe von 30 ml WM unterbrochen und die Zellsuspension erneut zentrifugiert. Alle folgenden Schritte waren analog zur Aufarbeitung der Lymphknotenzellen.

### **3.2.3 Gewinnung von Zellen aus dem Knochenmark**

Die Femurknochen und Unterschenkelknochen wurden sorgfältig mit einem Skalpell von anhängenden Muskeln und Sehnenanteilen befreit und in WM aufgenommen. In der Sterilbank wurden die Knochen zusammen mit dem WM in eine Petrischale überführt. Nach Aufziehen einer 5 ml-Spritze mit WM, die mit einer 25-Gauge-Kanüle bestückt war, wurde mit dieser von einer Seite in die Knochenmarkhöhle des Röhrenknochens hinein gestochen und der Knochenmarkpfropf sorgfältig herausgespült. Durch mehrmaliges Aufziehen der Spritze wurden größere Zellaggregate suspendiert. Die Zellsuspension wurde durch ein Sieb in 50 ml WM überführt und für 5 min. bei 470 x g und 4 °C zentrifugiert. Alle folgenden Schritte erfolgten analog zur Aufarbeitung der Lymphknotenzellen.

### **3.2.4 Proliferationstest**

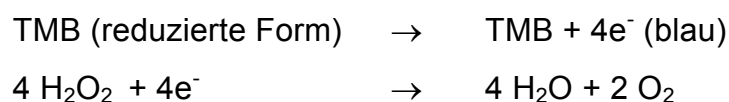
Methode: Mit Hilfe des Proliferationstests kann man das Ausmaß der Proliferation bestimmen. Vor jeder Zellteilung synthetisiert die Zelle neue DNA. Dabei werden die

dazu benötigten Nucleinsäuren entweder neu synthetisiert oder bei entsprechendem Angebot aus der Umgebung durch einen Transporter aufgenommen und eingebaut. Während Adenosin, Guanosin und Cytidin auch in die RNA eingebaut werden, wird Thymidin ausschließlich für die DNA-Synthese verwendet. Die Proliferation der Zellen kann daher über den Einbau von radioaktiv markiertem [Methyl<sup>3</sup>H]-Thymidin verfolgt und im  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen werden. Die dabei ermittelten Messwerte haben die Einheit CPM (counts per minute).

Durchführung:  $2 \times 10^5$  Zellen der Lymphknoten bzw. Milz der untersuchten Mausstämmen wurden in 200  $\mu$ l KM für 72 h in den Mulden einer 96-Muldenplatte mit unterschiedlichen Konzentrationen nativer rhG6PI, denaturierter rhG6PI, Peptid und PBS bei 37 °C im Inkubator stimuliert. Für die letzten 18 h wurde der Kultur zusätzlich 1  $\mu$ Ci [Methyl<sup>3</sup>H]-Thymidin zugefügt und weiter bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden dann mit Hilfe eines Zellerntegeräts auf Szintillationsfilterplatten transferiert und bei 65 °C für 20 min. getrocknet. Auf jeden Filter wurden 40  $\mu$ l Szintillationsflüssigkeit pipettiert. Anschließend wurden die Filterplatten versiegelt und im  $\beta$ -Szintillationszähler für 1 min. pro Filter gemessen. Die Proliferation wurde in Form des Stimulationsindex angegeben. Der Stimulationsindex ist der Quotient aus dem Mittelwert nach Restimulation mit dem jeweiligen Antigen und dem Mittelwert der unstimulierten mit PBS kultivierten Kultur.

### 3.2.5 ELISA

Methode: Antikörper, die spezifisch für ein Antigen sind, können über einen ELISA (engl.: enzyme linked immunosorbent assay) detektiert werden. Das Antigen wird dafür an die Matrix einer speziellen 96-Muldenplatte gebunden. Antikörper aus Serum, die das Antigen spezifisch binden, verbleiben auf der Platte. Der Nachweis dieser Bindung erfolgt indirekt über einen zweiten Isotyp-spezifischen Antikörper, der mit einer Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist. Diese Peroxidase katalysiert nach Zugabe des Elektronendonors Tetramethylbenzidin (TMB) die Reaktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff. Dabei wird der Elektronendonor oxidiert, was durch einen Farbumschlag sichtbar wird.



In dieser Arbeit sind verschiedene ELISA durchgeführt worden. Es folgt zunächst eine Beschreibung der mit Mausserum durchgeführten G6PI-ELISA. Anschließend wird auf die unterschiedlichen Antigene und Besonderheiten bei der Durchführung der anderen ELISA eingegangen.

Durchführung: Zur Bestimmung des Serumtiters G6PI-spezifischer Antikörper wurden 100 µl der rhG6PI (5 µg/ml) in PBS (Beschichtungslösung) in jede Mulde einer 96-Muldenplatte für ELISA überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Lösung wurde dann ausgeschüttelt und die Platten kurz auf Zellstoff abgeklopft. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von 100 µl Blockierungspuffer (PBS/BSA) und einer 30 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur blockiert.

Anschließend wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und mit 100 µl Serum als Triplets in unterschiedlichen Verdünnungen (1:100 bis 1:72.900) in PBT (PBS/BSA/Tween) inkubiert. Nach 1 h wurden die Platten erneut dreimal gewaschen. Als Negativkontrolle wurden Triplets mit je 100 µl PBS mitgeführt. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden die Platten mit je 100 µl eines Ziege-anti-Maus-IgG-Antikörpers (1:50.000) in PBT für 30 min. inkubiert. Nach gründlichem Waschen erfolgte die Farbreaktion durch Zugabe von 100 µl einer frisch hergestellten Lösung aus 10 ml TMB-Puffer pro Tablette TMB (1 mg) und 4 µl 30 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Mit beginnender Blaufärbung der Negativkontrolle wurde diese Farbreaktion mit 50 µl 12,5 %iger H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Dabei folgte ein Farbumschlag von blau nach gelb und die Absorption wurde anschließend in einem ELISA-Messgerät bei 450 nm bestimmt.

#### ELISA gegen Peptid mit Mausseren

Die ELISA-Platten wurden mit Peptid (5 µg/ml) in PBS beschichtet. Das Mausserum wurde seriell in PBS/BSA/Tween von 1:100 bis 1:72.900 verdünnt. Alle folgenden Schritte wurden wie beim G6PI-ELISA durchgeführt.

#### Inhibitions-ELISA gegen rhG6PI mit Mausserum

##### Methode:

Polyklonale Antikörper sind ein Gemisch von Antikörpern, die im Rahmen der adaptiven Immunantwort von B-Zellen produziert werden und gegen unterschiedliche Epitope eines spezifischen Antigens gerichtet sind. Der Inhibitions-ELISA kann zur Analyse der Epitopspezifität polyklonaler Seren eingesetzt werden. Das Antigen wird wie beim

G6PI-ELISA an die Matrix einer speziellen 96-Muldenplatte gebunden. Nach Zugabe des zu untersuchenden Epitops konkurrieren Epitop und Antigen um die Bindungsstelle des Antikörpers. Je nachdem wie stark die Affinität der Antikörper zu dem Epitop ist, verbleibt nur ein Teil der Antikörper an der Platte. Der Nachweis dieser Bindung erfolgt wie im oben beschriebenen G6PI-ELISA, es kommt zu einer Signalabschwächung.

#### Durchführung:

Die Bestimmung des Serumtiters G6PI-spezifischer Antikörper und des Inhibitionseffekts durch das Epitop verlief im allgemeinen Ablauf gleich. Während der Inkubation der Muldenplatte mit Blockierungspuffer, wurde das Serum mit unterschiedlichen Konzentrationen (100 µg/ml bis 0 µg/ml in PBS bzw. 100 µM bis 0 µM in PBS) von nativem rhG6PI, denaturiertem rhG6PI und Epitop im Verhältnis 1:1 (60 µl Serum und 60 µl Proteinlösung) vorinkubiert. Alle folgenden Schritte waren identisch zum G6PI-ELISA.

### **3.2.6 ELISPOT**

#### Methode:

Die Quantifizierung einzelner Immunzellen und deren Sekretionsprodukten kann mit der ELISPOT-Methode (engl.: enzyme linked immunospot) ermittelt werden. Dazu wird eine Mikrotiterplatte mit einem Antigen oder einem Antikörper beschichtet, an dem das Sekretionsprodukt spezifisch bindet und auf der Platte verbleibt. Diese Bindung wird indirekt durch einen Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen, der eine hohe Affinität zu Streptavidin besitzt.

Nach Zugabe eines Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugats erfolgt durch die darauffolgende Enzym-Substrat-Reaktion ein Farbnachweis. Dabei wird das farblose BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) durch die alkalische Phosphatase umgesetzt und bildet einen blauen Farbkomplex, der überall dort sichtbar wird, wo sich eine sezernierende Zelle befindet. Diese kleinen Spots lassen sich anschließend unter einem Invert-Mikroskop auszählen. Da in beiden Femurknochen 11,8 % des Knochenmarks enthalten sind, wurde zur Ermittlung der Zahl der Plasmazellen im gesamten Knochenmark die in den Experimenten erhaltene Zellzahl mit dem Faktor 8,47 multipliziert (Chervenick, Boggs et al. 1968).

Durchführung: Zur Quantifizierung G6PI-spezifischer Plasmazellen wurde eine flachbodige 96-Mikrotiterplatte für ELISA verwendet. Die Beschichtung mit rhG6PI verlief identisch wie bei dem G6PI-ELISA. Unspezifische Bindungen wurden durch Zugabe von 100 µl Blockierungspuffer (PBS/BSA 3 %) und einer 30-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur blockiert. Anschließend wurden die Platten einmal mit PBS gewaschen und 200 µl der Zellsuspension reihenweise in unterschiedlichen Verdünnungsstufen (jeweils 1:3) in KM inkubiert. Die Antikörpersekretion erfolgte für 2 h im Brutschrank bei 37 °C unter Zusatz von 5 % CO<sub>2</sub>. Nach der Inkubation wurden die Platten erneut sechsmal mit Waschpuffer gewaschen und von den Zellen entfernt. Dieser Puffer wurde für alle nachfolgenden Waschschritte und zur Herstellung der Gebrauchslösungen für die Reagenzien verwendet.

Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurden die Platten mit 100 µl Biotin-gekoppelten polyklonalen Ratten-anti-Maus-IgG-Antikörper (1 µg/ml) in PBT inkubiert. Nach 20 min. bei Raumtemperatur wurden die Platten wieder dreimal gewaschen und danach mit 100 µl Streptavidin-alkalische-Phosphatase-Konjugat für 20 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Zugabe von 100 µl eines frisch hergestellten Entwicklungspuffers. Dazu wurden 8 mg BCIP in 8 ml 2-AMP-Puffer gelöst und 20 min. bei 64 °C im Wasserbad erwärmt. Danach wurden 2 ml geschmolzene Agarose hinzugefügt und der Puffer erneut 10 min. bei 65 °C im Wasserbad erwärmt. Die Verfestigung der Agarose geschah für 10 min. bei 4 °C. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 10 min. wurde bei Raumtemperatur die Farbreaktion für 2 h bei 37 °C entwickelt.

### **3.3 SPOT-Technologie**

#### **3.3.1 SPOT-Synthese von Peptiden**

Methode: Die Analyse und Identifizierung von antigenen Determinanten auf Proteinen („Epitope-Mapping“) kann mit Hilfe eines Pepscan-Verfahrens durchgeführt werden. Dabei wird die Reaktivität der Antikörper gegenüber synthetisch hergestellten, sich überlappenden Partiaalsequenzen eines Proteins untersucht. Zur Herstellung einer solchen Peptidbibliothek bedient man sich der SPOT-Technologie, bei der parallel Peptide sukzessive auf einen planaren Träger nach der Fmoc-Strategie aufgebaut werden (Frank 1992; Kramer and Schneider-Mergener 1998). Zur Einführung von Aminofunktionen als Ankerfunktionen für die nachfolgende Peptidsynthese werden die Hydroxyl-

Gruppen der Zellulose mit  $\beta$ -Alanin verestert. Durch die Kopplung eines zweiten  $\beta$ -Alanins mit Hilfe eines *Auto-Spot Robot 222 XL* Pipettierroboters werden kreisförmige Syntheseorte auf der Membran, sogenannte Spots, definiert. Die beiden  $\beta$ -Alaninreste dienen dabei gleichzeitig auch als Abstandhalter zwischen der Membran und dem Peptid, um später die freie Zugänglichkeit der immobilisierten Peptide zu gewährleisten. Mit Hilfe des Pipettierroboters erfolgt der schrittweise Aufbau der Peptide durch wiederholtes Auftragen von 0.3 M Aminosäurelösungen in NMP (1-Methyl-2-pyrrolidon) auf die Spots im Wechsel mit der Abspaltung der Seitenschutzgruppen und Waschprozedur.

Die verwendeten Aminosäuren waren dabei am N-Terminus durch einen Fluorenylmethoxycarbonyl-Rest (Fmoc) geschützt, um eine kontrollierte Verlängerung der Peptidketten zu gewähren. Zur Vermeidung anderer unerwünschter Nebenreaktionen wurden zusätzlich die reaktiven Seitenketten der Fmoc-Aminosäuren mit Schutzgruppen besetzt:

Tert-Butylester (OtBu)	Aspartat, Glutamat
Tert-Butylether (tBu)	Serin, Threonin, Tyrosin
Tert-Butyloxycarbonyl (Boc)	Tryptophan, Lysin,
Trityl (Trt)	Histidin, Asparagin, Glutamin
2,2,4,6,7-Pentamethyldihydrobenzofuran-5-sulfonyl (Pbf)	Arginin

Alle Aminosäuren lagen bereits als aktivierte Pentafluorphenyl (Pfp)- oder 3,4-Dihydro-3-hydroxy-4-oxio-1,2,3-benzotriazin (Dhbt)-Ester (Serin und Threonin) vor. Insgesamt wurden 276 15mer Peptide auf einer Membran synthetisiert, die sich jeweils um 13 Aminosäuren überlappen und in Ihrer Gesamtheit die gesamte Sequenz der G6PI darstellen.

#### Chemische Modifizierung der Cellulosemembran

Whatman<sup>®</sup>50-Filterpapiere wurden über Nacht mit einer Lösung von 0,2 M Fmoc- $\beta$ -Alanin-OH – aktiviert mit 0,24 M Dichlormethan (DIC) und 0,4 M N-Methylimidazol (NMI) – in DMF (N,N-Dimethylformamid) unter langsamem Schütteln inkubiert, so dass eine gleichmäßige Verteilung des  $\beta$ -Alanins auf der Membran erreicht wurde.

Nach dreimaligem Waschen der Membran mit Dimethylacetamid (DMA) erfolgte die Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppen des  $\beta$ -Alanins durch eine 20-minütige Inkubation mit 20 % Piperidin in DMA. Die Membran wurde erneut fünfmal mit DMA, dreimal mit Ethanol und einmal mit Ether gewaschen und anschließend getrocknet.

#### Quantitative Bestimmung der Beladungsdichte

Die Bestimmung der Beladungsdichte der modifizierten Cellulosemembran (Stoffmenge an gekoppeltem  $\beta$ -Alanin pro  $\text{cm}^2$  Membran) erfolgte durch Kopplung eines zweiten Fmoc- $\beta$ -Alanins und anschließende photometrische Quantifizierung des Fmoc. Je 1  $\mu\text{l}$  einer 0,6 M Fmoc- $\beta$ -Alanin-pentafluorphenyl-ester-Lösung (Fmoc- $\beta$ -Ala-Opfp) in DMA wurde an drei verschiedenen Stellen auf die Membran aufgebracht und der Pipettiervorgang nach 15 min. Kopplungszeit wiederholt. Die drei „Spots“ wurden anschließend mit einem Locher ausgestanzt, in 2 ml-Reaktionsgefäße überführt und fünfmal mit DMA gewaschen. Zur Abspaltung der Fmoc-Schutzgruppe wurden die Spots für 20 min. mit je 1 ml 20 % Piperidin in DMA inkubiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 302 nm in einem UV-Spektrometer bestimmt. Als Blindwert diente eine 20 %ige Piperidinlösung. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt nach dem Lambert-Beer-Gesetz. Es gilt:

$$E = \epsilon \cdot c \cdot d$$

$$c = E / \epsilon \cdot d$$

c = Konzentration

d = Schichtdicke der Küvette in cm

$\epsilon$  = molarer Extinktionskoeffizient = 8100 l mol/cm.

Für die in dieser Arbeit verwendeten Membranen konnte eine Beladung von ca. 16 nmol/cm<sup>2</sup> berechnet werden.

#### Definierung der Syntheseorte der Spots

Durch die Kopplung eines zweiten  $\beta$ -Alanins mit Hilfe eines *Auto-Spot Robot 222 XL* Pipettierroboters wurden kreisförmige Syntheseorte auf der Membran definiert. Die beiden  $\beta$ -Alaninreste dienen gleichzeitig auch als Abstandhalter zwischen der Membran und dem Peptid, um später die freie Zugänglichkeit der immobilisierten Peptide

zu gewährleisten. Es wurden 308 Spots aus 0,3 M Fmoc- $\beta$ -Ala-Opfp in Dimethylsulfoxid (DMSO) auf die Membran aufgebracht. Der Pipettiervorgang wurde nach 15 min. Reaktionszeit wiederholt, um eine vollständige Kopplung des  $\beta$ -Alanins zu erreichen. Um die reaktiven Reste auf die Spots zu begrenzen, wurden die restlichen Aminofunktionen auf der Membran durch Acetylierung blockiert. Die Membran wurde zunächst 2 min. mit 2 % Acetanhydrid in DMA und anschließend 30 min. mit 2 % Acetanhydrid und 1 % N-Ethyl-diisopropylamin (DIPEA) in DMA inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit DMA wurden die Fmoc-Schutzgruppen durch Zugabe von 20 % Piperidin in DMA und Inkubation für 20 min. abgespalten und die Membran erneut gewaschen (fünfmal mit DMA, dreimal mit Ethanol und einmal mit Ether). Die freien Aminogruppen wurden durch Anfärben mit 0,01 % (w/v) Bromphenolblau in Ethanol sichtbar gemacht (Blaufärbung der Spots) und die Membran anschließend einmal mit Ethanol und einmal mit Ether gewaschen und getrocknet.

#### Synthese der zellulosegebundenen Peptide

Zum sukzessiven Aufbau der Peptide wurde Alanin in DMSO, die übrigen Aminosäurelösungen in NMP hergestellt. Die Konzentration betrug durchgehend 0,3 mmol/l. Alle folgenden Waschschriffe wurden je 3 min. lang durchgeführt. Zum Auftragen der Aminosäurelösungen in NMP auf die Spots wurde der *Auto-Spot Robot 222 XL* Pipettierroboter eingesetzt. Die Reaktionszeit für die Bildung der Amidbindung betrug pro Kopplungszyklus 15 min., wobei jeder Pipettiervorgang zweimal wiederholt wurde. Es erfolgte die Fmoc-Gruppenabspaltung mit 20 % Piperidin in DMA für 20 min., wodurch der N-Terminus der Aminosäure für den sich anschließenden Reaktionszyklus freigesetzt wurde. Die Membran wurde erneut fünfmal mit DMA und dreimal mit Ethanol gewaschen. Die freien Aminogruppen wurden dann mit Bromphenolblau angefärbt. Anschließend wurde die Membran dreimal mit Ethanol und zum Trocknen zweimal mit Ether gewaschen.

#### Abspaltung der Seitenschutzgruppen

Die Abspaltung der Aminosäureseitenkettenschutzgruppen erfolgte mit Hilfe von Trifluorethansäure (TFA). Nach der letzten Fmoc-Abspaltung wurde die trockene Membran für 30 min. in eine frisch hergestellte Lösung aus 90 % TFA, 3 % Triisobutylsilan (TIBS), 2 % Wasser und 1 % Phenol in Dichlormethan (DCM) eingelegt und ohne Schüttelbewegung für 30 min. inkubiert. Die Membran wurde dann viermal mit DCM,



dreimal mit DMA, zweimal mit Ethanol und einmal mit Ether gewaschen und getrocknet. Bei langsamen Schüttelbewegungen folgte eine weitere Inkubation der Membran für 2,5 h mit einer Lösung aus 50 % TFA, 3 % TIBS, 2 % Wasser und 1 % Phenol in DCM, der sich eine Wiederholung der oben beschriebenen Waschprozedur anschloss.

### 3.3.2 Pepscan-Verfahren

Methode: Beim Pepscan-Verfahren können mit Hilfe der durch SPOT-Technologie hergestellten Peptidbibliothek Epitope bestimmt werden, die von Antikörpern erkannt werden. Wie bei den ELISA wird die Bindung zwischen Antikörper und Epitop indirekt über einen zweiten Spezies-spezifischen Antikörper, der mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert ist, nachgewiesen. Die Detektion der Zielmoleküle erfolgt anschließend mit Hilfe eines Chemilumineszenz-Systems in einem Lumineszenzdetektor. Die Peroxidase katalysiert nach Zugabe von *Luminol* die Reaktion von *Luminol* (3-Amino-phthalsäurehydrazid) zu 3-Aminophthalat, bei der Licht mit einer Wellenlänge von 425 nm emittiert und gemessen wird. Die detektierten Signale werden dabei rein visuell über den Schwärzungsgrad der Spots ausgewertet. Mit Hilfe der Software Genspotter wurden die Signalintensitäten der Spots quantifiziert. Dabei wurde ein Spot nur dann als positives Signal definiert, wenn die Signalintensität dem Hintergrundsignal plus seiner dreifachen Standarddeviation entsprach (Weiser, Or-Guil et al. 2005):

$$SI = BG + 3 \times \text{StdDev}$$

SI = Signalintensität

BG = Background

StdDev = Standarddeviation.

Durchführung: Die Membranen wurden einzeln in Petrischalen überführt und alle Inkubationen unter Schütteln durchgeführt. Zunächst wurden die Membranen für 10 min. mit Methanol und dreimal 10 min. mit *Tris Buffered Saline* (TBS) inkubiert. Zur Blockade unspezifischer Bindungen erfolgte eine Inkubation mit je 5 ml Blockierungspuffer (BB) für 2 h. Nach Abgießen des Blockierungspuffers wurden die Membranen für jeweils 10 min. dreimal mit TBS gewaschen. Anschließend wurden die Membranen mit Serum der Maus in einer Konzentration von 7 µg/ml in BB für 3 h inkubiert. Nach

dreimaligem Waschen mit TBS für jeweils 10 min. erfolgten die Inkubation mit anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (1:50.000) für 1,5 h und ein erneuter Waschschrift für dreimal 10 min. mit Tween-TBS (T-TBS). Zur Visualisierung der Bindungen wurde die *Lumino*-Lösung nach Angaben des Herstellers angesetzt und die Membranen mit je 1 ml für 1 min. inkubiert. Die Auswertung erfolgte anschließend im *Lumi-Imager*<sup>TM</sup>. Zum Ausschluss einer direkten Wechselwirkung der Peroxidase mit den zellulosegebundenen Peptiden wurde von der jeweiligen Membran eine Peptidbibliothek einem Kontrollexperiment unterzogen, bei welchem nur mit dem anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat inkubiert wurde. Das Ergebnis war in allen Fällen negativ, sodass direkte Wechselwirkungen zwischen der Peroxidase und den Peptiden ausgeschlossen werden konnten.

### 3.4 Peptidsynthese

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Peptide zeigten in der Reverse-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatographie (rHPLC) und in der Matrix-assoziierten-Laserdesorptions-Flugzeitmassenspektrometrie (MALDI-TOF) einen Reinheitsgrad von 100 % und wurden von der Arbeitsgruppe Dr. Rudolf Volkmer-Enger im Institut für Medizinische Immunologie der Charité synthetisiert.

