

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Würzburg**

Vorstand: Professor Dr. med. M.J. Lohse

**Immunologische Effekte der Therapie mit rezeptor-homologen Peptiden
im Rattenmodell der antikörper-induzierten dilatativen Immunkardiomyo-
pathie**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der**

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Martin Merkl

aus Neustadt a.d. WN

Würzburg, Mai 2013

Referent: Prof. Dr. med. Roland Jahns
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Kerkau
Dekan: Prof. Dr. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 15.11.2013

Der Promovend ist Arzt

Meinen Eltern Isolde und Wilhelm

Inhaltsverzeichnis

VERZEICHNIS VERWENDETER ABKÜRZUNGEN I

A) EINLEITUNG..... 1

1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM) 1

1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik 2

1.2 Ätiologie 3

1.2.1 Familiäre Genese 3

1.2.2 Toxische Genese..... 4

1.2.3 Infektiöse und autoimmune Genese..... 4

2. Das adrenerge System und seine physiologische Bedeutung 5

3. Anti- β_1 -AR Autoantikörper in der DCM 7

3.1 Klinische Daten..... 8

3.2 Anti- β_1 -EC_{II} Antikörper im Tiermodell..... 9

3.3 Der funktionelle Effekt der anti- β_1 -AR Antikörper und ihre Rolle bei der Pathogenese der DiCM..... 11

4. Die humorale Immunantwort gegen Proteinantigene..... 12

5. Therapeutische Ansätze bei DiCM 16

5.1 Konventionelle Standardtherapie der DiCM 16

5.2 Spezifische und immunmodulatorische Ansätze..... 17

5.2.1 Blockade des Rezeptors mit Betablockern..... 17

5.2.2 Immunsuppression 18

5.2.3 Immunmodulation mit Immunglobulin G i.v. 19

5.2.4 Immunadsorption..... 20

5.2.5 Neutralisierung herzschtidlicher Antikörper mit Hilfe Epitop homologer Peptide 21

6. Aufgabenstellung 22

B) MATERIAL UND METHODEN..... 23

7. Material 23

7.1 Versuchstiere..... 23

7.2 Geräte..... 23

7.3 Chemikalien und Materialien 24

7.4 Verwendete Software 24

8. Methoden..... 24

8.1 Induktion der Kardiomyopathie..... 24

8.2 Therapie mit verschiedenen Peptiden..... 25

8.3 ELISA..... 26

8.4 Echokardiographie..... 28

8.5 Herzkatheter 29

8.6	Organentnahme und Zellisolierung	30
8.6.1	Gewinnung der Organe	30
8.6.2	Isolierung der Milz- und Knochenmarkszellen.....	30
8.7	Detektion β_1 -EC _{II} spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen.....	31
8.8	Detektion β_1 -EC _{II} spezifischer B-Zellen	32
8.8.1	ELISPOT: Enzyme - Linked Immuno Spot Assay	32
8.8.2	Durchflusszytometrie	33
8.9	Histologie	35
8.9.1	Paraffinschnitte	36
	Entparaffinisierung.....	36
	HE - Färbung	36
	Spezifische Färbung: B-Zell- und T-Zellfärbung.....	37
8.9.2	Gefrierschnitte	37
8.9.3	Immunhistochemie	37
C)	ERGEBNISSE.....	39
9.	Effekte der Peptidtherapie auf den kardialen Phänotyp der Ratten.....	39
10.	Effekt der Peptidtherapie auf den Antikörpertiter	43
11.	Einfluss der Peptidtherapie auf die CD4⁺ T-Zellen.....	45
12.	Einfluss der Peptidtherapie auf β_1-EC_{II}-spezifische B-Zellen	48
12.1	Einfluss der Peptidtherapie auf langlebige Plasmazellen	48
12.2	Einfluss der Peptidtherapie auf Memory B-Zellen	49
13.	Histologie	54
D)	DISKUSSION	56
E)	ZUSAMMENFASSUNG	61
F)	LITERATUR- UND ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	62
G)	ANHANG	69

Verzeichnis verwendeter Abkürzungen

anti- β_1 -EC _{II} Ak	Spezifische Antikörper gegen die zweite extrazelluläre Domäne des β_1 – adrenergen Rezeptors
AS	Aminosäuren
ASC	Antikörper sezernierende Zellen
AZT	Azathioprin
BCR	B–Zell Rezeptor
BSS	Balancierte Salz - Lösung
β_1 -AR	β_1 – adrenerger Rezeptor
β_1 EC _{II}	zweite extrazelluläre Domäne des β_1 – adrenergen Rezeptors
β_1 -EC _{II} /GST-FP	Fusionsprotein aus GST und der zweiten extrazellulären Domäne des β_1 – adrenergen Rezeptors (FP)
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD 20	Oberflächenmarker auf humanen B–Zellen
CI	Kardialer Index
DAB	3,3' - Diaminobenzidin
DiCM	Dilatative Immun–Kardiomyopathie
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ELISPOT Assay	Enzyme Linked Immuno Spot Assay
EMB	Endomyokardbiopsie
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc -Rezeptor	Membranrezeptoren für verschiedene Immunglobulinisotypen
FCS	Fötale Kälber Serum
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
FS	Verkürzungsfraction

Gs	Stimulierendes G - Protein
GST	Glutathion - S - Transferase
HE - Färbung	Hämatoxylin / Eosin Färbung
HF	Herzfrequenz
HLA	Human Leukocyte Antigen
HZV	Herzzeitvolumen
IA	Immunadsorption
Ig	Immunglobulin
ivlg	intravenöse Gabe von Immunglobulin
LV	Linksventrikulär
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
LVP	Linksventrikulärer systolischer Druck
MHCII	Major Histocompatibility Complex Klasse II
NRS	Normales Ratten Serum
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PPD	Purified Protein Derrivative (gereinigtes Tu- berkulin Derivat)
RT	Raumtemperatur
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TCR	T-Zellrezeptor
T _{FH}	follikuläre T-Helferzellen

A) Einleitung

Nach einem aktuellen Bericht des Statistischen Bundesamtes Deutschland stellen Herz- / Kreislauferkrankungen mit 41 % aller Todesfälle weiterhin die häufigste Todesursache in Deutschland dar [1]. Eine besonders schlechte Prognose weist dabei die Dilatative Kardiomyopathie (DCM) auf. In westlichen Ländern wird sie als Hauptursache für eine schwere Herzinsuffizienz und Herzversagen bei jungen Erwachsenen mit anschließend u.U. erforderlicher Herztransplantation angeführt [2].

In der vorliegenden Arbeit wird zunächst kurz auf die Ursachen und Symptome einer DCM im Allgemeinen und dann speziell auf die Autoantikörper - induzierte DCM eingegangen. Gemäß bisher vorliegender klinischer Pilot - Daten sind zirkulierende Antikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor (β_1 -AR) mit einem ca. dreifach erhöhten Risiko für einen Tod kardiovaskulärer Ursache und dem gehäuftem Auftreten schwerer ventrikulärer Arrhythmien verbunden [3, 4]. An der Universität Würzburg ist es in den letzten Jahren gelungen, einen neuen hochspezifischen Therapieansatz auf Basis epitop - homologer Ringpeptide zu entwickeln, die gegen den β_1 -AR gerichtete Antikörper bereits im Blut binden und somit neutralisieren [5]. Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Effekt dieses neuen Therapieansatzes auf das Immunsystem im Tiermodell genauer zu untersuchen.

1. Dilatative Kardiomyopathie (DCM)

Nach der aktuellen Einteilung der Europäischen Gesellschaft für Kardiologie werden Kardiomyopathien definiert als Herzerkrankungen, bei denen der Herzmuskel sowohl strukturell als auch funktionell geschädigt ist [6]. Je nach im Vordergrund stehender Pathophysiologie bzw. zugrunde liegender ätiologischer Faktoren wurden von der 1995'er WHO Task Force fünf verschiedene Entitäten dieser Herzerkrankung unterschieden [6, 7].

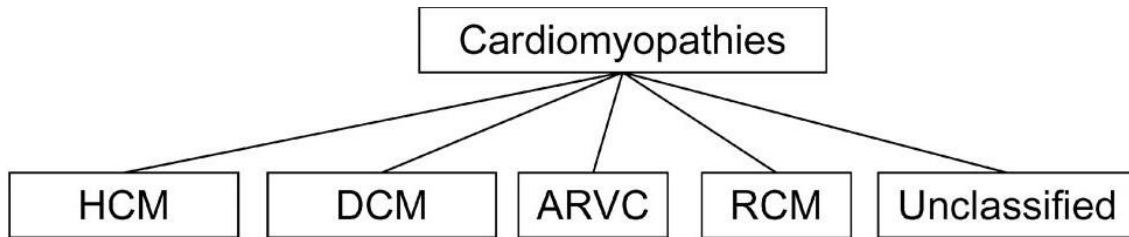


Abbildung 1 Einteilung der Kardiomyopathie nach der WHO ICSF Task Force, ARVC, arrhythmogene rechts ventrikuläre Kardiomyopathie; DCM, dilatative Kardiomyopathie; HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; RCM, restriktive Kardiomyopathie. Abbildung aus Elliott et al. [6].

Von den in der Abbildung 1 angeführten Kardiomyopathien sind die Formen abzugrenzen, die ätiologisch zugeordnet werden können. Sie werden als sekundäre Kardiomyopathien bezeichnet und sind einer ischämischen, valvulären, hypertensiven, entzündlichen, metabolisch - endokrinen oder neuromuskulären Genese zuzuordnen.

1.1 Definition, Epidemiologie und Klinik

DCM ist definiert als eine Erkrankung des Herzmuskels, bei der es zu einer linksventrikulären oder biventrikulären Dilatation mit Einschränkung der linksventrikulären systolischen Funktion kommt [6, 7]. Zusätzlich bestehen oft Störungen der diastolischen Funktion (verzögerte, inkomplette Relaxation des Myokards sowie erhöhte Steifigkeit) [8]. Unter den oben genannten Hauptformen der Kardiomyopathien (siehe Abbildung 1) tritt die DCM am häufigsten auf [9]. Weltweit gibt es je nach geographischer Lage und betrachteter Population [10] schwankende Angaben bezüglich der Inzidenz, sie variiert zwischen 2,0 und 8,3 Fällen je 100 000 Einwohner [11]. Die Prävalenz betrug bei einer großen Studie in Minnesota 36,5 Fälle je 100 000 Einwohner [12]. Hochrisikogruppen sind insbesondere ältere Menschen, Männer und Amerikaner afrikanischer Herkunft [13]. Der klinische Verlauf ist sehr variabel. Oft haben die Patienten bereits Zeichen einer akuten Herzschwäche, verbunden mit den typischen Symptomen wie Kurzatmigkeit, peripheren Ödemen, Orthopnoe, aber auch

Synkopen und Arrhythmien [9-11], welche in diesem Kontext eine sehr schlechte Prognose haben. Etwa 20 % der Patienten versterben innerhalb der ersten 5 Jahre nach Diagnosestellung an der Erkrankung [14, 15]. In den USA können über 25 000 Todesfälle jährlich auf dieses Krankheitsbild zurückgeführt werden [13]. Im Endstadium der DCM bleibt häufig als therapeutische „ultima ratio“ nur eine Herztransplantation [16].

1.2 Ätiologie

Die Ätiologie der DCM ist bis heute nicht gänzlich verstanden und verschiedene Ursachen werden diskutiert. Bei vielen Patienten kann nach wie vor kein auslösender Pathomechanismus gefunden werden, weshalb das Krankheitsbild auch als „idiopathische“ Kardiomyopathie bezeichnet wird [17]. Neuere diagnostische Methoden, u.a. molekular - pathologische, erlauben heute jedoch eine bessere Differenzierung möglicher Entstehungsmechanismen [18]. Im Folgenden sollen gegenwärtig als mögliche Krankheitsauslöser diskutierte Faktoren kurz vorgestellt werden.

1.2.1 Familiäre Genese

Bei ca. 30 - 35 % der Patienten kann eine erbliche Komponente als Ursache der DCM nachgewiesen werden [19]. Insbesondere Mutationen in Genen, die für strukturelle myozytäre Proteine kodieren und damit für die Kontraktilität verantwortlich sind, scheinen hierbei eine wichtige Rolle zu spielen [20]. In den meisten der bisher identifizierten Fälle handelt es sich hierbei um autosomal dominante Mutationen [9].

1.2.2 Toxische Genese

Klinische Beobachtungsstudien über mehrere Jahre konnten einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Entstehung einer DCM und Alkoholmissbrauch herstellen [21]. Auch andere Toxine wie Kokain, Kohlenmonoxid, Lithium, Anthracycline und Kobalt können bei der Entstehung einer Kardiomyopathie eine Rolle spielen [9, 11, 22]. In diesem Zusammenhang konnte z.B. auch ein direkter kardiotoxischer Effekt bestimmter therapeutisch eingesetzter monoklonaler Antikörper, wie Trastuzumab (monoklonaler Antikörper gegen Her2neu beim Mamma Karzinom) nachgewiesen werden [23].

1.2.3 Infektiöse und autoimmune Genese

Die Rolle von kardialen Autoantikörpern bei der Entstehung der DCM wird kontrovers diskutiert. Die Ausbildung einer DCM ist vermutlich häufig Folge einer Myokarditis und der im Rahmen der Immunabwehr entstehenden Autoantikörper gegen verschiedene kardiale Antigene.

Vermutlich stellen Myokarditis und DCM das akute und chronische Stadium einer organspezifischen Immunerkrankung dar [24]. Nach einer initialen Infektion mit Enteroviren - insbesondere bestimmten Coxsackievirusstämmen [25-27] - entwickelt sich eine akute Myokarditis [28]. Neuere Screening - Ergebnisse von Patientenbiopsien ergaben, dass neben den Enteroviren auch Adenoviren [29], Epstein-Barr - und Cytomegalieviren [30] als Myokarditis - Erreger eine Rolle spielen können. Durch die virale Infektion kommt es zu einer generellen Aktivierung des Immunsystems mit dem Ziel, das Virus möglichst rasch aus dem Myokard zu eliminieren. Bei einem Teil der Patienten wird das Virus jedoch nicht oder nicht ausreichend eliminiert. Die Folge ist eine chronisch persistierende Myokarditis [31], die im weiteren Verlauf zu einer progressiven Dilatation des Herzens und chronischen Herzinsuffizienz führen kann [28]. Dieser Krankheitsverlauf, der auch als inflammatorische Kardiomyopathie bezeichnet wird [32], scheint oft mit der Entstehung von funktionell aktiven Autoantikörpern gegen

unterschiedliche myokardiale Strukturen verbunden zu sein [33]. So können unter anderem Autoantikörper gegen mitochondriale - [34], sarkoplasmatische - [24] (z.B. Troponin [35]) und membranäre Proteine (z.B. adrenerge und muskarinerge Rezeptoren [36-39]) gebildet werden. Neben einer potentiellen Induktion von Autoantikörpern kommt es im Rahmen solcher Infektionen auch zur Bildung von Antikörpern gegen Antigene der auslösenden Mikroorganismen. Mikrobielle Antigene, die wirtseigenen Molekülstrukturen ähneln, können ein Phänomen auslösen, das als "Molecular Mimikry" bzw. Kreuzreaktivität bezeichnet wird [40]. So konnte nach einer Infektion mit *Trypanosoma cruzi* [41] gezeigt werden, dass kreuzreaktive Parasiten-Antikörper am kardialen β_1 -Adrenorezeptor als partielle Agonisten wirken können und darüber vermutlich für die Entwicklung der Chagas - Kardiomyopathie mitverantwortlich sind [42, 43].

Nicht alle diese Autoantikörper spielen dabei eine Rolle als pathogene Agentien [44]. Auch die genetische Prädisposition jedes einzelnen Patienten spielt eine wichtige Rolle, zum Beispiel in Abhängigkeit vom jeweils exprimierten HLA-Muster oder des individuellen T-Zell-Repertoires [45]. Darüber hinaus ist das schädigende Potential eines Autoantikörpers vermutlich stark von der Zugängigkeit und der funktionellen Relevanz der jeweiligen Zielstruktur mitbestimmt [33]. Ergebnisse von Tiermodellen aus den vergangenen Jahren scheinen dabei insbesondere auf ein krankheits - induzierendes Potential von funktionell aktiven konformationellen Antikörpern gegen den kardialen β_1 -adrenergen Rezeptor hinzudeuten (siehe 3.) [33].

2. Das adrenerge System und seine physiologische Bedeutung

Wichtige kardiovaskuläre Funktionen wie Herzfrequenz, Kontraktilität und die Weite der Herzkranzgefäße werden durch das autonome Nervensystem reguliert. Adrenerge Rezeptoren stellen dabei das Bindeglied dar. Sie werden durch die Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin aktiviert. Aufgrund ihrer phar-

makologischen Eigenschaften können drei verschiedene Typen adrenerger Rezeptoren differenziert werden: α_1 , α_2 und β -adrenerge Rezeptoren [46].

β -Rezeptoren wiederum lassen sich in die Subtypen eins bis vier unterteilen [47].

Der β_1 -Adrenorezeptor ist der am stärksten exprimierte Rezeptor im Herzen [48] und gehört zur Gruppe der G - Protein gekoppelten Rezeptoren [49]. G - Proteine sind heterotrimer, d.h. sie bestehen aus einer α -, β - und γ -Untereinheit [50], und dienen der Transduktion eines extrazellulären Signals in ein intrazelluläres Folgesignal [51].

Das Rezeptormolekül selbst besteht aus sieben hydrophoben transmembranen α - Helices, drei intra- und drei extrazellulären hydrophilen Schleifen (siehe Abb. 2 [52]) [53]. Die transmembranen Domänen formen eine Art „Bindungstasche“ für Rezeptor-Liganden. Die Ligandenbindungsstelle liegt im inneren Kern der in der Zellmembran kreisförmig angeordneten transmembranen Abschnitte des Rezeptormoleküls [51]. Auch wenn die extrazellulären Abschnitte nicht direkt mit der Ligandenbindung interferieren [54], so scheint die zweite extrazelluläre Rezeptor-Schleife dennoch eine wichtige Rolle bei der Rezeptor-Liganden Bindung zu spielen [53]. Eine Reduktion oder Mutation der Cystein-Residuen in dieser Domäne führte jeweils zu einem signifikanten Abfall der Affinität sowohl von Rezeptoragonisten als auch - antagonistien [55, 56]. Dies könnte erklären, wieso Antikörper gegen die zweite extrazelluläre Schleife mit der Ligandenbindung interferieren, die Konformation dieser Schleife ändern und dadurch auch in der Lage sind, die Aktivität des Rezeptors zu modulieren [57, 58].

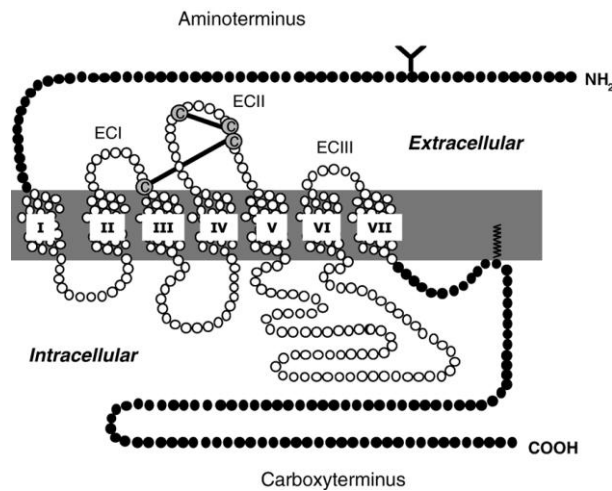


Abbildung 2 Vermutete Sekundärstruktur des β_1 -AR. Abbildung aus Jahns et al. [52]

Auf molekularer Ebene kommt es nach Bindung der physiologischen Agonisten Adrenalin oder Noradrenalin zu einer Konformationsänderung des gebildeten Ligand - Rezeptorkomplexes [59] und zur Induktion einer Signalkaskade, bei der über das stimulierende G-Protein (G_s) nacheinander die Adenylatzyklase und die cAMP abhängige Proteinkinase A aktiviert werden [60]. Die Proteinkinase A wiederum phosphoryliert Proteine, wie zum Beispiel eine Untereinheit des L-Typ - Kalziumkanals [61], die an der Regulierung der sarkoplasmatischen Kalziumkonzentration beteiligt sind. Die Folge ist in der Regel ein erhöhter Kalziumeinstrom in die Zelle, bei Kardiomyozyten verbunden mit einer Zunahme von Chronotropie und Inotropie [62].

3. Anti- β_1 -AR Autoantikörper in der DCM

Das schädigende Potential eines Autoantikörpers hängt von der Zugänglichkeit und der funktionellen Relevanz seiner Zielstruktur ab. Deswegen könnte gerade ein funktionell aktiver Antikörper gegen den β_1 -AR, der das Potential besitzt, die Kardiomyozytenfunktion durch Modulation des β_1 -AR zu verändern, eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der DCM spielen. So wurden in den letzten Jahren bei DCM - Patienten neben Antikörpern gegen verschiedene kardiale

Proteine insbesondere auch Autoantikörper identifiziert, die gegen die für die Stabilisierung der Rezeptorkonformation wichtige zweite, extrazelluläre Schleife des β_1 -AR gerichtet sind. Das Vorkommen derartiger Antikörper wurde sowohl bei ischämischer [38] als auch bei idiopathischer Kardiomyopathie beschrieben, nicht aber bei Herzklappenfehlern oder hypertensiver Herzerkrankung [63, 64]. Zudem wurde die mögliche pathophysiologische Relevanz solcher Antikörper bei der DCM im Tiermodell und in klinischen Studien weiter untersucht.

3.1 Klinische Daten

Die klinische Bedeutung von Antikörpern gegen den β_1 -AR bei DCM Patienten ist schwer einzuschätzen, da ein niedriger Titer solcher Antikörper vermutlich auch bei gesunden Menschen gefunden werden kann als Teil des natürlichen immunologischen Repertoires [40]. Bei ca. 30 % der DCM Patienten kommen derartige Antikörper vor. Bei Gesunden ist die Prävalenz im Vergleich zu Herzkranken eher gering und liegt nach einem Screeningverfahren, bei dem das Antigen, der membrangebundene (rekombinante) β_1 -AR in seiner natürlichen Konformation eingesetzt wurde, unter 1 % [38]. Mit der gleichen Methode konnten relevante Titer derartiger Antikörper bei Patienten mit Herzinsuffizienz auf dem Boden eines chronischen Hypertonus oder eines Herzklappenfehlers ausgeschlossen werden [64]. Hingegen wurden bei ca. 30% der Patienten mit idiopathischer DCM zirkulierende Antikörper gegen den β_1 -AR detektiert [38]. Andere Untersucher fanden derartige Antikörper bei 26 bis 95 % der DCM Patienten [37, 65, 66], die überwiegende Mehrzahl (73%) davon war gegen die zweite extrazelluläre Schleife des β_1 -AR gerichtet [67]. Die große Varianz der Ergebnisse ist vermutlich auf die unterschiedlichen Screeningverfahren zurückzuführen, mit denen häufig auch funktionell irrelevante Antikörper nachgewiesen werden. So konnte u.a. gezeigt werden, dass nur ein geringer Anteil der im Peptid-ELISA detektierten β_1 -AR Antikörper auch an native β_1 -AR binden kann. Deswegen sind Methoden [38], die natürliche β_1 -Rezeptoren verwenden, für

den Nachweis funktionell relevanter β_1 -AR Antikörper zwingende Voraussetzung.

Klinisch ist der Nachweis von funktionell stimulierenden β_1 -AR Antikörpern bei DCM Patienten mit einer schlechteren linksventrikulären Funktion [38], einer erhöhten Prävalenz von schweren ventrikulären Arrhythmien [4, 68] sowie einer höheren Inzidenz von plötzlichem Herztod assoziiert [4]. Eine 10 Jahres Follow-up Studie zeigte, dass der positive Nachweis von funktionellen anti- β_1 -EC_{II} Antikörpern bei DCM Patienten mit einem ca. dreifach erhöhten kardiovaskulären Mortalitätsrisiko assoziiert ist [3].

