

Aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. Holger Kirchner  
vertreten in der  
Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
durch das Institut für Medizinische Molekularbiologie  
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. Peter K. Müller

**Die Rolle der Komplementdefizienz im Zusammenhang  
mit Interferon alpha in der Pathogenese des  
Systemischen Lupus erythematodes**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
**-Aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät-**

vorgelegt von  
Doreen Finke  
aus Hamburg

Lübeck 2005

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Verena Gauss-Müller
2. Berichterstatter: PD Dr. med. Siegfried Görg

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

---

<b>I</b>	<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	
<b>II</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>9</b>
1.1	Das Immunsystem - angeborene und adaptive Mechanismen .....	9
1.2	Das Komplementsystem .....	10
1.3	Komplement in der adaptiven Immunität.....	12
1.4	Autoimmunerkrankungen .....	15
1.5	Systemischer Lupus erythematoses .....	16
1.6	Systemischer Lupus erythematoses und Komplement .....	18
1.7	Interferon alpha .....	19
1.8	Interferon alpha und Systemischer Lupus erythematoses .....	20
1.9	Hypothese und Arbeitsprogramm.....	23
<b>2</b>	<b>ZIELSETZUNG .....</b>	<b>25</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>27</b>
3.1	Mäuse.....	27
3.2	Geräte .....	27
3.3	Laborbedarf .....	28
3.4	Zellkulturmedien und –zusätze.....	29
3.5	Chemikalien und Reagenzien .....	30
3.6	Antikörper .....	31
3.7	Seren.....	33
3.8	Primer und Sonden .....	33
3.9	Lösungen und Kits (gebrauchsfertig) .....	34
3.10	Substrate .....	34
3.11	Zelllinien .....	34
<b>4</b>	<b>METHODEN.....</b>	<b>36</b>
4.1	Aufreinigung monoklonaler Antikörper .....	36
4.1.1	Aufreinigung aus der Zellkultur.....	36
4.2	Immunglobulin-Extraktion mittels Affinitätsaufreinigung.....	36
4.3	Proteinnachweis quantitativ.....	38
4.3.1	Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration mittels Spektroskopie .....	38
4.3.2	Bestimmung der Immunglobulinkonzentration mittels Spektroskopie .....	39
4.4	Proteinnachweis qualitativ .....	39
4.4.1	SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	39

4.4.2	Coomassie-Färbung.....	39
4.5	Nachweis der Spezifität der aufgereinigten Immun-globuline .....	40
4.6	Konjugation von Antikörper .....	40
4.6.1	Konjugation mit Biotin.....	40
4.6.2	Konjugation mit Jod <sup>123</sup> .....	41
4.7	Immunhistochemie .....	43
4.7.1	Beschichtung der Objektträger.....	43
4.7.2	Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern.....	43
4.7.3	Färbungen .....	43
4.8	Maus anti-Interferon alpha ELISA .....	48
4.9	Maus anti-dsDNA-Antikörper ELISA .....	49
4.10	Antiviraler Bioassay.....	50
4.11	Isolierung mononukleärer Zellen aus der Milz.....	50
4.12	Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen .....	51
4.13	Reinheitsmessung am Durchflußzytometer .....	52
4.14	DNA und RNA-Isolierung aus Zellen.....	53
4.15	DNA-Verdau .....	53
4.16	Bestimmung der Gesamt-DNA- bzw. Gesamt-RNA-Konzentration mittels Spektroskopie.....	53
4.17	Real-time RT-PCR .....	54
4.18	Relative Quantifizierung der RT-PCR .....	56
4.18.1	Vergleichende C <sub>T</sub> -Methode ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode).....	57
4.19	Qualitativer Nachweis von endogener DNA im Serum.....	57
4.20	Quantitativer Nachweis von endogener DNA im Serum .....	59
4.21	Bestimmung des Genotyps .....	60
4.21.1	PCR-Bestimmung des C4 <sup>-/-</sup> -Genotyps .....	60
4.21.2	PCR-Bestimmung des IFNR <sup>-/-</sup> -Genotyps .....	61
4.21.3	Gelelektrophorese .....	62
4.22	Intravenöse und intraperitoneale Applikation, Immunisierung, Blutentnahme und Serumgewinnung bei Mäusen.....	63
4.22.1	Intravenöse und intraperitoneale Applikation .....	63
4.22.2	Immunisierung, Blutentnahme und Serumgewinnung.....	64
4.23	Statistik.....	64
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>65</b>
5.1	Nachweis von Interferon alpha im Serum und der murinen Milz.....	65
5.1.1	Nachweis von Interferon alpha Protein im Serum .....	65

5.1.2	Nachweis von Interferon gamma, Interleukin 12 und Interferon alpha mRNA mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA der Milz unbehandelter Mäuse .....	66
5.2	Lokalisation und Charakterisierung Interferon alpha produzierender Zellen ....	68
5.3	Zytokin mRNA Nachweis von CD11b positiven Zellen.....	71
5.3.1	Reinheitsprüfung mittels Durchflusszytometer .....	71
5.3.2	RT-PCR für Interferon gamma, Interleukin 12 und Interferon alpha mRNA aus separierten Milzzellen unbehandelter Mäuse .....	72
5.3.3	Nachweis von IFRG28 mRNA.....	74
5.4	Zytokinproduktion nach Applikation von IgM anti-dsDNA-Immunkomplexen ...	76
5.4.1	Nachweis endogener DNA .....	76
5.4.2	Untersuchung zur Anreicherung des radioaktiv markierten IgM anti-dsDNA in verschiedenen Organen .....	77
5.4.3	Deposition des IgM anti-dsDNA in der marginalen Zone der Milz.....	79
5.4.4	Interferon gamma, Interleukin 12 und Interferon alpha RT-PCR nach IgM anti-dsDNA-Applikation .....	80
5.4.5	Nachweis von IFRG28 mRNA nach IgM anti-dsDNA-Applikation.....	85
5.5	Untersuchung der Zytokine nach TNP-Ficoll-Applikation.....	86
5.6	Die Bedeutung der IgM anti-dsDNA-Lokalisation für die Entstehung SLE-typischer Autoantikörper.....	91
5.6.1	Nachweis von IgG anti-dsDNA-Antikörpern nach IgM anti-dsDNA-Applikation.....	91
5.6.2	Interferon alpha Blockierung bei IgM anti-dsDNA-Applikation .....	93
<b>6</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>96</b>
6.1	Untersuchungen an unbehandelten Mäusen .....	96
6.1.1	Nachweis von Interferon gamma und Interleukin 12 bei unbehandelten Mäusen.....	96
6.1.2	Nachweis von Interferon alpha bei unbehandelten Mäusen .....	97
6.1.3	Nachweis von IFRG28 mRNA bei unbehandelten Mäusen .....	98
6.1.4	Charakterisierung der Interferon alpha produzierenden Zellen.....	98
6.2	Induktion von Zytokinen durch IgM-Immunkomplexe .....	100
6.2.1	Nachweis endogener DNA im Serum.....	100
6.2.2.	Distribution von IgM anti-dsDNA <i>in vivo</i> .....	101
6.2.3	Zytokinproduktion nach IgM anti-dsDNA-Applikation .....	102
6.2.4	IgM anti-dsDNA-Applikation induziert IgG-Autoantikörper .....	105
6.2.5	Blockierung von Interferon alpha.....	107
6.2.6	Neue Therapieoptionen beim Systemischen Lupus erythematodes .....	109

---

<b>7</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>112</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>113</b>
<b>III</b>	<b>PUBLIKATIONEN UND KONGRESSBEITRÄGE.....</b>	<b>133</b>
<b>IV</b>	<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>136</b>
<b>V</b>	<b>LEBENS LAUF.....</b>	<b>137</b>

## II Abkürzungsverzeichnis

Im Folgenden sind alle verwendeten Abkürzungen mit Ausnahme der im Duden zugelassenen Standardabkürzungen aufgeführt.

AP	Alkalische Phosphatase
ANA	Antikörpern gegen nukleäre Antigene
BCR	B-Zellrezeptor
BE	Blutentnahme
Bio	Biotin
C	Komplementkomponente
CD	Differenzierungsantigene (Cluster of differentiation)
CD11b+	CD11b positiv
CD11b-	CD11b negativ
CMV	Cytomegalie-Virus
CR	Komplementrezeptor
C4-/-	C4 defizient (Mäuse)
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
E	Extinktion
ssDNA	Einzelstrang-DNA
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EBV	Epstein-Barr-Virus
FCS	Fetales Kälberserum (Foetal Calf Serum)
FDC	Follikulär dendritische Zellen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
Ig	Immunglobulin (z.B. Immunglobulin G oder M)
IgM-IC	IgM anti-dsDNA-Immunkomplex
IFRG28	Interferon Regulated Gene 28
IC	Immunkomplex
IFN	Interferone
IFN $\alpha$	Interferon alpha
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IFNR-/-	Interferon-Rezeptordefizienz
IL	Interleukine
i.p.	Intraperitoneal
IU	Internationale Einheit

i.v.	Intravenös
Lprlpr	Lupus-Modell-Mausstamm (Lymphoproliferationsmutation)
mDC	Myelozytäre dendritische Zellen
MAC	Membranangriffskomplex
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
MBL	Mannanbindendes Lektin
mRNA	messenger RNA
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
MZ	Marginalzone
MZ B-Zellen	Marginalzonen B-Zellen
MZ Makrophagen	Marginalzonen Makrophagen
NIPC	Natürlichen Interferonproduzierende Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NDV	New Castle Disease Virus
NZW/NZB	Lupus-Modell-Mausstamm (New Zealand white/black)
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
pDC	Plasmazytoide dendritischen Zellen
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TdT	Terminale deoxynucleotidyl transferase
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNP	2,4,6-Trinitrophenyl
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TUNEL	Terminale deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
rpm	Umdrehungen pro Minute
Unbeh.	Unbehandelt
arb. Units	willkürlich gesetzte Einheit
Wt	Wildtyp

# 1 Einleitung

Der Systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine Immunkomplexerkrankung mit autoimmuner Ursache aus der Gruppe der Kollagenosen. Auf genetischer Ebene wird eine Assoziation des SLE zu Defekten von Komponenten des klassischen Komplementaktivierungsweges (Komplementkomponenten C1, C4, C2) gesehen und diese Defekte scheinen prädisponierend für SLE sowohl beim Menschen als auch in tierexperimentellen Studien zu sein. Daneben ist bekannt, dass Patienten mit SLE ein aktiviertes Typ I Interferonsystem haben und erhöhte Interferon alpha (IFN  $\alpha$ ) Spiegel im Serum messbar sind. Obwohl derzeit verschiedene Erklärungsansätze für die Induktion der Autoimmunität bei dieser Erkrankung diskutiert werden, ist weiterhin unklar, warum es in Abwesenheit von C1 oder C4 und in Anwesenheit von IFN  $\alpha$  zu einem Verlust der B-Zelltoleranz kommt.

Um die Bedeutung von Komplement C4, sowie den Zusammenhang von IFN  $\alpha$  und Autoimmunität zu ermitteln, wird in der vorliegenden Dissertation die besondere Rolle von IFN  $\alpha$  im Zusammenhang mit Immunkomplexen (IC) und Komplement C4 bei der Entstehung von Autoimmunität am Beispiel von SLE im Maus-Modell untersucht.

## 1.1 Das Immunsystem - angeborene und adaptive Mechanismen

Das Ziel des Immunsystems (lat. immunis = frei, unberührt) ist die Erhaltung der Integrität des Organismus. In der Unterscheidung von „Fremd“ und „Eigen“ und in der Definition von Selbst auf zellulärer und molekularer Ebene übernimmt das Immunsystem die überlebenswichtige Aufgabe den Organismus höherer Lebewesen gegen die potentiell feindlich gesinnte Außenwelt zu schützen. Es versetzt den Organismus in die Lage auf eine immunogene Herausforderung, gleichgültig ob bakterieller, viraler oder parasitärer Art zu reagieren. Für diese lebensnotwendige Aufgabe stehen eine Vielzahl an Effektoren zur Verfügung, deren komplexes Zusammenwirken eine meist schnelle Eliminierung der Gefahren ermöglicht.

Zur Erfüllung dieser Funktion existieren zwei verschiedene Hauptsysteme: zum einen die angeborenen, zum anderen die adaptiven Abwehrmechanismen.

Abhängig von den zugrundeliegenden Effektormechanismen kann sowohl das angeborene als auch adaptive Abwehrsystem zellulärer oder humoraler (nach lateinisch *humor*, für Flüssigkeit) Art sein.

Beim angeborenen Abwehrsystem sind die wichtigsten humoralen Faktoren die Serumproteine, welche als Komplementsystem bezeichnet werden, auf zellulärer Ebene sind es Monozyten/Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten. Zu den angeborenen Erkennungsmechanismen gehören u.a. die Toll-like Rezeptoren (TLR), von denen bisher ca. 11 bekannt sind und die spezifisch Strukturen u.a. wie LPS (TLR 4), CpG-DNA (TLR 9) und dsRNA (TLR 3) erkennen (O'Neill 2004). Da Mikroorganismen in der Lage sind, schnell zu evolvieren und so beständig neue Resistenzmechanismen entstehen, ist das angeborene Immunsystem alleine damit überfordert vor allen Infektionen zu schützen. Daher hat sich bei Vertebraten zusätzlich das System der adaptiven Immunität entwickelt. Dazu gehören auf zellulärer Ebene T- und B-Lymphozyten sowie als humorale Effektoren die Antikörper. Die adaptive Immunantwort im Gegensatz zur angeborenen benötigt jedoch einige Zeit um sich vollständig zu entfalten. Deshalb bietet das adaptive Immunsystem zunächst nur einen sehr geringen Schutz beim Erstkontakt gegen eindringende Fremdpathogene, kann sie später aber spezifischer und effektiver bekämpfen.

Oft wurden das angeborene und das erworbene System getrennt voneinander betrachtet, in den letzten Jahren setzte sich jedoch zunehmend die Erkenntnis durch, dass das angeborene das adaptive Immunsystem beeinflusst und unterstützt und umgekehrt. So sind beispielsweise Komplement und TLR in der Lage, die angeborene und die erworbene Immunität funktionell zu verknüpfen.

## 1.2 Das Komplementsystem

Komplement wurde erstmalig 1896 durch den belgischen Bakteriologen Jules Bordet (1870-1961) als eine Serums substanz beschrieben, welche die Fähigkeit besitzt mit ihrem korrespondierendem Antikörper inkubierte Bakterien zu lysieren. Da diese Substanz somit die Aktivität von Antikörpern bei der Lyse von Bakterien *komplementiert*, wurde sie Komplement genannt.

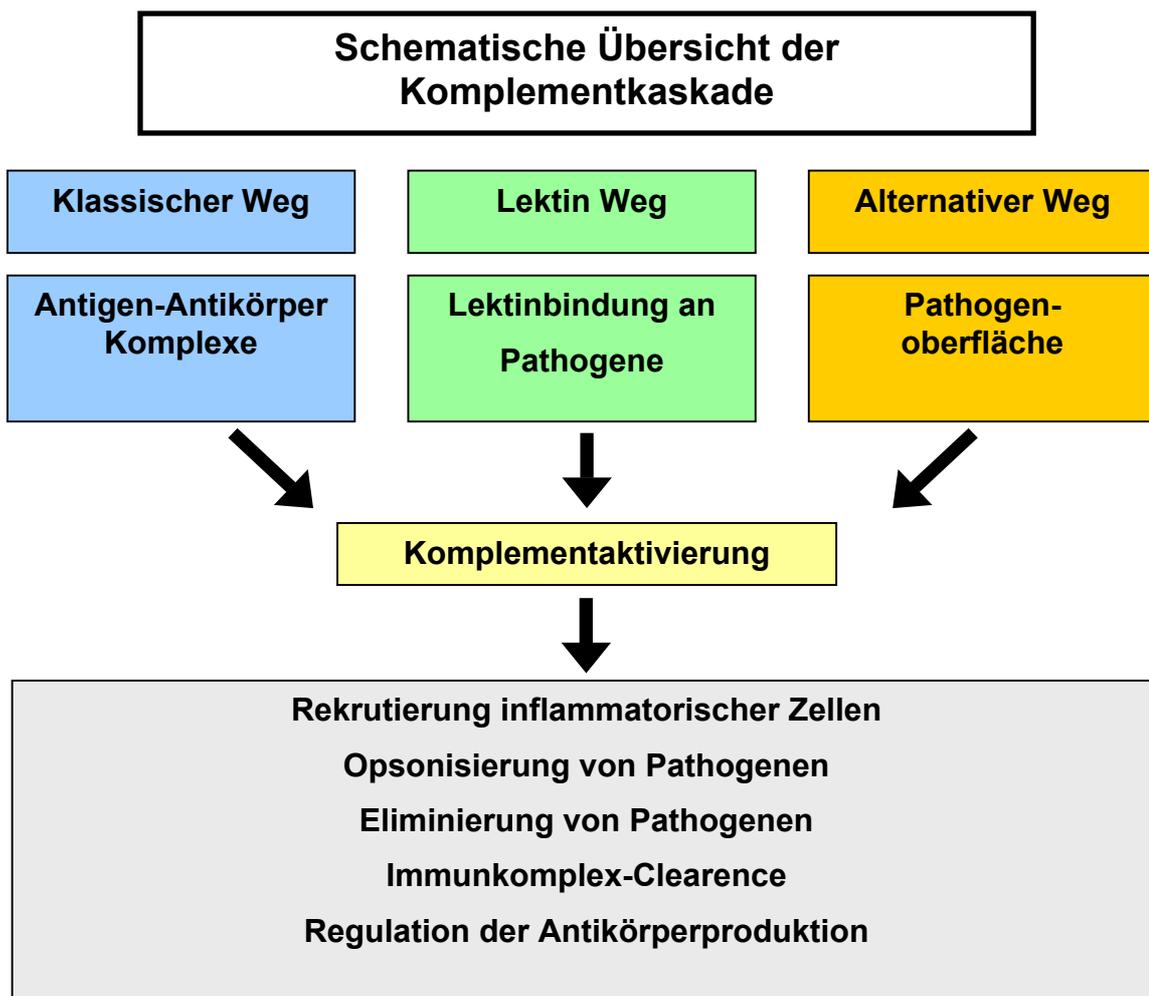
Wichtige Erkenntnisse über das Komplementsystem wurden Ende der fünfziger Jahre durch die neu entwickelte Möglichkeit der Proteinaufreinigung gewonnen (Mayer 1970 und 1984). Es konnte gezeigt werden, dass es sich um Proteine handelt, die in einem Komplex miteinander agieren und deren Aktivierung mittels einer Kaskade abläuft.

Mittlerweile weiß man, dass das Komplementsystem aus ca. 30 verschiedenen hitzeempfindlichen Plasmaproteinen besteht und vielfältige Aufgaben erfüllt. So spielt das Komplementsystem eine zentrale Rolle in der antibakteriellen Immunabwehr, in der Modulation von Entzündungsreaktionen, in der Eliminierung von Immunkomplexen und in der Regulation der Antikörperproduktion (Bitter-Suermann und Burger 1990, Fearon und Carter 1995, Fischer et al. 1996). Weiterhin scheint es an der Bildung von B-Gedächtniszellen beteiligt zu sein (Fang et al. 1998).

Derzeit sind drei Wege der Komplementaktivierung bekannt: der klassische Weg, der mannanbindendes Lektin (MBL)-Weg und der alternative Weg.

Beim klassischen Weg erfolgt die Aktivierung durch Immunkomplexe, bestehend aus Antigenen und Antikörpern wie IgM und IgG. Über die Komplementfaktoren C1q, r und s wird C4 aktiviert, welches über einen Thioester kovalent an eine Zieloberfläche bindet und gemeinsam mit C2 die C3-Konvertase bildet. Beim alternativen Weg wird die spontan aktivierte Komplementkomponente C3 direkt über den Thioester an die Pathogenoberfläche gebunden und bildet mit den Faktoren D, B und Properdin ebenfalls eine C3-Konvertase. Dieser Weg könnte eine Verstärkerschleife des klassischen Weges darstellen. Ein weiterer Aktivierungsweg erfolgt über MBL, welches an mannose- oder N-azetylglukosaminhaltige Proteine oder Kohlenhydrate auf Bakterien bindet und somit direkt über C4 ohne C1q eine Komplementaktivierung ermöglicht (Ikeda et al. 1987). Die gemeinsame Endstrecke aller drei Wege verläuft über die C3-Konvertase, die in der Lage ist, C3 zu spalten und somit zu aktivieren. C3b induziert die weiteren Komplementfaktoren C5-C9. Diese bilden den Membranangriffskomplex (MAC), der durch Porenbildung eine Zyto- oder Bakteriolyse hervorruft (Bhakdi et al. 1990, Zalman und Muller-Eberhard 1990).

Komplementspaltprodukte wie C4a, C3a und C5a können als Anaphylatoxine die Vasopermeabilität erhöhen und die Mastzellaktivierung sowie -degranulation beeinflussen (Frank und Fries 1991). C5a aktiviert zusätzlich die Leukozytenchemotaxis. Sind Komplementspaltprodukte an bakteriellen Oberflächen angelagert, so unterstützen sie über die Komplementrezeptoren CR1 (CD35) und CR3 (CD11b/CD18) die Erkennung und Phagozytose von Mikroorganismen durch Makrophagen. Weiterhin sind Komplementkomponenten, vor allem die des klassischen Weges (C1, C4, C2), an Transportmechanismen von Immunkomplexen (Clearance) beteiligt (**Abb. 1**).



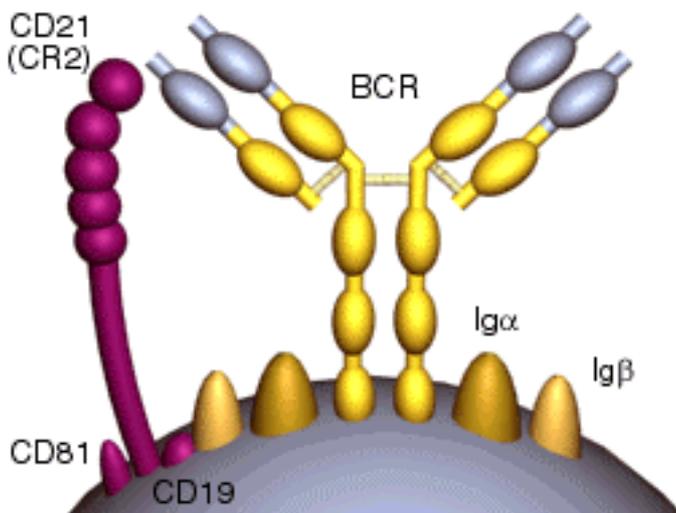
**Abb.1: Es sind drei Wege zur Aktivierung der Effektorfunktionen von Komplement bekannt: der klassische, der MBL- und der alternative Weg.**

Alle diese Wege lösen eine enzymatische Aktivität aus, welche die entscheidende Mechanismen der Komplementkaskade bewirken. Drei wichtige Konsequenzen der Komplementaktivierung sind die Rekrutierung inflammatorischer Zellen, die Opsonisierung und die Elimination von Pathogenen. (mod. nach Janeway, Immunobiology. 5th ed. 2001)

### 1.3 Komplement in der adaptiven Immunität

Das Komplementsystem ist nicht nur ein wichtiger Faktor der angeborenen Immunität, es beeinflusst auch das adaptive Immunsystem und ist somit eine der Verknüpfungsstellen zwischen angeborener und erworbener Immunität.

So erfolgt z.B. Regulation der antikörperproduzierenden B-Zellen über ihre

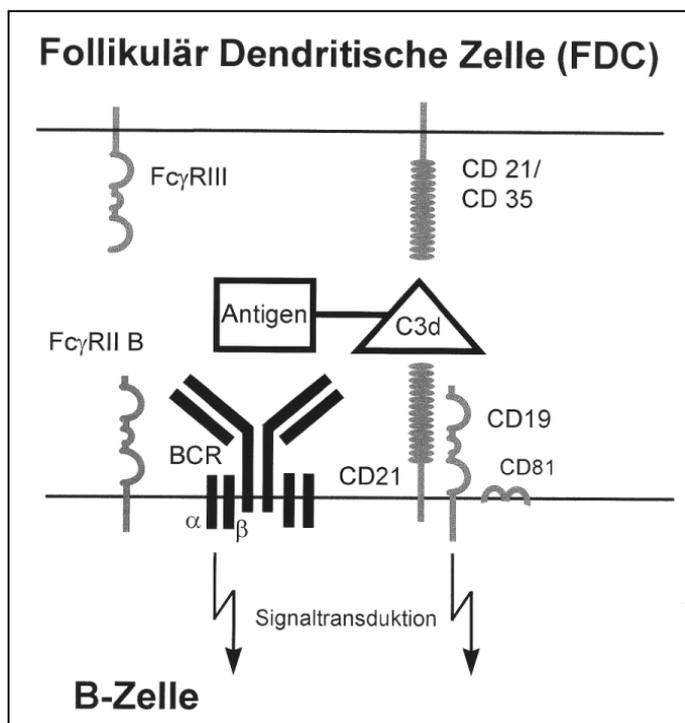


**Abb.2: B-Zelle mit Oberflächenmolekülen**  
 B-Zellrezeptor (BCR) und Korezeptorkomplex  
 (CD81/TAPA, CD19, CD21/CR2)  
 (Quelle: [www.immunology.klimov.tom.ru/fig35.gif](http://www.immunology.klimov.tom.ru/fig35.gif))

Komplementrezeptoren CR1 und CR2 (CD35/CD21) (Fearon und Ahearn 1990), welche zusammen mit CD19 und CD81 (TAPA-1) den B-Zellkorezeptorkomplex bilden (**Abb. 2**). An die Komplementrezeptoren können die Liganden C3d und C4d binden. CD19 ist mit Hilfe seines intrazellulären Molekülbereichs für die Signaltransduktion verantwortlich (Carter und Fearon 1992, Rickert et al. 1995).

Eine Reduktion von C3 oder C2 und C4, die in die C3-Aktivierung involviert sind, führt zu einer verminderten humoralen Antwort auf ein lösliches T-zellabhängiges Antigen (Bitter-Suermann und Burger 1990, Fearon und Carter 1995, Fischer et al. 1996). Eine reduzierte Antikörperproduktion konnte sowohl durch transiente Depletion von C3 vor einer Immunisierung (Pepys 1974), als auch bei genetisch bedingtem Mangel an Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges in verschiedenen Spezies gezeigt werden (Jackson et al. 1979, Fischer et al. 1996). Ursache hierfür ist die durch das Fehlen der frühen Komplementkomponenten C1 oder C4 verhinderte Aktivierung des klassischen Komplementweges, wodurch auch die Integration von C3d in Immunkomplexe gestört ist. Eine Kostimulation über den CD21-Rezeptor kann daher nicht erfolgen und dies führt zu einer beeinträchtigten Antikörperproduktion (Abb.3) (Fischer et al. 1998, Cutler et al. 1998).

Die Signalgebung für membranständige Immunglobuline (B-Zell-Rezeptoren (BCR))



wird also durch Bindung dieser Immunkomplexe über den  $CD 21 / CD 19 / CD 81$ -Korezeptorkomplex auf antigen-spezifischen B-Zellen erhöht (Fearon und Carter 1995) und die humorale Immunantwort wird über diesen Mechanismus verstärkt (Dempsey et al. 1996). Immunkomplexe aus spezifischen Antigen und  $C3d$  können aber die B-Zellantwort über einen weiteren Mechanismus beeinflussen (**Abb. 3**).

**Abb. 3:** Vereinfachte Darstellung der FDC-B-Zell-Interaktion und B-Zell-Regulation durch Antigen und Komplement  $C3d$

Die Antigenbindung via  $CD 21 / CD 35$  auf follikulär dendritischen Zellen ermöglicht die Antigenpräsentation für naive B-Zellen und die Aufrechterhaltung einer Gedächtnisfunktion (Fang et al. 1998).

Die Klasse des Immunglobulins welches im IC gebunden ist, spielt ebenfalls eine Rolle in der Aktivierung der B-Zelle. So ist ein Immunkomplex bestehend aus spezifischem Antigen und IgM, eher zur Einbindung von Komplement  $C3d$  geeignet, so dass über den B-Zell-Korezeptorkomplex  $CD 21 / CD 19 / CD 81$  dann eine Aktivierung der B-Zelle erfolgen kann (Dempsey et al. 1996). Liegen jedoch Antigene im Komplex mit IgG vor, so haben diese einen eher inhibierenden Einfluss auf B-Zellen (Cambier et al. 1994, Takai et al. 1996). Die Ursache hierfür wird kontrovers diskutiert. Einerseits scheint der Rezeptor  $Fc\gamma RI I B$  auf der B-Zell-Oberfläche eine wichtige Rolle zu spielen, da eine Kreuzvernetzung von BCR und  $Fc\gamma RI I B$  die B-Zell-Aktivierung inhibiert. Dies konnte in vivo und in vitro demonstriert werden. (Phillips und Parker 1984, Bijsterbosch und Klaus 1985, Amigorena et al. 1992, Cambier et al. 1994, Muta et al. 1994, Takai et al. 1996). Andererseits scheinen aber auch  $Fc\gamma RI I B$ -unabhängige Mechanismen zu existieren, wie es in Untersuchungen an  $Fc\gamma RI I B$ -defizienten Mäusen gezeigt wurde.

Als Ursache wird hierbei die Maskierung von Antigenepitopen durch Antikörper vom IgG-Typ und die daraus resultierende mangelnde Erkennung und B-Zellbindung an das korrespondierende Antigen diskutiert (Wernersson et al. 1999, Heyman 2001a, Heymann et al. 2001b, Karlsson et al. 1999 und 2001).

Das Komplementsystem ist folglich eine notwendige und wichtige Grundlage für die vollständige Generierung einer Immunantwort. Paradox erscheint allerdings die Tatsache, dass Komplementdefizienz einerseits zu reduzierter Antikörperbildung führt, andererseits jedoch bei Individuen mit Komplementmangel oft hohe Konzentrationen von Autoantikörpern auftreten. So weist der Mangel einer frühen Komplementkomponente (C1q, C1r, C1s, C4, C2) eine enge Assoziation zur Autoimmunerkrankung SLE auf.

