

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen  
Abteilung I  
(Schwerpunkte: Allgemeine Pädiatrie, Hämatologie/Onkologie)  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. R. Handgretinger

**Einfluss von anti-CD137 auf die Induktion und den  
Verlauf der Collagen-induzierten Arthritis**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von**

**OLIVER HEINZ DIEZ**

**aus Nürtingen**

**2007**

Dekan:

Prof. Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. G. Dannecker

2. Berichterstatter:

Frau Privatdozentin Dr. I. Kötter

**meiner Familie in Liebe**

„Damit das Mögliche entsteht, muß immer wieder das Unmögliche versucht werden.“

(Hermann Hesse)

---

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Rheumatoide Arthritis und juvenile Arthritis	1
1.2 Collagen induzierte Arthritis als experimentelles Modell der RA / JIA	4
1.2.1 Immunpathogenese der Collagen-induzierten Arthritis	4
1.2.1.1 Aktivierung der T-Zellen und ihre Bedeutung in der Induktion von CIA	6
1.3 T-Zellen-Kostimulation über das CD137-Molekül. Verwendung eines agonistischen, monoklonalen anti-CD137-Antikörpers als Immuntherapie in Tiermodellen	9
1.4 Fragestellung	11
2. Material und Methoden	12
2.1 Material	12
2.1.1 Grundausstattung	12
2.1.2 zusätzliches Material für die Collagen-induzierte Arthritis und Antikörperbehandlung	13
2.1.3 zusätzliches Material für die Serumgewinnung und ELISA-Analyse	14
2.1.4 zusätzliches Material für die Histologie und Durchflußzytometrie.	15
2.1.5 Firmenadressen	17
2.2 Methoden	18
2.2.1 Induktion einer Collagen-induzierten Arthritis in DBA/1J-Mäusen	19
2.2.1.1 Haltungsbedingungen für die Versuchstiere	19
2.2.1.2 Vorbereitung der Collagen-Emulsion	19
2.2.1.3 Immunisierung der Mäuse	19
2.2.1.4 Antikörper-Injektionen	20

---

2.2.1.5	Bestimmung der Arthritis . . . . .	21
2.2.2	Bestimmung der anti-CII-Antikörper-Titer . . . . .	22
2.2.2.1	Gewinnung des Serums . . . . .	22
2.2.2.2	ELISA-Testprinzip . . . . .	22
2.2.2.3	ELISA zur anti-CII-Antikörper-Bestimmung . . . . .	23
2.2.3	Histologie der Gelenke . . . . .	25
2.2.4	Immunfluoreszenzfärbung und Durchflußzytometrie . . . . .	25
2.2.4.1	Zellgewinnung und -aufbereitung . . . . .	25
2.2.4.2	Prinzip der direkten Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	26
2.2.4.3	Prinzip der Durchflußzytometrie . . . . .	27
2.2.4.4	Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächen- moleküle auf Splenozyten . . . . .	28
2.2.4.5	FACS-Messung und Analyse . . . . .	29
3.	Ergebnisse . . . . .	31
3.1	Einfluss der anti-CD137-Antikörper-Behandlung auf die Induktion und den Verlauf der CIA. Klinische Befunde und Bestimmung der anti-CII-IgG-Produktion . . . . .	31
3.1.1	dreimalige Gabe des anti-CD137-Antikörpers . . . . .	31
3.1.2	einmalige Gabe des anti-CD137-Antikörpers . . . . .	34
3.1.3	Wiederimmunisierung von anti-CD137-Antikörper behandelten Mäusen mit bCII . . . . .	36
3.1.4	Verzögerte Verabreichung des anti-CD137-Antikörpers nach der CIA-Induktion . . . . .	37
3.1.4.1	Verabreichung des anti-CD137-Antikörpers am Tag 14 nach der ersten bCII-Injektion . . . . .	37
3.1.4.2	Verabreichung des anti-CD137-Antikörpers zum Zeitpunkt des Ausbruches der Erkrankung . . . . .	38
3.2	Histopathologische Befunde . . . . .	41
3.3	FACS-Analyse der Splenozyten . . . . .	42
4.	Diskussion . . . . .	45

---

5. Zusammenfassung .....	52
6. Literaturverzeichnis .....	54
7. Glossar .....	66
Erklärung nach § 6 Absatz 2 der Promotionsordnung der Uni. Tübingen . . .	69
Danksagung .....	70
Lebenslauf .....	71

---

## 1. Einleitung

### 1.1 Rheumatoide Arthritis und Juvenile Idiopathische Arthritis

Die Arthritis zählt zu den häufigsten Erkrankungen des Menschen. Mit einer Prävalenz von etwa 1% stellt die rheumatoide Arthritis (RA) die am häufigsten vorkommende, entzündliche Gelenkerkrankung dar (88). In Deutschland wird die Anzahl der RA-Patienten auf ca. 1 Million geschätzt. Die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) ist die häufigste rheumatische Erkrankung bei Kindern aller Altersstufen in Deutschland mit einer geschätzten Inzidenz von 750 - 900 Neuerkrankungen pro Jahr und einer Prävalenz von 3.600 – 4.350 Kindern und Jugendlichen unter 16 Jahren per annum (107).

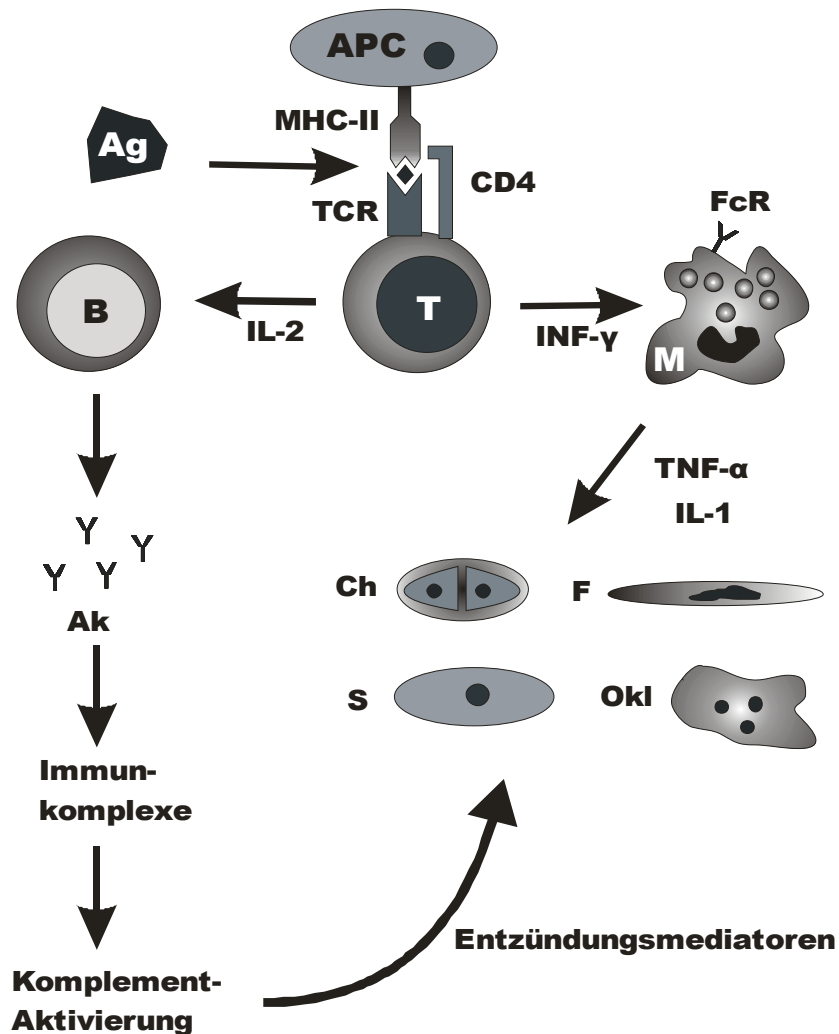
Die komplexe Pathogenese dieser Autoimmunerkrankungen ist nur zum Teil bekannt. Bei Autoimmunerkrankungen richtet sich die Aktivität des Immunsystems gegen körpereigene Strukturen durch Ausbildung von Autoantikörpern. Autoimmunerkrankungen sind durch eine falsche Programmierung des Immunsystems gekennzeichnet. Genetische (MHC: Haupt-Histokompatibilitätskomplex, engl.: major histocompatibility complex) und exogene Faktoren spielen, nicht nur in der Auslösung, sondern auch in der Chronifizierung der RA eine Rolle. Das Genprodukt der MHC-Klasse II-Gene wird in drei Isotypen eingeteilt: HLA-DR, HLA-DQ und HLA-DP (engl.: human leuocyte antigen, HLA). Die Allele HLA-DRB1\*0401 und HLA-DRB1\*0404 sind sehr stark mit der Entstehung der RA assoziiert (111). Bei der RA werden zusätzlich neben den immunologischen Faktoren geschlechtsspezifische Faktoren diskutiert (25). Man nimmt an, dass je nach genetischem Hintergrund virale oder bakterielle Antigene als Auslöser der RA dienen können.

Das Zusammenspiel der genetischen Veranlagung, der Umweltfaktoren (z.B. Infektionserreger) und bisher nicht definierten Regulationsmechanismen wird im pathophysiologischen Geschehen der RA anerkannt (111). Im Gelenk wird ein

---

unbekanntes Antigen von den Antigen-präsentierenden Zellen (engl.: antigen-presenting cells, APCs) mit Hilfe von MHC-Klasse-II-Molekülen den CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten präsentiert. Es folgt eine Aktivierung dieser Zellen mit Freisetzung von Zytokinen (IL-2, IFN- $\gamma$ ), was zu einer B-Zell-Proliferation und Antikörperbildung sowie Monozyten/Makrophagen-Stimulierung führt. Die aktivierten Monozyten/Makrophagen setzen proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , IL-1) frei, die eine Aktivierung von Synovialzellen, Fibroblasten, Endothelzellen und Osteoklasten auslösen. Es kommt zur Gelenkentzündung. Die Freisetzung von matrixabbauenden Enzymen (Matrixmetalloproteinasen, Kollagenasen), Zytokinen (IL-8, IL-15, IL-16) und Adhäsionsmolekülen (ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1) steigert den Entzündungsprozess und verursacht Knorpel- und Knochenzerstörung (Abb. 1).





**Abb.1: Induktion und Pathogenese der Rheumatoiden Arthritis.** Ein unbekanntes, exogenes Antigen (**Ag**) löst im Gelenk bei einem genetisch empfindlichen Individuum eine antigenabhängige Immunantwort aus. Durch Prozessierung und Präsentation des arthritogenen Peptides bei Antigen-präsentierenden Zellen (**APCs**), z.B.: Synovialzellen, werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen (**T**) aktiviert und diese stimulieren via IL-2 und INF-γ B-Lymphozyten (**B**) und Makrophagen (**M**). Es kommt zur Inflammation des Gelenkspaltes. Die B-Zellen produzieren Antikörper (**Ak**), insbesondere Rheumafaktoren, was in einer Komplementaktivierung endet. Makrophagen (**M**) schütten pro-inflammatorische Zytokine aus (TNF-α, IL-1), welche zu einer Stimulierung der ortsständigen mesenchymalen Zellen führt. Die Proliferation und Aktivierung der Synovialzellen (**S**), Fibroblasten (**F**), Endothelzellen, Chondrozyten (**Ch**), und Osteoklasten (**Okl**) ruft Synovitis, Pannusbildung, Knorpelzerstörung und Knochenresorption hervor.

## **1.2 Collagen induzierte Arthritis als experimentelles Modell der RA / JIA**

Die Collagen induzierte Arthritis (CIA) wurde bereits 1977 von Trentham und Mitarbeitern in Ratten beschrieben (104). Das Mausmodell der CIA wurde 1980 etabliert (13). Dieses experimentelle Arthritismodell wird für Pathogenese-Studien und für die Entwicklung von Therapien verwandt.

Die CIA ist eine Autoimmunarthritis, die durch Injektion von heterologem (13, 91, 114) oder autologem Typ-II-Collagen (CII) (32, 34) ausgelöst wird. Collagen II ist ein knorpelspezifisches Protein, das die Druckresistenz der Gelenkknorpel bestimmt. Die Immunisierung mit Collagen II und Freund'schem Adjuvant ruft eine schnelle und schwere Polyarthritis der Gelenke in Extremitäten von Mäusen hervor, die 3 bis 4 Wochen nach der Immunisierung klinisch sichtbar wird. Die Mäuse entwickeln neben anderen Autoimmunphänomenen eine Rheumafaktor-positive, erosive Arthritis, die in vielen Merkmalen Ähnlichkeiten zur RA aufweist (31, 70, 92). Histopathologische Befunde wie z.B. Fibrinanlagerung, Hyperplasie von Synoviozyten mit Bildung eines Pannus, Makrophageninfiltration, Hyperplasie und Immigration von Lymphozyten, Knorpel- und Knochendestruktion sind wie bei der RA im CIA Modell beschrieben worden (13, 104).

### **1.2.1 Immunpathogenese der Collagen-induzierten Arthritis**

An CIA erkranken nur Mäuse mit bestimmten MHC-II-Haplotypen (H-2<sup>q</sup> und H-2<sup>r</sup>) (35, 109, 114, 115). Da für die Antigenpräsentation eine Bindung und Interaktion zwischen dem MHC-Klasse-II-Molekül auf APCs und dem CD4-Molekül (engl.: cluster of differentiation, CD) der T-Zellen erforderlich ist, sind die CII-reaktiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen von zentraler pathogenetischer Bedeutung in der Entstehung von CIA. Die CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben bei der CIA eine initiale bzw. regulative Rolle. Für die CIA-Auslösung sind CD8<sup>+</sup> T-Zellen nötig, ebenso für die Verhinderung einer sekundären Induktion der Erkrankung (97).

---

Beobachtungen, dass die Behandlung zur Zeit der CII-Immunisierung mit monoklonalen Antikörpern gegen das CD4-Molekül (8, 59, 78), den T-Zell-Rezeptor- $\alpha\beta$  (7, 68, 117), den Interleukin-2-Rezeptor (CD25) (2) und das CD28-Molekül (110) die Entwicklung der Arthritis unterdrückt, beweisen die Rolle der T-Zellen in der Induktion der Erkrankung.

Für die Übertragung von CIA in SCID-Mäuse (engl.: severe combined immunodeficiency) oder syngene T-Zell-depletierte DBA/1-Mäuse sind sowohl T-Zellen als auch anti-CII-Antikörper für die Krankheitsauslösung erforderlich (83, 102, 113).

Die Ausbildung von anti-CII-spezifischen Antikörpern durch B-Zellen ist assoziiert mit Gelenkschäden (33, 90, 91, 96, 103, 115). Die CII-Immunisierung in DBA/1-Mäusen führt zu einer schnellen Aktivierung der B-Zellen und einer CII-spezifischen-Antikörper-Produktion (32, 35, 91), besonders von Komplement-fixierenden Antikörpern der IgG2a-Subklasse (109). Es ist zu vermuten, dass die Bindung von Komplement-aktivierenden IgG-Autoantikörpern mit dem Collagen II des Gelenkknorpels eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Entzündungsprozesses im Gelenk spielt. Untersuchungen bei Fc $\gamma$ -Rezeptor-knock-out-DBA/1-Mäusen zeigten, dass in Abwesenheit von Fc $\gamma$ R-I und Fc $\gamma$ R-III-Rezeptoren, trotz einer CII-Immunisierung mit zellulärer Immunantwort und Ausbildung CII-spezifischer Antikörper, die Arthritis unterdrückt werden konnte (47). In diesem Modell ist die Bindung von IgG-Immunkomplex an Fc-Rezeptoren der Phagozyten unterbrochen und damit die Antikörper-abhängige, zytotoxische Immunantwort durch natürliche Killer-Zellen (engl.: natural killer, NK) verhindert worden.

Für die Induktion einer schweren CIA ist es notwendig, sowohl mit Collagen II als auch mit komplettem Freund'schen Adjuvant (engl.: complete Freund's

---

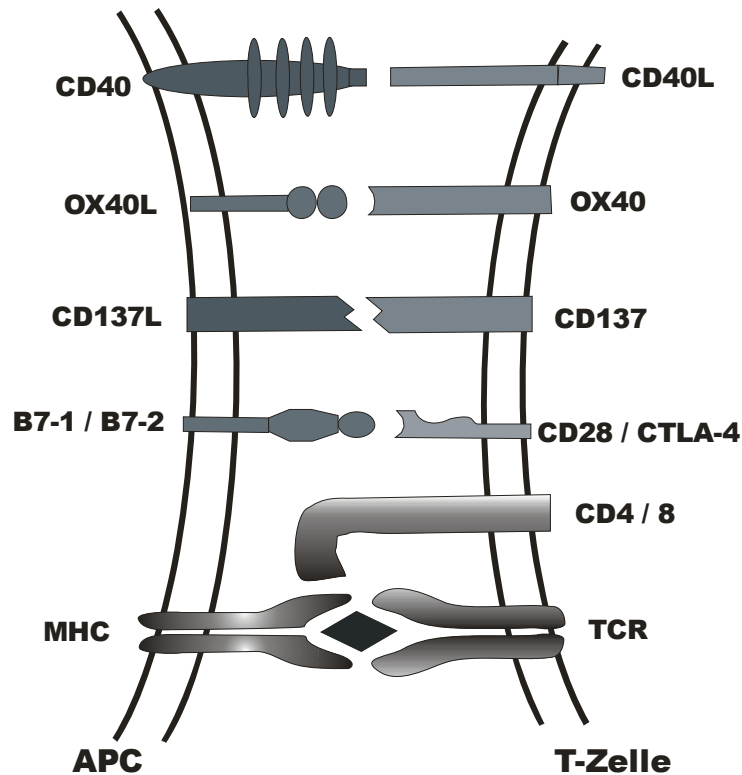
Adjuvant, CFA) zu immunisieren. Die Ko-Immunisierung mit CFA begünstigt die Differenzierung der T-Zellen in Th1-Zellen (engl.: T helper cell clone 1) (61). Bei DBA/1-Mäusen ist die Th1-Immunantwort mit der assoziierten Interferon- $\gamma$ -Freisetzung und IgG2a-Antikörper-Produktion verantwortlich für den Entzündungsprozess und die Induktion der Arthritis (74). Die Produktion von Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) zeigt außerdem eine regulative Funktion und damit eine paradoxe Rolle in der Pathogenese der CIA (3, 58, 105).

Zusammenfassend wird angenommen, dass die CII/CFA-Immunisierung in H2<sup>q</sup>-Mäusen eine Differenzierung der T-Zellen in Th1-Zellen bewirkt. Infolge der IFN- $\gamma$ -Freisetzung wird bei CII-spezifischen, aktivierten B-Zellen ein Immunglobulin-Klassen-Switch induziert und die IgG2a-Antikörper-Produktion begünstigt. Die Bildung von IgG2a-CII-Immunkomplexen im Gelenk aktiviert Komplement, das wiederum eine höhere Durchlässigkeit der Endothelkapillarwände bewirkt und die Einwanderung aktivierter T-Zellen, Monozyten und Granulozyten begünstigt. Die von aktivierten Makrophagen freigesetzten Zytokine (TNF- $\alpha$  und IL-1) locken weitere Zellen in den Gelenkspalt und führen zu einer Freisetzung von Prostaglandinen und Kollagenase bei Chondrozyten, Fibroblasten und Synoviozyten mit der Folge einer Knorpeldestruktion (57).