3.2 Anti- β_1 -EC_{II} Antikörper im Tiermodell

Matsui et al. und Mobini et al. gelang es, den Phänotyp einer DCM-ähnlichen Erkrankung zu induzieren, indem sie Kaninchen mit Peptidsequenzen entsprechend der zweiten extrazellulären Schleife des β_1 -AR immunisierten [69, 70]. Drei Jahre später zeigten Omerovic et al., dass die intraperitoneale Injektion peripherer Lymphozyten von anti- β_1 -Ak positiven DCM Patienten bei immundefizienten Mäusen zu einer kardialen Dilatation führte [71]. Unsere Arbeitsgruppe verwendet ein Rattenmodell, das durch die hundertprozentige Homologie des β_1 -AR zwischen Mensch und Ratte, anders als das Kaninchenmodell, besonders gut die humanen Verhältnisse widerspiegelt [72, 73]. Lewis-Ratten wurden dabei monatlich über einen Zeitraum von insgesamt 15 Monaten mit einem Fusionsprotein aus β_1 -EC_{II} und bakteriellem GST (β_1 -EC_{II}/GST-FP) immunisiert. So immunisierte Tiere entwickelten spezifische anti- β_1 -EC_{II} Ak und innerhalb von ca. 9 Monaten den Phänotyp einer im Verlauf progredienten DCM (Abbildung 3). Des Weiteren konnten durch Transferversuche mit Seren immunisierter Tiere in gesunde Geschwistertiere die krankheits-induzierende Potenz dieser Antikörper nachgewiesen werden: Auch die "Empfänger"-Ratten erkrankten an einer Kardiomyopathie mit progressiver linksventrikulärer Dysfunktion und wiesen eine selektive Herabregulierung kardialer β_1 -AR auf, was auch charakteristisch für die humane DCM ist [74].

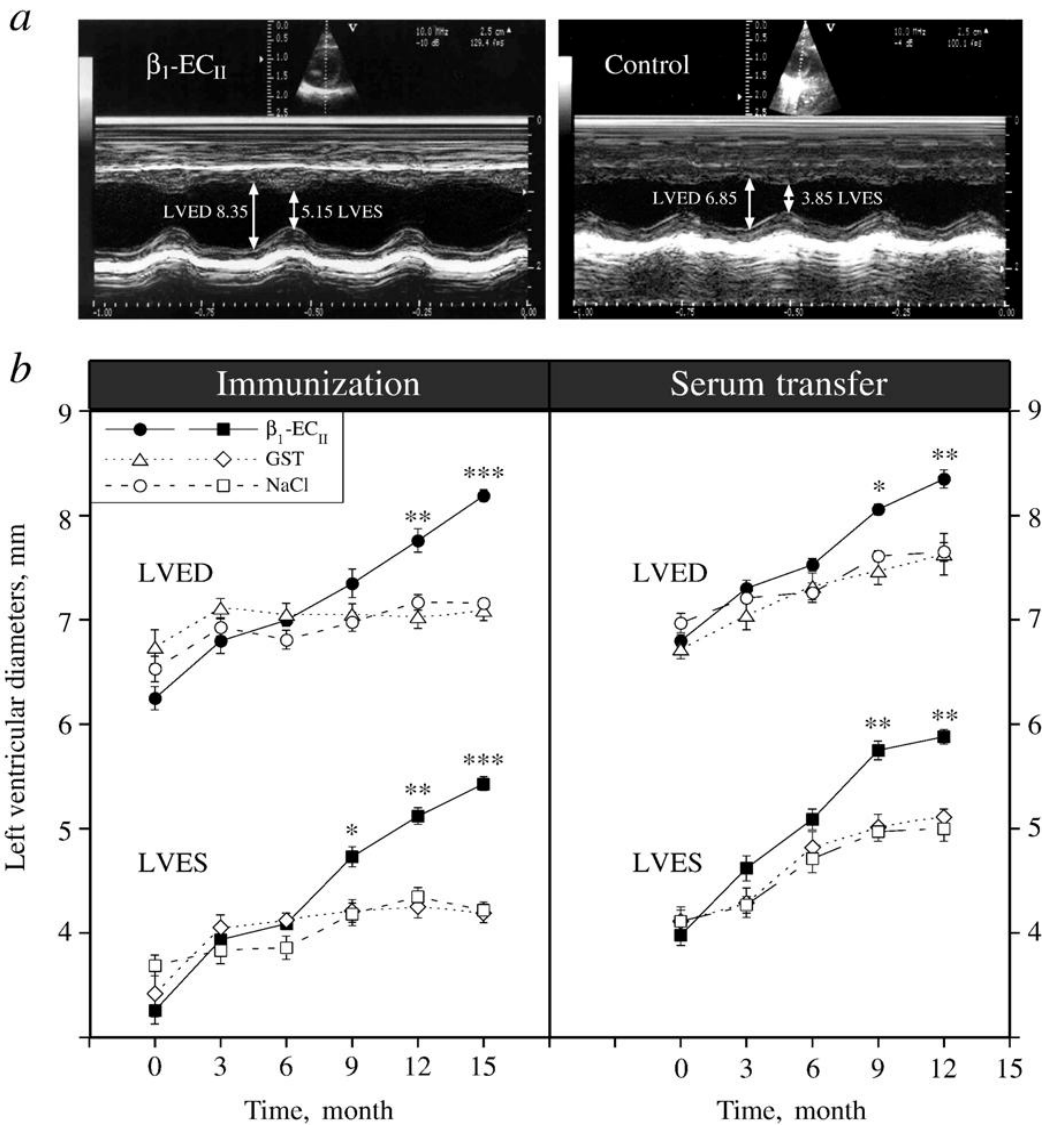


Abbildung 3 Echokardiographie von Rattenherzen (a) Immunisierung der Tiere über einen Zeitraum von 15 Monaten mit EC_{II}-GST FP oder NaCl: anti-β₁-EC_{II} Ak positives Tier (links) und Kontrolltier (rechts); LVED / LVES, links ventrikulärer end - diastolischer / end - systolischer Durchmesser (in mm). (b) Zeitverlauf der LVED und LVES während der Immunisierung.

Abbildung aus Jahns et al [52].

3.3 Der funktionelle Effekt der anti- β_1 -AR Antikörper und ihre Rolle bei der Pathogenese der DiCM

Unterschiedliche Arbeitsgruppen haben mittels verschiedener immunologischer Assays (Ganzzell - ELISA, Radioligandenverdrängung, FRET - Assay etc.) nachgewiesen, dass anti- β_1 -EC_{II} Ak bevorzugt an eine native β_1 -Rezeptorkonformation binden. Als Folge der Antikörperbindung an den Rezeptor wurde auch die Rezeptorfunktion beeinflusst. So zeigte sich u.a. im FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) Assay, einem Verfahren, bei dem der intrazelluläre cAMP - Spiegel mit Hilfe der (Licht-) Energieübertragung zwischen zwei Fluoreszenzfarbstoffen in einem cAMP - Sensormolekül (Epac - 1c) gemessen werden kann, eine Erhöhung der intrazellulären cAMP Produktion [57, 75]. Im Gegensatz dazu hatten Antikörper, die gegen den β_1 -Aminoterminus oder den intrazellulär lokalisierten β_1 -Carboxyterminus gerichtet waren, keinen nennenswerten Einfluss auf die Funktion bzw. den Aktivitätsstatus von β_1 -AR [57, 70, 76].

Nach Immunisierung mit dem Fusionsprotein konnten sowohl inhibitorische als auch agonistische anti- β_1 -EC_{II} Ak generiert werden [57]. Zum einen könnte dies durch die Polyklonalität der Immunantwort begründet sein, zum anderen scheint es sich bei den anti- β_1 -EC_{II} Ak um konformationale Antikörper zu handeln, die abhängig von ihrer spezifischen Bindungsregion innerhalb der 2. extrazellulären Schleife als „allosterische“ Regulatoren der Rezeptoraktivität agieren, d.h. durch sterische Modulation der Schleifenform (und somit Beeinflussung der Ligandenbindungstasche) eine bestimmte Konformation des Rezeptors initiieren, destabilisieren oder stabilisieren [52, 54, 77]. Die unterschiedlichen Eigenschaften der Antikörper lassen sich mit Hilfe eines Modells beschreiben, in dem zwei grundsätzliche Rezeptorzustände des β_1 -AR angenommen werden: ein aktiver und ein inaktiver Status [78]. Die meisten funktionell aktiven humanen oder in Ratten generierten anti- β_1 -EC_{II} Ak bewirkten durch die überwiegende Bindung an eine aktive Rezeptorkonformation bzw. die Induktion eines aktiven Rezeptorstatus eine erhöhte basale Rezeptoraktivität. Einige wenige anti- β_1 -EC_{II} Ak scheinen jedoch (auch in Gegenwart von Agonisten) die Rezeptoraktivität in

vitro zu reduzieren, wahrscheinlich über die Induktion eines „inaktiven“ Rezeptorstatus (trotz gebundenem Agonisten). Folglich könnte man postulieren, dass die ständige Präsenz von rein oder überwiegend aktivierenden anti- β_1 -EC_{II} Ak im Blutkreislauf und am Herzen einen ähnlichen Effekt wie eine chronische Dauerstimulation mit den physiologischen Agonisten Adrenalin und/oder Noradrenalin hat und letztendlich zur Entwicklung einer Herzschwäche führen kann [79].

Letztendlich konnte im Rattenmodell der „proof of principle“ (Krankheitsinduktion durch aktivierte Antikörper und Transfer des Phänotyps durch Transfer der Antikörper) erbracht werden, so dass die Autoantikörper-induzierte DCM heute als eine eigenständige Entität (DiCM - Dilatative Immun - Kardiomyopathie) innerhalb der Gruppe der Rezeptor Autoantikörper vermittelten Autoimmunerkrankungen, wie z.B. der Myasthenia gravis oder dem Morbus Basedow, betrachtet werden sollte.

4. Die humorale Immunantwort gegen Proteinantigene

Im für diese Arbeit verwendeten Tiermodell (siehe 3.2) kommt es durch kontinuierliche Immunisierung mit dem Antigen, β_1 -EC_{II}/GST-FP, zur Ausbildung einer spezifischen humoralen Immunantwort mit der Bildung von anti- β_1 -EC_{II} Ak und antigenspezifischen Gedächtniszellen. Grundsätzlich unterscheidet man zwischen T-Zell abhängigen und T-Zell unabhängigen humoralen Immunantworten. Während einige mikrobielle Antigene B-Zellen auch in der Abwesenheit von T-Helferzellen auf direktem Weg aktivieren können, wird für die Immunantwort gegen Proteinantigene wie dem Fusionsprotein β_1 -EC_{II}/GST-FP (sogenannte Thymus abhängige Antigene) die Hilfe von antigenspezifischen T-Helferzellen benötigt. Um diesen Vorgang und auch die möglichen anti- β_1 -EC_{II} spezifischen therapeutischen Ansätze besser verstehen zu können, sollen im Folgenden kurz der Ablauf einer humoralen Immunantwort gegen Protein - Antigene und die beteiligten Zellkomponenten beschrieben werden (modifiziert nach [80]):

- 1) Protein-Antigene werden von dendritischen Zellen aufgenommen und naiven T-Helferzellen in der T-Zell Zone der lymphoiden Organe präsentiert.
- 2) T-Helferzellen werden durch den Kontakt mit dendritischen Zellen, die prozessiertes Antigen über MHCII Moleküle präsentieren und kostimulierende Liganden (z.B. B7 Moleküle) exprimieren, aktiviert. Aktivierte T-Helferzellen exprimieren CD40L sowie Chemokinrezeptoren. Die Migration in die Follikel (Milz, Lymphknoten) wird durch einen Chemokingradienten bewirkt.
- 3) B-Zellen in den Follikeln werden durch lösliches oder von anderen Zellen (z.B. dendritischen Zellen) präsentiertes Antigen aktiviert.
- 4) B-Zellen prozessieren und präsentieren Antigen, verändern ihre Rezeptor Oberflächenmerkmale und wandern in Richtung der T-Zell Zone
- 5) An der Grenze zwischen T-Zell Zone und Follikel kommt es zur Interaktion von B- und T-Zellen sowie zur weiteren Aktivierung der B-Zellen durch CD40 L auf den Helfer T-Zellen und verschiedenen von T-Zellen sezernierten Zytokinen (siehe Abbildung 4)

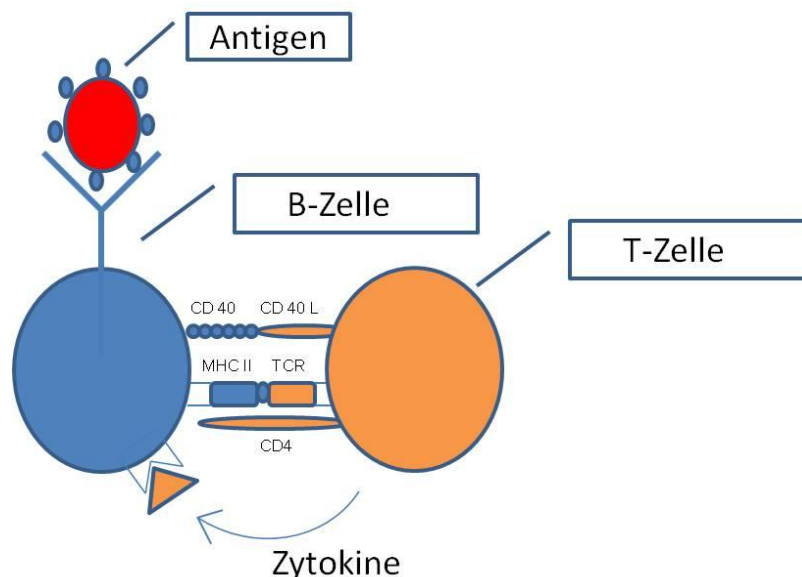


Abbildung 4. B-Zell Aktivierung durch Antigen und T-Helferzellen. Von B-Zellen prozessiertes Antigen wird über MHCII Moleküle präsentiert. Durch Bindung des T-Zellrezeptors (TCR) werden T-Helferzellen aktiviert. Sowohl Signale durch das gebundene Antigen als auch von aktivierten Helfer T-Zellen sind notwendig, um B-Zell Proliferation und Differenzierung zu generieren. (Abbildung modifiziert nach [81])

- 6) Es bilden sich kleine, extrafollikuläre B-Zell Foci. Dort kommt es zum Isotyp – Switching, somatischen Mutationen und zur Generierung kurzlebiger Plasmazellen, die Antikörper sezernieren.
- 7) Während der Interaktion zwischen B- und T-Zellen differenzieren einige T-Helferzellen in follikuläre T-Helferzellen (T_{FH}).
- 8) Aktivierte B-Zellen und T_{FH} wandern zurück in den Follikel. Dort werden die B-Zellen durch T_{FH} aktiviert. In den Follikeln bilden sich Keimzentren aus, deren Inneres von proliferierenden, antigenspezifischen B-Lymphozyten angefüllt ist. Durch Isotyp - Switching, somatische Mutationen in den kodierenden Bereichen für die Antigenbindungsstelle und Selektion entstehen u.a. Memory B-Zellen sowie langlebige Plasmazellen.
- 9) Die Differenzierung zur Plasmazelle beinhaltet bedeutende morphologische Veränderungen der Zellen, insbesondere der Komponenten des endoplasmatischen Retikulums. Plasmazellen zeichnen sich zudem durch eine niedrige Expression membrangebundener Immunglobuline und eine hohe Ig - Sekretionsrate aus. Sie sind vor allem extrafollikulär z.B. in der Milz, Lymphknoten und im Knochenmark lokalisiert. Es werden 2 Typen von Plasmazellen unterschieden. Kurzlebige Plasmazellen entstehen früh in den B-Zell Foci und sorgen kurzfristig für einen hohen spezifischen Antikörpertiter. Langlebige Plasmazellen, sind Zellen die in Folge der Reaktion in den Keimzellzentren entstehen und in sogenannten Nischen im Knochenmark Überlebenssignale von Stromazellen erhalten. Dort stellen sie eine Quelle von hochaffinen spezifischen Antikörpern dar [82]. Dadurch bieten sie unmittelbaren Schutz vor Reinfektionen. Ungefähr die Hälfte der im Blut eines gesunden Erwachsenen zirkulierenden Antikörpermenge wird auf langlebige Plasmazellen zurückgeführt. Die Frequenz dieser Plasmazellen bleibt über die Zeit hinweg relativ konstant, das bedeutet, dass neu generierte Plasmazellen mit den etablierten Plasmazellen um eine Nische in Competition treten müssen [83].

10) Einige der differenzierten B-Zellen aus den Keimzentren akquirieren die Eigenschaft, über lange Phasen unter Wahrung ihrer Antigen-spezifität zu überleben. Sie zeichnen sich durch sehr geringe Zellteilungs-raten, Expression von IgG, IgA oder IgE an der Oberfläche und niedrige bzw. keine Sekretion von Antikörpern aus. Man bezeichnet sie als Memory B-Zellen. Während einige Memory B-Zellen in den lymphatischen Organen verweilen, zirkulieren andere zwischen Milz und Lymphknoten. Im Rahmen der sekundären Immunantwort, bei der es zum erneuten Kontakt mit dem Antigen kommt, führt eine Reaktivierung von Memory B-Zellen mit Hilfe von Memory T-Zellen [84] zur schnelleren Bildung von Plasmazellen, die wiederum Antikörper mit erhöhter Affinität sezernieren und damit zur effektiveren Bekämpfung der Infektion beitragen.

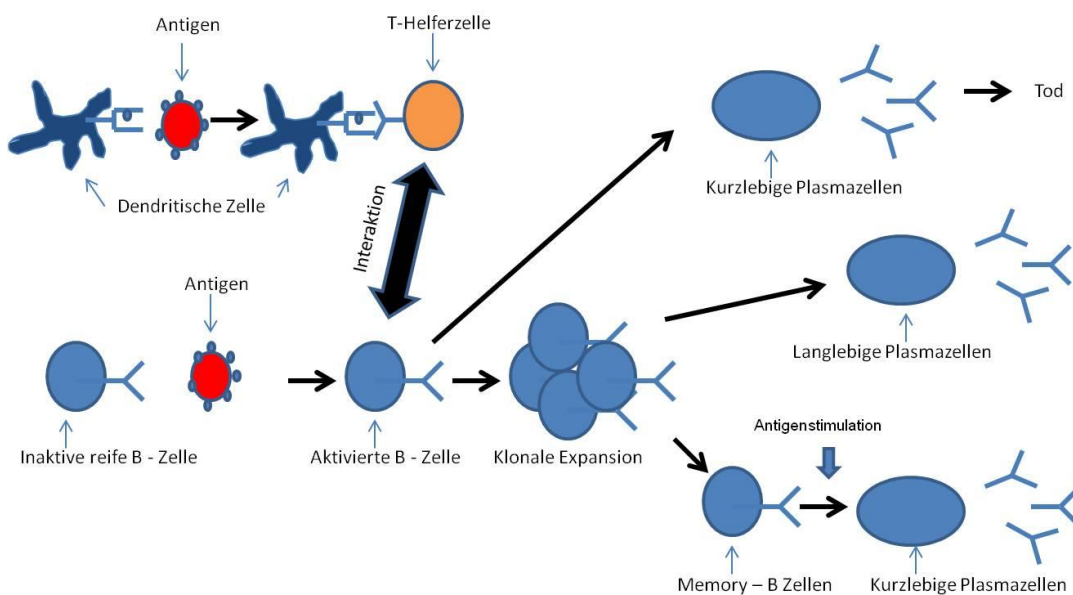


Abbildung 5 Phasen der humoralen Immunantwort. Die Aktivierung der B-Zellen wird durch spezifische Erkennung des Antigens durch Oberflächen Ig - Rezeptoren der Zellen initiiert. Aktivierte antigenspezifische T-Helferzellen interagieren mit den B-Zellen und stimulieren die Proliferation und Differenzierung der spezifischen B-Zell Klone. Aktivierte B-Zellen differenzieren zu kurzlebigen Antikörper sezernierenden Plasmazellen. Einige Abkömmlinge der differenzierten Zellen entwickeln sich zu Memory B- und langlebigen Antikörper sezernierenden Plasmazellen. Memory B-Zellen können nach erneutem Antigen Kontakt rasch zu kurzlebigen Plasmazellen differenzieren und so eine schnelle Immunantwort gewährleisten. (Abbildung modifiziert nach [80]).

Autoantikörper, die gegen körpereigene Strukturen gerichtet sind, spielen eine entscheidende Rolle bei systemischen und organspezifischen Autoimmunerkrankungen wie SLE bzw. DiCM [85, 86]. Sie entstehen dabei meist als Folge der chronischen Aktivierung autoreaktiver B-Zellen und deren Differenzierung in Plasmazellen [87]. Die Generierung dieser autoreaktiven Zellen ist dabei Teil der normalen B-Zell Entwicklung [88]. Allerdings erfolgt beim Gesunden im Rahmen der B-Zell Reifung die Eliminierung durch die Induktion zentraler und peripherer Toleranzmechanismen [89]. Bei Patienten mit Autoimmunerkrankungen scheinen diese Kontrollmechanismen gestört zu sein. Die ständige Persistenz sowohl des Antigens als auch der autoreaktiven B-Zelle bewirken eine beständig fortdauernde Immunreaktion, bei der es letztendlich auch zur Entwicklung autoreaktiver Gedächtniszellen kommt [90].

5. Therapeutische Ansätze bei DiCM

Die Therapie der DiCM ist komplex. Neben der Standardtherapie der Herzinsuffizienz existieren heute eine Reihe neuer experimenteller Verfahren. Dabei stehen insbesondere solche Therapieansätze, welche funktionell aktive anti- β_1 Ak adressieren, im Fokus der vorliegenden Arbeit.

5.1 Konventionelle Standardtherapie der DiCM

Bei der DCM gibt es bis heute keine kausale Therapie. Derzeitige therapeutische Maßnahmen orientieren sich daher an den Leitlinien der Europäischen (ESC) und Deutschen (DGK) Gesellschaft für Kardiologie zur Therapie der Herzinsuffizienz [91-94]. Danach gibt es für Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz im Endstadium kaum therapeutische Optionen. Die Prognose ist schlecht, die Lebensqualität stark eingeschränkt und als einziger Ausweg bleibt häufig nur eine Herztransplantation. Die verschiedenen konventionellen, eher mechanistischen therapeutischen Maßnahmen im Endstadium der Herzinsuffizienz

(Biventrikulärer Schrittmacher, Assist - Devices) sind jedoch nicht Gegenstand dieser Arbeit.

5.2 Spezifische und immunmodulatorische Ansätze

Neben konventionellen pharmakologischen Therapieansätzen, wie der Blockade des Renin - Angiotensin - Aldosteron - Systems und/oder der Blockade des β_1 -AR mit kardioselektiven Beta Blockern [95], wurden auf Basis der in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnisse zur möglichen Immunpathogenese der DCM neue immunmodulatorische Ansätze zur Therapie der DiCM entwickelt.

5.2.1 Blockade des Rezeptors mit Betablockern

Ein möglicher Ansatz bei β_1 -Autoantikörper - assoziierter DiCM ist die Blockade des β_1 -AR mit Betablockern und damit verbunden die indirekte pharmakologische Antagonisierung des durch diese funktionell stimulierenden Autoantikörper hervorgerufenen Effekts. Für die Betablocker Metoprolol, Bisoprolol und Carvediol konnte eine Verbesserung der Herzpumpleistung und eine Senkung der Mortalität bei Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz nachgewiesen werden [96]. Auf den ersten Blick erscheint dies paradox, da Betablocker eigentlich dafür bekannt sind, die Inotropie kurzzeitig zu verringern [97]. Es wurde auf molekularer Ebene jedoch nachgewiesen, dass eine Betablockade die toxische Überstimulation durch das sympathische Nervensystem abschwächt, indem zum einen die Desensibilisierung (Entkopplung) und Downregulation von β_1 -AR vermindert, zum anderen die myokardiale mRNA stabilisiert und die Expression des β_1 -AR wieder normalisiert werden [98]. Darüber hinaus scheint auch die Hyperphosphorylierung von Proteinen, die für die Kalzium - Hämostasie im sarkoplasmatischen Retikulum verantwortlich sind, reduziert zu werden [99]. So konnte in Tiermodellen zur DiCM von Matsui et al. nach DiCM - Induktion mit dem β_1 -EC_{II} Peptid in Kaninchen und von unserer Arbeitsgruppe nach DiCM -

Induktion im Rattenmodell ein therapeutischer Benefit einer oralen Bisoprololgabe nachgewiesen werden [100].