### 3.5 Tierversuche

#### 3.5.1 Immunisierung

Für die Immunisierung wurde eine Emulsion aus *komplettem Freundschens Adjuvans* (CFA) und der Proteinlösung mit rhG6PI hergestellt. Die Proteinlösung wurde mit PBS verdünnt und mit dem gleichen Volumen CFA in einem 2 ml-Eppendorfgefäß so gemischt, dass pro 200 µl der Emulsion 200 µg bis 500 µg Protein enthalten waren. Bei Immunisierung mit denaturierter rhG6PI wurde die Proteinlösung zuvor für 5 min. bei 95 °C gekocht und anschließend wieder auf 4 °C abgekühlt. Das in zwei Phasen vorliegende Gemisch wurde für einige Sekunden mit Ultraschall behandelt, bis eine weiße, feste Emulsion entstand. Diese Emulsion wurde luftblasenfrei in eine Spritze aufgezogen und je 100 µl davon links und rechts an der Schwanzbasis subkutan injiziert, nachdem der Injektionsort vorher mit 70 %igem Ethanol desinfiziert worden war. Die Mäuse wurden mit 200 µg bis 500 µg Protein immunisiert. Zur Kontrolle wurden einige Mäuse auch nur mit PBS in CFA immunisiert. Nach der Immunisierung

wurden die Mäuse in den Käfig zurückgesetzt und so lange beobachtet bis die Vitalitätszeichen dem Normalzustand entsprachen.

### **3.5.2 Serum- und Blutgewinnung**

Zur Serumgewinnung wurden die Mäuse zunächst für kurze Zeit mit Rotlicht bestrahlt, um eine stärkere Durchblutung in der Schwanzvene zu erreichen, und zur Immobilisation in einen Impfkäfig gesetzt. Die Schwanzvene wurde nahe der Schwanzbasis vorsichtig mit einem Skalpell eröffnet und die Blutropfen in einem 2 ml-Eppendorfgefäß aufgefangen. Die Inzisionsstelle wurde vorsichtig mit einem Papiertuch abgewischt und die Maus in den Käfig zurückgesetzt. Sie wurde dort so lange beobachtet, bis die Blutung vollständig zum Stillstand kam. Das gewonnene Blut wurde zur Gerinnung für 30 min. bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend für 10 min. bei 10.000 x g in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Das als Überstand verbliebene Serum wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und bei -20 °C aufbewahrt.

### **3.5.3 Klinischer Verlauf der Arthritis**

Die nach Immunisierung mit rhG6PI induzierte periphere symmetrische Arthritis in den Vorder- und Hinterpfoten wurde in drei Schweregrade unterteilt. Bewertet wurden sowohl die Rötung als auch die Schwellung der Pfoten. Der Grad 0 entsprach einer gesunden, klinisch unauffälligen Pfote, während bei Grad 1 (1 Punkt) eine leichte Schwellung und leichte Rötung zu verzeichnen war und bei Grad 2 (2 Punkte) ein Maximalbefund mit massiver Schwellung und starker Rötung vorlag. Bei vier Pfoten war somit ein maximaler Arthritiscore von 8 Punkten zu erreichen.

### **3.5.4 Histologie**

Für die histologische Untersuchung wurden die Mäuse an den entsprechenden Tagen durch zervikale Dislokation getötet. Die Tiere wurden mit 70 %igem Ethanol eingesprüht und anschließend sezziert. Dabei wurden die Vorder- und Hinterpfoten zuerst vom Fell frei präpariert und anschließend die Extremitäten abgetrennt. Die Fixierung der Körperteile erfolgte für mindestens eine Woche in 10 %iger Formalinlösung. Die gesamte weitere Aufarbeitung wurde von Frau Gabriele Fernahl und Frau Janine Karle in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Veit Krenn am Institut für Pathologie der Charité in Berlin durchgeführt. Die Hämatoxylin und Eosin gefärbten Gewebeschnitte wurden von Dr. Lars Morawietz oder Prof. Dr. Veit Krenn begutachtet und bewertet.

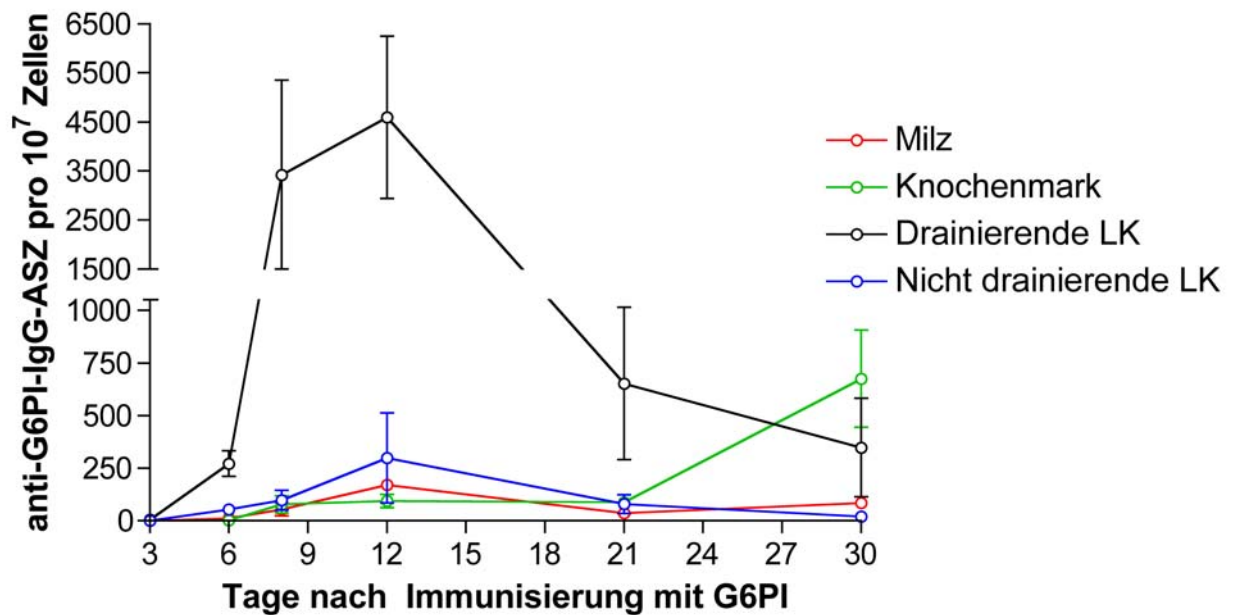
Zur Bestimmung des Arthritisgrads einer Pfote wurden folgende fünf Kriterien berücksichtigt: Das Ausmaß der Synovitis, Tenosynovitis, Periostitis, Periarthritis und der Knorpel- und Knochendestruktion. Dabei wurde jedes Kriterium in vier Schweregrade eingeteilt (0 bis 4), so dass durch bei Addition der Werte jedes Kriteriums für den Gesamtgrad einer Pfote maximal 15 Punkte erreicht werden konnten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Kinetik und Lokalisation der B-Zellantwort gegen rhG6PI

Im Modell der G6PI-induzierten Arthritis wird durch eine Immunantwort gegen ein systemisch exprimiertes Antigen eine organspezifische Erkrankung induziert. DBA/1-Mäuse entwickeln neun bis zwölf Tage nach Immunisierung mit rhG6PI eine akute periphere symmetrische Arthritis mit Befall der Vorder- und Hinterpfoten, die etwa 15 Tage nach der Immunisierung maximal ausgeprägt ist. Danach bildet sich die Arthritis langsam zurück. 60 Tage nach Immunisierung sind schließlich keine klinischen Zeichen einer Arthritis mehr zu beobachten (Schubert 2005). Da die G6PI ubiquitär exprimiert wird, sollte untersucht werden, ob die humorale Immunantwort gegen G6PI nach primärer Immunisierung systemisch ist oder nur lokal in den die Injektionsstellen drainierenden Lymphorganen stattfindet.

Dazu wurden DBA/1-Mäuse mit 400 µg rhG6PI in CFA subkutan an der Schwanzbasis immunisiert. An Tag 3, 6, 8, 12, 21 und 30 nach Immunisierung wurden Zellen aus Milz, Knochenmark, drainierenden (inguinal und paraaortal) und gelenknahen, nicht drainierenden Lymphknoten (axillär, popliteal) isoliert und daraus die absolute Anzahl G6PI-spezifischer IgG-Antikörper-sezernierender Zellen (IgG-ASZ) mittels ELISPOT bestimmt. Zur Vergleichbarkeit der in den unterschiedlichen Lymphorganen bestimmten Zellzahlen G6PI-spezifischer IgG-ASZ wurden die ermittelten Werte auf  $10^7$  Zellen der Gesamtzellzahl berechnet (Abb. 4.1).



**Abb. 4.1: Kinetik und Lokalisation der anti-G6PI-IgG-ASZ nach Immunisierung mit rhG6PI.** Nach Immunisierung von DBA/1-Mäusen mit 400 µg rhG6PI in CFA wurden an Tag 3, 6, 8, 12, 21 und 30 die Zellen aus der Milz, dem Knochenmark, den drainierenden Lymphknoten (inguinal und paraaortal) und nicht drainierenden Lymphknoten (mesenterial, popliteal, axillär) isoliert und die Anzahl der anti-GPI-IgG-ASZ mittels ELISPOT bestimmt. Die hier dargestellten Werte beziehen sich auf  $10^7$  Zellen. Die Anzahl der untersuchten Tiere variierte zwischen vier und acht Mäusen. Anti-G6PI-IgG-ASZ sind im akuten Krankheitsstadium überwiegend in den drainierenden Lymphknoten lokalisiert. Im weiteren Verlauf zeigt sich eine Verlagerung der anti-G6PI-IgG-ASZ von den drainierenden Lymphknoten in das Knochenmark.

DBA/1-Mäuse, die nur mit CFA immunisiert wurden und als Negativkontrolle dienten, zeigten zu keinem Zeitpunkt G6PI-spezifische Plasmazellen, so dass die Nachweisgrenze der Spots größer 1 gesetzt wurde. Bei den zu diesem Zeitpunkt klinisch unauffälligen DBA/1-Mäusen konnten am dritten Tag nach Immunisierung G6PI-spezifische Plasmazellen nur in den drainierenden Lymphknoten detektiert werden. Ihre Anzahl lag im Mittel bei sechs Zellen. Bereits sechs Tage nach Immunisierung wurden in allen Lymphorganen anti-G6PI-IgG-ASZ gefunden. Die höchste Zellzahl wurde in den drainierenden Lymphknoten beobachtet und lag im Mittel bei 270 Zellen. In den übrigen Lymphorganen wurden weniger als 30 Zellen gezählt.

Am achten Tag, kurz vor Manifestation der Arthritis, hatte die Zahl der anti-G6PI-IgG-ASZ insbesondere in den drainierenden Lymphknoten weiter zugenommen. Hier wurde im Vergleich zum sechsten Tag nach Immunisierung ein 13-fach höherer Wert gemessen. Die Zahl der G6PI-spezifischen IgG-ASZ war im Mittel auf 3418 Zellen angestiegen, während in der Milz und in den nicht drainierenden Lymphknoten maximal 100 IgG-ASZ gefunden wurden.

Auch im Knochenmark zeigte sich ein Anstieg G6PI-spezifischer Plasmazellen, im Mittel auf 78 Zellen. Zwölf Tage nach Immunisierung waren etwa 78 % aller anti-G6PI-IgG-ASZ in den drainierenden Lymphorganen lokalisiert, wo durchschnittlich 4591 Zellen nachgewiesen werden konnten. Im Vergleich dazu wurden in den nicht drainierenden Lymphknoten 299 und in der Milz 171 Zellen gefunden. Im Knochenmark lag die Anzahl der IgG-ASZ lag bei etwa 94 Zellen. Am Tag 21 war bei hohem Serumtiter gegen G6PI ein starker Abfall der ASZ in den drainierenden Lymphknoten.

In den nicht drainierenden Lymphknoten und der Milz fiel die Zahl der Plasmazellen auf ähnliche Werte wie am sechsten und achten Tag und betrug im Mittel weniger als 55 Zellen, im Knochenmark blieb sie mit durchschnittlich 86 Zellen unverändert. Bis zum Tag 30 nahm die Zahl der Plasmazellen in den drainierenden und nicht drainierenden Lymphknoten sowie in der Milz stetig ab, während im Knochenmark ein signifikanter Anstieg der anti-G6PI-IgG-ASZ auf durchschnittlich 675 Zellen beobachtet wurde.

Nach primärer Immunisierung mit rhG6PI wurden in allen untersuchten Lymphorganen G6PI-spezifische IgG-ASZ gefunden, wobei die humorale Immunantwort gegen G6PI im akuten Krankheitsstadium hauptsächlich in den die Injektionsstellen drainierenden Lymphknoten stattfand. Der Nachweis der anti-G6PI-IgG-ASZ korrelierte dabei zeitlich mit dem Auftreten der Autoantikörper gegen G6PI im Serum. Mit Abklingen der klinischen Manifestation der Arthritis wurde ein Abfall der G6PI-spezifischen Plasmazellen in den drainierenden Lymphknoten bei gleichzeitig stetigem Anstieg der Plasmazellen im Knochenmark beobachtet, wo am Tag 30 nach Immunisierung etwa 47 % aller anti-G6PI-IgG-ASZ lokalisiert sind.

#### **4.2 Epitopspezifische Analyse der Autoantikörper-Antwort gegen rhG6PI**

In der G6PI-induzierten Arthritis sind schon sechs Tage nach Immunisierung Antikörper gegen rhG6PI im Serum nachweisbar. Neun Tage nach Immunisierung erreichen die Antikörpertiter ihr Maximum. Auch nach Abklingen der klinischen Symptome am Tag 30 sind anti-G6PI-Antikörper noch hochtitrig nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass Antikörper gegen G6PI durch Aktivierung bzw. Verstärkung der Komplementkaskade sowie über ihre durch Fc $\gamma$ -Rezeptoren übermittelten Signale auf Effektorzellen entscheidend zur Pathogenese der Arthritis beitragen. Anders als im K/BxN-Modell kann die G6PI-induzierte Arthritis jedoch nicht durch Transfer von Antikörpern übertragen werden.

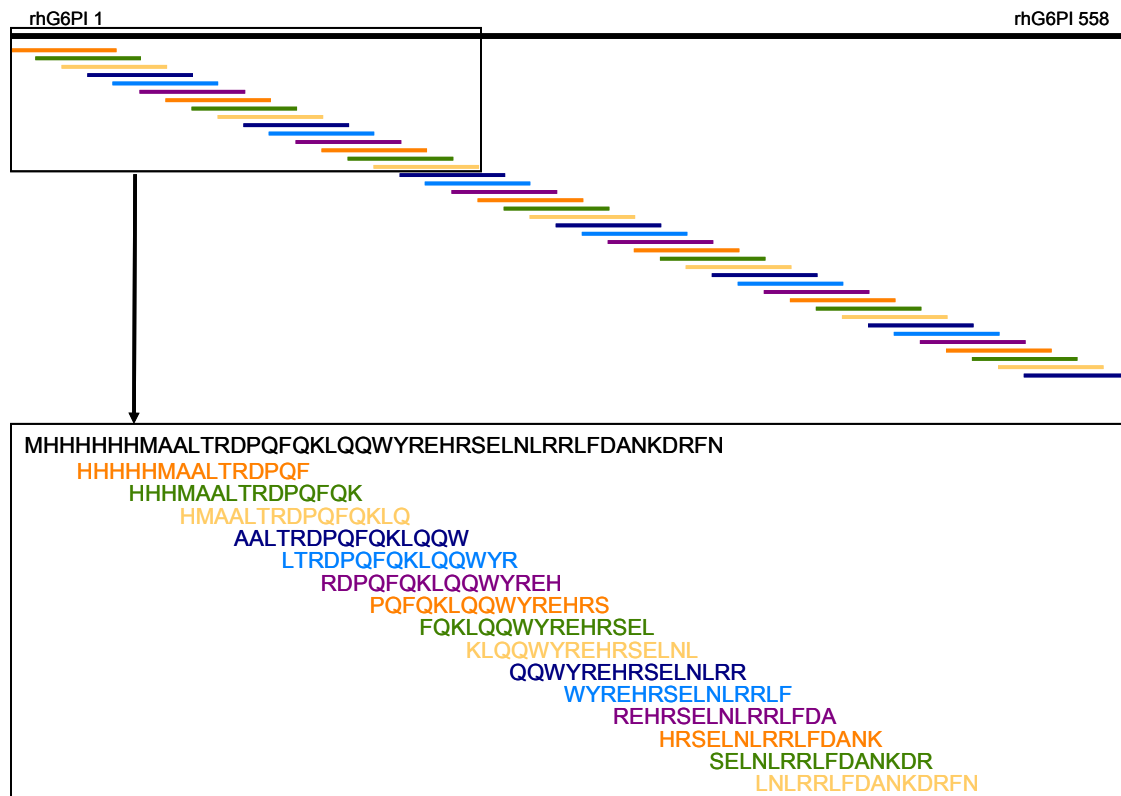
Daneben produzieren auch nicht suszeptible Stämme hohe Serumtiter gegen G6PI, so dass die spezifische Rolle der Antikörper noch nicht geklärt ist (Schubert 2004). Im K/BxN-Modell wurden zwei lineare B-Zell-Epitope identifiziert. Antikörper, die diese Epitope binden, können eine Arthritis transferieren (Solomon 2003). Eine Epitopenalyse der anti-G6PI-Antikörper arthritischer DBA/1-Mäuse könnte Aufschluss darüber geben, warum die G6PI-induzierte Arthritis bisher nicht durch Antikörper übertragen werden konnte und weshalb nicht suszeptible Stämme trotz hoher anti-G6PI-Titer keine Arthritis entwickeln.

Da die Arthritogenität der Antikörper von der Erkennung eines bestimmten oder weniger definierter Epitope abhängen kann, sollte unsere Untersuchung ermitteln, welche Peptide der G6PI von den Antikörpern der suszeptiblen und nicht suszeptiblen Stämme erkannt werden. Da auch die Immunisierung mit denaturierter G6PI zu einer Arthritisinduktion führt, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Erkennung linearer Epitope eine wichtige Rolle spielt.

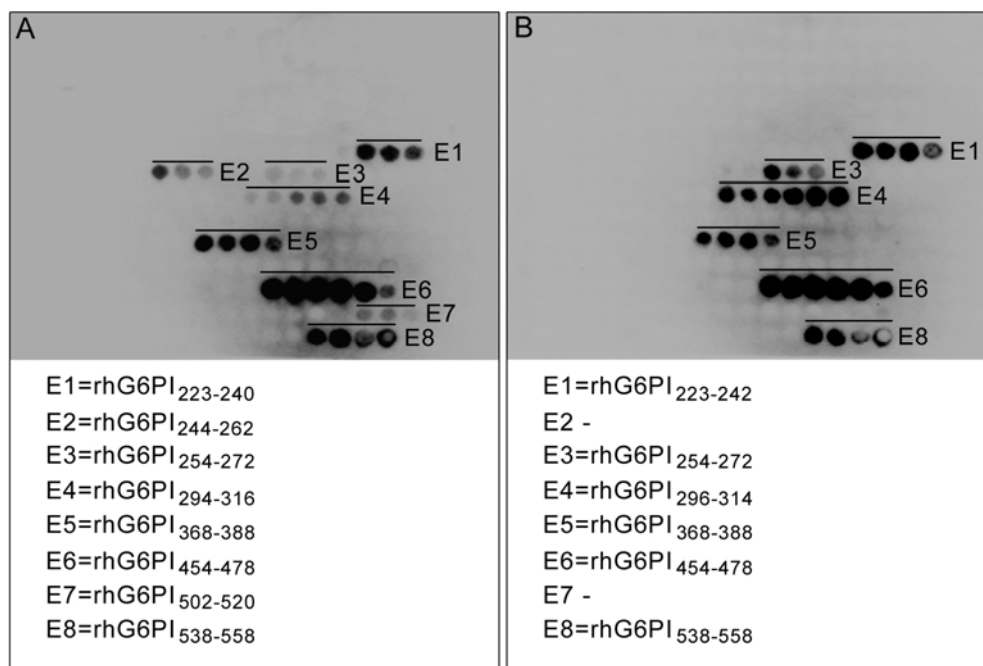
#### **4.2.1 Identifizierung immundominanter B-Zell-Epitope der G6PI**

Mit Hilfe der SPOT-Technologie wurden auf einer Membran 15mer-Peptide synthetisiert, die sich um jeweils 13 Aminosäuren überlappten und in Ihrer Gesamtheit die Aminosäuresequenz der humanen G6PI darstellten (Abb. 4.2). Getestet wurden die polyklonalen Seren von erkrankten DBA/1-Mäusen nach Immunisierung mit nativer und denaturierter G6PI, sowie die Seren der nicht suszeptiblen BALB/c-, BL/6- und B10.Q-Mäuse nach Immunisierung mit nativer rhG6PI. Die Seren wurden 21 Tage nach Immunisierung gewonnen. Trotz Abklingen der klinischen Symptome sind Antikörper gegen G6PI zu diesem Zeitpunkt noch hochtitrig nachweisbar.



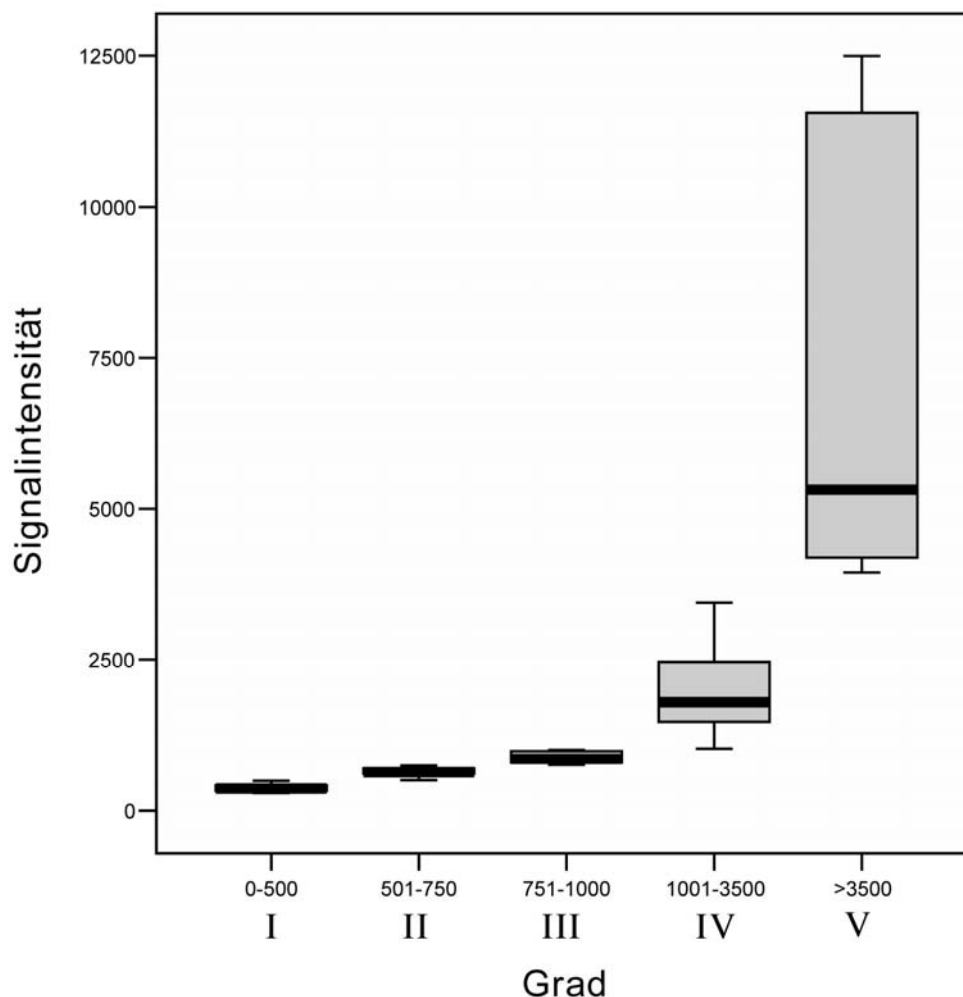


**Abb. 4.2: Peptidbibliothek der rhG6PI.** Mit Hilfe der SPOT-Technologie wurden auf einer Zellulosemembran insgesamt 276 15mer-Peptide synthetisiert, die sich um jeweils 13 Aminosäuren überlappten.