## 1.4 Autoimmunerkrankungen

Die grundlegende Aufgabe unseres Immunsystems ist es gegen eindringende Mikroorganismen vorzugehen und dabei die körpereigenen Komponenten auszusparen. In einigen Fällen werden jedoch Autoantikörper (griech. autos = selbst) gebildet, die sich gegen körpereigene Substanzen richten. Beteiligt an der Entstehung von Autoimmunität können verschiedenen Zelltypen sein. Im Fall der Multiplen Sklerose scheinen autoreaktive T-Zellen eine besondere Rolle zu spielen (Weiner 2004). Bei anderen Autoimmunerkrankungen wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder SLE kommt es zur Sezernierung autoreaktiver Antikörper (Mills 1994). Normalerweise sind Immunglobuline welche von den B-Zellen sezerniert werden gegen Moleküle auf Pathogenen („Fremd“) und nicht gegen „Selbst“ gerichtet. Viele verschiedene Mechanismen, zusammengefasst unter dem Begriff immunologische Toleranz, verhindern normalerweise eine Reaktion gegen „Selbst“. Ein Mechanismus der Toleranzbildung kann die klonale Deletion selbstreaktiver B-Zellen im Knochenmark oder der T-Zellen im Thymus durch Apoptose sein. B-Zellen verfügen daneben über das sogenannte „Rezeptor-Editing“, welches autoreaktive B-Zellen durch ein Neuarrangement des BCRs vor der Apoptose bewahren kann. Anergie ist ein Toleranzmechanismus welcher auftritt, wenn unreife B-Zellen löslichem Antigen bzw. T-Zellen Antigen in Abwesenheit kostimulatorischer Signale begegnen, diese Zellen gehen in einen inaktiven Zustand über (aus Janeway et al. 2001). Die Mechanismen der Toleranzerhaltung im Knochenmark und im Thymus sind mittlerweile recht gut bekannt. Da Lymphozyten aber auch in der Peripherie proliferieren und B-Zellen in

Keimzentrumsreaktionen die Spezifität der BCR verändern, sind hier weitere Toleranzmechanismen erforderlich. Diese sind allerdings bisher nicht hinreichend verstanden. Autoimmunerkrankungen könnten auf Fehler in diesen Mechanismen der peripheren Toleranzinduktion zurückzuführen sein.

## 1.5 Systemischer Lupus erythematoses

Beim SLE handelt es sich um eine immungenetisch geprägte, chronisch verlaufende Autoimmunerkrankung. Die klinischen Symptome beinhalten u.a. Arthritis, Dermatitis, Nephritis, Karditis, polymorphe Exantheme oder Pleuritis und variieren in ihrem Schweregrad von Fall zu Fall (Mills 1994).

Der Nachweis von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene (ANA) und doppelsträngige DNA (dsDNA) gilt als diagnostisch wegweisend und Immunkomplexe, die solche Autoantikörper enthalten, lagern sich im Bindegewebe von Haut und Gefäßen verschiedener Organe ab mit konsekutiver Arteriitis oder Arteriolitis. Charakteristisch für den SLE ist das Vorkommen zum einen hochtitriger antinukleärer Antikörper (ANA) der IgG-Klasse sowie zum anderen Antikörper gegen zytoplasmatische Antigene, Serumkomponenten oder Blutzellen. Unter ANA werden nicht nur die für den SLE pathognomischen anti-dsDNA-Antikörper, sondern auch Autoantikörper gegen Einzelstrang-DNA (ssDNA), Histone (H1-H4) und Non-Histon-Proteine (Sm, snRNP, SS-A/Ro, SS-B/La u.a.) zusammengefasst. Der SLE wird daher als Autoimmun- und Immunkomplexerkrankung bezeichnet (Tan et al. 1982).

Die Inzidenz in der kaukasischen Allgemeinbevölkerung liegt bei 6-7 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr. Im Erwachsenenalter sind Frauen 10-13 mal häufiger betroffen als Männer (Mills 1994).

Diverse Studien zeigen, das SLE eine komplexe genetische Erkrankung ist, bei welcher multiple Gene und verschiedene Umwelteinflüsse den klinischen Phänotyp beeinflussen (**Abb. 4**).

1. Etwa 80% aller SLE-Erkrankungen betreffen Frauen im gebärfähigen Alter (Uramoto et al. 1999). Dies lässt vermuten, dass Gene, welche die Östrogenhydroxylierung regeln, bzw. das Geschlechtshormone an sich eine Rolle bei der SLE-Penetranz spielen könnten (Lahita et al. 1999, Grimaldi et al. 2005).

2. Ethnische Faktoren scheinen ebenfalls eine bedeutsame prädisponierende Rolle zu spielen. Die SLE-Prävalenz liegt unter weißen Frauen im Alter von 15-64 Jahren bei 1 in 700 und unter schwarzen Frauen bei 1 in 245. Familienangehörige ersten und

zweiten Grades von SLE-Patienten zeigen eine stark erhöhte SLE-Prävalenz (1 in 20 bis 1 in 300) (Mills 1994).

3. Es ist lange bekannt, dass UV-Licht die Ausprägung des diskoiden Lupus erythematodes der Haut provoziert und auch bei ca. 20% der SLE-Patienten systemische Krankheitsexerbationen verursachen kann. (Golan et al. 1994).

4. Eine Reihe von Medikamenten (z.B. Procainamid, Chlorpromazid, u.a.) sind für ihre SLE induzierende Fähigkeit bekannt (Skaer 1992, Mills 1994).

5. Für Viren wie zum Beispiel Cytomegalie-Virus (CMV), Epstein-Barr- (EBV) und Parvovirus B19 wird diskutiert, ob sie eine Rolle als fördernde Faktoren für die Entstehung eines SLE spielen (Zandman-Goddard und Shoenfeld 2003).

6. Die Erkrankung des SLE ist mit verschiedenen genetischen Besonderheiten assoziiert (z.B. Komplementdefizienz, Fc gamma III, MHC, Gene des HLA Klasse II DRB und DQB) (Arnett und Reveille 1992, Hartung et al. 1992, Goerg 2002). Die genetische Defekte der Komplementkomponenten C1q, C4 und C2 werden gehäuft bei SLE-Patienten gefunden. Für C4 besteht ein erheblicher Polymorphismus, der prinzipiell für die Pathogenese des SLE bedeutsam sein könnte (Schur 1986 und 1995, Manderson et al. 2004).

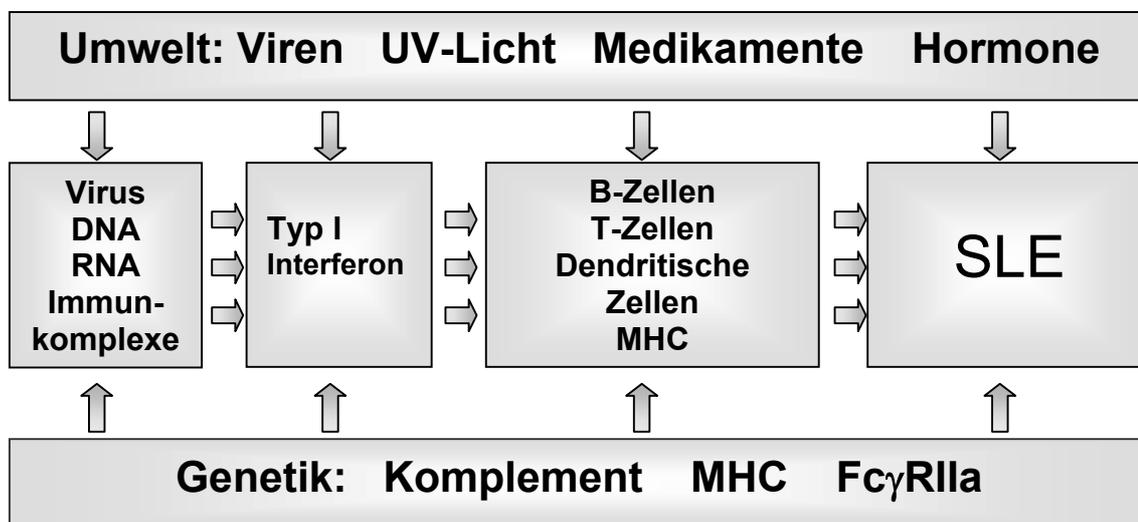


Abb.4: Schema einiger beeinflussender Faktoren beim Entstehen des SLE

## 1.6 Systemischer Lupus erythematodes und Komplement

Ein Zusammenhang zwischen SLE und dem Komplementsystem wurde erstmals identifiziert, als Untersuchungen erniedrigte Komplementspiegel bei SLE-Patienten nachwiesen.

Einerseits kommt es durch die Bildung der Immunkomplexen zum Verbrauch von Komplementkomponenten, andererseits wird auf genetischer Ebene eine Assoziation des SLE zu Defekten von frühen Komponenten des klassischen Komplementaktivierungsweges (Komplement C1, C4, C2) gesehen und diese Defekte scheinen prädisponierend für SLE sowohl beim Menschen (Atkinson 1989) als auch in tierexperimentellen Studien zu sein (Prodeus et al. 1998). Es scheint eine Hierarchie der Defekte des klassischen Aktivierungsweges und der Assoziation im Bezug auf Anfälligkeit und Schwere der Erkrankung zu geben. Patienten mit einem Defekt des C1-Komplexes (Pickering et al. 2000, Stone et al. 2000, Dragon-Durey et al. 2001) oder C4-Proteines (Pickering et al. 2000, Rupert et al. 2002) haben die höchste Anfälligkeit (>80%) und schwersten Verläufe, bei Defekten des C2-Proteins vermindert sich die Assoziation signifikant (Pickering et al. 2000), während ein angeborener Mangel von Komplement C3 weder in Mäusen noch im Menschen mit SLE assoziiert ist (Einav et al. 2002). Bei SLE-Patienten mit einer Komplementdefizienz (C1 oder C4) ist das Verhältnis zwischen Männern und Frauen ausgeglichen (1:1), dies zeigt deutlich die Bedeutung des Komplementdefektes, welcher das geschlechtsbezogene Ungleichgewicht dieser Erkrankung ausgleicht (Pickering et al. 2000, Manderson et al. 2004).

Neben der kompletten Defizienz ist beim Menschen auch ein partieller C4 Mangel bekannt. Im menschlichen Serum findet sich das C4 Protein in zwei Isoformen, kodiert durch zwei einzelne Gene C4A und C4B, lokalisiert hintereinander in der MHC Klasse III Region. Beide Gene sind hochgradig polymorph. Verschiedene unabhängige Studien an unterschiedlichen ethnischen Gruppen haben einen Zusammenhang zwischen Null-Allelen im C4A Gen und SLE gefunden (Pickering et al. 2000, Goerg 2002).

Die Kolokalisation der MHC Gene zu denen der Komplementfaktoren C4 und C2 auf dem Chromosom 6 (Maus Chromosom 17) lassen die Frage offen, ob besondere MHC Gene oder Defekte von C4 und C2 maßgeblicher an der Entstehung des Lupus beteiligt sind. Defekte des Komplementfaktors C1q führen allerdings noch häufiger und oft zu schwereren Erkrankungen des SLE als Defekte der späteren Komplementkomponenten. Da das C1q Gen auf dem Chromosom 1 (Maus

Chromosom 4) kodiert wird, ist hier keine Beeinträchtigung der MHC Gene möglich und somit sind eindeutig Komplementdefekte an der Entstehung des SLE beteiligt (Campell et al. 1986, Schur 1986).

Weitere Beobachtungen zeigten in zwei unabhängigen Toleranzmodellen, dass sowohl der Mangel an C4 als auch die Defizienz der Komplementrezeptoren CD21/CD35 die Entwicklung von Autoimmunphänomenen begünstigten (Prodeus et al. 1998). Dies lässt den Schluss zu, dass die Assoziation von Komplement C4-Mangel und erhöhter Autoantikörperproduktion auf eine gestörte Kostimulation der Komplementrezeptoren CD21/CD35 auf B-Zellen bzw. auf follikulär dendritischen Zellen beruht. Im Gegensatz allerdings zu C1q-defizienten oder C4-defizienten Mäusen entwickeln CD21/CD35 defiziente Mäuse praktisch keine spontane Autoimmunerkrankung (Chen et al. 2000). Daher scheint die Induktion von SLE am ehesten durch den Mangel der frühen Komplementkomponenten C1q oder C4 beeinflusst und unabhängig von Komplement C3 oder den Komplementrezeptoren CD21/CD35 zu sein. Als alternative Erklärung wurde daher die Beobachtung herangezogen, dass intraperitoneal (i.p) applizierte apoptotische Körperchen als Quelle für Lupus typische Autoantigene weniger gut phagozytiert werden können, wenn C1q (Botto et al. 1998) oder C4 (Taylor et al. 2000) fehlt. Da die komplementvermittelte Phagozytose jedoch zumindest teilweise auch C3b benötigt, der Mangel an C3 allerdings nicht mit einem SLE assoziiert ist, scheinen beide Modelle nicht hinreichend, die Assoziation von Komplementmangel und SLE zu erklären.

## 1.7 Interferon alpha

Interferon wurde erstmals indirekt von Hoskins (1935) als eine Substanz, welche nach einer Virusinfektion vor einer weiteren viralen Infektion schützt, beschrieben. Isaacs und Lindenmann (1957) charakterisieren erstmals ein Protein, welches zwischen Zellen nach einem Virusinfekt „interferiert“ und prägten somit den Namen Interferone (Isaacs und Lindenmann 1957).

Mittlerweile weiß man, dass es sich beim Interferon nicht um ein einzelnes Protein, sondern um eine Proteinfamilie, unterteilt in Typ I und Typ II Interferone handelt. Interferon  $\gamma$  ist das einzig bekannte Typ II Interferon, im Gegensatz dazu stehen die Typ I Interferone. Diese sind eine Familie eng verwandter Proteine, kodiert auf dem kurzen Arm des Chromosom 9 (Maus Chromosom 4). Dort finden sich mindestens 13

Interferon  $\alpha$  Gene, ebenso wie Interferon  $\beta$ , Interferon  $\kappa$ , Interferon  $\omega$  und Interferon  $\tau$  (Ivashkiv 2003).

Zunächst wurde IFN  $\alpha$  als ein Protein beschrieben, welches von Fibroblasten sezerniert wird und eine parakrine Resistenz gegen Virusinfektionen induziert. Die IFN  $\alpha$  Induktion findet nicht ausschließlich viral statt, denn die Stimulation der Zellen durch Endotoxin, dsRNA, poly (I:C) oder CpG-DNA kann ebenfalls eine IFN  $\alpha$  Produktion zur Folge haben (Havell und Spitalny 1983, Korngold et al. 1983, Ishikawa und Biron 1993, Sun et al. 1998).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass nicht allein die Fibroblasten in der Lage sind IFN  $\alpha$  zu produzieren, sondern auch Makrophagen und dendritische Zellen (welche beim Menschen hauptsächlich vom Typ der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) sind) (Havell und Spitalny 1983, Ishikawa und Biron 1993, Sun et al. 1998, Siegal et al. 1999). Zur Produktion von Typ I IFN kommt es als Antwort auf Aktivierung der TLR 3, 4, 7 und 9 (Ito et al. 2002, Hertzog et al. 2003).

Die Funktionen des IFN  $\alpha$  sind vielfältig und umfassen neben der antiviralen Abwehr auch die Induktion weiterer Zytokine und Rezeptoren (Sen und Lengyel 1992). Zudem wird dem Interferon eine Rolle in der Unterstützung der angeborenen und adaptiven Immunabwehr zugeschrieben, so ist IFN  $\alpha$  z.B. in der Lage den Immunglobulin-klassenwechsel zu fördern (Le Bon et al. 2001) oder die Leukozytenlokalisierung (Reduktion in der roten Pulpa, Ausweitung der weißen Pulpa) in der Milz zu beeinflussen (Ishikawa und Biron 1993).

IFN  $\alpha$  stellt daher neben seiner antiviralen Funktion einen Verknüpfungspunkt zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr dar.

## **1.8 Interferon alpha und Systemischer Lupus erythematodes**

Mehrere frühe Studien weisen darauf hin, dass IFN  $\alpha$  eine Rolle bei der Erkrankung SLE spielt. Sie zeigten in unterschiedlichen Untersuchungen erhöhte IFN  $\alpha$  Serumwerte bei SLE-Patienten (Hooks et al. 1979, Ytterberg und Schnitzer 1982, Preble et al. 1982, Strannegard et al. 1982). Die erhöhten IFN  $\alpha$  Werte korrelieren zum einen mit der Krankheitsaktivität und –schwere, zum anderen scheint ein Zusammenhang zwischen erhöhten IFN  $\alpha$  Werten, Fieber und Hautausschlägen zu bestehen (Bengtsson et al. 2000).

Einige Symptome und Zeichen bei einer SLE Erkrankung ähneln denen während einer Influenza oder IFN  $\alpha$  Therapie. So treten zum Beispiel Fieber, Müdigkeit, Myalgien, Arthralgien und Leukopenien gehäuft auf (Rönblom et al. 2003).

Bei SLE-Patienten die keine erhöhten IFN  $\alpha$ -Werte aufwiesen, konnte bereits 1989 ein interferoninduziertes Protein (MxA Protein) nachgewiesen werden (von Wussow et al. 1989).

In der jüngeren Vergangenheit konnte bei der Erstellung von genetischen Expressionsprofilen an peripheren mononukleären Blutzellen von SLE-Patienten gezeigt werden, dass bei ca. der Hälfte aller SLE-Patienten eine Aktivierung Interferon regulierter Gene nachweisbar ist (Crow et al. 2003, Han et al. 2003). Darüber hinaus scheinen diese Veränderungen mit der Krankheitsintensität und der Organmanifestation zu korrelieren (Baechler et al. 2003, Bennett et al. 2003).

Als wichtige Quelle endogenen IFN  $\alpha$  kommen dendritische Zellen (DC) in Frage, die im Menschen hauptsächlich vom Typ der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) sind (Siegal et al. 1999), während es in der Maus offenbar sowohl pDCs als auch dendritische Zellen des myelozytären Typs (mDCs) sein können (Eloranta und Alm 1999). Letztere sind unter anderem lokalisiert in der marginalen Zone lymphatischer Organe.

Diese dendritischen Zellen werden auch als natürliche Interferon-produzierende Zellen (NIPC) bezeichnet. Untersuchungen zur Anzahl und Funktion von NIPC im Blut zeigen, dass bei an SLE erkrankten Personen 70 mal weniger zirkulierende NIPC/pDC im Blut zu finden sind (Cederblad et al. 1998). Diese verminderte Anzahl von zirkulierenden NIPC/pDC lässt vermuten, dass die Zellen sich in Geweben aufhalten und deshalb aus der Zirkulation verschwunden sind. Dies konnte bei Untersuchungen von Patienten mit diskoiden Lupus bestätigt werden, wo Interferon-produzierende Zellen bzw. Zellen mit dem NIPC/pDC Phänotyp vermehrt in Hautbiopsaten gefunden wurden (Farkas et al. 2001, Blomberg et al. 2001, Blanco et al. 2001).

Der wahrscheinlich wichtigste Wirkungsort von NIPC/pDC scheint in den lymphoiden Geweben zu liegen, da Interferon-produzierende Zellen in Lymphknoten von SLE Patienten nachgewiesen wurden (Rönblom und Alm 2002).

Im Falle einer Virusinfektion und mit dem Eindringen der Viren in die regionären Lymphknoten haben die NIPC/pDCs die Aufgabe, hohe lokale Konzentrationen von IFN  $\alpha$  zu produzieren und die Virusreplikation zu bremsen. Beim SLE hingegen wird offenbar ohne viralen Stimulus die Entwicklung autoreaktiver T- und B-Zellen durch die Anwesenheit des Interferons stimuliert (Rönblom et al. 2003).

Eine pathologische Expression von Typ I Interferonen ist nicht auf den systemischen Lupus beschränkt, sondern findet sich auch bei anderen Autoimmunerkrankungen. Bei insulinpflichtigem Diabetes mellitus wurden erhöhte IFN  $\alpha$  Serumwerte sowie die Expression von IFN  $\alpha$  in den Zellen der Langerhansschen Inseln gefunden (Chehadeh et al. 2000, Huang et al. 1995). Auch bei Psoriasis gelang der Nachweis der Expression von Interferon induzierbaren Genen und dem Protein IFN  $\alpha$  (Schmid et al. 1994).

Interessanterweise ist die Entstehung von Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen eine häufige Nebenwirkung bei mit IFN  $\alpha$  behandelten Patienten (Schilling et al. 1991, Brassard et al. 2002). Bei nicht weniger als 19% der Patienten mit einem malignen Tumor, welche eine Langzeitbehandlung mit IFN  $\alpha$  erhielten, manifestierte sich eine Autoimmunerkrankung (Rönblom et al. 1991). Bei 8% aller Patienten konnten nach Interferontherapie hochaffine Antikörper gegen dsDNA nachgewiesen werden und in 22% der Fälle fand man ANAs (Kälkner et al. 1998).

Nach Interferontherapie wurden nicht nur die Induktion von SLE, sondern auch von verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen beschrieben wie perniziöse Anämie, autoimmune Thyroiditis und Myasthenia gravis, autoimmune Hepatitis, insulinpflichtiger Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, Polymyositis, Vaskulitis (Ioannou und Isenberg 2000, Raanani und Ben-Bassat 2002), ohne das es bislang einen ausreichenden Erklärungsansatz für diese Phänomene gibt. Die Gründe für dieses weite Spektrum an Autoimmunerkrankungen sind nicht bekannt.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich bei Anwesenheit von Autoantikörpern vor einer IFN  $\alpha$ -Therapie das Risiko der Entstehung einer manifesten Autoimmunerkrankung deutlich erhöht. So entwickelten ca. 68% der Patienten welche vor Therapiebeginn Thyroidea-Autoantikörper hatten als Folge einer Interferontherapie eine autoimmune Thyroiditis (Rönblom et al. 1991).

Folglich beeinträchtigt eine Typ I IFN-Behandlung die Toleranzerhaltung und initiiert zum einen eine *de novo* autoimmune Reaktion, zum anderen verstärkt sie ebenso einen schon existierenden, aber klinisch bis dahin unauffälligen autoimmunen Prozess und führt zu einer klinisch offenkundigen Erkrankung (Rönblom et al. 2003).

Eine weitere interessante Beobachtung ist, dass SLE-Patienten teilweise zusätzliche Autoantikörper gegen Komplementkomponenten und Interferon selbst entwickeln (Panem et al. 1982 und 1984, Goerg et al. 1993, Hogarth et al. 1996, Siegert et al. 1991). Frühe Untersuchungen bei einer Patientin mit SLE zeigten präformierte,

natürliche, zirkulierende Antikörpern gegen IFN  $\alpha$ , diese Patientin war nie mit Interferon behandelt worden (Mogensen et al. 1981).

Eine enge Verknüpfung von IFN  $\alpha$  mit dem Krankheitsverlauf des SLE ist offensichtlich, auch wenn die exakten Mechanismen noch ungeklärt sind.

## 1.9 Hypothese und Arbeitsprogramm

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen eine wichtige Rolle von Komplement C4 und seinen besonderen Einfluss auf den Transport und die „Clearance“ von IgM-Immunkomplexen. Die Deposition dieser Immunkomplexe an der marginalen Zone und die damit zusammenhängende gesteigerte humorale Immunantwort wurden in früheren Experimenten der Arbeitsgruppe bereits untersucht (Zachrau et al., 2004).

Zunächst sollen bei unbehandelten Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäusen die Zytokine IFN  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  und IL-12 gemessen werden. Die Zytokine IFN  $\gamma$  und IL-12 werden, neben anderen, ebenfalls im Zusammenhang mit SLE als auffällig beschrieben (Hooks et al. 1979, Ytterberg und Schnitzer 1982, Al-Janadi et al. 1993, Tokano et al. 1999, Ivashkiv 2003) und deshalb mit in diese Untersuchung einbezogen.

Der Proteinnachweis soll mit ELISA und auf mRNA-Ebene mittels Real-time RT-PCR erbracht werden. Hierzu werden drei PCR für die Zytokine IFN  $\alpha$  und zum Vergleich IFN  $\gamma$  und IL-12 etabliert.

Mit immunhistochemischen Färbungen von Gefrierschnitten der Milz soll versucht werden die interferonproduzierenden Zellen zu identifiziert und zu lokalisiert.

Zudem wird ein neues IgM-Immunkomplexmodell (IgM-IC) etabliert, welches als autoreaktive Komponente endogene DNA enthält. Dieses Immunkomplexmodell wird in erster Linie gewählt, um den Einfluss des Lupus-relevanten Antigens dsDNA untersuchen zu können. Die Verteilung und Anlagerung der IgM-IC in den Organen soll mittels radioaktiv markierter Antikörper gezeigt und ggf. in immunhistochemischen Färbungen der Milz spezifiziert werden.

Um den zugrundeliegenden Mechanismus der gesteigerten humoralen Immunantwort besser verstehen zu können, sollen mit Hilfe von ELISA und den Real-time RT-PCR für murines IFN  $\alpha$ , IFN  $\gamma$  und IL-12 die Auswirkung der Immunkomplexablagerungen auf die Zytokinproduktion untersucht werden. Sollte es durch Deposition von IgM-IC an die marginale Zone (Zachrau et al. 2004) zur Induktion von IFN  $\alpha$  kommen, könnte dieses als Verstärker bei der Immunantwort dienen und somit einen Erklärungsansatz geben (Le Bon et al. 2001).

Die marginale Zone wird aufgrund ihrer Funktion als Filter für (IgM-) Immunkomplexe (Youd et al. 2002, Zachrau et al. 2004), und als Ort residierender IFN  $\alpha$  produzierender Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen) hierbei im Fokus der Betrachtungen stehen (Eloranta und Alm 1999, Siegal et al. 1999). Die Folgen der IgM-IC Deposition an der marginalen Zone werden anhand der Bildung einer humoralen (autoreaktiven) Immunantwort untersucht. Schließlich soll durch Blockierung des IFN  $\alpha$  bzw. des Rezeptors gezeigt werden, dass IFN  $\alpha$  für die Entstehung von Autoantikörpern notwendig bzw. mitverantwortlich ist.

## 2 Zielsetzung

Der Systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine Autoimmunerkrankung, die mit der Bildung von Immunkomplexen und deren Ablagerung in diversen Organen einhergeht und so zu Nephritis, Dermatitis, Arthritis und anderen Erscheinungsformen führen kann. Eine genetische Assoziation wird u.a. zu den frühen Komplementkomponenten C1, C2 und C4 gesehen. Die derzeitigen Erklärungsmodelle postulieren einerseits eine reduzierte Eliminierung apoptotischer Körperchen andererseits eine ungenügende B-Zellregulation beim Mangel von C1, C4 oder C2, obwohl der Mangel der zentralen Komplementkomponente C3 offenbar nicht mit einer erhöhten Erkrankungshäufigkeit assoziiert ist. Ein bedeutender Faktor scheint das antivirale Zytokin Interferon alpha ( $IFN \alpha$ ) zu sein, da bei Patienten mit SLE regelmäßig erhöhte  $IFN \alpha$  Spiegel oder die erhöhte Expression von Interferon induzierten Genen beobachtet wird und die Applikation von  $IFN \alpha$  zu therapeutischen Zwecken gelegentlich die Induktion von SLE typischen Autoantikörpern als Nebenwirkung aufweist. Die beschriebenen Phänomene sind derzeit nicht vollständig verstanden und bislang gibt es keine einheitliche Theorie, die beide Phänomene für die Ätiopathogenese des SLE berücksichtigt.

Ausgehend von der Beobachtung, dass es im Mausmodell insbesondere bei C4-Mangel, zu einer Ablagerung von IgM-Immunkomplexen in der immunkompetenten marginalen Zone der Milz kommt und dadurch eine erhöhte Antikörperproduktion induzierbar ist, andererseits die Makrophagen der marginalen Zone der Milz als Quelle für  $IFN \alpha$  in Frage kommen, soll die folgende Hypothese überprüft werden:

Beim Mangel der Komplementkomponente C4 kommt es im Mausmodell zu einer ungenügenden Eliminierung endogener DNA, die durch natürliche Antikörper vom Typ IgM gebunden werden. Die Ablagerung der DNA-Immunkomplexe steigert die Produktion von  $IFN \alpha$  in der marginalen Zone der Milz. Diese  $IFN \alpha$  Sekretion unterstützt die humorale Immunreaktion gegen die im Immunkomplex gebundenen Antigene und führt somit zu Bildung von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene.

Diese Hypothese soll überprüft werden, durch die Bestimmung endogener DNA im Serum von C4 defizienten Mäusen und durch die Applikation von monoklonalen IgM-Antikörpern gegen dsDNA. Anschließend soll die Verteilung und Ablagerung neuformierter Immunkomplexe analysiert und diverse Zytokine in der marginalen Zone nach IgM-Applikation mittels Real-time RT-PCR bestimmt. Die Bedeutung der IgM-DNA-Immunkomplexe für die Induktion von IgG-Autoantikörpern soll schließlich mit Hilfe von Autoantikörperbestimmungen nachgewiesen werden. Falls die Ergebnisse

einen Effekt der IgM-Immunkomplexe auf die Induktion von IFN  $\alpha$  und von IgG-Autoantikörpern zeigen, soll durch Blockierung des IFN  $\alpha$ -Systems der Zusammenhang zwischen Immunkomplexbildung und Autoantikörpern bestätigt werden.

Lässt sich beweisen, dass IFN  $\alpha$  eine zentrale Rolle in der Entstehung von SLE spielt, bietet dies neue Optionen für die Therapie des Systemischen Lupus erythematoses.

## 3 Material

### 3.1 Mäuse

Verwendet wurden Wildtyp (wt) und C4 defiziente (C4<sup>-/-</sup>) Mäuse vom Stamm C57BL/6 (*Charles River Laboratories, Wilmington/USA*). Der genetische Hintergrund der C4<sup>-/-</sup> Mäuse ist die Kreuzung der Stämme C57BL/6. Der genetische Hintergrund der verwendeten Interferon-Rezeptor defizienten (IFNR<sup>-/-</sup>) Mäusen, welcher uns freundlicherweise vom DKFZ Heidelberg überlassen wurden, ist der Stamm C57BL/6. Die Tierversuchsanträge für dieses Projekt gemäss Antrag mit der Nummer 29/b/99 vom 28.08.1998 wurde durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein bis zum 31.12.2000 bewilligt und bis zum 31.03.2004 verlängert, der Antrag mit der Kennzeichnung 29/c/04 wurde durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein bis zum 31.03.2006 bewilligt. Die Einwilligung der Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck liegt ebenfalls vor.