5.2.2 Immunsuppression

Während die Blockade von Rezeptoren mit Betablockern zu den konventionellen pharmakologischen Therapieverfahren gehört, wird der Einsatz von Immunsuppressiva bei DCM mit vermuteter autoimmuner Genese kontrovers diskutiert. Mehrere klinische Pilotstudien wurden mit diesem Ansatz durchgeführt. Hobbs et al. [101] behandelten 34 unselektierte DCM - Patienten mit Prednison und Azathioprin und konnten nur einen geringen Benefit feststellen. Allerdings kam es bei 24% der Patienten zu schweren Nebenwirkungen. Auch Berensztein et al. [102] konnten in einer Metaanalyse keinen Überlebensvorteil nach Applikation gängiger immunsuppressiver Therapien bei DCM nachweisen. Wojnicz et al. [103] untersuchten DCM Patienten nach immunsuppressiver Therapie mit Prednison und Azathioprin. Dabei beobachteten sie zwar eine langfristige Verbesserung kardialer Funktionsparameter bei den behandelten Patienten, jedoch keine Überlebensverbesserung.

Frustaci et al. [104] hingegen konnten erstmals in einer Doppelblindstudie, bei der nur Patienten mit Virus- negativer inflammatorischer Kardiomyopathie eingeschlossen wurden, eine deutliche Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion und eine Reduktion der linksventrikulären Dilatation nach Behandlung mit Prednisolon und Azathioprin feststellen.

Über den Einsatz des Medikaments Rituximab bei DCM, einem monoklonalen Antikörper gegen CD20, der zur B-Zell Depletion führt, gibt es bisher noch keine klinischen Daten. Allerdings konnte bei vielen Autoimmunerkrankungen gezeigt werden, dass B-Zellen eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielen [105]; deshalb könnte ein therapeutischer Einsatz von Rituximab auch bei der Auto-Antikörper positiven DiCM eine denkbare Option darstellen.

Zusammenfassend muss über den Einsatz von Immunsuppressiva bei DCM festgestellt werden, dass es zur Zeit noch sehr wenige systematische klinische

Daten zu dieser Therapiestrategie gibt. Nach Entnahme und Analyse einer EMB (Myokardbiopsie) und dokumentiertem Ausschluss einer aktiven myokardialen Virusinfektion erscheint der Einsatz einer kombinierten Steroid/AZT - Kombination bei DiCM nach gegenwärtigem Stand der Wissenschaft jedoch durchaus gerechtfertigt [104].

5.2.3 Immunmodulation mit Immunglobulin G i.v.

In den letzten Jahren wurde die intravenöse Gabe von Immunglobulin G (ivlg) erfolgreich bei Immunmangelerkrankungen und bestimmten Autoimmunerkrankungen angewandt [106]. Die Immunglobulingabe scheint dabei auf viele verschiedene Arten „immunmodulatorisch“ [107] zu wirken: Bindung an inhibitorische Fc Rezeptoren [108], Inhibition des Komplementsystems [108], Modulation der Zytokinlevel [109], Herabregulierung oder Neutralisierung von Autoantikörpern durch anti-idiotypische Antikörper [110] und eine Neutralisierung von Toxinen / Mediatoren, die eine Antikörperproduktion stimulieren [111, 112]. Auch bei der DCM wurde in verschiedenen klinischen Studien der Einsatz von Immunglobulin getestet. Während Gullestad [113] bei Patienten mit kongestiver Herzinsuffizienz nach DCM eine geringe Verbesserung der Herzpumpleistung (LVEF) und einen gewissen antiinflammatorischen Effekt der Therapie nachweisen konnte, zeigte sich in einer größeren randomisierten klinischen Studie von McNamara [114] kein Unterschied in der kardialen Pumpleistung (LVEF) zwischen der mit Placebo und der ivlg behandelten Patienten - Gruppe. Ein Einsatz der ivlg Therapie bei der DCM bleibt nicht zuletzt auch wegen der hohen Kosten fragwürdig. Für eine endgültige Beurteilung dieses therapeutischen Ansatzes sind weitere randomisierte, placebokontrollierte Studien notwendig.

5.2.4 Immunadsorption

Eine weitere therapeutische Möglichkeit stellt die Entfernung der stimulierenden anti- β_1 -Ak aus dem zirkulierenden Blut mit Hilfe der selektiven oder unselektiven Immunadsorption dar [52]. Einige Autoren [115] sehen darin ein effektives und relativ risikoarmes Therapieverfahren, durch das sich eine mögliche Herztransplantation aufschieben oder eventuell sogar gänzlich vermeiden lässt.

Bei der unselektiven Immunadsorption werden IgG, IgM, IgA, IgD, IgE, zirkulierende Immunkomplexe und Ig - Fragmente aus dem menschlichen Plasma entfernt. Dazu wird das Plasma entweder über eine Protein A Säule oder aber eine Säule, die mit polyklonalen Schafsantikörpern gegen menschliches Immunglobulin beschichtet ist, geleitet [116]. Mehrere Arbeitsgruppen berichten über eine hämodynamische Stabilisierung und Verbesserung sowohl kardiovaskulärer Messparameter als auch klinischer Parameter (NYHA-Klasse, 6-Minuten-Gehstrecke) sowie über eine messbare Reduktion des oxydativen Stress (Stoffwechsellage, bei der eine das physiologische Ausmaß überschreitende Menge reaktiver Sauerstoffverbindungen gebildet wird) nach der IA-Therapie [115, 117-119]. Ein Überlebensbenefit konnte bisher aber nicht gezeigt werden. In diesem Zusammenhang muss betont werden, dass der Effekt nicht auf die Eliminierung von Autoantikörpern mit Spezifität für das pathophysiologisch relevante Autoantigen zurückgeführt werden kann, da ja bei der unselektiven Immunadsorption Antikörper vieler unterschiedlicher Spezifitäten aus dem Plasma entfernt werden. Zu diesem Ergebnis kommt auch eine Studie von Mobini et al. [120]: Sowohl β_1 -AK negative als auch β_1 -AK positive Patienten zeigten die oben erwähnte Verbesserung hämodynamischer kardialer Funktionsparameter nach unselektiver Immunadsorption. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die Entfernung vieler unterschiedlicher Antikörperklassen - mit dem Risiko einer vorübergehenden Abwehrschwäche v.a. gegenüber bakteriellen Mikroorganismen - und eine Abmilderung der Entzündungsreaktion durch die Elimination von Zytokinen im Rahmen einer Immunadsorption zurückzuführen.

In einer kleineren Pilotstudie wurden 8 Patienten einer sogenannten selektiven Immunadsorption unterzogen, bei der mit Hilfe von Peptid-beschichteten Säulen spezifisch gegen den β_1 -AR gerichtete Antikörper entfernt wurden [121]. Danach kam es bei diesen Patienten zu einer langfristigen Verbesserung der Herzleistung, erkennbar durch einen Anstieg der LVEF und eine Regression der linksventrikulären Dilatation. Dieses Resultat steht etwas im Widerspruch zu dem Ergebnis von Mobini et al., unterstreicht aber die wahrscheinlich herausragende Bedeutung der anti- β_1 -EC_{II} Ak in der Pathogenese der DiCM [122].

5.2.5 Neutralisierung herzschädlicher Antikörper mit Hilfe Epitop homologer Peptide

Unsere Arbeitsgruppe verfolgte mit Hilfe des unter 3.2 beschriebenen Tiermodells [73] einen neuen Therapieansatz mit einem synthetischen „Fänger - Peptid“, das der Aminosäuren - Sequenz des β_1 -EC_{II} entsprach. Die bestmögliche Imitation des „Target - Antigens“ sollte ähnlich einer „molekularen Immunadsorption“ zu einem Abfangen und somit zu einer funktionellen Neutralisation der schädlichen anti- β_1 -EC_{II} Ak im Blut führen, bevor diese ihre schädliche Wirkung am kardialen β_1 -AR ausüben könnten [123].

6. Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen der Langzeit - Peptidtherapie auf das Immunsystem im Rattenmodell der DiCM zu untersuchen. Dazu wurden epitop-homologe Zyklopeptide des zweiten extrazellulären Loops bestehend aus 25 Aminosäuren in zyklischer und linearer Form (ECII-25CP und ECII-25LIN) sowie eine aus 18 Aminosäuren bestehende Mutante in zyklischer und linearer Form (ECII-18CPm und ECII-18LINm) synthetisiert. Nach Induktion des DCM Phänotyps durch monatliche Immunisierung mit dem Fusionsprotein (β_1 -EC_{II}/GST-FP) erfolgte ab dem 9. Versuchsmonat alle 4 Wochen eine i.v. Peptidgabe unter Beibehalten der monatlichen Immunisierungen. Neben den Effekten auf den kardialen Phänotyp (Überwachung funktioneller Herzparameter mittels Echokardiographie, Linksherzkatheter) standen vor allem die Auswirkungen der verschiedenen Peptide auf das Immunsystem im Mittelpunkt. Dazu erfolgte die Analyse der wesentlichen Komponenten, die an einer humoralen Immunantwort beteiligt sein sollten:

- Analyse des spezifischen Antikörpertiters mittels ELISA
- Analyse der CD4⁺ T-Zellen mittels T-Zell Proliferations Assay
- Analyse der B-Zellen
 - 1) Memory B-Zellen (Elispot, Durchflusszytometrie)
 - 2) Plasmazellen (Elispot)

Neben den Effekten der Peptidtherapie auf das Immunsystem sollten auch die histologischen Veränderungen des Herzens bei der DiCM im Therapiemodell der Ratte untersucht werden. Im Mittelpunkt der histologischen Analysen stand dabei die Fragestellung, ob es bei der DiCM ähnlich wie bei anderen Autoimmunerkrankungen zur Infiltration von B- und T-Zellen ins Zielorgan Herz kommt.

B) Material und Methoden

7. Material

7.1 Versuchstiere

40 männliche, 3 Monate alte, Lewis-Inzuchtratten vom Stamm LEW/CrIBR wurden von der Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland bezogen. Die Tiere wurden im Tierstall des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie in Würzburg entsprechend den gesetzlichen Tierschutzvorschriften untergebracht und versorgt. Je 4 bis 5 Versuchstiere wurden in erhöhten Typ 3 - Käfigen gehalten.

7.2 Geräte

Zur echokardiographischen Untersuchung wurde die VeVo 770 Maschine (Visual Sonics, Toronto, Canada) ausgestattet mit einer 17 MHz - Schallkopfsonde verwendet. Die Herzkatheteruntersuchungen erfolgten mit einem 1.8 F High - fidelity - Tip-Katheter (Millar Instruments, Houston, Texas, USA). Die Daten wurden offline mit Power Lab (ADInstruments) analysiert.

Nach Gewinnung und Fixierung der Rattenherzen erfolgte die Entwässerung und Überführung der Herzscheiben in Paraffin in einem vollautomatisierten Micro - Infiltrationssystem (Thermo Electron Corp., Woburn, USA) im Institut für Pathologie der Universität Würzburg. Paraffinschnitte wurden am Schlittenmicrotom SM 2000 R (Leica Microsystem GmbH, Bensheim, Deutschland) angefertigt. Für die Gefrierschnitte wurde das Cryostat (Leica CM3050 S; Wetzlar, Deutschland) verwendet. Bei der mikroskopischen Untersuchung kam das Mikroskop Axiovert 135 (Zeiss, Jena, Deutschland) zum Einsatz. Computergestützte Aufnahmen am Mikroskop erfolgten mit der Spot-Insight-Color-

Kamera (Kodak, New York, USA). Die Analyse der Immunzellen wurde am Durchflusszytometer LSR II (BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

7.3 Chemikalien und Materialien

Die Induktion der Fusionsproteine erfolgte nach etabliertem Protokoll [76]. Die Zyklopeptide wurden kommerziell von der Firma PSL GmbH (Heidelberg, Deutschland) hergestellt. Die einzelnen in den Versuchen verwendeten Chemikalien und Materialien sind im Anhang aufgelistet.

7.4 Verwendete Software

Diagramme und zugehörige statistischen Berechnungen erfolgten mit Microsoft Excel®. Die Graphiken wurden mit Hilfe von Corel Paint Shop Pro® erstellt und mit Prism Graph® sowie SPSS Statistics® statistisch ausgewertet.

8. Methoden

8.1 Induktion der Kardiomyopathie

Zur Generierung eines kardiomyopathischen Phänotyps wurden N = 40 männliche Lewis Ratten monatlich subkutan mit 50 µl (in 500 µl PBS) eines Fusionsproteins (β_1 -EC_{II}/GST-FP) bestehend aus der 2. extrazellulären Domäne des humanen beta 1 adrenergen Rezeptors und der bakteriellen Glutathion - S - Transferase (GST) s.c. immunisiert [73].

8.2 Therapie mit verschiedenen Peptiden

Auf Basis der Aminosäuren - Primärstruktur der zweiten extrazellulären Schleife des β_1 -AR wurden Peptide generiert, die das Target - Antigen bestmöglich imitieren sollten. Dies sollte statt starrer linearer Peptide (mit kurzer HWZ) insbesondere durch ringförmige „zyklische“ Peptide (mit längerer HWZ, da weniger angreifbar durch Peptidasen) erreicht werden (siehe folgende Abbildung 6). Um bei in der Primärstruktur insgesamt vorhandenen 3 Cysteinen bei Ausbildung der Tertiärstruktur nur eine einzige Disulfidbrücke zu ermöglichen und damit auch die Stabilität des Ringmoleküls weiter zu erhöhen, wurde in einer mutierten Form des Peptids die Aminosäure Cystein durch Serin ersetzt.

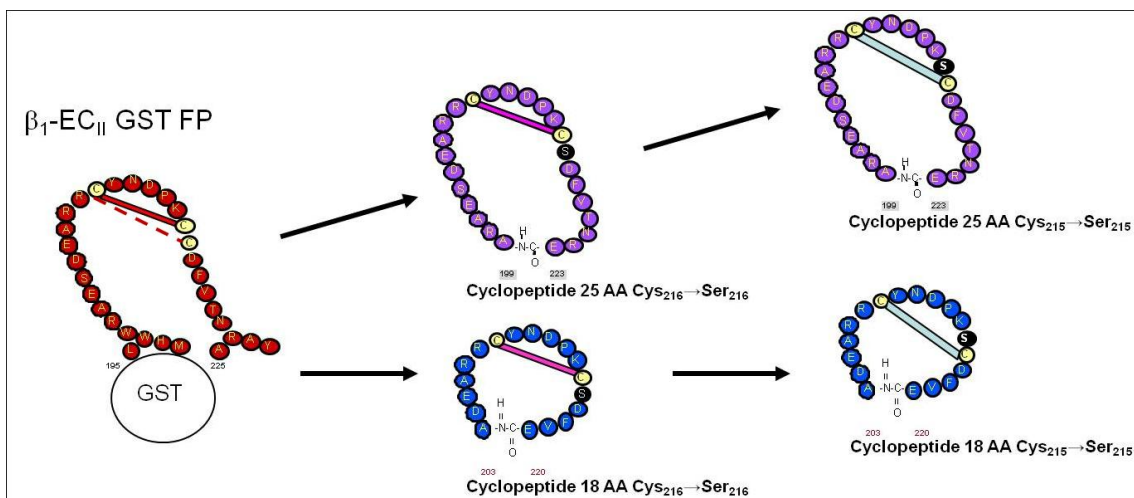


Abbildung 6 Generierung verschiedener Zycklopeptidmutanten aus der zweiten extrazellulären Schleife des β_1 -AR mit dem Ziel nur eine intramolekulare Disulfidbrücke zuzulassen (spontane Brückenbildung).

Um den therapeutischen Effekt der verschiedenen Peptide zu untersuchen, wurden den Tieren neun Monate nach der ersten Immunisierung (zu diesem Zeitpunkt hatten alle Tiere den Phänotyp einer DCM ausgebildet) die folgenden Peptide (in einer Dosierung von jeweils 1,0 mg/kg) alle 4 Wochen intravenös injiziert:

- a) 25 Aminosäure (AS) lange zyklische Peptide, entsprechend β_1 -EC_{II} (ECII-25CP), n=10
- b) 25 AS lange lineare Peptide entsprechend β_1 -EC_{II} (ECII-25LIN), n=5
- c) 18 AS lange mutierte zyklische Peptide (ECII-18CPm), bei denen ein Cystein durch ein Serin ersetzt wurde, n=10
- d) 18 AS lange mutierte lineare Peptide (ECII-18LINm), n=5
- e) anti- β_1 -EC_{II} AK positive, regelmäßig immunisierte, unbehandelte Kontrolltiere, DCM - Phänotyp, Beta 1 Gruppe (Positiv - Kontrolle), n=10
- f) 0,9% NaCl - injizierte nicht immunisierte Kontrolltiere (Negativ - Kontrolle), n=5

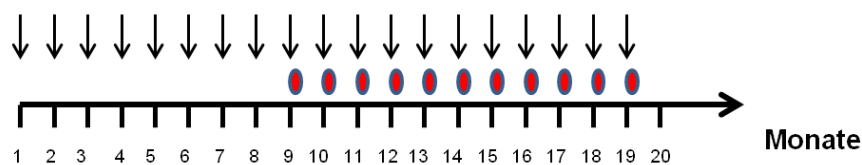


Abbildung 7: Monatliche Immunisierung mit β_1 -EC_{II}/GST-FP (schwarze Pfeile), ab dem 9. Monat wurde ein Teil der Tiere mit verschiedenen Zylopeptiden sowie linearen Peptiden behandelt (rote Ringe).

8.3 ELISA

Der „Enzyme - linked immunosorbent assay“ (ELISA) ist ein Verfahren, das dazu dient Antikörper gegen ein spezifisches Antigen nachzuweisen und zu quantifizieren. Im hier verwendeten Versuchsaufbau werden die gesuchten Antikörper an Antigen gecoatete Platten (lineares EC_{II} Peptid) gebunden und in einem zweiten Schritt durch die Bindung eines Enzym - markierten Spezies - spezifischen Immunglobulin - Antikörpers visualisiert. Im Rahmen dieser Arbeit diente der Assay der Detektion von anti- β_1 -EC_{II} Ak, die durch die monatliche Immunisierung der Tiere mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP induziert wurden. Dazu wurden den Ratten jeweils direkt vor sowie 24 Stunden nach der Peptidinjektion ca. 500 μ l Blut aus der Schwanzvene entnommen und das entsprechende Serum durch Zentrifugation gewonnen.

Abbildung 8 verdeutlicht die genaue Vorgehensweise. Die Inkubationsvolumina betragen jeweils 50 µl pro Well, alle Waschgänge wurden mit 300 µl durchgeführt. Mikrotierplatten wurden für 12 h bei 4 C° mit linearem EC_{II} Peptid in Coating - Puffer (Verhältnis 1:1000) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS/Tween 0,1% erfolgte die Blockierung der für die Proben bestimmten Wells mit fettfreier Milch (50 µl / Well) sowie das Pipettieren einer Standardreihe mit gereinigtem Ratten IgG in Coating - Puffer. Anschließend wurden die Platten für 2 h bei 37 C° im Wasserbad inkubiert. Jetzt wurden die Platten mit den Seren der Tiere, die die anti-β₁-EC_{II} Ak enthielten in unterschiedlichen Verdünnungen mit Milch (1/500, 1/1000, 1/2000, 1/4000, 1/6000, 1/8000, 1/10000, 1/20000) für 2 h bei 37 C° inkubiert. Gleichzeitig erfolgte die Blockade der Standardreihen mit Milch. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurden die Platten zunächst mit biotinyliertem Anti - Ratte IgG Antikörper (1/7000 in Milch) für 1,5 h und anschließend mit Streptavidin - Peroxidase (1/4000 in Milch) bei 37 C° im Wasserbad inkubiert. Die Färbereaktion wurde nach dreimaligem Waschen (PBS/Tween 0,1%) mit 0,52 mg OPD/ml Substratpuffer sowie 1,67 µl H₂O₂ initiiert und nach 30 Minuten mit 3M Schwefelsäure gestoppt. Die Auswertung der Platten erfolgte mit einem Spektrophotometer (Spectromax 340, Molecular Devices).

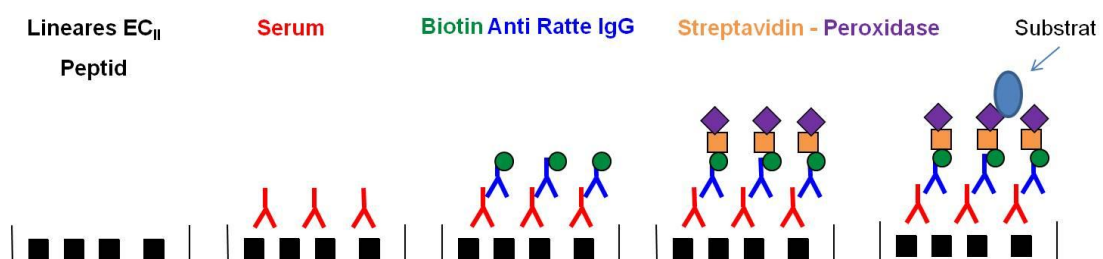


Abbildung 8 Aufbau des ELISA zum Nachweis von anti-β₁-EC_{II} Ak aus Rattenserum.

8.4 Echokardiographie

Die echokardiographische Untersuchung der Versuchstiere erfolgte einmalig vor Immunisierung (Basiswerte) und anschließend alle 4 Monate zur Verlaufskontrolle (also insgesamt 6 Untersuchungen im Versuchszeitraum).

Bei jeder Ultraschalluntersuchung wurden die Herzen sowohl im B-Mode als auch im M-Mode dokumentiert; die funktionellen Messungen erfolgten im 5-Kammer-Blick mittels Pulsed-Wave-(PW)-Doppler-Verfahren. Mit Hilfe des Aortendurchmessers (M-Mode) und der Strömungsgeschwindigkeiten (PW-Doppler) lassen sich die Durchflussvolumina berechnen.

cardiac output (CO) (CO [ml/min] = aortic VTI \times (π [LV outflow tract diameter/2]²) \times heart rate

Formel 1: Berechnung der kardialen Auswurfleistung aus dem aortalen Geschwindigkeits - Zeit Integral und der Herzfrequenz [73]

Die Ratten wurden mit 40 mg Ketamin-HCl und 7,5 mg Xylazin pro kg/KG anästhesiert. Anschließend wurde mit einer Haarschneidemaschine thorakal das Fell entfernt. Zunächst erfolgte die Darstellung des Herzens im linksparasternalen Längs- und Querschnitt in Höhe der atrioventrikulären Klappenebene. Im M-Mode wurde der Durchmesser des linksventrikulären Ausflusstraktes (DiaAo; in mm) in Höhe der Basis der Aortenklappe bestimmt. Des Weiteren wurden im M-Mode die Dicke des interventrikulären Septums (IVS), der linksventrikuläre Hinterwand (LVPW) sowie der Innendurchmesser des linken Ventrikels enddiastolisch und endsystolisch (LVED, LVES; in mm) bestimmt. Aus den M-Mode-Untersuchungen des linken Ventrikels wurde die regionale Verkürzungsfraction (FS, in Prozent; siehe Formel 2) bestimmt.

$$FS = \frac{LVED - LVES}{LVED} * 100 \quad \text{in [\%]}$$

Formel 2: Berechnung der regionalen Verkürzungsfraction aus dem linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVED) und dem linksventrikulären endsystolischen Durchmesser (LVES) in % [73]

Ausgehend von der Herzspitze erfolgte die zweidimensionale Darstellung des Herzens im Vier- und Fünfkammerblick. Mit dem PW-Doppler wurden die Flusskurven während der Herzaktionen an der Mitral- und Aortenklappe aufgezeichnet. Das Sample Volume wurde kleinstmöglich gewählt und in den Bereich der maximalen Flussgeschwindigkeit gelegt. Die Aufzeichnung von mindestens 20 Flusskurven erfolgte digital. Dopplersonographisch wurden die maximale Flussgeschwindigkeit des linksventrikulären Ausflusstraktes ($V_{\max} \text{ Ao}$) und das Geschwindigkeitszeitintegral (VTI, in mm) gemessen. Mit diesen Parametern wurden das Schlagvolumen, bzw. unter Einbeziehung der Herzfrequenz, das Herzzeitvolumen (HZV, in ml/min) und, unter Einbeziehung des Körpergewichts, der kardiale Index (CI, in ml/min/g) bestimmt. Der kardiale Index entspricht dem Herzzeitvolumen bezogen auf das jeweilige Körpergewicht und dient als zusätzlicher gewichtskorrigierter Parameter zur Beurteilung der Pumpleistung des linken Ventrikels.