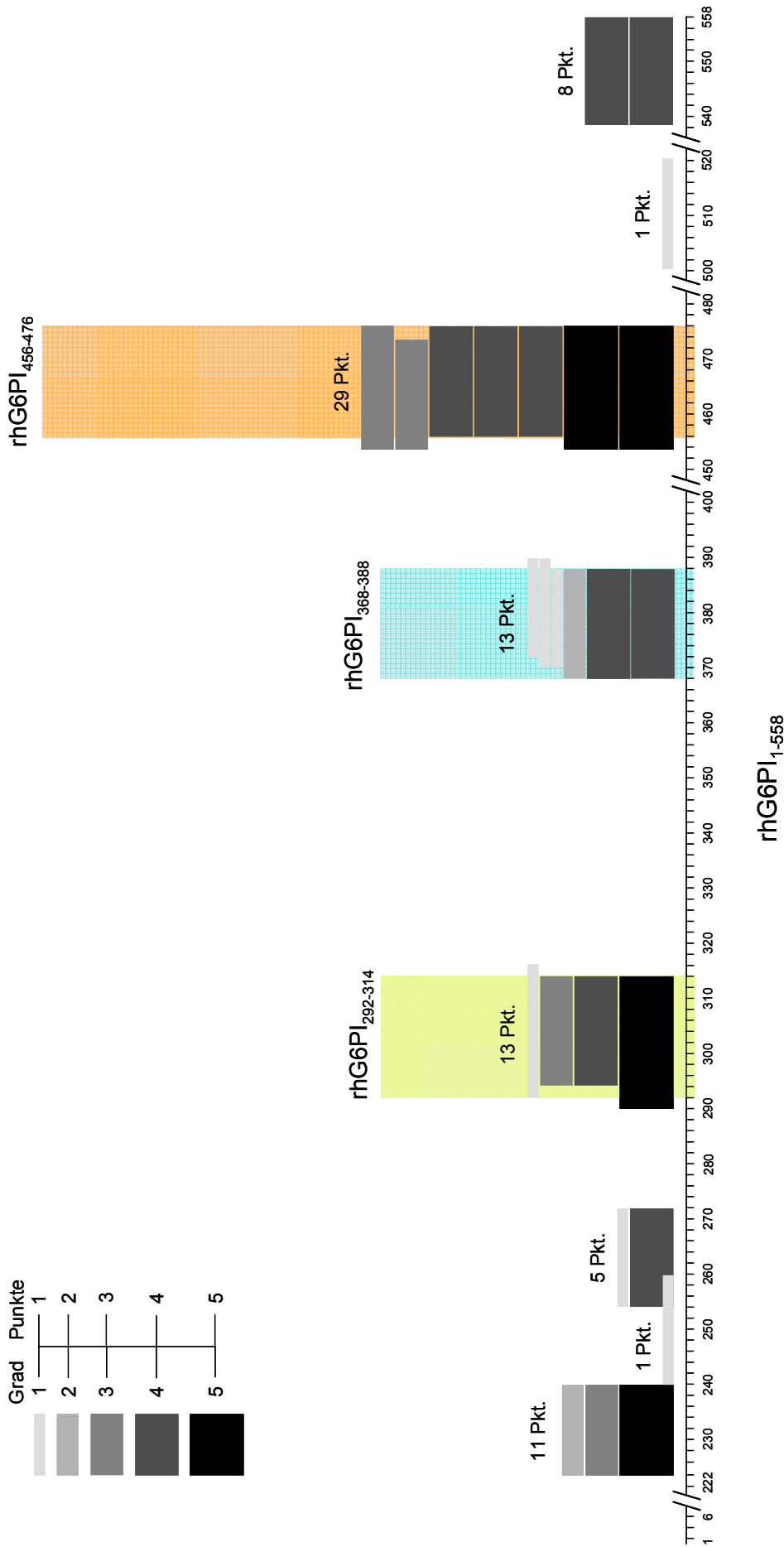


**Abb. 4.3: Epitopanalyse von anti-G6PI-Antikörpern arthritischer DBA/1-Mäuse mittels Pepscan-Verfahren.** Die polyklonalen anti-G6PI-Antikörper arthritischer DBA/1-Mäuse wurden auf die Erkennung linearer B-Zell-Epitope der G6PI getestet. Die Antikörper-Peptid-Bindung wurde unter Verwendung eines Chemilumineszenz-Systems in Form von schwarzen Spots visualisiert. Dargestellt sind exemplarisch die Epitopanalysen von zwei DBA/1-Mäusen (A, B) nach Immunisierung mit nativer rhG6PI. Anti-G6PI-Antikörper erkennen eine Vielzahl linearer B-Zell-Epitope. Die identifizierten Epitope sind entsprechend mit E1 bis E8 markiert.

Es konnte gezeigt werden, dass die nach Immunisierung mit nativer oder denaturierter rhG6PI produzierten Antikörper gegen eine Vielzahl linearer Epitope gerichtet sind. Diese unterscheiden sich nicht nur in Ihrer Signalintensität, sondern auch in der Häufigkeit Ihres Auftretens bei den einzelnen Versuchstieren (Abb. 4.3). Bei der Auswertung der Messwerte wurde daher ein Punktesystem verwendet, welches sowohl die Häufigkeit des Auftretens eines Epitops innerhalb eines Mausstamms (DBA/1, B10.Q, BALB/c, BL/6) als auch die Signalintensität berücksichtigte. Dabei wurden die detektierten Signale rein visuell über den Schwärzungsgrad der Spots mit der Software *Genspotter* quantifiziert. Mittels einer Cluster-Analyse wurden die Signalintensitäten kategorisch in fünf Grade unterteilt. Je nach Signalintensität erhielt ein Epitop einen bis maximal fünf Punkte (Abb. 4.4).



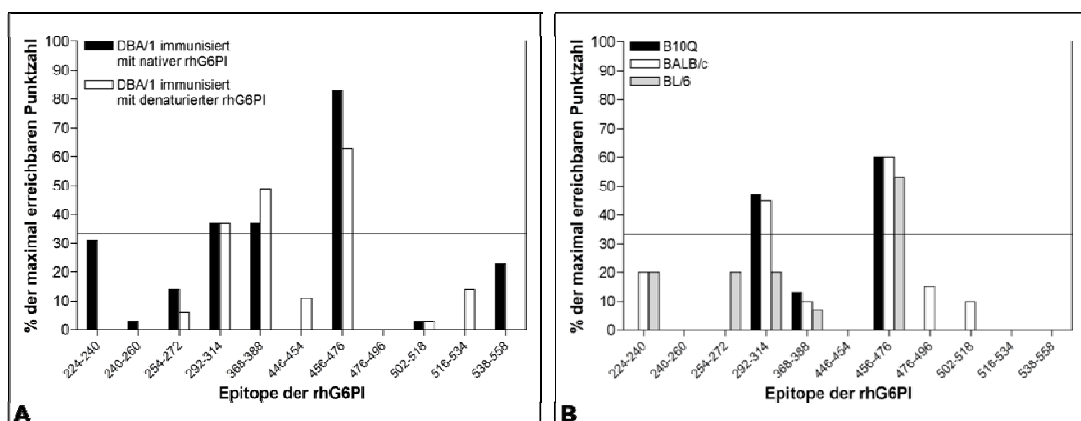
**Abb. 4.4: Einteilung der Signalintensitäten.** Die Signalintensitäten (SI) der Epitope wurden mit der Software *Genspotter* quantifiziert und mit Hilfe einer Cluster-Analyse kategorisch in fünf Grade eingeteilt: SI 0-500 = Grad I, SI 501-750 = Grad II, SI 751-1000 = Grad 3, SI 1001-3500 = Grad IV, SI >3500 = Grad V. Je nach gemessener SI erhielten die Epitope einen bestimmten Punktwert zwischen eins (SI Grad I) und maximal fünf (SI Grad V).



**Abb. 4.5: Definition immundominanter Epitope der G6PI.** Dargestellt ist die Auswertung der Epitopenalyse von insgesamt sieben DBA/1-Mäusen. Jedes Epitop erhielt entsprechend seiner Signalintensität einen Punktwert zwischen eins und fünf. Bei mehrmaligem Auftreten eines Epitops wurden diese Werte addiert, wobei in dieser Versuchsgruppe maximal 35 Punkte erreicht werden konnten. Epitope, die mindestens 33 % des Maximalwertes erreichten, wurden als immundominant definiert und sind in der Abbildung farbig hervorgehoben.

Abbildung 4.5 zeigt exemplarisch die Auswertung der Epitopanalyse von sieben DBA/1-Mäusen nach Immunisierung mit nativer rhG6PI. Die Punktzahlen wurden bei mehrmaligem Auftreten eines Epitops innerhalb eines Stamms entsprechend addiert, wobei der maximal erreichbare Punktwert von der Anzahl der Versuchstiere abhängig war. Ein Epitop wurde dann als immundominant definiert, wenn über 33 % des Maximalwerts erreicht wurden. Diese Grenze wurde willkürlich festgelegt. Da die Maximalwerte bei den jeweiligen Stämmen variierten, wurden die ermittelten absoluten Punktzahlen prozentual als relativer Wert zur maximal erreichbaren Punktzahl dargestellt. Bei den DBA/1-Mäusen konnten drei immundominante Epitope identifiziert werden. Es handelt sich um die Epitope rhG6PI<sub>292-314</sub>, rhG6PI<sub>368-388</sub> und rhG6PI<sub>456-476</sub> (Abb. 4.6 A).

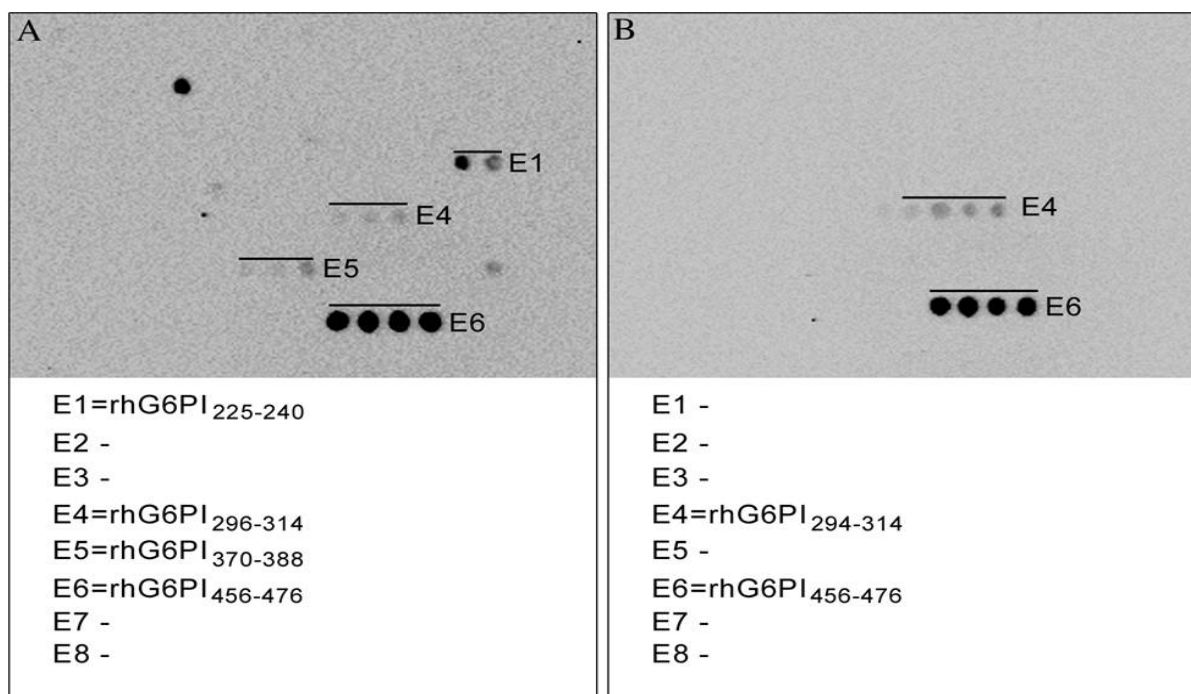
Das Peptid rhG6PI<sub>456-476</sub> mit der Aminosäuresequenz PEDLERLLPHKVFEGNRPTNS wurde von allen Mäusen erkannt und zeigte im Vergleich zu den anderen Peptiden kontinuierlich die stärkste Signalintensität. Dieses Peptid erreichte 63 % des maximal erreichbaren Punktwerts bei den Mäusen, die mit denaturierter rhG6PI immunisiert wurden und 83 % bei den mit nativer rhG6PI immunisierten Mäusen. Die Peptide rhG6PI<sub>292-314</sub> und rhG6PI<sub>368-388</sub> konnten dagegen nur bei einigen Mäusen detektiert werden. Für das Peptid rhG6PI<sub>368-388</sub> wurden bei den Mäusen, die mit denaturierter rhG6PI immunisiert wurden, 49 % und bei den mit nativer rhG6PI immunisierten Tieren 37 % des Maximalwerts erzielt. Das Peptid rhG6PI<sub>292-314</sub> erreichte in beiden Versuchsgruppen etwa 37%.



**Abb. 4.6: Immundominante G6PI-Epitope suszeptibler DBA/1-Mäuse und nicht suszeptibler Mausstämme.** Mit Hilfe des Pepscan-Verfahrens wurden die polyklonalen anti-G6PI-Antikörper suszeptibler DBA/1-Mäuse (A) sowie nicht suszeptibler B10Q-, BALB/c- und BL/6-Mäuse (B) auf die Erkennung linearer B-Zell-Epitope getestet. Die Anzahl der Versuchstiere variierte bei den einzelnen Stämmen zwischen drei und acht Mäusen, sodass für die Vergleichbarkeit der Ergebnisse die ermittelten Werte prozentual zur maximal erreichbaren Punktzahl dargestellt wurden. Erreichte ein Epitop über 33 % der maximal erreichbaren Punktzahl (schwarze Linie), so wurde es als immundominant definiert. Das Peptid rhG6PI<sub>456-476</sub> scheint dabei das Hauptepitop der humoralen Immunantwort zu sein.

In der Gruppe der nicht suszeptiblen Stämme wurden nach Immunisierung mit nativer rhG6PI die Seren von B10Q-, BALB/c- und BL/6-Mäusen auf die Erkennung linearer Epitope getestet (Abb. 4.6 B). Das Peptid rhG6PI<sub>456-476</sub> wurde ebenfalls von allen Stämmen als immundominantes Epitop erkannt und erreichte Werte zwischen 53 % und 60 %. Das Peptid rhG6PI<sub>292-314</sub> dagegen, zeigte nur bei den B10Q- und BALB/c-Mäusen eine Immundominanz und erreichte etwa 45 % bis 47 % der erreichbaren Punktzahlen. Das Peptid rhG6PI<sub>368-388</sub> wurde zwar von allen Stämmen erkannt, konnte aber nur bei den DBA/1-Mäusen als immundominantes Epitop definiert werden.

Die Arthritogenität der Antikörper ist nach diesen Befunden nicht an die Existenz eines bestimmten Epitops gebunden, welches nur von den suszeptiblen DBA/1-Mäusen, nicht aber von den nicht suszeptiblen Stämmen erkannt wird. Das immundominante Epitop rhG6PI<sub>456-476</sub> scheint jedoch insbesondere bei den DBA/1-Mäusen das Hauptepitop der polyklonalen anti-G6PI-Antikörper zu sein und könnte daher für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis von Bedeutung sein. Gestützt wird die Hypothese durch die Beobachtung, dass dieses Peptid auch bei der Epitopanalyse gepoolter Seren von jeweils zehn erkrankten DBA/1-Mäusen die stärkste Signalintensität zeigte (Abb 4.7).

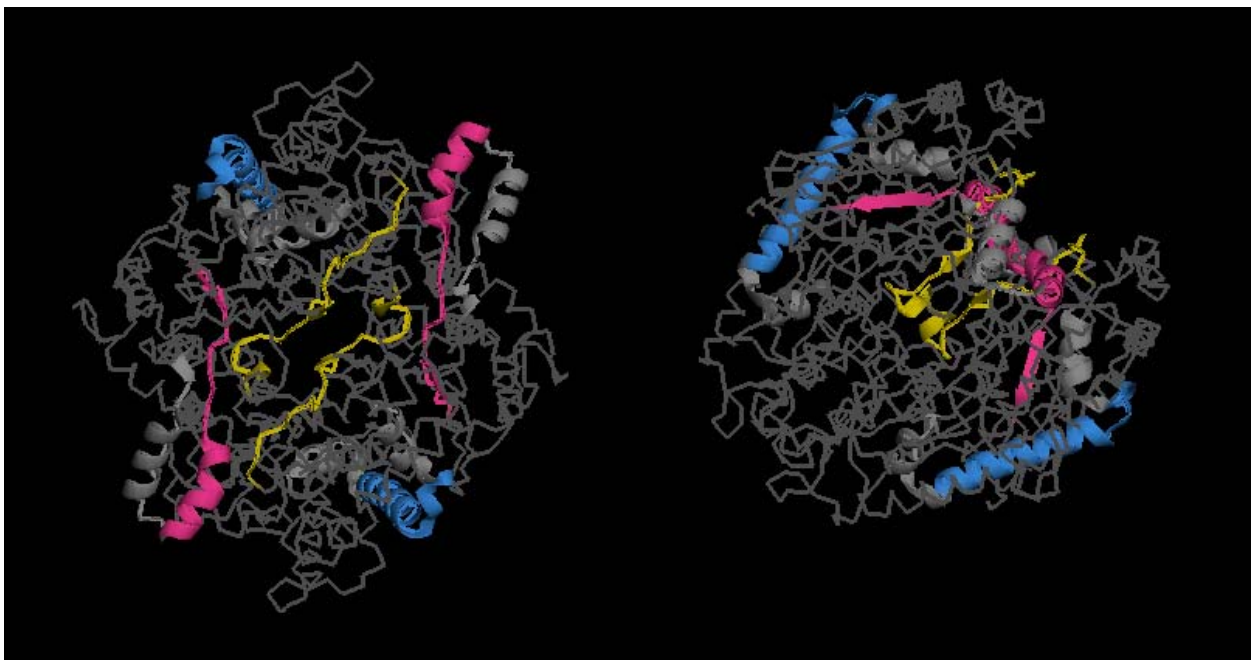


**Abb. 4.7: Epitopanalyse gepoolter Seren von arthritischen DBA/1-Mäusen.** Seren von je zehn DBA/1-Mäusen wurden am Tag 26 (A) und Tag 30 (B) gesammelt und auf die Erkennung linearer Epitope der rhG6PI getestet. Das Peptid rhG6PI<sub>456-476</sub> zeigt bei der Epitopanalyse gepoolter Seren die stärkste Immundominanz.

#### 4.2.2 Die Lage der immundominanten Epitope in der Kristallstruktur der humanen G6PI

Die G6PI liegt in Ihrer nativen Form als Homodimer vor. Jedes Monomer besteht aus zwei globulären Domänen und einem C-Terminus, der sich bogenförmig jeweils um die andere Untereinheit windet. Das aktive Zentrum des Enzyms liegt dabei zwischen den globulären Domänen im Bereich der Verbindungsstelle beider Monomere (Read, Pearce et al. 2001). Mit der Software *PyMol* wurde die in der Proteindatenbank (PDB) als 1JLH eingetragene Kristallstruktur der humanen G6PI (Cordeiro, Godoi et al. 2003) visualisiert und die Lage der im Pepscan-Verfahren identifizierten immundominanten B-Zell-Epitope bestimmt (Abb. 4.8).

Es konnte gezeigt werden, dass die Epitope mit den Aminosäureresten 292 bis 314 (NFEQLLSGAHWMDQHFRTTPLEK), 368 bis 388 (GTRVDHQTGPVWGEPTNGQ) und 456 bis 476 (PEDLERLLPHKVFEGNRPTNS) oberflächlich lokalisiert sind und daher für die Autoantikörper gut zugänglich wären. Interessanterweise sind die Epitope rhG6PI<sub>292-314</sub> und rhG6PI<sub>456-476</sub> direkt im Bereich der Verbindungsstelle des Homodimers lokalisiert.



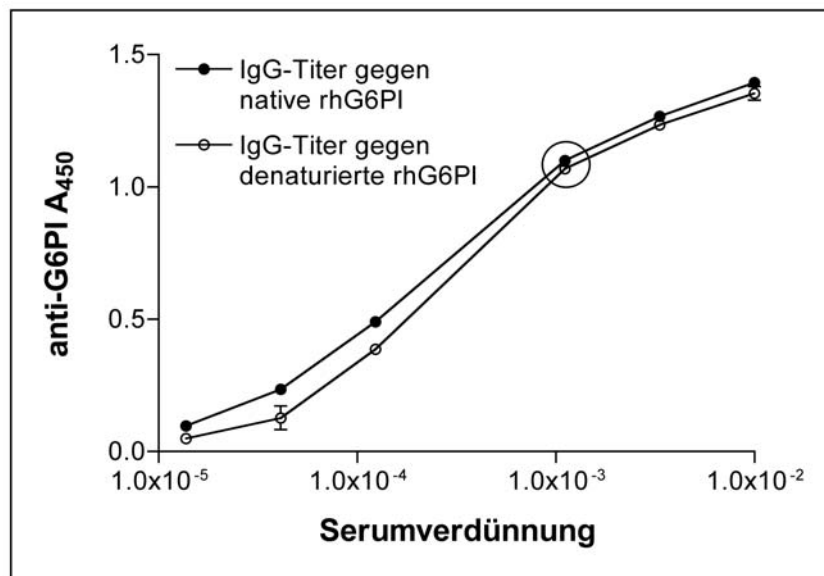
**Abb. 4.8:** Die Lage der immundominanten B-Zell-Epitope in der Kristallstruktur der humanen G6PI. Die immundominanten Epitope rhG6PI<sub>292-314</sub> (gelb), rhG6PI<sub>368-388</sub> (blau) und rhG6PI<sub>456-476</sub> (pink) wurden mit Hilfe der Software *PyMol* in der Kristallstruktur der rhG6PI (PDB 1JLH) visualisiert.

### **4.2.3 Das immundominante Epitop rhG6PI<sub>456-476</sub> und seine pathogene Bedeutung als Hauptepitop der anti-G6PI-Antikörper**

Bei der Epitopanalyse polyklonaler Seren erkrankter DBA/1-Mäuse wurde das lineare Peptid rhG6PI<sub>456-476</sub> als immundominantes Epitop definiert und als potentielles Hauptepitop der anti-G6PI-Antikörper identifiziert. Die genaue Definition des Peptids als Hauptepitop der humoralen Immunantwort gegen G6PI ist mit diesem Experiment allein allerdings nicht möglich, da das Pepscan-Verfahren weder eine Aussage über den quantitativen Anteil der gegen dieses Epitop gerichteten Antikörper noch eine Aussage über die Erkennung konformationeller Epitope liefert.

Mittels kompetitivem ELISA sollte daher abgeschätzt werden, wie quantitativ bedeutsam die Erkennung des linearen Epitops rhG6PI<sub>456-476</sub> nach primärer Immunisierung mit nativer bzw. denaturierter rhG6PI ist und ob nach weiteren, mit dem Pepscan-Verfahren nicht identifizierbaren, konformationellen Epitopen gesucht werden muss. Die Epitopregion wurde dabei auf einen Bereich eingegrenzt, der von allen untersuchten Tieren erkannt wurde. Dieser Bereich wurde auf ein 14mer-Peptid mit den Aminosäureresten 458 bis 472 reduziert (DLERLLPHKVFGNR) und das Peptid synthetisch in Pulverform hergestellt.