### 3.2 Geräte

- ABI Prism 7700 (*Applied Biosystem, Weiterstadt*)
- Analysenwaage LC 6200S (*Sartorius, Göttingen*)
- Anthos ELISA-Reader 2001 (*Anthos Labtec instruments, Wals/Österreich*)
- Bohrloch Gamma Counter Multi-Logger LB 5310 (*Berthold, Bad Wildbad*)
- Brutschrank (Water Jacketed Incubator) (*Labotect Labortechnik, Göttingen*)
- Columbus ELISA-Washer (*Tecan, Maennedorf/Schweiz*)
- Coulter Counter T-660 (*Beckman Coulter, Krefeld*)
- Diaplan Lichtmikroskop (*Leitz, Stuttgart*)
- Digitalkamera Canon EOS 10D (*Canon Inc., Tokyo/Japan*)
- Digitalkamera Leica DC350F (*Leica, Bensheim*)
- Durchflusszytometer Epics<sup>®</sup> XL-MCL (*Beckman Coulter, Krefeld*)
- Elektrophoresesystem Pharmacia LKB GB 200/400 (*Pharmacia, USA*)
- Färbekammer Magic Immuno Staining Tray; Cell path plc (*Hemel, Hempstead/USA*)
- Fluoreszenzmikroskop DMLM DC350F (*Leica, Bensheim*)
- Gefriermikrotom Kryostat CM 1850 (*Leica, Bensheim*)

- Gefriertruhe, -80°C (*Nuaire, Plymouth, USA*)
- Gene Amp PCR System 2400 (*Perkin Elmer, Wellesley, USA*)
- High Performance OCD Imaging System (*Appligene, Illkrich, Frankreich*)
- Infrarotlicht 100 W (*Philips, Hamburg*)
- Laborwaage 12116 MP (*Sartorius, Göttingen*)
- Magnetic cell separator MACS (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*)
- Magnetrührer (*Heidolph, Kelheim*)
- Multiphor II® Elektrophorese-Einheiten (*Pharmacia, Freiburg*)
- pH- Meter pHM 83 Autocal (*Radiometer, Kopenhagen/Dänemark*)
- Pipette Combi- Pipette Typ 3180L (*Eppendorf, Hamburg*)
- Pipetten Vario- Mikroliterpipetten 0.5-10µl, 10-100µl, 200-1000µl (*Eppendorf, Hamburg*)
- Spektralphotometer Hitachi U-3000 (*Hitachi, Tokyo/Japan*)
- Sterile Werkbank II AI B3; (*Nuaire Plymouth, USA*)
- Szintigraphie Dreikopfkamera PRISM 3000XP (*Picker*)
- Thermomixer 5436 (*Eppendorf, Hamburg*)
- Trockenschrank (*Heraeus Christ GmbH, Osterode*)
- UV-Tisch N9 (Benz, Wiesloch)
- Vakuumtransfersystem (Dot Blotter SRC 96D Minifold I, *Schleicher & Schuell, Dassel*)
- Wasserbad (*GFL Labortechnik, Burgwedel*)
- Zentrifuge Kühlzentrifuge 2K15 (*Sigma, Deisenhofen*)
- Zentrifuge Minifuge 5414 C (*Eppendorf, Hamburg*)
- Zentrifuge Omnifuge 2.0 RS (*Heraeus Christ GmbH, Osterode*)

### 3.3 Laborbedarf

- Dialyseschlauch Dialysis Tubing Cellulose Membrane, 25x16 mm (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Einmalkanülen BD Microlance™ 3, steril, 0.45 x 13 mm (*Becton Dickinson GmbH, Heidelberg*)
- Einmal- Feindosierungsspritze, steril, 1 ml (*B. Braun Melsungen AG, Melsungen*)
- Einmalspritzen, steril, 2 ml, 5 ml, 10 ml (*Becton Dickinson, Heidelberg*)

- ExcelGel® SDS Homogenous 7,5% bzw. 12,5% Gele (*Amersham Biosciences, Freiburg*)
- Flachboden-Mikrotiterplatten Costar (*Corning Incorp. New York/USA*)
- IODO-Gen® Precoated Iodination Tubes (*Pierce, Rockford/USA*)
- HiTrap™ IgM Purification Column (*Amersham Biosciences, Freiburg*)
- Nitrozellulose-Membran (*Bio-Rad, München*)
- Nylon-Zellsieb (*BD Biosciences, Bedford/USA*)
- Tissue-Tek Cryomold® Größen Biopsy, Intermediate, Standard (*Sakura Finetechnical Co. Ltd., Tokyo, Japan*)
- Kunststoffröhrchen, steril, mit Schraubverschluß, 15 ml, 50 ml (*Greiner, Nürtingen*)
- Liquid Blocker Pap-Pen (*Cederland, Canada*)
- Latex- Einmalhandschuhe (*Ansell, München*)
- Microcon- 10, 30-, 100- Filter (*Millipore GmbH, Schwalbach*)
- Nunc® Stericup Filtrationssysteme (*Millipore GmbH, Schwalbach*)
- Objektträger Super Frost (*Menzel Gläser, Braunschweig*)
- PD-10 Säule von Sephadex (*Amersham Pharmacia, Buckinghamshire/UK*).
- Pipettenspitzen, 1-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl (*Greiner, Nürtingen*)
- Pipettenspitzen, Combitips, steril, 0.5 ml, 1.25 ml, 2.5 ml, 5 ml, 12.5 ml (*Eppendorf, Hamburg*)
- Reagenzröhrchen (*Sarstedt, Nürmbrecht*)
- Reaktionsgefäße 1.5 ml (*Sarstedt, Nürmbrecht*)
- Reaktionsgefäße 1.5 ml, mit Schraubdeckel (*Sarstedt, Nürmbrecht*)
- Separationssäulen Größe MS (*Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach*)
- Stabpipetten, steril, 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml (*Greiner, Nürtingen*)
- Zellkulturflaschen, 20 ml, 50 ml, 800 ml (*Nunc, Roskilde/Dänemark*)
- Zellsieb 4 µm (*BD Falcon, Heidelberg*)

### 3.4 Zellkulturmedien und -zusätze

- bovines Serumalbumin (BSA) (*Fluka Biochemika, Neu Ulm*)
- Fetales Kälberserum (FCS), Mycoplex (*PAA Laboratories Inc., Österreich*)
- Kulturmedium RPMI 1640 (*BioWhittacker, Heidelberg*)
- L- Glutamin (*BioWhittacker, Heidelberg*)

- 2-Mercaptoethanol (*Merck, Darmstadt*)
- Natrium-Pyruvat (*BioWhittacker, Heidelberg*)
- Penicillin 10000 E/ml, Streptomycin 10000µg/ml (*BioWhittacker, Heidelberg*)

### 3.5 Chemikalien und Reagenzien

- Aceton (*Merck, Darmstadt*)
- Agarose NA (*Amersham Biosciences, Uppsala/Schweden*)
- Ammoniumchlorid (*Merck, Darmstadt*)
- Boehringer Blockreagent (*Boehringer, Mannheim*)
- Biotinamidocaproate N-Hydroxysuccinimide Ester (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Borsäure (*Merck, Darmstadt*)
- 123 bp-DNA-Leiter GIBCOBRL (*Invitrogen, Karlsruhe*)
- Bromphenolblau (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Carbonat-Bicarbonat Kapseln (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Coomassie Brilliant Blue G (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Crystal/Mount (*Biomedica Corp. USA*)
- Di-ethylpyrocarbonat (DEPC) (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Dinatriumhydrogenphosphat (*Merck, Darmstadt*)
- Dinatriumtetraborat-Decahydrat (*Merck, Darmstadt*)
- Glycin (*Merck, Darmstadt*)
- humanes Albumin (*DRK Blutspendedienst, Springe*)
- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) (*Cambrex Bioscience Verviers; Verviers, Belgien*)
- Ethylenediamintetraactic acid (EDTA) (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Essigsäure (*Merck, Darmstadt*)
- Ethanol (*Merck, Darmstadt*)
- Ethidiumbromid (*Appligene, Heidelberg*)
- Fast Blue BB Base (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Ficoll Typ 400 (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Isopropanol (*Merck, Darmstadt*)
- Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte (*Leica instruments, Nussloch*)
- konzentrierte Salzsäure (*Merck, Darmstadt*)
- Levamisole (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

- Magnesiumchlorid (*Merck, Darmstadt*)
- Methylenblau (*Merck, Darmstadt*)
- Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromide (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Naphthol AS-MX Phosphate (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Natriumazid (*Merck, Darmstadt*)
- Natriumdihydrogenphosphat (*Merck, Darmstadt*)
- Natriumcitrat 4%(ACDA) (*Baxter, München*)
- <sup>123</sup>I-Natrium-Jodid (*J<sup>123</sup>*) (*MDS Nordion, Ottawa/Kanada*)
- Natriumnitrat (*Merck, Darmstadt*)
- N,N-Dimethylformamide (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Paraformaldehyd (*Merck, Darmstadt*)
- Poly-L-Lysin (*Sigma, Taufkirchen*)
- 2-Propanol (*Merck, Darmstadt*)
- Protein-G-Agarose (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*)
- Saponin (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- TNP-(AECM)-Ficoll (*Biosearch Technologies, USA*)
- Tris (hydroxymethyl)-aminomethan (*Merck, Darmstadt*)
- Tween 20 (*Merck, Darmstadt*)
- Wasserstoffperoxid (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Xylene Cyanol (*BioRad, Hercules/USA*)

### 3.6 Antikörper

Alle nicht anderweitig gekennzeichneten Antikörper stammen von der Firma Pharmingen, San Diego/USA.

#### Unkonjugiert:

- Ratte anti-Maus IgG2b CD 16/32. (Fc-Block) [Klon2.4G2]
- Ratte anti-Maus MOMA-1 (*ImmunoKontakt AMS Biotechnology GmbH, Wiesbaden*)

#### Markierung mit Peroxidase:

- Anti-Fluorescein (*Roche Diagnostics GmbH, Mannheim*)
- Avidin (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- PNA (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

Markierung mit alkalischer Phosphatase:

- Anti-Maus IgM [polyklonal] (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Avidin (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Ratte anti-Maus IgG1 [Klon X56]
- Ratte anti-Maus IgG2a [Klon R19-15]
- Ratte anti-Maus IgG2b [Klon R12-3]
- Ratte anti-Maus IgG3 [Klon R40-82]

Markierung mit Biotin:

- Hamster anti-Maus IgG1 CD11c [Klon HL3 ]
- Maus anti-Ratte IgG1/2a [Klon G28-5]
- Ratte anti-Maus C3 [Klon RmC11H9] (*Connex, Martinsried*)
- Ratte anti-Maus IgG2b CD11b [Klon M1/70]
- Ratte anti-Maus IgM ERTR-9 [Klon SIGNR1] (*BMA Biomedicals AG, Augst/Schweiz*)
- Ratte anti-Maus TNP [Klon A111-3]

Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC):

- Hamster anti-Maus CD3 [Klon 145-2C11]
- Hamster anti-Maus IgG1 CD11c [Klon HL3 ]
- PNA (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Ratte anti-Maus CD11b [Klon M1/70]
- Ratte anti-Maus CD21/CD35 [Klon 7G6]
- Ratte anti-Maus CD45R/B220 [Klon RA3-6B2]
- Ratte anti-Maus IgG (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Ratte anti-Maus MOMA-1 (*ImmunoKontakt AMS Biotechnology GmbH, Wiesbaden*)

Markierung mit Phycoerythrin (PE):

- Avidin *Sigma-Aldrich, Steinheim*

Markierung mit magnetischen Beads:

- B220-Beads (*Miltenyi Biotec, Weilheim*)
- CD11b-Beads (*Miltenyi Biotec, Weilheim*)
- CD90.2 (Thy1.2)-Beads (*Miltenyi Biotec, Weilheim*)

### 3.7 Seren

- Anti-dsDNA-Antikörper positives Mausserum (*Alpha Diagnostic, San Antonio/USA*)
- Normal Mouse Serum (*DakoCytomation, Glostrup/Dänemark*)
- Normal Rat Serum (*DakoCytomation, Glostrup/Dänemark*)

### 3.8 Primer und Sonden

- Primersequenzierung (TIB Molbiol, Berlin):

Sequenz IFN $\alpha$ Forward-Primer	5' CCT gAg AgA gAA gAA ACA CAg C
Sequenz IFN $\alpha$ Reverse-Primer I	5' CAA gTT ggC TgA ggA AgA SA
Sequenz IFN $\alpha$ Reverse-Primer II	5' Cag CAA gTT AAC TgA ggA AgA CA

Sequenz IFRG28 Forward-Primer	5' TgC ATC TTT ggg TgA gAA ggT
Sequenz IFRG28 Reverse-Primer	5' ÀCT gCA TgC CTC ACA ATT gC

Sequenz Neo oIMR0013	5'- CTT ggg Tgg AgA ggC TAT TC
Sequenz Neo oIMR0014	5'- Agg TgA gAT gAC Agg AgA TC
Sequenz C4 oIMR1265	5'- ATA ACC Tgg gTC ggA CTT Tgg
Sequenz C4 oIMR1266	5'- TCT TCC gAA ACT gCT ggA TCC

Sequenz IFNR Forward-Primer	5'-AgA AAA gAC gAg gCg AAg Tg
Sequenz IFNR Reverse-Primer I	5'- gTT CCC TTC CTC TgC TCT g
Sequenz IFNR Reverse-Primer II	5'- CCA AgC gAA ACA TCg CAT Cg

- Sondensequenzierung von ABI (Applied Biosystems, Weiterstadt):

Sequenz IFN $\alpha$	5' FAM-CTg TgC CTg ggA ggT ggT CAg AgC-TAMRA
Sequenz IFRG28	5' FAM- Tgg ATg ggC CCC ACg ACA CA-TAMRA

- Gebrauchsfertige Sonden/Primer-Kits von ABI (Applied Biosystems, Weiterstadt):

Rodent GAPDH Control VIC Probe  
 PDAR-Assay Kit Murine IL-12p40  
 PDAR-Assay Kit Murine Interferon gamma

### 3.9 Lösungen und Kits (gebrauchsfertig)

- AmpliTaq Gold™ Polymerase (250U, 5U/μl) (*Applied Biosystems, Weiterstadt*)
- BioWhittaker™ Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 0,0095 M (*Cambrex, Verviers/Belgien*)
- Deoxynucleotide Triphosphat 10μmol (dTTP, dGTP, dCTP, dATP) (*Roche, Indianapolis/USA*)
- DNA-free-Kit (*Ambion, Austin/USA*)
- DNeasy DNA-Tissue-Isolations Kit (*Qiagen GmbH, Hilden*)
- Hanks Buffered Salts (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- In situ cell Death Detection Kit (*Roche, Indianapolis/USA*)
- Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077 (*PAA Laboratories GmbH, Pasching/Austria*)
- MgCl<sub>2</sub> 25 mM (*Promega GmbH, Mannheim*)
- Murine Interferon alpha ELISA Kit (*Research Diagnostics Inc. Flanders/USA*)
- One-Step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (*Applied Biosystems, Weiterstadt*)
- 10x PCR-Puffer II ohne MgCl<sub>2</sub> (*Applied Biosystems, Weiterstadt*)
- RNeasy RNA-Isolations Kit (*Qiagen GmbH, Hilden*)
- Tissue-Tek Ornithincarbamoyltransferase (Miles, Naperville/USA)

### 3.10 Substrate

- Fast Red™ TR/Naphtol AS-Mx Tabletten Set (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)
- Sigma Fast™ p-Nitrophenylphosphat Tabletten Set (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

### 3.11 Zelllinien

Die Hybridomzelllinie 111s.19 produziert ein Maus anti-Maus dsDNA-IgM, sie wurde freundlicherweise von Tony Marion (Tennessee/USA) zur Verfügung gestellt.

Die Hybridomzelllinie 4EA1 produziert ein Ratte anti-Maus Interferon alpha-IgG1 und wurde freundlicherweise von Rainer Zawatzky (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Das Zellmedium für diese beiden Zelllinien ist BioWhittaker™ RPMI 1640 und wird zusätzlich mit 10% FCS, 1% L-Glutamin und 1% Penicillin-Streptomycin (*Biochrom, Berlin*) auf 500 ml Medium versetzt.

## 4 Methoden



Lösung, Puffer



Protokoll

### 4.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

#### 4.1.1 Aufreinigung aus der Zellkultur

Die verwendeten monoklonalen Antikörper sind dsDNA-spezifische Immunglobuline der Subklasse IgM. Es wird von der Hybridomzelllinien 111s.19 produziert.

Hybridomzelllinie ist monoklonalen Ursprungs. Sie entsteht durch Fusion antigenspezifischer B-Lymphozyten mit nicht-sekretorischen Maus-Myelomzellen. Die B-Lymphozyten steuern die Fähigkeit zur Bildung spezifischer Immunglobuline, die Myelomzellen die zur Langlebigkeit der Hybridome im Kulturmedium bei. Die produzierten Antikörper werden von den Zellen in das Kulturmedium abgegeben. Zweimal die Woche werden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 10 Min.), die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen in frischem Medium aufgenommen.

### 4.2 Immunglobulin-Extraktion mittels Affinitätsaufreinigung

Die Immunglobulin-Extraktion erfolgt durch spezifisches Ausfällen der jeweiligen Immunglobulinsubklasse aus dem Kulturüberstand mittels Affinitätspurifikation.

**IgM** Die Aufreinigung des monoklonalen IgMs erfolgte mit Hilfe der „HiTrap™ IgM Purification Column“. Die Herstellung der Lösungen und Puffer sowie die Durchführung erfolgten nach Protokoll des Herstellers.

**IgG** Die Aufreinigung des monoklonalen IgG erfolgt mit Hilfe von Protein G-Agarose- Säulen.

**Protein G-Agarose (Boehringer, Mannheim) Bindungspuffer**

1,08 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   
3,27 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   
ad 1 Liter Aqua bidest.  
pH 7,0

**Elutionspuffer**

0,75 g Glycin  
1,0 ml HCl (konz.)  
ad 100 ml Aqua bidest.  
pH 2,7

**Neutralisierungspuffer**

12,1 g Tris-Base (Tris-[hydroxymethyl]-aminomethan)  
2,0 ml HCl (konz.)  
ad 100 ml Aqua bidest.  
pH 9,0

**BioWhittaker PBS****IgG Aufreinigung aus dem Kulturüberstand**

- Säule (10 ml) präparieren mit Watte, spülen mit Bindungspuffer, 1 ml Protein G-Agarose hinzufügen
- Verdünnung des Kulturüberstandes mit dem gleichen Volumen an Bindungspuffer
- Zentrifugation bei 12000 rpm für 20 Min.
- Filtern mittels NALGENE® Disposable Filtereinheit mit einer Porengröße von 0.45µm.
- Equilibrierung der Säule durch Hinzufügen von 20 ml des Bindungspuffers
- Probe über die Säule geben
- ungebundenes Protein auswaschen durch Spülen der Säule mit 10 ml Bindungspuffer
- in Glasröhrchen je 60 µl Neutralisationspuffer vorlegen (reicht für je 1 ml an eluierter IgG-Lösung)

- Elution des gebundenen IgG durch Zugabe von 10-15 ml Elutionspuffer zur Säule
- Sammeln der ausgewaschenen Fraktionen in den vorbereiteten Glasröhrchen zu je 1 ml
- Säule in den Ausgangszustand versetzen mittels Zugabe von 10 ml Bindungspuffer, anschließend 10 ml 20% Ethanol zugeben
- Aufbewahrung der Säule, gefüllt mit 20% Ethanol zum Schutz vor Austrocknung, bei 4°C

Zum Austausch des Puffers der IgG-Lösung wird diese in einen Dialyseschlauch überführt (Dialysis Tubing Cellulose Membrane). Den Dialyseschlauch bei 4°C zwei Tage in PBS unter Rühren schwimmen lassen, täglich den Austauschpuffer wechseln. Zur weiteren Konzentration wurden Mikrokonzentratoren eingesetzt. Amicon® Mikrokonzentratoren sind größenspezifische Filter. Sie können Moleküle ab einem bestimmten Molekulargewicht (z.B. 10, 30 oder 100 kDa) zurückhalten. Die Durchführung aller Arbeitsgänge erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

Anschließend wurde der Proteingehalt sowohl quantitativ (s. 4.2), als auch qualitativ nachgewiesen (s.4.4).

### 4.3 Proteinnachweis quantitativ

#### 4.3.1 Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration mittels Spektroskopie

Durch folgende Formel ist die Proteinkonzentration in guter Näherung photometrisch bestimmbar (Johnstone und Thorpe 1996).

Proteinkonzentration (mg/ml) =  $[(1,55 \times E_{280\text{nm}}) - (0,76 \times E_{260\text{nm}})] \times \text{Verdünnungsfaktor}$

Die Extinktion (E) der verdünnten Proteinlösung ist demzufolge bei 280nm und 260nm zu messen und die Werte in die Formel einzusetzen.

### 4.3.2 Bestimmung der Immunglobulinkonzentration mittels Spektroskopie

Die jeweilige Immunglobulinkonzentration ist durch folgende Formel photometrisch in guter Näherung bestimmbar (Johnstone und Thorpe 1996).

$$\text{Ig-Konzentration (mg/ml)} = A_{280\text{nm}} / \epsilon_{280\text{ nm}} \times 10 \text{ mg/ml}$$

[ $\epsilon$  für IgG = 13,6;  $\epsilon$  für IgM = 11,8 ( $\epsilon$  = Extinktionskoeffizient) ]

## 4.4 Proteinnachweis qualitativ

### 4.4.1 SDS- Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bindet an die durch Hitzebehandlung denaturierten und in ihre Untereinheiten zerfallenen Proteine. Die Zahl der angelagerten SDS-Moleküle ist proportional zum Molekulargewicht der Polypeptide, so dass im elektrischen Feld eine Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht möglich ist.

Durchgeführt wird die SDS-PAGE mit ExcelGel<sup>®</sup> SDS Homogenous 7,5% bzw. 12,5% Gelen auf Multiphor II<sup>®</sup> Elektrophorese-Einheiten. Der Separationsumfang beträgt für die 7,5% Gele 20 bis 300 kDa, für die 12,5% Gele 9 bis 210 kDa. Jede Probe wurde mit reduzierendem (mit Mercaptohenol) oder nichtreduzierendem Laemmli-Probenpuffer im Verhältnis 1:5 verdünnt (Laemmli 1970). Die Proteine wurden denaturiert (5 Min. bei 95°C). Die Durchführung der SDS-PAGE erfolgte nach Herstellerangaben.

### 4.4.2 Coomassie-Färbung

Die auf dem SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Dazu wurden die Gele für mindestens 15 Minuten mit 25% Isopropanol und 10% Essigsäure fixiert, anschließend nach Sicht gefärbt. Die Färbelösung besteht aus 10% Essigsäure und 0,006% Coomassie G. Entfärbt wurden die Gele wiederum nach Sicht mittels 10% Essigsäure.

## 4.5 Nachweis der Spezifität der aufgereinigten Immunglobuline

Der Dot Blot weist die Spezifität der aufgereinigten Immunglobuline (IgM, IgG) nach. Bei diesem Verfahren wird ein Proteingemisch, welches DNA enthält, auf einer Nitrozellulosemembran fixiert.

Der Proteintransfer erfolgt mit Hilfe des Vakuumtransfersystems, wodurch das auf 200 µl verdünnte Proteingemisch auf eine Nitrozellulose-Membran gesaugt wird. Die Membran wird mit einem feuchten Filterpapier unterlegt, um die Transferqualität zu optimieren.

Auch hier wird nach dem Blocken der unspezifischen Bindungsstellen mittels 3% BSA in PBS durch Inkubation mit dsDNA-spezifischem IgM bzw. IgG das betreffende Antigen „markiert“. Anschließend wird der Antigen- Antikörper-Komplex mit einem AP-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert, es erfolgt wiederum eine Substratumsetzung durch die alkalische Phosphatase.



### **Blockierungslösung**

PBS + 3% BSA



### **Primärantikörper**

1 µg/ml in PBS + 0,1% BSA



### **Sekundärantikörper** (alkalische Phosphatase konjugiert)

1:1000 in PBS + 0,1% BSA



### **Substrat für die alkalische Phosphatase**

SIGMA FAST™ pNPP-Substrattabletten (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

## 4.6 Konjugation von Antikörper

### 4.6.1 Konjugation mit Biotin

Avidin, ein Glycoprotein, hat eine hohe Affinität und bildet einen festen Komplex mit Biotin. Verschiedenen Antikörper wurden biotinyliert.



### Pufferlösungen

#### 0,2 M Borsäure

1,24 g  $\text{H}_3\text{BO}_3$   
ad 100 ml Aqua bidest.

#### 0,2 M di-Natriumtetraborat-Decahydrat

7,62 g  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \times 10 \text{H}_2\text{O}$   
ad 100 ml Aqua bidest.



### Biotinamidocaproate N-Hydroxysuccinimide Ester

(Sigma-Aldrich, Steinheim)



### Stopp-Lösung

1 M Ammoniumchlorid  
53,5 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$   
ad 1 Liter Aqua bidest.



### Biotinylierung von Antikörpern

- zur Proteinlösung gleiche Menge an Puffer (Borsäure + Natriumtetraborat zu gleichen Anteilen, pH = 8,8) geben
- Hinzugabe von Biotinamidocaproate N-Hydroxysuccinimide Ester (ca. 100  $\mu\text{g}$  für 1 mg Protein)
- 2 h bei Raumtemperatur rühren
- Reaktion stoppen mit 1 M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  – pro  $\mu\text{g}$  Biotin 2  $\mu\text{l}$  Stopp-Lösung
- Dialyse (Dialysis Tubing Cellulose Membrane) und Aufkonzentrierung mittels Amicon<sup>®</sup> Mikrokonzentratoren

Anschließend Kontrolle der Biotinylierung durch Dot Blot, wobei jeweils Avidin (alkalische Phosphatase oder Horseradish Peroxidase konjugiert) als Primärantikörper fungiert.

#### 4.6.2 Konjugation mit $\text{Jod}^{123}$

Um die Verteilung bzw. Anreicherung eines Antikörpers im Organismus zu untersuchen, wird radioaktiv markierter Antikörper verabreicht. Das kurzlebige

Radionuklid (z.B. Jod<sup>123</sup>) sendet Gamma-Strahlung aus, die mit Hilfe eines geeigneten Detektors (z.B. Gammazähler) gemessen werden kann. Zur Markierung werden IODO-Gen®Precoated Iodination Tubes verwendet. Diese Reagenzgläser sind mit dem Katalysator Iodogen beschichtet.

Isolation des Antikörpers aus der Lösung erfolgt mittels Größenauftrennung über PD-10 Säulen von Sephadex.



### **Jod<sup>123</sup>-Lösung**

123-Natrium-Jodid zur Markierung



### **Wasch- und Verdünnungspuffer**

0.05 M PBS-Puffer, pH 7.4



### **Antikörpermarkierung mit Jod<sup>123</sup>**

- 20 µg Ag + 5 ml PBS + Jod<sup>123</sup>-Lösung (z.B. 3 µl) in das mit dem Katalysator Iodogen beschichtete Reagenzglas
- 2-3 Min. sorgfältig mischen
- 10 Min. stehen lassen
- Reaktion stoppen mit 0.5 ml PBS-Puffer
- Chromatographie mit PBS-Puffer, nach ca. 2.5 ml Durchlauf erscheint radioaktives Eluat
- Auffangen des Eluats
- Messung der Aktivität

Die Messung der Aktivität in den verschiedenen Organen erfolgt „durch ins Verhältnis setzen“ von Körpergewicht – Blutvolumen – Organgewicht - Injizierte Aktivität/Verbliebene Aktivität in der Spritze – Gemessene Aktivität im Organ.

Die Verteilung der Aktivität im Körper kann ebenfalls in einem Szintigramm als Bild dargestellt werden. Die Registrierung der Gamma-Strahlung erfolgt mit einer Gammakamera.

## 4.7 Immunhistochemie

### 4.7.1 Beschichtung der Objektträger

Die Objektträger werden vor Benutzung für 10 Min. in eiskaltes Aceton getaucht, für 15 Min. getrocknet, dann 10 Min. lang mit 0,01% Poly-L-Lysin (in Aqua bidest.) beschichtet und anschließend wiederum getrocknet.

### 4.7.2 Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern

Die der Maus entnommenen Gewebe werden in Einbettmedium (Tissue-Tek) platziert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Zum Schneiden der Gewebe mittels Mikrotom (*LEICA CM 1850*) wird dieses auf eine Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlt. Die Schnittdicke der Gewebe beträgt 5-8  $\mu\text{m}$ . Die Gefrierschnitte werden auf die beschichteten Objektträger gebracht und 1 h getrocknet. Anschließend werden sie für 10 Min. in eiskaltem Aceton fixiert und wiederum 1 h luftgetrocknet. Danach können sie bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren und gelagert werden.

### 4.7.3 Färbungen

Mit Hilfe der Färbungen können auf den Gefrierschnitten spezifische Antigene lokalisiert werden. Es gibt verschiedene Möglichkeiten der Darstellung, wie die direkte oder indirekte Methode.

Bei der direkten Methode bindet ein spezifischer, konjugierter Antikörper (mit alkalische Phosphatase (AP) oder Horseradish Peroxidase (HRP) konjugiert) direkt an ein Gewebeantigen.

Bei der indirekten Methode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Gewebeantigen und mit Hilfe eines Sekundärantikörpers (alkalische Phosphatase oder Horseradish Peroxidase konjugiert), welcher den Primärantikörper erkennt, wird das Gewebeantigen lokalisiert. Sollte der Primärantikörper Biotin-konjugiert sein, so ist mit Hilfe von Avidin als Sekundärantikörper (AP oder HRP konjugiert) ein Nachweis möglich.

Bei allen Methoden entsteht durch Substratumsetzung letztendlich ein gefärbtes Endprodukt.

Die Aufnahmen der Färbungen wurden mit einer Digitalkamera fotografiert und mit dem Programm Adobe Photoshop 7.0 (*Adobe, Mountain View, CA, USA*) bearbeitet.