#### 1.2.1.1 Aktivierung der T-Zellen und ihre Bedeutung in der Induktion von CIA

Die Entwicklung der CIA ist abhängig von der Aktivierung von T-Zellen (36). Für ihre vollständige Aktivierung benötigen T-Zellen zwei Signale: ein Signal wird durch den T-Zell-Rezeptor (engl.: T-cell-receptor, TCR) induziert und das andere durch Kostimulation (4). Neben dem TCR tragen die T-Zellen das CD4- oder das CD8-Molekül auf ihrer Oberfläche. Diese Moleküle vermitteln die Bindung und Interaktion mit dem MHC-Antigen-Komplex der APCs und B-Zellen. Kostimulatorische Signale werden durch die physikalische Interaktion

zwischen Oberflächenmolekülen auf T-Zellen und APCs ausgelöst (50) (Abb. 2).



**Abb. 2: T-Zell-APC-Interaktion.** Für die vollständige T-Zell-Aktivierung sind Signale über den T-Zell-Rezeptor und über die kostimulatorischen Moleküle unentbehrlich.

Kostimulatorische Rezeptoren werden in zwei Gruppen eingeteilt (14, 84). Eine Gruppe gehört der IgG-Superfamilie an und schließt CD28- und ICOS- (engl.: *inducible co-stimulator*) Moleküle ein. Die zweite Gruppe ist durch verschiedene Moleküle - CD27, CD30, CD40, CD134 (OX40), CD137 (4-1BB) – repräsentiert, die der TNFR/TNF- (engl.: *tumor necrosis factor receptor*, TNFR) Superfamilie angehören.

Die Kostimulation über B7-1/B7-2 auf APCs und CD28/CTLA4 (engl.: *cytotoxic T lymphocyte antigen 4*) auf T-Zellen spielt eine entscheidende Rolle in der

---

Regulation der T-Zellaktivierung (43). Eine Bindung von B7-1/B7-2 an CD28 ist ein starkes, kostimulatorisches Signal für T-Zellen, was zu einer Produktion von Interleukin-2 (IL-2) und dem Überleben von primären T-Zellen führt. Der T-Zellrezeptor CTLA4 wird hauptsächlich auf aktivierten T-Zellen exprimiert. Da er eine höhere Affinität gegenüber B7-1/B7-2 aufweist, blockiert CTLA4 die Interaktion von CD28 und löst damit hemmende Signale aus. Durch die intraperitoneale Gabe von CTLA4-Ig (CTLA4-Immunglobulin) zum Zeitpunkt der CII-Immunisierung konnte bei Mäusen die CIA verhindert werden (110). CD28-defiziente Mäuse zeigten sich resistent gegenüber der Induktion einer CIA und wiesen nur eine geringe T-Zellantwort gegenüber CII mit niedrigen IgM- und IgG-anti-CII-Antikörperspiegeln auf (98).

Die Blockade der TNFR-Kostimulation verspricht eine therapeutische Möglichkeit gegen Autoimmunerkrankungen zu sein. Die Interaktion zwischen dem Oberflächenmolekül OX40L (engl.: OX40 ligand) auf aktivierten APCs (aktivierte B-Zellen, dendritische und endotheliale Zellen) und OX40 (CD134) auf aktivierten T-Zellen löst ein kostimulatorisches Signal aus, das zu einer T-Zell-abhängigen Antikörper-Produktion führt. Eine Blockade der Interaktion OX40/OX40L durch die Gabe von monoklonalen anti-OX40L-Antikörpern (engl.: monoclonal antibodies, mAb) hemmt die T-Helfer-1-Immunantwort (Th1) und die IFN- $\gamma$ -Freisetzung. Folglich wurde die CII-spezifische IgG2a-Antikörper-Produktion stark unterdrückt und die Entwicklung einer schweren Arthritis deutlich verhindert (118).

Ein anderes Oberflächenmolekül, CD154 (CD40L), wurde besonders im Hinblick auf seinen immunmodulatorischen Effekt eingehend untersucht. Sein Ligand, CD40, befindet sich auf B- und dendritischen Zellen. Die Hemmung der Kostimulation mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD154 verhinderte die Induktion von CIA (18). Dagegen führte die Gabe eines agonistischen Antikörpers gegen CD40 zu einer Verstärkung der Immunantwort (17). Die

Beobachtung, dass durch die Gabe eines agonistischen anti-CD40-Antikörpers die Ausprägung von CIA deutlich reduziert werden kann, wurde durch eine Änderung des Zytokinmusters zugunsten von Th2-Zytokinen wie z.B. IL-10 oder IL-4 erklärt (60).

### **1.3 T-Zell-Kostimulation über das CD137-Molekül. Verwendung eines agonistischen, monoklonalen anti-CD137-Antikörpers als Immuntherapie in Tiermodellen**

Der kostimulatorische Rezeptor CD137 (4-1BB) gehört der TNF-Rezeptor-Familie an und wird auf aktivierten T-Zellen, natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen), Monozyten, Neutrophilen, dendritischen Zellen und regulatorischen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert (22, 24, 30, 63, 65, 66, 76, 77, 112). Sein natürlicher Ligand, der CD137-Ligand (CD137L, 4-1BBL) findet sich vor allem auf APCs wie z.B. dendritischen Zellen (15), aktivierten B-Zellen und Makrophagen (76, 106). Die Kostimulation durch Bindung des Liganden an CD137 führt zur starken Aktivierung von CD4<sup>+</sup> (27) und vor allem CD8<sup>+</sup> T-Zellen (86, 106).

Der CD137-Rezeptor ist einer der wenigen kostimulatorischen Rezeptoren, die eine starke IL-2-Produktion bei ruhenden T-Zellen in der Abwesenheit von CD28 auslösen können (9, 15, 106). Erfolgt ein schwaches erstes Signal über den TCR, ist die Kostimulation über CD137 nicht so effektiv wie eine CD28-Kostimulation bei der Induktion der IL-2-Produktion (82). Es wird deswegen angenommen, dass CD137 seine Rolle in der T-Zellaktivierung nach CD28 übernimmt und für die Aufrechterhaltung der Immunantwort verantwortlich ist. Insbesondere dann wenn CD28 bereits herunterreguliert wurde (46). Die CD137-Kostimulation schützt T-Zellen vor einem Zelltod nach Aktivierung (engl.: activation-induced cell death, AICD) (38, 99).

---

Die Gabe eines agonistischen, monoklonalen Antikörpers gegen den CD137-T-Zellrezeptor (anti-CD137, anti-4-1BB) verstärkt die zellvermittelte Immunität und Wirkung von antigen-spezifischen, zytotoxischen T-Zellen (engl.: cytotoxic T lymphocytes, CTLs) bei der Stimulierung der IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -Produktion. Diese Eigenschaft ist von großer Bedeutung in der antiviralen (29, 100, 101), antibakteriellen (51) und in der Tumor-Therapie (64, 66, 86, 116). Andererseits wird mit der anti-CD137-Gabe die humorale Immunantwort gegen T-zellabhängige Antigene verhindert (67), wobei die Funktion der B-Zellen unbeeinflusst bleibt. Der immunsuppressive Effekt von anti-CD137 ist lang anhaltend und unabhängig von zirkulierenden Antikörpern. Diese Wirkung könnte durch die Aktivierung regulativer CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelt werden, die eine Anergie von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen bewirken und somit die Produktion von spezifischen Antikörpern indirekt beeinflussen (67). Die Verabreichung des agonistischen anti-CD137-Antikörpers vor oder nach antigenspezifischer T-Zellaktivierung ist der entscheidende Faktor, um eine Hemmung oder eine Stimulation der vollständigen T-Effektorzell-Aktivierung zu erreichen (20, 93).

Die erfolgreiche anti-CD137-Therapie bei CD4<sup>+</sup> T-Zell - und B-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen wurde in verschiedenen Tiermodellen gezeigt. In murinen Modellen des systemischen Lupus erythematodes (SLE) konnte die Entstehung eines spontanen SLE durch die Gabe eines agonistischen anti-CD137-Antikörpers verhindert oder die Erkrankung verbessert werden (20, 94). Die Injektion von humanisierten anti-CD137-Antikörpern in Primaten hemmte die Entwicklung einer T-Zell-abhängigen, humoralen Immunantwort (37). Ferner konnte durch die Behandlung mit anti-CD137-Antikörper im murinen EAE-Modell (engl.: experimental autoimmune encephalomyelitis) eine Enzephalitis erfolgreich unterdrückt werden (95).



#### **1.4 Fragestellung**

In der vorliegenden Arbeit soll der Einfluss eines agonistischen anti-CD137-Antikörpers auf die Induktion und den Verlauf der Collagen-induzierten Arthritis untersucht werden. Insbesondere die Tatsache, dass die Gabe eines agonistischen anti-CD137-Antikörpers T-Helfer-Zellen und damit die humorale Immunantwort hemmt, wirft die Frage auf, welche Auswirkungen dieser Antikörper auf die Pathogenese und den Verlauf von CIA hat.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Grundausrüstung

- GERÄTE

Eismaschine Scottsman EME 8045 on BH 800	U.S. ICE MACHINE
Gefrierschrank – 20°C, GS 5203 Index 11, S20L	LIEBHERR
Kühlschrank 4 – 8°C , FKU 1800 Index 11-001	LIEBHERR
Mikroskop Olympus IX 50	OLYMPUS
Neubauer Zählkammer	SUPERIOR MARIENFELD
pH – Meter GPHR 1400	GREISINGER
Photokamera Olympus Camedia, 2.1 Mio. Pixel	OLYMPUS
Pipetboy plus	INTEGRA
Pipetman P10, 0.5 – 10 µl	GILSON
Pipetman P1.000, 100 – 1000 µl	GILSON
Pipetman P100, 20 – 100 µl	GILSON
Pipetman P200, 20 – 200 µl	GILSON
Schüttler Heidolph Titramax 1000	HEIDOLPH
Sterilbank Hera Safe Typ H Klasse II 50048712	HERAEUS
Vortexer Heidolph Reax top	HEIDOLPH
Zentrifuge Centrifuge 5415 C	EPPENDORF
Zentrifuge Rotixa 50 RS	HETTICH

- VERBRAUCHSMATERIALIEN

Kanülensammelbox, Medibox	BRAUN
Pasteurpipetten, ungestopft	WU
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1.000 µl, steril	GREINER

---

Plastikpipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml, steril	GREINER
Plastikröhrchen 15 ml, 50 ml, steril	FALCON

- REAGENZIEN

Ethanol 70 %	UNI.-APOTHEKE TÜBINGEN
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ohne Ca <sup>2+</sup> / Mg <sup>2+</sup> (engl.: phosphate buffered saline, PBS)	BIOCHROME
fötale Kälberserum (engl.: fetal calf serum, FCS)	BIOCHROME

### **2.1.2 zusätzliches Material für die Collagen-induzierte Arthritis und Antikörper-Behandlung**

- TIERE

DBA1/JBom-Mäuse (H-2 <sup>q</sup> ), männlich, 8 – 12 Wochen alt	M & B A/S
--	-----------

- GERÄTE

Tierkäfige Tecniplast 1284 L	TECNIPLAST
Belüftungssystem Top-Flow-1VC-System	TECNIPLAST
Wasserflaschen, 400 ml	TECNIPLAST
Feinwaage Kern 462-41	KERN
Messgerät Oditest S5010	KROEPLIN
<u>Mäusehalter:</u>	
Spritze Omnifix, 50 ml (abgeschnittener Luer Lock, ohne Stempel, mit angebrachten Luftschlitzen)	BRAUN
Glasspritzen 1 ml mit Luer Lock	SIGMA-ALDRICH

- VERBRAUCHSMATERIALIEN

Streu sniff bedding S8/15	SNIFF
Standardnahrung	SNIFF
Dreiwegehahn Discofix, steril	BRAUN
Kanülen, steril, 19 G, 27 G, 30 G	BECTON DICKINSON
Spritzen, Omnifix-F, Tuberkulin 0.01 ml / 1 ml, steril	BRAUN
Softasept N (250 ml Sprühflasche)	BRAUN

- REAGENZIEN

bovines Typ-II-Collagen, 10 mg lyophilisiert	CHONDREX
Essigsäure (0.05 M)	MERCK
Komplettes Freund'sches Adjuvant (CFA), 0.5 mg / ml Mycobacterium tuberculosis	GIBCO

- ANTIKÖRPER \*

- monoklonaler Ratte-anti-Maus-Antikörper anti-CD137 (Klon 3H3), Typ IgG<sub>2a</sub>
  - monoklonaler Ratte-anti-Mensch-Antikörper anti-CD137 (Klon 9D6), Typ IgG<sub>2a</sub>
- \*Beide Antikörper wurden freundlicherweise von Herrn Prof. Robert Mittler, (Department of Surgery and Emory Vaccine Center, Emory University School of Medicine, Atlanta, GA, U.S.A.) zur Verfügung gestellt.

### **2.1.3 zusätzliches Material für die Serumgewinnung und ELISA-Analyse**

- GERÄTE

Rotlichtlampe intensiv Infrarotlampe IL-20	BEURER
Multipipette Transferpipette – 8 (20 – 200 µl)	BRAND

---

ELISA Mikroplattenleser, MILENIA Kinetic Analyzer                      DIAGNOSTIC PRODUCTS

- VERBRAUCHSMATERIALIEN

Plastikröhrchen Safe Lock Tubes, 0.5 ml    EPPENDORF  
 Skalpellklingen WECPREP, Prep Blades    PILLING WECK  
 ELISA Kit, Arthrogen-CIA, Maus IgG-anti-Typ II Collagen-Ab-Assay Kit    CHONDREX  
 Combitips (1 ml, 5 ml)    EPPENDORF  
 Plastikschißchen    LABCOR PRODUCTS  
 Paraffinziehfolie Parafilm "M", Laboratory film    AMERICAN NATIONAL CAN

- SOFTWARE

SOFTmaxPRO for Windows and Macintosh                      MOLECULAR DEVICES Corp.

#### **2.1.4 zusätzliches Material für die Histologie und Durchflußzytometrie**

- GERÄTE

chirurgisches Besteck:

- *Pinzetten*: BD 029R, BD 527R, BD 725 R, OCR 100R    AESCULAP  
 - *Scheren*: BC 304R, BC 326R, BC 404R

Durchflußzytometer FACSCalibur    BECTON DICKINSON

- VERBRAUCHSMATERIALIEN

Sterilfilter 0.22 µm, Minisart NML    SARTORIUS

---

6-Loch-Platten Falcon Multiwell 6-well, steril	BECTON DICKINSON
Zellsieb Cell Strainer, 70 µm mesh, Nylon, steril	FALCON
Plastikröhrchen, konisch, 4.5 ml	GREINER
Styroporplatte, 300 × 210 × 20 mm (Präparationstisch)	

- REAGENZIEN

Formaldehyd, gepuffert, 4 % in Methanol stabilisiert	OTTO FISCHER
Trypanblau (0.4 %)	SIGMA
<u>Antikörper:</u>	
<u>FITC-markiert:</u> Ratte-anti-Maus-CD4 (Klon RM4-5), -CD3 (Klon 17A2), -CD19 (Klon 1D3)	BECTON DICKINSON
<u>PE-markiert:</u> Ratte-anti-Maus-CD8 (Klon 53-6.7), -CD25 (Klon 7D4), -CD45RB (Klon 16A), -CD3 (Klon 17A2)	
Paraformaldehyd	SIGMA
Trägerflüssigkeit FACSDiv, 20 l	BECTON DICKINSON
Ammoniumchlorid (0.15 M) [NH <sub>4</sub> Cl]	SIGMA
Kaliumhydrogencarbonat (1.0 mM) [KHCO <sub>3</sub> ]	SIGMA
Natrium-EDTA (0.1 mM) [Na <sub>2</sub> EDTA]	SIGMA
Ampuwa (destilliertes Wasser)	FRESENIUS
Salzsäure (1 N) [HCl]	SIGMA

ACK-Lyse-Puffer:

8.29 g NH<sub>4</sub>Cl (0,15 M), 1.0 g KHCO<sub>3</sub> (1.0 mM) und 37.2 mg Na<sub>2</sub>EDTA (0.1 mM) abwiegen und 800 ml destilliertes Wasser hinzugeben, pH auf 7.2 – 7.4 mittels HCl (1 N) einstellen und bis 1.000 ml mit destilliertem Wasser auffüllen. Die Lösung durch einen 0.22 µm Filter steril filtrieren und bei Raumtemperatur aufbewahren.

## SOFTWARE

WinMDI Version 2.8  
CellQuest Software

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE  
BECTON DICKINSON

**2.1.5 Firmenadressen**

Aesculap	Tuttlingen, Deutschland
American National Can	Menasha, U.S.A.
Becton Dickinson GmbH	Heidelberg, Deutschland
Beurer	Ulm, Deutschland
Biochrome KG	Berlin, Deutschland
Brand	Wertheim, Deutschland
Braun Melsungen AG	Melsungen, Deutschland
Chondrex LLC	Redmond, WA, U.S.A.
Diagnostics Products Corp.	Los Angeles, CA, U.S.A.
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	Hamburg, Deutschland
Falcon BD	Le Pont de Claix, Frankreich
Fresenius	Bad Homburg, Deutschland
GIBCO BRL	Grand Island, U.S.A.
Gilson	Villiers-le-Bel, Frankreich
Greiner bio-one	Frickenhausen, Deutschland
Greiner GmbH	Nürtingen, Deutschland
Greisinger electronic GmbH	Regenstauf, Deutschland
Heidolph Instruments GmbH & Co. KG	Schwabach, Deutschland
Heraeus Instruments GmbH	Hanau, Deutschland
Hettich	Tuttlingen, Deutschland
Integra Biosciences GmbH	Fernwald, Deutschland
Kern Gottl. Kern & Sohn GmbH	Albstadt, Deutschland
Kroeplin GmbH	Schlüchtern, Deutschland
Labcor Products, Inc.	Frederick, MA, U.S.A.

---

Liebherr	Ochsenhausen, Deutschland
M & B A/S	Ry, Dänemark
Merck KG	Darmstadt, Deutschland
Molecular Devices Corp.	Sunnyvale, U.S.A.
Olympus	Hamburg, Deutschland
Otto Fischar GmbH & Co. KG	Saarbrücken, Deutschland
Pilling Weck GmbH	Karlstein am Main, Deutschland
Sarstedt AG & Co.	Nümbrecht, Deutschland
Sartorius	Göttingen, Deutschland
Sigma Chemical Co.	St. Louis, MO, U.S.A.
Sigma Diagnostics	St. Louis, MO, U.S.A.
Sigma-Aldrich	Taufkirchen, Deutschland
Sniff	Soest, Deutschland
Sniff bedding Fa. Jenter	Hechingen, Deutschland
Superior Marienfeld	Landau-Königshofen, Deutschland
Tecniplast Gazzada s.a. r.l.	Buguggiate, Italien
The scripps research institute	Palm Beach County, FL, U.S.A.
U.S. ice machine manufacturing company (Scottsman)	Miami, FL, U.S.A.
WU	Mainz, Deutschland

## 2.2 Methoden

Alle Arbeitsschritte wie Zubereitung des Immunogens, der monoklonalen Antikörper-Verdünnungen, die Untersuchung und die Injektionen der Tiere und die Bearbeitung von Gewebeproben wurden unter einer Sterilbank mit Laminar-flow-Technik durchgeführt.