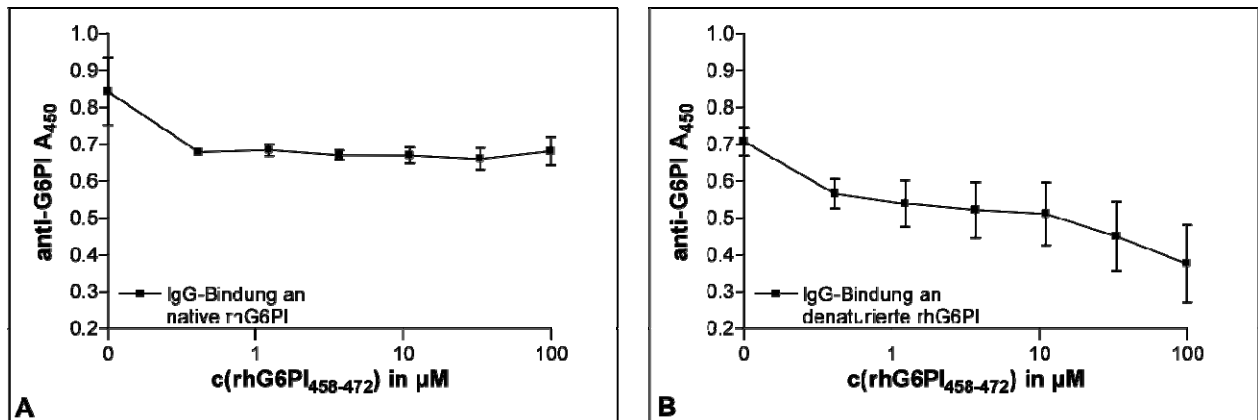
Zunächst wurden die Seren von DBA/1-Mäusen, die mit nativer bzw. denaturierter rhG6PI immunisiert wurden, im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI-Antikörper getestet und der für die Durchführung des kompetitiven ELISA geeignete Serumtiter bestimmt. Definiert wurde dieser Titer als die höchste noch im linearen Bereich der Sättigungskurve liegende Serumverdünnung. Diese lag bei allen untersuchten Tieren zwischen 1:300 und 1:900 (Abb. 4.9).



**Abb. 4.9: Bestimmung des für den kompetitiven ELISA geeigneten Seruntiters.** 21 Tage nach Immunisierung mit rhG6PI wurden die Seren gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI-Antikörpern getestet. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Bindungskurve der polyklonalen Antikörper einer einzelnen DBA/1-Maus an native bzw. denaturierte rhG6PI. Als geeigneter Seruntiter wurde die höchste noch im linearen Bereich der sigmoiden Kurve liegende Serumverdünnung definiert, die mit einem Kreis markiert wurde. Diese lag bei allen untersuchten Tieren zwischen 1:300 und 1:900.

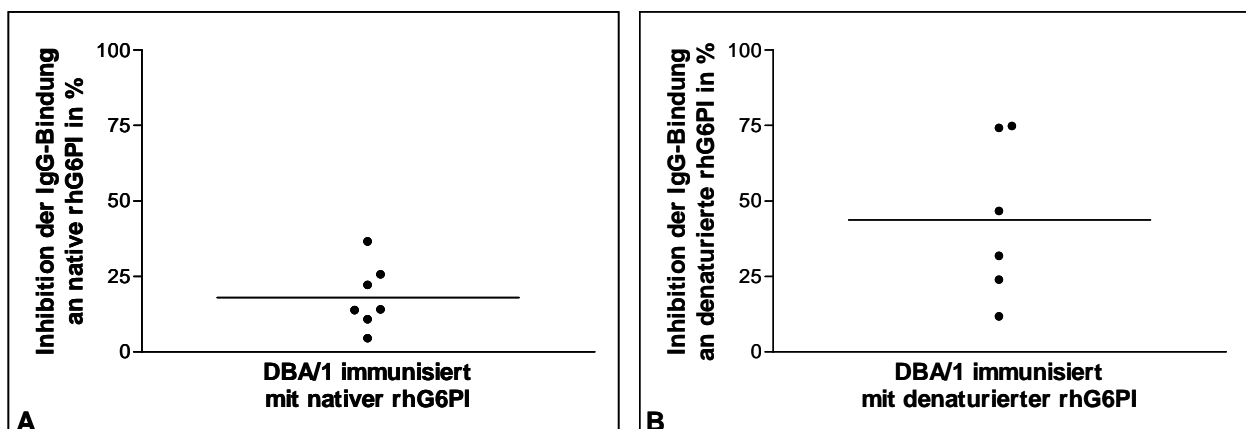
Im kompetitiven ELISA wurde anschließend die kompetitive Hemmung der Bindung der G6PI-spezifischen Antikörper an native bzw. denaturierte rhG6PI durch steigende Konzentrationen des Peptids rhG6PI<sub>458-472</sub> analysiert (Abb. 4.10). Die Peptidkonzentrationen variierten von 0  $\mu\text{mol/l}$  bis maximal 100  $\mu\text{mol/l}$ . Mit steigenden Peptidkonzentrationen wurde eine Abnahme der Absorption beobachtet. Die maximale Abnahme der Absorption wurde in Seren von DBA/1-Mäusen, die mit denaturierter rhG6PI immunisiert worden waren, bei einer Peptidkonzentration von 100  $\mu\text{mol/l}$  erreicht (Abb. 4.10 A). In Seren jener DBA/1-Mäuse, die mit nativer rhG6PI immunisiert worden waren, variierte diese Peptidkonzentration zwischen 10  $\mu\text{mol/l}$  und 100  $\mu\text{mol/l}$  (Abb. 4.10 B). In der Abbildung 4.11 wird die Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI prozentual als relative Abnahme der Absorption bei kompetitiver Hemmung mit 100  $\mu\text{M}$  Peptid im Vergleich zur Absorption ohne Peptid dargestellt (Abb. 4.11).





**Abb. 4.10: Kompetitive Hemmung der anti-G6PI-Antikörper gegen native und denaturierte rhG6PI durch steigende Konzentrationen des Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub>.** Dargestellt sind die Bindungskurven der anti-G6PI-Antikörper von je drei DBA/1-Mäusen an rhG6PI. Die Seren wurden 21 Tage nach Immunisierung mit denaturierter rhG6PI (A) oder nativer rhG6PI (B) gewonnen und die Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI bei steigenden Konzentrationen des Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub> im kompetitiven ELISA analysiert. Die Peptidkonzentrationen lagen bei 100 µmol/l, 33,3 µmol/l, 11,1 µmol/l, 3,7 µmol/l, 1,2 µmol/l, 0,4 µmol/l und 0 µmol/l.

In Seren von DBA/1-Mäusen, die mit nativer rhG6PI immunisiert wurden, konnte mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> eine prozentuale Inhibition der Antikörperbindung an native rhG6PI von 18 % erreicht werden (Abb. 4.11 A). In Seren von mit denaturierter rhG6PI immunisierten Mäusen, wurde eine stärkere Inhibition der Antikörperbindung durch das Peptid beobachtet. Die prozentuale Inhibition für die Bindung der Antikörper an denaturierte rhG6PI betrug im Mittel 47 % (Abb. 4.11 B).



**Abb. 4.11: Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI mit 100 µmol/l des Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub>.** DBA/1-Mäuse wurden mit nativer rhG6PI (A) bzw. denaturierter rhG6PI (B) immunisiert. 21 Tage nach Immunisierung wurde die Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI mit Hilfe des Peptids rhG6PI<sub>458-472</sub> im kompetitiven ELISA analysiert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der Antikörperbindung an native bzw. denaturierte rhG6PI bei Einsatz von 100 µmol/l rhG6PI<sub>458-472</sub>. Die Inhibition ist stärker, wenn die Mäuse mit denaturierter rhG6PI immunisiert wurden.

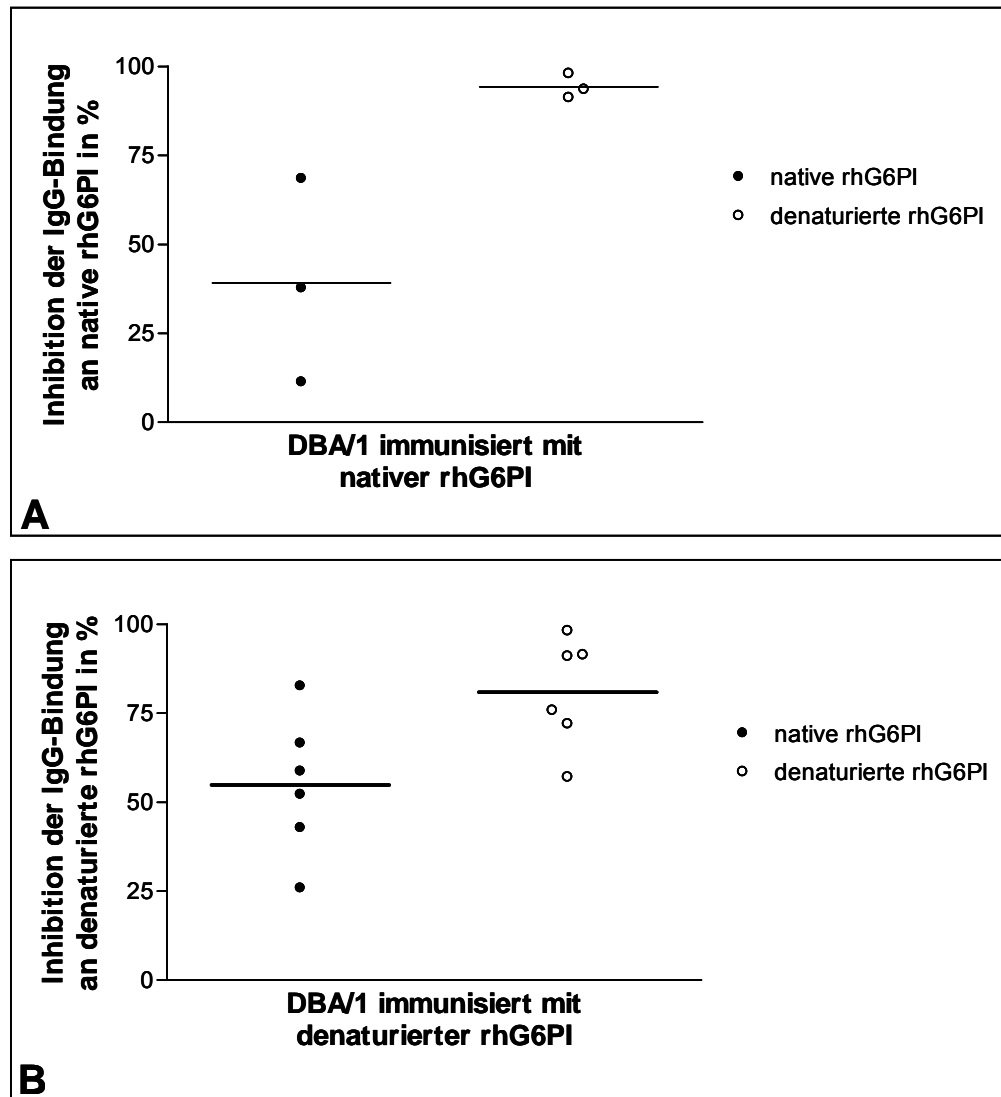
Die Inhibition der Bindung G6PI-spezifischer Antikörper an rhG6PI mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> war stärker, wenn die polyklonalen Seren nach Immunisierung mit denaturierter rhG6PI gewonnen wurden. Ein Großteil der polyklonalen Antikörper konnte jedoch nicht durch das Peptid gehemmt werden. Neben dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> muss es demnach mindestens ein weiteres Hauptepitop der G6PI geben, bei dem es sich möglicherweise auch um ein konformationelles Epitop handelt. Dies schließt jedoch nicht aus, dass das Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> dennoch als Hauptepitop für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis Bedeutung haben kann.

#### **4.2.4 Die polyklonalen anti-G6PI-Antikörper erkennen vorwiegend lineare Epitope der rhG6PI**

Bei der kompetitiven Hemmung der Bindung G6PI-spezifischer Antikörper an rhG6PI wurde ein Großteil der polyklonalen Antikörper jedoch nicht durch das lineare Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> gehemmt. Diese könnten entweder gegen andere lineare Epitope gerichtet sein oder gegen Konformationsepitope, die das Pepscan-Verfahren nicht erfasst. Eine Analyse der Inhibition der Antikörperbindung durch native und denaturierte rhG6PI könnte darüber Aufschluss bringen, da bei der nativen Form der G6PI überwiegend Konformationsepitope und bei der denaturierten G6PI eher lineare Epitope abgebildet sind.

Mittels kompetitiven ELISA wurde die Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI durch steigende Konzentrationen nativer bzw. denaturierter rhG6PI analysiert und miteinander verglichen. Getestet wurden die polyklonalen Seren von DBA/1-Mäusen nach Immunisierung mit nativer rhG6PI bzw. denaturierter rhG6PI. Die Konzentration der Hemmlösung variierte dabei zwischen 0 µg/ml und 100 µg/ml. Mit steigender Proteinkonzentration wurde eine zunehmende Abnahme der Absorption beobachtet, die ihr Maximum bei einer Konzentration von 100 µg/ml erreichte. Die prozentuale Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI wurde analog zu den vorhergehenden Experimenten als relative Abnahme der Absorption bei kompetitiver Hemmung mit 100 µg/ml nativer bzw. denaturierter rhG6PI im Vergleich zur Absorption ohne Protein definiert (Abb. 412).

In Seren von Mäusen, die mit nativer rhG6PI immunisiert wurden, konnte durch Zugabe der denaturierten rhG6PI eine Inhibition der Antikörperbindung an native rhG6PI von über 90 % erzielt werden. Im Vergleich dazu wurde mit Hilfe der nativen rhG6PI eine Inhibition der Antikörperbindung von nur 39 % erzielt (Abb.4.12 A).



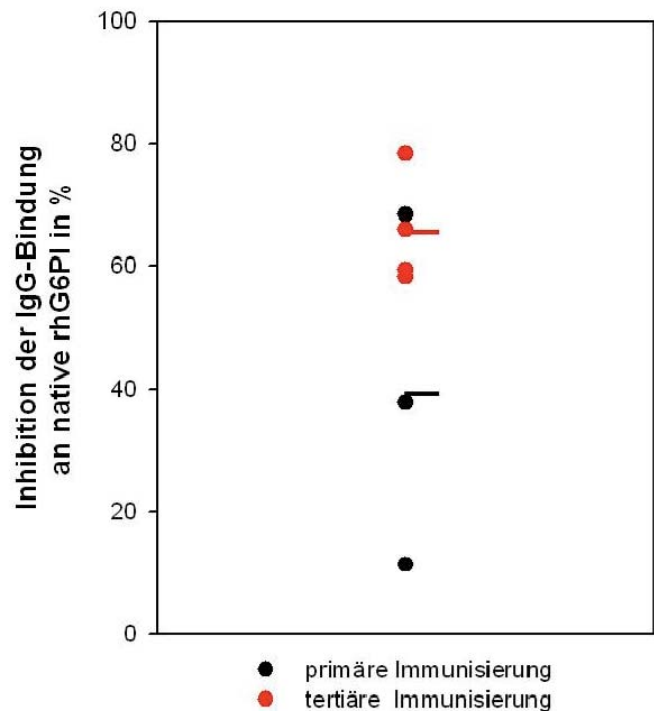
**Abb. 4.13: Vergleich der Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI durch native und denaturierte rh G6PI.** DBA/1-Mäuse wurden mit nativer rhG6PI (A) bzw. denaturierter rhG6PI (B) immunisiert. 21 Tage nach Immunisierung wurde die Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI mit Hilfe der nativen rhG6PI und denaturierten rhG6PI im kompetitiven ELISA analysiert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der Antikörperbindung an native bzw. denaturierte rhG6PI bei Einsatz von 100 µg/ml native rhG6PI und denaturierte rhG6PI. Die Antikörperbindung an rhG6PI wird durch denaturierte rhG6PI stärker gehemmt als durch native rhG6PI.

In Seren von Mäusen, die mit denaturierter rhG6PI immunisiert wurden, konnte eine Inhibition der Antikörperbindung an denaturierte rhG6PI bei kompetitiver Hemmung mit denaturierter rhG6PI von über 89 % erreicht werden. Die durch native rhG6PI erzielte prozentuale Inhibition der Antikörperbindung dagegen lag bei 55 % (Abb.4.12 B). Die Bindung der G6PI-spezifischen Antikörper an rhG6PI wurde stärker gehemmt, wenn für die kompetitive Hemmung denaturierte rhG6PI verwendet wurde. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass neben dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> weitere lineare Epitope existieren, die von anti-G6PI-Antikörpern erkannt werden.

#### **4.2.5 Niedrige Affinität der nach primärer Immunisierung mit rhG6PI produzierten Antikörper**

Die Bindung polyklonaler anti-G6PI-Antikörper an rhG6PI konnte durch Zugabe von denaturierter rhG6PI stärker gehemmt werden als durch Zugabe von nativer rhG6PI. Bei kompetitiver Hemmung mit nativer rhG6PI war die prozentuale Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI insbesondere in Seren von Mäusen, die mit nativer rhG6PI immunisiert wurden, mit 39 % deutlich niedriger als erwartet. Diese schwache Inhibition könnte durch eine niedrige Affinität der anti-G6PI-Antikörper gegenüber der nativen rhG6PI erklärt werden. Da nach mehrfacher Immunisierung mit demselben Antigen Antikörper mit höherer Affinität produziert werden als nach primärer Immunisierung, sollte in Seren von DBA/1-Mäusen, die mehrfach mit nativer rhG6PI immunisiert werden, eine stärkere Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI durch Zugabe von nativer rhG6PI auftreten.

Dies wurde folgendermaßen untersucht: DBA/1-Mäuse wurden im Abstand von vier Wochen mehrfach mit nativer rhG6PI immunisiert. 21 Tage nach der tertiären Immunisierung wurde die Inhibition der polyklonalen Antikörper durch Zugabe von steigenden Konzentrationen nativer rhG6PI im kompetitiven ELISA analysiert (Abb. 4.13). Im Vergleich zu Seren, die nach primärer Immunisierung gewonnen wurden, wurde in Seren von Mäusen nach tertiärer Immunisierung durch Zugabe von 100 µg/ml nativer rhG6PI eine Steigerung der Inhibition der Antikörperbindung von zuvor 39 % auf 69 % erreicht. Die nach primärer Immunisierung mit nativer rhG6PI gebildeten anti-G6PI-Antikörper scheinen demnach eine relativ niedrige Affinität gegenüber der nativen rhG6PI zu besitzen.



**Abb. 4.13: Vergleich der Inhibition der Antikörperbindung an native G6PI nach primärer und tertiärer Immunisierung.** DBA/1-Mäuse wurden mit 400 µg nativer rhG6PI in CFA primär immunisiert und die Immunisierungen zweimal im Abstand von vier Wochen mit einer Dosis von 25 µg oder 50 µg rhG6PI in CFA wiederholt. Die Seren wurden 21 Tage nach der letzten Immunisierung gewonnen und die Inhibition der Antikörperbindung an native rhG6PI analysiert. Dargestellt ist die prozentuale Inhibition der Antikörperbindung bei kompetitiver Hemmung mit 100 µg/ml nativer rhG6PI. Die roten Punkte markieren die Ergebnisse der Seren, die nach tertiärer Immunisierung gewonnenen wurden. Zum Vergleich wurden die Daten der Seren, die nach primärer Immunisierung gewonnen wurden, als schwarze Punkte dargestellt (Daten von Abb. 4.13 A). Die nach primärer Immunisierung produzierten anti-G6PI-Antikörper haben vermutlich eine geringe Affinität gegenüber der nativen rhG6PI.

### 4.3 Die pathogenetische Relevanz des Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub> als Immunogen

In den bisherigen Experimenten wurde das Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> als immundominantes B-Zellepitop der anti-G6PI-Antikörper identifiziert, welches möglicherweise als Hauptepitop der humoralen Immunantwort in die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis einwirkt. Im folgenden Teil der Arbeit wurde die pathogenetische Relevanz des Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub> in vivo getestet.

#### 4.3.1 Versuch einer Arthritisinduktion bei DBA/1-Mäusen durch Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub>

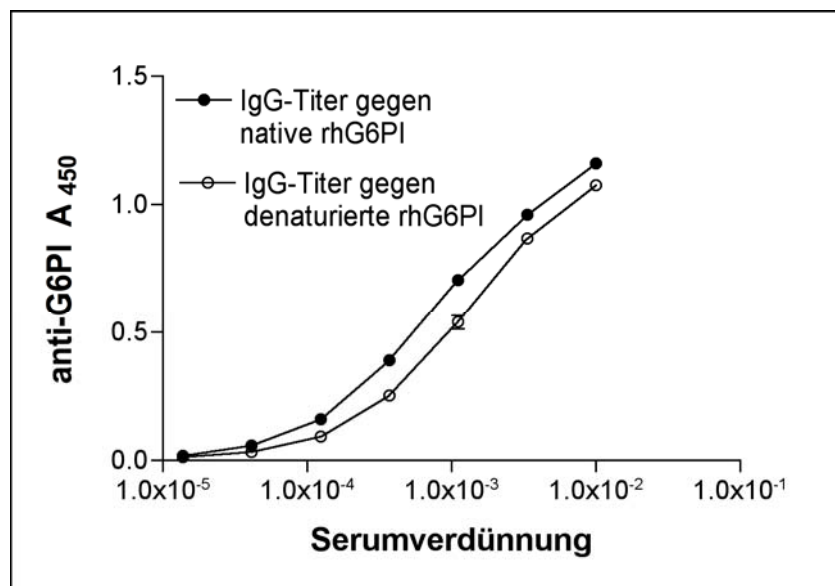
Es wird untersucht, ob durch subkutane Immunisierung mit dem identifizierten B-Zellepitop rhG6PI<sub>458-472</sub> eine Arthritis in DBA/1-Mäusen induziert werden kann.

Die klinischen Zeichen einer Arthritis wurden in drei Schweregrade eingeteilt, wobei jede Pfote einer Maus einzeln bewertet wurde. Grad 0 entsprach einer gesunden, klinisch unauffälligen Pfote. Eine leichte Schwellung der Pfote wurde als Grad 1 eingestuft, während eine starke Schwellung dem Grad 2 entsprach. Insgesamt war ein maximaler Arthritisgrad von acht vorgesehen. DBA/1-Mäuse wurden nach Immunisierung mit 50 µg bis maximal 400 µg rhG6PI<sub>458-472</sub> in CFA in einem Zeitraum von 30 Tagen auf klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet. Parallel dazu wurden auch Kontrolltiere beobachtet, die ausschließlich mit CFA oder mit 400 µg rhG6PI in CFA immunisiert wurden.

Die Tabelle 4.1 zeigt die Inzidenz von Arthritis in den verschiedenen Versuchsgruppen. Keines der mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> immunisierten Tiere entwickelte bis zum Tag 30 nach Immunisierung makroskopisch Zeichen einer Arthritis. In den Kontrollgruppen zeigten die mit CFA immunisierten Mäuse erwartungsgemäß keine Arthritis, während bei allen Mäusen, die mit nativer rhG6PI immunisiert wurden, am Tag 12 nach Immunisierung der maximale Arthritisgrad acht beobachtet wurde. Sowohl die mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> als auch die mit der rhG6PI immunisierten Tiere zeigten 30 Tage nach Immunisierung vergleichbar hohe Antikörpertiter gegen G6PI (Abb. 4.14). Diese Ergebnisse zeigen, dass mit dem B-Zellepitop rhG6PI<sub>458-472</sub> allein keine Arthritis in DBA/1-Mäusen induziert werden kann.