### 4.7.3.1 Einfarben-Färbung

Mit der Einfarben-Färbung ist der Nachweis einer speziellen Antigenstruktur möglich.



#### Waschpuffer

PBS



#### Blockierungspuffer

PBS/ Tween 0,05%/ BSA 1%



#### Primärantikörper (AP oder HRP konjugiert bzw. Biotin oder FITC konjugiert)

1:500 bis 1:1000 in Blockierungspuffer



#### Sekundärantikörper (nur bei Biotin- oder FITC-markiertem Primärantikörper)

1:500 bis 1:1000 in Blockierungspuffer



#### Alkalische Phosphatase – Substrat

Naphthol AS-MX Phosphate

N,N-Dimethylformamide

0,1 M Tris-Puffer

12,1 g (Tris-[ hydroxymethyl ]-aminomethan)

ad 1 Liter Aqua bidest.

pH 8,5

Fast Blue BB Base

2N HCl

4% Natriumnitrat

Levamisole



#### Horseradish Peroxidase – Substrat

AEC-Lösung

400 mg 3-Amino-9-Ethyl-Carbazole (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)

ad 25 ml N,N Dimethylformamide

Lichtgeschützt aufbewahren!

0,05 M Natriumacetat-Puffer

3,4 g Natriumacetat

ad 500 ml Aqua bidest.

pH 5,0

Hydrogenperoxid, 32% (w/v) (*Sigma-Aldrich, Steinheim*)



### Einbettmedium

Crystal/Mount (*Biomedica Corp. Foster City/USA*)



### Einfarben-Färbung

- Objektträger mit Gewebeschnitten bei Raumtemperatur auftauen (ca. 15 Min.)
- mit Liquid Blocker PAP-Pen Gewebe umfahren und trocknen lassen (ca. 10 Min.)
- Objektträger in PBS ca. 10 Min. unter Schütteln inkubieren
- Objektträger in Block-Puffer ca. 10 Min. unter Schütteln inkubieren
- Objektträger in einer feuchten Kammer platzieren
- 200 µl - 250 µl Primärantikörperlösung pro Objektträger hinzufügen (Verdünnung ca. 1:50 - 1:250), ca. 1 Stunde bei RT inkubieren
- mehrmals mit Waschpuffer vorsichtig spülen
- bei AP- oder HRP-konjugiertem Primärantikörper erfolgt jetzt die Substratentwicklung; bei Biotin-konjugiertem Primärantikörper Avidin (AP- oder HRP-konjugiert), bei FITC-markiertem Primärantikörper anti-FITC (AP- oder HRP-markiert) als Sekundärantikörper für ca. 1 Stunde zugeben, danach mehrmals mit Waschpuffer vorsichtig spülen
- Substratentwicklung:

#### Fast Blue BB Base (Detektion der Alkalischen Phosphatase)

Farbe: Blau

- 5 mg Naphthol AS-MX Phosphat in 250 µl N,N Dimethylformamid lösen
- Die Lösung zu 40 ml Tris-Puffer hinzufügen
- 10 mg Fast Blue BB Base in 250 µl 2 N HCl lösen, 250 µl 4% Natriumnitrat hinzufügen und für 2 Min. bei Raumtemperatur inkubieren, dann die Lösung sehr langsam zu der 40 ml Tris-Puffer-Lösung zugeben
- 10 mg Levamisole (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) hinzufügen, um die endogene Alkalische Phosphatase-Aktivität zu inhibieren
- Filtern der Lösung (Filter mit 0,45 µm Porengröße, *Schleicher & Schuell, Dassel*)
- Objektträger im Dunkeln mit der Lösung für 15 bis 60 Min. inkubieren (Sichtkontrolle auf eventuelle Überfärbung!)

#### AEC (Detektion der Horseradish Peroxidase)

Farbe: Rot

- 250 µl AEC-Lösung zu 9,75 ml 0,05 M Natriumacetat-Puffer geben
- Lösung filtern; lichtgeschützt aufbewahren
- vor Gebrauch 5 µl 30% Hydrogenperoxid zugeben, um endogene Peroxidase-Aktivität zu verhindern; gut mischen
- im Dunkeln Objektträger für 10 bis 15 Min. (Kontrolle auf eventuelle Überfärbung!) mit der Lösung inkubieren
- zweimal mit Wasch-Puffer waschen
- 3 bis 5 Tropfen Crystal/Mount zur Einbettung auf den noch feuchten Schnitt geben, über Nacht bei Raumtemperatur trocknen lassen

#### 4.7.3.2 Zweifarben-Färbung

Bei der Zweifarben-Färbung können gleichzeitig zwei unterschiedliche Antigenstrukturen nachgewiesen werden. Die Färbung erfolgt nach dem gleichen Protokoll wie die Einfarben-Färbung. Es ist wiederum sowohl die direkte Methode möglich (zwei unterschiedliche AP- oder HRP-konjugierte Primärantikörper), als auch die indirekte Methode (Primärantikörper Biotin- oder FITC-gelabelt; als Sekundärantikörper Avidin- oder anti-FITC-AP bzw. -HRP).

Bei der Farbentwicklung ist zu beachten, dass erst das AP-Substrat entwickelt wird und als zweites das HRP-Substrat.

#### 4.7.3.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung

Bei der intrazellulären Färbung mit Zytokin-spezifischen Antikörpern kann die Lokalisation zytokinproduzierender Zellen im Gewebe gezeigt werden.



##### **2% Paraformaldehyd (PFA)**

0,5 g Paraformaldehyd in 25 ml PBS lösen bei 50°C für 1 h (Aufbewahrung bei 4°C für max. 3 Tage)



##### **Saponinpuffer**

Stocklösung 10%: 1 g Saponin + 10 ml HBSS (Lagerung bei 4°C)

1% Lösung: 1 ml 10% Stocklösung Saponin + 9 ml HBSS

**Blockierungspuffer**

siehe Einfarb-Färbung

**Alkalische Phosphatase – Substrat**

siehe Einfarb-Färbung

**Horseradish Peroxidase – Substrat**

siehe Einfarb-Färbung

**Einbettmedium**

Crystal/Mount

**Intrazelluläre IFN  $\alpha$  Färbung mit dem 4EA1-Antikörper**

- Acetonfixierte 7  $\mu$ m Kryoschnitte
- 5 Min. fixieren mit 2% PFA eiskalt
  - Waschen mit PBS/Tween
- 15 Min. blocken mit 1% BSA/PBS/Tween
  - Waschen mit PBS/Tween
- 30 Min. Blocken mit 5% NMS/1% Saponin
  - Waschen mit 1% Saponin
- IFN  $\alpha$ -AK (4EA1) (10  $\mu$ g/ml) in 2% NMS/1% Saponin für 2 Std.
  - Waschen mit 1% Saponin
  - Waschen mit PBS/Tween
- 1 Std. den FITC-gelabelten Antikörper für die Gegenfärbung in 1% BSA/PBS/Tween (darf kein Isotyp Ratte IgG1/2a sein, wegen des sekundär Antikörpers für 4EA1)
  - Waschen mit 1% BSA/PBS/Tween
- Anti-IgG1/2a-bio (Clone G28-5) Verdünnung 1:75 für 1 Std.
  - Waschen mit 1% BSA/PBS/Tween
- 45 Min. Avidin-AP (Vdg. 1:500) und Anti-FITC-POD (Vdg. 1:250) in 1% BSA/PBS/Tween
  - Waschen mit 1% BSA/PBS/Tween
  - Waschen mit PBS in einer Küvette
- AP-Substrat (siehe 4.6.3.1 Einfarb-Färbung) in einer Küvette über Nacht
  - Waschen mit PBS

- HRP-Substrat (siehe 4.6.3.1 Einfarb-Färbung) für ca. 1 Std.
  - Waschen mit PBS
- Eindecken mit Crystal-Mount (siehe Einfarb-Färbung)

#### 4.7.3.4 Immunfluoreszenzfärbung

Diese Methode ermöglicht wie die Zweifarben-Färbung die simultane Lokalisation zweier exprimierter Antigene. Hierzu wurden Antikörper verwendet, die entweder mit dem fluoreszenzierenden Farbstoff Phycoerythrin (PE) oder Fluoresceinisothiocyanat (FITC) markiert waren.

#### Immunfluoreszenzfärbung

- Acetonfixierte 7 µm Kryoschnitte
- 5 Min. waschen mit PBS
- 15 Min. Schnitte mit 100 µl 10%iges Normal Mouse Serum pro Schnitt inkubieren
- 30 Min. mit 100 µl Primärantikörper anti-C3-bio (1:20) inkubieren
- 2x 5 Min. waschen mit PBS
- 30 Min. 100 µl Avidin-PE (1:500) pro Schnitt inkubieren
- 2x 5 Min. waschen mit PBS
- 30 Min. 100 µl pro Schnitt mit FITC-konjugiertem anti-Maus IgG (1:64) inkubieren
- 2x 5 Min. waschen mit PBS
- Schnitte in einer Küvette mit PBS bei 4°C im dunkeln aufbewahren (innerhalb von einem Tag mikroskopisch auswerten)

### 4.8 Maus anti-Interferon alpha ELISA

Dieses fertige ELISA-Kit der Fa Research Diagnostics Inc. dient zum Nachweis von murinen IFN  $\alpha$  im Serum. Probenverdünnung, Wasch- und Verdünnungspuffer sowie Durchführung wurden nach Angaben des Herstellers ausgeführt.

## 4.9 Maus anti-dsDNA-Antikörper ELISA

Der Nachweis von anti-dsDNA-Antikörpern spielt eine entscheidende Rolle in der SLE-Diagnostik. Dieser speziell für die Maus entwickelte anti-dsDNA-Antikörper ELISA wurde mit DNA beschichteten Mikrotiterplatten der Fa. Orgentec (*Orgentec, Mainz*) durchgeführt. Als positive Kontrolle/Standard wurde Mausserum der Fa. Alpha Diagnostic (*Alpha Diagnostics Inc., San Antonio/USA*) verwendet.



### Substrat Alkalische Phosphatase

pNPP Sigma Fast-AP, 50 sets a 20 ml



### Verdünnungspuffer

PBS bzw. PBS/Tween (0,05%)



### Waschpuffer

PBS/Tween (0,05%)



### Vorverdünnung der Positivkontrolle als Standard:

175 µl PBS + 75 µl Positivserum



### Verdünnung des Sekundärantikörper (AP-konjugiert) in PBS/Tween 0,05%

Ratte anti-Maus IgG1	1:20000
Ratte anti-Maus IgG2a	1:5000
Ratte anti-Maus IgG2b	1:10000
Ratte anti-Maus IgG3	1:2500



### Anti-dsDNA-Antikörper ELISA

- Standard im Doppelansatz in verschiedenen Verdünnungen pipettieren
- Serum in der Verdünnung 1:20 im Doppelansatz pipettieren, jeweils 100 µl pro Vertiefung
- Probeninkubation 30 Min. Raumtemperatur
- 3 x mit 300 µl Wasch-Puffer waschen
- 100 µl Sekundärantikörperlösung pro Vertiefung zugeben, 30 Min. inkubieren bei Raumtemperatur
- 3 x mit 300 µl Wasch-Puffer waschen

- pro Vertiefung 200  $\mu$ l Substrat hinzugeben, für 20 Min. im Dunkeln inkubieren
- nach 20 Min. Reaktion mit 50  $\mu$ l 3 N NaOH stoppen
- Extinktion bei 405 nm messen (Referenz 620 nm)

#### 4.10 Antiviraler Bioassay

Die biologische Aktivität von Interferon wird mittels eines standardisierten antiviralen Bioassays nachgewiesen. Hierfür wurden murine Fibroblastenzellen der Linie L-929 (Kulturmedium: DMEM + 5% FCS) verwendet.

Die Zellen werden dazu mit der zu untersuchenden Probe inkubiert. Je nach Menge des in der Probe enthaltenen IFN  $\alpha$  sind die Zellen geschützt gegen das Maus Encephalomyocarditis-Virus. Nach Zugabe von Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromide (MTT) sind nur die vitalen Zellen in der Lage MTT in den Mitochondrien zu metabolisieren und es kommt zur unlöslichen dunkelbraunen Ablagerung von MTT-Formazan in der Zelle. Je größer die Anzahl der vitalen Zellen, desto höher ist die Menge des in der Probe vorhandenen IFN  $\alpha$ .

Diese Versuche fanden mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. Rainer Zawatzky am Deutschen Krebsforschungsinstitut in Heidelberg statt.

#### 4.11 Isolierung mononukleärer Zellen aus der Milz

Die Zellseparation (Ficollierung) ist eine präparative Methode, bei der mononukleäre Zellen durch Dichtezentrifugation aufgetrennt werden. Zellen mit höherer Dichte, wie z.B. Erythrozyten wandern in die Ficoll-Phase, Zellen mit geringerer Dichte, Makrophagen, B- und T- Lymphozyten, sammeln sich in der Interphase.



##### Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077



##### Isolierung mononukleärer Zellen mittels Ficoll-Auftrennung

- Milz zerreiben mit 2 Objektträgern (mattes Ende) und in PBS aufnehmen (Volumen ungefähr 5 ml)

- Zellsuspension durch ein 40  $\mu$ M Nylon-Zellsieb geben
- Die Zellsuspension vorsichtig auf das vorgelegte Separationsmedium schichten (ca. 5 ml vorlegen)
- Zentrifugation 1200 rpm, 4°C, 20 Min.
- Anschließend die in der Interphase enthaltenen mononukleären Targetzellen nehmen und in ein frisches Röhrchen überführen
- 1 x mit eiskaltem PBS auffüllen und zentrifugieren bei 1200 rpm 10 Min.
- Überstand verwerfen

## 4.12 Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen

Die Aufreinigung von Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker ist möglich mit Antikörpern, an welche sogenannte magnetische Beads gekoppelt sind. Der eigentliche Aufreinigungsschritt erfolgt über spezielle Säulen und einen Magneten. Die Antikörper-Beads (MACS-Beads) wurden von der Firma Miltenyi (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach*) bezogen.



### MACS-Puffer

500 ml PBS + 0,4 % Natriumcitrat + 1% humanes Albumin (von 5% Stock)  
sterilfiltrieren



### Beads- Aufreinigung

Wichtig: Alle Schritte soweit möglich auf Eis pipettieren!

- Zellsuspension (s. Isolierung mononukleärer Zellen) mit eiskaltem MACS-Puffer auffüllen und zentrifugieren bei 1200 rpm 10 Min.  
(Zellpellet in einer definierten Puffermenge aufnehmen -Volumen notieren -ein Aliquot abnehmen zum Messen am Coulter Counter)
- Überstand verwerfen -Zellen in der Restflüssigkeit resuspendieren und in ein Mikrotube überführen.
- Zugabe von 0,25  $\mu$ g Fc-Block (CD16/32 purified)/1 Million Zellen -10 Min. auf Eis inkubieren

- Danach direkt Zugabe von 10 µl Antikörper-Beads / $10^7$  Zellen -15 Min. bei 10°C inkubieren
- Mit MACS-Puffer waschen, zentrifugieren bei 1600 rpm / 10 Min.
- Überstand verwerfen
- Zellen dann in 500 µl MACS-Puffer aufnehmen
- Säule mit 500 µl MACS-Puffer vorspülen
- Zellsuspension auf die Säule geben, danach mit 2 ml MACS- Puffer nachspülen und die positiven Zellen mit 1 ml MACS-Puffer eluieren (dazu Säule vom Magneten entfernen)
- Nach der ersten Säule die eluierten Zellen auf eine zweite Säule geben, wieder mit 2 ml Puffer waschen und zum Schluss mit 1 ml MACS-Puffer eluieren.
- Kontrolle der Reinheit am Durchflußzytometer

### 4.13 Reinheitsmessung am Durchflußzytometer

Die Durchflusszytometrie stellt ein optisches Messsystem für einzelne, in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar und basiert auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d.h. der Färbung verschiedener Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Das Anwendungsspektrum reicht von Lymphozytentypisierung über Zellzyklusanalysen bis hin zu funktionellen Untersuchungen, wie z.B. intrazelluläre Stoffwechselfvorgänge.

Die Zellen werden dazu mit monoklonalen FITC oder PE markierten Antikörpern gegen die zu untersuchenden Oberflächenmarker inkubiert. Durch Einsatz entsprechender Marker und anschließender Messung der isolierten Zellsuspensionen können Zelltyp und das Maß der Verunreinigungen (bei einer CD11b Aufreinigung z.B. B- und T-Zellen) gemessen werden.

#### Reinheitsüberprüfung

- 5-10 µl FITC- und/oder PE Antikörper
- 10 Min. Inkubation bei Raumtemperatur
- Zentrifugieren 1 Min. bei 5000 rpm
- Überstand verwerfen
- Zellen in PBS aufnehmen

Es folgt eine Einfarb- bzw. Zweifarbenmessung am Durchflußzytometer, je nach Zellanzahl wurden mindestens 12 000-50 000 Zellen untersucht.

#### 4.14 DNA und RNA-Isolierung aus Zellen

Die DNA und RNA-Isolierung erfolgt mittels Qiagen DNeasy bzw. RNeasy Kit. Die Herstellung der Lösungen und Puffer sowie die Durchführung erfolgten nach Protokoll des Herstellers.

#### 4.15 DNA-Verdau

Um die isolierte RNA von genomischer DNA zu befreien, welche die RT PCR-Ergebnisse verfälschen könnte, wird die DNA mittels des DNA-free-Kits verdaut. Die Mengenangaben und Inkubationszeiten richten sich nach der eingesetzten Zellzahl.



##### DNA-Verdau mit dem DNA-free-Kit

- 0,1 Volumen DNase I Puffer und 1-2 µl DNase I (je nach Zellmenge) zu der RNA hinzufügen, mixen und 30 Min. bei 37°C inkubieren.
- 0,1 Volumen bzw. 5 µl (je nachdem welches Volumen größer ist) DNase Inactivation Reagent hinzugeben, mixen 2 Min. bei RT inkubieren
- Zentrifugieren 10000 g für 1 Min.
- Überstand mit der RNA von dem DNase Inactivation Reagent-Pellet abpipettieren und in ein neues Tube geben.

#### 4.16 Bestimmung der Gesamt-DNA- bzw. Gesamt-RNA-Konzentration mittels Spektroskopie

Durch folgende Formel ist die Proteinkonzentration in guter Näherung photometrisch bestimmbar (Johnstone und Thorpe 1996).

DNA/RNA-Konzentration (ng/µl) = (260 nm –320 nm) x OD DNA bzw. RNA x Verdünnungsfaktor

OD DNA = 50; OD RNA = 40

## 4.17 Real-time RT-PCR

Die Real-time RT (Reverse Transkriptase)-PCR erlaubt eine relative Quantifizierung der mRNA. Dazu wird der Abbau einer fluorogenen Sonde gemessen. Diese spezielle Sonde ist an ihrem 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff und an ihrem 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff und blockierendem Phosphatrest markiert. Durch die räumliche Nähe zum Quencher wird bei der intakten Sonde trotz Anregung des Reporter-Farbstoffes die Fluoreszenz unterdrückt. Durch die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Ampli Taq Polymerase wird die hybridisierte Sonde geschnitten und die räumliche Nähe zwischen Quencher und Reporter wird unterbrochen. Entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporters mit jedem PCR-Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist strikt sequenzspezifisch. Die Veränderungen der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe werden mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequence Detector (*Applied Biosystems, Weiterstadt*) im geschlossenen Reaktionsgefäß Zyklus für Zyklus erfasst.

Aus den isolierten Zellen (s. 3.10) wurde mRNA gewonnen (s. 3.12) und verschiedenen Zytokine (IFN  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-12) oder das Interferon induzierte Gen IFRG28 mittels RT-PCR quantifiziert.



### RNasefreies Wasser

- 1  $\mu$ l Di-ethylpyrocarbonat pro 1 ml Wasser
- 12 h bei 37°C inkubieren
- autoklavieren (120°C, 20 Min.)



### PCR-Mastermix (Menge je Probe) für IFN $\alpha$ (steril)

2x Master Mix	25 $\mu$ l
Multiscribe/RNase Inhibitor	1,25 $\mu$ l
Forward-Primer IFNa 20 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l
Reverse-PrimerI IFNa 20 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l
Reverse-PrimerII IFNa 20 $\mu$ M	0,75 $\mu$ l
Sonde IFNa 5 $\mu$ M	0,3 $\mu$ l
Rodent GAPDH Primer I	0,2 $\mu$ l
Rodent GAPDH Primer II	0,2 $\mu$ l
Rodent GAPDH Sonde	0,2 $\mu$ l
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	3 $\mu$ l
Wasser (RNasefrei)	7,6 $\mu$ l

**PCR-Mastermix (Menge je Tube) für Interferon gamma und IL-12 (steril)**

2x Master Mix	25 µl
Multiscribe/RNase Inhibitor	1,25 µl
Gebrauchsfertiger Sonde/Primer Mix IL-12 bzw. IFNg	2,5 µl
Rodent GAPDH Primer I	0,2 µl
Rodent GAPDH Primer II	0,2 µl
Rodent GAPDH Sonde	0,2 µl
Wasser (RNasefrei)	10,65 µl

**PCR-Mastermix (Menge je Tube) für IFRG28 (steril)**

2x Master Mix	25 µl
Multiscribe/RNase Inhibitor	1,25 µl
Forward-Primer IFRG28 20 µM	0,75 µl
Reverse-Primer IFRG28 20 µM	0,75 µl
Sonde IFRG28 5µM	0,4 µl
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	2 µl
Wasser (RNasefrei)	9,85 µl

**GAPDH-Kontrolle im separaten PCR-Tube**

2x Master Mix	25 µl
Multiscribe/RNase Inhibitor	1,25 µl
Rodent GAPDH Primer I	0,3 µl
Rodent GAPDH Primer II	0,3 µl
Rodent GAPDH Sonde	0,3 µl
MgCL <sub>2</sub> 25 mM	2 µl
Wasser (RNasefrei)	10,85 µl

**RT-PCR**

- Ansatz pro tube:

PCR-Mastermix	40 µl
---------------	-------
- Bei der IFN α, IFN γ und IL-12-PCR:

RNA-Probe (c=5 ng/1µl)	10 µl
------------------------	-------
- Bei der IFRG28-PCR:

RNA-Probe (c=10 ng/1µl)	10 µl
-------------------------	-------

- Thermocycler-Konditionen für IFN  $\alpha$ :

Hold	50°C	0:05 Min.	
Hold	48°C	30:00 Min.	
Hold	95°C	10:00 Min.	
Cycle	95°C	0:15 Min.	
	62°C	1:00 Min.	45x
  
- Thermocycler-Konditionen für IFN  $\gamma$  und IL-12:

Hold	50°C	0:05 Min.	
Hold	48°C	30:00 Min.	
Hold	95°C	10:00 Min.	
Cycle	95°C	0:15 Min.	
	60°C	1:00 Min.	45x
  
- Thermocycler-Konditionen für IFRG28

Hold	50°C	0:05 Min.	
Hold	48°C	30:00 Min.	
Hold	95°C	10:00 Min.	
Cycle	95°C	0:15 Min.	
	62°C	1:00 Min.	45x

Zur Überprüfung des erfolgreichen DNA-Verdaus wird in einem Doppelansatz die Multiscribe/RNase Inhibitor (enthält die reverse Transkriptase) weggelassen. In diesem Ansatz darf es zu keiner cDNA-Bildung kommen und somit zu keinem Signal. Befindet sich noch genomische DNA im Ansatz, bewirkt diese eine Positivität. In diesem Fall wird der DNA-Verdau wiederholt und die Probe erneut gemessen.

#### 4.18 Relative Quantifizierung der RT-PCR

Bei dieser Form der Quantifizierung soll die Zielsequenz (IFN $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12, IFRG28) relativ in ihrer Expression zu einer zweiten, nicht verwandten Sequenz bestimmt werden. Dabei wird die unbekannte Menge der Zielsequenz semiquantitativ bezogen auf das Signal der zweiten Sequenz. Als Standard dient das sogenannte Housekeeping-Gene GAPDH (murine Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase).

Für die experimentellen Proben wurde die Ausgangsmenge der Zielsequenz über eine Standardkurve bestimmt und dann durch die Ausgangskopienzahl des Kalibrators (z.B. Wildtyp unbehandelt) dividiert. Der Kalibrator wird dadurch zum 1x -Wert und die unbekanntes Proben werden als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator bestimmt.

#### 4.18.1 Vergleichende $C_T$ -Methode ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode)

Sind die Effizienzen für beide Amplicons ungefähr gleich, so nähert sich die Steigung der Geraden 0. Mit Hilfe dieser Vorexperimente kann bei Anwendung der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode gezeigt werden, dass die Effizienzen beider Reaktionen von Zielsequenz und Referenz ungefähr gleich sind. Dabei sollte der absolute Wert der Steigung des Graphen  $<0,1$  sein. Kann dies gezeigt werden, so kann die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung angewandt werden, ohne dass eine Standardkurve generiert werden muss. Im folgenden sind die absoluten Werte der Steigung des Graphen für die verschiedenen PCR-Ansätze aufgelistet:

IFN $\gamma$	[0,069]
IL-12	[0,066]
IFN $\alpha$	[0,028]
IFRG28	[0,016]

Alle Werte sind  $<0,1$ , somit war die Generierung einer Standardkurve nicht notwendig.

### 4.19 Qualitativer Nachweis von endogener DNA im Serum

Der qualitative Nachweis endogener DNA im Serum erfolgte mittels DotBlot-Technik und Detektierung durch die TUNEL-Methode (Terminale deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). Hierbei wird an die freien Enden der fragmentierten DNA durch das Enzym TdT (Terminale deoxynucleotidyl Transferase) FITC-markierte dNTP-Nukleotide angehängt. Die Detektion erfolgt mittels anti-FITC-AP Nachweis.

Um den Reagenzienverbrauch zu reduzieren, wurden nach Blockierung die geblotteten Punkte ausgeschnitten und auf einem Objektträger platziert. Durch eine wasserunlösliche Umrandung kann die Reagenzienmenge auf ein Minimum eingeschränkt werden.

**TNB-Puffer**

Tris-HCL, NaCl, 0,5% Boehringer Blockreagent

**TUNEL-Reagenz**

aus dem In situ cell Death Detection Kit  
nach Anleitung

**TBST-Puffer**

150 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 8.0), 0.05% Tween 20

**AP-Puffer**

100 mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05% Tween 20, pH 9.5):

Tris-HCl (MW 157.60)            15.8 g

NaCl (MW 58.44)                5.8 g

MgCl<sub>2</sub> (MW 203.31)            1.02 g

Tween 20                            0.5 ml

Aqua dest                            900 ml                            (Lagerung bei RT)

**Substrat „Fast Red“**

nach Anleitung

**TUNEL-DotBlot**

- Unter die 0,45 nm Nitrozellulose Membran eine Lage Filterpapier in dem Vakuumtransfersystem platzieren
- Beide mit PBS tränken
- Kammer schließen und Vakuum anlegen
- Proben in einer 1: 40 Verdünnung (200 µl/well) auf die Membran pipettieren
- 20 Sekunden Vakuum weiter bestehen lassen
- Vakuum lösen und Membran trocknen lassen (ca. 10 Min.)
- Membran blocken mit TNB-Puffer
- Waschen in PBS (2x 5 Min.)
- Probenpunkte ausschneiden und auf einem Objektträger platzieren
- Membranabschnitte mit Fettstift umranden
- TUNEL-Reagenz ( 1:10), 50 µl/Membranabschnitt, Inkubation 1 h bei 37°C
- Waschen mit TBST (2x 5 Min.)

- Membranabschnitt bedecken mit anti- FITC- AP-Antikörper (1:500), 50 µl/ Membranabschnitt, Inkubation 30 Min.
- Waschen mit AP- Puffer, (2x 5 Min.)
- Färbung mit dem Substrat „Fast Red“ nach Sicht
- Waschen mit PBS (1x 5 Min.)
- Lufttrocknen

## 4.20 Quantitativer Nachweis von endogener DNA im Serum

Zur Quantifizierung freier DNA im Mausserum wurde eine Mikrotiterplatte mit dem 111s.19-IgM Antikörper (anti-dsDNA) beschichtet und anschließend mit dem zu untersuchenden Serum inkubiert. Die so gebundene DNA wurde mittels des mit Biotin-markierten Antikörpers detektiert und photometrisch quantifiziert.



### TNB-Puffer

Tris-HCL, NaCl, 0,5% Boehringer Blockreagent



### Beschichtungspuffer

1 Kapsel Carbonat-Bicarbonat (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) auf 100 ml aqua bidest



### Waschpuffer

PBS/Tween (0,05%)



### DNA-ELISA

- Platte über Nacht beschichten mit 5 µg/ml anti-ds-DNA-IgM-Antikörper (Klon 111s.19) in Beschichtungspuffer
- 3x waschen mit 300 µl Waschpuffer
- geblockt mit TNB-Puffer (100 µl/well) für 45 Min. bei RT
- 3x waschen mit 300 µl Waschpuffer
- Serumverdünnung 1:2 (50 µl Serum + 50µl PBS); 1 h bei RT
- 3x waschen mit 300 µl Waschpuffer
- 100 µl/well 111s.19-Bio (5 µg/ml); 1 h bei RT
- 3x waschen mit 300 µl Waschpuffer

- Avidin-AP (Verdünnung 1:10000); 30 Min. bei RT
- Sigma Fast™ pNpp (*Sigma-Aldrich, Steinheim*) für AP für 2 h bei RT im Dunkeln inkubieren

## 4.21 Bestimmung des Genotyps

Es wurden spezifische PCR etabliert um den Genotyp der Mäuse aus der C4<sup>-/-</sup> bzw. IFNR<sup>-/-</sup> Zucht zu bestimmen.

Hierfür wurde den Mäusen die Schwanzspitze gekappt (0,5mm) und aus dieser die DNA isoliert (s. 4.12). Die DNA wurde mittels Spektroskopie quantifiziert (s. 4.14) und entsprechend dem PCR-Ansatz verdünnt.