---

## **2.2.1 Induktion einer Collagen-induzierten Arthritis in DBA/1J-Mäusen**

### 2.2.1.1 Haltungsbedingungen für die Versuchstiere

Die Tiere wurden zu fünf in Macrolon-Standardkäfigen unter speziell pathogenfreien Bedingungen (engl.: special pathogen free, SPF) gehalten. Dabei betrug die Raumtemperatur 21 – 23°C und die relative Luftfeuchtigkeit 50 - 60%. Die Mäuse lebten in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und hatten freien Zugang zu sterilisiertem Leitungswasser und Standardnagerfutter.

### 2.2.1.2 Vorbereitung der Collagen-Emulsion

Das lyophilisierte bovine Collagen II (bCII) wurde in 0.05 M Essigsäure auf eine Konzentration von 2 mg/ml gebracht und über Nacht bei 4°C geschüttelt.

Das so gewonnene bCII wurde am folgenden Tag im Verhältnis 1:2 mit CFA emulgiert, dass eine bCII-Konzentration von 1 mg/ml entstand. Dafür wurden zwei Glasspritzen mittels eines Dreiwegehahnes verbunden und alternierend bewegt, bis aus den zwei gekühlten Flüssigkeiten eine cremige Emulsion geworden ist. Bis zur Injektion verblieb die Emulsion auf Eis.

### 2.2.1.3 Immunisierung der Mäuse

Vor der Immunisierung wurden die Mäuse gewogen und klinisch untersucht (siehe 2.2.1.5). Vorbereitend wurde auf eine der in 2.2.1.2 verwendeten Glasspritzen eine 19 G-Kanüle angebracht und die Maus in den Maushalter verbracht. Die Schwanzbasis wurde mit Hautdesinfektionsmittel desinfiziert und 100 µl der in 2.2.1.2 hergestellten Emulsion subkutan injiziert. Dabei sollte sich eine subepidermale Bulla ausbilden.

Am Tag 21 nach Primärimmunisierung erfolgte ein Booster. Hierzu wurde das bCII (2 mg/ml) im Verhältnis 1:2 mit PBS gemischt, dass eine bCII-Konzentration von 1 mg/ml entstand. 100 µl wurden in eine Tuberkulinspritze

aufgezogen und nach erfolgter Hautdesinfektion via 27 G Nadel intraperitoneal injiziert.

#### 2.2.1.4 Antikörper-Injektionen

Der agonistische anti-CD137- und der Kontrollantikörper (9D6) wurden in PBS auf eine Konzentration von 2 mg/ml gebracht. Mit einer Tuberkulinspritze und einer 30-G-Kanüle wurden 1 bis 3 Mal je nach Versuch an den Tagen 0, 6 und 21 nach Primärimmunisierung 100 µl Antikörper intravenös gespritzt. Dazu wurden die Tiere in den Maushalter verbracht.

**Tabelle 1: Ablauf der Experimente.** Die Spalten repräsentieren die verschiedenen Mäusegruppen. **bCII**: Immunisierung mit bCII, (+): bCII/CFA-Emulsion wurde am Tag 0 subkutan gespritzt und bCII in PBS wurde als Booster am Tag 21 intraperitoneal injiziert. Die Gabe des **anti-CD137**-Antikörpers und des Kontroll-Antikörpers (**Kontroll-Ak**) erfolgte intravenös am Schwanz des Tieres. **bCII-Re**: Re-Immunisierung der Mäuse mit bCII in PBS intraperitoneal am Tag 112. **3x**: dreimalige Gabe des Antikörpers an den Tagen 0, 6 und 21. **1x**: einmalige Gabe des Antikörpers am Tag 0.



	Gabe des agonistischen anti-CD137-Antikörpers								
	dreimalige Gabe			einmalige Gabe					
				Tag 0			Tag 14		Krankheitsausbruch
bCII	+	+	+	+	+	+	+	+	+
anti-CD137	-	3x	-	-	3x <sup>a</sup>	1x	-	1x	1x
Kontroll-Ak	3x	-	-	-	-	-	-	-	-
bCII-Re	-	-	-	-	+	+	-	-	-

<sup>a</sup> = Kontrollgruppe

### 2.2.1.5 Bestimmung der Arthritis

Die Tiere wurden zweimal pro Woche untersucht. Dabei wurde der Arthritis-Score, die Pfortendicken sowie das Gewicht ermittelt.

Für die Bestimmung des Arthritis-Score wurde jede Pfote und jede einzelne Zehe eingehend auf Rötung beziehungsweise Schwellung untersucht. Abschließend wurden die Pfoten mittels des Oditest Feinmessgeräts vermessen. Dabei wurde das Messgerät im Bereich der Ossa carpi angesetzt und der angezeigte Wert ermittelt. Waren die Pfoten sehr stark geschwollen, so wurde der Wert genommen, der angezeigt wurde, bevor der Stempel des Messgeräts eine Impression in das Ödem verursachte.

Die klinischen Zeichen der Arthritis wurden nach dem in Tabelle 2 aufgeführten Score eingeteilt.

**Tabelle 2: Arthritis-Score nach einem internationalen Scoresystem.**

<u>Arthritis Score</u>	<u>Beurteilung</u>	<u>sichtbare klinische Zeichen</u>
0	keine Arthritis	keine klinischen Zeichen einer Arthritis
1	milde Arthritis	Rötung und / oder Schwellung eines kleinen Gelenks
2	moderate Arthritis	Schwellung von zwei oder mehr kleinen Gelenken und / oder eines großen Gelenks
3	schwere Arthritis	Schwellung der ganzen Pfote und / oder Ankylose

Jeder Extremität wurde ein maximaler Score von 3 zugeteilt. Alle Extremitäten-Scores wurden addiert, weshalb ein totaler Score von 12 pro Tier möglich war.

---

## **2.2.2 Bestimmungen der anti-CII-Antikörper-Titer**

### 2.2.2.1 Gewinnung des Serums

Den Tieren wurde alle 14 Tage Blut aus der Schwanzvene entnommen. Dazu wurden die Tiere in den Tierhalter verbracht und der Schwanz mit einer Rotlichtlampe erwärmt. Nach der Hautdesinfektion wurde die Vene mittels einer Rasierklinge/eines Skalpells angeschnitten und die Blutropfen in einem Eppendorf-Tube aufgefangen. Die maximal entnommene Blutmenge betrug 150 µl.

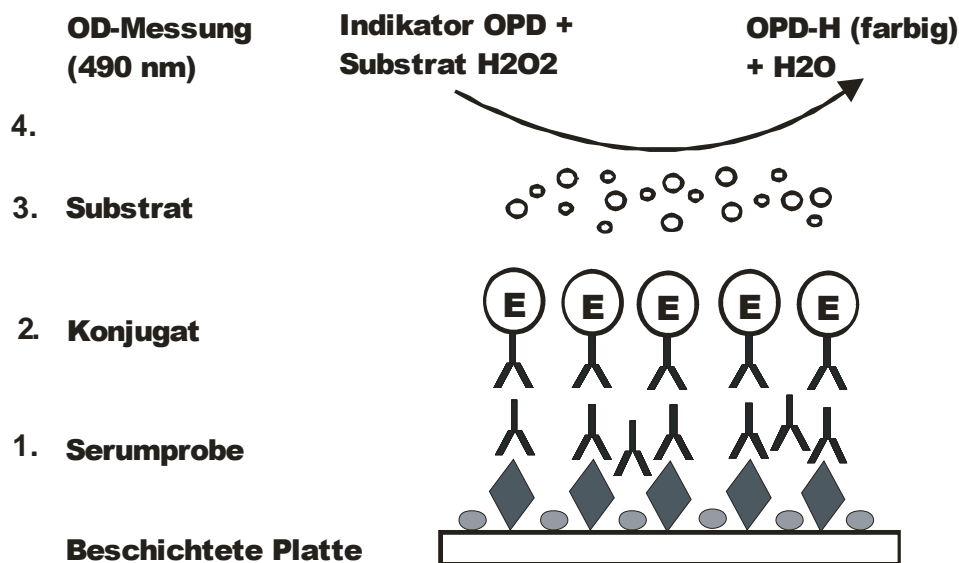
Das Blut wurde 2 Stunden zur Koagulation bei Raumtemperatur aufbewahrt und anschließend bei 10.000 r.p.m. (engl.: rounds per minute; Umdrehungen pro Minute) für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Plastikröhrchen pipettiert und bis zur Analyse bei –20°C eingefroren.

### 2.2.2.2 ELISA-Testprinzip

Der Enzymimmunoassay (engl.: enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) ist eine quantitative Analysemethode zur Bestimmung von Antikörpern oder Antigenen. Dabei ist eine Microtiterplatte entweder mit Antikörper oder Antigen beschichtet, auf die das Untersuchungsmaterial pipettiert wird. Befindet sich im Untersuchungsmaterial das entsprechende Antigen oder der entsprechende Antikörper, so werden diese hochspezifisch gebunden. Substrat wird gebunden und umgewandelt, wenn zuvor ein enzymatisch markierter Sekundärantikörper der Platte zugegeben wird. Bei der Reaktion wird Farbstoff aus einem enzyspezifischen Substrat-Farbstoff-Komplex freigesetzt, der photometrisch bestimmt wird. Ein mitgeführter Proteinstandard erlaubt durch Blottieren einer Eichkurve die Korrelation der gemessenen OD-Werte (engl.: optical density, OD) mit der Antikörper- bzw. Antigenkonzentration.

### 2.2.2.3 ELISA zur anti-CII-Antikörper-Bestimmung

Die anti-CII-IgG-Antikörper-Titer wurden in Sera der Tiere nach den Anweisungen des Herstellers gemessen. Eine Zusammenfassung des durchgeführten ELISA-Tests ist in Abbildung 3 dargestellt.



**Abb. 3: ELISA zur anti-CII-IgG-Antikörper-Titer-Bestimmung in Mäusen.**

◆ CII-Antigen

● Blockierungspuffer: verhindert die unspezifische Anhaftung an der Platte

⋈ gesuchter anti-CII-IgG-Antikörper, 1:10.000 verdünnt

⋈<sup>(E)</sup> enzymgekoppelter Sekundärantikörper: Peroxidase-Ziege-anti-Maus-IgG

○<sub>0</sub> Substratlösung: Indikator-Substrat (OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

↪ durch das Enzym Peroxidase wird das Substrat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in H<sub>2</sub>O + H<sup>+</sup> umgewandelt. Die pH-Änderung führt mittels des OPD-Indikators zur Farbentstehung, die photometrisch bestimmt wird. Die Farbreaktion korreliert mit der Antikörperkonzentration.

Nach dreimaligem Waschen der ELISA-Platten mit Waschpuffer wurden 100 µl des Blockierungspuffers pipettiert und 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation erfolgten drei weitere Waschschrte.

---

Die Serumproben wurden aufgetaut, bei 10.000 r.p.m. für 5 Minuten zentrifugiert und 1:10.000 in Verdünnungspuffer gelöst.

Als Standardkurve diente eine Verdünnungsreihe (0,5, 1, 2, 4, 8, 16 Units/ml) aus polyklonalem Standardantikörper, der aus CII-immunisierten Mäusen gewonnen wurde (ELISA-Kit).

Von den Probesera und den Standardverdünnungen wurden je 100 µl als Duplikate pipettiert. Als Leerwert fungierte Verdünnungspuffer. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Dann wurde eine zweite Antikörper-Lösung mit lyophilisiertem, Peroxidase-markiertem Antikörper (Ziege-anti-Maus-IgG) in entsprechendem Puffer hergestellt. Nach sechsmaligem Waschvorgang wurden je 100 µl der zweiten Antikörper-Lösung pipettiert. Die Platte wurde anschließend zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Bei jedem Inkubationsschritt wurde die Platte mit Paraffin-Ziehfolie bedeckt. Nach der Inkubationszeit wurde die Platte sechsmal gewaschen und 100 µl Substratlösung (Orthophenylenediamine in Urea-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Puffer, OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pipettiert und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zufügen von 50 µl 2,5 N Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Anschließend wurden die 96-Lochplatten bei 490 nm in einem ELISA-Microplatten-Lesegerät ausgewertet. Die anti-CII-IgG-Antikörper-Titer wurden von dem Programm SOFTmaxPro durch Analyse und Berechnung der OD-Messwerte kalkuliert. Dazu wurde der Mittelwert der Duplikate der einzelnen Proben gebildet und davon die Hintergrundwerte abgezogen.

In einem doppelt logarithmischen Graphen wurden die gemessenen OD-Werte der Standardantikörper-Verdünnungsreihe gegen deren Units/ml aufgetragen. Die Antikörper-Konzentrationen der Proben wurde mittels Regressionsanalyse berechnet.

### **2.2.3 Histologie der Gelenke**

#### *Anmerkung:*

Die histologischen Schnitte wurden von Herrn Dr. med. Peter Ruck, Pathologisches Institut der Universität Tübingen hergestellt. Die histologische Präparation ist somit nicht vom Doktoranden erarbeitet.

Am Tag 89 nach Primärimmunisierung wurden die Hinterbeine der Mäuse in der Hüfte exartikuliert und in 4%igen Formalin fixiert. Nach Dekalzifikation in EDTA (engl.: etilene diamine tetra-acetic acid) wurde das Präparat in Paraffin eingebettet und in 5 µm dünne Scheiben geschnitten. Anschließend wurden die Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und unter dem Mikroskop beurteilt.

### **2.2.4 Immunfluoreszenzfärbung und Durchflußzytometrie**

#### 2.2.4.1 Zellgewinnung und –aufbereitung

Vier verschiedene Mäusegruppen wurden in einem weiteren Versuch verwandt. Eine Gruppe gebildet aus nativen Mäusen diente als Kontrolle. Eine zweite Gruppe wurde lediglich mit bCII immunisiert (Tag 0, 21), während eine dritte Gruppe zusätzlich eine dreimalige Gabe des anti-CD137-Antikörpers (Tag 0, 6, 21) bekam. Die vierte Gruppe wurde lediglich mit anti-CD137 behandelt (Tag 0, 6, 21).

Am Tag 28 nach der ersten Immunisierung wurden die Tiere mittels CO<sub>2</sub> getötet und nachfolgend in Rückenlage auf dem Präparationstisch leicht gestreckt fixiert. Mit der chirurgischen Pinzette wurde die abdominelle Hautpartie gepackt und mit der großen Schere in Medianlinie kranial der Symphyse bis zur Incisura jugularis inzidiert. Die Haut wurde zur besseren Einsicht in das Operationsgebiet knapp oberhalb der Hüfte und im Bereich des Manubrium sterni quer eingeschnitten und zur Seite geklappt. Mittels einer medianen Laparotomie wurde das Peritoneum eröffnet, danach der Darm zur Seite

---

geschoben. Die Hautschnitte wurden erweitert, indem die Dermis extremitätenwärts inzidiert und ebenfalls aufgeklappt wurde. Mit der anatomischen Pinzette und der kleinen Schere wurde die Milz vom Hilum und vom Ligamentum gastrosplenicum abgeschnitten und gewogen. Die Organe wurden in je ein Falcon-Tube mit PBS/10% FCS verbracht und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C aufbewahrt.

Die Milzen wurden in einer 6-Lochplatte mittels einer anatomischen Pinzette und einer Graefe-Pinzette zerkleinert. Das überschüssige Gewebe wurde durch ein Zellsieb von den Zellsuspensionen separiert und verworfen. Nachfolgend wurden Splenozyten von Mäusen der gleichen Gruppe in einem 50 ml-Plastikröhrchen gepoolt.

Um die Erythrozyten aus den Milzsuspensionen zu entfernen, wurden die Proben bei 2.000 r.p.m. 5 Minuten zentrifugiert. Auf die Zellpellets wurde jeweils 5 ml ACK-Lyse-Puffer gegeben und 5 Minuten auf Eis in einen Schüttler gestellt. Danach wurde den Plastikröhrchen 5 ml PBS / 10 % FCS zugegeben und bei 1.000 r.p.m. für 10 Minuten zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Zellpellet zwei Mal mit 10 ml PBS / 10 % FCS gewaschen. Diese Prozedur wurde ein weiteres Mal wiederholt.

#### 2.2.4.2 Prinzip der direkten Immunfluoreszenzfärbung

Immunfluoreszenz kombiniert histochemische und immunologische Methoden, um Epitope von Zellmolekülen, welche als Antigene fungieren, darzustellen. Dazu werden hochspezifische, monoklonale Antikörper mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert und mit der zu analysierenden Zellsuspension inkubiert. Besitzen die Zellen das für den Antikörper spezifische Epitop, bindet der Fluorochrom-markierte Antikörper daran und die Zell-Antikörper-Komplexe emittieren Licht, wenn sie mit energiereichem Licht



beschossen werden. Um Autofluoreszenzphänomene der Zellen auszuschließen, werden als Kontrolle unmarkierte Zellsuspensionen analysiert.

#### 2.2.4.3 Prinzip der Durchflußzytometrie

Die fluoreszenzaktivierte Zellanalyse (engl.: fluorescence activated cell scan, FACS) ermöglicht die quantitative Bestimmung von Oberflächenmolekülen und intrazellulären Proteinen und die Analyse der Eigenschaften der Zellen. Mittels Fluoreszenzfarbstoff-markierten, monoklonalen Antikörpern werden bestimmte zelluläre Antigene identifiziert. Zusätzlich werden durch die Lichtstreuung Informationen über die Zellgröße und die Granularität des Zytoplasmas der Zellen gewonnen.

Die Zellen einer Einzelzellsuspension werden über eine Stahlkapillare in eine vibrierende Flüssigkeitskammer geleitet, wo sie von einem Mantel aus Trägerflüssigkeit umgeben werden. Mit Hochdruck wird die Suspension in eine Quarzküvette geleitet, damit die Zellen einzeln den Messpunkt erreichen. Die Messküvette wird mit einem Laserstrahl beschossen. Aufgrund der Zellgröße, der Zellgranularität und des unterschiedlichen, fluoreszierenden Farbstoffs emittiert jede Zelle eine bestimmte Lichtemission. Diese wird gemessen und mittels eines Computers ausgewertet.

Die Vorwärtslichtstreuung (engl.: forward light scatter, FSC) repräsentiert die Zellgröße und die seitliche Lichtstreuung (engl.: sideward light scatter, SSC), im 90° Winkel gemessen, stellt das Plasma/Kern-Verhältnis beziehungsweise die Granularität dar. Mit Hilfe der FACS-Analyse lassen sich große Zellen mit großer Plasma/Nukleus-Relation und granuliertem Zytoplasma (z.B. Granulozyten) von kleinen Zellen mit kleinem Plasma/Kern-Verhältnis (z.B. Lymphozyten) abgrenzen. Durch Analyse von bis zu drei verschiedenen Fluoreszenzfarben können bis zu drei verschiedene Epitope auf ihr

---

Vorhandensein zusätzlich zur Größe und Granularität einer Zelle überprüft werden.

Obwohl die Antikörper-markierten Zellen mit dem gleichen Laser beleuchtet werden, emittieren sie Licht unterschiedlicher Wellenlänge, das über optische Filter und Photomultiplikatoren detektiert wird. Als fluoreszierende Farbstoffe werden unter anderem Fluoreszeinisothiozyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE) eingesetzt, die auf energiereiches Licht der Wellenlänge 488 nm spezifisch mit Lichtemissionen von grünem (FITC, Fluoreszenzlicht-Maximum 525 nm Wellenlänge) und rotem Licht (PE, Fluoreszenzlicht-Maximum 575 nm Wellenlänge) reagieren. Die erhaltenen Signale werden computertechnisch in der angeschlossenen Recheneinheit verarbeitet und graphisch aufbereitet.