**Tab. 4.1: Arthritisinduktion mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> bei DBA/1-Mäusen.** DBA/1-Mäuse wurden mit 50 µg bis 400 µg rhG6PI<sub>458-472</sub> in CFA subkutan an der Schwanzbasis immunisiert und über einen Zeitraum von 30 Tagen auf klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet. Zur Kontrolle wurden je vier DBA/1-Mäuse mit 400 µg nativer rhG6PI in CFA bzw. ausschließlich CFA immunisiert.

Immunisierung	Inzidenz
rhG6PI <sub>458-472</sub>	0/9
rhG6PI	4/4
CFA	0/4

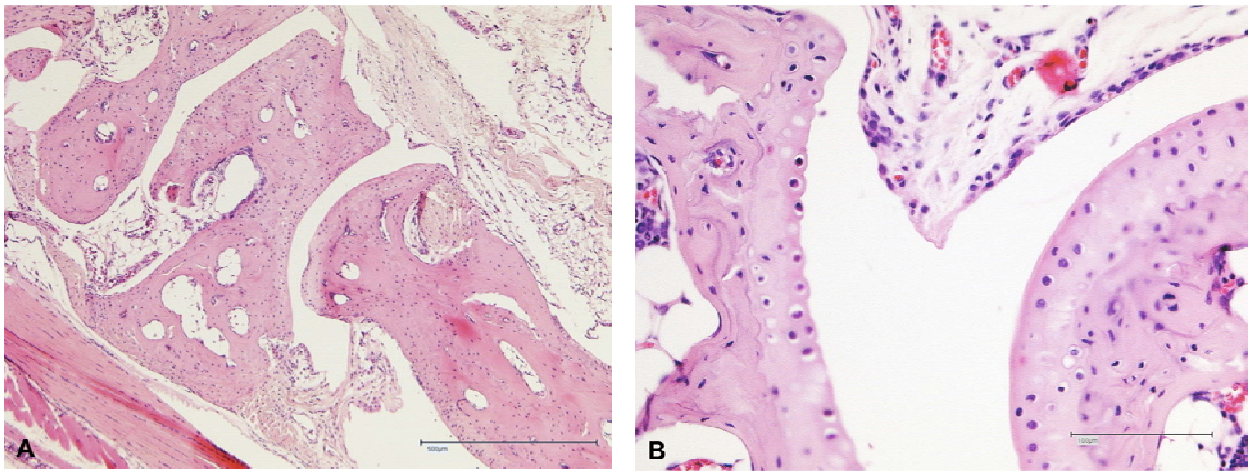


**Abb. 4.14: Anti-G6PI-Titer nach Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub>.** Die Seren wurden 21 Tage nach Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> gewonnen und im ELISA auf die Anwesenheit von anti-G6PI-Antikörpern getestet. Die Abbildung zeigt beispielhaft die Bindungskurve der polyklonalen Antikörper einer einzelnen DBA/1-Maus an native bzw. denaturierte rhG6PI.

#### 4.3.2 Histologische Analyse der DBA/1-Mäuse nach Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub>

Obwohl DBA/1-Mäuse nach Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> keine klinischen Anzeichen einer Arthritis zeigten, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Immunisierung eine Entzündungsreaktion mit Einwanderung inflammatorischer Zellen in die distalen Gelenke induziert wurde. Deshalb wurden 30 Tage nach Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> die distalen Gelenke der vorderen und hinteren Extremitäten histologisch auf Zeichen einer Arthritis untersucht. Zur Kontrolle wurden auch die Mäuse, die ausschließlich mit PBS in CFA immunisiert worden waren, herangezogen.

Die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Gelenkschnitte zeigten nach Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> keine Auffälligkeiten (Abb. 4.15). Der Gelenkspalt war frei von inflammatorischen Zellen, die Synovialmembran war schmal und glatt, Knochen und Knorpel waren intakt und zeigten keine Destruktionsmerkmale. Die Gelenkschnitte der ausschließlich mit PBS in CFA immunisierten Mäuse waren ebenfalls unauffällig. Die Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> zeigte auch auf mikroskopischer Ebene keine Anzeichen einer Arthritis.



**Abb. 4.15: Histologische Arthritisbewertung. HE-Färbung von einem Gelenkschnitt der hinteren Pfote einer DBA/1-Maus nach primärer Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub>.** DBA/1-Mäuse wurden mit 200 µg rhG6PI<sub>458-472</sub> immunisiert und über einen Zeitraum von 30 Tagen beobachtet. Gezeigt wird eine HE-Färbung in 50-facher (A) und 200-facher Vergrößerung (B) der Gelenkschnitte einer DBA/1-Maus nach Immunisierung mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub>. Keines der Tiere zeigte entzündliche Infiltrate in den Gelenken.

#### 4.3.3 T-Zellantwort gegen das B-Zell-Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub>

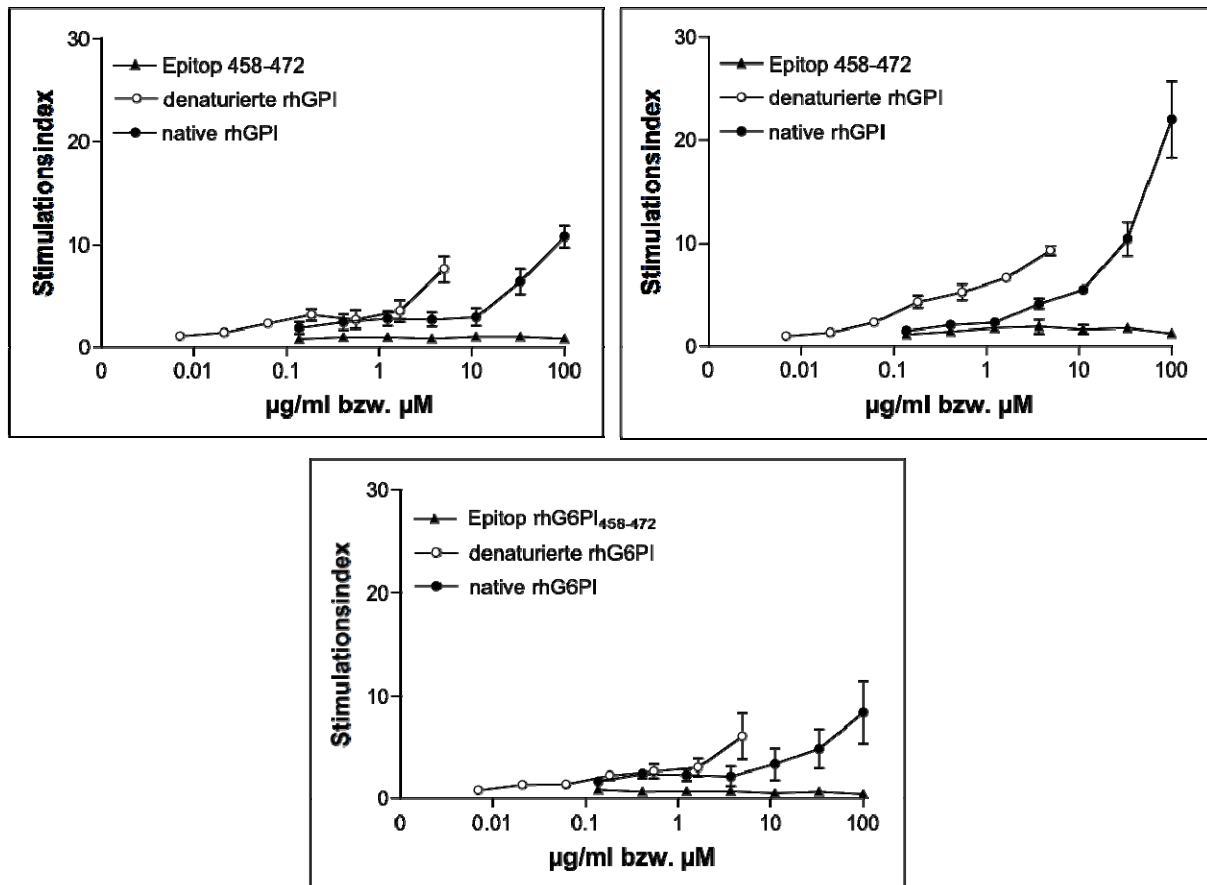
Nach Immunisierung von DBA/1-Mäusen mit rhG6PI sind die Zellen aus den drainierenden Lymphknoten (inguinal) und der Milz in der Lage, nach Restimulation mit rhG6PI zu proliferieren. Wir untersuchten, ob diese Zellen auch nach Restimulation mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> proliferieren können. Im Vergleich wurden auch Zellen von DBA/1-Mäusen nach Immunisierung mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> analysiert.

Je drei DBA/1-Mäuse wurden mit nativer rhG6PI, denaturierter rhG6PI und dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> immunisiert. Zwölf Tage nach Immunisierung wurden Einzelzell-suspensionen aus den inguinalen Lymphknoten und der Milz hergestellt. Diese wurde dann mit steigenden Konzentrationen nativer rhG6PI, denaturierter rhG6PI oder dem Peptid restimuliert und die Proliferation über den <sup>3</sup>H-Thymidineinbau gemessen. Der Stimulationsindex (SI) berechnete sich dabei aus dem Quotienten der Werte mit rhG6PI bzw. Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> restimulierten Zellen und dem der unstimulierten Zellen.

Nach Restimulation der Zellen mit rhG6PI wurde bei allen Mäusen eine Proliferation der Zellen aus den Lymphknoten und der Milz beobachtet. Der maximale SI wurde bei einer Konzentration von 5 µg/ml denaturierter rhG6PI bzw. 100 µg/ml nativer rhG6PI erreicht. Bei den Zellen von DBA/1-Mäusen, die mit denaturierter rhG6PI immunisiert wurden, wurde ein mittlerer SI von 22 ± 2,6 nach Restimulation mit 100 µg/ml nativer rhG6PI und von 9,3 ± 0,4 nach Restimulation mit 5 µg/ml denaturierter



rhG6PI erzielt (Abb. 4.15, A). Bei den Zellen, die von DBA/1-Mäusen nach Immunisierung mit nativer rhG6PI gewonnen wurden, betrug der SI nach Restimulation mit nativer rhG6PI  $10,8 \pm 1$  und mit denaturierter rhG6PI  $7,8 \pm 1,3$ . Die Zellen von Mäusen, die mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> immunisiert wurden, zeigten nach Restimulation mit rhG6PI nur eine schwache Proliferation. Der mittlere Stimulationsindex nach Restimulation mit nativer rhG6PI schwankte zwischen 2,9 und 13,1 und erreichte im Mittel einen Wert von 8,4.



**Abb. 4.15: Zelluläre Immunantwort gegen das Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub>.** DBA/1-Mäuse wurden mit nativer rhG6PI (A), denaturierter rhG6PI (B) und dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> (C) immunisiert. Die Zellen der inguinalen Lymphknoten und der Milz wurden zwölf Tage nach primärer Immunisierung für 72 h in 96-Muldenplatten kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit nativer rhG6PI, denaturierter rhG6PI oder dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> restimuliert und die Proliferation am  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen. Der Stimulationsindex (SI) wurde dabei als Quotient aus den Werten, die für die mit rhG6PI bzw. Peptid restimulierten Zellen gemessen wurden, und den Werten, die für die unstimulierten Zellen gemessen wurden, gebildet und als Mittel  $\pm$  SEM angegeben. Es wurden je drei DBA/1-Mäuse untersucht.

Nach Restimulation mit denaturierter rhG6PI schwankten die Werte ebenfalls sehr stark und erreichten einen mittleren Stimulationsindex von  $6,1 \pm 2,2$ . Die Restimulation mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> führte bei keiner Maus zu einer Proliferation der Zellen. Der mittlere SI lag bei allen Tieren unter 3,3.

Die Zellen erkrankter DBA/1-Mäuse zeigten nach Restimulation mit nativer oder denaturierter rhG6PI eine starke zelluläre Antwort, die nach Restimulation mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> ausblieb. Erstaunlicherweise wurde bei den Mäusen, die mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> immunisiert wurden, eine schwache Proliferation nach Restimulation mit nativer bzw. denaturierter rhG6PI beobachtet, nicht aber nach Restimulation mit dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub>. Das Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> wird demnach von den Zellen der DBA/1-Mäuse nicht als immundominantes T-Zell-Epitop erkannt.

## 5 Diskussion

DBA/1-Mäuse entwickeln nach Immunisierung mit Glukose-6-phosphat-Isomerase (G6PI) eine symmetrische Polyarthritits (Schubert, Maier et al. 2004). Damit war zum ersten Mal erwiesen, dass eine Immunisierung mit einem systemischen Antigen eine organspezifische Erkrankung in nicht transgenen Mäusen induziert. Bisher ist jedoch nicht geklärt, welche Rolle Antikörper und B-Zellen in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis spielen. Anders als beim transgenen K/BxN-Modell und der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) ist die G6PI-induzierte Arthritis nicht durch Antikörper übertragbar, während auch nicht suszeptible Mausstämme hohe Titer gegen G6PI produzieren.

In dieser Arbeit wurden Lokalisation und Kinetik der B-Zellantwort nach primärer Immunisierung mit G6PI sowie die Epitopspezifität der von den B-Zellen produzierten anti-G6PI-Antikörper untersucht. Dabei wurde ein lineares B-Zellepitop identifiziert, welches möglicherweise eine Rolle bei der Pathogenese der Arthritis spielt. Dies könnte ein Beitrag zur Aufklärung der arthritogenen Rolle der B-Zellen und der von ihnen produzierten Antikörper sein.

### 5.1 Lokalisation und Kinetik der G6PI-spezifischen Plasmazellen

B-Zellen können über ihren B-Zellrezeptor (BCR) Antigen in das Zellinnere aufnehmen und Peptide des Antigens zusammen mit einem MHC-Molekül an der Oberfläche präsentieren. Bereits nach wenigen Stunden sind Antigen-beladene B-Zellen an der Grenze zwischen der T- und B-Zellzone im Lymphknoten nachweisbar. Trifft nun eine antigenspezifische Th-Zelle auf eine B-Zelle, so kann die B-Zelle durch die Th-Zelle aktiviert werden. Es kommt zur klonalen Expansion der B-Zelle mit Entstehung von Antikörper-sezernierenden Zellen (ASZ).

Im K/BxN-Modell entwickelt die F1-Generation aus der Kreuzung von T-Zell-Rezeptor-transgenen (TZR) C57BL/6-Mäusen mit Diabetes-suszeptiblen NOD-Mäusen spontan eine periphere symmetrische destruierende Polyarthritits. Dabei erkennt der transgene TZR der KRN-Maus im Kontext mit der I-A<sup>g7</sup>-Präsentation die ubiquitär exprimierte G6PI, ein Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, und führt über eine antikörpervermittelte Immunreaktion spontan zu einer Arthritis (Kouskoff, Korganow et al. 1996; Matsumoto, Staub et al. 1999).

T-Lymphozyten sind in diesem Modell ausschließlich dafür notwendig, den B-Lymphozyten Hilfe bei der Produktion der pathogenen Antikörper zu leisten. Sind diese Antikörper erst einmal produziert, sind Lymphozyten für die Pathogenese nicht mehr erforderlich; mit dem Serum der K/BxN-Mäuse lässt sich Arthritis sogar auf rag-defiziente Mäuse übertragen (Kouskoff, Korganow et al. 1996; Korganow, Ji et al. 1999; Matsumoto, Staub et al. 1999; Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002).

Eine Studie von Maccioni et al. zeigte, dass die Initiierung der B-Zellantwort gegen G6PI im K/BxN-Modell hauptsächlich in der Milz stattfindet (Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002). Allerdings handelte es sich bei den in dieser Arbeit verwendeten Zellen um anti-G6PI-IgG-sezernierende B-Zellen (anti-G6PI-IgG-ASZ), die aus G6PI-spezifischen B-Zellhybridomen generiert wurden. Eine andere Arbeitsgruppe dagegen, die unmanipulierte B-Zellen direkt aus der Maus verwendete, zeigte, dass die Aktivierung und Differenzierung der B-Zellen vorwiegend in den gelenknahen Lymphknoten stattfindet (Mandik-Nayak, Wipke et al. 2002).

Es wird diskutiert, ob die G6PI an die extrazelluläre Matrix des Knorpels und der Synovia bindet. Dies könnte im Gelenk zu einer besseren Zugänglichkeit der Autoantikörper zur G6PI führen und sekundär über die Bildung von Immunkomplexen zur Aktivierung des alternativen Komplementweges mit konsekutiver Entzündungsreaktion im Gelenk (Hirano 2002). Auch bei organspezifischen Autoantigenen, wie z.B. dem Myelin-basischen Protein bei der experimentellen allergischen Enzephalitis oder dem Inselzell-Antigen bei dem NOD-Modell des insulinabhängigen Diabetes, ist die Aktivierung der Lymphozyten auf die die befallenen Gewebe drainierenden Lymphknoten fokussiert (Chabannes and Borel 1990; Hoglund, Mintern et al. 1999).

Da die Arthritsentwicklung gerade im K/BxN-Modell entscheidend von den B-Zellen und Antikörpern abhängt, sollten die Kinetik und Lokalisation der Produktion von anti-G6PI-Antikörpern auch im Modell der G6PI-induzierten Arthritis untersucht werden. Dazu wurde die Anzahl G6PI-spezifischer IgG-ASZ aus der Milz, dem Knochenmark, den gelenknahen Lymphknoten und den die Injektionsstelle drainierenden Lymphknoten vor, während und nach Manifestation der Arthritis bestimmt und miteinander verglichen.

Es ist bekannt, dass die Mehrzahl der in der frühen Immunantwort gebildeten Antigen-spezifischen Plasmazellen nach wenigen Tagen im extrafollikulären Bereich der sekundären Lymphorgane noch am Ort ihrer Entstehung durch Apoptose sterben, während ein kleiner Teil dieser Zellen in das Knochenmark wandert, um dort über Mo-

nate bis Jahre zu überleben und als Teil des immunologischen Gedächtnisses Antigen-unabhängig persistierende Antikörpertiter zu produzieren (Slifka and Ahmed 1998; Manz, Cassese et al. 1999; Manz and Radbruch 2002; Hoyer, Moser et al. 2004; Manz, Hauser et al. 2005). Wie die Ergebnisse in Kapitel 4.1.1 zeigen, scheint diese Vorstellung auch auf die G6PI-induzierte Arthritis übertragbar zu sein. Nach Immunisierung der DBA/1-Mäuse mit rhG6PI findet die Aktivierung der B-Zellen in der frühen Phase der Immunantwort hauptsächlich in den die Injektionsstellen drainierenden Lymphknoten (aortale und inguinale Lymphknoten) statt.

Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um kurzlebige anti-G6PI-IgG-ASZ, die zur Bildung des am neunten Tag nach Immunisierung beobachteten hohen Maximums des Antikörpertiters gegen G6PI (Schubert, Maier et al. 2004) führen und nach einigen Tagen vor Ort durch Apoptose sterben. In der Folge kommt es zu einem raschen Abfall G6PI-spezifischer Plasmazellen in den drainierenden Lymphknoten. Zeitgleich beobachtet man jedoch im Knochenmark einen erneuten Anstieg von anti-G6PI spezifischen Plasmazellen. Diese sind vermutlich als kurzlebige anti-G6PI-IgG-ASZ aus den drainierenden Lymphknoten in das Knochenmark eingewandert, um sich dort zu langlebigen, sich nicht mehr teilenden Plasmazellen zu differenzieren und durch Produktion mehrerer tausend Antikörpermoleküle pro Sekunde in ihre Umgebung für die Persistenz des hohen anti-G6PI-Antikörpertiters zu sorgen, der auch nach Abklingen der klinischen Symptomatik zu beobachten ist.

Antigene werden je nach Injektionsort in verschiedene Lymphgewebe drainiert. So wird nach Injektion des Antigens im Bereich der Schwanzbasis überwiegend ein Lymphabstrom zu den inguinalen Lymphknoten beobachtet, während das Antigen nach Injektion in den Fußsohlen der Hinterfüße hauptsächlich in die poplitealen Lymphknoten drainiert wird (Tilney 1971).

Die Aktivierung von B-Zellen findet gewöhnlich in Lymphorganen statt, die in der Nähe des Antigens lokalisiert sind (Zinkernagel, Ehl et al. 1997). Demnach war zu erwarten, dass die Initiierung der B-Zellantwort gegen rhG6PI in den die Injektionsstellen drainierenden Lymphknoten stattfindet. Auch im CIA-Modell werden nach intradermaler Injektion von Kollagen II im Bereich der Scapulae die anti-CII-Antikörper vorwiegend in den brachialen Lymphknoten produziert (Rahman and Staines 1991). Andererseits handelt es sich bei der G6PI um ein systemisch exprimiertes Antigen, das sowohl in der G6PI-induzierten Arthritis als auch im K/BxN-Modell eine organspezifische Erkrankung induziert.

Im Gegensatz zum K/BxN-Modell konnten nach Immunisierung mit rhG6PI auch zum Zeitpunkt der klinischen Manifestation nur wenige G6PI-spezifische ASZ in den gelenknahen Lymphknoten nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis schließt jedoch eine pathogenetische Relevanz der Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis noch keineswegs aus. Zum einen wissen wir, dass Fc-Rezeptoren – und damit indirekt Antikörper – für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis von Bedeutung sind (Schubert, Maier et al. 2004). Zum anderen gibt es Hinweise dafür, dass B-Zellen nicht nur in Lymphorganen, sondern auch in entzündetem Gewebe zu Plasmazellen differenzieren können und dort der lokalen Antikörperbildung im Rahmen der humoralen Immunantwort dienen (Tengner, Halse et al. 1998; Cassese, Lindenau et al. 2001; Salomonsson, Jonsson et al. 2003; Hoyer, Moser et al. 2004; Sekine, Watanabe et al. 2004).

So findet man in der Synovia von Patienten mit rheumatoider oder reaktiver Arthritis Lymphozytenformationen wie sie in sekundären Lymphorganen zu beobachten sind, in denen vermutlich nicht nur die Aktivierung von B-Zellen, sondern auch ihre Differenzierung zu Plasmazellen stattfindet (Kim, Krenn et al. 1999). Es ist daher vorstellbar, dass nach primärer Immunisierung mit rhG6PI auch in der Synovia der DBA/1-Mäuse autoreaktive B-Zellen aktiviert werden und zu anti-G6PI-spezifischen Plasmazellen differenzieren, die im Gelenk pathogene Antikörper produzieren.

Möglicherweise sezernieren kurzlebige und langlebige Plasmazellen verschiedene Antikörper mit jeweils unterschiedlichen Qualitäten. So könnte es sein, dass kurzlebige Plasmazellen, die in der frühen Phase der Immunantwort in den drainierenden Lymphknoten gefunden werden, hauptsächlich pathogene Antikörper produzieren, die möglicherweise Arthritis induzieren, nicht aber für den weiteren Verlauf der Erkrankung relevant sind. Die langlebigen Plasmazellen im Knochenmark hingegen könnten Antikörper sezernieren, die pathogenetisch keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen.

Bei den Transferversuchen wurden Seren verwendet, die 14 bis 18 Tage nach Immunisierung von arthritischen Mäusen gewonnen wurden. Dies ist auch der Zeitraum, in dem die anti-G6PI-spezifischen Plasmazellen in den drainierenden Lymphknoten durch Apoptose sterben. Geht man davon aus, dass kurzlebige und langlebige Plasmazellen tatsächlich unterschiedliche Antikörper produzieren, so könnte man schließen, dass die Transferversuche deshalb nicht zur Induktion einer Arthritis geführt haben, weil zum Zeitpunkt der Serumgewinnung bereits viele kurzlebige

Plasmazellen durch Apoptose untergegangen sind und somit zu wenig pathogene Antikörper im Serum vorhanden waren, um eine Arthritis zu induzieren. DBA/1-Mäuse entwickeln nach Immunisierung mit rhG6PI eine akute, selbstlimitierende symmetrische Polyarthrititis. Eine Sekundärimmunisierung mit rhG6PI nach kompletter klinischer Remission führt zu keiner oder nur zu einer geringgradigen Arthritis (Bockermann, Schubert et al. 2005). Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass die nach primärer Immunisierung mit rhG6PI gebildeten langlebigen Plasmazellen im Knochenmark Antikörper sezernieren, die zur Aufrechterhaltung der protektiven humoralen Immunität dienen, wie z. B. nach einer Impfung, und es deshalb nicht zu einer erneuten Induktion der Arthritis kommt.