### 4.21.1 PCR-Bestimmung des C4<sup>-/-</sup> -Genotyps



#### PCR-Mastermix (Menge je Tube) für C4<sup>-/-</sup>-Genotypisierung

10x PE Puffer	2,4 µl
dNTPs	1,92
Neo oIMR0013	1,4 µl
Neo oIMR0014	1,4 µl
C4 oIMR1265	0,2 µl
C4 oIMR1266	0,2 µl
TaqGold Polymerase	0,2 µl
Wasser (RNasefrei)	10,36 µl



#### PCR-Ansatz für die C4<sup>-/-</sup> -Genotypisierung

- Ansatz pro Tube:

PCR-Mastermix	45 µl
DNA-Probe (c=4 ng/µl)	5 µl

- Thermocycler-Konditionen für C4-/-

Hold	94°C	10:00 Min.	
Cycle	94°C	00:30 Min.	
	55°C	00:45 Min.	
	72°C	00:45 Min.	35x
Hold	72°C	02:00 Min.	
	10°C	∞	

#### 4.21.2 PCR-Bestimmung des IFNR-/- -Genotyps

Da die Primer zu stark untereinander konkurrieren, werden die Reverse-Primer in getrennten Ansätzen eingesetzt.



##### PCR-Mastermix (Menge je Tube) für IFNR-/- Genotypisierung I

10x PE Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	5 µl
dNTPs	0,11 µl
IFNR Forward (2 mM)	0,155 µl
IFNR Reverse-Primer I (2 mM)	0,11 µl
TaqGold Polymerase	0,5 µl
Wasser (RNasefrei)	36,7 µl



##### PCR-Mastermix (Menge je Tube) für IFNR-/- Genotypisierung II

10x PE Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	5 µl
dNTPs	0,11 µl
IFNR Forward (2 mM)	0,155 µl
IFNR Reverse-Primer II (2 mM)	0,13 µl
TaqGold Polymerase	0,5 µl
Wasser (RNasefrei)	36,7 µl

### PCR-Ansatz für IFNR I und II PCR

- Ansatz pro Tube:

PCR-Mastermix	48 µl	
DNA-Probe (c=4 ng/µl)	2 µl	
- Thermocycler-Konditionen für IFNR I und II

Hold	94°C	10:00 Min.	
Cycle	94°C	01:00 Min.	
	55°C	00:30 Min.	
	72°C	01:00 Min.	35x
Hold	72°C	06:00 Min.	
	10°C	∞	

#### 4.21.3 Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate werden auf ein 2% Agarose-Gel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.



##### 10x TBE-Puffer

216 g Tris-Base (0,89 M) + 110 g Borsäure (0,89 M) + 14,88 g EDTA (20 mM) ad 2000 ml Aqua dest (Lagerung bei 4°C)



##### 1x TBE-Puffer

200 ml 10X TBE-Puffer ad 2000 ml Aqua dest. (Lagerung bei RT)  
pH-Wert auf 8,0 einstellen



##### 2% Agarose Gel

4 g Agarose NA + 198 ml 1x TBE-Puffer  
-mehrfach aufkochen bis die Agarose gelöst und die Lösung klar ist  
-abkühlen auf 60°C, dann in den vorbereiteten Gelträger gießen und ca. 20 Min. erstarren lassen



##### Gelladepuffer

0,025 g Bromphenolblau + 0,025 g Xylene Cyanol + 1,5 g Ficoll Typ 400 ad 10 g Aqua dest. (Lagerung bei RT)



#### 4.22.2 Immunisierung, Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Mäuse werden je nach Versuchsmodell intravenös über die Schwanzvene oder intraperitoneal immunisiert.

Vor und nach Immunisierung werden z.T. serielle Blutabnahmen vorgenommen, aus welchen Serum für die verschiedenen Versuchsansätze gewonnen wird.

##### Serumgewinnung

- Aus einer Schwanzvene wird mittels einer Kanüle Blut entnommen.
- 1 h bei Raumtemperatur ruhen lassen
- bei 20°C mit 3500 rpm für 3 Min. zentrifugieren.

#### 4.23 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse sowie die Berechnungen der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Excel<sup>®</sup> *Analyse-it* für Windows durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit dem nicht parametrischen Mann-Whitney-Test für zwei unabhängige Stichproben ermittelt.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nachweis von Interferon alpha im Serum und der murinen Milz

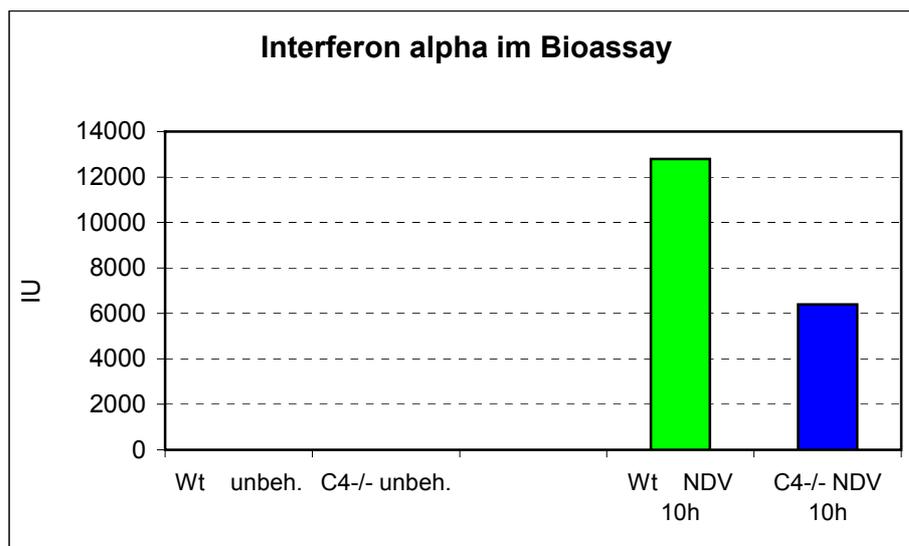
Es besteht eine Korrelation zwischen der Erkrankung SLE und erhöhten IFN  $\alpha$  Serumspiegeln. Das Ziel dieser Arbeit war, diesen Befund bei den Lupus-Modell-Mäusen (C4<sup>-/-</sup> Mäuse) zu verifizieren und die Rolle des IFN  $\alpha$  bei der Entstehung des SLE zu untersuchen.

#### 5.1.1 Nachweis von Interferon alpha Protein im Serum

Zum Nachweis von IFN  $\alpha$  wurden Serumproben von Mäusen im Alter von 6-12 Wochen verwendet und mittels eines ELISA der IFN  $\alpha$  Gehalt untersucht.

Die Untersuchungen der Serumproben von C4<sup>-/-</sup> Mäuse mittels ELISA ergaben keine messbaren IFN  $\alpha$  Werte. Weitere Untersuchungen des Serums mittels Bioassays, in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Tumovirusimmunologie aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum Heidelberg, erbrachten ebenfalls keine messbaren Serumspiegel (**Abb.5**).

Erst nach Stimulation der Mäuse mit dem New Castle Disease Virus (NDV) (Stamm „Ulster“, erhalten von der Arbeitsgruppe Tumovirusimmunologie, DKFZ Heidelberg) konnten messbare Werte im Bioassay erzielt werden, bei C4<sup>-/-</sup>-Mäusen etwas weniger als beim Wildtyp (**Abb.5**). Die Blutentnahme erfolgte 10 h nach der intraperitonealen Verabreichung von 100  $\mu$ l (=1,600 Hämagglutinin Units) NDV-Lösung.



**Abb.5: Serum-Bioassays mit unbehandelten und mit NDV-stimulierten Wildtyp und C4-/- Mäusen.**

Serumuntersuchung unbehandelter Mäuse und 10 h nach NDV-Stimulation. Erst nach viraler Stimulation war IFN  $\alpha$  im Serum der Mäuse nachweisbar. ( $n \geq 2$ )

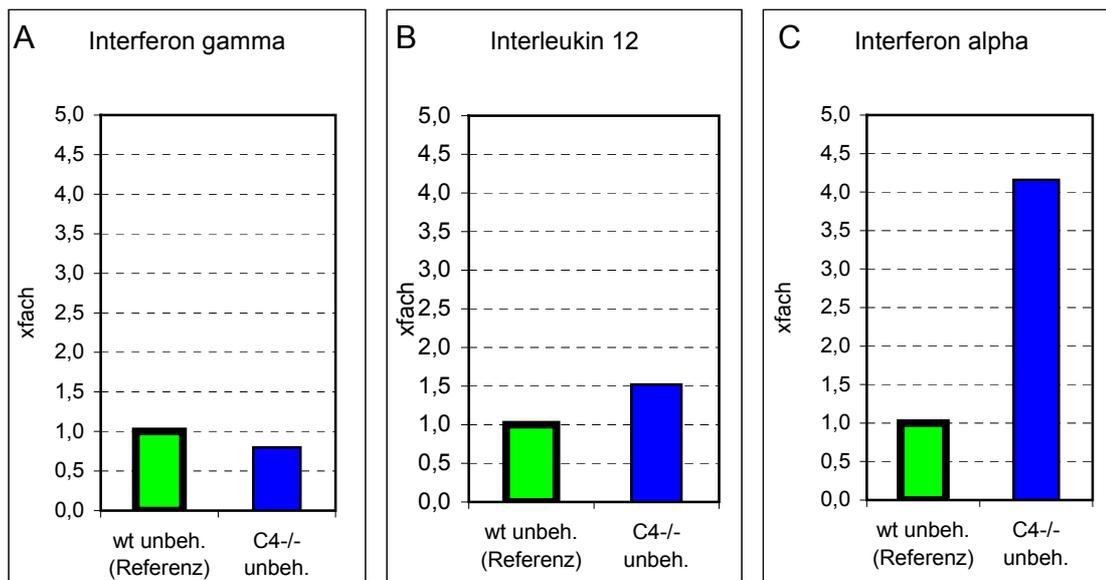
### 5.1.2 Nachweis von Interferon gamma, Interleukin 12 und Interferon alpha mRNA mittels RT-PCR aus Gesamt-RNA der Milz unbehandelter Mäuse

Da der Nachweis von IFN  $\alpha$  unbehandelter Mäuse im Bioassay nicht gelang, wurde mRNA aus Milzzellen nach Ficoll-Aufreinigung gewonnen und diese per RT-PCR auf die verschiedenen Zytokine getestet. Neben IFN  $\alpha$  wurden zwei weitere Leitzytokine (IFN  $\gamma$ , IL-12) zum Vergleich in die Untersuchung mit einbezogen. IFN  $\gamma$  und IL-12 sind proinflammatorische Zytokine, welche vorwiegend von T- und NK-Zellen (IFN  $\gamma$ ) bzw. Monozyten/Makrophagen und DC (IL-12) gebildet werden. Für diese Versuche wurden Mäuse im Alter von 6-16 Wochen verwendet. Zur Auswertung wurden die Ergebnisse von unbehandelten Wildtyp Mäusen jeweils auf 1,0 gesetzt und im Verhältnis dazu die Werte der C4-/- Mäuse.

Entsprechend der Hypothese sollte IFN  $\alpha$  als ein wichtiger Induktor von Autoantikörpern untersucht werden. Da C4-/- Mäuse erst im Alter von acht bis zwölf Monaten spontan Autoantikörper entwickeln, wurden die jungen Mäuse untersucht um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte die Folge einer manifesten SLE-Erkrankung sind. Die Mäuseren wurden zum Zeitpunkt der PCR-Untersuchungen auf

das Vorkommen von IgG-Autoantikörpern gegen dsDNA untersucht und diese konnten damit ausgeschlossen werden.

Bei C4<sup>-/-</sup> Mäusen kann im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied der mRNA der Zytokine IFN  $\gamma$  (**Abb. 6A**) und IL-12 (**Abb. 6B**) festgestellt werden. Bei den C4<sup>-/-</sup> Mäusen findet sich allerdings etwa 4,2 mal mehr IFN  $\alpha$  mRNA in der Milz als beim Wildtyp (**Abb. 6C**).



	Wt gesamt-RNA (Referenz)	C4 <sup>-/-</sup> gesamt-RNA	p=
Interferon gamma	<b>1,00</b>	0,8	0,5
Interleukin 12	<b>1,00</b>	1,52	0,5
Interferon alpha	<b>1,00</b>	4,16	0,3

**Abb.6: Graphische und tabellarische Darstellung des RT-PCR Ergebnis für IFN  $\gamma$ , IL-12 und IFN  $\alpha$  mRNA un behandelter Wt und C4<sup>-/-</sup> Mäuse.**

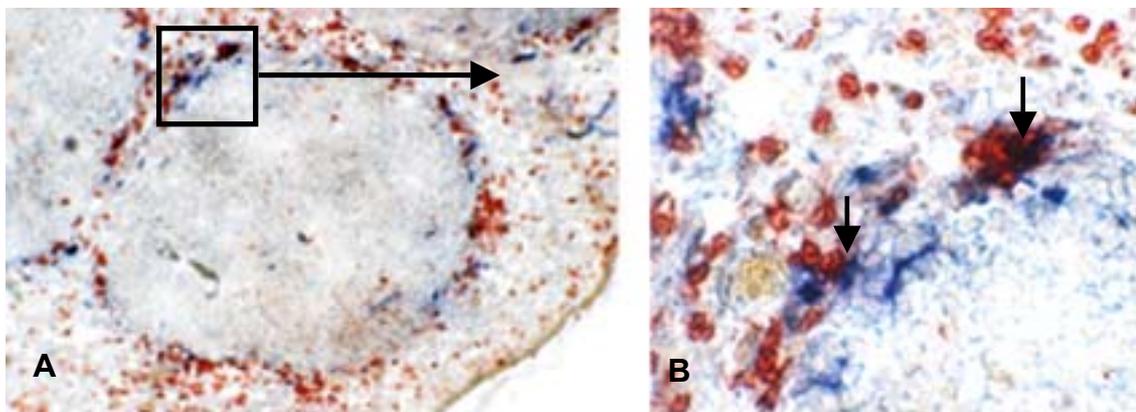
Die durchschnittlichen mRNA-Werte der Zellen der gesamten Milz un behandelter Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäuse wurden mittels RT-PCR quantifiziert. Die fett umrandeten Balken stellen die als Referenz (1,0) gesetzten Werte (wt unbeh.) dar, alle weiteren Werte geben das x-fache dieses Wertes an. Bei den Zytokinen IFN  $\gamma$  und IL-12 ist kaum ein Unterschied zwischen Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäusen zu erkennen (**A** und **B**). Bei IFN  $\alpha$  geht die Tendenz zu einer vermehrten Produktion (**C**). ( $n \geq 6$ )

## 5.2 Lokalisation und Charakterisierung Interferon alpha produzierender Zellen

Um die IFN  $\alpha$  produzierenden Zellen zu charakterisieren, wurde auf seriellen Gefrierschnitten von der Milz eine intrazelluläre Färbung mit dem anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper 4EA1 einschließlich der Gegenfärbung mit verschiedenen Oberflächenmarkern durchgeführt.

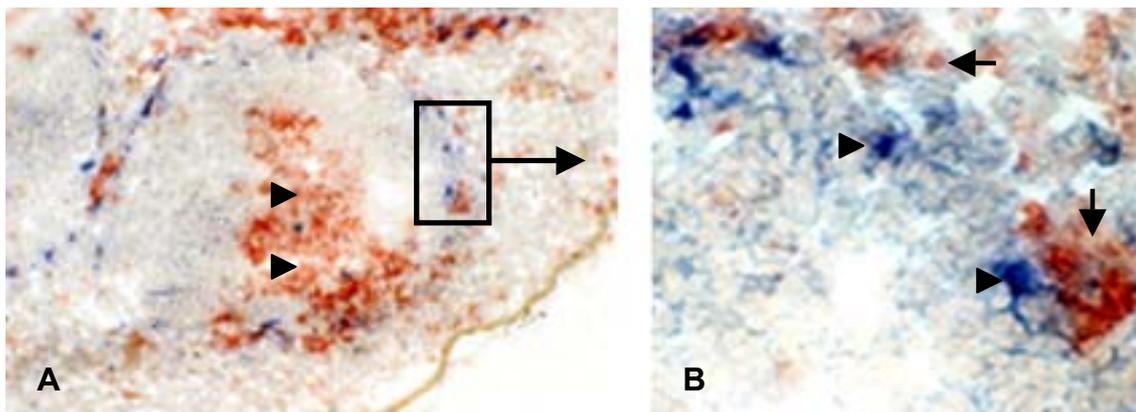
Dazu wurden Wildtyp Mäuse mit NDV stimuliert und die Milz nach 10 h entnommen. Intrazelluläre immunhistochemische Färbungen von Gefrierschnitten zeigten eine Lokalisation IFN  $\alpha$  produzierender Zellen im Bereich der marginalen Zone (**Abb. 8A**). Gegenfärbungen mit dem dendritischen Zellen-/Makrophagenmarker CD11b zeigen teilweise eine Kolokalisation der positiven Zellen an der marginalen Zone mit den IFN  $\alpha$  produzierenden Zellen (**Abb. 8B**).

Gegenfärbungen an Folgeschnitten mit dem Antikörper gegen CD11c zeigten eine Anreicherung der CD11c positiven Zellen im Bereich des Follikels (**9A, Pfeilköpfe**) und einige wenige Zellen in der marginalen Zone (**9B, Pfeile**). Größtenteils sind die CD11c positiven Zellen (**9B, Pfeile**) nicht IFN  $\alpha$  positiv (**9B, Pfeilköpfe**).



**Abb.8: Intrazelluläre Färbung von IFN  $\alpha$  (blau) und CD11b (rot) bei Milzschnitten NDV behandelter Wildtyp Mäuse.**

**Abb. A** (100x) zeigt die Lokalisation der IFN  $\alpha$  produzierenden Zellen in der marginalen Zone. In der vergrößerten **Abb. B** (400x) ist die Kolokalisation IFN  $\alpha$  produzierender Zellen und CD11b positiver Zellen deutlich sichtbar (Pfeile).

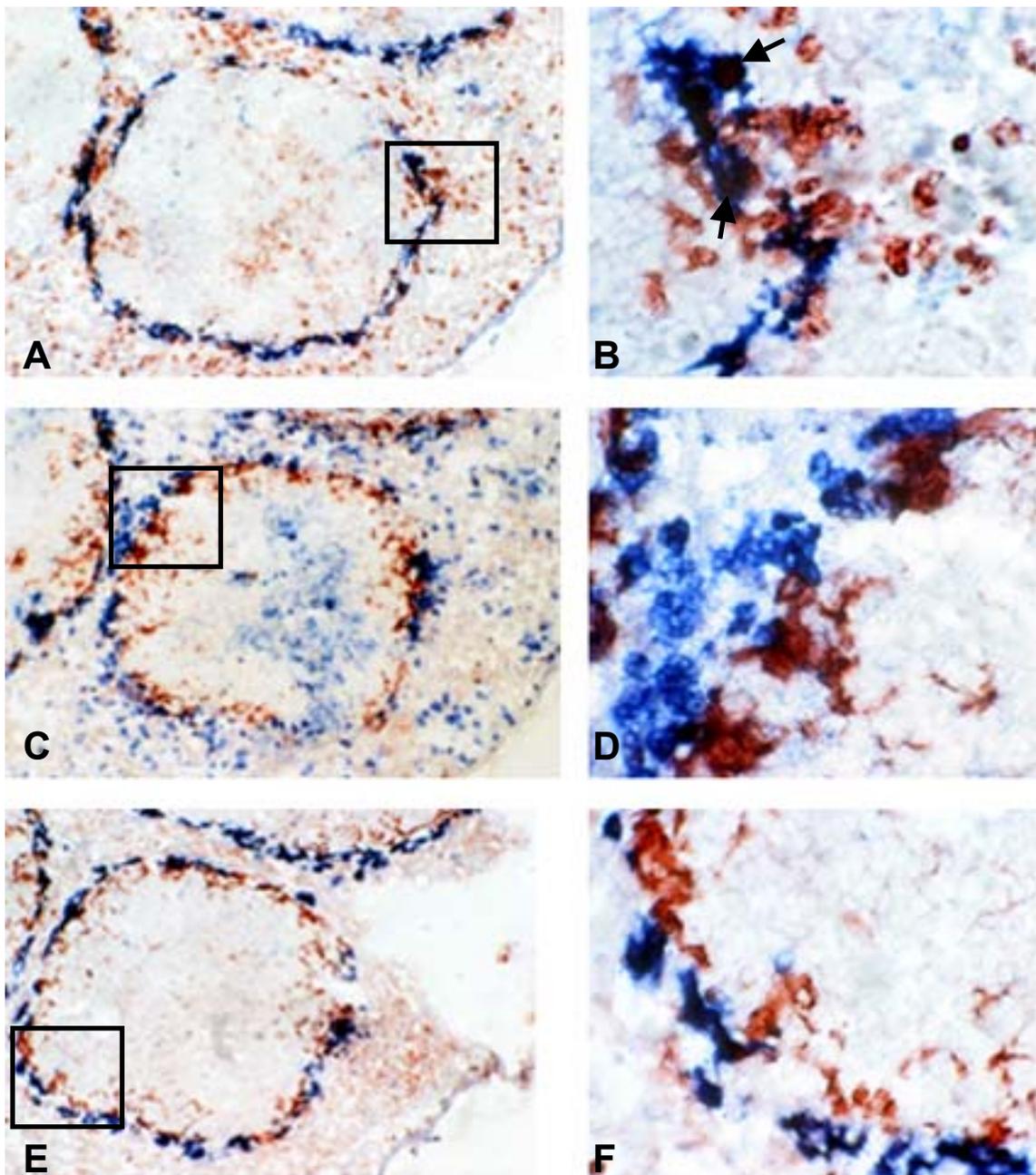


**Abb.9: Intrazelluläre Färbung von IFN  $\alpha$  (blau) und CD11c (rot) bei Milzschnitten NDV behandelter Wildtyp Mäuse.**

**Abb. A** (100x): Eine deutliche Anreicherung CD11c positiver Zellen ist im Bereich des Follikels zu erkennen (Pfeilkopf). **Abb. B** (400x): Wenige doppelpositive Zellen sind in der marginalen Zone lokalisiert, es finden sich eher getrennt IFN  $\alpha$  produzierende (Pfeilkopf) und CD11c positive Zellen (Pfeil).

Weitere Färbungen mit den DC-/Makrophagen-Markern ERTR-9, MoMa-1 und CD11b zeigten, dass ERTR-9 und CD11b positive Zellen größtenteils identisch (doppelpositiv) und beide im äußeren Bereich der marginalen Zone lokalisiert (**Abb. 10 A, B**) sind. Färbungen mit den Antikörpern gegen CD11b und MoMa-1 zeigten, dass die metallophilen Makrophagen (MoMa-1 positiv) einen inneren Kreis zu den CD11b positiven Zellen bilden und in der Mehrheit nicht mit CD11b doppel positiv sind (**Abb. 10 C, D**). Bei der Färbung von ERTR-9 gegen MoMa-1 (**Abb. 10 E, F**) zeigt sich ein ähnliches Bild wie in Abbildung 10 C/D, die Zellen liegen in benachbarten Bereichen sind aber nicht doppel positiv für diese beiden Marker.

Insgesamt finden sich relativ wenig IFN  $\alpha$  produzierende Zellen, wovon die meisten CD11b positiv und in der marginalen Zone lokalisiert sind und nur wenige IFN  $\alpha$  produzierende CD11c positiv sind.



**Abb.10: Immunhistochemische Färbungen verschiedener Oberflächenmarker an Gefrierschnitten der Milz einer NDV behandelten Wildtyp Maus.**

**Abb. A** (100x): ERTR-9 (blau) gegen CD11b (rot). **Abb. B** (400x) Ausschnittsvergrößerung von A (Kasten) teilweise Doppelpositivität (Pfeile) von CD11b und ERTR-9 in der marginalen Zone.

**Abb. C** (100x): CD11b (blau) gegen MoMa-1 (rot). **Abb. D** (400x): Ausschnittsvergrößerung von C (Kasten), keine Doppelpositivität von CD11b und MoMa-1.

**Abb. E** (100x): ERTR-9 (blau) gegen MoMa-1 (rot). **Abb. F** (400x): Ausschnittsvergrößerung von E (Kasten), keine Doppelpositivität von ERTR-9 und MoMa-1.

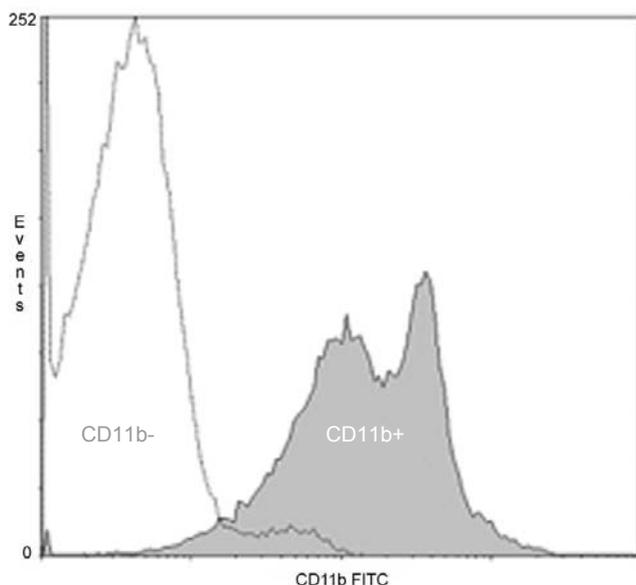
### 5.3 Zytokin mRNA Nachweis von CD11b positiven Zellen

Aufgrund der Erkenntnisse aus den immunhistochemischen Färbungen NDV behandelter Mäuse wurden die CD11b positiven Zellen aus den Milzen unbehandelter Mäuse mittels anti-CD11b-MACS-Beads separiert und die mRNA isoliert. Die PCR-Messungen wurden mit mRNA der CD11b positiven (CD11b+) und im Vergleich mit mRNA der CD11b negativen (CD11b-) Zellen durchgeführt. CD11b+ sind die durch die anti-CD11b-MACS-Beads an eine magnetische Säule gebundenen Zellen, CD11b- alle Zellen, welche nicht an die Säule gebunden haben.

Aus den Zellen wurde mRNA gewonnen und ein DNA-Verdau durchgeführt um eine Kontamination der Probe mit genomischer DNA auszuschließen.

#### 5.3.1 Reinheitsprüfung mittels Durchflusszytometer

Die Reinheitsüberprüfung erfolgte per Durchflusszytometrie (**Abb.11**). Mit der MACS-Aufreinigungsmethode wird eine durchschnittliche Reinheit von ~90% erreicht. Von den restlichen ~10% entsprachen ~52% B-Zellen und ~27% T-Zellen, die verbleibenden ~21% waren Zellen nicht bestimmter Spezifität.



**Abb.11: Beispiel einer Reinheitsmessung am Durchflußzytometer nach CD11b-Aufreinigung.**

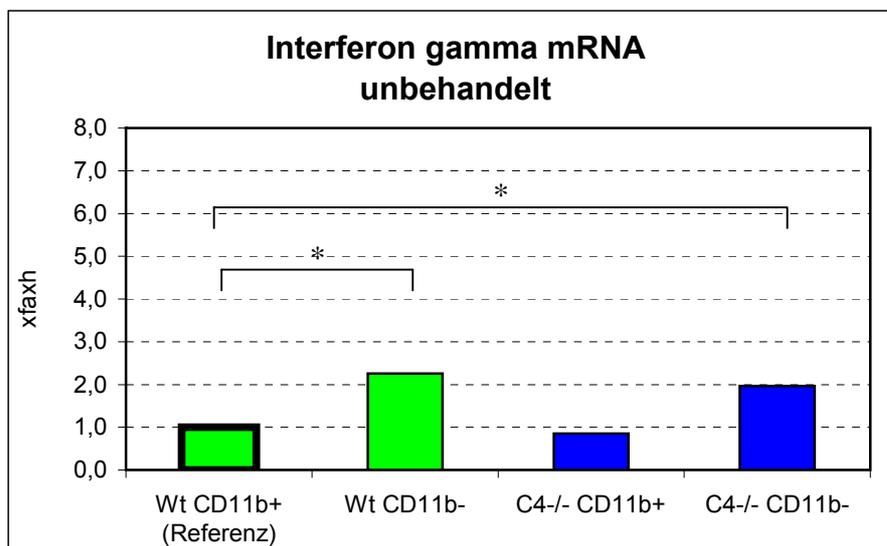
*Grau unterlegt ist die CD11b+ Fraktion, weiß die CD11b- Zellen. Mit der Aufreinigung per anti-CD11b-MACS-Beads wurde eine durchschnittliche Reinheit von ~90% erzielt, die verbleibenden ~10% setzten sich hauptsächlich aus B- und T-Zellen zusammen.*

### 5.3.2 RT-PCR für Interferon gamma, Interleukin 12 und Interferon alpha mRNA aus separierten Milzzellen unbehandelter Mäuse

Erneut wurde zur Auswertung das Ergebnis von CD11b<sup>+</sup> Zellen unbehandelter Wt Mäuse als Referenz auf 1,0 gesetzt. Die durchgeführte RT-PCR zeigte für IFN  $\gamma$  (**Abb. 12**) bei CD11b<sup>+</sup> Zellen einen minimalen Unterschied (Wt unbehandelt CD11b<sup>+</sup> als Referenz 1,0, C4<sup>-/-</sup> CD11b<sup>+</sup> 0,85). Mehr IFN  $\gamma$  mRNA als in der CD11b<sup>+</sup> Fraktion findet sich in den CD11b<sup>-</sup> Fraktionen sowohl bei Wildtyp als auch bei C4<sup>-/-</sup> Mäusen.