#### 2.2.4.4 Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenmoleküle auf Splenozyten

Die Zellzahlen der Milzsuspensionen wurden in einer Neubauerzählkammer bestimmt und auf eine Konzentration von  $2.5 \times 10^6$  Zellen / ml in PBS / 10 % FCS gebracht.

In jedes konisches Plastikröhrchen wurde je 50  $\mu$ l Zellsuspension und 50  $\mu$ l der entsprechenden Antikörper-Lösung (Verhältnis 1:40 in PBS) zugegeben. Dabei wurden vier Kombinationen von jeweils zwei markierten Antikörpern, einer mit FITC und der andere mit PE, verwandt (anti-CD4/anti-CD8, anti-CD4/anti-CD25, anti-CD3/CD45RB und anti-CD19/anti-CD3). Abgedunkelt wurden die Proben auf Eis 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation folgten zwei Waschschrte mit PBS. Die Suspensionen wurden bei 2.000 r.p.m. für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Auf die so entstandenen Pellets wurde jeweils 200  $\mu$ l PBS pipettiert. Alle Proben wurden gevortext und durchflußzytometrisch analysiert.

---

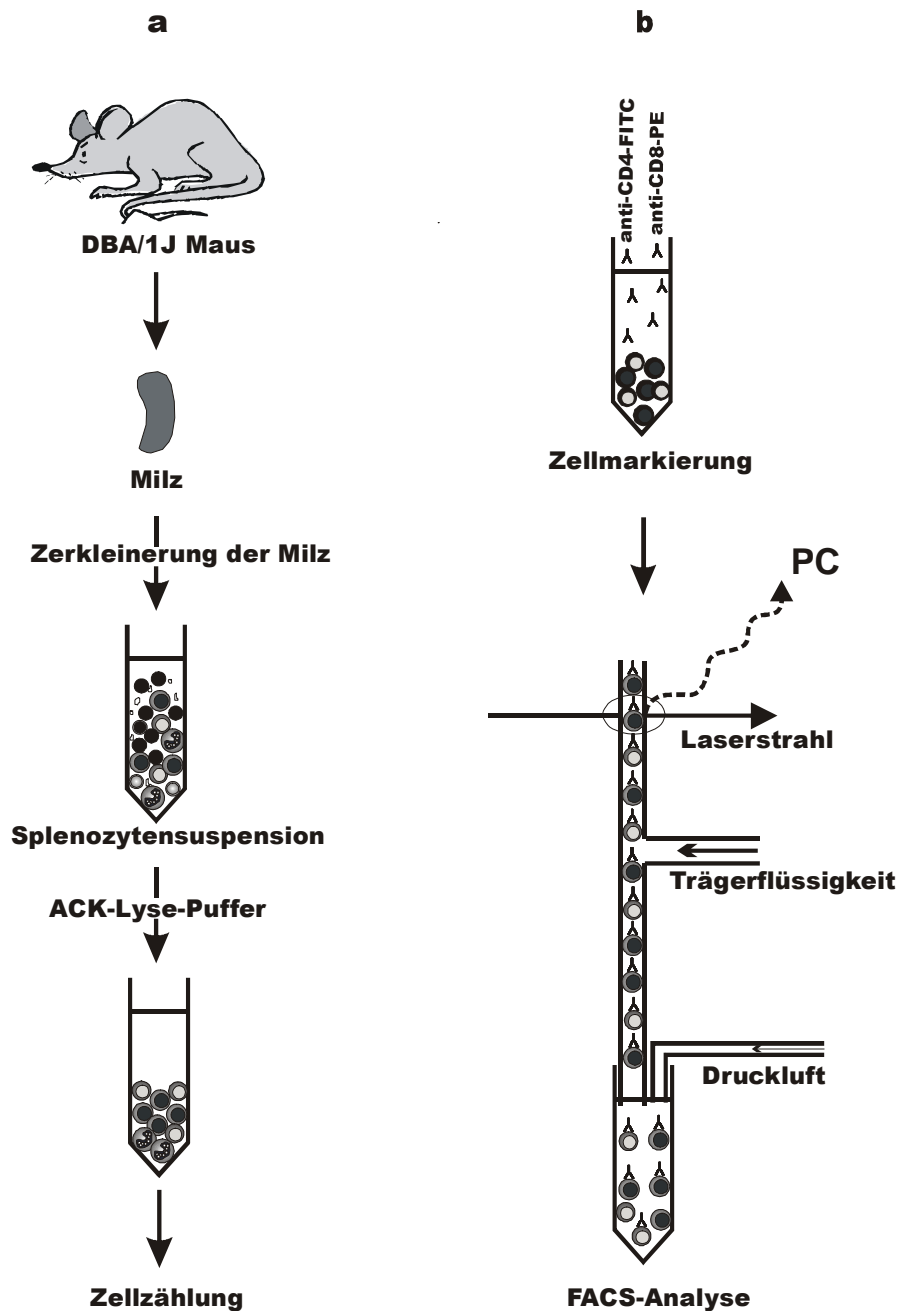
#### 2.2.4.5 FACS-Messung und Analyse

Die in 2.2.4.4 hergestellten Zellsuspensionen wurden einer FACS-Analyse unterzogen. Die Einstellungen von FSC und SSC wurden so gewählt, dass die toten Zellen von der Analyse ausgeschlossen blieben.

In der korrelierten Zweiparameterdarstellung (Größe gegen Granularität) wurde eine Region definiert, die nur den Lymphozyten entsprach. Die Autofluoreszenz der Zellen wurde ermittelt, indem die ungefärbte Zellsuspension analysiert wurde. Diese Autofluoreszenz wurde von der Analyse abgezogen. Hinterher wurde die gesuchte Fluoreszenz eingestellt, indem ungefärbte Zellen und definierte positive Zellen gescannt wurden. Die ungefärbten Zellen wurden als negativ und die positiven Zellen als positiv fluoreszierend definiert. Ferner wurden die Fluoreszenzen 1 (FITC) und 2 (PE) gegeneinander kompensiert, um den Bereich der Fluoreszenzintensität zu korrigieren, worin sich beide überschneiden.

Es wurden von jeder Probe maximal 20.000 Zellen der zuvor definierten Region analysiert. Dafür wurden die emittierten Intensitätswerte der einzelnen Zellen in einem Graphen, wo Fluoreszenz 1 gegen Fluoreszenz 2 aufgetragen war, dargestellt und mittels der CellQuest Software statistisch ausgewertet. Hierfür wurden in den Graphen Quadranten eingezeichnet und eine logarithmische Skalierung verwendet.

Der experimentelle Ablauf der Splenozytengewinnung bis zur Analyse mittels Durchflußzytometrie ist in Abbildung 4 zusammengefasst.



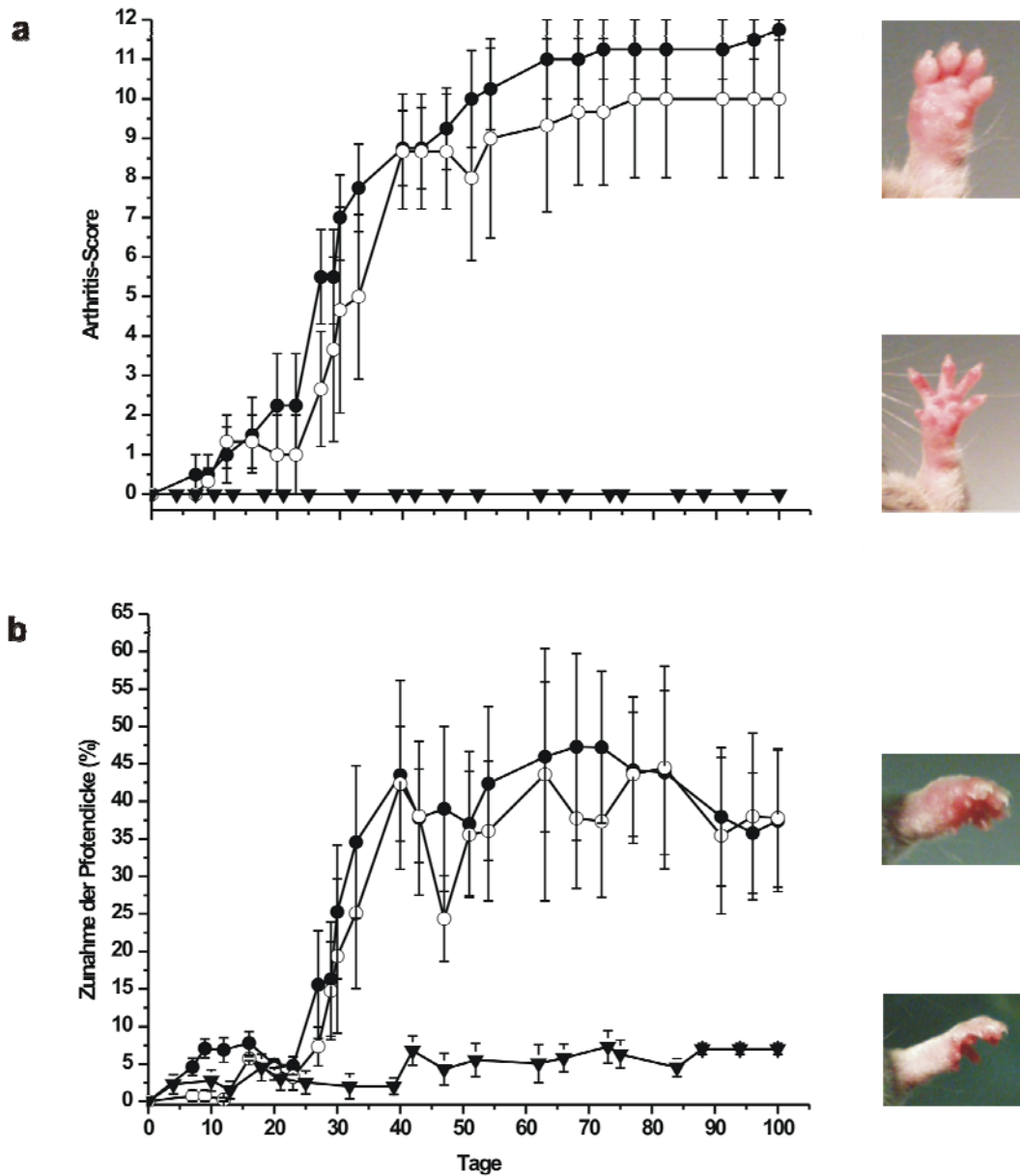
**Abb. 4: Splenozytengewinnung und –aufbereitung zur FACS-Analyse.** Aus der Milz der untersuchten Maus erfolgte die Gewinnung von Splenozyten mittels Zerkleinerung des Organs. Eine nachfolgende Behandlung der Zellsuspension mit ACK-Lyse-Puffer entfernte Erythrozyten (a). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die Splenozyten mit spezifischen, monoklonalen Antikörpern gegen bestimmte Oberflächenmoleküle markiert und mittels Durchflußzytometrie analysiert (b).

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Einfluss der anti-CD137-Antikörper-Behandlung auf die Induktion und den Verlauf der CIA. Klinische Befunde und Bestimmung der anti-CII-IgG-Produktion**

##### ***3.1.1 Dreimalige Gabe des anti-CD137-Antikörpers***

Alle DBA/1J-Mäuse, die lediglich mit bCII immunisiert wurden, entwickelten eine schwere Arthritis. Die Tiere der Kontrollgruppe, die mit dem Kontroll-Antikörper (Klon 9D6) am Tag 0, 6, und 21 behandelt wurden, zeigten ebenfalls eine schwere Erkrankung. Initial gab es eine leichte Rötung und Schwellung von einzelnen Fingern, die sich schnell über die ganze Pfote ausbreitete mit Entwicklung einer starken Rötung und massiven Ödemen (Abb. 5a).



**Abb. 5: Arthritis-Score (a) und Pfotendicke (b) in DBA1/J-Mäusen.** Alle Tiere (n = 15) wurden an den Tagen 0 und 21 mit bCII immunisiert. Eine Gruppe (n = 5) erhielt keine Therapie (●), eine Gruppe (n = 5) dreimalige Kontrollantikörper Klon 9D6 (○) und eine dritte (n = 5) eine dreimalige Therapie mit anti-CD137 Klon 3H3 (▼) an den Tagen 0, 6 und 21. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM.

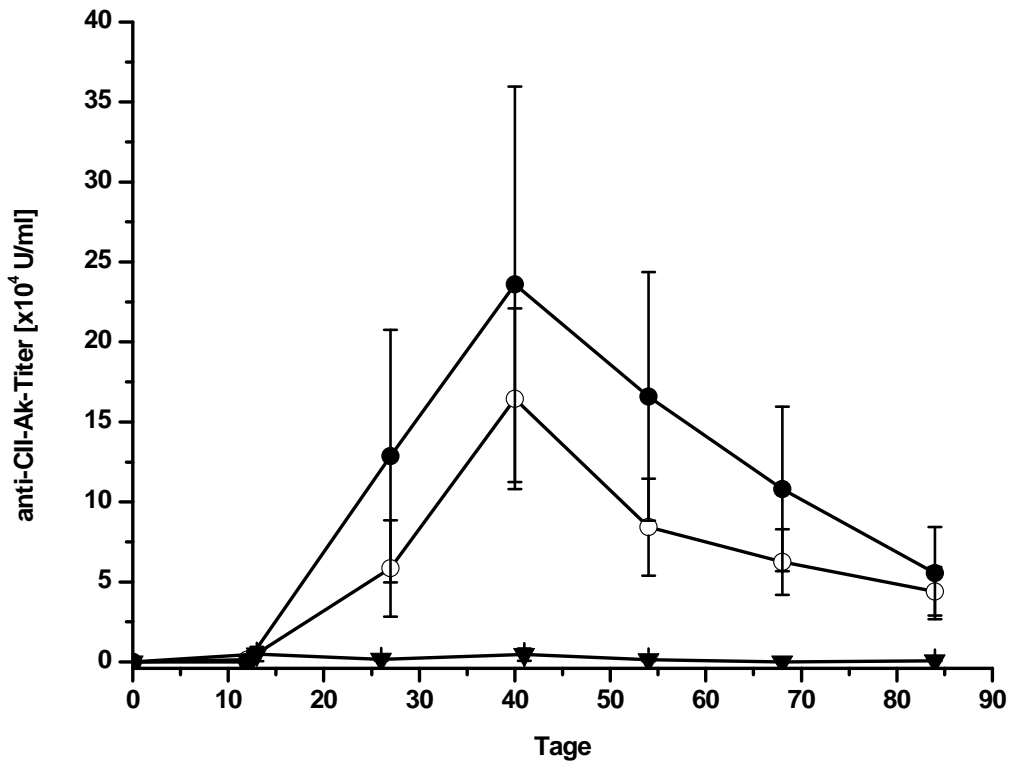
---

Im Gegensatz dazu blieben die dreimalig mit anti-CD137 (Tag 0, 6, 21) behandelten Mäuse während der 100tägigen Beobachtung ohne klinische Zeichen einer Arthritis.

Um die Schwere der Arthritis bestimmen zu können, wurde die Pfortendicke in jeder Mäuse-Gruppe gemessen. Die Immunisierung mit lediglich bCII führte zu einer Schwellung der Pforten zwischen Tag 25 und 28 (Abb. 5b). Der Beginn setzte plötzlich ein mit einer maximalen Schwere zwischen Tag 67 und 82 nach initialer bCII-Injektion. Die zusätzliche dreimalige Behandlung mit anti-CD137 hemmte die Schwellung der Pforten. Dies war nicht so wenn die Mäuse mit Kontroll-Antikörper behandelt wurden, denn in diesem Fall konnte kein schützender Effekt auf die Pfortenschwellung festgestellt werden (Abb. 5b).

Im Vergleich zu Mäusen, welche dreimalig mit anti-CD137 behandelt wurden, zeigten die Mäuse, die entweder nur bCII oder dreimalig Kontroll-Antikörper injiziert bekamen, einen Gewichtsverlust, der zwischen Tag 15 und 24 nach initialer Immunisierung in Erscheinung trat. Mäuse, die dreimalig mit anti-CD137 behandelt wurden, zeigten ein vergleichbares Gewichtsverhalten wie Nativmäuse.

Neben der klinischen Beobachtung wurden die anti-CII-IgG Antikörper-Titer im Serum der Tiere mittels eines ELISA bestimmt. Obwohl in Mäusen, welche Kontroll-Antikörper erhielten, hohe anti-CII-Antikörper-Titer gemessen wurden, waren diese niedriger als die Titer von Mäusen, die nur mit bCII immunisiert wurden (Abb. 6). Im Gegensatz dazu konnte keine humorale Antwort gegen das immunisierende CII in der Mäusegruppe, die mit anti-CD137 behandelt wurde, festgestellt werden (Abb. 6).



**Abb. 6: Anti-CII-IgG Antikörper-Titer in DBA1/J-Mäusen.** Die Seren wurden aus den Tieren gewonnen, die in Abb. 5 dargestellt sind. Die Gruppen samt Symbolen entsprechen denen aus Abb. 5. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM.

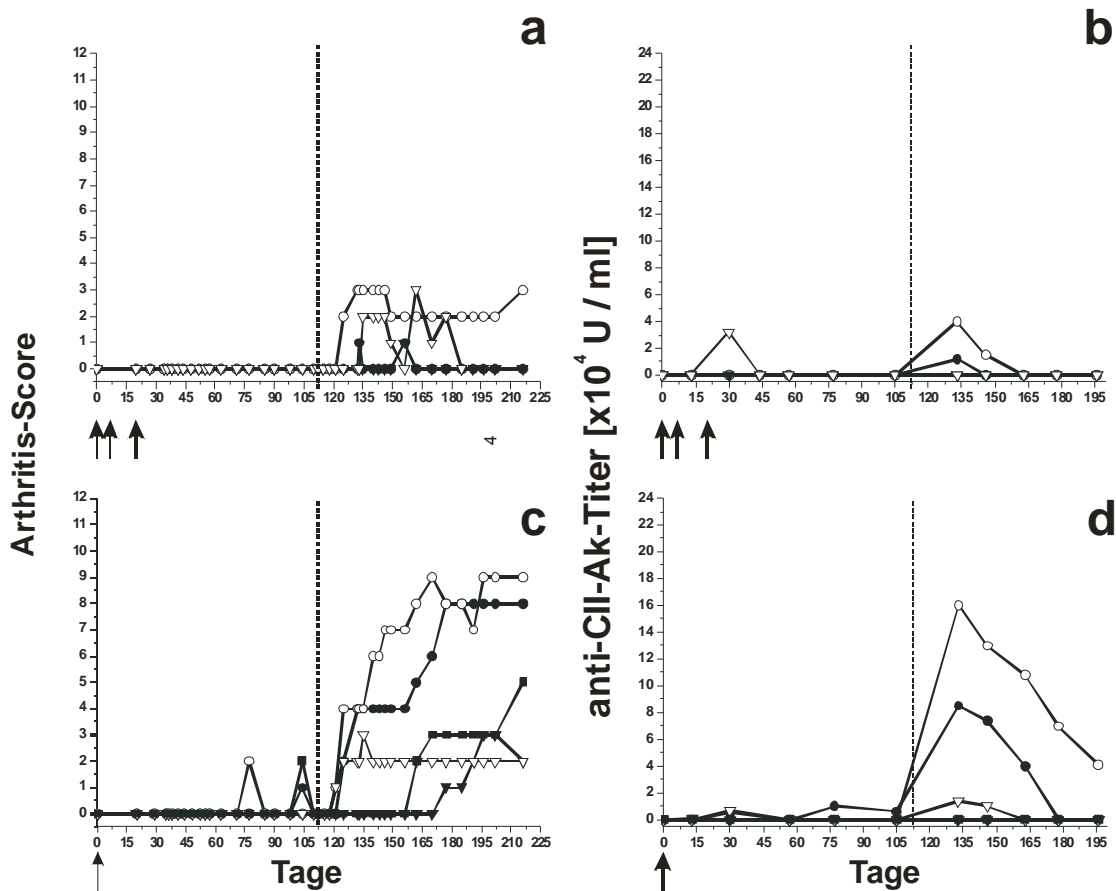
### 3.1.2 Einmalige Gabe des anti-CD137-Antikörpers

Um zu untersuchen, ob auch eine einzelne Injektion des Antikörpers ausreicht, den Ausbruch von CIA zu verhindern, wurde eine Mäusegruppe am Tag 0 der Immunisierung mit einer einzigen Dosis von anti-CD137 behandelt. Drei von fünf Mäusen (60%) zeigten eine verzögerte, milde und passagere Arthritis (Abb. 7c, d). Eine Maus war am Tag 75 nach initialer Immunisierung krank und die anderen zwei Mäuse am Tag 105. In dieser Gruppe konnte nur ein Score zwischen 1 – 2 festgestellt werden (Abb. 7c).