8.5 Herzkatheter

Zwei bis drei Tage nach der letzten Echokardiographieuntersuchung wurden die Ratten invasiv mittels Linksherzkatheter untersucht. Die Tiere wurden dazu leicht anästhesiert, mit dem Rücken auf einen vorgewärmten (37 C°) Tisch gelegt und an den Extremitäten vorsichtig fixiert. Nach mikroskopisch durchgeführter Präparation der rechten Arteria carotis interna wurde ein 1,8 F Katheter über eine ca. 0,5 mm lange Inzision der Gefäßwand via Aorta ascendens in den linken Ventrikel vorgeschoben. Die Druckkurve des linken Ventrikels wurde für 15 Minuten digital aufgezeichnet (Power Lab, ADInstruments). Die Auswertung erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt offline und verblindet. Registriert wurden zudem die Herzfrequenz (HF), der maximale linksventrikuläre systolische (LVP) und enddiastolische Druck (LVEDP) sowie die linksventrikuläre Druckerhöhungsgeschwindigkeit (= Kontraktilität; $+\text{dP}/\text{dt}$) und Druckabfallgeschwindigkeit (= Relaxation; $-\text{dP}/\text{dt}$).

8.6 Organentnahme und Zellisolierung

8.6.1 Gewinnung der Organe

Unmittelbar nach der Herzkatheteruntersuchung wurde den Tieren das schlagende Herz, Milz, Leber, beide Nieren, beide Tibiae und Femura entnommen, mit eiskaltem PBS gespült, „feucht“ gewogen bzw. vermessen (Tibia/Femur) und für die weitere Präparation in PBS auf Eis gelagert.

8.6.2 Isolierung der Milz- und Knochenmarkszellen

Um die Milzzellen zu gewinnen, wurde die Milz durch ein 70 µm Nylon - Zellsieb gedrückt. Die gewonnene Suspension wurde in 50 ml BSS/BSA aufgenommen und zentrifugiert (1600 rpm, 5 min, RT). Anschließend wurden dem Pellet zuerst unter vorsichtigem Vortexen 9 ml dest. H₂O und dann 9 ml NaCl (1,8%) zugegeben, um die Erythrozyten zu lysieren. Nach erneutem Zentrifugieren (1600 rpm, 5 min, RT) und Waschen wurden die Zellen in 10 ml BSS / BSA aufgenommen und gezählt.

Zur Gewinnung der Knochenmarkszellen erfolgte die Abtrennung der Epiphysen des Femurs und der Tibia. Durch Spülen der Markhöhle mit einer 5 ml Spritze und einer Neoject Kanüle wurde das Knochenmark gewonnen. Die Suspension wurde in BSS / BSA aufgenommen, zentrifugiert und mit einem Zellsieb filtriert, um Knochensplitter zu entfernen. Anschließend erfolgte die Lyse der Erythrozyten durch zehnmünütige Inkubation mit 9 ml TAC Puffer. Nach Zentrifugation und erneutem Waschen der Zellen in 50 ml BSS / BSA wurden die Zellen in 10 ml RPMI 1640 / XVIVO - 15 Medium (Verhältnis 1/1 + 10 % FCS) aufgenommen und gezählt.

8.7 Detektion β_1 -EC_{II} spezifischer CD4⁺ T-Zellen

Ein sehr guter Test zur Detektion antigenspezifischer T-Zellen ist der Lymphozyten Proliferationstest. Durch die wiederholte Immunisierung der Tiere mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP entstehen u.a. auch antigenspezifische CD4⁺ Memory T-Zellen. Nach Isolation dieser Zellen und Restimulation mit jeweils unterschiedlichen Antigenen kann anhand des Einbaus von ³H - Thymidin in die DNA der sich aktiv teilenden Zellen deren Proliferation gemessen werden. In dieser Arbeit wurde mit Hilfe dieser Methode der Effekt der Peptidtherapie auf die β_1 -EC_{II} spezifischen CD4⁺ T-Zellen untersucht.

Aus Milzzellen wurden CD4⁺ T-Zellen mittels magnetischer Separation isoliert (MACS Beads und Säulen). So konnten jeweils ca. 1×10^6 CD4⁺ T-Zellen mit einem Reinheitsgrad von ca. 85% gewonnen werden. Anschließend wurden die Zellen zusammen mit 1×10^6 bestrahlten Thymozyten (die von 4 - 8 Wochen alten naiven Ratten gewonnen wurden und als antigenpräsentierende Zellen dienten) und verschiedenen Antigenen (cycl. Peptid 1,0 μ g/ml, GST 1,0 μ g/ml, β_1 -EC_{II}/GST-FP 1,0 μ g/ml, β_1 -EC_{II}/GST-FP 0,1 μ g/ml, PPD 1,0 μ g/ml, und Medium alleine) in einer 96 - Well Platte in RPMI 1640 (Medium) bei 5% CO₂ und 37 C° kultiviert. Am Tag 3 wurden die Zellen mit 1,25 μ Ci ³H - Thymidin pro Well gepulst und erneut für 16 Stunden inkubiert. Nach Lyse der Zellen wurde die DNA schließlich auf Fieberglasfilter aufgetragen und anhand der Radioaktivität des in die DNA eingebauten Thymidins konnte die Proliferation mit einem Flüssigkeits - Lumineszenz- und Szintillationszähler (1450 Microbeta, Wallac) gemessen werden. Um den β_1 -EC_{II} spezifischen Proliferationsindex zu erhalten, wurde der Thymidineinbau bei Antigen stimulierten Zellen bezogen auf den Thymidineinbau nicht stimulierter CD4⁺ T-Zellen normalisiert.

8.8 Detektion β_1 -EC_{II} spezifischer B-Zellen

Die monatliche Immunisierung der Ratten mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP führt u.a. zur Generierung β_1 -EC_{II} spezifischer B-Zellen (Memory B- und Plasmazellen). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frequenz dieser beiden Zellpopulationen in Milz und Knochenmark von immunisierten und mit Peptid behandelten Tieren sowie von immunisierten und nicht behandelten Tieren analysiert. Als Methoden dienten hierbei der ELISPOT - Assay sowie die Durchflusszytometrie.

8.8.1 ELISPOT: Enzyme - Linked Immuno Spot Assay

Der ELISPOT - Assay ist eine Methode zur Quantifizierung Antikörper sezernierender Zellen. Im Rahmen dieser Arbeit diente der ELISPOT zur Detektion von Zellen, die an der Produktion von anti- β_1 -EC_{II} Antikörpern beteiligt sind (Plasmazellen, Memory B-Zellen).

Die Durchführung des ELISPOT - Assays lässt sich in mehrere Schritte einteilen: Zunächst wurden 25 Well - Platten mit anti rat IgG (2 μ g / ml, zur Bestimmung der Gesamtzahl der IgG produzierenden Zellen) bzw. mit den Antigenen GST (10 μ g / ml) sowie β_1 -EC_{II}/GST-FP (10 μ g / ml) in Coating - Puffer beschichtet und über Nacht bei 4 C° inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit BSS und einstündiger Blockierung mit BSS/BSA bei 37 C° erfolgte die Übernachtinkubation mit Milz - und Knochenmarkszellen (zwischen 1 x 10³ und 5 x 10⁶ Zellen / Well) im Brutschrank (37 C° + 5%CO₂). Dem erneuten Waschen mit PBS/Tween 0,05% und PBS schloss sich die Inkubation mit anti Ratte IgG Antikörper, konjugiert mit alkalischer Phosphatase (0,3 μ g/ml) für 3 Stunden bei 37 C° an. Nach erneutem mehrmaligen Waschen mit PBS/Tween 0,05% wurden die Platten durch die Zugabe von BCIP / AMP Lösung als Substrat für die alkalische Phosphatase im Verhältnis 5:1 entwickelt, so dass dort, wo spezifische Antikörper sezerniert und an der Platte gebunden wurden, hellblaue Spots entstanden. Um die Zahl der spezifischen Antikörper sezernierenden Zellen zu

bestimmen, wurden die Spots jeder 25-Wellplatte innerhalb von 24 Stunden ausgezählt.

Bei der Auswertung des ELISPOT - Assays geht man davon aus, dass jeder Spot einer einzelnen antikörpersezernierenden Zelle entspricht. Um die Zahl der β_1 -EC_{II} spezifischen Zellen zu ermitteln, mussten die GST - spezifischen Zellen von den β_1 -EC_{II}/GST-FP spezifischen Zellen subtrahiert werden. Das erhaltene Ergebnis wurde auf die Gesamtzahl der IgG sezernierenden Zellen bezogen.

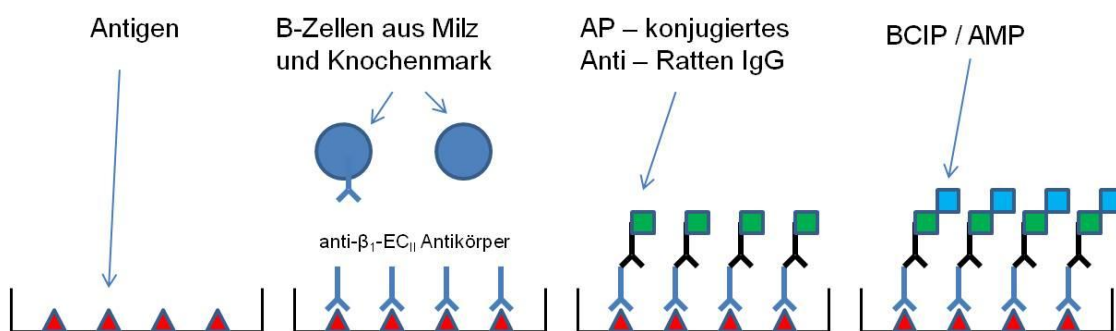


Abbildung 9 Aufbau des ELISPOT - Assays zum Nachweis von β_1 -EC_{II} spezifischen B-Zellen (Plasmazellen, Memory B-Zellen). Sezernierte Antikörper werden von immobilisiertem Antigen (z.B. β_1 -EC_{II}/GST-FP) gebunden [124, 125] und in einem zweiten Schritt mit Hilfe von konjugiertem anti Ratten Immunglobulin sowie einer Enzymreaktion detektiert.

8.8.2 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine etablierte Methode zur Detektion und quantitativen Analyse von Lymphozyten - Subpopulationen. Dabei passieren die Zellen in einem Flüssigkeitsstrom einen Laserstrahl und abhängig von der durch die Zellen induzierten Lichtbeugung und -brechung können so zunächst die Parameter Zellgröße (Forward Scatter, FSC) und Zellgranularität (Side Scatter) bestimmt werden. Durch Inkubation mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern mit Spezifität für unterschiedliche Zelloberflächenproteine ist zudem die Detektion diverser Lymphozyten - Subpopulationen möglich.

Zur Detektion β_1 -EC_{II} spezifischer B-Zellen wurden die folgenden Reagenzien eingesetzt:

- Anti Rat IgG PE (Antikörper gegen membrangebundenes Immunglobulin auf Memory B-Zellen = B-Zell Rezeptor)
- Anti CD45 RA FITC (Antikörper gegen B-Zell Marker der Ratte)
- DYL 649 markiertes β_1 -EC_{II}/GST-FP (Farbstoff markiertes Antigen, bindet an den B-Zell Rezeptor mit entsprechender Spezifität)

Analysiert wurden immunisierte nicht therapierte, immunisierte therapierte und naive Tiere (Negativkontrolle) in jeweils 4 verschiedenen Färbungen. Die einzelnen Färbeschritte beschreibt die folgende Tabelle:

1 Negativkontr.	Ungefärbt	Waschen			
2 B-Zellen	anti rat IgG PE (Fc)	Waschen	NRS	anti rat CD45RA FITC	Waschen
3 EC _{II} spezifische B-Zellen	anti rat IgG PE (Fc)	Waschen	NRS + GST	anti rat CD45RA FITC β_1 -EC _{II} /GST-FP DYL 649	Waschen
4 β_1 -EC _{II} /GST-FP spezifische B-Zellen	anti rat IgG PE (Fc)	Waschen	NRS	anti rat CD45RA FITC β_1 -EC _{II} /GST-FP DYL 649	Waschen

Gefärbt wurden je 2×10^7 Milzzellen in 1ml FACS Puffer. Zwischen den einzelnen Färbeschritten wurde jeweils dreimal mit 2 ml FACS - Puffer gewaschen. Die Inkubation der einzelnen Antikörper erfolgte für je 15 Minuten auf Eis. NRS (Normales Ratten Serum) diente der Sättigung der freien Bindungsstellen des anti Ratte IgG PE Antikörpers. Zunächst wurden die Memory B-Zellen über die Markierung mit anti Ratte IgG und anti Ratte CD 45 RA Antikörpern identifiziert. Aus dieser Zellpopulation wiederum sollten dann die β_1 -EC_{II} - spezifischen Zellen, nach vorheriger Blockade der GST - spezifischen Zellen mit GST, durch die Anfärbung mit DYL 649 markiertem β_1 -EC_{II}/GST-FP identifiziert werden.

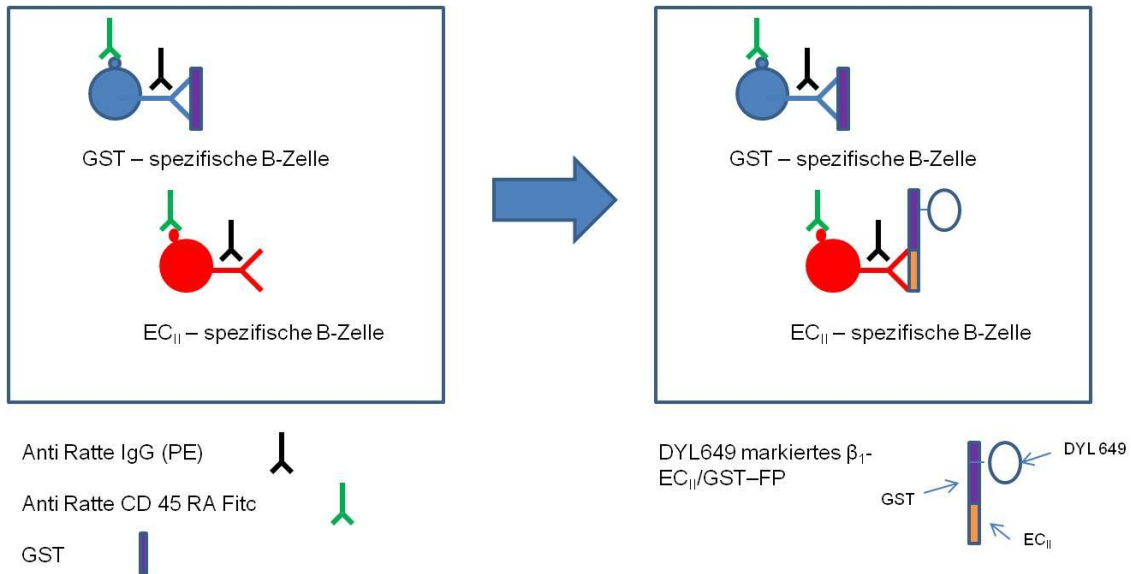


Abbildung 10 In der Zellpopulation der IgG und CD45 exprimierenden B-Zellen werden die GST - spezifischen Zellen mittels Inkubation mit GST blockiert und in einem zweiten Schritt die EC_{II} - spezifischen Zellen mittels DYL649 markiertem β_1 -EC_{II}/GST-FP markiert.

Zur Analyse der am Durchflusszytometer (LSRII, BD) gewonnenen Daten wurde das Programm Cell Quest (BD) und Flowjo (Tree Star) verwendet. Dabei wurden ausschließlich Zellen eingeschlossen, die aufgrund ihres „Forward Scatter“ und „Side Scatter“ Profils als lebend eingestuft wurden.

8.9 Histologie

Neben den Effekten der Peptidtherapie auf die B- und T-Zellen galt eine weitere Fragestellung dieser Arbeit der Analyse von möglichen histologischen/immunhistochemischen Veränderungen von Milz und Herz. So wird bei anderen Autoimmunerkrankungen wie der chronischen lymphozytären Thyreoiditis (Hashimoto) eine lymphozytäre Infiltration von Zielorganen beobachtet [126].

Dies sollte nun auch bei der DiCM der Ratten untersucht werden. Dazu wurden Paraffin- und Gefrierschnitte von Milz und Herz 20 Monate nach Beginn der Immunisierung mit β_1 -EC_{II}/GST-FP angefertigt und untersucht.

8.9.1 Paraffinschnitte

Im Institut für Pathologie der Universität Würzburg wurden Herz- und Milzpräparate der Versuchstiere / Ratten im Rahmen einer automatisierten Routinepräparation in flüssiges, 60 C° heißes Paraffin überführt und dann durch aufsteigende Ethanollösungen sowie Ethanol-Xylenlösungen nochmals entwässert. Danach wurden die behandelten Organe in Paraffinblöcke gegossen, auf einer Kälteplatte ausgekühlt und in ein Mikrotom (Leika) eingespannt und 2 µm dicke Paraffinschnitte angefertigt. Die Schnitte wurden auf Super-Frost Plus-Objektträger aufgezogen und anschließend über Nacht bei 37 C° getrocknet. Jeweils ein Milz- und ein Herzpräparat wurden für die Hämatoxylin - Eosin - Färbung (HE) verwendet. Zwei weitere Schnitte dienten zur Färbung auf B- und auf T-Lymphozyten

Entparaffinisierung

Die Entparaffinisierung erfolgte mit Xylol (30 Minuten) und einer absteigenden Alkoholreihe (2 x 99%, 2 x 96%, 80%, 2 x 70%, 50%, je 2 Minuten). Danach wurden die Schnitte in destilliertes Wasser überführt.

HE - Färbung

Die Färbung mit Hämatoxylin und Eosin (HE) der Paraffinschnitte erfolgte nach folgendem Protokoll:

Entparaffinieren	Xylol	12 min
	Alkohol 100%	6 min
	Alkohol 70%	2 min
Hämalaun		10 min
Leitungswasser	fließend bläuen	10 min
Eosin		Ca 50 sek
Entwässern	Alkohol 70%	1 min
	Alkohol 100%	8 min
	Xylol	6 min

Nach der Färbung wurden die Objektträger mit Eukitt eingedeckt.

Spezifische Färbung: B-Zell- und T-Zellfärbung

Trotz unterschiedlicher Ansätze und der Anwendung verschiedener Antigen - Retrieval Methoden gelang die T- und B-Zellfärbung an Paraffinschnitten nicht. Deswegen wurden dafür Gefrierschnitte verwendet.

8.9.2 Gefrierschnitte

Ein Teil der entnommenen Organe wurde routinemäßig in Tissue - Tek - Kryomedium eingebettet und in Flüssigstickstoff eingefroren. Die so gewonnenen Präparate wurden bis zu sechs Monate bei -80 C° aufbewahrt. Gewebeschnitte wurden in einer Dicke von 5 µm auf einem Cryotom (Leica) angefertigt. Die Schnitte wurden dann mit gekühltem (-10 C°) Aceton fixiert und luftgetrocknet. Anschließend wurden immunhistochemische Färbungen durchgeführt.

8.9.3 Immunhistochemie

Mit Hilfe der Immunhistochemie können u.a. Zellen in Gewebsschnitten durch spezifische Antikörper detektiert und unter dem Lichtmikroskop visualisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit diente die Methode dem Nachweis von B- und T-Zellen im Herzen und in der Milz. Dabei wurden Antikörper gegen die Oberflächenantigene CD3 (T-Zellen) und CD45RA (B-Zellen) verwendet. Durch die Bindung eines zweiten biotinylierten Antikörpers an den jeweiligen Primärantikörper wurden die Zellen nach Zugabe eines Enzym - Substratkomplexes detektierbar. Untersucht wurden immunisierte behandelte, immunisierte unbehandelte und naive Tiere. Die Milzen der jeweiligen Tiere dienten als Positivkontrolle, da dort mit Sicherheit B- und T-Zellen erwartet wurden. Als Negativkontrolle wurden die Schnitte anstelle der Zugabe des primären Antikörpers mit PBS inkubiert.

Nach dem Auftauen wurden die Schnitte für 30 Minuten mit 10% BSA/PBS geblockt und daraufhin mit dem primären Antikörper (Maus anti Ratte CD3 Antikörper oder Maus anti Ratte CD45RA [Ox33]) über Nacht bei +4 C° (Verdünnung 1:500 in 1% BSA/PBS) inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 200 ml Methanol und 3,5 ml 30% H₂O₂ für 15 Minuten. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Schnitte mit dem sekundären Antikörper (biotinylierter anti Maus IgG [H+L]) für 45 Minuten bei Raumtemperatur (Verdünnung 1:100 in 1% BSA/PBS) inkubiert. Auf einen erneuten Waschschrift folgte die 35 minütige Inkubation mit dem Streptavidin - Biotin - Komplex mit anschließender Zugabe von Diaminobenzidin (DAB 4170) als Substrat, so dass eine braune Farbreaktion entstand. Anschließend wurden die Präparate für 20 Sekunden mit Hematoxylin gegengefärbt und mit Aquatex eingedeckt.

C) Ergebnisse

9. Effekte der Peptidtherapie auf den kardialen Phänotyp der Ratten

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit dienten Echokardiographie und invasive Diagnostik mittels Herzkatheter dazu, wichtige funktionale Herzparameter (u.a. LVED, LVES, kardialer Index, Verkürzungsfraktion) nach Beginn der Immunisierung mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP sowie unter anschließender Peptidtherapie zu überwachen.

Echokardiographisch war ca. sechs Monate nach Beginn der Immunisierung mit β_1 -EC_{II}/GST-FP bei immunisierten, unbehandelten Ratten eine Vergrößerung der Dimensionen des linken Ventrikels nachweisbar. Mit Einleitung der Peptid-Behandlung im neunten Monat nach Beginn der Immunisierung konnte das Fortschreiten der Dilatation aufgehalten und bei Einsatz zyklischer Peptide (ECII-25CP, ECII-18CPm) sogar reduziert werden. Am Ende des Beobachtungszeitraums von 20 Monaten lagen die Werte bei Applikation von ECII-25CP und ECII-18CPm im Bereich der Kontrollgruppe, wohingegen ECII-25LIN und ECII-18LINm deutlich weniger kardioprotektiv wirkten. Hinsichtlich der Dicken der linksventrikulären Vorder- bzw. Hinterwand konnte die finale echokardiographische Beurteilung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachweisen (ausführliche Daten siehe Dissertation von cand.med. Markus Müller).