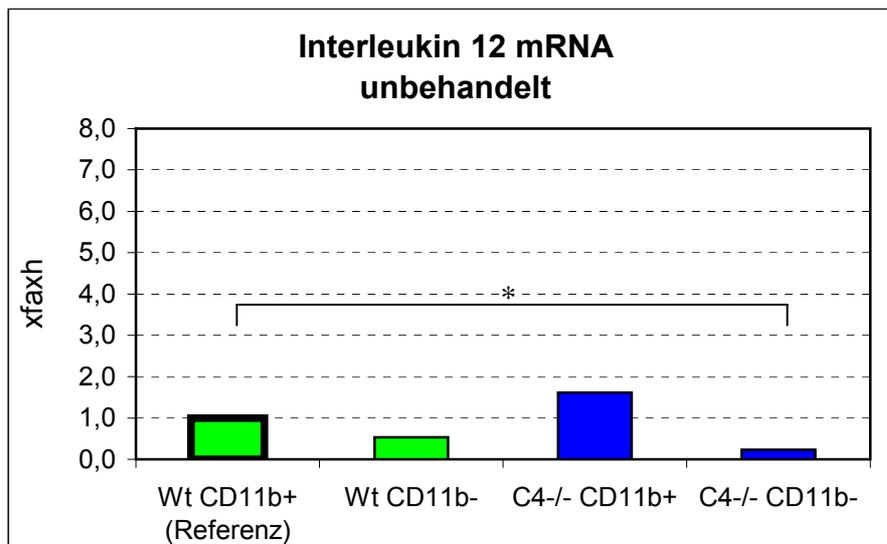
Bei Messungen der IL-12 mRNA Expression findet sich ein geringer Unterschied zwischen CD11b<sup>+</sup> Zellen der Wildtyp Mäuse (Referenz 1,0) und den CD11b<sup>+</sup> Zellen der C4<sup>-/-</sup> Mäuse (1,61). Die CD11b<sup>-</sup> Fraktion hat im Fall der Wildtyp Mäuse 0,54 mal soviel mRNA wie die wt CD11b<sup>+</sup> Fraktion. Die CD11b<sup>+</sup> Zellen der C4<sup>-/-</sup> Mäuse hatten 0,23 mal soviel mRNA wie die wt CD11b<sup>+</sup> Fraktion. (**Abb. 13**)

Ein signifikanter Unterschied findet sich bei Messung der IFN  $\alpha$  mRNA. Die CD11b<sup>+</sup> Zellen der C4<sup>-/-</sup> Mäuse haben 6,32 mal soviel mRNA wie die CD11b<sup>+</sup> Zellen der Wildtyp Mäuse. Die CD11b<sup>-</sup> Fraktion hat bei beiden Mausstämmen deutlich niedrigere mRNA Werte als die Referenz (**Abb. 14**).



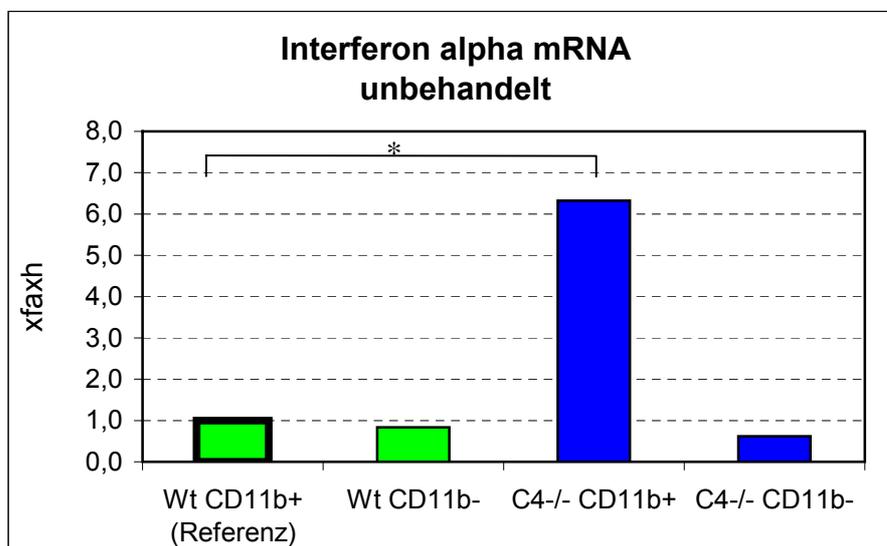
**Abb. 12: RT-PCR Ergebnis für IFN  $\gamma$  mRNA von unbehandelten Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäusen nach CD11b-Aufreinigung.**

IFN  $\gamma$  findet sich im Gegensatz zur Referenz (Wt CD11b<sup>+</sup> unbehandelt auf 1,0 gesetzt (fett)) signifikant erhöht in den CD11b<sup>-</sup> Fraktionen, sowohl bei Wildtyp als auch bei C4<sup>-/-</sup> Mäusen. Kein Unterschied zwischen den CD11b<sup>+</sup> Zellen der Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäuse. ( $n \geq 12$ ,  $*p \leq 0,04$ )



**Abb.13: RT-PCR Ergebnis für IL-12 mRNA von unbehandelten Wildtyp und C4-/- Mäusen nach CD11b-Aufreinigung.**

Bei Messung der IL-12 mRNA besteht ein geringer Unterschied zwischen den CD11b+ Fraktionen von Wildtyp und C4-/- Mäusen. In der negativen Fraktion der C4-/- findet sich signifikant weniger IL-12 mRNA als bei der Referenz (Wt CD11b+ unbehandelt auf 1,0 gesetzt (fett)). Die CD11b- Fraktion der Wt Mäuse exprimiert ebenfalls weniger mRNA als die CD11b+ Fraktion, hier nur als Trend ( $p=0,08$ ) messbar. ( $n \geq 11$ ,  $*p=0,0001$ )



**Abb.14: RT-PCR Ergebnis für IFN  $\alpha$  mRNA von unbehandelten Wildtyp und C4-/- Mäusen nach CD11b-Aufreinigung.**

Die Werte der IFN  $\alpha$  mRNA aus CD11b+ Zellen von C4-/- Mäusen heben sich von den als Referenz gesetzten Wt CD11b+ Zellen (fett) signifikant ab. Niedrigere IFN  $\alpha$  mRNA Expression findet sich in den negativen Fraktionen von Wt und C4-/- Mäusen. ( $n \geq 13$ ,  $*p=0,05$ )

	Wt CD11b+	Wt CD11b-		C4-/- CD11b+		C4-/- CD11b-	
	(Referenz)	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=
IFN $\gamma$	<b>1,00</b>	2,26*	0,02	0,85	0,35	1,97*	0,04
IL-12	<b>1,00</b>	0,54	0,08	1,61	0,43	0,23*	0,0001
IFN $\alpha$	<b>1,00</b>	0,84	0,8	6,32*	0,05	0,62	0,58

**Tabelle 1: Relative Darstellung der Werte für IFN  $\gamma$ , IL-12 und IFN  $\alpha$  unbehandelter Mäuse nach CD11b Aufreinigung im Bezug auf die als Referenz (1,00) gesetzten Werte Wt CD11b+ Zellen.**

Die Werte für Wt CD11b+ Zellen sind als Referenz 1,0 gesetzt, alle weiteren Werte geben das x-fache dieses Wertes an und den p-Wert im Bezug auf die Referenz. Signifikante Unterschiede finden sich hauptsächlich zwischen den positiven und negativen CD11b Fraktionen, wobei zwischen Wt und C4-/- Mäusen kaum Unterschiede erkennbar sind. Eine signifikante Unterscheidung zwischen Wt und C4-/- Mäusen findet sich innerhalb der CD11b+ Fraktion bei der IFN  $\alpha$  mRNA.

### 5.3.3 Nachweis von IFRG28 mRNA

Zum Nachweis der lokalen Wirksamkeit des IFN  $\alpha$  wurde das Gen IFRG28 getestet, welches ein klassisch Interferon-induzierbares Gen ist und sich durch eine reproduzierbare interferonabhängige Expression auszeichnet (R. Zawatzky, pers. Mitteilung).

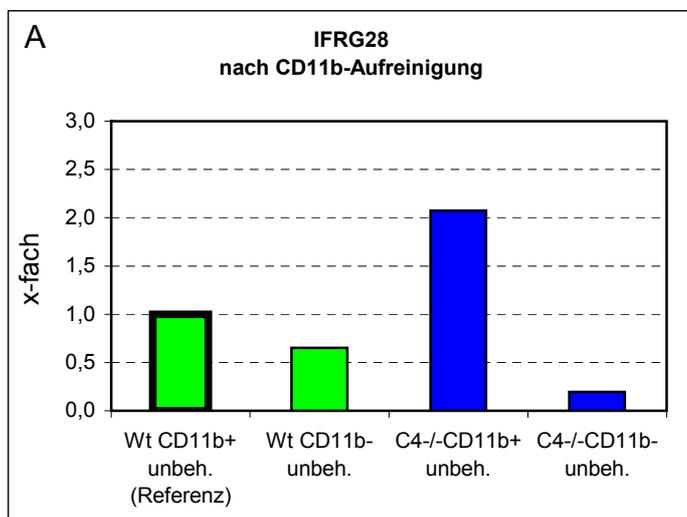
Da dieses Gen nur beim Vorhandensein des Interferon Proteins exprimiert wird, ist dies ein indirekter Nachweis dafür, dass nicht nur IFN  $\alpha$  mRNA, sondern auch das Protein IFN  $\alpha$  gebildet wird.

Untersucht wurden CD11b+ Zellen, B-Zellen (B220 positiv) und T-Zellen (CD90 positiv) unbehandelter Wildtyp und C4-/- Mäuse (**Abb.15A-C**).

IFRG28 mRNA findet sich vermehrt bei den C4-/- Mäusen exprimiert. Hierbei zeigt sich eine gesteigerte Expression in der CD11b+ Fraktion und in den B220- und CD90-Fraktionen.

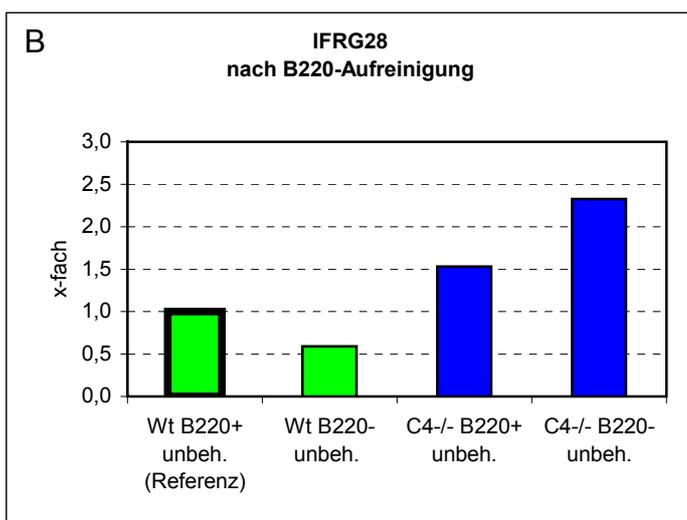
**Abb.15: RT-PCR Ergebnis für IFRG28 mRNA von unbehandelten Wildtyp und C4-/- Mäusen nach CD11b-Aufreinigung.**

Insgesamt wird bei C4-/- Mäusen mehr IFRG28 mRNA exprimiert als bei Wt Mäusen. Die Werte der positiven Fraktion der unbehandelten Wt Mäuse sind jeweils als Referenz auf 1,0 gesetzt (Wt CD11b+, Wt B220+ und Wt CD90+). (n≥5)

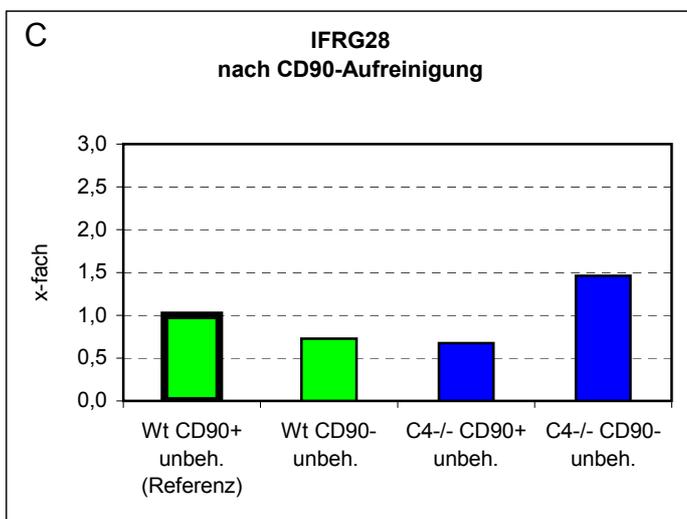


(Wt CD11b+, Wt B220+ und Wt CD90+). (n≥5)

**Abb. A:** Die IFRG28 mRNA bei unbehandelten Mäusen findet sich hauptsächlich in der CD11b+ Fraktion. In der CD11b+ Fraktion der C4-/- Mäuse fand sich etwa doppelt soviel IFRG28 mRNA wie bei den Wt Mäuse.



**Abb. B:** Es findet sich eher in der B220 negativen Fraktion der C4-/- Mäuse IFRG28 mRNA. Die B220 positive Fraktion der C4-/- Mäuse exprimiert 1,5mal soviel IFRG28 mRNA als die Referenz (Wt unbeh. B220+).



**Abb. C:** Auch bei der CD90-Aufreinigung findet sich mehr IFRG28 mRNA in der CD90 negativen Fraktion der C4-/- Mäuse.

## 5.4 Zytokinproduktion nach Applikation von IgM anti-dsDNA-Immunkomplexen

Für die weiteren Untersuchungen wurde ein neues Immunkomplexmodell etabliert. Ein muriner monoklonaler IgM Antikörper gegen dsDNA wurde hierfür intravenös appliziert. Antikörper gegen dsDNA gelten als diagnostisch wegweisend beim SLE, aus diesem Grund wurde dieses neue Immunkomplexmodell gewählt, um den Einfluss des wichtigen Lupus relevanten Antigens dsDNA untersuchen zu können. Verwendet wurde der IgM anti-dsDNA-Antikörper der Hybridomzelllinie 111s.19.

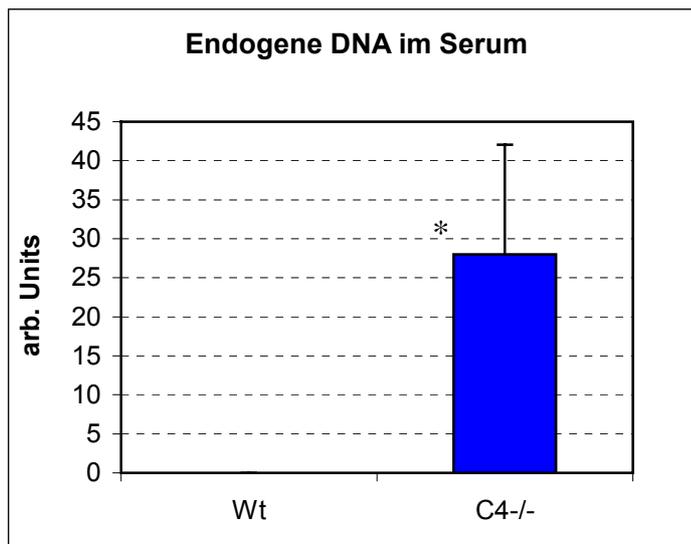
### 5.4.1 Nachweis endogener DNA

Als Antigen für den applizierten Antikörper sollte körpereigene endogene DNA dienen, welche zunächst nachgewiesen werden musste. Der Nachweis erfolgte mit einem selbstentwickeltem ELISA unter Einsatz des 111s.19 Antikörpers (anti-dsDNA-IgM).

Im Gegensatz zu den Wildtyp Mäusen, welche im ELISA negativ waren, konnten wir bei den C4<sup>-/-</sup> Mäusen im Serum extrazelluläre DNA nachweisen (**Abb.16**). Sechs von neun C4<sup>-/-</sup> Mäusen waren positiv im ELISA-Test. Beim Wildtyp waren alle getesteten Mäuse negativ (n=6).

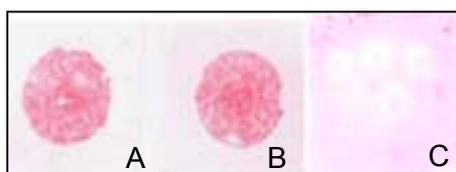
Durch die Einführung eines selbstentwickelten sensitiveren Nachweissystems, des TUNEL-Dotblots, war es möglich, auch bei Wildtyp-Mäusen endogene (apoptotische) DNA nachzuweisen (**Abb. 17**). Das in dem TUNEL-Reagenz enthaltene Enzym TdT hängt an die bei der Apoptose entstehenden freien DNA-Enden markierte dNTP-Nukleotide an. Hierbei handelt es sich um eine qualitative, nicht um eine quantitative Methode.

Anhand dieser Ergebnisse wurde sichergestellt, dass die korrespondierenden Zielantigene intravaskulär für das i.v. applizierte IgM anti-dsDNA zur Verfügung stehen.



**Abb. 16: Nachweis endogener DNA im Serum von Wt und C4-/- Mäusen mittels ELISA.**

In dem Serum der Wildtyp Mäuse war keine DNA messbar, bei den C4-/- Mäusen konnte ein Wert von 28,1 arb. Units ermittelt werden. ( $n \geq 6$ ,  $*p=0,003$ ).



**Abb.17: Nachweis endogener apoptotischer DNA im Serum von Wt und C4-/- Mäusen mittels TUNEL-Dotblot.**

**Abb. A:** Nachweis endogener DNA aus Serum von Wt Mäusen. **Abb. B:** Nachweis endogener DNA aus Serum von C4-/- Mäusen. **Abb. C:** Als Negativkontrolle wurde Serum eingesetzt, aus welchem im Vorwege die DNA isoliert worden ist.

#### 5.4.2 Untersuchung zur Anreicherung des radioaktiv markierten IgM anti-dsDNA in verschiedenen Organen

Die Untersuchungen zur spezifische Deposition des IgM anti-dsDNA in den Organen wurden mittels radioaktiv markierten Antikörpers durchgeführt.

C4-/- sowie Wildtyp Mäusen wurden 4  $\mu\text{g}$  des IgM anti-dsDNA i.v. injiziert, welcher zuvor mit dem Radionuklid Jod<sup>123</sup> markiert wurde. Nach Verabreichung des radioaktiv markierten Antikörpers reichert sich dieser in Organen oder Gewebe an. Das kurzlebige Radionuklid sendet Gamma-Strahlung aus, die mit Hilfe eines geeigneten Detektors gemessen werden kann.

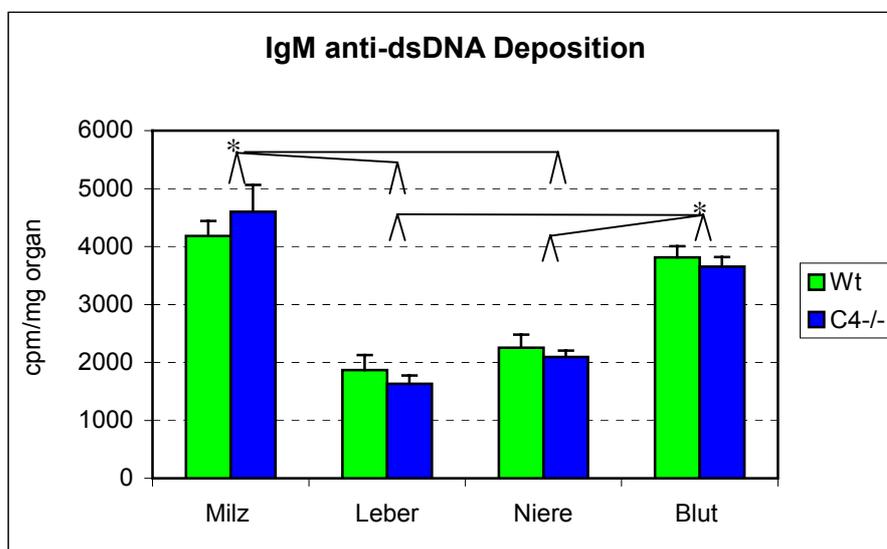
Um die spezifische Menge pro Organ zu bestimmen, wurden verschiedene Organe wie Milz, Leber, Niere und Blut 30 Minuten nach Applikation des Antikörpers entnommen und die Aktivität mittels eines Bohrloch-Gammazählers bestimmt.

Die Verabreichung von IgM anti-dsDNA führte zu einer deutlichen Anreicherung in der Milz verglichen mit der Aufnahme in die Niere oder die Leber. Nach 30 Minuten befindet sich noch ein Teil des Antikörpers in der Zirkulation, welches an den relativ hohen Blutwerten zu erkennen ist. Allerdings zeigte sich nur ein unwesentlicher Unterschied zwischen C4<sup>-/-</sup> und Wildtypmäusen (**Abb.18**).

Die Verteilung der Aktivität im Körper kann in einem Szintigramm als Bild dargestellt werden. Die Registrierung der Gamma-Strahlung erfolgte mit einer Szintigraphie Dreikopfkamera (**Abb.19**).

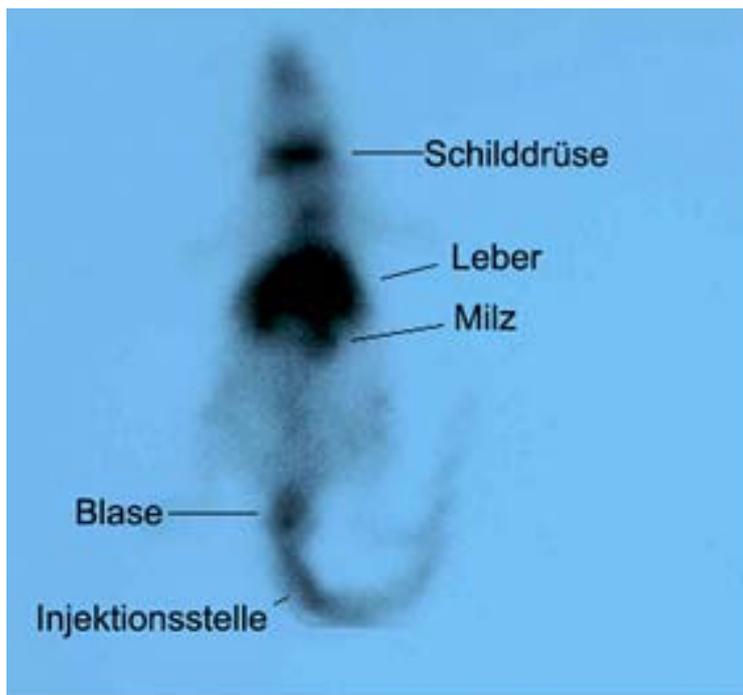
Anreicherungsorte für das radioaktiv markierte IgM sind die Leber und die Milz. Die Nieren sind überdeckt durch die stark positive Leber. Freies Jod<sup>123</sup> findet sich vermehrt in der Schilddrüse. Die i.v.-Injektionsstelle ist im oberen Schwanzdrittel unterhalb der ebenfalls leicht positiven Blase gut sichtbar. Ansonsten ist keine Beteiligung anderer Organe auffallend.

Die schwache Strahlung der gesamten Maus wird durch den noch in der Zirkulation befindlichen restlichen Antikörper verursacht.



**Abb.18: Anreicherung des IgM-anti-dsDNA-Antikörpers nach 30 Minuten bei Wt und C4<sup>-/-</sup> Mäusen (Angabe in Counts per minute/mg Organ).**

Es war kein signifikanter Unterschied zwischen Wt und C4<sup>-/-</sup> Mäusen messbar. Signifikante Anreicherungen des Antikörpers fanden in der Milz und im Blut im Verhältnis zur Leber oder zur Niere statt, unabhängig vom Mausstamm. Die höchsten Werte wurden für die Milz ermittelt. ( $n \geq 5$ ,  $*p < 0,008$ )



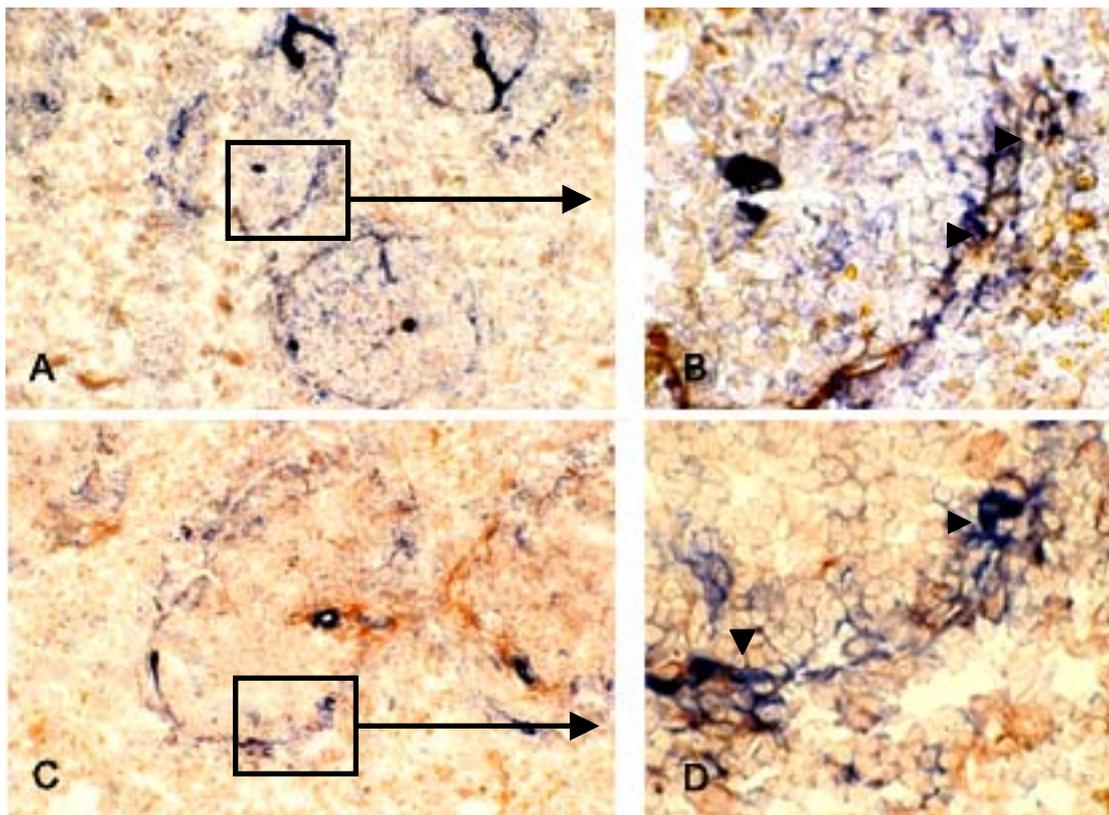
**Abb. 19: Szintigramm 30 Minuten nach 4 µg IgM anti-dsDNA- $J^{123}$ -Injektion.**

*In der Schilddrüse sammelt sich das ungebundene  $J^{123}$ . Eine starke Anreicherung findet sich in Leber und Milz (die Nieren sind durch die Leber überdeckt). Deutlich erkennbar ist die Injektionsstelle am Schwanz und die Blase.*

#### **5.4.3 Deposition des IgM anti-dsDNA in der marginalen Zone der Milz**

Zum Nachweis der Lokalisation des applizierten IgM anti-dsDNA innerhalb der Milz wurde der Antikörper mit Biotin markiert und 5 µg i.v. injiziert. Die Milzentnahme für die immunhistochemischen Färbungen erfolgte nach 30 Minuten.

In den immunhistochemischen Färbungen ist eine Deposition des Antikörpers an der marginalen Zone zu erkennen. Zwischen Wildtyp- und C4<sup>-/-</sup> Mäusen gibt es keinen sichtbaren Unterschied (**Abb. 20 A-D**).



**Abb.20:** Immunhistochemische Färbung des biotin-markierten IgM anti-dsDNA Antikörpers (blau) gegen PNA (rot) in der Milz.

**Abb. A** (100x) und **B** (400x): Immunhistochemische Färbung bei einer Wildtyp Maus. **Abb. C** (100x) und **D** (400x): Immunhistochemische Färbung bei einer C4<sup>-/-</sup> Maus. Zu sehen ist die Anlagerung des Antikörpers (blau) an die marginale Zone der Milz bei beiden Mausstämmen (Pfeilköpfe B,D).

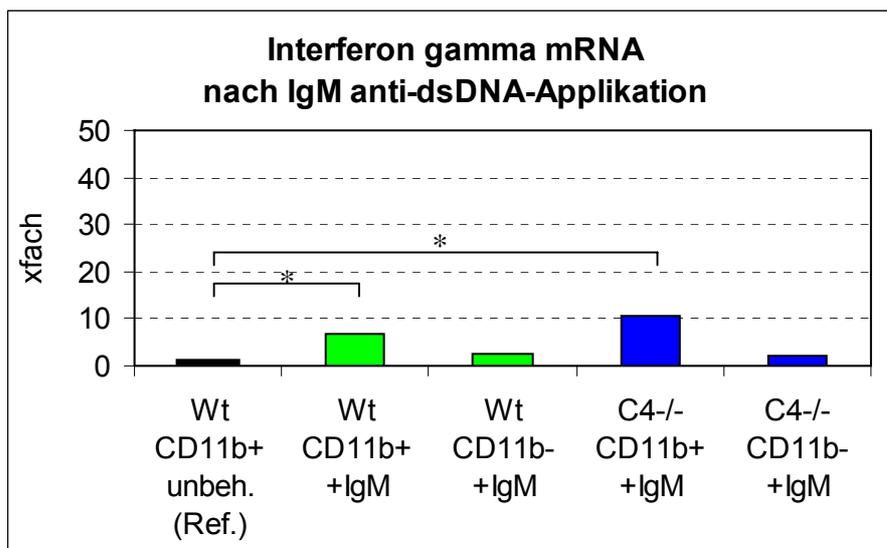
#### 5.4.4 Interferon gamma, Interleukin 12 und Interferon alpha RT-PCR nach IgM anti-dsDNA-Applikation

Mit Hilfe der selbst entwickelten Real-time PCR für murines IFN  $\alpha$ , sowie für IFN  $\gamma$  und IL-12 wurde die Auswirkung der Immunkomplexablagerungen auf die Zytokinproduktion untersucht. Um festzustellen, ob sich die Zytokinprofile bei Anwesenheit von Immunkomplexen an der marginalen Zone verändern, wurde den Mäusen 20  $\mu$ g des IgM anti-dsDNA-Antikörpers i.v. injiziert und nach 6 h die Milz entnommen und die CD11b<sup>+</sup> Zellen isoliert.

Sowohl bei Wildtyp als auch bei C4<sup>-/-</sup> Mäusen kam es nach IgM anti-dsDNA-Applikation zu einem signifikanten Anstieg der IFN  $\gamma$  mRNA in der CD11b<sup>+</sup> Fraktion, geringe Anstiege sind auch in der negativen Fraktion zu messen (**Abb. 21, Tabelle 2**). In der IL-12 Produktion wirkt sich die Immunkomplexdeposition hauptsächlich auf die auf die CD11b<sup>+</sup> Fraktion der C4<sup>-/-</sup> Mäuse aus.