## **5.2 Rolle der anti-G6PI-Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis**

### **5.2.1 Charakterisierung der anti-G6PI-Antikörper**

Bei der Pathogenese der RA werden B-Zellen und den von ihnen produzierten Autoantikörpern eine große Rolle zugeschrieben. Mehr als 2/3 der RA-Patienten entwickeln den sogenannten Rheumafaktor (RF) (Dörner, Egerer et al. 2004). Daneben konnten noch zahlreiche andere Autoantikörper identifiziert werden, von denen Antikörper, die gegen citrullinierte Antigene gerichtet sind, im Vergleich zum RF eine höhere Spezifität besitzen (Bizzaro and Tampona 2008).

Im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) ist die Produktion von arthritogenen Autoantikörpern gegen murines Kollagen II (CII) der Hauptmechanismus in der Immunpathogenese. Der passive Transfer von Serum arthritischer Mäuse induziert sowohl in den suszeptiblen als auch in den nicht suszeptiblen Stämmen eine Arthritis (Englert, Ferguson et al. 1986; Holmdahl, Jansson et al. 1990). Auch im K/BxN-Modell spielen B-Zellen und die von ihnen produzierten Antikörper bei der Entwicklung der Arthritis eine entscheidende Rolle. Eine Arthritis kann auch hier durch Transfer von Serum arthritischer Mäuse oder monoklonalen Antikörpern in Empfängermäusen induziert werden (Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002).

Bisher konnte durch ein Transfer von Antikörpern aus Mäusen mit G6PI-induzierter Arthritis keine Erkrankung bei Empfängermäusen induziert werden (Kamradt and Schubert 2005). Sowohl IgG1, die im K/BxN-Modell arthritogen sind, als auch IgG2, die in der CIA hauptsächlich pathogen sind, sind vom neunten Tag nach Immunisierung bis nach Abklingen der klinischen Symptome an Tag 30 hochtitrig nachweisbar.

Daneben produzieren auch die nicht suszeptiblen Mausstämme nach Immunisierung mit G6PI hohe Antikörpertiter gegen G6PI. Diese Befunde sprechen zunächst gegen eine pathogene Bedeutung der anti-G6PI-Antikörper. Andererseits sind FcR<sup>+</sup>-Effektorzellen, und damit auch indirekt IgG-Antikörper, für die Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis entscheidend, so dass diese Befunde gegen die Induzierbarkeit der G6PI-induzierten Arthritis ausschließlich durch anti-G6PI-Antikörper, jedoch nicht gegen die generelle pathogene Bedeutung der anti-G6PI-Antikörper sprechen (Schubert, Maier et al. 2004).

Für die Arthritisinduktion kann es von Bedeutung sein, welche Epitope der G6PI von den anti-G6PI-Antikörpern erkannt werden. Zum einen ist es möglich, dass die Erkennung eines bestimmten „arthritogenen“ Epitops Voraussetzung für die Arthritogenität der Antikörper ist. In diesem Fall wäre die Antigenerkennung unmittelbar mit der pathologischen Funktion der Antikörper verbunden. Zum anderen ist es möglich, dass für die Induktion der Arthritis verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Epitopspezifitäten benötigt werden. Man unterscheidet lineare und konformationelle Epitope. Da eine Arthritis auch mit denaturierter G6PI induziert werden kann, ist es nicht unwahrscheinlich, dass die Erkennung linearer Epitope für die Pathogenese wichtig ist.

Zur Charakterisierung der anti-G6PI-Antikörper wurde eine Epitopanalyse polyklonaler Antikörper aus den Seren erkrankter DBA/1-Mäuse und den Seren nicht suszeptibler Mäuse durchgeführt. Die Ergebnisse in Kapitel 4.2.1 zeigen, dass die nach primärer Immunisierung mit rhG6PI produzierten Antikörper eine Vielzahl linearer Epitope der G6PI erkennen. Insgesamt scheinen jedoch nur drei dieser Epitope eine immundominante Wirkung zu besitzen. Die Epitope rhG6PI<sub>458-472</sub> und rhG6PI<sub>292-314</sub> konnten dabei sowohl bei den arthritischen DBA/1-Mäusen als auch bei den nicht suszeptiblen Stämmen als immundominante Epitope identifiziert werden, während für das Epitop rhG6PI<sub>368-388</sub> nur bei den DBA/1-Mäusen eine Immundominanz beobachtet werden konnte.

Dass die DBA/1-Mäuse, die mit nativer rhG6PI immunisiert worden waren, dieselben Peptide als immundominante Epitope erkennen wie die mit denaturierter rhG6PI immunisierten Mäuse, macht noch einmal deutlich, dass wenn Antikörper eine pathologische Rolle spielen, die Erkennung linearer Epitope von Bedeutung ist. Hauptepitop der G6PI-spezifischen Antikörper ist bei allen Mausstämmen das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub>.



Damit kann eine pathogene Bedeutung dieses Epitops zumindest als alleiniges arthritogenes Epitop ausgeschlossen werden.

Es ist jedoch möglich, dass das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> bei den DBA/1-Mäusen erst in Kombination mit anderen immundominanten Epitopen für die Arthritisentwicklung eine pathogene Bedeutung haben könnte.

Möglicherweise werden für die Induktion einer Arthritis verschiedene Antikörper benötigt, die verschiedene Epitope der G6PI erkennen. Viele Autoantikörper tragen über direkte klassische Effektormechanismen oder indirekt über die Bildung von Immunkomplexen in Gelenken zur Pathogenese der Arthritis bei (Martin and Chan 2004). Sowohl in der CIA als auch im K/BxN-Modell ist ein Transfer der Arthritis nur dann möglich, wenn mindestens zwei oder drei Antikörper unterschiedlicher Epitopspezifität das Antigen binden. Dabei scheint in beiden Tiermodellen die räumliche Anordnung der Epitope eine wesentliche Rolle zu spielen.

Die simultane Bindung mehrerer Antikörper an verschiedene Epitope könnte dabei durch die Bildung einer bestimmten räumlichen Anordnung der verschiedenen Antikörper zueinander die Aktivierung der Komplementkaskade entweder direkt oder indirekt durch Immunkomplexe günstig beeinflussen (Terato, Hasty et al. 1992; Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002; Nandakumar and Holmdahl 2005). Diese Daten lassen vermuten, dass auch bei der G6PI-induzierten Arthritis die Arthritogenität der Antikörper nicht an das Vorhandensein eines bestimmten „arthritogenen“ Epitops gebunden ist, sondern vielmehr an das Vorhandensein mehrerer verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Epitopspezifitäten.

Das Epitop rhG6PI<sub>368-388</sub> wurde zwar auch von den nicht suszeptiblen Stämmen erkannt, konnte aber nur bei den DBA/1-Mäusen als immundominant definiert werden. Es ist daher vorstellbar, dass beispielsweise erst durch die gleichzeitige Erkennung des Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub> und rhG6PI<sub>368-388</sub> eine räumliche Voraussetzung zur Bildung von Immunkomplexen geschaffen werden kann, die dann sekundär über die Aktivierung des Komplementsystems zur Arthritisentwicklung führt.

Die pathogene Funktion der Antikörper wäre in diesem Fall nicht durch die Erkennung eines bestimmten G6PI-Epitops, sondern weitgehend vom Fc-Teil des Antikörpers vermittelt, so dass verschiedene Antikörper durch die Erkennung unterschiedlicher Epitope zu einer optimierten Kreuzvernetzung und damit zu einer Aktivierung der Fc-Rezeptoren auf den Effektorzellen führen. Interessanterweise liegen beide Epitope

in direkter Nachbarschaft im Bereich der Verbindungsstelle des Homodimers und wären durch ihre oberflächliche Lage für Autoantikörper gut zugänglich (Abb. 4.8). Im K/BxN-Modell gelingt ein Transfer der Arthritis nach Injektion von 2 x 1 mg Immunglobulin G (IgG), in der CIA werden höhere Dosen von mindestens 2 x 4 mg benötigt. Bei den Transferexperimenten im Modell der G6PI-induzierten Arthritis konnte trotz Injektion von maximal 2 x 5 mg IgG von arthritischen DBA/1-Mäusen keine Arthritis in Empfängerermäuse induziert werden.

Diese Befundkonstellation lässt zwei Deutungen zu. Es ist erstens möglich, dass Antikörper notwendig, aber allein nicht hinreichend für eine Arthritisinduktion sind. Zweitens ist es vorstellbar, dass in den Immunglobulinpräparationen nicht genügend pathogene Antikörper vorhanden waren, die beispielsweise gegen diese beiden immundominanten Epitope rhG6PI<sub>458-472</sub> und rhG6PI<sub>368-388</sub> gerichtet sind. In diesem Fall wären die transferierten Antikörper also qualitativ und quantitativ nicht hinreichend für eine Arthritisinduktion.

### **5.2.2 Pathogenetische Relevanz der Erkennung des immundominanten Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub> durch anti-G6PI-Antikörper**

Bei der Epitopanalyse polyklonaler Seren arthritischer DBA/1-Mäuse wurde das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> als potentiell Hauptepitop der anti-G6PI-Antikörper identifiziert. Allerdings können mit dem Pepscan-Verfahren nur lineare Epitope identifiziert werden, nicht aber konformationelle Epitope. Es ist also lediglich wahrscheinlich, dass es sich bei dem Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> um ein Hauptepitop der anti-G6PI-Antikörper handelt. Die Existenz eines konformationellen Epitops ist nicht sicher auszuschließen. Dass jedoch DBA/1-Mäuse auch nach primärer Immunisierung mit denaturierter rhG6PI eine Arthritis entwickeln (Schubert, Maier et al. 2004), stützt die Annahme, es handele sich bei den immundominanten und pathogenetisch relevanten Epitopen um lineare Peptide.

Im K/BxN-Modell kann durch adoptiven Transfer von Serum oder monoklonalen anti-G6PI-Antikörpern eine Arthritis in Empfängerermäusen induziert werden. Bei der Epitopanalyse der monoklonalen anti-G6PI-Antikörper konnten die Peptide mit den Aminosäureresten 170 bis 202 und 470 bis 495 als immundominante B-Zellepitope identifiziert werden (Solomon 2003). Ein Transfer der Arthritis gelingt allerdings nur dann, wenn mindestens zwei Antikörper mit unterschiedlicher Epitopspezifität verwendet werden (Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002). In der G6PI-induzierten Arthritis

wurden die Epitope rhG6PI<sub>458-472</sub>, rhG6PI<sub>368-388</sub> und rhG6PI<sub>292-314</sub> als immundominante Epitope identifiziert, wobei das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> als potentielles Hauptepitop der anti-G6PI-Antikörper definiert wurde. Hier fällt auf, dass es sich bei dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> nahezu um dieselbe Peptidregion handelt wie bei dem im K/BxN-Modell identifiziertem Epitop mit dem Aminosäurerest 470 bis 495. Es war daher von großem Interesse, die quantitative Erkennung dieses Epitops durch die polyklonalen Antikörper arthritischer Mäuse im Modell der G6PI-induzierten Arthritis zu erfassen. Dafür wurde mittels kompetitivem ELISA die Inhibition der Antikörperbindung an rhG6PI durch das synthetisch hergestellte 14mer-Peptid mit den Aminosäureresten 458 bis 472 untersucht.

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Bindung G6PI-spezifischer Antikörper polyklonaler Seren an rhG6PI stärker durch das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> gehemmt werden konnte, wenn die Tiere zuvor mit denaturierter rhG6PI immunisiert worden waren. Die maximale Inhibition betrug im Mittel 47 %. Das heißt also, dass maximal 47 % der polyklonalen Antikörper das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> erkennen und binden, während die übrigen Antikörper eine andere Epitopspezifität zu besitzen scheinen. Es muss also neben dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> noch mindestens ein weiteres Epitop geben, welches von den polyklonalen Seren erkannt wird.

Auch wenn die Wahrscheinlichkeit besteht, dass die von den anti-G6PI-Antikörpern erkannten Epitope von linearer Natur sind, ist nicht sicher auszuschließen, dass auch konformationelle Epitope eine wichtige Rolle spielen, wie oben bereits ausgeführt. Zur weiteren Klärung wurden in einem weiteren Experiment kompetitive ELISA durchgeführt, in denen die Inhibition der Antikörperbindung an G6PI einmal mit nativer G6PI und einmal mit denaturierter G6PI miteinander verglichen wurde. Grundgedanke war dabei die Vorstellung, dass die native G6PI überwiegend konformationelle Epitope auf der Oberfläche abbildet, während die denaturierte G6PI durch Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstrukturen überwiegend lineare Epitope abbildet. In diesem Experiment konnte gezeigt werden, dass die Antikörperbindung an rhG6PI stärker durch denaturierte rhG6PI als durch native rhG6PI gehemmt wird.

Daraus ließe sich folgern, dass die Erkennung der denaturierten rhG6PI – und damit die Erkennung linearer Epitope – quantitativ bedeutsamer ist als die Erkennung konformationeller Epitope. Es ist vorstellbar, dass die übrigen anti-G6PI-Antikörper polyklonaler Seren andere lineare Epitope, wie z. B. die im Pepscan-Verfahren als immun-

dominante Epitope identifizierten Peptide rhG6PI<sub>368-388</sub> und rhG6PI<sub>292-314</sub>, erkennen, und diese erst in ihrer Kombination pathogenetisch relevant werden.

In der G6PI-induzierten Arthritis produzieren auch die nicht suszeptiblen Stämme hohe Antikörpertiter gegen G6PI. Diese Befundkonstellation scheint zunächst gegen die pathogene Bedeutung von Antikörpern zu sprechen. Allerdings produzieren auch in der CIA nicht suszeptible Stämme Antikörper gegen Kollagen II, obwohl die Antikörper hier eindeutig pathologisch relevant sind und den primären Mechanismus der Immunpathogenese darstellen.

Wenn spekuliert wird, dass auch in der G6PI-induzierten Arthritis Antikörper unterschiedlicher Epitopspezifitäten eine Rolle spielen, so könnten die Charakterisierung und der Transfer monoklonaler Antikörper in Empfängermäuse neue Erkenntnisse darüber liefern, welche qualitativen Eigenschaften für die Arthritogenität von Bedeutung sind. Im Rahmen dieser Fragestellung wurden in unserer Arbeitsgruppe B-Zellhybridome hergestellt, die monoklonale Antikörper gegen G6PI produzieren. Allerdings gibt es noch keine Daten bezüglich ihrer Epitopspezifitäten.

Die Qualität der Antikörper wird nicht nur durch die Epitopspezifität, sondern auch durch die Affinität bestimmt. So kann die Affinität von Autoantikörpern entscheidend dafür sein, ob Antikörper pathogene Effekte haben. Die im K/BxN-Modell von B-Zellhybridomen produzierten monoklonalen anti-G6PI-Antikörper wurden mit Hilfe einer *Biacore*-Analyse, einer Messmethode, die auf dem physikalischen Prinzip der Oberflächen-Plasmonresonanz basiert, bezüglich ihrer Affinität untersucht (Karlsson 1999). Sie zeigten eine sehr hohe Affinität gegenüber der G6PI, deren Dissoziationskonstante  $K_D$  bei ca.  $10^{-9}$  M liegt (Maccioni, Zeder-Lutz et al. 2002). Die hohe Affinität der Antikörper beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass die B-Zellen aufgrund des transgenen T-Zellrezeptors starke B-Zellhilfe erhalten und einer massiven Affinitätsreifung unterzogen werden.

Da es sich bei den DBA/1-Mäusen um nicht transgene Tiere handelt, ist es möglich, dass die nach Immunisierung mit rhG6PI gebildeten Antikörper in der G6PI-induzierten Arthritis eine niedrige Affinität besitzen und es bei den kompetitiven ELISA zur Bildung instabiler, immer wieder dissoziierender Antigen-Antikörper-Komplexe kommt. Das kompetitiv eingesetzte Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> wäre dann nur bedingt in der Lage, die Antikörperbindung an die immobilisierte rhG6PI zu inhibieren. Geht man davon aus, dass die nach Immunisierung mit rhG6PI gebildeten anti-G6PI-Antikörper hauptsächlich gegen lineare Epitope gerichtet sind, dann ist es sehr wahrscheinlich, dass

nach Immunisierung mit denaturierter rhG6PI Antikörper mit höherer Affinität gebildet werden als nach Immunisierung mit nativer rhG6PI.

Dies könnte erklären, weshalb die Bindung G6PI-spezifischer Antikörper polyklonaler Seren an rhG6PI durch das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> stärker gehemmt wird, wenn die Mäuse zuvor mit denaturierter rhG6PI immunisiert wurden.

Es ist bekannt, dass es nach Mehrfachimmunisierung nicht nur zu einer Steigerung der Antikörpermenge, sondern auch zur einer Steigerung der Affinität der antigen-spezifischen Antikörper kommt. Unter der Annahme, dass die im vorherigen Abschnitt dargestellten Inhibitionsversuche indirekt eine Aussage über die Affinität der anti-G6PI-Antikörper zulassen, wurden in einem weiteren Experiment DBA/1-Mäuse mehrfach mit nativer rhG6PI immunisiert und die Affinität der Antikörperbindung an G6PI nach primärer und tertiärer Immunisierung miteinander verglichen (Abb.4.13). Es zeigte sich, dass die Antikörperbindung an die immobilisierte rhG6PI stärker durch das kompetitiv in Lösung befindliche rhG6PI gehemmt werden konnte, wenn die Seren von Mäusen mit tertiärer Immunisierung eingesetzt wurden.

Eine niedrige Affinität der anti-G6PI-Antikörper könnte dafür verantwortlich sein, dass es in der G6PI-induzierten Arthritis trotz des Transfers großer Mengen an Immunglobulin bisher nicht gelungen ist, eine Arthritis in Empfängermäusen zu induzieren. Da diese Ergebnisse nur indirekt eine Aussage über die Affinität der anti-G6PI-Antikörper zulassen, wäre es interessant, die Affinitäten der in unserer Arbeitsgruppe hergestellten monoklonalen anti-G6PI-Antikörper direkt z.B. über die Methode der reflektometrischen Interferenzspektroskopie zu bestimmen. Dies könnte Aufschluss darüber geben, ob auch in nicht transgenen Mäusen Antikörper mit vergleichbar hoher Affinität wie im transgenen K/BxN-Modell produziert werden oder ob die Antikörper, wie die bisherigen Untersuchungen vermuten lassen, eine wesentlich niedrigere Affinität besitzen als die Antikörper im K/BxN-Modell.

Eine hohe Affinität der Antikörper, wie sie im K/BxN-Modell beschrieben ist, kann für die pathogenen Effekte von Antikörpern relevant sein, ist aber, wie eine Studie im in der CIA gezeigt hat, nicht zwangsläufig eine qualitative Voraussetzung für die Arthritogenität der Antikörper. Ratten, die nach intradermaler Immunisierung mit bovinem Kollagen II (CII) eine Arthritis entwickelten, produzierten im Vergleich zu den nicht erkrankten Tieren höhere Mengen an anti-CII-Antikörpern, deren Affinität jedoch deutlich niedriger war als bei den Antikörpern der klinisch gesunden Tiere (Rahman, Loh et al. 1992).

Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass niedrigaffine Antikörper aufgrund ihrer Unfähigkeit Antigene zu eliminieren sowohl die Bildung von Immunkomplexen als auch ihre persistierende Zirkulation begünstigen und sekundär die Aktivierung des Komplementsystems mit Initiierung einer Entzündungsreaktion begünstigen (Alpers, Steward et al. 1972; Steward, Katz et al. 1975). Die Tatsache, dass durch eine einmalige Immunisierung mit rhG6PI eine Arthritis induziert werden kann, weist darauf hin, dass wenn Antikörper pathologisch relevant sind, die Affinität der anti-G6PI-Antikörper eine eher untergeordnete Rolle zu spielen scheint.

Die Arthritogenität der Antikörper scheint aber auch von der Gesamtmenge der vorhandenen Antikörper abhängig zu sein. So konnte in der CIA bei arthritischen Mäusen eine wesentlich höhere Antikörperproduktion als bei gesunden Tieren nachgewiesen werden (Rahman, Loh et al. 1992). Zur Klärung der Frage, ob die Quantität der Antikörper bei der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis von Bedeutung ist, wurden in unserer Arbeitsgruppe Versuche durchgeführt, bei denen die Antikörpertiter im Serum von KRN-Mäusen aus dem K/BxN-Modell und die Antikörpertiter von arthritischen DBA/1-Mäusen aus dem Modell der G6PI-induzierten Arthritis direkt miteinander verglichen wurden. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten, dass KRN-Mäuse wesentlich höhere Antikörpermengen gegen G6PI produzieren als DBA/1-Mäuse nach Immunisierung mit rhG6PI (Daten nicht gezeigt).

In der CIA gelingt die Induktion der Arthritis durch Transfer von 2 x 4 mg Immunglobulin aus dem Serum arthritischer Mäuse, im K/BxN-Modell werden sogar nur 2 x 1 mg benötigt. In der G6PI-induzierten Arthritis konnte trotz des Transfers großer Mengen von bis zu 2 x 5 mg Immunglobulin keine Arthritis in Empfängermause induziert werden. Möglicherweise waren in der Immunglobulinpräparation zu wenig pathologische anti-G6PI-Antikörper vorhanden, so dass in diesem Fall sowohl die quantitativen als auch qualitativen Bedingungen nicht hinreichend für die Arthritisinduktion waren. Neben der Epitopspezifität kann auch der Isotyp der Antikörper für die Pathogenese der Arthritis relevant sein.

Es ist bekannt, dass bei der CIA vor allem IgG2a-Antikörper gegen Kollagen Typ II arthritogen sind. Im K/BxN-Modell hingegen sind ausschließlich IgG1-Antikörper gegen G6PI arthritogen. Die IgG2-Subklassen aktivieren dabei über die Bindung an C1q den klassischen Weg der Komplementkaskade, während die IgG1-Subklassen über die Bindung an C3b den alternativen Weg aktivieren (Klaus, Pepys et al. 1979; Duncan and Winter 1988; Ji, Ohmura et al. 2002). Da DBA/1-Mäuse zu dem Zeit-

punkt, an dem sie erkranken, über alle IgG-Subklassen verfügen, kann spekuliert werden, dass die Antikörper sowohl an der Aktivierung des klassischen als auch des alternativen Weges beteiligt sind. Bisher ist nicht bekannt, ob für die Induktion der G6PI-induzierten Arthritis ein bestimmter Isotyp notwendig ist. Auch hier könnten Transferversuche mit monoklonalen Antikörpern vom IgG1-, IgG2- oder beiden Subtypen neue Erkenntnisse über die pathogene Bedeutung der Antikörper liefern. In Zusammensicht aller bisherigen Befunde wäre es dabei sinnvoll, möglichst hochaffine monoklonale Antikörper mit verschiedenen Epitopspezifitäten zu kombinieren.

### **5.2.3 Pathogenetische Relevanz der Erkennung des Epitops rhG6PI<sub>458-472</sub> als Immunogen in vivo**

Obwohl in der CIA die Produktion arthritogener anti-CII-Antikörper der primäre Pathomechanismus ist, produzieren auch nicht suszeptible Stämme hohe Antikörpertiter gegen CII (Wooley, Luthra et al. 1981).