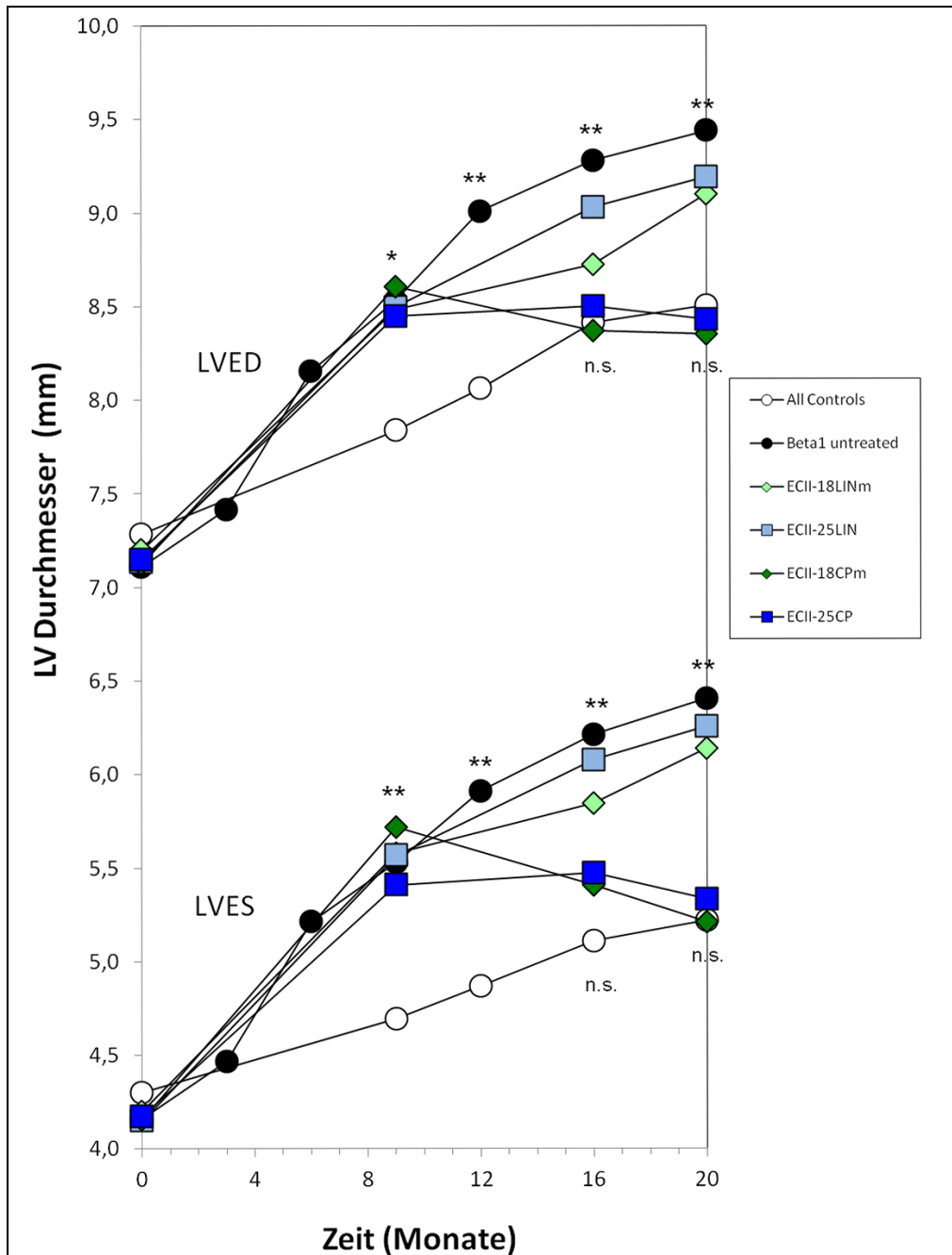
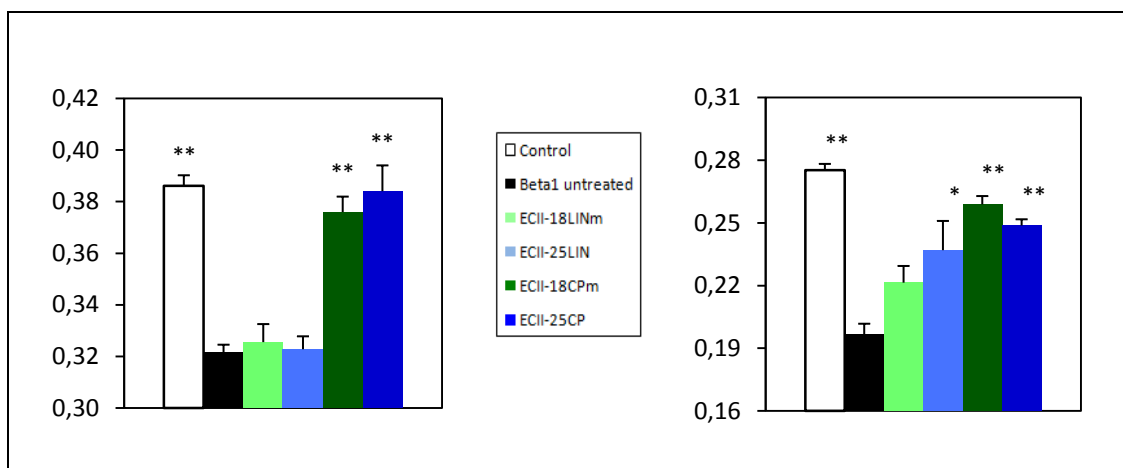


Abbildung 11 Echokardiographie: Darstellung des linksventrikulären Durchmessers sowohl endsystolisch (LVES) als auch enddiastolisch (LVED) gegen die Zeit (Monate). Die Immunisierung der Tiere mit dem Fusionsprotein führte zu einem signifikanten Anstieg des linksventrikulären Durchmessers im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach Beginn der Therapie im Monat 9 kam es bei Zyklopeptid - behandelten Tieren zu einer Normalisierung des linksventrikulären Durchmessers (*p < 0,05; **p < 0,001, n.s. = nicht signifikant, ANOVA und Bonferroni post hoc Test).

Die Verkürzungsfraktion (FS, Abbildung 12 a) des linken Ventrikels war bei den unbehandelten immunisierten Tieren (Beta1) als Ausdruck einer systolischen Kontraktionsstörung gegenüber der Kontrollgruppe hochsignifikant reduziert ($0,32 \pm 0,03$ vs. $0,39 \pm 0,04$, $p < 0,0001$). Während die Behandlung mit einem linearen Peptid nicht zu einer signifikanten Verbesserung der FS führte, waren ECII-18CPm und ECII-25CP in der Lage, diese wieder auf das Niveau gesunder Kontrolltiere anzuheben ($0,38 \pm 0,06$ bzw. $0,38 \pm 0,01$, $p < 0,0001$).

Der Herzindex (CI, Abbildung 12 b) als Indikator der kardialen Pumpfunktion war in mit β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierten Ratten gegenüber den gesunden Ratten deutlich verringert. Nur die zyklischen Peptide konnten den CI hochsignifikant verbessern ($p < 0,001$).

Abbildung 12 a + b



a) Verkürzungsfraktion in %

Signifikante Verbesserung nach Behandlung mit ECII-18CPm oder ECII-25CP, jedoch nicht nach Behandlung mit ECII-18LINm oder ECII-25LIN im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Beta 1) zum Zeitpunkt 20 Monate

(* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs. Beta1 unbehandelt)

(ANOVA, Dunnetts multiple comparison Test)

b) Kardialer Index (ml/min/g):

Zunahme um 25% nach Behandlung mit ECII-25CP bzw. um 30% nach Behandlung mit ECII-18CPm im Vergleich zu den unbehandelten Tieren (Beta1) zum Zeitpunkt 20 Monate.

(* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$ vs. Beta1 unbehandelt)

(ANOVA, Dunnetts multiple comparison Test)

Bei ähnlichen Herzfrequenzen in den einzelnen Gruppen lag das Herzzeitvolumen (HZV) der β_1 - Tiere um mehr als 30 % unter dem nicht immunisierter Ratten. Alle Peptide zeigten einen gewissen Effekt hinsichtlich des HZV mit klarer Überlegenheit von zyklischen ($p < 0,001$) gegenüber linearen Peptiden ($p = 0,1$ bzw. $0,05$).

Die Auswertung der im Rahmen der Linksherzkatheteruntersuchung erhobenen invasiven Parameter bestätigte die Ergebnisse der Echokardiographie. β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierte nicht therapierte Ratten zeigten eine deutlich kompromittierte Herzfunktion mit einem erniedrigten maximalen linksventrikulären systolischen Druck von ca. 112 mmHg und einem enddiastolischen Druck von über 15 mmHg. Im Gegensatz dazu wiesen gesunde Kontroll - Ratten mittlere systolische LV-Druckwerte von ca. 127 mmHg und einen LVEDP kleiner 9 mmHg auf (jeweils $p < 0,01$). Die Applikation linearer Peptide führte zu keiner relevanten Verbesserung der hämodynamischen Parameter, während ECII-25CP und besonders ECII-18CPm zu einer weitgehenden Normalisierung der maximalen systolischen Druckwerte des LV sowie des LVEDP führten ($p < 0,05$ bzw. $p < 0,001$). Ebenso waren die Kontraktilität und Relaxation des Herzmuskels (Parameter für den maximalen Anstieg bzw. Abfall des linksventrikulären Drucks pro Zeit) bei β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierten nicht therapierten Versuchstieren signifikant erniedrigt. Eine Therapie mit ECII-18LINm oder ECII-25LIN führte zu keiner signifikanten Verbesserung der Werte für Kontraktilität und/oder Relaxation. Bei Verabreichung zyklischer Peptide hingegen kam es zu einer Verbesserung dieser Werte in den Bereich gesunder Kontrolltiere (vgl. Dissertation von cand. med. M. Müller).

Das feuchte Herzgewicht der β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierten, unbehandelten Ratten lag deutlich über dem der Kontrollratten (1860 ± 121 mg vs. 1500 ± 440 mg, $p < 0,01$). Hinsichtlich des gesamten Körpergewichts waren die β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierten unbehandelten Ratten (Beta 1) dabei im Mittel mit 623,0 g sogar noch um 68,7 g leichter als die Kontrollratten. Die unterschiedliche Effizienz von zyklischen gegenüber linearen Peptiden kam folglich beson-

ders beim körperrgewichtskorrigierten Herzgewicht zu Tage. Bei β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierten unbehandelten Ratten war das relative Herzgewicht, gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren um mehr als 37 % erhöht ($p < 0,001$). Durch beide Zyklopeptide konnte das relative Herzgewicht deutlich reduziert werden ($p < 0,01$, vgl. Dissertation cand. med. M. Müller).

10. Effekt der Peptidtherapie auf den Antikörpertiter

Die wiederholte Immunisierung der Ratten mit β_1 -EC_{II}/GST-FP führte sowohl zu einer Ausbildung von hohen anti- β_1 -EC_{II} Antikörpertitern als auch zur Entwicklung einer progressiven linksventrikulären Dilatation und Herzinsuffizienz, ähnlich der DCM beim Menschen. Um herauszufinden, ob die Peptid - Therapie einen Einfluss auf die immunologischen Vorgänge bei der Erkrankungsentwicklung hat, wurden zunächst die Seren unbehandelter und behandelter Tiere hinsichtlich des Titerverlaufs der anti- β_1 -EC_{II} Antikörper untersucht.

Die Konzentration der β_1 -EC_{II} spezifischen IgG - Antikörper war im Verlauf des Beobachtungszeitraums bei allen Ratten, die Peptidinjektionen erhielten geringer im Vergleich zu immunisierten unbehandelten Tieren (siehe hierzu auch Abbildung 13, S.44). Der Antikörpertiter β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierter unbehandelter Tiere (Beta 1) stieg während der ersten beiden Monate sogar noch um ca. 20 % gegenüber dem Ausgangswert an, bevor er mit Beginn des 3. Therapiemonats kontinuierlich abnahm und sich am Versuchsende bei ca. 63 % des maximal erzielten Titers einpendelte. Durch die i.v. Applikation der Peptide gelang es, die Antikörpertiter zu senken, wobei der deutlichste Effekt unter ECII-25CP zu verzeichnen war. In diesem Fall wurde die IgG - Konzentration schon bei der ersten Injektion auf ca. 30 % des Ausgangwertes gesenkt, und lag nach 12 Therapiemonaten (11 Injektionen) bei weniger als 10 % des initialen Wertes, obwohl die Tiere weiterhin kontinuierlich mit β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisiert wurden. Auch mit ECII-18CPm konnte ein signifikanter Abfall des anti- β_1 -EC_{II} Antikörpertiters im Mittel auf ca. 40-45% der Ausgangswerte erzielt werden. Die linearen Peptide hingegen besaßen eine deutlich schlechtere Effizienz

hinsichtlich einer Reduktion zirkulierender Antikörper (Titer ca. 70-80% der Ausgangswerte).

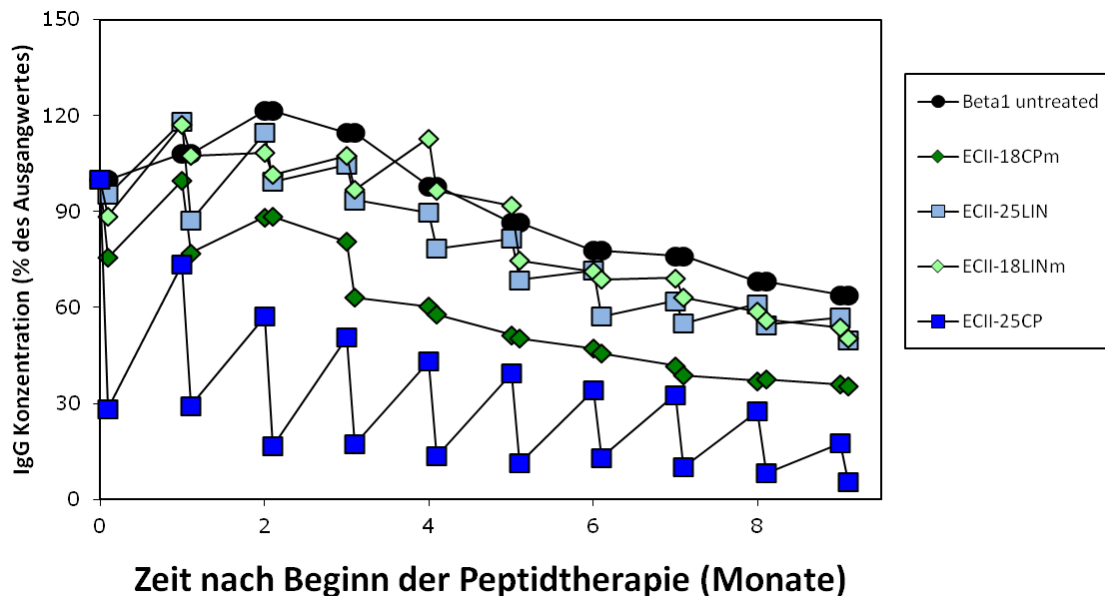


Abbildung 13 Zeitlicher Verlauf der Konzentration der β_1 -EC_{II} spezifischen IgG - Antikörper im Blut mit Beginn der Peptidtherapie (9 Monate nach Beginn der Immunisierung mit β_1 -EC_{II}/GST-FP). Die Antikörperkonzentration wird jeweils in Prozent des Ausgangswertes angegeben. Messungen erfolgten jeweils 24h vor bzw. nach Peptidinjektion. Um eine bessere Übersicht zu gewähren, wurde auf das Einzeichnen der Fehlerbalken verzichtet.

Die Reduktion des Antikörper - Titters direkt nach Peptidinjektion kann durch ein Wegfangen (Neutralisieren) der anti- β_1 -EC_{II} Antikörper im zirkulierenden Blut durch die β_1 -EC_{II} homologen Peptide erklärt werden. Allerdings lässt die Tatsache, dass der anti- β_1 -EC_{II} Antikörpertiter trotz monatlich durchgeführter Immunisierungsboosts mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP auf einem niedrigen Niveau verblieb, vermuten, dass neben einer reinen Neutralisation zirkulierender Antikörper auch die für die Antikörperproduktion verantwortlichen B- und/oder T-Zell - Populationen durch die Peptidtherapie betroffen sein könnten.

11. Einfluss der Peptidtherapie auf die CD4⁺ T-Zellen

Die Interaktion zwischen B- und T-Zellen ist notwendig für die Ausbildung einer Immunantwort gegen Proteinantigene wie dem β_1 -EC_{II}/GST-FP (siehe hierzu auch Kapitel 4). Folglich könnte eine eingeschränkte Funktion oder verringerte Zahl antigenspezifischer CD4⁺ T-Helferzellen zu einer Abnahme der Antikörperproduktion gegen ein Proteinantigen führen. Deswegen sollte mit Hilfe eines T-Zell Proliferationstests herausgefunden werden, ob die durch die Peptidtherapie induzierte Abnahme der β_1 -EC_{II} spezifischen Antikörper durch eine Modulation β_1 -EC_{II}/GST-FP - spezifischer CD4⁺ T-Helferzellen erklärt werden könnte.

Untersucht wurde die antigeninduzierte Proliferation von CD4⁺ T-Zellen gesunder Ratten (Kontrolltiere), immunisierter unbehandelter Ratten (Beta1) sowie immunisierter und mit verschiedenen Peptiden behandelter Ratten (ECII-18CPm, ECII-18LIN und ECII-25LIN). Abbildung 14 (S.47) zeigt den Effekt verschiedener Antigene (cycl. Peptid: ECII-18CPm, GST, β_1 -EC_{II}/GST-FP und PPD), die mit den isolierten T-Zellen und bestrahlten Thymozyten als antigenpräsentierenden Zellen in Kultur gegeben wurden.

Nach Stimulation mit β_1 -EC_{II}/GST-FP bzw. GST alleine war die Proliferation der CD4⁺ T-Zellen, die aus mit β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierten Tieren isoliert wurden, deutlich erhöht im Vergleich zu CD4⁺ T-Zellen aus gesunden nicht immunisierten Kontrolltieren. Dies lässt den Rückschluss zu, dass die Immunisierung der Tiere zu einer Induktion von β_1 -EC_{II}/GST-FP - spezifischen Memory CD4⁺ T-Zellen geführt hat, deren Proliferation im T-Recall Assay gemessen werden kann. Allerdings proliferierten CD4⁺T-Zellen sowohl behandelter als auch unbehandelter immunisierter Tiere nach Stimulation mit dem zyklischen Peptid ECII-18CPm nicht wesentlich besser als CD4⁺ T-Zellen von Kontrolltieren.

Des Weiteren entsprach die Proliferation, die durch β_1 -EC_{II}/GST-FP induziert wurde in etwa derjenigen, die nur durch GST induziert wurde. Folglich ist die Proliferation β_1 -EC_{II}/GST-FP spezifischer CD4⁺ T-Zellen wahrscheinlich überwiegend durch GST spezifische CD4⁺ T-Zellen bedingt und nur zu einem geringen Anteil durch β_1 -EC_{II} spezifische CD4⁺ T-Zellen. Außerdem ist die Prolifera-

tion der CD4⁺ T-Zellen von ECII-18CPm bzw. ECII-18LINm und ECII-25LIN behandelten Tieren vergleichbar mit CD4⁺ T-Zellen aus immunisierten un- behandelten Tieren (Beta1), unabhängig von dem verwendeten Antigen. Dem- nach hat die Peptidbehandlung mit ECII-18CPm, ECII-18LINm und ECII-25LIN keinen Einfluss auf die antigeninduzierte in vitro Proliferation von β_1 -EC_{II}/GST- FP - oder GST - spezifischen T-Helferzellen.

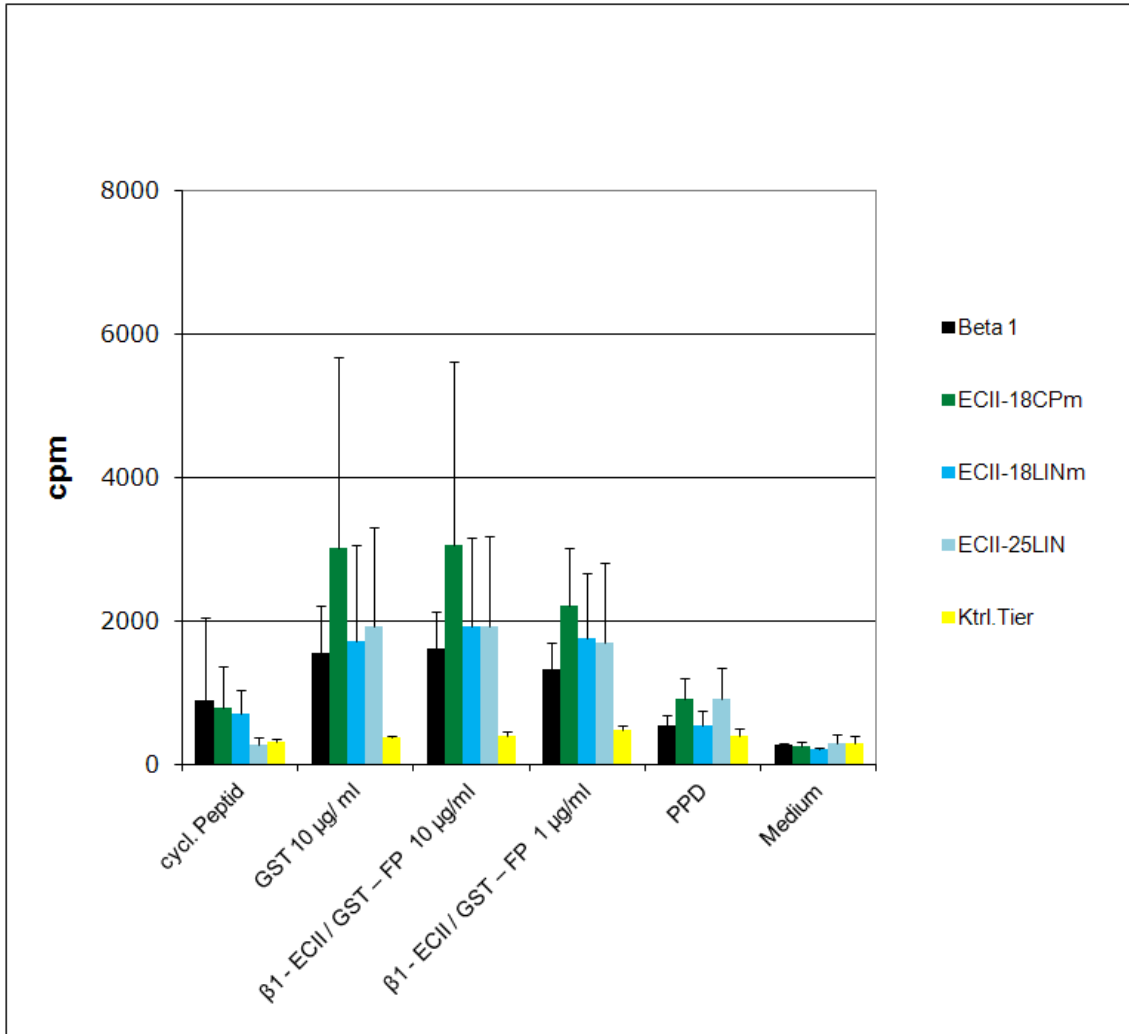


Abbildung 14 Effekt der Peptidtherapie auf die Proliferation von β_1 -EC_{II}/GST-FP CD4⁺ T-Zellen

CD 4⁺ T-Zellen von FP immunisierten Ratten, die mit verschiedenen Peptiden (ECII18-CPm, grün; ECII-18LINm, türkis; ECII-25LIN, hellblau) oder NaCl als Kontrolle (schwarz) für 10 Monate nach der DCM Induktion behandelt wurden sowie von gesunden nicht immunisierten Tieren (gelb) wurden mit bestrahlten Thymozyten von naiven Ratten in Gegenwart von verschiedenen Stimuli (Peptid, GST, β_1 -EC_{II}/GST-FP, PPD, Medium) kultiviert. Nach 2 Tagen erfolgte das Pulsen der Zellen mit ³H - Thymidin für 16 Stunden. Anhand der Radioaktivität des in die DNA eingebauten Thymidins konnte die Zellproliferation gemessen werden. Die Abbildung zeigt jeweils den Mittelwert von 3 Tieren pro Gruppe. Zwischen den relevanten Gruppen (behandelte vs. unbehandelte Tiere) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. (ANOVA)

12. Einfluss der Peptidtherapie auf β_1 -EC_{II}-spezifische B-Zellen

Nachdem das T-Zell Kompartiment offensichtlich nicht durch die Peptidtherapie beeinflusst wurde, erfolgte im nächsten Schritt die Analyse der Zellen, die direkt an der Produktion der anti- β_1 -EC_{II} Antikörper beteiligt sein sollten (Plasmazellen, Memory B-Zellen).