Die CD11b<sup>+</sup> Fraktion der C4<sup>-/-</sup> Mäuse produziert nach IgM anti-dsDNA-Applikation 3,55 mal soviel IL-12 mRNA wie die Referenz. Im Vergleich zeigt sich nur eine geringfügige Steigerung in der positiven Fraktion der Wildtyp Mäuse (**Abb. 22, Tabelle 3**).

Die Immunkomplex-Anreicherung bewirkt sowohl beim Wildtyp als auch bei den C4<sup>-/-</sup> Mäusen eine signifikante Steigerung der IFN  $\alpha$  mRNA. Die Zellen der CD11b<sup>+</sup> Fraktion produzieren bis zu 40 mal mehr IFN  $\alpha$  mRNA als die Referenz (**Abb. 23, Tabelle 4**).



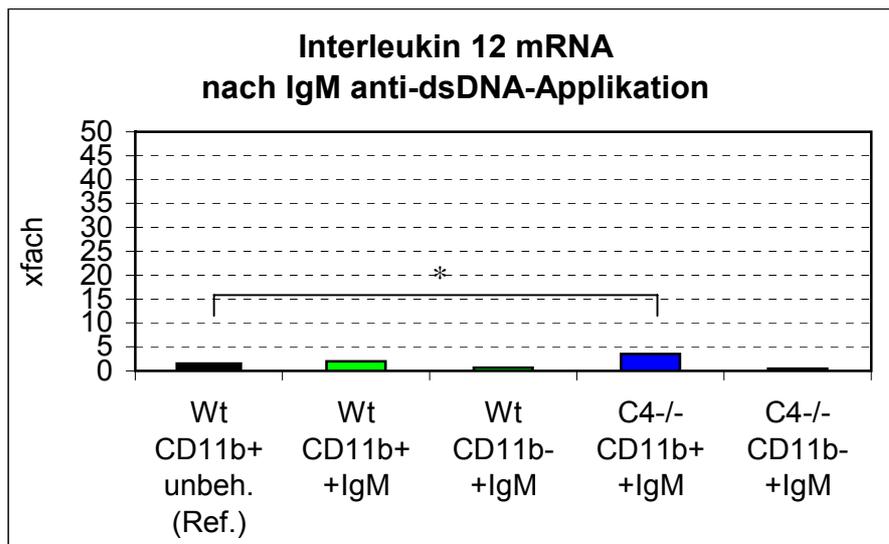
**Abb.21: RT-PCR Ergebnis für IFN  $\gamma$  mRNA nach IgM anti-dsDNA-Applikation und CD11b Aufreinigung bei Wildtyp und C4-/- Mäusen.**

Ein Anstieg der IFN  $\gamma$  mRNA in der CD11b+ Fraktion ist zu erkennen. Die CD11b- Fraktion zeigt keine Veränderung nach IgM anti-dsDNA-Applikation. (n=5, \*p $\leq$ 0,004)

Interferon gamma	wt CD11b+		wt CD11b-		C4-/- CD11b+		C4-/- CD11b-	
	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=
Unbehandelt (Vgl. 5.3.2)	<b>1,00</b>		2,26*	0,02	0,85	0,35	1,97*	0,04
20 $\mu$ g anti-dsDNA-IgM	6,58*	0,004	2,34	0,11	10,52*	0,002	2,24	0,22

**Tabelle 2: Relative Darstellung der Werte für IFN  $\gamma$  un behandelter und mit IgM anti-dsDNA behandelte Mäuse nach CD11b-Aufreinigung im Bezug auf die als Referenz (1,0) gesetzten Werte der Wt CD11b+ Zellen.**

Die Werte für Wt CD11b+ Zellen sind als Referenz 1,0 gesetzt, alle weiteren Werte geben das x-fache dieses Wertes an und den p-Wert im Bezug auf die Referenz. Die Applikation von IgM anti-dsDNA führt in der CD11b+ Fraktion sowohl beim Wildtyp als auch bei den C4-/- Mäusen zu einem signifikanten Anstieg der IFN  $\gamma$  mRNA.



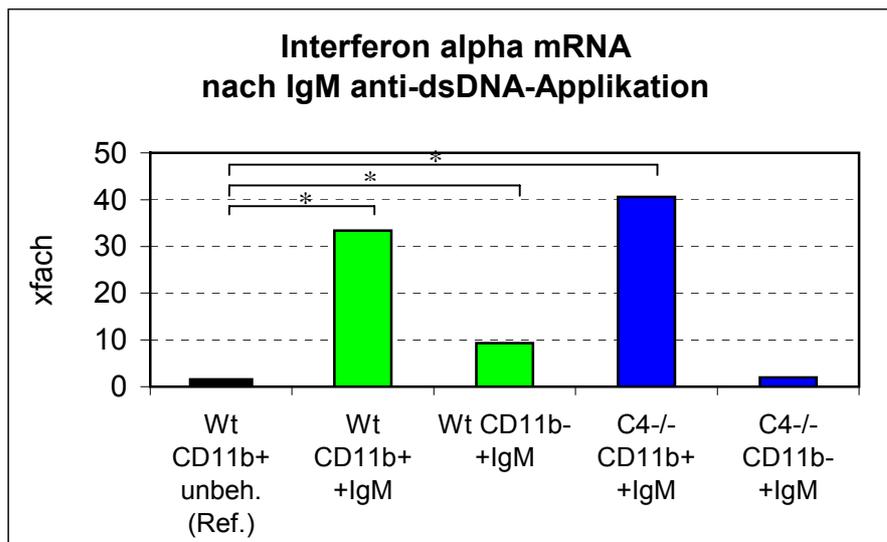
**Abb.22: RT-PCR Ergebnis für IL-12 mRNA nach IgM anti-dsDNA-Applikation und CD11b Aufreinigung bei Wildtyp und C4-/- Mäusen.**

Eine signifikante Erhöhung der IL-12 mRNA im Vergleich zur Referenz (wt unbeh. CD11b+(fett)) ist in der positiven Fraktion bei C4-/- Mäusen messbar. (n=5\*p=0,006)

Interleukin 12	wt CD11b+		wt CD11b-		C4-/- CD11b+		C4-/- CD11b-	
	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=
Unbehandelt (Vgl. 5.3.2)	<b>1,00</b>		0,54	0,08	1,61	0,43	0,23	0,0001
20 µg anti-dsDNA-IgM	2,02	0,32	0,64	0,32	3,55*	0,006	0,49	0,13

**Tabelle 3: Relative Darstellung der Werte für IL-12 unbehauelter und mit IgM anti-dsDNA behauelter Mäuse nach CD11b-Aufreinigung im Bezug auf die als Referenz (1,0) gesetzten Werte der Wt CD11b+ Zellen.**

Die Werte für Wt CD11b+ Zellen sind als Referenz 1,0 gesetzt, alle weiteren Werte geben das x-fache dieses Wertes an und den p-Wert im Bezug auf die Referenz.



**Abb.23: RT-PCR Ergebnis für IFN  $\alpha$  mRNA nach IgM anti-dsDNA-Applikation und CD11b Aufreinigung bei Wildtyp und C4-/- Mäusen.**

Sowohl in Wildtyp als auch in C4-/- Mäusen zeigt sich ein deutlicher Anstieg in der CD11b+ Fraktion. In der negativen Fraktion ist nur bei den Wildtyp Mäusen ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen. (n=8, \*p<0,004)

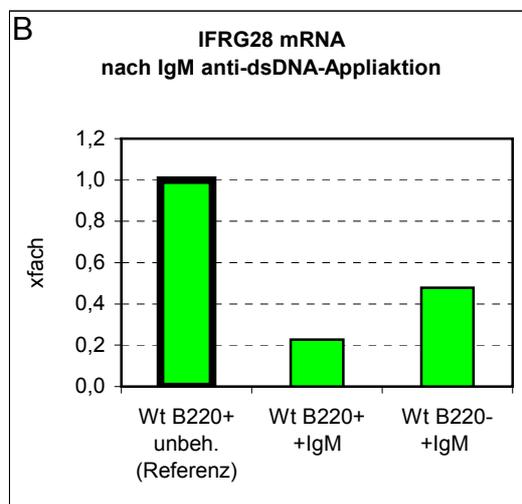
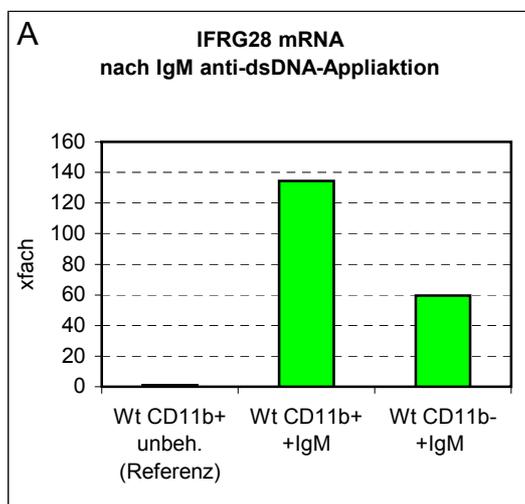
Interferon alpha	wt CD11b+		wt CD11b-		C4-/- CD11b+		C4-/- CD11b-	
	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=
Unbehandelt (Vgl. 5.3.2)	1,00		0,54	1,00	6,32*	0,05	0,53	0,42
20 $\mu$ g anti-dsDNA-IgM	33,4*	0,0001	9,34*	0,015	40,95*	0,0001	1,95	0,64

**Tabelle 4: Relative Darstellung des Wertes für IFN  $\alpha$  unbehandelter und mit IgM anti-dsDNA behandelter Mäuse nach CD11b-Aufreinigung im Bezug auf die als Referenz (1,0) gesetzten Werte der Wt CD11b+ Zellen.**

Die Werte für Wt CD11b+ Zellen sind als Referenz 1,0 gesetzt, alle weiteren Werte geben das x-fache dieses Wertes an und den p-Wert im Bezug auf die Referenz.

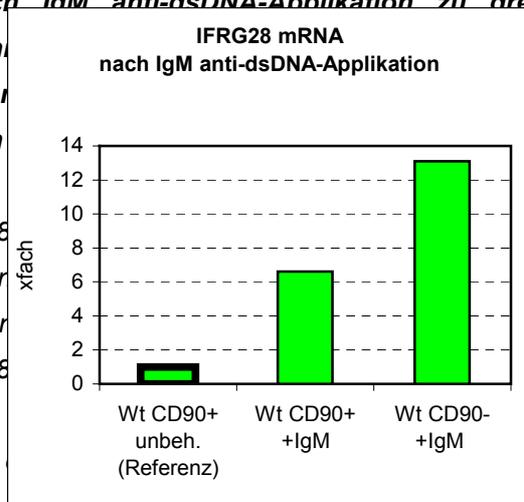
### 5.4.5 Nachweis von IFRG28 mRNA nach IgM anti-dsDNA-Applikation

Da hier der Nachweis von IFN  $\alpha$  Protein im Bioassay misslang, wurde alternativ die Aktivierung des interferoninduzierten Genes IFRG28 nach IgM-Applikation untersucht. Untersucht wurden CD11b (Abb. 24A), B220 (Abb. 24B) und CD90 (Abb. 24C) aufgereinigte Zellen nach der Applikation von 20  $\mu$ g IgM anti-dsDNA-Applikation an wenigen Wildtyp Mäusen. Deutlich zeigt sich, dass das interferoninduzierte Gen IFRG28 ca. 20 h nach IgM anti-dsDNA-Applikation in der CD11b+ und zu einem geringeren Teil auch in der CD11b- Fraktion verstärkt exprimiert wird. In B-Zellen (B220+) kommt es kaum zu einer verstärkten Expression. Die T-Zellen (CD90+) exprimieren weniger IFRG28 mRNA als die CD 90- Fraktion (Abb. 24 A-C).



**Abb. 24: RT-PCR Ergebnis für IFRG28 mRNA 20 h nach IgM anti-dsDNA-Applikation zu drei verschiedenen Mäusen**

In den Mäusen IFRG28 Referenzfraktion IFRG28 wie die B220+ gesteigerte Expression messbar (Abb. B): (1122)

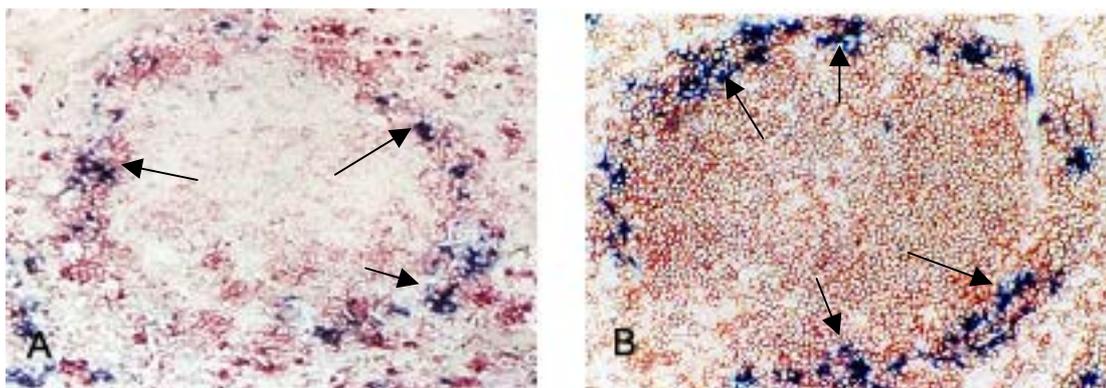


## 5.5 Untersuchung der Zytokine nach TNP-Ficoll-Applikation

Da die Ablagerung von IgM anti-dsDNA offenbar zu einer deutlichen Zytokinantwort führt, wurde untersucht, ob dies ein spezifischer Effekt des IgM anti-dsDNA-DNA-Komplexes ist oder ob dies eine unspezifische Folge der Anlagerung an sich ist. Hierfür wurde ein T-zellunabhängiges Antigen verwendet.

Die Kohlenhydratverbindung TNP-Ficoll gilt als T-zellunabhängiges Antigen und lagert sich nach i.v.-Verabreichung in der marginalen Zone der Milz an. TNP (2,4,6-Trinitrophenyl) ist ein Hapten, wird dieses an einen sogenannten „Carrier“ gekoppelt, entscheidet dieser über die T-zellab- bzw. -unabhängigkeit. Der Nachweis im Gefrierschnitt der Milz erfolgt mittels eines anti-TNP-Antikörpers.

Die Anlagerung von TNP-Ficoll an die marginale Zone der Milz ist bei der immunhistochemischen anti-TNP-Färbung gut zu erkennen (**Abb. 25**).



**Abb. 25: Immunhistochemische Färbungen von TNP gegen CD11b und B220 bei Wildtypmäusen 6 h nach TNP-Ficoll-Applikation.**

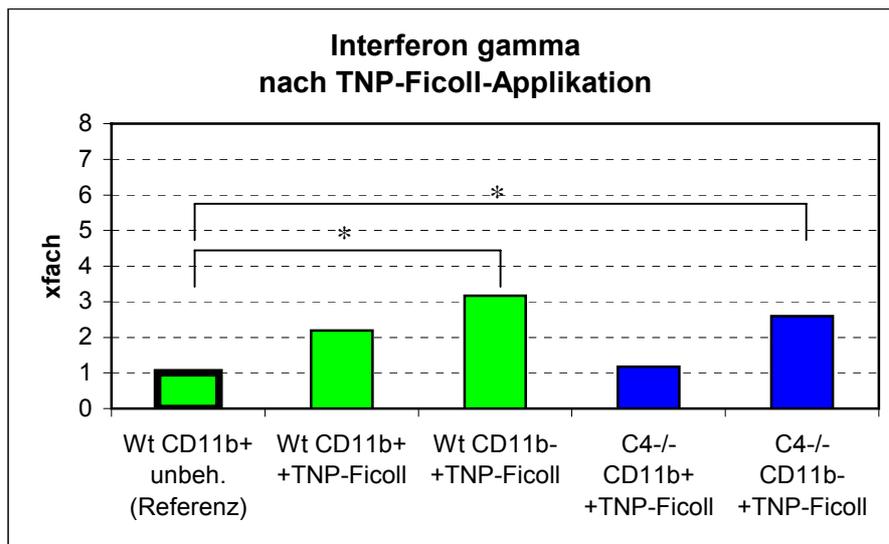
Milzentnahme 6 h nach 25 µg TNP-Ficoll-Injektion. **Abb A** (200x): Färbung von TNP (blau) gegen CD11b (rot). **Abb. B** (200x): Färbung von TNP (blau) und B220 (rot). Deutlich erkennbar ist die spezifische Anreicherung von TNP (blau) in der marginalen Zone der Milz (Pfeile).

Zur Zytokinbestimmung wurde den Mäusen 25 µg TNP-Ficoll i.v. injiziert, die Milzentnahme erfolgte 6 h nach Applikation. Die Aufarbeitung des Materials und Gewinnung der mRNA wurden entsprechend den anderen Versuchen durchgeführt. Die Deposition eines T-zellunabhängigen Antigens führt bei der CD11b+ Fraktion zu keiner gesteigerten Expression der IFN  $\gamma$  mRNA. Die negativen Fraktionen der Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäuse produzieren signifikant mehr IFN  $\gamma$  mRNA. Im Vergleich zur Injektion des IgM anti-dsDNA zeigen sich hier nur geringe Unterschiede in der IFN  $\gamma$  mRNA-Expression. Das IgM führte zu einem Anstieg der IFN  $\gamma$  mRNA in der positiven Fraktion

sowohl von WT als auch C4<sup>-/-</sup> Mäusen (s. 5.4.4), TNP-Ficoll zeigte keinen Einfluss auf diese Fraktionen (**Abb. 26, Tabelle 5**).

Weiterhin ist TNP-Ficoll kaum in der Lage die IL-12 mRNA-Expression zu beeinflussen. In der positiven Fraktion der Wildtyp Mäuse ist eine minimale Steigerung zu vermerken, eine signifikante Steigerung der IL-12 mRNA ist in der positiven Fraktion der C4<sup>-/-</sup> Mäuse nach TNP-Ficoll-Injektion nachweisbar (ähnliche Reaktionen zeigten sich bei IgM anti-dsDNA-Applikation). Kaum Veränderungen sind in den negativen Fraktionen messbar (**Abb. 27, Tabelle 6**).

Bei Messungen der IFN  $\alpha$  mRNA Expression zeigt sich, dass TNP-Ficoll einen, dem IgM anti-dsDNA gegenteiligen Effekt hat. Es kommt eher zu einer verringerten Expression der IFN  $\alpha$  mRNA nach TNP-Ficoll-Gabe (**Abb. 28, Tabelle 7**).



**Abb.26: RT-PCR Ergebnis für IFN  $\gamma$  mRNA nach TNP-Ficoll-Applikation und CD11b Aufreinigung bei Wildtyp und C4-/- Mäusen.**

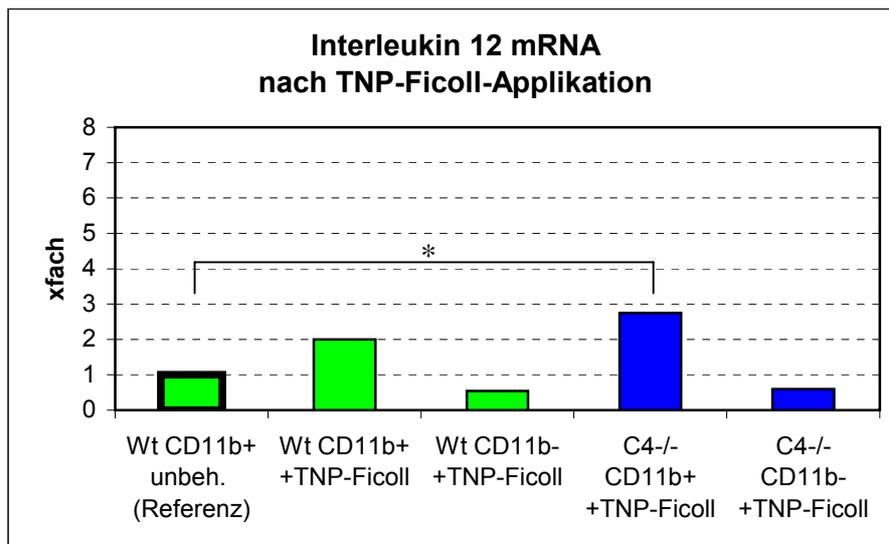
Sechs Stunden nach Applikation des TNP-Ficolls kommt es zu einer signifikanten Steigerung der IFN  $\gamma$  mRNA in der CD11b- Fraktion bei Wildtyp und C4-/- Mäusen im Vergleich zur Referenz (Wt unbeh. CD11b+ Zellen). ( $n > 7$ ,  $*p \leq 0,02$ )

Interferon gamma	Wt CD11b+		Wt CD11b-		C4-/- CD11b+		C4-/- CD11b-	
	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=
Unbehandelt (Vgl. 5.3.2)	1,00		2,26*	0,02	0,85	0,35	1,97*	0,04
20 $\mu$ g anti-dsDNA-IgM (Vgl. 5.4.4)	6,58*	0,004	2,34	0,11	10,52*	0,002	2,24	0,22
25 $\mu$ g TNP-Ficoll	2,19	0,41	3,17*	0,004	1,17	0,81	2,59*	0,02

**Tabelle 5: Relative Darstellung der Werte für IFN  $\gamma$  unbehauelter, mit IgM anti-dsDNA und TNP-Ficoll behauelter Mäuse nach CD11b-Aufreinigung im Bezug auf die als Referenz (1,0) gesetzten Werte der Wt CD11b+ Zellen.**

Die Applikation von TNP-Ficoll führt zu einer signifikanten Steigerung der IFN  $\gamma$  mRNA in der CD11b- Fraktion bei Wildtyp und C4-/- Mäusen.

Die negativen Fraktionen der Wildtyp und C4-/- Mäuse produzieren signifikant mehr IFN  $\gamma$  mRNA ähnlich dem unbehauelten Zustand



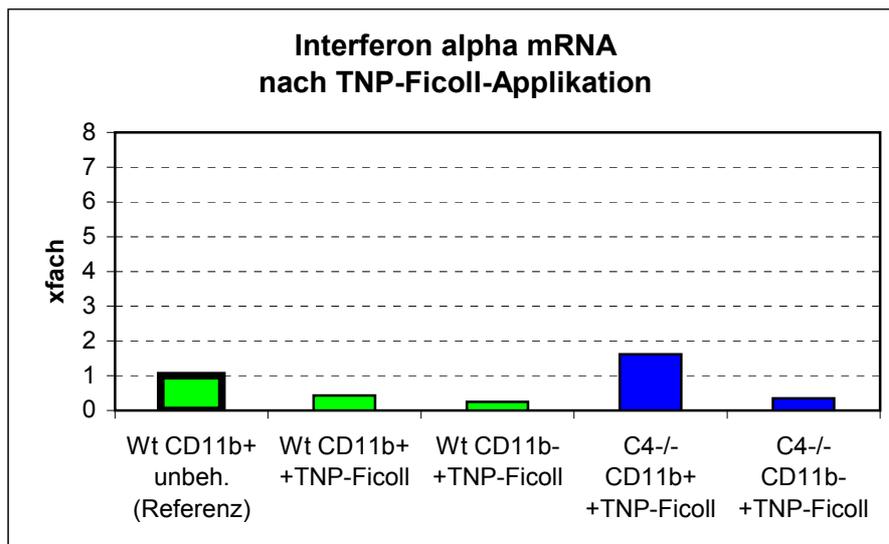
**Abb.27: RT-PCR Ergebnis für IL-12 mRNA nach TNP-Ficoll-Applikation und CD11b Aufreinigung bei Wildtyp und C4-/- Mäusen.**

Es sind nur geringe Veränderungen in der IL-12 mRNA Expression nach Applikation des TNP-Ficolls bei C4-/- und Wildtyp Mäusen messbar. ( $n > 7$ ,  $*p = 0,02$ )

Interleukin 12	Wt CD11b+		Wt CD11b-		C4-/- CD11b+		C4-/- CD11b-	
	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=
Unbehandelt (Vgl. 5.3.2)	1,00		0,54	0,08	1,61	0,43	0,23*	0,0001
20 µg anti-dsDNA-IgM (Vgl. 5.4.4)	2,02	0,32	0,64	0,32	3,55*	0,006	0,49	0,13
25 µg TNP-Ficoll	2,00	0,17	0,54	0,08	2,75*	0,02	0,60	0,14

**Tabelle 6: Relative Darstellung der Werte für IL-12 unbehauelter, mit IgM anti-dsDNA und TNP-Ficoll behandelter Mäuse nach CD11b-Aufreinigung im Bezug auf die als Referenz (1,0) gesetzten Werte der Wt CD11b+ Zellen.**

In der CD11b+ Fraktion der C4-/- Mäuse kommt es zu einer signifikanten Steigerung der IL-12 mRNA Expression im Gegensatz zur Referenz (Wt CD11b+ unbeh. auf 1,0 gesetzt).



**Abb.28: RT-PCR Ergebnis für IFN  $\alpha$  mRNA nach TNP-Ficoll-Applikation und CD11b Aufreinigung bei Wildtyp und C4-/- Mäusen.**

Es sind nur geringe Veränderungen in der IFN  $\alpha$  mRNA Expression 6 h nach Applikation des TNP-Ficolls bei C4-/- und Wildtyp Mäusen messbar. Eher kommt es zu einer Reduktion des Interferons. (n>7)

Interferon alpha	Wt CD11b+		Wt CD11b-		C4-/- CD11b+		C4-/- CD11b-	
	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=	x-fach	p=
Unbehandelt (Vgl. 5.3.2)	1,00		0,54	1,00	6,32	0,05	0,53	0,42
20 $\mu$ g anti-dsDNA-IgM (Vgl. 5.5.1)	33,4*	0,0001	9,34*	0,015	40,95*	0,0001	1,95	0,64
25 $\mu$ g TNP-Ficoll	0,43	0,51	0,25	0,31	1,62	0,96	0,35	0,15

**Tabelle 7: Relative Darstellung der Werte für IFN  $\alpha$  unbehauelter, mit IgM anti-dsDNA und TNP-Ficoll behandelter Mäuse nach CD11b-Aufreinigung im Bezug auf die als Referenz (1,0) gesetzten Werte der Wt CD11b+ Zellen.**

Deutlich zu sehen ist die Steigerung der IFN  $\alpha$  mRNA Expression bei Applikation von IgM anti-dsDNA während es eher zu einer Verringerung der mRNA Expression bei TNP-Ficoll-Gabe kommt.

## 5.6 Die Bedeutung der IgM anti-dsDNA-Lokalisation für die Entstehung SLE-typischer Autoantikörper

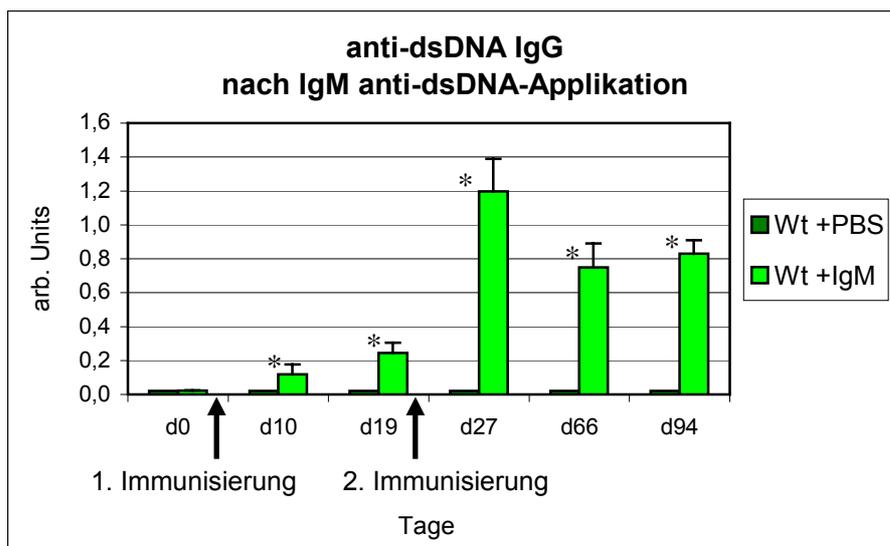
Die Applikation von IgM anti-dsDNA führt offenbar zu einer gesteigerten Aktivierung von IFN  $\alpha$ . Zum Nachweis ob hier ein Zusammenhang zum SLE besteht, wurde die Induktion von IgG anti-dsDNA-Antikörpern nach der Injektion von IgM anti-dsDNA-Antikörpern untersucht.

### 5.6.1 Nachweis von IgG anti-dsDNA-Antikörpern nach IgM anti-dsDNA-Applikation

Während innerhalb des Beobachtungszeitraumes von 27 Tagen keine spontane Bildung von IgG anti-dsDNA bei unbehandelten Mäusen gleichen Alters zu verzeichnen war, führte die zweifache Applikation von IgM anti-dsDNA am Tag 0 und Tag 19, zu einer messbaren IgG-Immunantwort gegen dsDNA und zu einem Immunglobulinklassenwechsel, messbar an den Tagen 10, 19 und 27 (**Abb. 29**).

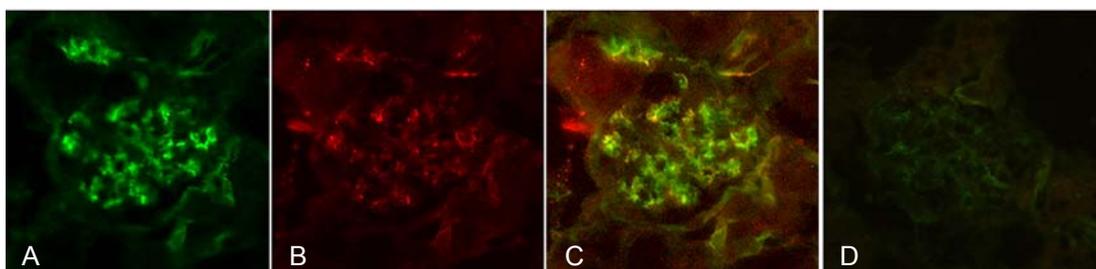
Auch am Tag 66 und 94 nach Applikation des IgM anti-dsDNA-Antikörper sind zum Teil noch hohe IgG-Titer im Serum nachweisbar.