Bei der Epitopanalyse der anti-CII-Antikörper konnte eine Reihe von immundominanten B-Zellepitopen identifiziert werden, die in verschiedenen Peptidfragmenten (CB-8, CB-10, CB-11) lokalisiert sind, wobei die Mehrzahl der Antikörper gegen Epitope gerichtet war, die in dem sogenannten CB-11-Fragment des Kollagens liegen. Innerhalb des CB-11-Fragments war die Peptidregion mit den Aminosäureresten 359 bis 369 die am häufigsten von den monoklonalen Antikörpern aller suszeptiblen und nicht suszeptiblen Stämme erkannte Peptidstruktur. Da eine Arthritis nur mit dem Fragment CB-11, nicht aber mit anderen Peptidfragmenten des Kollagens induziert werden kann, scheint das Fragment CB-11 das Hauptepitop der B-Zellen zu sein (Terato, Hasty et al. 1985; Holmdahl, Jansson et al. 1990).

Auch in der G6PI-induzierten Arthritis produzieren sowohl suszeptible als auch nicht suszeptible Stämme hohe Antikörpertiter gegen G6PI. Wie bei der CIA konnte auch in diesem Modell ein B-Zellepitop identifiziert werden, das am häufigsten und stärksten erkannt wurde, und zwar von allen suszeptiblen wie auch nicht suszeptiblen Tieren, und deshalb, als potentiell immundominantes Hauptepitop der anti-G6PI-Antikörper definiert wurde.

Bisher wissen wir, dass B-Zellen notwendig, aber allein nicht hinreichend für eine Arthritisinduktion sind. Eine Arthritisinduktion mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> scheint demnach unwahrscheinlich. Es könnte aber dann eine wichtige Rolle in der Pathogenese der G6PI-induzierten Arthritis spielen, wenn es auch von T-Zellen als immundo-

minantes Epitop erkannt und mit Hilfe dieser eine Arthritis induzieren würde. Im Rahmen der Fragestellung, ob das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> pathogenetisch relevant ist, wurde seine Rolle als Immunogen in vivo untersucht. Nach Immunisierung von DBA/1-Mäusen mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> konnten weder klinisch noch histologisch Zeichen einer Arthritis beobachtet werden, während die Mäuse in der Kontrollgruppe, die mit rhG6PI immunisiert worden waren, zu 100 % eine Arthritis entwickelten (Tab. 4.1). Diese Daten weisen darauf hin, dass das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> vermutlich nicht von T-Zellen erkannt wird.

Es ist bekannt, dass für die Induktion der G6PI-induzierten Arthritis T-Zellen notwendig sind. DBA/1-Mäuse, die am sechsten und neunten Tag nach Immunisierung mit rhG6PI mit depletierenden Antikörpern gegen CD4 behandelt werden, entwickeln keine klinischen oder histologischen Zeichen einer Arthritis (Schubert, Maier et al. 2004). Diese Daten sprechen gegen eine Induzierbarkeit der GPI-induzierten Arthritis durch anti-GPI-Antikörper als alleinigen Faktor, schließen jedoch eine pathogene Bedeutung der Antikörper gegen G6PI nicht aus.

Im letzten Teil der Arbeit wurde untersucht, ob das als B-Zell-Epitop identifizierte Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> auch von T-Zellen erkannt wird, so wie es in der experimentellen autoimmunen Glomerulonephritis der Fall ist (Reynolds, Haxby et al. 2009). Da DBA/1-Mäuse nach Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> keine Arthritis entwickeln, aber T-Zellen für die Induktion der Arthritis notwendig sind, scheint eine Erkennung dieses Epitops durch T-Zellen eher unwahrscheinlich. Es ist jedoch nicht sicher auszuschließen, dass es sich bei dem identifizierten B-Zell-Epitop gleichzeitig auch um ein immundominantes T-Zell-Epitop handeln könnte und die Induktion der Arthritis nicht möglich war, weil eine Kombination mehrerer B- bzw. T-Zell-Epitope notwendig ist.

Autoreaktive CD4<sup>+</sup>-T-Zellen wurden nach Immunisierung mit G6PI mit dem synthetisch hergestellten Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> sowie als Positivkontrolle mit nativer und mit denaturierter rhG6PI restimuliert und die Proliferation über den Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin verfolgt. Nach Restimulation der CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> wurde keine Proliferation gemessen, so dass das Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> nicht als immundominantes T-Zell-Epitop anzusehen ist.

Zusätzlich wurden auch CD4<sup>+</sup>-T-Zellen von Mäusen restimuliert, die zuvor mit dem Peptid immunisiert worden waren. Interessanterweise lassen sich auch diese Zellen nicht mit dem Peptid, jedoch mit G6PI restimulieren. Das heißt also, dass nach Immu-



nisierung mit dem Peptid CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entstehen, die gegen andere Epitope der G6PI gerichtet sind. Eine Erklärungshypothese dazu wäre, dass es nach Immunisierung mit dem Peptid zu einer Ausweitung des initial erkannten Epitopspektrums mit Generierung neuer antigener Determinaten (Neoepitope) bzw. Freisetzung kryptischer Epitope kommt (Lehmann, Forsthuber et al. 1992). Dieses als „Epitope-Spreading“ bezeichnete Phänomen könnte erklären, weshalb die T-Zellen nach Immunisierung nicht mehr das Peptid, aber wohl die G6PI erkennen.

Kürzlich konnten in unserer Arbeitsgruppe die Peptide hG6PI<sub>85-99</sub> und hG6PI<sub>469-483</sub> als immundominante T-Zell-Epitope identifiziert werden, die arthritogen sind und über eine Aktivierung der B-Zellen zur Produktion von anti-G6PI-Antikörpern führen (Bruns, Frey et al. 2009). Eine Immunisierung mit dem Peptid hG6PI<sub>85-99</sub> oder hG6PI<sub>469-483</sub> führte zur Entwicklung einer Arthritis in DBA/1-Mäusen, deren klinischer Verlauf allerdings milder und kürzer verlief als bei der G6PI-induzierten Arthritis. Da die Aminosäuresequenz im Bereich der Peptidregion 469 bis 483 zwischen humaner und muriner G6PI identisch ist, konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Arthritis auch durch Immunisierung mit einem Autoantigen induziert werden kann.

Fast zeitgleich wurde von einer anderen Arbeitsgruppe ein weiteres immundominantes und arthritogenes T-Zellepitop, das Epitop hG6PI<sub>325-339</sub>, identifiziert (Iwanami, Matsumoto et al. 2008), das ebenfalls zur Produktion von anti-G6PI-Antikörpern führt. Zusätzlich konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass ein Transfer von T-Zellen allein nicht ausreicht, um eine Arthritis in Empfängermäuse zu induzieren. Diese Daten lassen vermuten, dass für die Induktion einer Arthritis sowohl T- Zellen als auch B-Zellen – und damit Antikörper – notwendig sind.

Es fällt auf, dass sowohl in der CIA als auch in der G6PI-Arthritis die identifizierten B- und T-Zell-Epitope zwar nicht identisch sind, jedoch innerhalb einer bestimmten Peptidregion liegen und eine lokale Nähe zueinander zeigen. So liegen in der CIA sowohl das B-Zellepitop als auch das immundominante T-Zell-Epitop (Aminosäurereste 260 bis 267) in dem CB-11-Fragment des Kollagens II (Brand, Myers et al. 1994). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass aufgrund der Lokalisation der B- und T-Zellepitope ein funktioneller Zusammenhang zwischen beiden besteht. Bisher gibt es jedoch keine Daten, die diese Spekulationen belegen können.

## 6 Zusammenfassung

Bei der G6PI-induzierten Arthritis entwickeln DBA1-Mäuse nach Immunisierung mit G6PI eine akute, symmetrische Polyarthritis, die im Gegensatz zu dem T-Zellrezeptor transgenen K/BxN-Modell nicht durch Transfer von Antikörpern übertragen werden kann. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit einem systemischen Antigen eine organspezifische Erkrankung in nicht transgenen Mäusen induziert. Da in der G6PI-induzierten Arthritis die Arthritsentwicklung entscheidend von Fc-Rezeptoren abhängt, wurde vermutet, dass auch B-Zellen und die von ihnen produzierten anti-G6PI-Antikörper eine pathogene Rolle spielen.

Im ersten Teil der Arbeit wurde die Kinetik und Lokalisation der B-Zellantwort gegen G6PI nach Immunisierung mit rhG6PI in DBA/1-Mäusen untersucht. Anders als im K/BxN-Modell wird die B-Zellantwort hauptsächlich in den die Injektionsstellen drainierenden Lymphknoten initiiert. In dieser frühen Phase der Immunantwort entsteht eine große Anzahl von kurzlebigen Plasmazellen, die nach wenigen Tagen durch Apoptose noch vor Ort sterben. Gleichzeitig wandert ein Teil dieser Zellen in das Knochenmark, wo sie zu langlebigen Plasmazellen differenzieren, um dort auch nach Abklingen der klinischen Symptomatik hohe Antikörpertiter gegen G6PI zu produzieren.

Für die Arthritsentwicklung scheint es von Bedeutung zu sein, welche Epitope der G6PI von den anti-G6PI-Antikörpern erkannt werden. Im zweiten Teil der Arbeit wurden daher die qualitativen Eigenschaften der polyklonalen anti-G6PI-Antikörper suszeptibler und nicht suszeptibler Stämme analysiert. Da auch die Immunisierung mit denaturierter rhG6PI eine Arthritis in DBA/1-Mäusen induziert, ist es sehr wahrscheinlich, dass die Erkennung linearer Epitope eine wichtige Rolle spielt.

Mit Hilfe des Pepscan-Verfahrens wurden die anti-G6PI-Antikörper suszeptibler und nicht suszeptibler Stämme auf ihre Epitopspezifität untersucht und miteinander verglichen. Die Ergebnisse zeigten, dass die anti-G6PI-Antikörper eine Vielzahl von Peptiden erkennen. Allerdings konnten nur wenige dieser Peptide als immundominante Epitope definiert werden. Das Peptid rhG6PI<sub>458-472</sub> mit der Aminosäuresequenz DLERLLPHKVFEGNR wurde sowohl bei den suszeptiblen DBA/1-Mäusen als auch bei den nicht suszeptiblen Stämmen als immundominantes Hauptepitop identifiziert. In Inhibitionsversuchen wurde die quantitative Bedeutsamkeit der Erkennung dieses Epitops untersucht. Das synthetisch hergestellte Epitop wurde von etwa 20 % bis 50 % der polyklonalen anti-G6PI-Antikörper gebunden.

Neben diesem Hauptepitop müssen also noch weitere Epitope existieren, die von den anti-G6PI-Antikörpern erkannt werden. Bei der Epitopanalyse konnte tatsächlich ein weiteres Epitop identifiziert werden, das von den anti-G6PI-Antikörpern erkannt wird. Das Peptid rhG6PI<sub>368-388</sub> wurde ebenfalls von allen Mausstämmen erkannt, konnte aber nur bei den DBA/1-Mäusen als immundominantes Epitop definiert werden. Insgesamt scheint die Arthritogenität der Antikörper an das Vorhandensein mehrerer verschiedener Antikörper mit unterschiedlichen Epitopspezifitäten gebunden zu sein. Es ist vorstellbar, dass Antikörper, die das Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> erkennen, nur in Kombination mit weiteren, andere immundominante Epitope – wie z.B. das Epitop rhG6PI<sub>368-388</sub> – erkennenden Antikörpern einen pathogenen Effekt besitzen.

Neben der Epitopspezifität kann auch die Affinität für die Arthritogenität der Antikörper entscheidend sein. Die Inhibitionsversuche lieferten indirekt auch Hinweise dafür, dass die nach Immunisierung mit G6PI produzierten Antikörper eine niedrige Affinität besitzen und die Arthritis möglicherweise deswegen nicht durch Transfer von Antikörpern übertragen werden kann.

Die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in den DBA/1-Mäusen zeigten nach Restimulation mit dem identifizierten B-Zellepitop rhG6PI<sub>458-472</sub> keine Proliferation. Auch führte die Immunisierung mit dem Epitop rhG6PI<sub>458-472</sub> weder klinisch noch histologisch zur Entwicklung einer Arthritis. Diese Ergebnisse sprechen gegen die Induzierbarkeit der G6PI-induzierten Arthritis durch anti-G6PI-Antikörper als alleinigen Faktor, jedoch nicht gegen deren generelle pathogene Bedeutung.

In der CIA und auch im K/BxN-Modell kann die Arthritis durch Transfer monoklonaler Antikörper übertragen werden, wobei mindestens zwei oder drei Antikörper unterschiedlicher Epitopspezifität für die Arthritisinduktion benötigt werden. Im Modell der G6PI-induzierten Arthritis wurden bei den Transferexperimenten bisher nur polyclonale Antikörper aus den Seren arthritischer Mäuse verwendet. Neue Erkenntnisse könnten monoklonale Antikörper liefern, die aus arthritischen Mäusen nach Immunisierung mit G6PI generiert werden. Die Bestimmung der Epitope und Affinitäten der monoklonalen Antikörper sowie Transferversuche, bei denen verschiedene monoklonale anti-G6PI-Antikörper miteinander kombiniert werden, könnten weiteren Aufschluss darüber geben, ob bisher die Quantität oder die Qualität der transferierten Antikörper nicht hinreichend für eine Arthritisinduktion waren.

## Abkürzungsverzeichnis

AA	Adjuvant-induzierte Arthritis
AMP	2-Amino-2-methyl-1-propanol
Abb.	Abbildung
APZ	Antigen-präsentierende Zelle
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat
BSA	bovines Serumalbumin
C	Komplementfaktor
CD	engl.: cluster of differentiation
CFA	komplettes Freundsches Adjuvans
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CII	Kollagen II
CTLA 4-IgG1	engl.: cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4-IgG1
DCM	Dichlormethan
DIC	Diisopropylcarbodiimid
DIPEA	N-Ethyl-Diisopropylamin
DNA	engl.: Desoxyribonucleic Acid
DMA	Dimethylacetamid
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	engl.: enzyme-linked immunosorbent assay
ELISPOT	engl.: enzyme linked immuno spot technique
FACS	engl.: fluorescence activated cell sorting
FcR	Fc-Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum
Fmoc-	Fluorenyl-methoxycarbonyl-
G6PI	Glukose-6-phosphat Isomerase
G-CSF	engl.: granulocyte colony stimulating factor
GM-CSF	engl.: granulocyte macrophage colony-stimulating factor
HLA	engl.: Human Leucozye Antigen

---

IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Interphalangealgelenke
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktosid
kD	Kilodalton
KM	Kulturmedium
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MALDI-TOF-MS	engl.: matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry
MCP	Metakarpophalangealgelenke
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MTP	Metatarsophalangealgelenke
NAD	Nikotinamidadenindinukleotid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotidhydrogen
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NMI	1-Methyl-imidazol
NMP	1-Methyl-2-Pyrrolidon
NOD	engl.: non obese diabetes
OD	optische Dichte
OspA	engl.: outer surface protein A
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PIP	Proximale Interphalangealgelenke
PerCP	Peridinin-Chlorophyll
POD	Peroxidase
RA	Rheumatoide Arthritis
Ra	Rezeptor-Antagonist
RAG	engl.: recombinant-activating gene
RF	Rheumafaktor
rhG6PI	rekombinante humane G6PI
s.c.	subkutan
SDS	Natriumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler (engl.: Standard Srror of the Mean)
SLE	Systemischer Lupus Erythematodis
Tab.	Tabelle
TBS	engl.: tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFA	Trifluoethansäure
TGF	engl.: transforming growth factor
TIBS	Triisobutylsilan
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TZR	transgener T-Zellrezeptor
U	engl.: unit
V	Volt
VCAM-1	engl.: vascular cell adhesion molecule-1
WM	Waschmedium
ZNS	zentrales Nervensystem

## Literaturverzeichnis

### Internetseiten:

Cedars Sinai Hospital (2010). "Arthritis – Rheumatoid Arthritis, Osteoarthritis and Spinal Arthritis." <http://www.cedars-sinai.edu/Patients/Health-Conditions/Arthritis---Rheumatoid-Arthritis-Osteoarthritis-and-Spinal-Arthritis.aspx>

### Zeitschriften:

- (2002). "Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 Update." Arthritis Rheum 46(2): 328-346.
- Alonzi, T., E. Fattori, et al. (1998). "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis." J Exp Med 187(4): 461-468.
- Alpers, J. H., M. W. Steward, et al. (1972). "Differences in immune elimination in inbred mice. The role of low affinity antibody." Clin Exp Immunol 12(1): 121-132.
- Arnett, F. C., S. M. Edworthy, et al. (1988). "The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 31(3): 315-324.
- Bedwell, A. E., C. J. Elson, et al. (1987). "Immunological involvement in the pathogenesis of pristane-induced arthritis." Scand J Immunol 25(4): 393-398.
- Behlke, M. A., H. S. Chou, et al. (1986). "Murine T-cell receptor mutants with deletions of beta-chain variable region genes." Proc Natl Acad Sci U S A 83(3): 767-771.
- Bizzaro, N. and M. Tampoia (2008). "Diagnostic accuracy of immunoassays for the detection of antibodies to citrullinated proteins." Clin Rev Allergy Immunol 34(1): 16-20.
- Bockermann, R., D. Schubert, et al. (2005). "Induction of a B-cell-dependent chronic arthritis with glucose-6-phosphate isomerase." Arthritis Res Ther 7(6): R1316-1324.
- Brahn, E. and D. E. Trentham (1984). "Effect of antithymocyte serum on collagen arthritis in rats: evidence that T cells are involved in its pathogenesis." Cell Immunol 86(2): 421-428.
- Brand, D. D., L. K. Myers, et al. (1994). "Characterization of the T cell determinants in the induction of autoimmune arthritis by bovine alpha 1(II)-CB11 in H-2q mice." J Immunol 152(6): 3088-3097.
- Brennan, F. M., D. Chantray, et al. (1989). "Inhibitory effect of TNF alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis." Lancet 2(8657): 244-247.
- Bresnihan, B., J. M. Alvaro-Gracia, et al. (1998). "Treatment of rheumatoid arthritis with recombinant human interleukin-1 receptor antagonist." Arthritis Rheum 41(12): 2196-2204.
- Bruns, L., O. Frey, et al. (2009). "Immunization with an immunodominant self-peptide derived from glucose-6-phosphate isomerase induces arthritis in DBA/1 mice." Arthritis Res Ther 11(4): R117.
- Carlsen, S., A. S. Hansson, et al. (1998). "Cartilage oligomeric matrix protein (COMP)-induced arthritis in rats." Clin Exp Immunol 114(3): 477-484.

- Cassese, G., S. Lindenau, et al. (2001). "Inflamed kidneys of NZB / W mice are a major site for the homeostasis of plasma cells." Eur J Immunol 31(9): 2726-2732.
- Chabannes, D. and J. F. Borel (1990). "Chronic-relapsing experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats: correlation between clinical state and antimyelin basic protein reactivity in draining lymph node cells." Transplant Proc 22(6): 2591-2593.
- Chabaud, M., J. M. Durand, et al. (1999). "Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium." Arthritis Rheum 42(5): 963-970.
- Chabaud, M., F. Fossiez, et al. (1998). "Enhancing effect of IL-17 on IL-1-induced IL-6 and leukemia inhibitory factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes and its regulation by Th2 cytokines." J Immunol 161(1): 409-414.
- Chabaud, M. and P. Miossec (2001). "The combination of tumor necrosis factor alpha blockade with interleukin-1 and interleukin-17 blockade is more effective for controlling synovial inflammation and bone resorption in an ex vivo model." Arthritis Rheum 44(6): 1293-1303.
- Chang, Y. H., C. M. Pearson, et al. (1980). "Adjuvant polyarthritis. IV. Induction by a synthetic adjuvant: immunologic, histopathologic, and other studies." Arthritis Rheum 23(1): 62-71.
- Chang, Y. H., C. M. Pearson, et al. (1981). "Adjuvant polyarthritis. V. Induction by N-acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine, the smallest peptide subunit of bacterial peptidoglycan." J Exp Med 153(4): 1021-1026.
- Chaput, M., V. Claes, et al. (1988). "The neurotrophic factor neuroleukin is 90% homologous with phosphohexose isomerase." Nature 332(6163): 454-455.
- Chervenick, P. A., D. R. Boggs, et al. (1968). "Quantitative studies of blood and bone marrow neutrophils in normal mice." Am J Physiol 215(2): 353-360.
- Cohen, S. B., P. Emery, et al. (2006). "Rituximab for rheumatoid arthritis refractory to anti-tumor necrosis factor therapy: Results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial evaluating primary efficacy and safety at twenty-four weeks." Arthritis Rheum 54(9): 2793-2806.
- Cordeiro, A. T., P. H. Godoi, et al. (2003). "Crystal structure of human phosphoglucose isomerase and analysis of the initial catalytic steps." Biochim Biophys Acta 1645(2): 117-122.
- Corr, M. and B. Crain (2002). "The role of FcγR signaling in the K/B x N serum transfer model of arthritis." J Immunol 169(11): 6604-6609.
- Cremer, M. A., X. J. Ye, et al. (1998). "Immunity to type IX collagen in rodents: a study of type IX collagen for autoimmune and arthritogenic activities." Clin Exp Immunol 112(3): 375-382.
- Cush, J. J. and P. E. Lipsky (1988). "Phenotypic analysis of synovial tissue and peripheral blood lymphocytes isolated from patients with rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 31(10): 1230-1238.
- De Vita, S. and L. Quartuccio (2006). "Treatment of rheumatoid arthritis with rituximab: An update and possible indications." Autoimmun Rev 5(7): 443-448.
- Ditzel, H. J. (2004). "The K/BxN mouse: a model of human inflammatory arthritis." Trends Mol Med 10(1): 40-45.
- Dörner, T., K. Egerer, et al. (2004). "Rheumatoid factor revisited." Curr Opin Rheumatol 16(3): 246-253.
- Dreja, H., A. Annenkov, et al. (2000). "Soluble complement receptor 1 (CD35) delivered by retrovirally infected syngeneic cells or by naked DNA injection



- prevents the progression of collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum 43(8): 1698-1709.
- Duncan, A. R. and G. Winter (1988). "The binding site for C1q on IgG." Nature 332(6166): 738-740.
- Edwards, J. C. (1994). "The nature and origins of synovium: experimental approaches to the study of synoviocyte differentiation." J Anat 184 ( Pt 3): 493-501.
- Edwards, J. C., L. Szczepanski, et al. (2004). "Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis." N Engl J Med 350(25): 2572-2581.
- Englert, M. E., K. M. Ferguson, et al. (1986). "Passive transfer of collagen arthritis: heterogeneity of anti-collagen IgG." Cell Immunol 101(2): 373-379.
- Faik, P., J. I. Walker, et al. (1988). "Mouse glucose-6-phosphate isomerase and neuroleukin have identical 3' sequences." Nature 332(6163): 455-457.
- Fava, R., N. Olsen, et al. (1989). "Active and latent forms of transforming growth factor beta activity in synovial effusions." J Exp Med 169(1): 291-296.
- Feldmann, M., F. M. Brennan, et al. (1996). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis." Annu Rev Immunol 14: 397-440.
- Firestein, G. S. (2003). "Evolving concepts of rheumatoid arthritis." Nature 423(6937): 356-361.
- Firestein, G. S., J. M. Alvaro-Gracia, et al. (1990). "Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis." J Immunol 144(9): 3347-3353.
- Firestein, G. S. and N. J. Zvaifler (1990). "How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?" Arthritis Rheum 33(6): 768-773.
- Fossiez, F., O. Djossou, et al. (1996). "T cell interleukin-17 induces stromal cells to produce proinflammatory and hematopoietic cytokines." J Exp Med 183(6): 2593-2603.
- Frank, R. (1992). "Spot-synthesis: an easy technique for the positionally addressable, parallel chemical synthesis on a membrane support." Tetrahedron 48(42): 9217-9232.
- Frei, Y., J. D. Lambris, et al. (1987). "Generation of a monoclonal antibody to mouse C5 application in an ELISA assay for detection of anti-C5 antibodies." Mol Cell Probes 1(2): 141-149.
- Gabriel, S. E. (2001). "The epidemiology of rheumatoid arthritis." Rheum Dis Clin North Am 27(2): 269-281.
- Girbal-Neuhauser, E., J. J. Durieux, et al. (1999). "The epitopes targeted by the rheumatoid arthritis-associated antifilaggrin autoantibodies are posttranslationally generated on various sites of (pro)filaggrin by deimination of arginine residues." J Immunol 162(1): 585-594.
- Glant, T. T. and K. Mikecz (2004). "Proteoglycan aggrecan-induced arthritis: a murine autoimmune model of rheumatoid arthritis." Methods Mol Med 102: 313-338.
- Gregersen, P. K., J. Silver, et al. (1987). "The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 30(11): 1205-1213.
- Hassfeld, W., G. Steiner, et al. (1993). "Autoantibody to the nuclear antigen RA33: a marker for early rheumatoid arthritis." Br J Rheumatol 32(3): 199-203.
- Hassfeld, W., G. Steiner, et al. (1989). "Demonstration of a new antinuclear antibody (anti-RA33) that is highly specific for rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 32(12): 1515-1520.
- Hietala, M. A., I. M. Jonsson, et al. (2002). "Complement deficiency ameliorates collagen-induced arthritis in mice." J Immunol 169(1): 454-459.