Minimale und vorübergehende anti-CII-IgG-Antikörper-Titer wurden in den Sera ermittelt, die zu jenen drei Mäusen gehörten (Abb. 7d).

Zum Vergleich diente eine Mausgruppe, die dreimalig anti-CD137-Antikörper erhielt (Abb. 7a, b).



**Abb. 7: Arthritis-Score (a, c) und anti-CII-IgG Antikörper-Titer (b, d) in DBA1/J-Mäusen.** Die Immunisierung der Tiere mit bCII erfolgte zunächst an den Tagen 0 und 21. Eine Gruppe (n = 5) erhielt an den Tagen 0, 6 und 21 Therapie mit anti-CD137 (a, b), während die andere (n = 5) lediglich am Tag 0 den Antikörper bekam (c, d). Zusätzlich wurde in diesem Versuch eine erneute Immunisierung mit bCII am Tag 112 durchgeführt (vertikale, gestrichelte Linie). Jedes Symbol repräsentiert ein Versuchstier. Der Pfeil symbolisiert den Tag der Injektion mit anti-CD137-Antikörper.

---

### **3.1.3 Wiederimmunisierung von anti-CD137-Antikörper behandelten Mäusen mit bCII**

Zur Ermittlung wie lange der Schutz gegen CIA in anti-CD137-behandelten Mäusen andauerte, wurde zwei Gruppen von Tieren am Tag 112 100 µg von bCII intraperitoneal injiziert (engl.: rechallenge). Beide Mäusegruppen hatten das etablierte Schema der Immunisierung mit bCII erhalten (am Tag 0 und 21). Eine Gruppe hatte eine dreimalige Gabe des Antikörpers bekommen (Tag 0, 6, 21), während die zweite Gruppe nur eine einzige Injektion erhielt (Tag 0).

Es wurden 10 bis 20 Tage nach erneuter Gabe des bCII (2. Booster, Tag 112) klinische Zeichen einer Arthritis beobachtet (Abb. 7). Die Schwere der Arthritis war größer in der Mäusegruppe, welche eine einzelne Injektion von anti-CD137-Antikörper erhielt (Abb. 7c), verglichen mit der Gruppe, die drei Injektionen des Antikörpers bekam (Abb. 7a). Alle Tiere der Gruppe, die nur mit einer einzigen Gabe des Antikörpers behandelt wurden, erkrankten nach dem 2. Booster (zwei von fünf Mäusen schwer). Drei von fünf Mäusen der anderen Gruppe, die 3 Injektionen des Antikörpers bekamen, entwickelten lediglich eine milde Arthritis.

Die anti-CII-IgG-Titer verhielten sich entsprechend den klinischen Beobachtungen (Abb. 7b, 7d). Je schwerer die Klinik der Erkrankung, desto höhere Antikörper-Titer wurden gemessen.

---

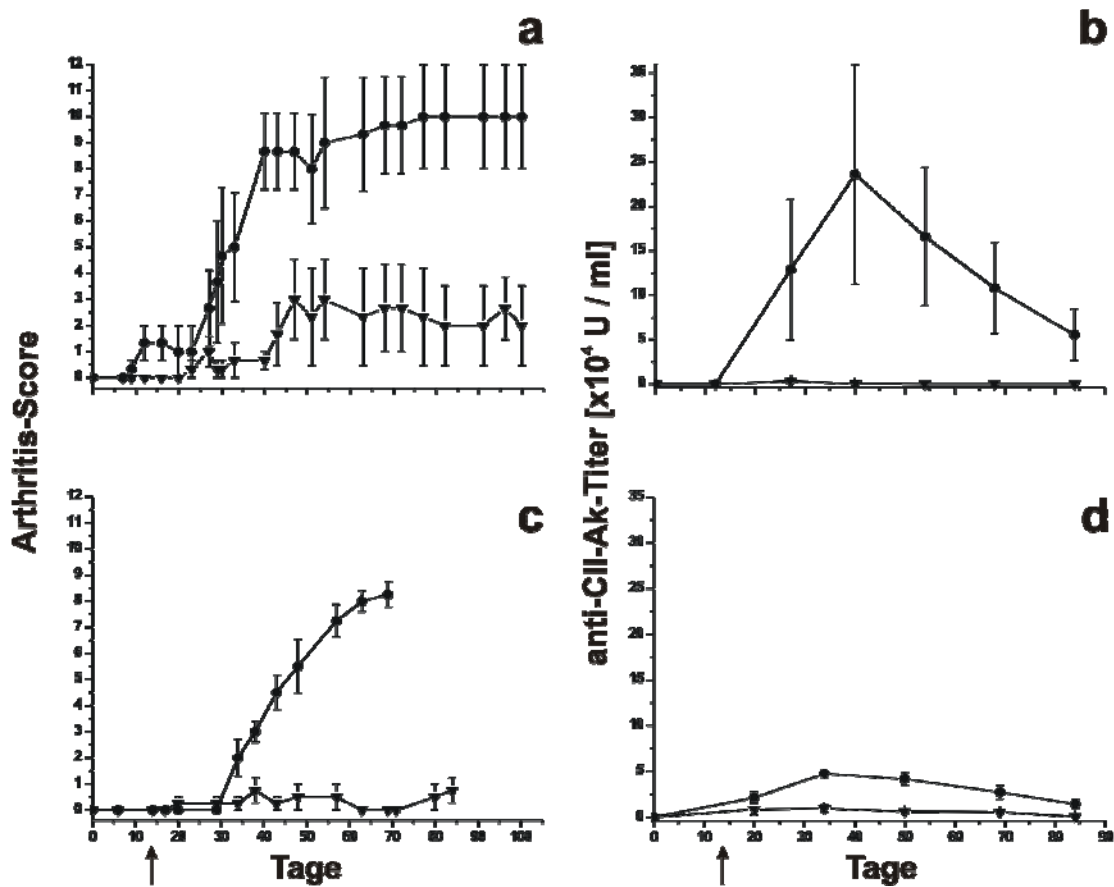
### **3.1.4 Verzögerte Verabreichung des anti-CD137-Antikörpers nach der CIA-Induktion**

#### 3.1.4.1 Verabreichung des anti-CD137-Antikörpers am Tag 14 nach der ersten bCII-Injektion

Weil eine einzige Injektion von anti-CD137-Antikörper am Tag 0 der Immunisierung zu einer großen Reduktion der Erkrankungsschwere und einem verzögertem Erscheinen der Arthritis führte, wurde untersucht, ob auch lediglich eine einzige Injektion von anti-CD137 am Tag 14 nach Immunisierung ausreicht, um Einfluss auf den Verlauf von CIA zu nehmen.

Wenn anti-CD137 am Tag 14 nach der Immunisierung gespritzt wurde, konnte eine deutliche Verzögerung des Beginns der Arthritis in zwei unterschiedlichen Versuchen beobachtet werden (Abb. 8). Als Kontrolle diente eine Gruppe, die nur mit bCII immunisiert wurde. Der maximale Score-Mittelwert in der Gruppe, die eine einmalige Gabe des Antikörpers am Tag 14 bekommen hat, war 3 (Abb. 8a, 8c).

Dementsprechend waren die anti-CII-IgG-Titer deutlich reduziert in den mit anti-CD137 behandelten Mäusen (Abb. 8b, 8d)



**Abb. 8: Arthritis-Score (a, c) und anti-CII-IgG Antikörper-Titer (b, d) in DBA1/J-Mäusen nach verzögerter Gabe des Antikörpers am Tag 14. Alle Tiere wurden an den Tagen 0 und 21 mit bCII immunisiert und eine Gruppe pro Versuch am Tag 14 mit anti-CD137 behandelt (Symbol ▼). Der Pfeil symbolisiert den Tag der Injektion mit anti-CD137-Antikörper. Dargestellt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM von zwei unterschiedlichen Versuchen (a, b: n = 3 pro Gruppe und c, d: n = 4 pro Gruppe).**

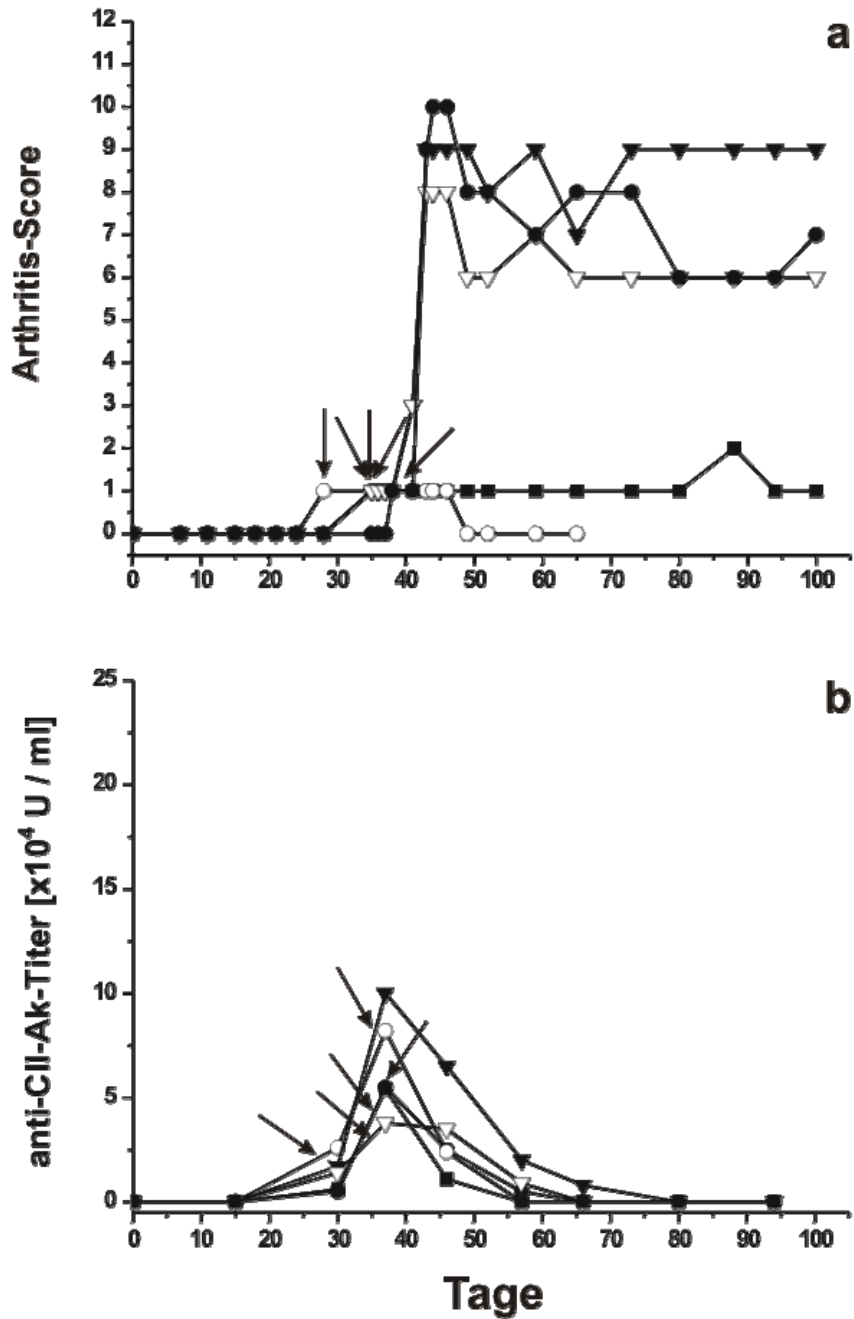
### 3.1.4.2 Verabreichung des anti-CD137-Antikörpers zum Zeitpunkt des Ausbruches der Erkrankung

Es konnte zuvor gezeigt werden, dass eine einzelne Injektion mit dem anti-CD137-Antikörper den Krankheitsausbruch verzögert und die Schwere der Arthritis mildert, insbesondere dann, wenn in der Frühphase der Autoimmunreaktion der anti-CD137-Antikörper injiziert wurde.

---

Um zu ermitteln, ob eine Arthritis durch den anti-CD137 Antikörper gelindert oder verzögert werden kann, wenn die ersten Zeichen der Erkrankung in Erscheinung treten, wurde eine einzelne Dosis des anti-CD137-Antikörpers zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruches gespritzt. Die ersten Zeichen zeigten sich zwischen Tag 23 und 35 (Abb. 9a). Eine Maus wurde am Tag 27 mit anti-CD137 behandelt, drei Mäuse bekamen den Antikörper am Tag 35 und die andere Maus am Tag 37. In zwei von fünf Mäusen wurde die Erkrankung gestoppt oder gelindert, während die anderen drei Tiere, trotz der Antikörper-Gabe, eine schwere Arthritis entwickelten.

Ähnlich, wie es bei den nur mit bCII immunisierten Mäusen gezeigt wurde (Abb. 6), erreichten die anti-CII-IgG-Titer der Mäuse dieses Versuches ihren höchsten Wert um Tag 40 (Abb. 9b). Zum Zeitpunkt der anti-CD137-Injektion waren die Antikörper-Titer bereits hoch. Allerdings konnte nach der anti-CD137-Gabe eine schnelle Abnahme der Antikörperbildung im Vergleich zu nur mit bCII immunisierten Tieren verzeichnet werden. Am Tag 66 waren die Antikörper-Titer bei 80% der Tiere nicht mehr nachweisbar.

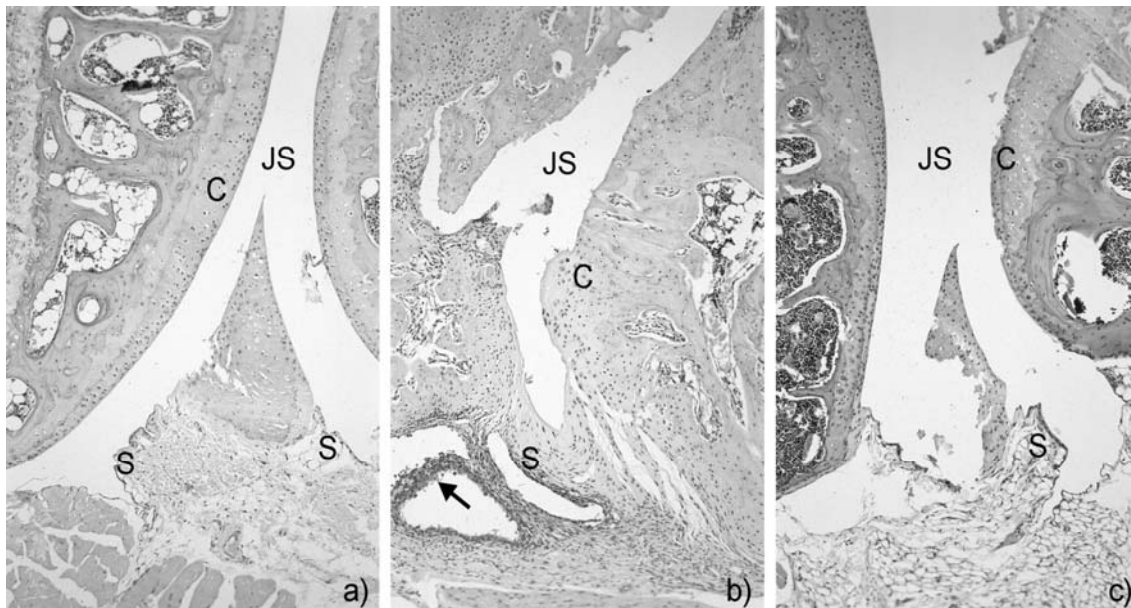


**Abb. 9: Arthritis-Score (a) und anti-CII-IgG Antikörper-Titer (b) in DBA1/J-Mäusen nach Gabe des Antikörpers zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruches. Die Tiere wurden an den Tagen 0 und 21 mit bCII immunisiert und bei klinischem Auftreten von CIA mit einer einmaligen Gabe von anti-CD137 therapiert. Jedes Symbol entspricht einem Tier. Jeder Pfeil symbolisiert eine Injektion mit anti-CD137-Antikörper.**

### 3.2 Histopathologische Befunde

Histologische Untersuchungen der Gelenke von unterschiedlich behandelten Mäusen wurden am Tag 89 nach der ersten Immunisierung durchgeführt (Abb. 10).

Es wurde ein Zusammenhang zwischen klinischer und histologischer Untersuchung festgestellt. Mäuse mit schwerer Arthritis zeigten Knorpelzerstörung mit starker Fibroblasteninfiltration und Proliferation der Synoviozyten mit Pannusbildung (Abb. 10b). Trotz der Immunisierung mit bCII zeigten die Gelenke der Tiere, die drei Mal mit anti-CD137-Antikörper behandelt wurden, keinen pathologischen Befund. Das Gelenk war mit der Gelenksstruktur der nativen Mäuse vergleichbar (Abb.10a, 10c).



**Abb. 10: Gelenkhistologie von DBA/1J Mäusen am Tag 89 nach bCII-Immunisierung.** Gezeigt ist die Histologie des Kniegelenkes einer nativen Maus (a), einer lediglich mit bCII immunisierten Maus (b) und einer mit bCII immunisierten und dreimalig mit anti-CD137 therapierten Maus (c). Der Pfeil in (b) zeigt die Stelle der Fibroblasten- und Synoviozytenproliferation. JS = Gelenkspalt, C = Gelenkknorpel, S = Membrana synovialis.

### 3.3 FACS-Analyse der Splenozyten

Um den Effekt der anti-CD137-Behandlung auf verschiedene Lymphozyten-Populationen zu untersuchen, wurden murine Lymphozyten aus Milzen nach Markierung mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächen-Moleküle mittels durchflußzytometrischer Analyse gezählt, gemessen und ausgewertet.

Die Milzen von Mäusen, welche mit anti-CD137-behandelt wurden, hatten ein größeres Gewicht und eine größere Dimension (Abb. 11).



<b>nativ</b>	0.0813 g
<b>bCII</b>	0.1035 g
<b>bCII + anti-CD137</b>	0.4094 g
<b>anti-CD137</b>	0.4144 g

**Abb. 11: Milzveränderungen in DBA1/J-Mäusen nach dreimaliger Gabe von anti-CD137.** Die Milzen wurden 28 Tage nach Versuchsbeginn exstirpiert. Zu sehen sind die Milzen (von links nach rechts) einer nativen, einer mit bCII-immunisierten, einer mit bCII-immunisierten und anti-CD137 therapierten und einer nur mit anti-CD137 behandelten Maus. Das Gewicht der einzelnen Milzen ist in der mitaufgeführten Tabelle dargestellt.