12.1 Einfluss der Peptidtherapie auf langlebige Plasmazellen

Zunächst wurden die β_1 -EC_{II}-spezifischen langlebigen Plasmazellen mittels ELISPOT analysiert. Dazu wurden Knochenmarkszellen untersucht, die 4 Wochen nach der letzten Immunisierung der Tiere mit β_1 -EC_{II}/GST-FP isoliert wurden (siehe Abbildung 15).

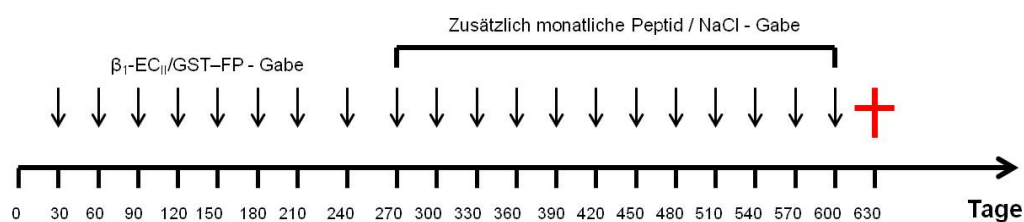


Abbildung 15. Zur Analyse der langlebigen Plasmazellen wurden Ratten 30 Tage nach dem letzten Boost mit β_1 -EC_{II}/GST-FP euthanasiert.

Abbildung 16 (S.49) zeigt die Zahl β_1 -EC_{II}-spezifischer Plasmazellen von immunisierten nicht therapierten (Beta 1) und immunisierten therapierten Tieren (ECII-18CPm, ECII-25LIN, ECII-18 CPm, ECII-25CP) bezogen auf alle IgG sezernierenden Zellen. Zwischen den verschiedenen Gruppen kann kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

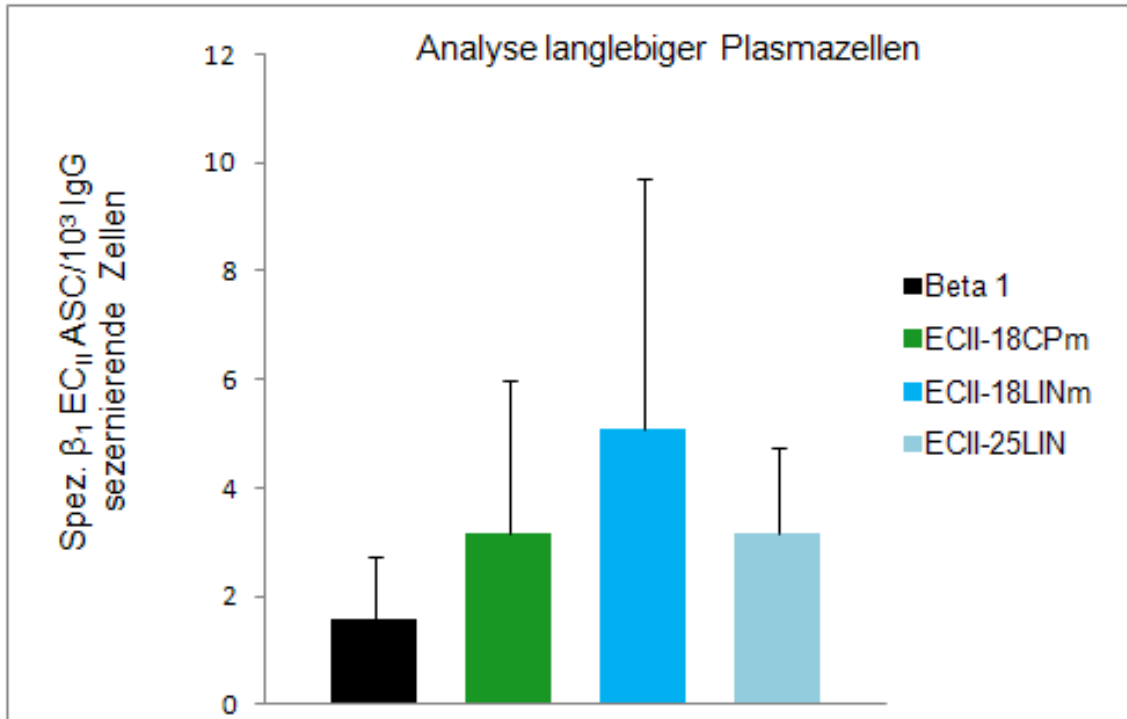


Abbildung 16 ELISPOT 20 Monate nach Beginn der Immunisierung. Die Balken zeigen die durchschnittliche Frequenz β_1 -EC_{II}-spezifischer Antikörper sezernierender Zellen (ASC) je 1000 IgG - ASC von β_1 -EC_{II}/GST-FP immunisierten Ratten, die mit verschiedenen Peptiden oder NaCl als Kontrolle (schwarz) ab dem 9. Monat nach Beginn der Immunisierung für die Dauer von 11 Monaten behandelt wurden. (Beta 1, n=3, ECII-18CPm, n=5, ECII-18LIN, n=3, ECII-25LINm, n=3; Shapiro-Wilk, einfaktorierter ANOVA n.s.)

12.2 Einfluss der Peptidtherapie auf Memory B-Zellen

Im Gegensatz zu den Plasmazellen exprimieren Memory B-Zellen Antigenrezeptoren in Form membrangebundener Immunglobuline auf ihrer Zelloberfläche und könnten somit direkt durch die Bindung der β_1 -EC_{II}-Peptide - z.B. durch Induktion von Apoptose - beeinflusst werden. Um die wenigen β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen unter den Milzzellen zu identifizieren wurden die Milzzellen drei Tage nach der letzten Immunisierung mit β_1 -EC_{II}/GST-FP isoliert (Abbildung 17, S.50) Zu diesem Zeitpunkt differenzieren die Memory B-Zellen durch den Antigen - Boost zu kurzlebigen Plasmazellen. Über die mittels ELISPOT gemessene Frequenz der β_1 -EC_{II}-spezifischen kurzlebigen Plasmazellen

kann somit auf die Zahl der antigenspezifischen Memory B-Zellen rückgeschlossen werden.

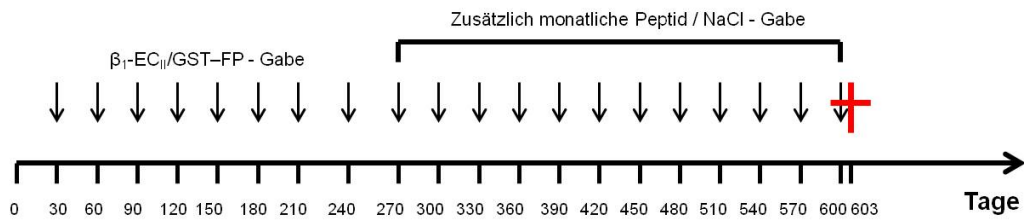


Abbildung 17 Zur Analyse der Memory B-Zellen wurden Ratten 3 Tage nach dem letzten Boost mit β₁-EC_{II}/GST-FP euthanasiert.

Abbildung 18 (S.51) zeigt, dass die Frequenz der β₁-EC_{II}-spezifischen ASC bei Tieren, die mit ECII-18CPm behandelt wurden, im Vergleich zu den immunisierten jedoch unbehandelten Beta 1 - Tieren deutlich reduziert war. Im ANOVA - Test verfehlt der Vergleich v.a. auf Grund der kleinen Gruppengrößen knapp die statistische Signifikanz (p=0,059). Aussagekräftiger ist hier jedoch der Vergleich zwischen sogenannten klinischen Respondern (gute Therapieansprache im Echo und Herzkatheter, ECII-18CPm) und klinischen Non-Respondern (keine Therapieansprache im Echo und Herzkatheter, ECII-18LIN, ECII-25LIN). Zwischen diesen beiden Gruppen zeigt sich ein statistisch signifikanter Unterschied (p=0,04, Mann-Whitney U Test).

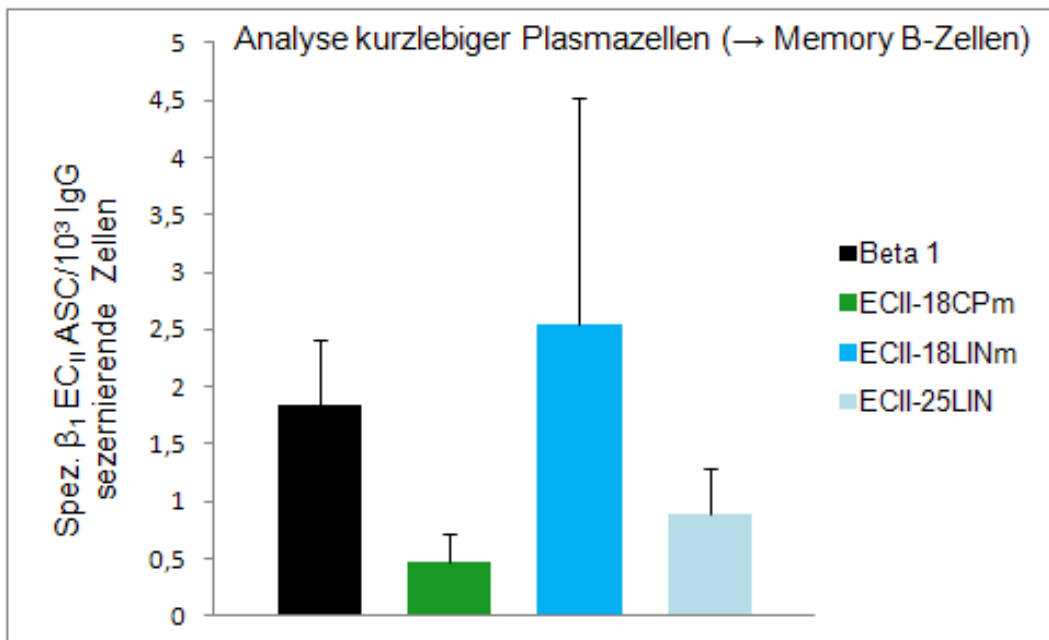


Abbildung 18 ELISPOT 20 Monate nach Beginn der Immunisierung. Die Balken zeigen die durchschnittliche Frequenz β_1 -ECII-spezifischer ASC je 1000 IgG - ASC von β_1 -ECII/GST-FP immunisierten Ratten, die mit verschiedenen Peptiden oder NaCl als Kontrolle (schwarz) ab dem 9. Monat nach Beginn der Immunisierung für die Dauer von 11 Monaten behandelt wurden. (Beta 1, n=3, ECII-18CPm, n=5, ECII-18LIN, n=3, ECII-25LINm, n=3; ECII-18CPm vs. Beta 1: einfaktorieller ANOVA p= 0,059, Dunnett – T (2-seitig), p=0,176). Klinische- Responder (ECII-18CPm) vs. Klinische-Non-Responder (Beta 1, ECII 18LINm, ECII-25LIN): Shapiro-Wilk-Test, Mann-Whitney U Test, p=0,04.

Neben dem Elispot - Assay diente die Durchflusszytometrie als zweite unabhängige Methode zum Nachweis β_1 -EC_{II}-spezifischer Memory B-Zellen aus der Milz. Dafür wurden Milzzellen 30 Tage nach der letzten Immunisierung mit β_1 -EC_{II}/GST-FP isoliert. Die Zellen wurden mit anti Rat IgG PE Antikörpern, anti CD45RA FITC Antikörpern (OX 33) sowie Dyl 649 markiertem β_1 -EC_{II}/GST-FP gefärbt. Um die β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen zu identifizieren wurde zunächst auf die IgG (Immunglobulin auf Memory B-Zellen) und OX33 (B-Zell Marker der Ratte) positiven Zellen gegasert. In der so gefundenen Memory B-Zellpopulation wurden dann die DYL 649 positiven Zellen dargestellt.

Auch an Hand dieser Methode konnte eine signifikante ($p=0,025$) Reduktion β_1 -EC_{II}-spezifischer Memory B-Zellen bei Tieren, die mit dem zyklischen Peptid ECII-18CPm behandelt wurden, im Vergleich zu Immunisierten, aber nicht therapierten Tieren (Beta1) gezeigt werden (siehe Abbildung 19). Exemplarisch für eine Färbung steht Abbildung 20 (S.53).

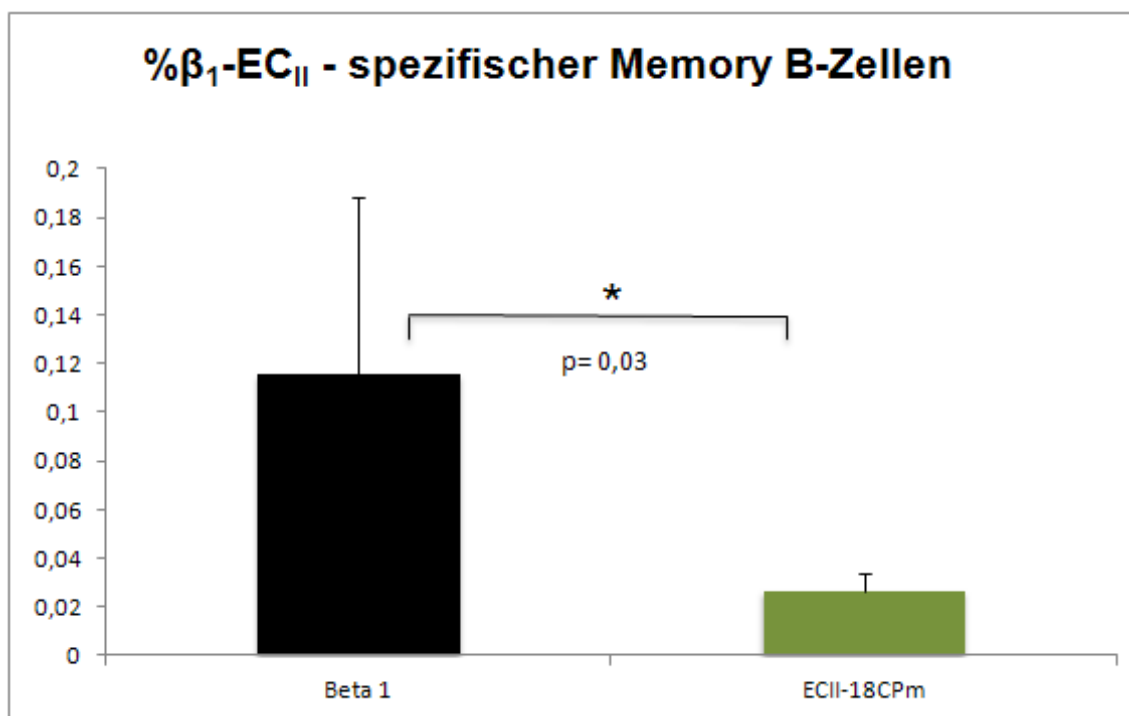
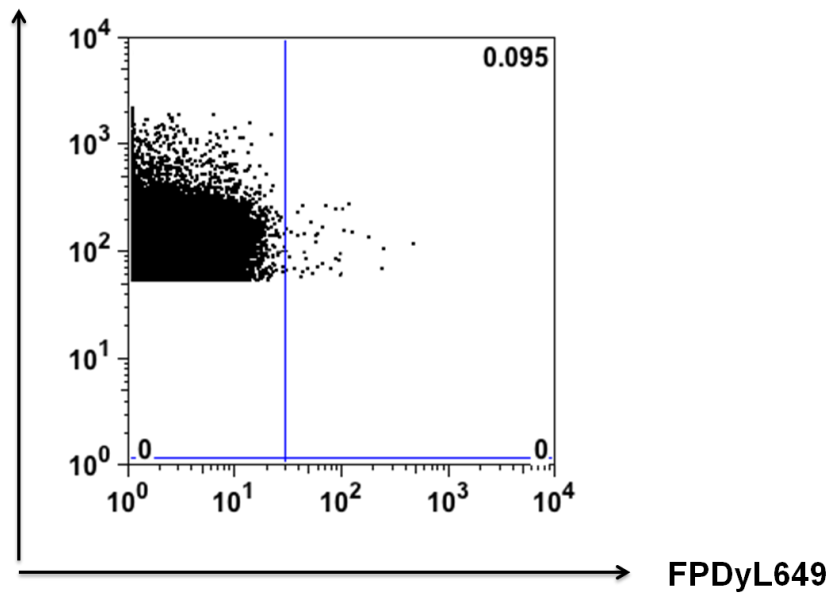


Abbildung 19 Durchflusszytometrie 20 Monate nach Beginn der Immunisierung. Die Balken zeigen den prozentualen Anteil der DYL 649 positiven Zellen unter den OX33 sowie IgG positiven Zellen. (Beta 1, n=4, ECII-18CPm, n=4, Student t-Test, $p=0,03$).

CD45RA Immunisiert, unbehandelt (Beta 1)



CD45RA Immunisiert, behandelt (ECII-18CPm)

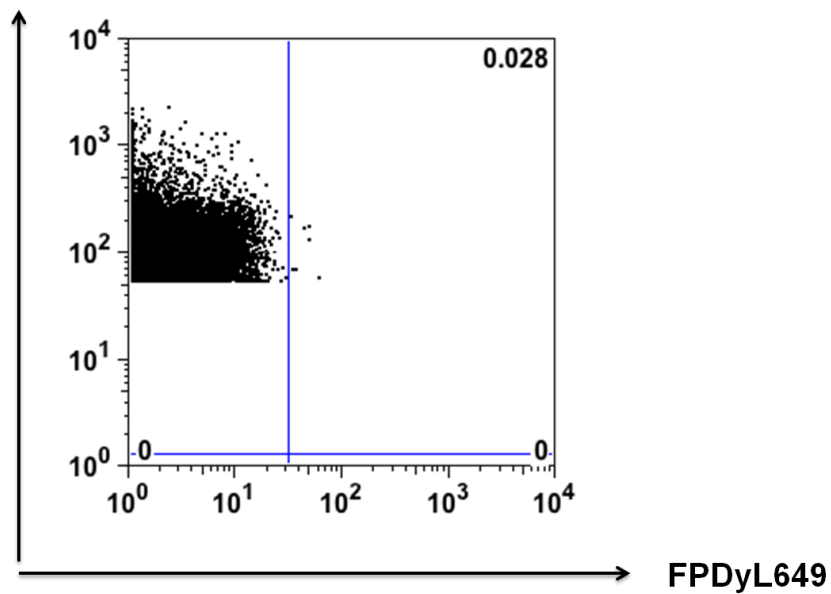


Abbildung 20 Durchflusszytometrie. Gezeigt werden die FPDyl spezifischen Zellen unter den Memory B-Zellen (IgG+, CD45RA+) nach GST - Block von immunisierten, unbehandelten Tieren (Beta 1) und immunisierten behandelten Tieren (ECII-18CPm). Nach Therapie kann eine Reduktion dieser spezifischen Zellpopulation im Vergleich zu den Beta1 Tieren beobachtet werden.

13. Histologie

In Folge der Immunisierung der Tiere mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP zeigte sich bei den Herzen der Tiere auch histologisch die Entwicklung einer DCM, sichtbar u.a. an einer Zunahme der Myozytenvolumina und der Fibrosierung. Nach Therapiebeginn im neunten Monat kam es unter Applikation der beiden zyklischen Peptide ECII-18CPm oder ECII-25CP zu einer weitgehenden Rückbildung des histologischen Phänotyps, jedoch nicht unter Therapie mit ECII-18LINm oder ECII-25LIN (siehe dazu Dissertation cand. med. Markus Müller).

Ein Teilabschnitt der hier vorgelegten Doktorarbeit widmete sich der Frage, ob nach Immunisierung der Tiere mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP eine lymphozytäre Infiltration des Zielorgans Herz beobachtet werden konnte. Nach den Kriterien der WHF/WHO für eine Myokarditis spricht man ab 14 Leukozyten/mm², vorzugsweise B- oder T-Lymphozyten, von einer akuten myokardialen Inflammation [32]. Exemplarisch sind in Abbildung 21 jeweils Herz und Milz eines nicht immunisierten unbehandelten (0,9% NaCl Kontrollen), eines immunisierten unbehandelten (Beta 1) sowie eines immunisierten und mit ECII-18CPm behandelten Tieres abgebildet. Die Analyse erfolgte analog den üblichen EAM - Modellen in der Ratte am Tag 30 nach Immunisierung (vgl. dazu auch PhD-thesis MSc. P. Panjwani, RVZ/GSLS der Universität Würzburg). An Hand der in Abbildung 21 dargestellten Milzen wird ersichtlich, dass die verwendeten Antikörper (Maus anti Ratte CD3 Antikörper sowie Maus anti Ratte CD45RA Antikörper) T- und B-Zellen anfärben (Positiv - Kontrolle).

Es zeigt sich, dass es weder nach Immunisierung (Beta 1) noch unter Therapie mit ECII-18CPm zu einer Expansion bzw. vermehrten Infiltration von B- oder T-Zellen im Herzen kommt. Eine lymphozytäre Infiltration des Myokards konnte somit bei allen untersuchten Tieren zumindest 30 Tage nach Induktion einer Antikörper-vermittelten Immun-DCM nicht beobachtet werden.