- Hirano, T. (2002). "Revival of the autoantibody model in rheumatoid arthritis." Nat Immunol 3(4): 342-344.
- Hogasen, K., T. E. Mollnes, et al. (1995). "Terminal complement pathway activation and low lysis inhibitors in rheumatoid arthritis synovial fluid." J Rheumatol 22(1): 24-28.
- Hoglund, P., J. Mintern, et al. (1999). "Initiation of autoimmune diabetes by developmentally regulated presentation of islet cell antigens in the pancreatic lymph nodes." J Exp Med 189(2): 331-339.
- Holmdahl, R., M. E. Andersson, et al. (1989). "Collagen induced arthritis as an experimental model for rheumatoid arthritis. Immunogenetics, pathogenesis and autoimmunity." Apmis 97(7): 575-584.
- Holmdahl, R., L. Jansson, et al. (1988). "Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis." Immunology 65(2): 305-310.
- Holmdahl, R., L. Jansson, et al. (1990). "Arthritis in DBA/1 mice induced with passively transferred type II collagen immune serum. Immunohistopathology and serum levels of anti-type II collagen auto-antibodies." Scand J Immunol 31(2): 147-157.
- Holmdahl, R., J. C. Lorentzen, et al. (2001). "Arthritis induced in rats with nonimmunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis." Immunol Rev 184: 184-202.
- Hoyer, B. F., K. Moser, et al. (2004). "Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice." J Exp Med 199(11): 1577-1584.
- Ishikawa, H., J. D. Smiley, et al. (1975). "Electron microscopic demonstration of immunoglobulin deposition in rheumatoid cartilage." Arthritis Rheum 18(6): 563-576.
- Iwanami, K., I. Matsumoto, et al. (2008). "Arthritogenic T cell epitope in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis." Arthritis Res Ther 10(6): R130.
- Ji, H., D. Gauguier, et al. (2001). "Genetic influences on the end-stage effector phase of arthritis." J Exp Med 194(3): 321-330.
- Ji, H., K. Ohmura, et al. (2002). "Arthritis critically dependent on innate immune system players." Immunity 16(2): 157-168.
- Ji, H., A. Pettit, et al. (2002). "Critical roles for interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in antibody-induced arthritis." J Exp Med 196(1): 77-85.
- Jose, P. J., I. K. Moss, et al. (1990). "Measurement of the chemotactic complement fragment C5a in rheumatoid synovial fluids by radioimmunoassay: role of C5a in the acute inflammatory phase." Ann Rheum Dis 49(10): 747-752.
- Jouen, F., O. Vittecoq, et al. (2004). "Diagnostic and prognostic values of anti glucose-6-phosphate isomerase antibodies in community-recruited patients with very early arthritis." Clin Exp Immunol 137(3): 606-611.
- Jovanovic, D. V., J. A. Di Battista, et al. (1998). "IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages." J Immunol 160(7): 3513-3521.
- Kalden, J. R., F. C. Breedveld, et al. (1998). "Immunological treatment of autoimmune diseases." Adv Immunol 68: 333-418.
- Kamradt, T. and D. Schubert (2005). "The role and clinical implications of G6PI in experimental models of rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther 7(1): 20-28.

- Karlsson, R. (1999). "Affinity analysis of non-steady-state data obtained under mass transport limited conditions using BIAcore technology." J Mol Recognit 12(5): 285-292.
- Katsikis, P. D., C. Q. Chu, et al. (1994). "Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis." J Exp Med 179(5): 1517-1527.
- Kim, H. J., V. Krenn, et al. (1999). "Plasma cell development in synovial germinal centers in patients with rheumatoid and reactive arthritis." J Immunol 162(5): 3053-3062.
- Kjellen, P., U. Brunsberg, et al. (1998). "The structural basis of MHC control of collagen-induced arthritis; binding of the immunodominant type II collagen 256-270 glycopeptide to H-2Aq and H-2Ap molecules." Eur J Immunol 28(2): 755-767.
- Klaus, G. G., M. B. Pepys, et al. (1979). "Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody." Immunology 38(4): 687-695.
- Klippel, J. H. and P. A. Dieppe (1998). Rheumatology. London, Mosby International.
- Koch, A. E., J. C. Burrows, et al. (1991). "Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues." Lab Invest 64(3): 313-320.
- Korganow, A. S., H. Ji, et al. (1999). "From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins." Immunity 10(4): 451-461.
- Kouskoff, V., A. S. Korganow, et al. (1996). "Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity." Cell 87(5): 811-822.
- Kramer, A. and J. Schneider-Mergener (1998). "Synthesis and screening of peptide libraries on continuous cellulose membrane supports." Methods Mol Biol 87: 25-39.
- Kwoh, C. K., C. Venglish, et al. (1996). "Age, sex, and the familial risk of rheumatoid arthritis." Am J Epidemiol 144(1): 15-24.
- Kyburz, D., D. A. Carson, et al. (2000). "The role of CD40 ligand and tumor necrosis factor alpha signaling in the transgenic K/BxN mouse model of rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 43(11): 2571-2577.
- Lee, D. M., D. S. Friend, et al. (2002). "Mast cells: a cellular link between autoantibodies and inflammatory arthritis." Science 297(5587): 1689-1692.
- Lehmann, P. V., T. Forsthuber, et al. (1992). "Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen." Nature 358(6382): 155-157.
- Lu, S., S. Carlsen, et al. (2002). "Immunization of rats with homologous type XI collagen leads to chronic and relapsing arthritis with different genetics and joint pathology than arthritis induced with homologous type II collagen." J Autoimmun 18(3): 199-211.
- Lubberts, E., M. I. Koenders, et al. (2005). "The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models." Arthritis Res Ther 7(1): 29-37.
- Lundy, S. K., S. Sarkar, et al. (2007). "Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes." Arthritis Res Ther 9(1): 202.
- Maccioni, M., G. Zeder-Lutz, et al. (2002). "Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice." J Exp Med 195(8): 1071-1077.
- Maddison, P. J., D. Isenberg, et al. (2004). Oxford Textbook of Rheumatology, Oxford University Press.
- Malfait, A. M., R. O. Williams, et al. (2001). "Chronic relapsing homologous collagen-induced arthritis in DBA/1 mice as a model for testing disease-modifying and remission-inducing therapies." Arthritis Rheum 44(5): 1215-1224.

- Mandik-Nayak, L., B. T. Wipke, et al. (2002). "Despite ubiquitous autoantigen expression, arthritogenic autoantibody response initiates in the local lymph node." Proc Natl Acad Sci U S A 99(22): 14368-14373.
- Mangialaio, S., H. Ji, et al. (1999). "The arthritogenic T cell receptor and its ligand in a model of spontaneous arthritis." Arthritis Rheum 42(12): 2517-2523.
- Manz, R. A., G. Cassese, et al. (1999). "Long-lived plasma cells survive independent of antigen." Curr Top Microbiol Immunol 246: 71-74; discussion 74-75.
- Manz, R. A., A. E. Hauser, et al. (2005). "Maintenance of serum antibody levels." Annu Rev Immunol 23: 367-386.
- Manz, R. A. and A. Radbruch (2002). "Plasma cells for a lifetime?" Eur J Immunol 32(4): 923-927.
- Martin, F. and A. C. Chan (2004). "Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic." Immunity 20(5): 517-527.
- Masi, A. T., J. C. Aldag, et al. (2006). "Sex hormones and risks of rheumatoid arthritis and developmental or environmental influences." Ann N Y Acad Sci 1069: 223-235.
- Matsumoto, I., M. Maccioni, et al. (2002). "How antibodies to a ubiquitous cytoplasmic enzyme may provoke joint-specific autoimmune disease." Nat Immunol 3(4): 360-365.
- Matsumoto, I., A. Staub, et al. (1999). "Arthritis provoked by linked T and B cell recognition of a glycolytic enzyme." Science 286(5445): 1732-1735.
- Miossec, P. (2003). "Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy." Arthritis Rheum 48(3): 594-601.
- Morgan, K., R. B. Clague, et al. (1981). "Native type II collagen--induced arthritis in the rat: the effect of complement depletion by cobra venom factor." Arthritis Rheum 24(11): 1356-1362.
- Moxley, G. and S. Ruddy (1987). "Elevated plasma C3 anaphylatoxin levels in rheumatoid arthritis patients." Arthritis Rheum 30(10): 1097-1104.
- Nakae, S., A. Nambu, et al. (2003). "Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice." J Immunol 171(11): 6173-6177.
- Nandakumar, K. S. and R. Holmdahl (2005). "Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis." J Immunol Methods 304(1-2): 126-136.
- Nell, V. P., K. P. Machold, et al. (2005). "Autoantibody profiling as early diagnostic and prognostic tool for rheumatoid arthritis." Ann Rheum Dis 64(12): 1731-1736.
- Newton, J. L., S. M. Harney, et al. (2004). "A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis." Genes Immun 5(3): 151-157.
- Nguyen, H. V., S. C. Ludwig, et al. (2004). "Rheumatoid arthritis of the cervical spine." Spine J 4(3): 329-334.
- Pearson, C. M. (1956). "Development of arthritis, peri-arthritis and periostitis in rats given adjuvants." Proc Soc Exp Biol Med 91(1): 95-101.
- Piguet, P. F., G. E. Grau, et al. (1992). "Evolution of collagen arthritis in mice is arrested by treatment with anti-tumour necrosis factor (TNF) antibody or a recombinant soluble TNF receptor." Immunology 77(4): 510-514.
- Pincus, T., R. H. Brooks, et al. (1994). "Prediction of long-term mortality in patients with rheumatoid arthritis according to simple questionnaire and joint count measures." Ann Intern Med 120(1): 26-34.

- Pritzker, L. B., S. Joshi, et al. (2000). "Deimination of myelin basic protein. 2. Effect of methylation of MBP on its deimination by peptidylarginine deiminase." Biochemistry 39(18): 5382-5388.
- Rahman, J., J. Loh, et al. (1992). "Low-affinity antibodies against collagen type II produced by lymph node cells are associated with pathology in collagen-induced arthritis in rats." Clin Exp Immunol 88(3): 461-466.
- Rahman, J. and N. A. Staines (1991). "Contribution of the spleen, lymph nodes and bone marrow to the antibody response in collagen-induced arthritis in the rat." Clin Exp Immunol 85(1): 48-54.
- Ranges, G. E., S. Sriram, et al. (1985). "Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4." J Exp Med 162(3): 1105-1110.
- Read, J., J. Pearce, et al. (2001). "The crystal structure of human phosphoglucose isomerase at 1.6 Å resolution: implications for catalytic mechanism, cytokine activity and haemolytic anaemia." J Mol Biol 309(2): 447-463.
- Reynolds, J., J. Haxby, et al. (2009). "Identification of a nephritogenic immunodominant B and T cell epitope in experimental autoimmune glomerulonephritis." Clin Exp Immunol 155(2): 311-319.
- Rosloniec, E. F., K. B. Whittington, et al. (1996). "Identification of MHC class II and TCR binding residues in the type II collagen immunodominant determinant mediating collagen-induced arthritis." Cell Immunol 172(1): 21-28.
- Salomonsson, S., M. V. Jonsson, et al. (2003). "Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum 48(11): 3187-3201.
- Sasai, M., Y. Saeki, et al. (1999). "Delayed onset and reduced severity of collagen-induced arthritis in interleukin-6-deficient mice." Arthritis Rheum 42(8): 1635-1643.
- Schaller, M. M., W. Stohl, et al. (2004). "Elevated levels of anti-glucose-6-phosphate isomerase (GPI) IgG in serum and synovial fluid from patients with inflammatory arthritis." Ann Rheum Dis.
- Schubert, d. (2005). "Arthritisinduktion durch Immunität gegen ein systemisch exprimiertes Autoantigen – Untersuchung im Tiermodell und bei Patienten."
- Schubert, D., B. Maier, et al. (2004). "Immunization with glucose-6-phosphate isomerase induces T cell-dependent peripheral polyarthritis in genetically unaltered mice." J Immunol 172(7): 4503-4509.
- Schubert, D., M. Schmidt, et al. (2002). "Autoantibodies to GPI and creatine kinase in RA." Nat Immunol 3(5): 411; author reply 412-413.
- Sebbag, M., M. Simon, et al. (1995). "The antiperinuclear factor and the so-called antikeratin antibodies are the same rheumatoid arthritis-specific autoantibodies." J Clin Invest 95(6): 2672-2679.
- Sekine, H., H. Watanabe, et al. (2004). "Enrichment of anti-glomerular antigen antibody-producing cells in the kidneys of MRL/MpJ-Fas(lpr) mice." J Immunol 172(6): 3913-3921.
- Shaw, M. H., V. Boyartchuk, et al. (2003). "A natural mutation in the Tyk2 pseudokinase domain underlies altered susceptibility of B10.Q/J mice to infection and autoimmunity." Proc Natl Acad Sci U S A 100(20): 11594-11599.
- Shouda, T., T. Yoshida, et al. (2001). "Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis." J Clin Invest 108(12): 1781-1788.

- Simon, M., E. Girbal, et al. (1993). "The cytokeratin filament-aggregating protein filaggrin is the target of the so-called "antikeratin antibodies," autoantibodies specific for rheumatoid arthritis." J Clin Invest 92(3): 1387-1393.
- Slifka, M. K. and R. Ahmed (1998). "Long-lived plasma cells: a mechanism for maintaining persistent antibody production." Curr Opin Immunol 10(3): 252-258.
- Solomon, S. (2003). Role of pathogenic auto-antibodies and innate immunity mediators in K/BxN murine model for rheumatoid arthritis. Universität Konstanz. Konstanz, Universität Konstanz.
- Steiner, G., K. Hartmuth, et al. (1992). "Purification and partial sequencing of the nuclear autoantigen RA33 shows that it is indistinguishable from the A2 protein of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex." J Clin Invest 90(3): 1061-1066.
- Steiner, G. and J. Smolen (2002). "Autoantibodies in rheumatoid arthritis and their clinical significance." Arthritis Res 4 Suppl 2: S1-5.
- Steward, M. W., F. E. Katz, et al. (1975). "The role of low affinity antibody in immune complex disease. The quantity of anti-DNA antibodies in NZB/W F1 hybrid mice." Clin Exp Immunol 21(1): 121-130.
- Tada, Y., A. Ho, et al. (1996). "Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8+ T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis." J Immunol 156(11): 4520-4526.
- Tak, P. P., E. W. Thurkow, et al. (1995). "Expression of adhesion molecules in early rheumatoid synovial tissue." Clin Immunol Immunopathol 77(3): 236-242.
- Tengner, P., A. K. Halse, et al. (1998). "Detection of anti-Ro/SSA and anti-La/SSB autoantibody-producing cells in salivary glands from patients with Sjogren's syndrome." Arthritis Rheum 41(12): 2238-2248.
- Terato, K., K. A. Hasty, et al. (1985). "Collagen-induced arthritis in mice. Localization of an arthritogenic determinant to a fragment of the type II collagen molecule." J Exp Med 162(2): 637-646.
- Terato, K., K. A. Hasty, et al. (1992). "Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen." J Immunol 148(7): 2103-2108.
- Thorbecke, G. J., R. Shah, et al. (1992). "Involvement of endogenous tumor necrosis factor alpha and transforming growth factor beta during induction of collagen type II arthritis in mice." Proc Natl Acad Sci U S A 89(16): 7375-7379.
- Tilney, N. L. (1971). "Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat." J Anat 109(Pt 3): 369-383.
- Tisch, R. and H. McDevitt (1996). "Insulin-dependent diabetes mellitus." Cell 85(3): 291-297.
- Trentham, D. E., A. S. Townes, et al. (1977). "Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis." J Exp Med 146(3): 857-868.
- Tureson, C., D. J. Schaid, et al. (2005). "The impact of HLA-DRB1 genes on extra-articular disease manifestations in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther 7(6): R1386-1393.
- van Boekel, M. A., E. R. Vossenaar, et al. (2002). "Autoantibody systems in rheumatoid arthritis: specificity, sensitivity and diagnostic value." Arthritis Res 4(2): 87-93.
- Van Boxel, J. A. and S. A. Paget (1975). "Predominantly T-cell infiltrate in rheumatoid synovial membranes." N Engl J Med 293(11): 517-520.
- van den Berg, W. B., L. A. Joosten, et al. (1994). "Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment." Clin Exp Immunol 95(2): 237-243.

- van der Lubbe, P. A., B. A. Dijkmans, et al. (1995). "A randomized, double-blind, placebo-controlled study of CD4 monoclonal antibody therapy in early rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 38(8): 1097-1106.
- Verheijden, G. F., A. W. Rijnders, et al. (1997). "Human cartilage glycoprotein-39 as a candidate autoantigen in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum 40(6): 1115-1125.
- Wahl, S. M. (1994). "Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly." J Exp Med 180(5): 1587-1590.
- Wandstrat, A. and E. Wakeland (2001). "The genetics of complex autoimmune diseases: non-MHC susceptibility genes." Nat Immunol 2(9): 802-809.
- Watanabe, H., K. Takehana, et al. (1996). "Tumor cell autocrine motility factor is the neuroleukin/phosphohexose isomerase polypeptide." Cancer Res 56(13): 2960-2963.
- Watson, W. C. and A. S. Townes (1985). "Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis. Proposed relationship to the IgG2 autoantibody subclass response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non-MHC loci." J Exp Med 162(6): 1878-1891.
- Weiser, A. A., M. Or-Guil, et al. (2005). "SPOT synthesis: reliability of array-based measurement of peptide binding affinity." Anal Biochem 342(2): 300-311.
- Williams, R. O., M. Feldmann, et al. (1992). "Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A 89(20): 9784-9788.
- Wipke, B. T. and P. M. Allen (2001). "Essential role of neutrophils in the initiation and progression of a murine model of rheumatoid arthritis." J Immunol 167(3): 1601-1608.
- Wipke, B. T., Z. Wang, et al. (2002). "Dynamic visualization of a joint-specific autoimmune response through positron emission tomography." Nat Immunol 3(4): 366-372.
- Wolfe, F. and D. J. Hawley (1998). "The longterm outcomes of rheumatoid arthritis: Work disability: a prospective 18 year study of 823 patients." J Rheumatol 25(11): 2108-2117.
- Wooley, P. H., J. Dutcher, et al. (1993). "Influence of a recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor FC fusion protein on type II collagen-induced arthritis in mice." J Immunol 151(11): 6602-6607.
- Wooley, P. H., H. S. Luthra, et al. (1981). "Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates." J Exp Med 154(3): 688-700.
- Wooley, P. H., J. R. Seibold, et al. (1989). "Pristane-induced arthritis. The immunologic and genetic features of an experimental murine model of autoimmune disease." Arthritis Rheum 32(8): 1022-1030.
- Xu, W., K. Seiter, et al. (1996). "The differentiation and maturation mediator for human myeloid leukemia cells shares homology with neuroleukin or phosphoglucose isomerase." Blood 87(11): 4502-4506.
- Zinkernagel, R. M., S. Ehl, et al. (1997). "Antigen localisation regulates immune responses in a dose- and time-dependent fashion: a geographical view of immune reactivity." Immunol Rev 156: 199-209.
- Ziolkowska, M., A. Koc, et al. (2000). "High levels of IL-17 in rheumatoid arthritis patients: IL-15 triggers in vitro IL-17 production via cyclosporin A-sensitive mechanism." J Immunol 164(5): 2832-2838.

## Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas Kamradt bedanken, der mir durch kontinuierliche Anregungen und Hilfestellungen die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt David Schubert, der mir bei dieser Arbeit stets mit Rat und Tat mit vollem Einsatz zur Seite stand und mich in die verschiedenen Methoden eingewiesen hat.

Dr. Rudolf Volkmer-Engert und seinem Laborteam danke ich für die gute Zusammenarbeit und für die enorme Hilfsbereitschaft.

Ich möchte mich auch bei Herrn Prof. Rudolf Manz bedanken, der immer offen für Diskussionen war und mir unzählige wissenschaftliche Anregungen gegeben hat.

Zu Dank bin ich auch Gabriele Fernahl und Janine Karle verpflichtet, die für mich Gewebeschnitte angefertigt haben. Dr. Lars Morawitz und Prof. Veit Krenn danke ich für die histologische Beurteilung der Gewebeschnitte.

Den „Kamradts“ danke ich für eine wunderschöne Zeit im DRFZ. Insbesondere möchte ich mich bei Thordis Hohnstein bedanken, die mir zu jeder Tages- und Nachtzeit sowie an zahlreichen Wochenenden im Labor tatkräftig zur Seite stand. Lisa Bruns danke ich für das Korrekturlesen und für ihre zahlreichen konstruktiven Ideen. Danken möchte ich auch Arne, Verena, Ati und Ben für die vielen gemeinsamen Mittags- und Kaffeepausen im DRFZ.

Patrick Müller und Mama Dimroth danke ich für das Korrekturlesen.

Alexander Kowski danke ich für die vielen aufmunternden Worte und Unterstützung während meiner Promotionszeit.

Bei meinen Freunden möchte ich mich für die langjährige Freundschaft bedanken.



Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen mit viel Liebe unterstützt hat. Insbesondere möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Studium und die Durchführung der Doktorarbeit erst ermöglicht haben.

어린시절부터 늘 사랑과 관심으로 제 인생의 든든한 지원자가 되어주신 어머님과 아버님께 감사의 말씀을 올립니다. 언제나 정신적으로 든든한 버팀목이 되어주신 어머님과 힘든시절을 겪으시면서도 늘 자식의 그늘진 곳에서 뒷받침이 되어주신 아버님이 계시지 않았더라면 오늘날 제가 이 자리에 있을수 없었을 것 입니다. 이제까지 예쁘게 길러주시고 아낌없이 저를 물심양면으로 지원해주신 부모님께 다시 한번 감사의 말씀을 올립니다.

In gleicher Weise möchte ich mich bei Jonas Dimroth für die liebevolle Unterstützung und für das Korrekturlesen der Arbeit bedanken.

## **Lebenslauf**

***Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.***

Jae-Yun Lee

Berlin, den 03.12.2010

## **Eidesstattliche Erklärung**

„Ich, Jae -Yun Lee, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Analyse der B-Zellantwort im Modell der Glukose-6-Phosphat-Isomerase-induzierten Arthritis“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Jae -Yun Lee