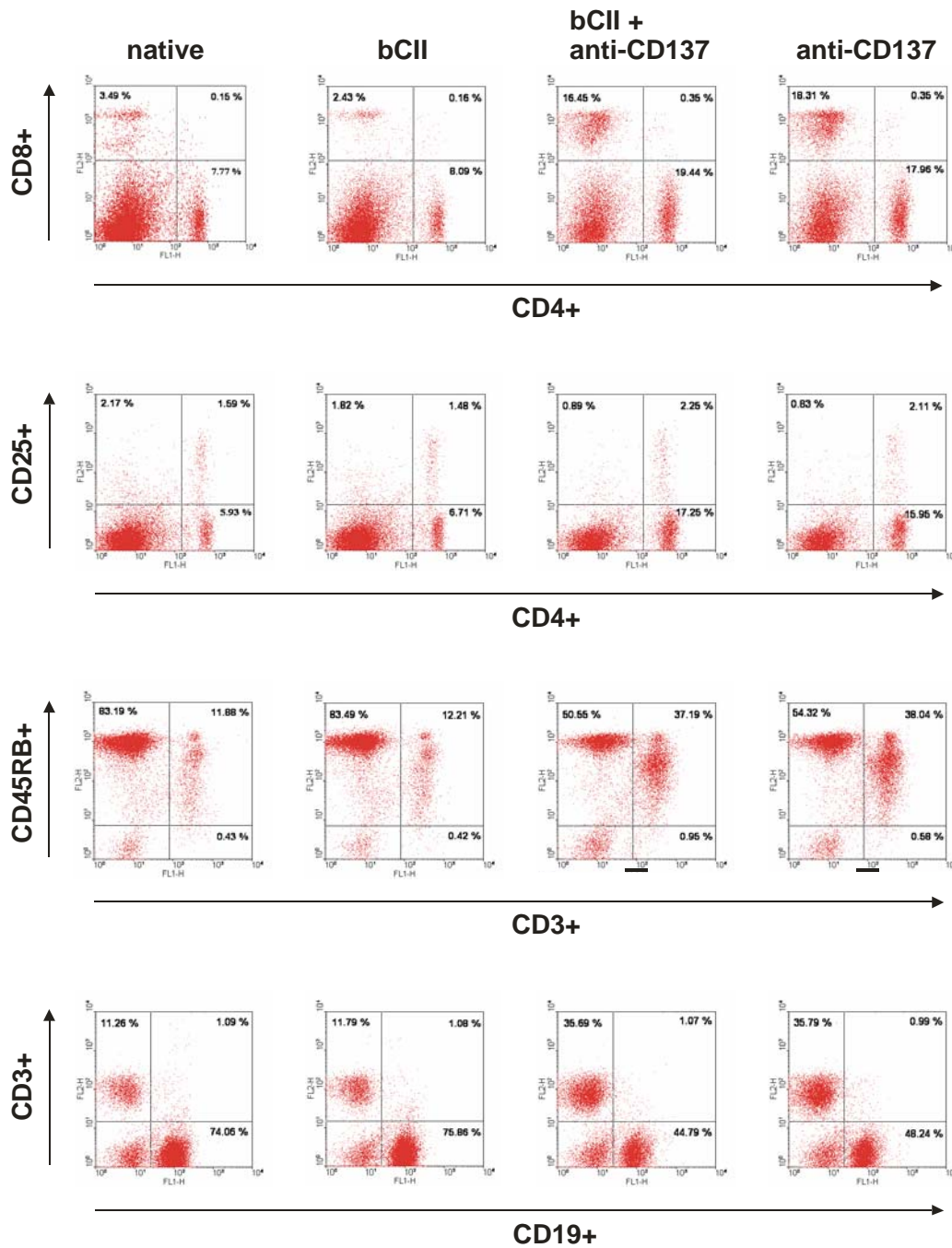


---

Auch wenn die Splenomegalie der Splenozyten-Zahl entsprach, war die relative Zellzahl in Relation zum Organgewicht erniedrigt.

In Abbildung 12 sind die Auswertungen der FACS-Analyse dargestellt. Auf der horizontalen Achse sind die FITC-markierten Zellen (Fluoreszenz 1) abgebildet und mit ihrem Prozentsatz eingetragen. Auf der vertikalen Achse stehen die PE-markierten Zellen (Fluoreszenz 2).

Nach der anti-CD137-Behandlung und unabhängig von der bCII-Immunisierung waren in den beiden mit Antikörper therapierten Mäusegruppen die Prozentsätze der Lymphozyten-Subpopulationen ähnlich repräsentiert (Abb. 12). Um die Analyse der Ergebnisse zu erleichtern, wurden die zwei Gruppen, die mit bCII immunisiert wurden, verglichen. Es zeigte sich eine Zunahme des relativen Prozentsatzes (11.8% versus 35.7%) von CD3<sup>+</sup> T-Zellen in der mit anti-CD137-Antikörper behandelten Gruppe. Diese Zunahme von CD3<sup>+</sup> T-Zellen war hauptsächlich durch CD8<sup>+</sup> Zellen (2.4% versus 16.5%) repräsentiert, verglichen mit der CD4<sup>+</sup> Subpopulation (8.1% versus 19.4%). Zusätzlich war eine deutliche Zunahme der CD3<sup>+</sup>CD45RB<sup>+</sup> T-Lymphozyten (12.2% versus 37.2%) in den mit anti-CD137-Antikörper behandelten Mäusen festzustellen. Der Prozentsatz der CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> doppelt positiven Zellen in dieser Gruppe hatte eine leichte Steigerung gezeigt (1.5% versus 2.3%). Anders zeigte sich der Prozentsatz der B-Zellen (CD19<sup>+</sup>). Obwohl die totale Zahl der B-Zellen in allen Gruppen ähnlich war, änderte sich der prozentuale Anteil der B-Zellen in den Gruppen, welche die Behandlung mit anti-CD137-Antikörper bekommen haben. Er war deutlich niedriger (75.9% versus 44.8%) im Vergleich zu den anderen zwei Gruppen.



**Abb. 12: FACS Analyse der Splenozyten von DBA1/J-Mäusen.** Die Nummern in den einzelnen Quadranten repräsentieren den prozentualen Anteil der mit FITC (horizontale Achse) oder PE (vertikale Achse) markierten Zellen. Die doppelt positiven Zellen sind im oberen rechten Quadranten dargestellt. Splenozyten von nativen, nur mit bCII immunisierten, mit bCII immunisierten und mit anti-CD137 therapierten und mit nur anti-CD137 behandelten Tieren sind entsprechend dargestellt.

---

## 4. Diskussion

Für die Entstehung der CIA ist eine T-Helfer- und B-Zellaktivierung nötig (19, 36, 83, 96, 102). T-Zellen und Serum von erkrankten Tieren sind für die Übertragung der Arthritis erforderlich (33, 44, 89, 90). Die Gabe eines agonistischen, monoklonalen Antikörpers gegen den CD-137 T-Zellrezeptor verhindert die Antikörperausbildung gegen T-zellabhängige Antigene, besonders wenn der anti-CD137-Antikörper gleichzeitig zur initialen Immunisierung verabreicht wird (67). Dies geschieht *in vivo* nicht durch eine direkte Beeinflussung der Funktion von B-Zellen, sondern durch die Induktion einer persistierenden T-Helfer-Zell-Anergie. Dieser Effekt konnte allerdings nicht nach dem Beginn der T-zellabhängigen humoralen Immunantwort beobachtet werden.

Angesichts der pathogenetischen Rolle der T-Helfer-Zellen und damit der T-zellabhängigen Antikörper in der Entstehung und Entwicklung der inflammatorischen Autoimmunerkrankungen, stellte sich die Frage, ob ein agonistischer anti-CD137-Antikörper das Auftreten der CIA beeinflussen kann.

Die Gabe eines agonistischen anti-CD137-Antikörpers hemmte den Auftritt der CIA und die Ausbildung spezifischer anti-CII-IgG Antikörper in DBA/1J-Mäusen. Diese Unterdrückung der Erkrankung, die auch mikroskopisch verifiziert werden konnte, war dosis- und zeitabhängig. Die Tiere, die dreimalig mit Antikörper behandelt wurden, bekamen keine Arthritis während der 100-tägigen Beobachtung. Bei ihnen konnte keine humorale Immunantwort festgestellt werden. Die einmalig mit Antikörper gespritzten Mäuse zeigten eine vorübergehende oder verzögerte Erkrankung. Die Wirkung des Antikörpers war umso effektiver je früher er verabreicht wurde. Bei einmaliger Gabe konnte eine Arthritis in den Mäusen nur verhindert werden, wenn der Antikörper zum Zeitpunkt der initialen Immunisierung (Tag 0) gespritzt wurde. Andererseits

---

konnte bei manchen Mäusen die Arthritis auch noch gestoppt oder gelindert werden, wenn man den anti-CD137-Antikörper zum Zeitpunkt des Krankheitsausbruches injizierte. Es resultierte auch dann noch ein verminderter Schweregrad der Erkrankung, wenn die Tiere nach 110 Tagen erneut mit bCII immunisiert wurden und zuvor mit einer dreimaligen Gabe von anti-CD137 (Tag 0, 6 und 21) behandelt waren. Der Gewichtsverlust bei erkrankten Mäusen korrelierte mit dem Schweregrad der Erkrankung. FACS-Analysen zeigten eine Zunahme des relativen Prozentsatzes der CD4<sup>+</sup> und besonders der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in den Gruppen, die anti-CD137 erhielten.

Viele immunmodulatorische Substanzen hemmen mittels Immunsuppression die Entwicklung einer Autoimmunarthritits (18, 41, 49, 108, 110, 118). Dies könnte ebenfalls der Mechanismus sein, über den anti-CD137 die Entstehung und den Verlauf der CIA beeinflusst. Ein wichtiger Nachteil dieser immunmodulatorischen Substanzen ist aber ihr Wirkungsverlust, wenn die Autoimmunerkrankung bereits etabliert ist (49, 118). Lediglich in wenigen Fällen konnten diese Substanzen eine etablierte Arthritis modulieren (41, 42, 110). Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit anti-CD137 sogar ihre therapeutische Wirkung noch, wenn die Autoimmunmechanismen bereits ausgelöst waren. In den durchgeführten Experimenten zeigten die behandelten Mäuse eine lang anhaltende Resistenz gegenüber einer erneuten Krankheitsinduktion. Der Schutz vor der Entwicklung einer Arthritis erwies sich als länger als die Halbwertszeit des gespritzten Antikörpers (67). Dies weist darauf hin, dass die Behandlung mit anti-CD137 nicht nur die pathogenetischen Autoimmunmechanismen in der Induktion der CIA verhindern oder stoppen kann, sondern eine aktive und lang andauernde Immunsuppression auf zellulärer Ebene auslöst. Anti-CD137 kann deshalb als ein Immunsuppressivum und als ein Immunregulator betrachtet werden.

---

Studien zeigten zwei verschiedene Auswirkungen auf die Immunregulation nach der Applikation der anti-CD137-Antikörper. Auf der einen Seite verstärkt der Antikörper den Effekt von antigen-spezifischen, zytotoxischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen (38, 64, 66, 86, 99) und auf der anderen Seite verhindert er die humorale Immunantwort durch die Hemmung von CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen (20, 67, 94). Die zuletzt erwähnte suppressive Wirkung könnte durch eine direkte Unterdrückung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder durch die Aktivierung regulatoriver CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die eine Anergie der CD4<sup>+</sup> T-Zellen bewirken, erklärt werden (67). Unter Berücksichtigung, dass die anti-CD137-Gabe zur starken Aktivierung und zum Überleben von hauptsächlich CD8<sup>+</sup> T-Zellen führt (38, 86, 99), könnte die Beteiligung der regulatorischen und suppressiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Verhinderung der Autoimmunmechanismen bei der CIA als Erklärung herangezogen werden. Mehrere Versuche konnten die Rolle der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Suppression autoreaktiver T-Zellen *in vivo* bestätigen (23, 48, 55). Es wurde gezeigt, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen eine Immunsuppression durch zytotoxische Zerstörung der aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (39) und der APCs (87) auslösen. Laut Myers et al. konnte die anti-CD137-Behandlung im Maus-Modell die Aktivierung von CD8<sup>+</sup> Suppressor-T-Zellen induzieren (71, 72). Diese CD8<sup>+</sup> Suppressor-T-Zellen setzen TGF- $\beta$  (engl.: tumor growth factor  $\beta$ ) frei, welches einen inhibitorischen Effekt auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen hatte (71). Eine andere Gruppe beschrieb, dass dendritische Zellen eine Population von regulatorischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen induzierten, die IL-10 freisetzen und keinen zytolytischen Effekt aufwiesen (26). Die regulatorische Rolle der CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Hemmung der Autoimmunität ist bekannt (10, 11, 16, 26, 40, 54, 56, 73). Dies könnte den lang anhaltenden Schutz gegen die CIA-Induktion, den die mit anti-CD137-Antikörper behandelten Mäuse zeigten, erklären.

Bei der Behandlung mit anti-CD137-Antikörpern wurden nach bCII-Immunisierung keine bzw. in reduziertem Maße IgG-anti-CII-Antikörper gebildet. Die deutlich reduzierte Inzidenz und Schwere der Arthritis nach Behandlung mit

---

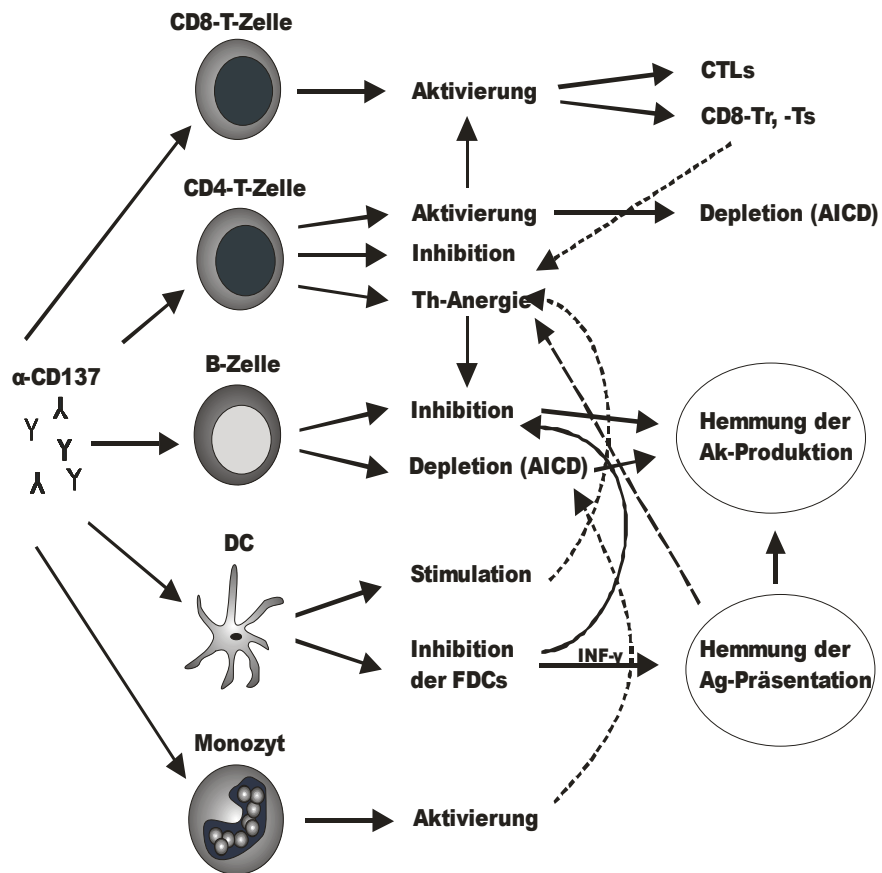
anti-CD137-Antikörpern könnte auf eine fehlende anti-CII-Antikörperproduktion zurückzuführen sein. Spezifische IgG-anti-CII-Antikörper sind mitverantwortlich für die Entstehung der Arthritis (32, 57, 91, 96, 103), was mittels Übertragungsexperimenten mit Serum erkrankter Tiere bestätigt werden konnte (33, 89, 90, 102). Antigen-spezifische T-Zellen konnten gebildet werden, aber eine Erkrankung trat aufgrund der fehlenden humoralen Immunantwort nicht auf. Mittels FACS-Analyse wurde ein niedriger relativer Prozentsatz der B-Lymphozyten in den Gruppen, die mit anti-CD137 behandelt wurden, gezeigt. Da B-Zellen kein CD-137 Molekül exprimieren, kann die Depletion dieser Population lediglich durch einen indirekten Effekt des anti-CD137-Antikörpers erfolgen. Die Hemmung der humoralen Immunantwort gegen Collagen II könnte auf eine beeinträchtigte Helferfunktion der CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückgeführt werden. Eine direkte Induktion der T-Helfer-Zell-Anergie oder eine Blockade der Aktivierung dieser Zellen durch regulatorische T-Zellen nach der Behandlung mit anti-CD137-Antikörper wurde von Mittler et al. gezeigt (67). Bei NZB/W F1 Mäusen, einem Modell einer Autoimmunerkrankung (SLE), wurde die Ausbildung von Autoantikörpern nach CD137-Behandlung unterdrückt (20). In diesem Modell wurde eine lang anhaltende Hemmung der humoralen Immunantwort gegen Autoantigene und ein schützender Effekt gegen den Auftritt einer spontanen Erkrankung beobachtet. Die Suppression der Autoimmunität im murinen SLE-Modell wurde der Hemmung der B-Zell-Reifung in Keimzentren der Milz aufgrund des Mangels an CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen zugeschrieben (20). Auf eine Hemmung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Stimulation bei der Interaktion mit dendritischen Zellen wurde auch hingewiesen (20). Laut anderen Autoren (45, 94) könnte die Aktivierung der Makrophagen/Monozyten mittels CD137-Kostimulation eine induzierte Apoptose der B-Lymphozyten mit Hemmung der Autoantikörper-Produktion hervorrufen.

Die Expression des CD25-Moleküls auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen war höher in mit anti-CD137 behandelten Mäusen. Zusätzlich waren CD3<sup>+</sup> T-Zellen in hohem Maße

---

auch CD45RB positiv bei behandelten Tieren. Verschiedene regulatorische T-Zellen sind sowohl bei Menschen als auch bei Mäusen bekannt (1, 5, 12, 62, 63, 79, 80, 85). Sowohl CD8<sup>+</sup> als auch CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurde eine suppressive Rolle zugeschrieben (75). Wie oben diskutiert wurde, könnte die Behandlung mit anti-CD137-Antikörpern eine Verhinderung der Entstehung der Arthritis mittels regulatorischer CD8<sup>+</sup> T-Zellen bewirken. Da bei CD8-defizienten Mäusen eine antigenspezifische T-Zell-Anergie beobachtet werden konnte (97), ist eine ausschließlich durch CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermittelte Suppression aber unwahrscheinlich. Eine inhibitorische Wirkung von regulatorischen CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf die Proliferation der T-Helferzellen wurde ebenfalls gezeigt (53). Die Expression von CD25- ( $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors) und CD45RB- (Maus), CD45RO- (Human) bzw. CD45RC- (Ratte) Molekülen wurden als Marker für regulatorische CD4<sup>+</sup> T-Zellen identifiziert (6, 21, 28, 81). Bei DBA/1 Mäusen rief die Depletion von CD25<sup>+</sup> T-Zellen eine schwere Arthritis hervor (69). Eine Zunahme der CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen nach der Behandlung mit anti-CD137 wurde im murinen SLE-Modell beobachtet (20). Eine regulatorische Rolle des auf T-Zellen exprimierten 4-1BB-Moleküls wurde bei Lee et al. vorgeschlagen (52). Die Autoren zeigten, dass aktivierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die kein 4-1BB-Molekül exprimieren können (4-1BB [-/-]), eine hyperreaktive Antwort gegen Antigen *in vivo* zeigten.