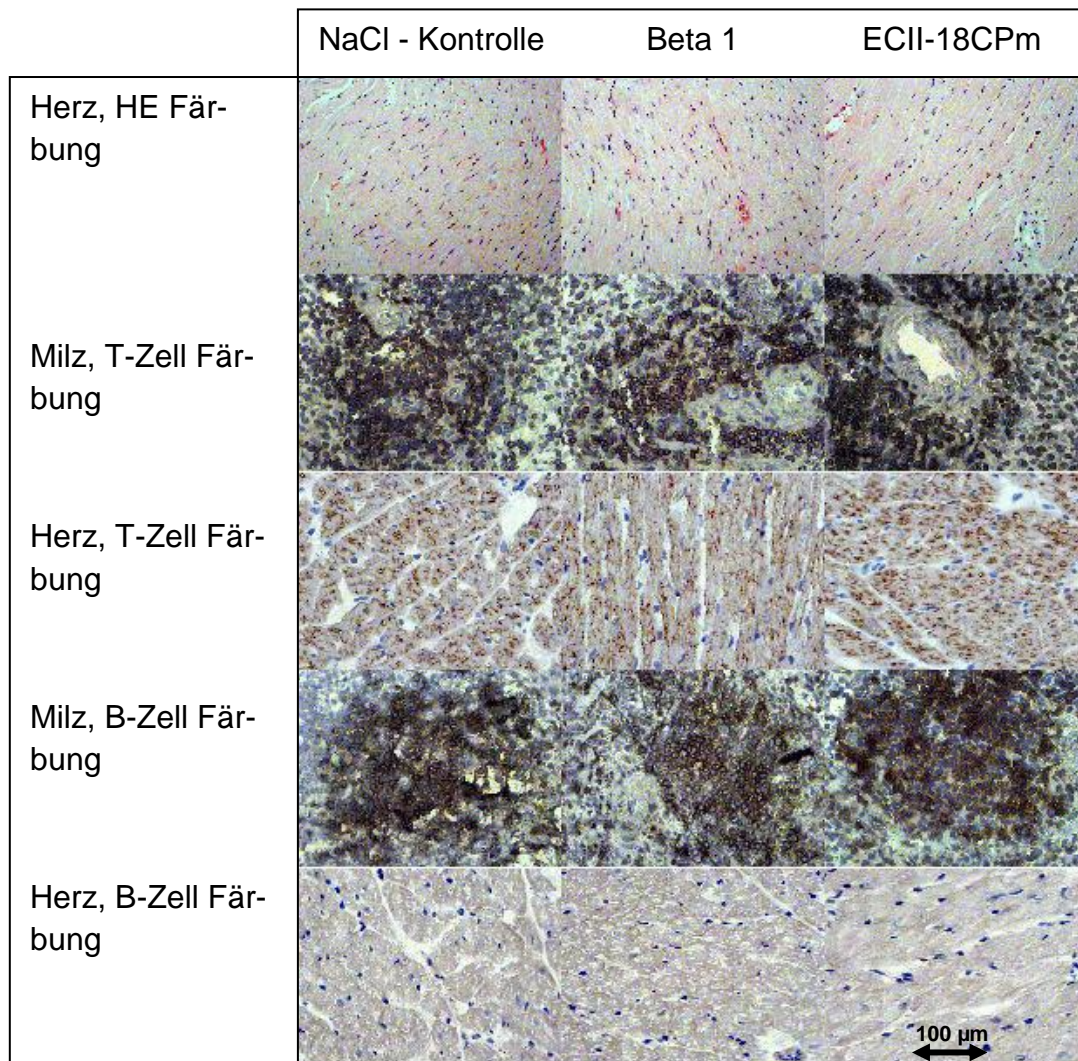


Abbildung 21 Immunhistochemische Färbung von Gefrierschnitten aus Milz und Herz. Exemplarisch dargestellt sind jeweils ein mit ECII-18CPm therapiertes, ein immunisiertes nicht therapiertes (Beta 1) und ein naives Kontrolltier (NaCl - Kontrolle) zum Zeitpunkt 20 Monate. Anfärbung der B-Zellen mit Maus anti Ratte CD45RA (Ox33), BD Pharmingen, der T-Zellen mit Maus anti Ratte CD3 (1F4) Antikörper, Serotec. Je Versuchstier und Organ wurden Übersichtsaufnahmen angefertigt (NaCl Kontrolle, n=4, Beta1, n=4, ECII-18CPm, n=4).

D) Diskussion

Antikörper gehören zu den potentesten Werkzeugen des Immunsystems im Kampf gegen körperfremde Substanzen. Der Körper verfügt über ein sehr großes Reservoir dieser Proteine, die hochspezifisch an fremde Antigene inklusive Mikroorganismen binden und diese dann neutralisieren bzw. eliminieren.

Autoantikörper hingegen spielen eine entscheidende pathogenetische Rolle bei vielen Autoimmunerkrankungen wie z.B. Morbus Basedow oder Myasthenia gravis [32, 127, 128, 129]. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die durch Autoantikörper gegen den β_1 -adrenergen Rezeptor vermittelte dilatative Kardiomyopathie (DiCM) und deren Therapie mittels Rezeptor-analoger Fängerpeptide.

Die bisherigen Behandlungsstrategien Autoantikörper-vermittelter Autoimmunerkrankungen zielen entweder auf die Autoantikörper selbst ab, wie im Falle der Immunabsorption, oder sie richten sich direkt gegen die an der Autoantikörperproduktion beteiligten Zellen, nämlich die kurzlebigen und die langlebigen Plasmazellen. So können die kurzlebigen Plasmazellen und deren Vorläuferzellen - die Memory B-Zellen - durch Zytostatika wie Cyclophosphamid [130] oder CD20-spezifische monoklonale Antikörper (z.B. Rituximab, [131]) zerstört werden, während die Depletion der langlebigen Plasmazellen den Einsatz des Proteasomeninhibitors Bortezomib [132] erfordert. All diese Anwendungen wirken allerdings unspezifisch, d.h. sie treffen nicht nur die krankheitsauslösenden Autoantikörper, sondern auch Antikörper mit anderen Spezifitäten. Zudem ist die Applikation dieser Medikamente mit teilweise erheblichen Nebenwirkungen verbunden. So ist z.B. Bortezomib bei einem Teil der Patienten stark kardiotoxisch [133].

Mit den in dieser Arbeit beschriebenen zyklischen bzw. linearen β_1 -EC_{II} homologen Peptiden stehen potentiell hochspezifische Agenzien zur Therapie der DiCM zur Verfügung. Ausgehend von dem Ergebnis, dass nur zyklische aber nicht die linearen Peptide kardioprotektive Effekte im Rattenmodell der DiCM zeigten, lag der Schwerpunkt meiner Arbeit darin, die dieser tierexperimentellen

Beobachtung zugrunde liegenden immunologischen Vorgänge näher zu untersuchen.

Zunächst analysierte ich die Kinetik der Autoantikörper-Konzentration im Zuge der Behandlung mit den unterschiedlichen Peptiden (siehe Abbildung 13, S.44). Der Vergleich mit dem Titer-Verlauf der unbehandelten Kontrollgruppe zeigte, dass die Behandlung mit dem zyklischen Peptid zu einer deutlichen Reduktion des Autoantikörpertiters führte. Die linearen Peptide hingegen bewirkten einen wesentlich geringeren und im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikanten Abfall der Konzentration frei zirkulierender Antikörper. Die Unterschiede zwischen den linearen und den zyklischen Peptiden könnte man sich folgendermaßen erklären: Im Vergleich zu den zyklischen Peptiden besitzen lineare Peptide (I) ein geringeres Potential, β_1 -EC_{II}-spezifische Antikörper zu neutralisieren und/oder sie werden (II) durch endogene Peptidasen leichter abgebaut.

Interessanterweise blieben im Laufe der Behandlung mit den zyklischen Peptiden die Antikörper-Titer niedrig trotz fortgeführter Boosts mit dem β_1 -EC_{II}/GST-FP. Dieses Ergebnis führte uns zu der Annahme, dass zyklische β_1 -EC_{II} homologe Peptide nicht nur eine neutralisierende Wirkung auf frei zirkulierende β_1 -EC_{II}-spezifische Antikörper haben, sondern auch Zellen funktionell beeinflussen oder gar depletieren, die direkt oder indirekt an der Autoantikörperproduktion beteiligt sind, also T-Zellen, B-Zellen sowie Plasmazellen.

Zunächst untersuchten wir die antigenspezifische Proliferation der CD4⁺ T-Zellen in vitro mittels Proliferationstest (Recall-Assay): Zusammengefasst zeigten CD4⁺ T-Zellen aus mit Peptid-behandelten Tieren eine gleich starke in vitro Recall-Antwort auf das β_1 -EC_{II}/GST-FP bzw. seiner Komponenten wie CD4⁺ T-Zellen aus immunisierten jedoch unbehandelten Tieren (siehe Abbildung 14, S.47). Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die applizierten Peptide nicht über MHC Klasse II Proteine der Lewis Ratte präsentiert werden und als Folge dessen eine Modulation der Funktion der CD4⁺ T-Zellen nicht erfolgen kann. Für diese Hypothese spricht, dass wir im Proliferationstest keine Recall-Antwort gegen β_1 -EC_{II}-Peptide beobachten konnten, was uns schlussfolgern lässt, dass

sich die meisten oder gar alle CD4⁺ T-Zell-Epitope im Bereich der GST befinden.

Nachdem die Peptide offensichtlich nicht mit der Funktion β_1 -EC_{II}-spezifischer T-Zellen interferierten, erfolgte die Analyse der Zellen, die direkt an der Antikörperproduktion beteiligt sind: Plasmazellen und B-Zellen. Mittels ELISPOT konnten wir zunächst zeigen, dass die Behandlung mit dem zyklischen Peptid zu keiner Reduktion der Frequenz β_1 -EC_{II}-spezifischer langlebiger Plasmazellen führte (siehe Abbildung 16, S.49). Im Gegensatz zu den Plasmazellen tragen B-Zellen jedoch Immunglobuline an der Zelloberfläche und könnten somit ein direktes Ziel der Peptide sein. Die Detektion der β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen erfolgte indirekt, indem wir deren Differenzierung in kurzlebige Plasmazellen durch einen Boost mit β_1 -EC_{II}/GST-FP induzierten und drei Tage später die Frequenz β_1 -EC_{II}-spezifischer kurzlebiger Plasmazellen im ELISPOT analysierten. Im Gegensatz zu den linearen Peptiden führte die Applikation des zyklischen Peptids zu einer deutlichen Reduktion der β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren (siehe Abbildung 18, S.51). Im ANOVA - Test sowie im zweiseitigen Dunnett - T Test verfehlte der Unterschied nur knapp die statistische Signifikanz. Dies ist v.a. auf die kleine Gruppengröße zurückzuführen. Da aus den klinischen Daten (Echo, Herzkatheter) hervorgeht, dass einzig durch die Applikation des zyklischen Peptids EC_{II}-18CPm eine Therapieansprache erzielt werden kann, erscheint in diesem Fall ein Vergleich zwischen sogenannten „klinischen Respondern“ und „Non-Respondern“ sinnvoll. Hierbei zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied ($p=0,04$).

Den fehlenden Effekt der linearen Peptide könnte man sich wiederum durch den schnelleren Abbau in vivo durch endogene Peptidasen erklären. Die Modulation der Memory B-Zellen durch die zyklischen Peptide lässt viel Spielraum für Spekulationen: So könnte man sich vorstellen, dass die zyklischen Peptide eine naturgetreue Imitation des natürlichen Epitops darstellen und mit hoher Affinität an den korrespondierenden B-Zell-Rezeptor binden. Dies wiederum könnte zu einer „monomeren“ und damit unproduktiven Stimulation des B-Zell-Rezeptors

mit daraus resultierender Depletion bzw. funktioneller Inaktivierung der Memory B-Zellen führen [134]. Alternativ könnte die Bindung der Antikörper an sogenannte Fc γ - Rezeptoren zu einem „Umprogrammieren“ der B-Zelle führen. Fc - Rezeptoren sind Moleküle auf der Zelloberfläche von B-Zellen, die den Fc - Teil von Immunglobulinen/Antikörpern binden. Neuere Daten weisen darauf hin, dass die Bindung eines Antikörpers an den Fc γ R1IB, einem inhibitorischen Fc - Rezeptor u.a. zur Apoptose der entsprechenden B-Zelle führen könnte [135].

Die Durchflusszytometrie diente als zweite unabhängige Methode zur Detektion der β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen. Die gesuchte Zellpopulation konnte anhand der für Memory B-Zellen charakteristischen Oberflächenmarker CD45RA und IgG sowie durch die Anfärbung mit dem DYL649 markierten Antigen β_1 -EC_{II}/GST-FP nach vorhergehendem GST Block identifiziert werden. Auch in diesem Experiment führte die Applikation des zyklischen Peptids zu einer signifikanten Reduktion der β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen im Vergleich zu den nicht behandelten Kontrolltieren (siehe Abbildung 19, S.52).

Die Definition der DiCM als eigenständige Entität und deren Einordnung in die Gruppe der organspezifischen Autoimmunerkrankungen [52] wie z.B. die lymphozytäre Thyreoditis, der Morbus Basedow und/oder der Diabetes mellitus Typ I, warf die Frage auf, ob es (ähnlich wie bei den genannten Erkrankungen) zu einer lymphozytären Infiltration in das Zielorgan kommt [136]. In den durchgeführten immunhistochemischen Färbungen konnte keine abnormale Infiltration von B- oder T-Zellen in den Herzen immunisierter unbehandelter oder immunisierter behandelter Tiere nachgewiesen werden. Die Induktion der Herzerkrankung (durch monatliche Immunisierung) im Tiermodell lässt sich aber grundsätzlich nicht mit der Pathogenese beim Menschen vergleichen. So konnte mittels Endomyokardbiopsien (EMB) bei fast der Hälfte aller untersuchten DCM Patienten eine Erhöhung der T-Zellen im Herzen nachgewiesen werden [137]. Anders als im Rattenmodell liegt hier der DCM aber vermutlich eine primäre Myokarditis zu Grunde. Die dabei ursächliche virale Infektion und eventuell chronische Inflammation (insbesondere bei Virus-Persistenz) führt vermutlich auch zu einer lymphozytären Infiltration. Folglich wären zur Klärung des Vor-

kommens von (chronischen) Infiltraten Endomyokardbiopsien (EMB) von allen DCM Patienten, bei denen Antikörper gegen den β_1 -EC_{II} nachgewiesen wurden, zu empfehlen.

In Zusammenschau der immunologischen Experimente steht mit der Peptidtherapie somit eine neue Therapieoption zur Verfügung, die das Produkt lang- und kurzlebiger Plasmazellen (anti- β_1 -EC_{II} Antikörper) neutralisiert und zudem auch die Anzahl antikörperproduzierender Zellen reduziert. Die Anzahl der langlebigen Plasmazellen wird jedoch nicht durch die Peptidtherapie beeinflusst. Dies lässt sich durch den fehlenden B-Zell - Rezeptor an der Zelloberfläche der Plasmazellen und der damit fehlenden Möglichkeit einer Interaktion mit den Zyklopeptiden erklären. Dennoch zeigten histologische und echokardiographische Analysen während und nach Abschluss der Therapie, dass die Zyklopeptid-Behandlung eine sehr effektive Therapie darstellt. Der Phänotyp der dilatativen Kardiomyopathie konnte weitgehend revertiert werden. Alle funktionellen, morphologischen und molekularen Parameter besserten sich unter Therapie deutlich im Vergleich zu unbehandelten Tieren. Durch den hochspezifischen Therapieansatz sollten zudem unerwünscht auftretende Wirkungen gänzlich vermieden werden, was einen klaren Fortschritt zu den bisher verfügbaren sehr unspezifisch wirkenden Therapieoptionen darstellt. Beachtet werden muss jedoch, dass die Anwendung der Peptidtherapie bei Patienten mit zirkulierenden anti- β_1 -EC_{II} Antikörpern ein gänzlich anderes Resultat als im Tiermodell haben könnte. Der individuelle HLA Haplotyp des Patienten könnte unter Umständen eine Präsentation der Peptide an T-Zellen ermöglichen und so durch T-Zell Proliferation - anstelle einer gewünschten Reduktion – paradoxer Weise zu einer vermehrten Produktion von anti- β_1 -EC_{II} Autoantikörpern führen. Erste Phase - I Daten zeigen jedoch, dass dies bei i.v. Applikation der Zyklopeptide nicht der Fall ist.

Bei der gezeigten hohen Effizienz der Peptidtherapie in der Behandlung der DiCM, könnte dieses Verfahren auch eine therapeutische Option für andere Antikörper - vermittelte Autoimmunerkrankungen darstellen.

E) Zusammenfassung

Unsere Arbeitsgruppe verfolgt im Rattenmodell der Antikörper-induzierten DiCM einen Antikörper-spezifischen Therapieansatz durch die Gabe eines synthetischen β_1 -EC_{II} homologen zyklischen „Fänger“ - Peptids. Die Applikation dieses Peptids führte zu einer deutlichen Verbesserung wichtiger Herzparameter wie z.B. des Durchmessers des linken Ventrikels (LV) sowie der LV-Verkürzungsfraktion und des kardialen Indexes. Des Weiteren kam es unter der Peptid - Therapie zu einer signifikanten Reduktion des anti- β_1 -EC_{II} Antikörpertiters trotz kontinuierlich durchgeführter Immunisierungen mit dem die Erkrankung induzierenden Antigen.

Es lag daher nahe, dass durch die Peptid-Therapie auch eine Art immunologischer Toleranz induziert wird, der eine Depletion bzw. funktionelle Beeinträchtigung von Zellen des Immunsystems, die an der Produktion von anti- β_1 -EC_{II} Antikörpern beteiligt sind, zugrunde liegen könnte. Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit war es daher Aufgabe, die verschiedenen Zellkomponenten der humoralen und zellulären Immunantwort zu untersuchen, um den immunologischen Effekt der Peptid-Applikation besser zu verstehen. So scheinen in unserem Modell die β_1 -EC_{II}-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durch die Peptid-Therapie nicht beeinflusst zu werden; ebenso konnten unsere Experimente keinen Zylopeptideffekt auf die langlebigen Plasmazellen nachweisen. Die erzielten Ergebnisse sprechen jedoch dafür, dass die Rückbildung des DiCM Phänotyps und der Abfall des anti- β_1 -EC_{II} Antikörpertiters trotz kontinuierlicher Immunisierung zum einen auf der direkten Neutralisierung der anti- β_1 -EC_{II} Antikörper durch die Ring-Peptide (Scavenger-Effekt) und zum anderen auf einer Depletion bzw. funktionellen Beeinträchtigung der β_1 -EC_{II}-spezifischen Memory B-Zellen beruhen könnte. Der für die Reduktion der Memory B-Zellen letztlich verantwortliche molekulare Mechanismus muss jedoch noch in weiteren Experimenten untersucht werden.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse tragen aber wesentlich zum besseren Verständnis der Wirkungsweise dieses neuartigen Therapiekonzepts zur Behandlung der immuninduzierten Kardiomyopathie bei.

F) Literatur- und Abbildungsverzeichnis

1. Statistisches Bundesamt Deutschland. 2010: Herz-/Kreislaufkrankungen verursachten rund 41 % aller Todesfälle Pressemitteilung Nr. 354 vom 23.09.2011 2011; Available from: https://www.destatis.de/DE/PresseService/Presse/Pressemitteilungen/2011/09/PD11_354_232.html.
2. *From the Centers for Disease Control and Prevention. Changes in mortality from heart failure--United States, 1980-1995.* JAMA, 1998. **280**(10): p. 874-5.
3. Störk, S., et al., *Stimulating autoantibodies directed against the cardiac beta1-adrenergic receptor predict increased mortality in idiopathic cardiomyopathy.* Am Heart J, 2006. **152**(4): p. 697-704.
4. Iwata, M., et al., *Autoantibodies against the second extracellular loop of beta1-adrenergic receptors predict ventricular tachycardia and sudden death in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy.* J Am Coll Cardiol, 2001. **37**(2): p. 418-24.
5. Jahns, R., V. Boivin, and L. Hein, *A new cyclic receptor-peptide prevents development of heart dilatation and failure induced by antibodies activating cardiac beta1 adrenergic receptors.* Circulation, 2005. **102 (Abst Suppl II):5 (120)**.
6. Elliott, P., et al., *Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society Of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases.* Eur Heart J, 2008. **29**(2): p. 270-6.
7. Richardson, P., et al., *Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies.* Circulation, 1996. **93**(5): p. 841-2.
8. Braunwald, E., *Braunwald's Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine.* 2011. **9**.
9. Mohan, S.B., et al., *Idiopathic dilated cardiomyopathy: a common but mystifying cause of heart failure.* Cleve Clin J Med, 2002. **69**(6): p. 481-7.
10. Rakar, S., et al., *Epidemiology of dilated cardiomyopathy. A prospective post-mortem study of 5252 necropsies.* The Heart Muscle Disease Study Group. Eur Heart J, 1997. **18**(1): p. 117-23.
11. Manolio, T.A., et al., *Prevalence and etiology of idiopathic dilated cardiomyopathy (summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute workshop.* Am J Cardiol, 1992. **69**(17): p. 1458-66.
12. Codd, M.B., et al., *Epidemiology of idiopathic dilated and hypertrophic cardiomyopathy. A population-based study in Olmsted County, Minnesota, 1975-1984.* Circulation, 1989. **80**(3): p. 564-72.
13. Lloyd-Jones, D., et al., *Heart disease and stroke statistics--2009 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee.* Circulation, 2009. **119**(3): p. e21-181.
14. Dec, G.W. and V. Fuster, *Idiopathic dilated cardiomyopathy.* N Engl J Med, 1994. **331**(23): p. 1564-75.
15. Franciosa, J.A., et al., *Survival in men with severe chronic left ventricular failure due to either coronary heart disease or idiopathic dilated cardiomyopathy.* Am J Cardiol, 1983. **51**(5): p. 831-6.
16. Schocken, D.D., et al., *Prevalence and mortality rate of congestive heart failure in the United States.* J Am Coll Cardiol, 1992. **20**(2): p. 301-6.

17. Felker, G.M., et al., *The spectrum of dilated cardiomyopathy. The Johns Hopkins experience with 1,278 patients*. *Medicine (Baltimore)*, 1999. **78**(4): p. 270-83.
18. Pathak, S.K., R.C. Kukreja, and M. Hess, *Molecular Pathology of Dilated Cardiomyopathies*. *Curr Probl Cardiol*, 1996. **21**(2): p. 99-144.
19. Grunig, E., et al., *Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy*. *J Am Coll Cardiol*, 1998. **31**(1): p. 186-94.
20. Leiden, J.M., *The genetics of dilated cardiomyopathy--emerging clues to the puzzle*. *N Engl J Med*, 1997. **337**(15): p. 1080-1.
21. Fabrizio, L. and T.J. Regan, *Alcoholic cardiomyopathy*. *Cardiovasc Drugs Ther*, 1994. **8**(1): p. 89-94.
22. Felker, G.M., et al., *Underlying causes and long-term survival in patients with initially unexplained cardiomyopathy*. *N Engl J Med*, 2000. **342**(15): p. 1077-84.
23. Chien, K.R., *Myocyte survival pathways and cardiomyopathy: implications for trastuzumab cardiotoxicity*. *Semin Oncol*, 2000. **27**(6 Suppl 11): p. 9-14; discussion 92-100.
24. Caforio, A.L., et al., *Circulating cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy and myocarditis: pathogenetic and clinical significance*. *Eur J Heart Fail*, 2002. **4**(4): p. 411-7.
25. Martino, T.A., P. Liu, and M.J. Sole, *Viral infection and the pathogenesis of dilated cardiomyopathy*. *Circ Res*, 1994. **74**(2): p. 182-8.
26. Klingel, K., et al., *Ongoing enterovirus-induced myocarditis is associated with persistent heart muscle infection: quantitative analysis of virus replication, tissue damage, and inflammation*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(1): p. 314-8.
27. Baboonian, C., et al., *Coxsackie B viruses and human heart disease*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 1997. **223**: p. 31-52.
28. MacLellan, W.R. and A.J. Lusis, *Dilated cardiomyopathy: learning to live with yourself*. *Nat Med*, 2003. **9**(12): p. 1455-6.
29. Grumbach, I.M., et al., *Adenoviruses and enteroviruses as pathogens in myocarditis and dilated cardiomyopathy*. *Acta Cardiol*, 1999. **54**(2): p. 83-8.
30. Kühl, U., et al., *High prevalence of viral genomes and multiple viral infections in the myocardium of adults with "idiopathic" left ventricular dysfunction*. *Circulation*, 2005. **111**(7): p. 887-93.
31. Kallwellis-Opara, A., et al., *Autoimmunological features in inflammatory cardiomyopathy*. *Clin Res Cardiol*, 2007. **96**(7): p. 469-80.
32. Naparstek, Y. and P.H. Plotz, *The role of autoantibodies in autoimmune disease*. *Annu Rev Immunol*, 1993. **11**: p. 79-104.
33. Jahns, R., et al., *Pathological autoantibodies in cardiomyopathy*. *Autoimmunity*, 2008. **41**(6): p. 454-61.
34. Pohlner, K., et al., *Identification of mitochondrial antigens recognized by antibodies in sera of patients with idiopathic dilated cardiomyopathy by two-dimensional gel electrophoresis and protein sequencing*. *Am J Cardiol*, 1997. **80**(8): p. 1040-5.
35. Okazaki, T., et al., *Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice*. *Nat Med*, 2003. **9**(12): p. 1477-83.
36. Magnusson, Y., A. Hjalmarsen, and J. Hoebcke, *Beta 1-adrenoceptor autoimmunity in cardiomyopathy*. *Int J Cardiol*, 1996. **54**(2): p. 137-41.
37. Magnusson, Y., et al., *Autoimmunity in idiopathic dilated cardiomyopathy. Characterization of antibodies against the beta 1-adrenoceptor with positive chronotropic effect*. *Circulation*, 1994. **89**(6): p. 2760-7.