Eine Zusammenfassung der verschiedenen Hypothesen bezüglich der Auswirkungen der anti-CD137-Therapie auf die Immunantwort ist in Abbildung 13 dargestellt.



**Abb. 13: Auswirkungen der Gabe eines agonistischen monoklonalen anti-CD137-Antikörpers auf verschiedene Zellpopulationen des Immunsystems.** CTLs: zytotoxische T-Lymphozyten, DC: dendritische Zellen, FDCs: folliculäre dendritische Zellen, Th: T-Helfer-Zellen, Tr: T-Regulatorzellen, Ts: Suppressor-T-Zellen.

Die Behandlung mit anti-CD137-Antikörpern führte zu einer Splenomegalie. Ein ähnlicher Befund wurde ebenfalls von anderen Autoren beobachtet (20). Eine Splenomegalie ist auch von Zhu et al. bei CD137L-transgenen Mäusen beschrieben worden (119). Die Induktion der T-Zell- und APC-Proliferation unter der Wirkung von anti-CD137 könnte eine Erklärung für die Splenomegalie in behandelten Tieren sein.

Die Toleranz gegen eigene Antigene ist eine wichtige Fähigkeit des Immunsystems, um Autoimmunerkrankungen zu unterdrücken. Toleranz-



---

Mechanismen schließen die Wirkung von regulatorischen T-Zellen ein. Durch den Verlust von Regulationsmechanismen kann eine Autoimmunität induziert werden. Zahlreiche Versuche gehen in die Richtung, regulatorische oder suppressive Zellen *in vivo* durch die Applikation von immunmodulatorischen Substanzen zu erzeugen. Die therapeutische Nutzung des agonistischen anti-CD137-Antikörpers könnte ein neues Konzept in der Therapie von Autoimmunerkrankungen bedeuten.

---

## 5. Zusammenfassung

Die Collagen induzierte Arthritis ist eine experimentelle Autoimmunkrankheit in Mäusen, die als ein Modell der rheumatoiden Arthritis und der juvenilen idiopathischen Arthritis gilt.

CD137 (4-1BB) ist ein kostimulatorisches Molekül, das in der Frühphase der T-Zell-Aktivierung exprimiert wird. Ein agonistischer anti-CD137-Antikörper verhindert die humorale Immunantwort gegen T-Zell-abhängige Antigene. Dies geschieht *in vivo* nicht durch eine direkte Beeinflussung der Funktion von B-Zellen, sondern durch die Induktion einer lang anhaltenden Anergie von T-Helfer-Zellen. Da die T-Helfer-Zellen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese der CIA spielen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss eines spezifischen, agonistischen anti-CD137-Antikörpers auf die Induktion und den Verlauf von CIA untersucht.

DBA/1J-Mäuse wurden mit bovinem Collagen II immunisiert und mit einem agonistischen anti-CD137-Antikörper behandelt. Die Tiere wurden zweimal pro Woche untersucht und ihr anti-Collagen-II-Antikörper-Spiegel im Serum gemessen. Außerdem wurden histologische Untersuchungen und FACS-Analysen durchgeführt. Die dreimalige Gabe von anti-CD137-Antikörpern konnte den Ausbruch der CIA und die humorale Immunantwort gegen CII verhindern. Eine einmalige Gabe des Antikörpers konnte den Ausbruch der Krankheit verhindern oder deutlich mildern, vor allem wenn anti-CD137 zum Zeitpunkt der initialen Immunisierung gegeben wurde. Ein verminderter Schweregrad der Erkrankung resultierte auch dann noch, wenn die Tiere nach dreimaliger, initialer Gabe von anti-CD137 nach 112 Tagen erneut mit Collagen II immunisiert wurden.

---

Eine Zunahme des relativen Prozentsatzes der T-Zell-Population, die hauptsächlich von CD8<sup>+</sup> T-Zellen repräsentiert war, wurde mittels FACS-Analyse in den mit anti-CD137 behandelten Gruppen gezeigt. Als Erklärung der Verhinderung des Ausbruches der Arthritis könnte die Aktivierung von regulatorischen und suppressiven CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit der nachfolgenden Hemmung der T-Helfer-Zellen herangezogen werden.

Die Ergebnisse zeigen klar, dass die Behandlung mit dem agonistischen anti-CD137-Antikörper den Ausbruch der CIA verhindern oder mildern kann. Für die Therapie und einer gesteigerten Erkenntnis in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen könnte die Behandlung mit einem agonistischen anti-CD137-Antikörper ein neues Konzept bedeuten.

---

## 6. Literaturverzeichnis

1. Annunziato, F., Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S. (2002) Phenotype, localization, and mechanism of suppression of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> human thymocytes. *J. Exp. Med.* **196**, 379-387
2. Banerjee, S., Wei, B.Y., Hillman, K., Luthra, H.S., David, C.S. (1988) Immunosuppression of collagen-induced arthritis in mice with an anti-IL-2 receptor antibody. *J. Immunol.* **141**, 1150-1154
3. Boissier M.C., Chiocchia G., Bessis, N., Hajnal, J., Garotta, G., Nicoletti, F., Fournier, C. (1995) Biphasic effect of interferon- $\gamma$  in murine collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1184-1190
4. Bretscher, P. (1992) The two-signal model of lymphocyte activation twenty-one years later. *Immunol. Today* **13**, 74-76
5. Chen, W., Wahl, S.M. (2003) TGF- $\beta$ : the missing link in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine growth factor Rev.* **14**, 85-89
6. Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., Weiner, H.L. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* **265**, 1237-1240
7. Chiocchia, G. Boissier, M.C., Fournier, C. (1991) Therapy against murine collagen-induced arthritis with T cell receptor V $\beta$ -specific antibodies. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2899-2905
8. Chu, C.Q., Londei, M. (1996) Induction of Th2 cytokines and control of collagen-induced arthritis by nondepleting anti-CD4 Abs. *J. Immunol.* **157**, 2685-2689
9. Chu, N.R., DeBenedette, M.A., Stiernholm, B.J., Barber, B.H., Watts, T.H. (1997) Role of IL-12 and 4-1BB ligand in cytokine production by CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> T cells. *J. Immunol.* **158**, 3081-3089
10. Ciubotariu, R., Colovai, A.I., Pennesi, G., Liu, Z., Smith, D., Berlocco, P., Cortesini, R., Suci-Foca, N. (1998) Specific suppression of human CD4<sup>+</sup> Th cell responses to pig MHC antigens by CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> regulatory T cells. *J. Immunol.* **161**, 5193-5202

11. Colovai, A. I., Liu, Z., Ciubotariu, R., Lederman, S., Cortesini, R., Suciufoca, N. (2000) Induction of xenoreactive CD4<sup>+</sup> T-cell anergy by suppressor CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells. *Transplantation* **69**, 1304-1310
12. Cosmi, L., Liotta, F., Lazzeri, E., Francalanci, M., Angeli, R., Mazzinghi, B., Santarasci, V., Manetti, R., Vanini, V., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., Annunziato, F. (2003) Human CD8<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> thymocytes sharing phenotypic and functional features with CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory thymocytes. *Blood* **102**, 407-414
13. Courtenay, J.S., Dallman, M.J., Dayan, A.D., Martin, A., Mosedale B. (1980) Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature* **283**, 666-668
14. Croft, M. (2003) Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 609-620
15. DeBenedette, M.A., Shahinian, A., Mak, T.W., Watts, T.H. (1997) Costimulation of CD28-T lymphocytes by 4-1BB ligand. *J. Immunol.* **158**, 551-559
16. Dorf, M.E., Benacerraf, B. (1984) Suppressor cells and immunoregulation. *Annu. Rev. Immunol.* **2**, 127-157
17. Dullforce, P. Sutton, D.C., Heath, A.W. (1998) Enhancement of T cell-independent immune responses in vivo by CD40 antibodies. *Nat. Med.* **4**, 88-91
18. Durie, F.H., Fava, R.A., Foy, T.M., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Noelle, R.J. (1993) Prevention of collagen-induced arthritis with an antibody to gp39, the ligand for CD40. *Science* **261**, 1328-1330
19. Edwards, J.C., Cambridge G. (2001) Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes. *Rheumatology (Oxford)* **40**, 205-211
20. Foell, J., Strahotin, S., O'Neil, Sh.P., McCausland, M.M., Suwyn, C., Haber, M., Chander, P.N., Bapat, A.S., Yan, X., Chiorazzi, N., Hoffmann., M.K., Mittler, R.S. (2003) CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F<sub>1</sub> mice. *J. Clin. Invest.* **111**, 1505-1518
21. Fowell, D., Mason, D. (1993) Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. *Characterization*

- of the CD4<sup>+</sup> T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J. Exp. Med.* **177**, 627-636
22. Futagawa T., Akiba, H., Kodama, T., Takeda, K., Hosoda, Y., Yagita, H., Okumura, K. (2002) Expression and function of 4-1BB and 4-1BB ligand on murine dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**, 275-286
  23. Gaur, A., Ruberti, G., Haspel, R., Mayer, J.P., Fathman, C.G. (1993) Requirement for CD8<sup>+</sup> cells in T cell receptor peptide-induced clonal unresponsiveness. *Science* **259**, 91-94
  24. Gavin, M.A., Clarke, S.R., Negrou, E., Gallegos, A., Rudensky, A. (2002) Homeostasis and anergy of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells *in vivo*. *Nat. Immunol.* **3**, 33-41
  25. Gerber, N.J. (1998) Rheumatoid arthritis. In: Gerber N.J. et al. (Hrsg.). *Rheumatologie in Kürze*. Stuttgart, New York: Thieme, 73-87
  26. Gilliet, M., Liu, Y.J. (2002) Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**, 695-704
  27. Gramaglia, I., Cooper, D., Miner, K.T., Kwon, B.S., Croft, M. (2000) Co-stimulation of antigen-specific CD4 T cells by 4-1BB ligand. *Eur. J. Immunol.* **30**, 392-402
  28. Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J.E., Roncarolo, M.G. (1997) A CD4<sup>+</sup> T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* **389**, 737-742
  29. Halstead, E.S., Mueller, Y.M., Altman, J.D., Katsikis, P.D. (2002) In vivo stimulation of CD137 broadens primary antiviral CD8<sup>+</sup> T cell responses. *Nat. Immunol.* **3**, 536-541
  30. Heinisch I.V., Daigle, I., Knopfli, B., Simon, H.U. (2000) CD137 activation abrogates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-mediated anti-apoptosis in neutrophils. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3441-3446
  31. Holmdahl, R., Andersson, M., Goldschmidt, T.J., Gustafsson, K., Jansson, L., Mo, J.A. (1990) Type II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol. Rev.* **118**, 193-232
  32. Holmdahl, R., Jansson, L., Gullberg, D., Rubin, K., Forsberg, P.O., Klareskog, L. (1985) Incidence of arthritis and autoreactivity of anti-

- collagen antibodies after immunization of DBA/1 mice with heterologous and autologous collagen II. Clin. Exp. Immunol. **62**, 639-646
33. Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, A., Jonsson, R. (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**, 147-157
  34. Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, E., Rubin, K., Klareskog, L. (1986) Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. Arthritis Rheum. **29**, 106-113
  35. Holmdahl, R., Klareskog, L., Andersson M., Hansen C. (1986) High antibody response to autologous type II collagen is restricted to H-2<sup>q</sup>. Immunogenetics **24**, 84-89
  36. Holmdahl, R., Klareskog, L., Rubin, K., Larsson, E., Wigzell, H. (1985) T lymphocytes in collagen II-induced arthritis in mice. Characterization of arthritogenic collagen II-specific T-cell lines and clones. Scand. J. Immunol. **22**, 295-306
  37. Hong, H.J., Lee J.W., Park, S.S., Kang, Y.J., Chang, S.Y., Kim, K.M., Kim, J.O., Murthy, K.K., Payne, J.S., Yoon, S.K., Park, M.J., Kim, I.C., Kim, J.G., Kang, C.Y. (2000) A humanized anti-4-1BB monoclonal antibody suppresses antigen-induced humoral immune response in nonhuman primates. J. Immunother. **23**, 613-621
  38. Hurtado, J.C., Kim, Y.J., Kwon, B.S. (1997) Signals through 4-1BB are costimulatory to previously activated splenic T cells and inhibit activation-induced cell death. J. Immunol. **158**, 2600-2609
  39. Jiang, H., Ware, R., Stall, A., Flaherty, L., Chess, L., Pernis, B. (1995) Murine CD8<sup>+</sup> T cells that specifically delete autologous CD4<sup>+</sup> T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. Immunity **2**, 185-194
  40. Jiang, S., Tugulea, S., Pennesi, G, Liu, Z., Mulder, A., Lederman, S., Harris, P., Cortesini, R., Suci-Foca, N. (1998) Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming *in vitro*. Hum. Immunol. **59**, 690-699
  41. Joosten, L.A.B., Helsen, M.M.A., Saxne, T., van de Loo, F.A.J., Heinegard, D., van den Berg, W.B. (1999) IL-1 $\alpha$  blockade prevents cartilage and bone destruction in murine type II collagen-induced

- arthritis, whereas TNF- $\alpha$  blockade only ameliorates joint inflammation. *J. Immunol.* **163**, 5049-5055
42. Joosten, L.A.B., Lubberts, E., Helsen, M.M.A., Saxne, T., Coenen-de Roo, C.J., Heinegard, D., van den Berg, W.B. (1999) Protection against cartilage and bone destruction by systemic interleukin-4 treatment in established murine type II collagen-induced arthritis. *Arthritis Res.* **1**, 81-91
  43. June, C.H., Bluestone, J.A., Nadler, L.M., Thompson, C.B. (1994) The B7 und CD28 receptor families. *Immunol. Today* **15**, 321-331
  44. Kadowaki, K.M., Matsuno, H., Tsuji, H., Tunru, I. (1994) CD4<sup>+</sup> T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin. Exp. Immunol.* **97**, 212-218
  45. Kienzle, G., von Kempis, J. (2000) CD137 (ILA/4-1BB), expressed by primary human monocytes, induces monocyte activation and apoptosis of B lymphocytes. *Int. Immunol.* **12**, 73-82
  46. Kim, Y.J., Kim S.H., Mantel, P., Kwon, B.S. (1998) Human 4-1BB regulates CD28 co-stimulation to promote Th1 cell responses. *Eur. J. Immunol.* **28**, 881-890
  47. Kleinau, S., Martinsson, P., Heyman, B. (2000) Induction and suppression of collagen-induced arthritis is dependent on distinct Fc $\gamma$  receptors. *J. Exp. Med.* **191**, 1611-1616
  48. Koh, D.R., Fung-Leung, W.P., Ho, A., Gray, D., Acha-Orbea, H., Mak, T.W. (1992) Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8<sup>-/-</sup> mice. *Science* **256**, 1210-1213
  49. Kyburz, D., Carson, D.A., Corr, M. (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**, 2571-2577
  50. Lanzavecchia, A., Sallusto, F. (2000) Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science* **290**, 92-97
  51. Lee, S.C., Ju, S.A., Pack, H.N., Heo, S.K., Suh, J.H., Park, S.M., Choi, B.K., Kwon, B.S., Kim, B.S. (2005) 4-1BB (CD137) is required for rapid clearance of *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* **73**, 5144-5151



- 
52. Lee, S.W., Vella, A.T., Kwon, B.S., Croft, M. (2005) Enhanced CD4 T cell responsiveness in the absence of 4-1BB. *J. Immunol.* **174**, 6803-6808
  53. Lehmann, J., Huehn, J., de la Rosa, M., Maszyra, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., Hamann, A. (2002) Expression of the integrin  $\alpha\text{E}\beta\text{7}$  identifies unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 13031-13036
  54. Li, J., Liu, Z., Jiang, S., Cortesini, R., Lederman, S., Suci-Foca, N. (1999) T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J. Immunol.* **163**, 6386-6392
  55. Lider, O., Reshef, T., Beraud, E., Ben-Nun, A., Cohen, I.R. (1998) Anti-idiotypic network induced by T cell vaccination against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Science* **239**, 181-183
  56. Liu, Z., Tugulea, S., Cortesini, R., Suci-Foca, N. (1998) Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells. *Int. Immunol.* **10**, 775-783
  57. Luross, J.A., Williams, N.A. (2001) The genetic and immunopathological processes underlying collagen-induced arthritis. *Immunology* **103**, 407-416
  58. Manoury-Schwartz, B., Chiochia, G., Bessis, N., Abehsira-Amar, O., Batteux, F., Muller, S., Huang, S., Boissier, M.C., Fournier, C. (1997) High susceptibility to collagen-induced arthritis in mice lacking IFN- $\gamma$  receptors. *J. Immunol.* **158**, 5501-5506
  59. Mauri, C., Chu, C.Q., Woodrow, D., Mori, L., Londei, M. (1997) Treatment of a newly established transgenic model of chronic arthritis with nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody. *J. Immunol.* **159**, 5032-5041
  60. Mauri, C., Mars, L.T., Londei, M. (2000) Therapeutic activity of agonistic monoclonal antibodies against CD40 in a chronic autoimmune inflammatory process. *Nat. Med.* **6**, 673-679
  61. Mauri, C., Williams, R.O., Walmsley, M., Feldmann, M. (1996) Relationship between Th1/Th2 cytokine patterns and the arthritogenic response in collagen-induced arthritis. *Eur. J. Immunol.* **26**, 1511-1518
  62. McHugh, R.S., Shevach, E.M. (2002) The role of suppression T cells in regulation of immune responses. *J. Allergy Clin. Immunol.* **110**, 693-702

- 
63. McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., Byrne, M.C. (2002) CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* **16**, 311-323
  64. Melero, I., Bach, N., Hellström, K.E., Aruffo, A., Mittler, R.S., Chen, L. (1998) Amplification of tumor immunity by gene transfer of the co-stimulatory 4-1BB ligand: synergy with the CD28 co-stimulatory pathway. *Eur. J. Immunol.* **28**, 1116-1121
  65. Melero, I., Johnston, J.V., Shuford, W.W., Mittler, R.S., Chen, L. (1998) NK1.1 cells express 4-1BB (CDw137) costimulatory molecule and are required for tumor immunity elicited by anti-4-1BB monoclonal antibodies. *Cell Immunol.* **190**, 167-172
  66. Melero, I., Shuford, W.W., Newby S.A., Aruffo, A., Ledbetter, J.A., Hellström, K.E., Mittler, R.S., Chen, L. (1997) Monoclonal antibodies against the 4-1BB T-cell activation molecule eradicate established tumors. *Nat. Med.* **3**, 682-685
  67. Mittler, R.S., Bailey, T.S., Klussman, K., Trailsmith, M.D., Hoffmann, M.K. (1999) Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune response in vivo through the induction of helper T cell anergy. *J. Exp. Med.* **190**, 1535-1540
  68. Moder, K.G., Luthra, H.S., Kubo, R., Griffiths, M., David, C.S. (1992) Prevention of collagen-induced arthritis in mice by treatment with an antibody directed against the T cell receptor alpha beta framework. *Autoimmunity* **11**, 219-224
  69. Morgan, M.E., Suttmuller, R.P.M., Witteveen H.J., van Duivenvoorde, L.M., Zanelli, E., Melief, C.J.M., Snijders, A., Offringa, R., de Vries, R.R.P., Toes, R.E.M. (2003) CD25<sup>+</sup> cell depletion hastens the onset of severe disease in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.* **48**, 1452-1460
  70. Myers, L.K., Rosloniec, E.F., Cremer, M.A., Kang, A.H. (1997) Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci.* **61**, 1861-1878
  71. Myers, L., Takahashi, C., Mittler, R.S., Rossi, R.J., Vella, A.T. (2003) Effector CD8 T cells possess suppressor function after 4-1BB and Toll-like receptor triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 5348-5353