38. Jahns, R., et al., *Autoantibodies activating human beta1-adrenergic receptors are associated with reduced cardiac function in chronic heart failure*. *Circulation*, 1999. **99**(5): p. 649-54.
39. Fu, M.L., et al., *Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. **72**(1): p. 15-20.
40. Rose, N.R., *Infection, mimics, and autoimmune disease*. *J Clin Invest*, 2001. **107**(8): p. 943-4.
41. Elies, R., et al., *Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease*. *J Immunol*, 1996. **157**(9): p. 4203-11.
42. Ferrari, I., et al., *Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of Trypanosoma cruzi and a functional epitope on the human beta 1-adrenergic receptor*. *J Exp Med*, 1995. **182**(1): p. 59-65.
43. Smulski, C., et al., *Structural basis of the cross-reaction between an antibody to the Trypanosoma cruzi ribosomal P2beta protein and the human beta1 adrenergic receptor*. *FASEB J*, 2006. **20**(9): p. 1396-406.
44. Limas, C.J., *Cardiac autoantibodies in dilated cardiomyopathy: a pathogenetic role?* *Circulation*, 1997. **95**(8): p. 1979-80.
45. Limas, C.J., *Autoimmunity in dilated cardiomyopathy and the major histocompatibility complex*. *Int J Cardiol*, 1996. **54**(2): p. 113-6.
46. Lands, A.M., et al., *Differentiation of receptor systems activated by sympathomimetic amines*. *Nature*, 1967. **214**(5088): p. 597-8.
47. Lohse, M.J., *Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization*. *Biochim Biophys Acta*, 1993. **1179**(2): p. 171-88.
48. Post, S.R., H.K. Hammond, and P.A. Insel, *Beta-adrenergic receptors and receptor signaling in heart failure*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1999. **39**: p. 343-60.
49. Frielle, T., et al., *Cloning of the cDNA for the human beta 1-adrenergic receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1987. **84**(22): p. 7920-4.
50. Gilman, A.G., *G proteins: transducers of receptor-generated signals*. *Annu Rev Biochem*, 1987. **56**: p. 615-49.
51. Hein, L. and B.K. Kobilka, *Adrenergic receptor signal transduction and regulation*. *Neuropharmacology*, 1995. **34**(4): p. 357-66.
52. Jahns, R., V. Boivin, and M.J. Lohse, *Beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmunity as a cause of dilated cardiomyopathy in rats*. *Int J Cardiol*, 2006. **112**(1): p. 7-14.
53. Bywater, R.P., *Location and nature of the residues important for ligand recognition in G-protein coupled receptors*. *J Mol Recognit*, 2005. **18**(1): p. 60-72.
54. Wieland, K., et al., *Involvement of Asn-293 in stereospecific agonist recognition and in activation of the beta 2-adrenergic receptor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(17): p. 9276-81.
55. Dohlman, H.G., et al., *Role of extracellular disulfide-bonded cysteines in the ligand binding function of the beta 2-adrenergic receptor*. *Biochemistry*, 1990. **29**(9): p. 2335-42.
56. Noda, K., et al., *The high affinity state of the beta 2-adrenergic receptor requires unique interaction between conserved and non-conserved extracellular loop cysteines*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(9): p. 6743-52.
57. Jahns, R., et al., *Modulation of beta1-adrenoceptor activity by domain-specific antibodies and heart failure-associated autoantibodies*. *J Am Coll Cardiol*, 2000. **36**(4): p. 1280-7.

58. Jahns, R., V. Boivin, and M.J. Lohse, *beta(1)-Adrenergic receptor function, autoimmunity, and pathogenesis of dilated cardiomyopathy*. Trends Cardiovasc Med, 2006. **16**(1): p. 20-4.
59. Kobilka, B., et al., *Examination of ligand-induced conformational changes in the beta2 adrenergic receptor*. Life Sci, 1998. **62**(17-18): p. 1509-12.
60. Hoffmann, C., et al., *Comparative pharmacology of human beta-adrenergic receptor subtypes--characterization of stably transfected receptors in CHO cells*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2004. **369**(2): p. 151-9.
61. Gao, T., et al., *cAMP-dependent regulation of cardiac L-type Ca²⁺ channels requires membrane targeting of PKA and phosphorylation of channel subunits*. Neuron, 1997. **19**(1): p. 185-96.
62. Lohse, M.J., [Mechanisms of the regulation of adrenergic beta-receptors]. Z Kardiol, 1996. **85 Suppl 7**: p. 1-3.
63. Limas, C.J., I.F. Goldenberg, and C. Limas, *Autoantibodies against beta-adrenoceptors in human idiopathic dilated cardiomyopathy*. Circ Res, 1989. **64**(1): p. 97-103.
64. Jahns, R., et al., *Activating beta-1-adrenoceptor antibodies are not associated with cardiomyopathies secondary to valvular or hypertensive heart disease*. J Am Coll Cardiol, 1999. **34**(5): p. 1545-51.
65. Wallukat, G., et al., *Autoantibodies against the beta-adrenergic receptor in human myocarditis and dilated cardiomyopathy: beta-adrenergic agonism without desensitization*. Eur Heart J, 1991. **12 Suppl D**: p. 178-81.
66. Limas, C.J., I.F. Goldenberg, and C. Limas, *Assessment of immune modulation of beta-adrenergic pathways in human dilated cardiomyopathy: influence of methodologic factors*. Am Heart J, 1992. **123**(4 Pt 1): p. 967-70.
67. Wallukat, G., et al., [Autoantibodies against the beta 1-adrenergic receptor in myocarditis and dilated cardiomyopathy: localization of two epitopes]. Z Kardiol, 1992. **81 Suppl 4**: p. 79-83.
68. Chiale, P.A., et al., *Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction*. Circulation, 2001. **103**(13): p. 1765-71.
69. Matsui, S., et al., *Peptides derived from cardiovascular G-protein-coupled receptors induce morphological cardiomyopathic changes in immunized rabbits*. J Mol Cell Cardiol, 1997. **29**(2): p. 641-55.
70. Mobini, R., et al., *Probing the immunological properties of the extracellular domains of the human beta(1)-adrenoceptor*. J Autoimmun, 1999. **13**(2): p. 179-86.
71. Omerovic, E., et al., *Induction of cardiomyopathy in severe combined immunodeficiency mice by transfer of lymphocytes from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. Autoimmunity, 2000. **32**(4): p. 271-80.
72. Machida, C.A., et al., *Molecular cloning and expression of the rat beta 1-adrenergic receptor gene*. J Biol Chem, 1990. **265**(22): p. 12960-5.
73. Jahns, R., et al., *Direct evidence for a beta 1-adrenergic receptor-directed autoimmune attack as a cause of idiopathic dilated cardiomyopathy*. J Clin Invest, 2004. **113**(10): p. 1419-29.
74. Lohse, M.J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen, *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* Circ Res, 2003. **93**(10): p. 896-906.
75. Nikolaev, V.O., et al., *Novel single chain cAMP sensors for receptor-induced signal propagation*. J Biol Chem, 2004. **279**(36): p. 37215-8.
76. Jahns, R., et al., *Probing human beta 1- and beta 2-adrenoceptors with domain-specific fusion protein antibodies*. Eur J Pharmacol, 1996. **316**(1): p. 111-21.

77. Mijares, A., et al., *Anti-peptide antibodies sensitive to the 'active' state of the beta2-adrenergic receptor*. FEBS Lett, 1996. **399**(1-2): p. 188-91.
78. Milligan, G. and R.A. Bond, *Inverse agonism and the regulation of receptor number*. Trends Pharmacol Sci, 1997. **18**(12): p. 468-74.
79. Woodiwiss, A.J., et al., *Reduction in myocardial collagen cross-linking parallels left ventricular dilatation in rat models of systolic chamber dysfunction*. Circulation, 2001. **103**(1): p. 155-60.
80. Abbas, A.K., ed. *Cellular and Molecular Immunology*. 7th ed. 2011. 545. Copyright Elsevier
81. Kenneth Murphy, P.T., Mark Walport, ed. *Janeway's Immunobiology*. 7th ed. 2008, Taylor & Francis: New York. 380.
82. Radbruch, A., et al., *Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 741-50.
83. Manz, R.A., et al., *Maintenance of serum antibody levels*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 367-86.
84. McHeyzer-Williams, L.J. and M.G. McHeyzer-Williams, *Antigen-specific memory B cell development*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 487-513.
85. Davidson, A. and B. Diamond, *Autoimmune diseases*. N Engl J Med, 2001. **345**(5): p. 340-50.
86. Mitchison, N.A. and L.R. Wedderburn, *B cells in autoimmunity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(16): p. 8750-1.
87. Zhang, J., et al., *Cutting edge: a role for B lymphocyte stimulator in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2001. **166**(1): p. 6-10.
88. Ray, S.K., C. Putterman, and B. Diamond, *Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(5): p. 2019-24.
89. von Boehmer, H. and F. Melchers, *Checkpoints in lymphocyte development and autoimmune disease*. Nat Immunol, 2010. **11**(1): p. 14-20.
90. Yoshida, T., et al., *Memory B and memory plasma cells*. Immunol Rev, 2010. **237**(1): p. 117-39.
91. *[Treatment guidelines--chronic heart failure. Recommendations for therapy of chronic heart failure of the Medical Commission of the German Medical Branch]*. Z Arztl Fortbild Qualitatssich, 1999. **93**(1): p. 45-8.
92. Hoppe, U.C., et al., *[Guidelines for therapy of chronic heart failure]*. Z Kardiol, 2005. **94**(8): p. 488-509.
93. Hoppe, U.C. and E. Erdmann, *[Guidelines for therapy of chronic heart failure. German Society of Cardiology-Heart and Cardiovascular Research]*. Z Kardiol, 1998. **87**(8): p. 645-58.
94. Howard, P.A., et al., *Drug therapy recommendations from the 2005 ACC/AHA guidelines for treatment of chronic heart failure*. Ann Pharmacother, 2006. **40**(9): p. 1607-17.
95. Dickstein, K., et al., *ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure 2008: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure 2008 of the European Society of Cardiology. Developed in collaboration with the Heart Failure Association of the ESC (HFA) and endorsed by the European Society of Intensive Care Medicine (ESICM)*. Eur Heart J, 2008. **29**(19): p. 2388-442.
96. Bristow, M.R., *beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure*. Circulation, 2000. **101**(5): p. 558-69.

97. Reiken, S., et al., *beta-adrenergic receptor blockers restore cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) structure and function in heart failure*. *Circulation*, 2001. **104**(23): p. 2843-8.
98. Lowes, B.D., et al., *Myocardial gene expression in dilated cardiomyopathy treated with beta-blocking agents*. *N Engl J Med*, 2002. **346**(18): p. 1357-65.
99. Reiken, S., et al., *Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure*. *Circulation*, 2003. **107**(19): p. 2459-66.
100. Matsui, S. and M.L. Fu, *Prevention of experimental autoimmune cardiomyopathy in rabbits by receptor blockers*. *Autoimmunity*, 2001. **34**(3): p. 217-20.
101. Hobbs, R.E., et al., *Lymphocytic myocarditis and dilated cardiomyopathy: treatment with immunosuppressive agents*. *Cleve Clin J Med*, 1989. **56**(6): p. 628-35.
102. Berensztein, C.S., J. Lerman, and L.D. Suarez, *[Is there a clinical value of endomyocardial biopsy and immunosuppressive treatment in idiopathic dilated cardiomyopathy? Study by meta analysis]*. *Medicina (B Aires)*, 1991. **51**(4): p. 315-21.
103. Wojnicz, R., et al., *Randomized, placebo-controlled study for immunosuppressive treatment of inflammatory dilated cardiomyopathy: two-year follow-up results*. *Circulation*, 2001. **104**(1): p. 39-45.
104. Frustaci, A., M.A. Russo, and C. Chimenti, *Randomized study on the efficacy of immunosuppressive therapy in patients with virus-negative inflammatory cardiomyopathy: the TIMIC study*. *Eur Heart J*, 2009.
105. Isenberg, D.A., *B cell targeted therapies in autoimmune diseases*. *J Rheumatol Suppl*, 2006. **77**: p. 24-8.
106. Sapir, T. and Y. Shoenfeld, *Facing the enigma of immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulin*. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2005. **29**(3): p. 185-99.
107. Sapir, T., M. Blank, and Y. Shoenfeld, *Immunomodulatory effects of intravenous immunoglobulins as a treatment for autoimmune diseases, cancer, and recurrent pregnancy loss*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. **1051**: p. 743-78.
108. Kazatchkine, M.D. and S.V. Kaveri, *Immunomodulation of autoimmune and inflammatory diseases with intravenous immune globulin*. *N Engl J Med*, 2001. **345**(10): p. 747-55.
109. Sherer, Y., et al., *Cytokine levels in various intravenous immunoglobulin (IVIg) preparations*. *Hum Antibodies*, 2001. **10**(2): p. 51-3.
110. Shoenfeld, Y., et al., *Efficacy of IVIG affinity-purified anti-double-stranded DNA anti-idiotypic antibodies in the treatment of an experimental murine model of systemic lupus erythematosus*. *Int Immunol*, 2002. **14**(11): p. 1303-11.
111. Ibanez, C. and J.B. Montoro-Ronsano, *Intravenous immunoglobulin preparations and autoimmune disorders: mechanisms of action*. *Curr Pharm Biotechnol*, 2003. **4**(4): p. 239-47.
112. Dwyer, J.M., *Manipulating the immune system with immune globulin*. *N Engl J Med*, 1992. **326**(2): p. 107-16.
113. Gullestad, L., et al., *Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure*. *Circulation*, 2001. **103**(2): p. 220-5.
114. McNamara, D.M., et al., *Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy*. *Circulation*, 2001. **103**(18): p. 2254-9.
115. Muller, J., et al., *Immunoglobulin adsorption in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Circulation*, 2000. **101**(4): p. 385-91.
116. Halfmann, R.H., *Immunoabsorption as a new treatment option for patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. *Perfusion*, 2000. **15**(4): p. 333-6.

117. Felix, S.B., et al., *Hemodynamic effects of immunoadsorption and subsequent immunoglobulin substitution in dilated cardiomyopathy: three-month results from a randomized study*. J Am Coll Cardiol, 2000. **35**(6): p. 1590-8.
118. Dorffel, W.V., et al., *Short-term hemodynamic effects of immunoadsorption in dilated cardiomyopathy*. Circulation, 1997. **95**(8): p. 1994-7.
119. Schimke, I., et al., *Decreased oxidative stress in patients with idiopathic dilated cardiomyopathy one year after immunoglobulin adsorption*. J Am Coll Cardiol, 2001. **38**(1): p. 178-83.
120. Mobini, R., et al., *Hemodynamic improvement and removal of autoantibodies against beta1-adrenergic receptor by immunoadsorption therapy in dilated cardiomyopathy*. J Autoimmun, 2003. **20**(4): p. 345-50.
121. Wallukat, G., J. Muller, and R. Hetzer, *Specific removal of beta1-adrenergic autoantibodies from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy*. N Engl J Med, 2002. **347**(22): p. 1806.
122. Hershko, A.Y. and Y. Naparstek, *Removal of pathogenic autoantibodies by immunoadsorption*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1051**: p. 635-46.
123. Jahns, R., et al., *Targeting receptor antibodies in immune cardiomyopathy*. Semin Thromb Hemost, 2010. **36**(2): p. 212-8.
124. Crotty, S., et al., *Tracking human antigen-specific memory B cells: a sensitive and generalized ELISPOT system*. J Immunol Methods, 2004. **286**(1-2): p. 111-22.
125. Tuaille, E., et al., *Detection of memory B lymphocytes specific to hepatitis B virus (HBV) surface antigen (HBsAg) from HBsAg-vaccinated or HBV-immunized subjects by ELISPOT assay*. J Immunol Methods, 2006. **315**(1-2): p. 144-52.
126. Dayan, C.M. and G.H. Daniels, *Chronic autoimmune thyroiditis*. N Engl J Med, 1996. **335**(2): p. 99-107.
127. Vincent, A., O. Lily, and J. Palace, *Pathogenic autoantibodies to neuronal proteins in neurological disorders*. J Neuroimmunol, 1999. **100**(1-2): p. 169-80.
128. Bahn, R.S. and A.E. Heufelder, *Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy*. N Engl J Med, 1993. **329**(20): p. 1468-75.
129. Khoo, T.K. and R.S. Bahn, *Pathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the role of autoantibodies*. Thyroid, 2007. **17**(10): p. 1013-8.
130. Hoyer, B.F., et al., *Short-lived plasmablasts and long-lived plasma cells contribute to chronic humoral autoimmunity in NZB/W mice*. J Exp Med, 2004. **199**(11): p. 1577-84.
131. Edwards, J.C. and G. Cambridge, *Prospects for B-cell-targeted therapy in autoimmune disease*. Rheumatology (Oxford), 2005. **44**(2): p. 151-6.
132. Neubert, K., et al., *The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis*. Nat Med, 2008. **14**(7): p. 748-55.
133. Enrico, O., et al., *Unexpected cardiotoxicity in haematological bortezomib treated patients*. Br J Haematol, 2007. **138**(3): p. 396-7.
134. Kim, Y.M., et al., *Monovalent ligation of the B cell receptor induces receptor activation but fails to promote antigen presentation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3327-32.
135. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fc gamma receptors as regulators of immune responses*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(1): p. 34-47.
136. Bach, J.F., *Organ-specific autoimmunity*. Immunol Today, 1995. **16**(7): p. 353-5.
137. Kühl, U., et al., *Immunohistological evidence for a chronic intramyocardial inflammatory process in dilated cardiomyopathy*. Heart, 1996. **75**(3): p. 295-300.

G) Anhang

I. Antikörper

Antikörper Elisa Assay

- Biotinylierter anti Ratten Antikörper, Dianova, Hamburg, Deutschland

Antikörper ELISPOT Assay

- Anti Ratten IgG (H+L), Dianova, Hamburg, Deutschland
- Alkal. Phosphatase konjugierter anti Ratten Antikörper (Jackson Immunoresearch, West Grove, USA)

Antikörper Durchflusszytometrie

- Anti rat IgG PE (Fc), Jackson Immunosearch, West Grove, USA
- Anti Rat CD45 RA FITC, cat.no. 554883, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
- Dyl 649 markiertes β_1 - EC_{II} / GST – FP, markiert mit Dy Light™ Antibody Labeling Kit Number 53050, Thermo Scientific, Rockford, USA

Antikörper Immunhistochemie

- Maus anti Ratte CD3 Antikörper, Serotec, Düsseldorf, Deutschland
- Maus anti Ratte CD 45 RA (Ox 33) Antikörper, BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
- Biotinylierter anti Maus IgG (H+L), Vektor, Burlingame, USA

Immunglobuline für Elisa

- Ratten IgG, Dianova, Hamburg, Deutschland

II. Standardlösungen / Puffer / Medien

- BCIP / AMP Lösung (100 mg BCIP auf 100 ml AMP)
- BSS (Balanced Salt Solution I,II)
 - BSS I: 50 mg Glukose, 3g, KH₂PO₄, 11,9g Na₂HPO₄
 - BSS II: 9,25 g CaCl₂, 20 g KCl, 320g NaCl
- BSS / BSA 0,2% BSA in BSS
- 10% BSA / PBS 10% BSA in PBS
- 1% BSA / PBS 1% BSA in PBS
- Coating Puffer (0,05M Tris, pH 9,4), Institutseigene Herstellung
- FACS – Puffer 0,1% BSA, 0,02% NaN₃ in PBS
- PBS (Phosphate Bufferd Saline)
 - Ad 1000 ml H₂O bidest: 0,2 g KCl, 0,2 g KH₂PO₄, 0,05 g MgCl₂, 8 g NaCl, 1,15 g Na₂HPO₄
- PBS / BSA 1% BSA in PBS
- PBS / Tween 0,05% 0,05% Tween 20 in PBS
- PBS / Tween 0,1% 0,1% Tween 20 im PBS
- RPMI 1640 Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
- Tris – Ammonium – Chlorid – Puffer (TAC – Puffer)
 - 0,48g Tris 1,66g NH₄Cl, ad 200 ml Aqua dest.
- Substratpuffer 1,45 g Na₂HPO₄, 1 g Citronensäure, Institutseigene Herstellung

- Substratlösung 0,52 mg OPD / ml + 1,67 µl H₂O₂
- Stopplösung 3M Schwefelsäure, Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Würzburg, Deutschland
- Waschmilch Milchpulver 3 % in PBS
- XVIVO – 15, Bio Whittaker, Verviers, Belgien

III. Gebrauchsmaterialien

- Aquatex, Merck Chemicals, Darmstadt, Deutschland
- Einmalkanülen, NEOJECT, Gelnhausen, Deutschland
- Eukitt Fluka 03989, Sigma – Aldrich, Hamburg, Deutschland
- Fieberglassfilter, Prod. Nr.: 1450-421, Wallac Oy, Turku, Finnland
- Kryoröhrchen 2,0 ml, Hartenstein Laborversand, Würzburg, Deutschland
- MACS Beads und Säulen, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
- Mikrotierplatten 8x 12 Wells, Nunc, Langenselbold, Deutschland
- 96 – Well Flachbodenplatte, Greiner, Nürnberg, Deutschland
- Pipettenspitzen, Sarstedt GmbH, Nürnbrecht, Deutschland
- Platten 25 Well, Sterilin / Barloworld, Ansbach, Deutschland
- Rotilabo – Einbettkassetten, Carl – Roth – GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- Spritzen 5 ml, Codan Medical APS, Lensahn, Deutschland
- Super Frost Plus – Objektträger, Super Frost Plus, R. Langenbrinck, Teningen, Deutschland
- Tissue Tek Kryomedium, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande
- Tube 15ml / 50 ml, Sarstedt GmbH, Nürnbrecht, Deutschland
- Zellsieb, BD Falcon, Franklin Lakes, USA

IV. Chemikalien und Reagenzien

- Agarose, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- AMP, Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat (BCIP), Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- DAB (KEM, 4170), KEM – En- Tec Diagnostics A/S, Kopenhagen, Dänemark
- Eosin – Lösung, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- Ethanol, Ferak, Berlin, Deutschland
- FCS (Fötales Kälberserum), Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland
- Formalin 10% gepuffert, Otto Fischar GmbH%Co., Saarbrücken, Deutschland
- Hämatoxylin – Lösung, Sigma Aldrich Chemie, Deisenhofen, Deutschland
- ³H – Thymidin, Amsterham Buchler, Braunschweig, Deutschland
- NaCl, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- NSR (Normales Ratten Serum), Institutseigene Herstellung
- Streptavidin – Biotin - Komplex (K0377) Fa Dako Cytomation, Carpinteria, USA
- Streptavin Peroxidase, Dianova, Hamburg, Deutschland
- Tris, Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Tween 20, Sigma, Deisenhofen, Deutschland

Danksagung

Bei der Erstellung dieser Arbeit hatten folgende Personen großen Anteil, denen ich an dieser Stelle danken möchte:

Herrn Prof. Dr.med. Roland Jahns für die ausgezeichnete Betreuung der Arbeit und die jederzeit gewährte schnelle und unkomplizierte Hilfe sowie die Übernahme des Referats.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Thomas Kerkau danke ich für das fachlich – immunologische Feedback, die hilfreichen Verbesserungsvorschläge / Denkanstöße und die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr.med. Niklas Beyersdorf danke ich für die vielen Anregungen und konstruktiven Diskussionen sowie in Zusammenarbeit mit Frau Sandra Werner für die Durchführung des Proliferations Assays.

Herrn Dr. rer. nat. Vladimir Kocoski danke ich für die Geduld und Unterstützung bei allen Problemen sowie für die Einführung in die Laborarbeit.

Frau Dr. rer. nat. Valerie Jahns danke ich für die Hilfe bei der Durchführung von Elisa und histologischer Arbeiten.

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die bisher nicht genannt worden sind, aber in irgendeiner Weise zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben. Vielen Dank!