- 
72. Myers, L., Vella A.T. (2005) Interfacing T-cell effector and regulatory function through CD137 (4-1BB) co-stimulation. *Trends Immunol.* **26**, 440-446
  73. Najafian, N., Chitnis, T., Salama, A.D., Zhu, B., Benou, C., Yuan, X., Clarkson, M.R., Sayegh, M.H., Khoury, S.J. (2003) Regulatory functions of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells in an autoimmune disease model. *J. Clin. Invest.* **112**, 1037-1048
  74. Okamoto, Y., Gotoh, Y., Tokui, H., Mizuno, A., Kobayashi, Y., Nishida, M. (2000) Characterization of the cytokine network at a single cell level in mice with collagen-induced arthritis using a dual color ELISPOT assay. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**, 55-61
  75. Padberg, W.M., Lord, R.H., Kupiec-Weglinski, J.W., Williams, J.M., Di Stefano, R., Thornburg, L.E., Araneda, D., Strom, T.B., Tilney, N.L. (1987) Two phenotypically distinct populations of T cells have suppressor capabilities simultaneously in the maintenance phase of immunologic enhancement. *J. Immunol.* **139**, 1751-1757
  76. Pollok, K.E., Kim, Y.J., Hurtado, J., Zhou, Z., Kim, K.K., Kwon, B.S. (1994) 4-1BB T-cell antigen binds to mature B cells and macrophages, and costimulates anti- $\mu$ -primed splenic B cells. *Eur. J. Immunol.* **24**, 367-374
  77. Pollok, K.E., Kim, Y.J., Zhou, Z., Hurtado, J., Kim, K.K., Pickard, R.T., Kwon, B.S. (1993) Inducible T cell antigen 4-1BB. Analysis of expression and function. *J. Immunol.* **150**, 771-781
  78. Ranges, G.E., Sriram, S., Cooper, S. (1985) Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J. Exp. Med.* **162**, 1105-1110
  79. Read, S., Powrie, F. (2001) CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **13**, 644-649
  80. Sakaguchi, S. (2000) Regulatory T cell: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*, **101**, 455-458
  81. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., Toda, M. (1995) Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**, 1151-1164

- 
82. Saoulli, K., Lee, S.Y., Cannons, J.L., Yeh, W.C., Santana, A., Goldstein, M.D., Bangia, N., DeBenedette, M.A., Mak, T.W., Choi, Y., Watts, T.H. (1998) CD28-independent, TRAF2-dependent costimulation of resting T cells by 4-1BB ligand. *J. Exp. Med.* **187**, 1849-1862
  83. Seki, N., Sudo, Y., Yoshioka, T., Sugihara, S., Fujitsu, T., Sakuma, S., Ogawa, T., Hamaoka, T., Senoh, H., Fujiwara, H. (1988) Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J. Immunol.* **140**, 1477-1484
  84. Sharpe, A.H., Freeman, G.J. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 116-126
  85. Shevach, E.M. (2000) Regulatory T cells in autoimmunity. *Ann. Rev. Immunol.* **18**, 423-449
  86. Shuford, W.W., Klussman, K., Tritchler, D.D., Loo, D.T., Chalupny, J., Siadak, A.W., Brown, T.J., Emswiler, J., Raecho, H., Larsen, Ch., Pearson T., Ledbetter J.A., Aruffo, A., Mittler, R.S. (1997) 4-1BB costimulatory signals preferentially induce CD8<sup>+</sup> T cell proliferation and lead to the amplification in vivo of cytotoxic T cells responses. *J. Exp. Med.* **186**, 47-55
  87. Simpson, E. (1988) Suppression of the immune response by cytotoxic T cells. *Nature* **336**, 426
  88. Strunk, J., Lange, U., Müller-Ladner, U. (2005) Rheumatoide Arthritis. *Dtsch. Med. Wochenschr.* **130**; 1761-1768
  89. Stuart, J.M., Cremer, M.A., Townes, A.S., Kang, A.H. (1982) Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J. Exp. Med.* **155**, 1-16
  90. Stuart, J.M., Dixon, F.J. (1983) Serum transfer of collagen-induced arthritis in mice. *J. Exp. Med.* **158**, 378-392
  91. Stuart, J.M., Townes, A.S., Kang, A.H. (1982) Nature and specificity of the immune response to collagen in type II collagen-induced arthritis in mice. *J. Clin. Invest.* **69**, 673-683
  92. Stuart, J.M., Townes, A.S., Kang, A.H. (1985) Type II collagen-induced arthritis. *Ann. NY Acad. Sci.* **460**, 355-362

- 
93. Sun, Y., Chen, J.H., Fu, Y. (2004) Immunotherapy with agonistic anti-CD137: two sides of a coin. *Cell. Mol. Immunol.* **1**, 31-36
  94. Sun, Y., Chen, H.M., Subudhi, S.K., Chen, J., Koka, R., Chen, L., Fu, Y. (2002) Costimulatory molecule-targeted antibody therapy of a spontaneous autoimmune disease. *Nat. Med.* **8**, 1405-1413
  95. Sun, Y., Lin, X., Chen, H.M., Wu, Q., Subudhi, S.K., Chen, L., Fu, Y.X. (2002) Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* **168**, 1457-1465
  96. Svensson, L., Jirholt, R., Holmdahl, R., Jansson, L. (1998) B-cell deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA). *Clin. Exp. Immunol.* **111**; 521-526
  97. Tada, Y., Ho, A., Koh, D., Mak, T.W. (1996) Collagen-induced arthritis in CD4- or CD8-deficient mice: CD8<sup>+</sup> T cells play a role in initiation and regulate recovery phase of collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* **156**, 4520-4526
  98. Tada, Y., Nagasawa, K., Ho, A., Morito, F., Ushiyama, O., Suzuki, N., Ohta, H., Mak, T.W. (1999) CD28-deficient mice are highly resistant to collagen-induced arthritis. *J. Immunol.* **162**, 203-208
  99. Takahashi, Ch., Mittler R.S., Vella, A.T. (1999) Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal. *J. Immunol.* **162**, 5037-5040
  100. Tan, J.T., Whitmire, J.K., Ahmed, R., Pearson, T.C., Larsen, C.P. (1999) 4-1-BB ligand, a member of the TNF family, is important for the generation of antiviral CD8 T cell responses. *J. Immunol.* **163**, 4859-4868
  101. Tan, J.T., Whitmire, J.K., Murali-Krishna, K., Ahmed, R., Altman, J.D., Mittler, R.S., Sette, A., Pearson, T.C., Larsen, C.P. (2000) 4-1BB costimulation is required for protective anti-viral immunity after peptide vaccination. *J. Immunol.* **164**, 2320-2325
  102. Taylor, P.C., Plater-Zyberk, C., Maini R.N. (1995) The role of the B-cells in the adoptive transfer of collagen-induced arthritis from DBA/1 (H-2<sup>q</sup>) to SCID (H-2<sup>d</sup>) mice. *Eur. J. Immunol.* **27**, 763-769
  103. Terato, K., Hasty, K.A., Reife, R.A., Cremer, M.A., Kang, A.H., Stuart, J.M. (1992) Induction of arthritis with monoclonal antibodies to collagen. *J. Immunol.* **148**, 2103-2108

- 
104. Trentham, D.E., Townes, A.S., Kang, A.H. (1977) Autoimmunity to type II collagen: an experimental model of arthritis. *J. Exp. Med.* **146**, 857-868
  105. Vermeire, K., Heremans, H., Vandeputte, M., Huang, S., Billiau, A., Matthys, P. (1997) Accelerated collagen-induced arthritis in IFN- $\gamma$  receptor-deficient mice. *J. Immunol.* **158**, 5507-5513
  106. Vinay, D.S., Kwon, B.S. (1998) Role of 4-1BB in immune responses. *Semin. Immunol.* **10**, 481-489
  107. von Koskull, St., Truckenbrodt, H., Holle, R., Hörmann, A. (2001) Incidence and prevalence of juvenile arthritis in an urban population of southern Germany: a prospective study. *Ann. Rheum. Dis.* **60**, 940-945
  108. Wang, H., Marsters S.A., Baker, T., Chan, B., Lee, W.P., Fu, L., Tumas, D., Yan, M., Dixit, V.M., Ashkenazi, A., Grewal, I.S. (2001) TACI-ligand interactions are required for T cell activation and collagen-induced arthritis in mice. *Nat. Immunol.* **2**, 632-637
  109. Watson, W.C., Townes, A.S. (1985) Genetic susceptibility to murine collagen II autoimmune arthritis: proposed relationship to the IgG2 autoantibody sub-class response, complement C5, major histocompatibility complex (MHC) and non MHC loci. *J. Exp. Med.* **162**, 1878-1891
  110. Webb, L.M.C., Walmsley, M.J., Feldmann, M. (1996) Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7-1 and B7-2. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2320-2328
  111. Weyand, C.M. (2000) New insights into the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **39**, 3-8
  112. Wilcox, R.A., Chapoval, A.I., Gorski, K.S., Otsuji, M., Shin, T., Flies, D.B., Tamada, K., Mittler, R.S., Tsuchiya, H., Pardoll, D.M., Chen, L. (2002) Cutting edge: Expression of functional CD137 receptor by dendritic cells. *J. Immunol.* **168**, 4262-4267
  113. Williams, R.O., Plater-Zyberk, C., Williams, D.G., Maini, R.N. (1992) Successful transfer of collagen-induced arthritis to severe combined immunodeficient (SCID) mice. *Clin. Exp. Immunol.* **88**, 455-460
  114. Wooley, P.H., Dillon, A.M., Luthra, H.S., Stuart, J.M., David Ch. S. (1983) Genetic control of type II collagen-induced arthritis in mice: factors

- 
- influencing disease susceptibility and evidence for multiple MHC-associated gene control. *Transplant. Proc.* **15**, 180-185
115. Wooley, P.H., Luthra, H.S., Stuart, J.M., David Ch. S. (1981) Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I Region) linkage and antibody correlates. *J. Exp. Med.* **154**, 688-700
116. Xiang, J. (1999) Expression of co-stimulatory 4-1BB ligand induces significant tumor regression and protective immunity. *Cancer Biother. Radiopharm.* **14**, 353-361
117. Yoshino, S., Cleland, L.G., Mayrhofer, G. (1991) Treatment of collagen-induced arthritis in rats with a monoclonal antibody against the alpha / beta T cell antigen receptor. *Arthritis Rheum.* **34**, 1039-1047
118. Yoshioka, T., Nakajima, A., Akiba, H., Ishiwata, T., Asano, G., Yoshino, S., Yagita, H., Okumura, K. (2000) Contribution of OX40/OX40 ligand interaction to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.* **30**, 2815-2823
119. Zhu, G., Flies, D.B., Tamada, K., Sun, Y., Rodriguez, M., Fu, Y.X., Chen, L. (2001) Progressive depletion of peripheral B lymphocytes in 4-1BB (CD137) ligand/I-E $\alpha$ -transgenic mice. *J. Immunol.* **167**, 2671-2676

## 7. Glossar

Abb.	Abbildung
Ag	Antigen
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod
Ak	Antikörper
APC	Antigen-präsentierende Zelle
bCII	bovines Typ-II-Collagen
CD	Lymphozyten-Untergruppen-Antigen
CFA	komplettes Freund'sches Adjuvant
CIA	Collagen-induzierte Arthritis
CTLs	zytotoxische T-Lymphozyten
CTLA-4	zytotoxisches T-Lymphozyten-Antigen 4
CII	Typ-II-Collagen
EAE	experimentelle Autoimmunenzephalitis
EDTA	Ethylendiaminessigsäure
ELAM	endotheliales Leukozyten-Adhäsionsmolekül
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent-assay
FACS	Durchflußzytometrie, fluoreszenzaktivierte Zellanalyse/-sortierung
FcR	Rezeptor für das Fc-Fragment der Immunglobuline
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
FDC	follikuläre dendritische Zelle
FSC	Vorwärtslichtstreuung
HE	Hämatoxylin-Eosin
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
ICAM	interzelluläres Adhäsionsmolekül
ICOS	induzierbarer Kostimulator
Ig	Immunglobulin



---

IL	Interleukin
IFN	Interferon
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JIA	juvenile idiopathische Arthritis
L	Ligand
mAk	monoklonaler Antikörper
MHC	Haupt-Histokompatibilitätskomplex
n	Anzahl
NK	natürliche Killer-Zelle
OD	Absorption
OPD	Orthophenylenediamine
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PE	Phycoerythrin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der $H^+$ Konzentration
RA	rheumatoide Arthritis
r.p.m.	Umdrehungen pro Minute
s.c.	subkutan
SCID	schwere kombinierte Immundefizienz
SD	Standardabweichung
SEL	systemischer Lupus erythematoses
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
SPF	speziell keimfrei
SSC	seitliche Lichtstreuung
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
Th	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNFR	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor

---

VCAM

vaskuläres Zell-Adhäsionsmolekül

vs.

versus

---

## Erklärung nach § 6 Absatz 2 der Promotionsordnung

Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit wurden vorab in *Immunology* 2004; 113(1):89-98 publiziert. Diese Publikation ist das Ergebnis einer internationalen Zusammenarbeit mit der Abteilung für Mikrobiologie und Immunologie, New York Medical College, Valhalla, USA und der Abteilung für Chirurgie und Emory Impfzentrum, Emory University School of Medicine, Atlanta, USA. Demgemäß waren an der Durchführung der Versuche mehrere Personen beteiligt. Das Manuskript zur Publikation in *Immunology* wurde durch die Erstautoren Dr. Föll und Fr. Dr. Diez-Mendiondo verfasst.

Dr. J. Föll hatte die Vorversuche zu diesem Projekt durchgeführt (die Ergebnisse dieser Versuche sind nicht Bestandteil der Dissertation) und die anti-CD137-Wirkung im LE-Modell untersucht.

Fr. Dr. Diez-Mendiondo hat Tierversuche zu CIA +/- SEB und zur anti-CD137-Wirkung im EAE-Modell durchgeführt. Sie hat ELISPOTS in den CIA + anti-CD137-Versuchen angefertigt. Darüber hinaus hat sie mich bei den sehr aufwändigen Tierexperimenten unterstützt.

Fr. Dr. Holzer hat das CIA-Modell in unserem Labor etabliert.

Die histologischen Schnitte für diese Dissertation wurden von Herrn Dr. Peter Ruck hergestellt.

Die aufwändigen Tierexperimente für diese Promotion habe ich alle selbst durchgeführt. Bei der Erarbeitung der Versuchsbedingungen war ich federführend. Durch meine vorherigen tierexperimentellen Versuche in einem Tumormodell sammelte ich Erfahrung im Umgang mit den Versuchstieren und habe die Mitarbeiter in die experimentelle Arbeit mit Mäusen eingelernt.

---

## Danksagung

Diese Arbeit wäre ohne die Hilfe vieler Menschen nicht möglich gewesen. Ihnen gilt mein besonderer Dank:

Meiner Frau Belkis danke ich für ihre unendliche Geduld; die Hilfe bei den aufwändigen Tierexperimenten; für die unzähligen Stunden des kurzweiligen Redens während der Arbeit; für die kubanische Musik, die die langen Arbeitsstunden kurz erscheinen ließ; für die mühsamen Korrekturen dieser Arbeit; für die unzählbaren, mir zubereiteten Tees und Kaffees; für die Kraft und Ausdauer, die sie mir gab, die neben der Arbeit als Chirurg für diese Arbeit nötig war.

Meinem Sohn Sebastián Fernando, der die knappe, gemeinsame Zeit speziell an freien Wochenenden opfern musste, damit ich die Arbeit fertig schreiben konnte.

Herrn Professor Günther Dannecker, der mir dieses interessante Thema überlassen hatte und mich selbstständig durchführen ließ. Ihm gilt auch mein Dank für die freundliche Unterstützung, die vielen Ratschläge, Ideen und Diskussionen.

Herrn Dr. Jürgen Föll und Frau Dr. Ursula Holzer, die diese Arbeit durch unzählige Diskussionen und Ideen begleitet haben.

Herrn Dr. Peter Ruck für die rasche Herstellung der histologischen Schnitte.

Frau Dr. Cornelia Zehrer, die mich in die Wissenschaft eingeführt hat.

Herrn Dr. Paul-Gerhard Schlegel, der mir unbezahlbare Tipps für die Arbeit mit den Versuchstieren gab.

Frau Luciana Dannecker, die mir den pfleglichen Umgang mit Zellkulturen beibrachte und meine Zellen so vor manchem Pilz bewahrte.

Am Ende, aber nicht zuletzt, will ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir das Medizinstudium ermöglicht haben. Sie begleiteten diese Doktorarbeit durch viele „Taxifahrten“, „Weihnachtsfest-Unterbrechungen“ und weniger werdende Zeit für sie. Für ihre Geduld und Unterstützung möchte ich mich bedanken.

---

**Lebenslauf**

<b>Name</b>	Oliver Diez
<b>Geburtsdatum/-ort</b>	25.09.1972 / Nürtingen
<b>Familienstand</b>	verheiratet, 1 Kind
<b>05 / 1993</b>	Allgemeine Hochschulreife, Esslingen a.N.
<b>10 / 1993 – 12 / 1994</b>	Zivildienst auf der Intensivstation A53i, Städtische Krankenanstalten Esslingen a.N.
<b>04 / 1995 – 11 / 2002</b>	Studium der Humanmedizin an der Universität Tübingen
<b>04 / 1997</b>	Ärztliche Vorprüfung
<b>07 / 1998 – 06 / 2000</b>	Tumorforschung: „Therapie eines Adriamycin-resistenten T-Zell-Lymphoms mit Superantigen-Antikörper-Verbindungen“
<b>03 / 1999</b>	1. Staatsexamen
<b>04 / 2000 – 10 / 2002</b>	Experimenteller Teil der Dissertationsarbeit „Einfluss von CD137 auf die Induktion und den Verlauf der CIA“
<b>09 / 2001</b>	2. Staatsexamen
<b>10 / 2001 – 09 / 2002</b>	Praktisches Jahr am Universitätsklinikum Tübingen
<b>05 / 2002 – 06 / 2003</b>	Beratertätigkeit für immunologische Versuche, Sympore GmbH Reutlingen / Tübingen
<b>22 / 11 / 2002</b>	3. Staatsexamen
<b>03 / 2003 – 09 / 2004</b>	AiP in der Klinik für Allgemein-, Gefäß-, Thorax- und Kinderchirurgie der Klinik am Eichert in Göppingen
<b>01 / 09 / 2004</b>	Approbation als Arzt
<b>seit 09 / 2004</b>	Assistenzarzt in der Klinik für Allgemein-, Gefäß-, Thorax- und Kinderchirurgie der Klinik am Eichert in Göppingen