Immunfluoreszenzfärbungen der Niere zeigen eine deutliche Immunkomplexablagerung in den Glomeruli, hier dargestellt durch eine anti-IgG- (grün) und anti-C3- (rot) Färbung bei einer Wildtyp Maus am Tag 67 nach der ersten Applikation des IgM-anti-dsDNA (**Abb. 30A-D**).



**Abb. 29: Ergebnisse des anti-dsDNA-IgG ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten bei Wildtyp-Mäusen nach Applikation von IgM anti-dsDNA und PBS.**

Blutentnahme am Tag 0 vor Immunisierung, BE am Tag 10 und Tag 19 nach 1. Immunisierung, BE am Tag 27 nach 2. Immunisierung am Tag 19. Nach Applikation des IgM anti-dsDNA ist eine IgG anti-dsDNA Immunantwort an den Tagen 10, 19 und 27 messbar. ( $n > 16$ ,  $*p < 0,05$ )



**Abb. 30: Immunfluoreszenzfärbung gegen Maus-IgG und C3 in der Niere am Tag 67 nach IgM anti-dsDNA-Applikation bei einer Wt Maus.**

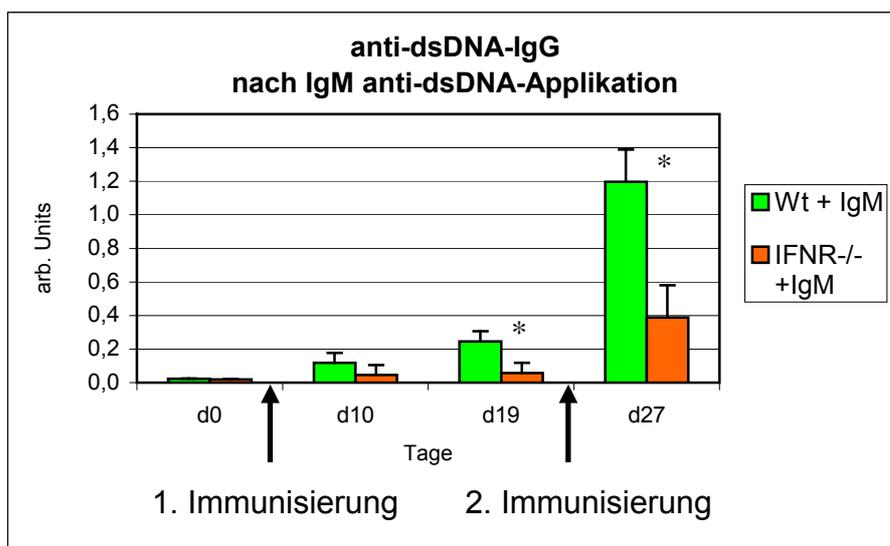
Deutlich zu sehen ist die Ablagerung von IgG-Immunkomplexen (A, grün) und von C3 (B rot) in den Glomeruli der Niere. Die Kolokalisation (gelb) des IgG und des C3 ist in der Abb. C gut zu erkennen. In Abb. D ist ein Glomerulum gezeigt von einer Wildtyp Maus ohne IgG anti-dsDNA Titer. Hier findet sich keine Immunkomplexdeposition in dem Glomerulum.

### 5.6.2 Interferon alpha Blockierung bei IgM anti-dsDNA-Applikation

Die Bestimmung von IgG-Autoantikörpern nach IgM anti-dsDNA-Injektion wurde in Analogie zu 5.6.1 mit IFNR<sup>-/-</sup> Mäusen durchgeführt, so dass das IFN  $\alpha$  keinen Einfluss auf die Zellen ausüben kann. IFNR<sup>-/-</sup> Mäuse haben einen Defekt in dem Klasse I Interferonrezeptor und sind nicht in der Lage Typ I bzw. II Interferon vermittelte Signale umzusetzen.

Vergleicht man die bei Wildtyp Mäusen gewonnenen Daten mit den gemessenen Werten bei IFNR<sup>-/-</sup> Tieren ist eine signifikante Reduktion der Immunantwort an den Tagen 19 und 27 zu verzeichnen. Am Tag 10 ist noch kein signifikanter Unterschied zwischen den Mausstämmen messbar (Abb. 31).

Der Interferonrezeptormangel führt somit zu einer signifikant reduzierten Immunantwort nach IgM anti-dsDNA-Gabe.



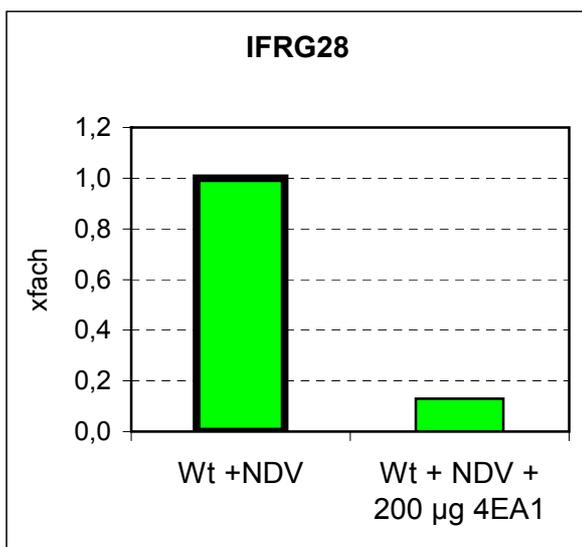
**Abb.31: Ergebnisse des anti-dsDNA-IgG ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten bei Wildtyp- und IFNR<sup>-/-</sup> Mäusen nach Applikation von IgM anti-dsDNA.**

Blutentnahme am Tag 0 vor Immunisierung, BE am Tag 10 und Tag 19 nach 1. Immunisierung, BE am Tag 27 nach 2. Immunisierung am Tag 19. ( $n \geq 16$ ,  $*p < 0,007$ )

Um zu untersuchen inwieweit die Blockierung des IFN  $\alpha$  mittels eines Antikörpers möglich ist, wurde der anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper 4EA1 eingesetzt.

Zunächst wurden zur Überprüfung, ob 4EA1 *in vivo* eine Interferon-blockierende Wirkung hat, in einem Vorversuch Mäuse mit NDV zur Interferoninduktion stimuliert.

Ein Teil der Mäuse (n=4) erhielt zeitgleich i.v. den anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper 4EA1. Die

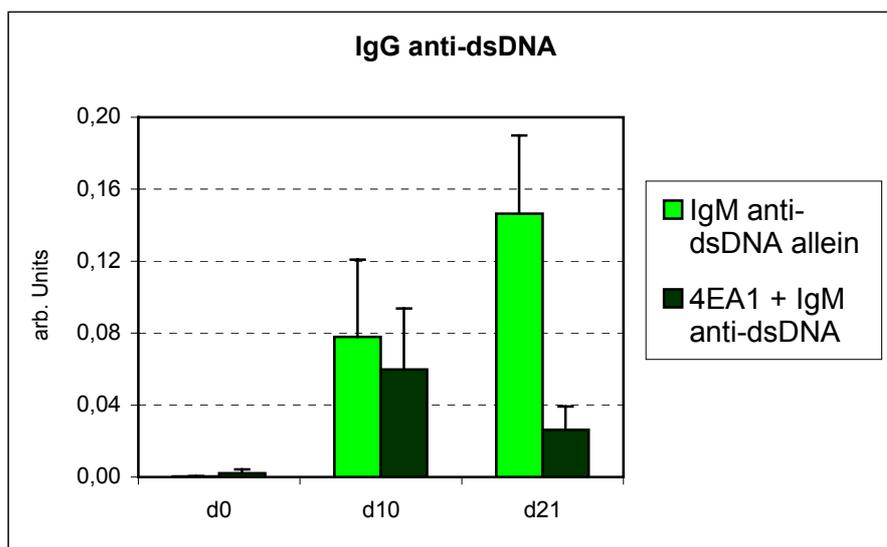


**Abb.32: RT-PCR Ergebnis für IFRG28 mRNA 3,5 Tage nach NDV-Applikation allein oder mit einem blockierenden anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper bei Wildtyp Mäusen**

Nach 3,5 Tagen ist eine deutliche Reduktion der IFRG28 mRNA bei Einsatz des blockierenden Antikörpers (4EA1) zu sehen. (n $\geq$ 2)

Messung der IFRG28 mRNA an Splenozyten ergab eine deutliche Reduktion des interferoninduzierten Gens (**Abb. 32**).

In einem weiteren Versuch wurde der anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper zusammen mit dem IgM anti-dsDNA eingesetzt. 20 µg IgM anti-dsDNA wurden gemeinsam mit 200 µg anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper i.v. appliziert. Anschließend wurde zu verschiedenen Zeitpunkten Serum entnommen und mit dem IgG anti-dsDNA-ELISA getestet. Durch die gemeinsame Verabreichung von IgM anti-dsDNA und dem IFN  $\alpha$ -blockierenden Antikörper kam es zu einer Reduktion der Immunantwort an den Tagen 10 und 21 (**Abb. 33**).



**Abb. 33: Ergebnisse des anti-dsDNA-IgG ELISA zu verschiedenen Zeitpunkten bei Wildtyp Mäusen nach Applikation von IgM anti-dsDNA und IgM anti-dsDNA in Kombination mit dem blockierenden anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper 4EA1.**

Die Applikation von IgM anti-dsDNA zusammen mit 200 µg des blockierenden anti-IFN  $\alpha$ -Antikörpers 4EA1 führt zu einer Reduktion der Immunantwort am Tag 21. (n $\geq$ 11)

Bei dem anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper 4EA1 handelt es sich um einen Ratte anti-Maus IgG1-Antikörper, welcher von einer eigenen Hybridomzelllinie produziert wird, bisher fehlt ein geeigneter Kontrollantikörper für diese Untersuchungen, deshalb wurde zunächst nur das IgM anti-dsDNA allein als Kontrolle genutzt. Die bisher ermittelten Ergebnisse mit dem Interferon-blockierenden Antikörper 4EA1 sind daher als vorläufig zu betrachten. Aufgrund der nicht unerheblichen Kosten und des großen Zeitaufwandes (z.B. Aufreinigung großer Mengen des 4EA1-Antikörpers) sind die weiteren Experimente nicht mehr Inhalt dieser Arbeit.

## 6 Diskussion

Der Systemische Lupus erythematoses ist eine Immunkomplexerkrankung autoimmuner Ursache. Die derzeitigen Erklärungsmodelle postulieren eine reduzierte Elimination apoptotischer Körperchen bzw. eine ungenügende B-Zellregulation bei Mangel der Komplementfaktoren C1, C4 und C2. Eine zentrale Rolle spielt wohl das Zytokin IFN  $\alpha$ , da bei Patienten mit SLE regelmäßig erhöhte IFN  $\alpha$  -Spiegel oder die erhöhte Expression von interferoninduzierten Genen beobachtet wird nun die Applikation von IFN  $\alpha$  zu therapeutischen Zwecken gelegentlich die Induktion von SLE typischen Autoantikörpern als Nebenwirkung aufweist.

Verschiedene Beobachtungen, wie die Deposition von Immunkomplexen an der marginalen Zone bei C4-Mangel (Zachrau et al. 2004) und die Fähigkeit von Makrophagen der marginalen Zone IFN  $\alpha$  zu produzieren (Eloranta und Alm 1999, Siegal et al. 1999), führten zu der folgenden Hypothese:

*Beim Mangel der Komplementkomponente C4 kommt es im Mausmodell zu einer ungenügenden Elimination endogener DNA, die durch natürliche Antikörper vom Typ IgM gebunden werden. Die Anlagerung der DNA-Immunkomplexe steigert die Produktion von IFN  $\alpha$  in der marginalen Zone der Milz. Diese IFN  $\alpha$  Sekretion unterstützt die humorale Immunreaktion gegen die im Immunkomplex gebundenen Antigene und führt somit zu Bildung von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene.*

Diese Hypothese wird im folgenden anhand der erbrachten Ergebnisse diskutiert.

### 6.1 Untersuchungen an unbehandelten Mäusen

#### 6.1.1 Nachweis von Interferon gamma und Interleukin 12 bei unbehandelten Mäusen

Die untersuchten Zytokine IFN  $\gamma$  und IL-12 zeigten zwischen Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäusen keine signifikant unterschiedliche Expression bei Messung der Gesamt-RNA der Milz. Bei dem untersuchten Zytokin IFN  $\gamma$  zeigten sich zwar signifikante Unterschiede zwischen den CD11b<sup>+</sup> und CD11b<sup>-</sup> Zellen, aber keine Unterschied zwischen Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> Mäusen. Hierbei handelt es sich also um einen reinen zellspezifischen und nicht mausspezifischen Unterschied.

Bei IL-12 ist ein etwas niedrigerer Wert in der CD11b- Fraktion der C4-/- Mäuse als in der entsprechenden Fraktion der Wildtyp Mäuse nachweisbar. Ansonsten sind auch hier keine Auffälligkeiten zwischen Wildtyp und C4-/- Mäusen erkennbar.

Diese zwei Zytokine wurden untersucht, weil neben IFN  $\alpha$  auch andere Zytokine als auffällig verändert beim SLE beschrieben werden. So zeigten frühe Studien beim SLE, dass neben IFN  $\alpha$  auch das Typ II Interferon IFN  $\gamma$  und IL-6 im Serum erhöht vorliegen (Hooks et al. 1979, Ytterberg und Schnitzer 1982, Al-Jadani et al. 1993). Eine vermehrte IL-12- und TNF  $\alpha$ -Produktion sind ebenfalls beschrieben und hier wird ein Zusammenhang mit Störungen in der NF $\kappa$ B-Aktivierung gesehen (Al-Jadani et al. 1993, Tokano et al. 1999, Ivashkiv 2003, Palucka et al. 2005).

Diese Aktivierung scheint beim SLE eher Folge des Krankheitsgeschehens, als einer der auslösenden Faktoren zu sein, da in der Frühphase vor Krankheitsbeginn keine Unterschiede bzw. Aktivierung bei Wildtyp und C4-/- Mäusen beobachtet werden konnten.

### **6.1.2 Nachweis von Interferon alpha bei unbehandelten Mäusen**

Zunächst wurden bei unbehandelten C4-/- Mäusen in verschiedenen Altersgruppen Untersuchungen des Serums mittels ELISA und Bioassay durchgeführt. Hierbei war kein IFN  $\alpha$  Protein nachweisbar.

Andere Studien zeigten bei einem anderen Lupus-Maus-Modell (NZB/NZW), dass ebenfalls kein zirkulierendes IFN  $\alpha$  messbar war (Santiago-Raber et al. 2003, Mathian et al. 2005).

Obwohl SLE-Patienten in mehr als 90% der Fälle ein auffälliges IFN-Erscheinungsbild in der Mikroarray-Analyse zeigten, konnten nur bei ca. 50% erhöhte IFN  $\alpha$ -Werte im Serum nachgewiesen werden. Dies könnte an der Sensitivität der im IFN-Serum-Assay verwendeten Antikörper liegen, die möglicherweise nicht alle zirkulierenden Interferontypen erkennen können oder an der Anwesenheit von anti-Interferon-Antikörpern im Serum der Patienten (Bennett et al. 2003).

Offenbar lagen auf Proteinebene bei den C4-/- Mäusen die ermittelten Werte im Serum unterhalb der Nachweisgrenze bzw. das IFN  $\alpha$  wird bevorzugt in bestimmten Geweben produziert (Farkas et al. 2001, Mathian et al. 2005) und ist lokal wirksam, ohne dass signifikante Mengen in die Zirkulation gelangen. Deshalb wurden in dieser Arbeit weitere Untersuchungen mit der wesentlich sensitiveren Methode der quantitativen Real-time RT-PCR an Splenozyten durchgeführt.

Schon bei jungen unbehandelten Mäusen fand sich mittels der Real-time RT-PCR ein aktiviertes Typ I Interferonsystem. Die CD11b<sup>+</sup> Zellen der C4<sup>-/-</sup> Mäuse produzierten signifikant mehr IFN  $\alpha$  mRNA als die vergleichbare Fraktion der Wt Mäuse. Zu diesem Zeitpunkt gab es noch keinen Hinweis auf eine Autoimmunerkrankung, da kein Nachweis von IgG anti-dsDNA im Serum mittels ELISA möglich war. Außerdem zeigten zwei unabhängige Untersuchungen (Chen et al. 2000, Paul et al. 2002), dass die Entwicklung von Autoantikörpern alters- und haltungsabhängig sind und in der Regel nicht vor dem achten Lebensmonat bei C4<sup>-/-</sup> Mäusen zu erwarten ist. Die von uns untersuchten Mäuse waren in einem Alter von 6-16 Wochen, so dass daher noch keine spontane Lupusmanifestation zu erwarten war.

Erkenntnisse zum spontan aktivierten Typ I Interferonsystem ohne Krankheitsmanifestation fehlen bisher vollständig im humanen System. Studien zum humanen Lupus beginnen frühestens nach Auftreten der ersten Krankheitssymptome, da das vorherige Bestimmen einer Lupusprädisposition, wie z.B. im Maus-Modell, nicht möglich ist. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Aktivierung des IFN  $\alpha$ -Systems stattfindet bevor erste Krankheitssymptome auftreten.

### **6.1.3 Nachweis von IFRG28 mRNA bei unbehandelten Mäusen**

Die Expression des Gens IFRG28 war bei unbehandelten C4<sup>-/-</sup> Mäusen gering. Es zeigte sich eine moderat gesteigerte (nicht signifikante) Produktion der IFRG28 mRNA in den CD11b<sup>+</sup> Zellen und in den negativen Fraktionen nach B220- bzw. CD90-Aufreinigung und dies ist schlüssig, da die CD11b<sup>+</sup> Zellen in den negativen Fraktionen der B220- bzw. CD90-Aufreinigungen enthalten sind.

Die Menge des produzierten IFN  $\alpha$  Proteins bei jungen unbehandelten C4<sup>-/-</sup> Mäusen scheint also noch so gering zu sein, dass es zu keiner signifikanten IFRG28 mRNA Erhöhung führt.

### **6.1.4 Charakterisierung der Interferon alpha produzierenden Zellen**

Die IFN  $\alpha$  produzierenden Zellen wurden als CD11b<sup>+</sup> identifiziert, da zum einen in der RT-PCR die CD11b<sup>+</sup> Fraktion die höchste IFN  $\alpha$  mRNA Konzentration aufwies, zum anderen die immunhistochemischen Färbungen teilweise eine Kolo-kalisation von IFN  $\alpha$

produzierenden Zellen und CD11b<sup>+</sup> Zellen in der marginalen Zone der murinen Milz zeigten. Bei Doppelfärbungen mit den Markern CD11b und ERTR-9 war eine eindeutige Doppelpositivität sichtbar, bei Doppelfärbungen mit dem Marker für metallophile Makrophagen (MoMa-1) und CD11b konnte diese Doppelpositivität nicht gefunden werden. Dies bedeutet, dass CD11b<sup>+</sup>, ERTR-9 positive Zellen der MZ als IFN  $\alpha$  Produzenten zu betrachten sind.

Die marginale Zone der Milz dient als Filter für die schnelle Aufnahme von Pathogenen (Morse et al. 2001, Zandvoort und Timens 2002) und für IgM- Immunkomplexe aus dem Blutstrom (Zachrau et al. 2004). In diesem speziellen Bereich der Milz, welcher die weiße Pulpa umgibt, sind hauptsächlich Makrophagen, dendritische Zellen, Marginalzonen B-Zellen (MZ B-Zellen), aber nur sehr wenige T-Zellen lokalisiert (Cyster et al. 2000).

Auch Eloranta und Alm (1999) zeigten, dass sich nach i.v.-Immunisierung mit dem inaktivem Herpes Simplex Virus die Mehrheit der IFN  $\alpha$  produzierenden Zellen in der marginalen Zone der Milz befinden. Weitere Gegenfärbungen mit SER-4 (metallophile Makrophagen) und ERTR-9 (MZ Makrophagen) zeigten, dass zum Grossteil die metallophilen Makrophagen doppelt positiv für IFN  $\alpha$  sind. Es handelt sich bei den dort beschriebenen Zellen nicht um B- oder T-Zellen. Auch Makrophagen der roten Pulpa sind ausgeschlossen. Die metallophilen Makrophagen zeigten in dieser Arbeit keine Doppelpositivität mit den interferonproduzierenden Zellen. Dieser Widerspruch könnte durch die Natur der verwendeten Viren begründet sein. Der bei Eloranta und Alm (1999) verwendete Herpes Simplex Virus ist ein DNA-Virus, welcher vom TLR 9 erkannt werden kann, während NDV als dsRNA-Virus an den TLR 3 bindet (O'Neill 2004). Anhand der RT-PCR Ergebnisse bei unbehandelten C4<sup>-/-</sup> Mäusen oder nach IgM anti-dsDNA-Applikation können die interferonproduzierenden Zellen als CD11b<sup>+</sup> identifiziert werden.

Als eine wichtige Quelle endogenen IFN  $\alpha$  kommen dendritische Zellen (DC) in Frage, die im Menschen hauptsächlich vom Typ der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) sind (Siegal et al. 1999). Im humanen System scheinen die pDC in der Zirkulation die stärksten IFN  $\alpha$  Produzenten zu sein (Siegal et al. 1999) und wurden als mögliche Quelle des bei SLE-Patienten nachgewiesenen IFN  $\alpha$  Spiegels diskutiert (Pascual et al 2003, Palucka et al. 2003). In der Maus kommen offenbar sowohl pDC als auch DC vom myelozytären Typ (mDC) als interferonproduzierende Zellen in Frage (Eloranta und Alm 1999). Letztere finden sich unter anderem in der marginalen Zone lymphatischer Organe.

Da pDC beim Menschen häufig als CD11b negativ beschrieben werden (Banchereau et al. 2000) spricht dies für mDC als Quelle des frühen IFN  $\alpha$  in diesem Maus-Modell.

## 6.2 Induktion von Zytokinen durch IgM-Immunkomplexe

### 6.2.1 Nachweis endogener DNA im Serum

Zur Generierung von Immunkomplexen sollte der IgM anti-dsDNA Antikörper körpereigene DNA als Antigen binden, so dass kein Antigen zusätzlich zugeführt werden muss. Dazu wurde die Menge natürlicher endogener DNA im Serum mittels ELISA nachgewiesen. Hier konnte gezeigt werden, dass deutlich mehr endogene DNA im Serum von C4<sup>-/-</sup> Mäusen nachweisbar war als beim Wildtyp. Dies könnte ein Hinweis für die gestörte Elimination apoptotischer Körperchen sein. Andere Arbeitsgruppen beschrieben, dass komplementdefiziente Mäuse eine verminderte Fähigkeit zur Clearance von apoptotischen Körperchen hatten, wenn diese intraperitoneal appliziert wurden (Taylor et al. 2000, Potter et al. 2003).

Dies legte den Schluss nahe, dass die nachgewiesene DNA möglicherweise apoptotischen Ursprungs ist. Daher wurde zum Nachweis von apoptotischer DNA der TUNEL-Dotblot etabliert. Diese Methode erwies sich als sehr sensitiv, da nun auch bei unbehandelten Wildtyp Mäusen ebenso wie bei C4<sup>-/-</sup> Mäusen der Nachweis endogener, apoptotischer DNA im Serum gelang.

Aus den Untersuchungen dieser Arbeit ist also zu schließen, dass die Eliminierung von zirkulierenden Immunkomplexen und apoptotischen Körperchen in C4<sup>-/-</sup> Mäusen verlangsamt ist. Dies ist nachweisbar schon bevor die Mäuse erste Anzeichen einer Autoimmunerkrankung zeigen. Dennoch weisen auch Wt Mäuse zumindest im sensitiven TUNEL-Dotblot endogene apoptotische DNA auf. Eine Akkumulation dieser potentiellen Immunogene könnte die Toleranz stören und eine Immunantwort gegen Selbstantigene bedingen (Chen et al. 2000).

Verschiedene Studien untersuchten die Natur der möglichen Epitope für anti-DNA-Antikörper. Monoklonale Antikörper und das Serum von SLE-Patienten sind eher in der Lage, denaturierte DNA zu binden als die komplexe helikale Form und unter anderem auch Einzelstrang-DNA, Einzelstrang-RNA, sowie Doppelstrang-RNA (Stollar et al. 1986, Karounos et al. 1988, Isenberg et al. 1994, Marion et al. 1997).

Viele der Autoantigene welche eine Rolle beim SLE spielen, werden in hohen Konzentrationen von apoptotischen Körperchen exprimiert. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese apoptotischen Körperchen eine Quelle für die beim SLE typischen Autoantigene sind (Casciola-Rosen et al. 1994, Rosen et al. 1995). Die Apoptose spielt nicht nur eine bedeutende Rolle bei der Entfernung möglicher autoreaktiver Zellen, sondern auch bei der Bereitstellung von Selbst-Antigenen,

welches dann mitverantwortlich für den Verlust der peripheren Toleranz ist (Navratil und Ahearn 2000). Normale gesunde Individuen haben eine endogene DNA-Konzentration von unter 10 ng/ml im Plasma, während bei SLE-Patienten mit aktivem Krankheitsbild sehr unterschiedliche, aber höhere Konzentrationen von DNA im Plasma messbar waren (Varianz von 25 ng/ml bis >5000 ng/ml) (Steinman 1975, McCoubrey-Hoyer et al. 1984, Bret et al. 1990).

Erhöhte Spiegel zirkulierender DNA, welche im Plasma von SLE Patienten gefunden wurden, sind zumeist körpereigenen Ursprungs und keine Fremdpathogene und stammen aus apoptotischen Vorgängen (Rumore und Steinman 1990, Isenberg et al. 1994). Ein geringerer Anteil ist womöglich bakteriellen Ursprungs (Steinman 1984).

Es ist also davon auszugehen, dass der verabreichte IgM anti-dsDNA Antikörper *in vivo* ausreichend körpereigene DNA als Antigen findet.

### **6.2.2. Distribution von IgM anti-dsDNA *in vivo***

Die Verteilung des IgM anti-dsDNA in den verschiedenen Organen wurde mit radioaktiv markierten Antikörpern untersucht. Nach der intravenösen Injektion lagerte sich ein geringer Anteil in Leber und Niere an, ein Teil des IgM verblieb nach 30 Minuten in der Zirkulation, die größte Organanreicherung fand sich in der Milz. Hier fand sich signifikant mehr IgM anti-dsDNA als in der Leber oder der Niere. Eine bildliche Darstellung der gesamten Maus mittels einer Szintigraphiekamera veranschaulicht die an der Deposition des IgM beteiligten Organe.

Während bei Zachrau et al. (2004) C4<sup>-/-</sup> Mäuse im Vergleich zu Wildtyp Mäusen deutlich mehr IgM-NP-IC (anti-Nitrophenyl-IgM + Nitrophenyl (NP)-BSA) in der marginalen Zone der Milz anlagerten, konnte dies für IgM anti-dsDNA-DNA-Immunkomplexe nicht gezeigt werden. Dies könnte auf unterschiedliche Konzentrationen bzw. Verhältnisse von Antigen und Antikörpern oder einer besonderen Affinität der MZ Makrophagen für die endogene DNA beruhen. So konnte bei Zachrau et al. (2004) bei hohen Konzentrationen von Antigen und Antikörper ebenfalls kein Unterschied zwischen Wildtyp und C4<sup>-/-</sup> gesehen werden, welches möglicherweise auf den Verbrauch von Komplementkomponenten durch die Immunkomplexe zurückzuführen war.

Die Hauptaufnahmeorgane für IgG-Immunkomplexe sind die Leber und die Milz (Chen et al. 2000, Nash et al. 2001). Für IgM-Komplexe wurde eine vermehrte Aufnahme in

der Milz gezeigt (Youd et al. 2002), insbesondere bei bestehender Komplementdefizienz (Zachrau et al. 2004).

Ähnlich wie bei den Untersuchungen von Youd et al. (2002) und Zachrau et al. (2004) zeigten die immunhistochemischen Färbungen die marginale Zone als Ort, an welchem sich die IgM-dsDNA-Immunkomplexe anlagerten. Die marginale Zone der Milz scheint eine zentrale Rolle in der Entstehung der Autoimmunität einzunehmen, da autoreaktive B-Zellen dort nachgewiesen wurden (Zeng et al 2000, Li et al. 2002) und diese auch außerhalb der Keimzentren der Proliferation und somatischen Mutation unterliegen (William et al. 2002, MacLennan et al. 2003).

### **6.2.3 Zytokinproduktion nach IgM anti-dsDNA-Applikation**

#### **6.2.3.1 Interferon alpha Produktion nach IgM anti-dsDNA-Applikation**

Die bis zu vierzigfache signifikante Steigerung von IFN  $\alpha$  mRNA 6 h nach Applikation des IgM anti-dsDNA in der CD11b<sup>+</sup> Fraktion von Wt und C4<sup>-/-</sup> Mäusen unterstreicht die Bedeutung dieser IgM-Immunkomplexe und ihrer Anlagerung an der marginalen Zone der Milz. Als indirekter Beweis für die Bildung des Proteins IFN  $\alpha$  dient wiederum der Nachweis des Gens IFRG28. Im Fall von IL-12 ist nur eine geringere Steigerung der mRNA Expression gegenüber den unbehandelten Mäusen zu erkennen, während IFN  $\gamma$  mRNA bis auf das Zehnfache signifikant erhöht produziert wird.

Murine DC werden deutlich effektiver durch IC aktiviert; welche Chromatin bzw. DNA-enthalten, als durch solche IC, welche andere fremde Proteine enthalten. Einer der Aktivierungswege für Chromatin- bzw. DNA-enthaltende Immunkomplexe führt offenbar über den TLR 9 (Leadbetter et al. 2002, Boule et al. 2004, Means et al. 2005).

Beim Menschen exprimieren plasmazytoide DC und B-Zellen relativ viel TLR 9 im Gegensatz zu anderen Zellpopulationen. PDC und B-Zellen sind deshalb wohl die in der Detektion von DNA sensitivsten Zelltypen (Hornung et al. 2002).

Die Deposition von TNP-Ficoll, einem T-zellunabhängigen Antigen, innerhalb der marginalen Zone führte nicht zu einer Aktivierung von IFN  $\alpha$ . Dies zeigt, dass nicht die Deposition an sich, sondern die IgM anti-dsDNA-Immunkomplexe für die Aktivierung der IFN  $\alpha$  Produktion verantwortlich sind. Endogene DNA, welche stets im Serum vorhanden ist, bewirkt allein keine Aktivierung, ebenso wie natürliches IgM, welches immer in der Zirkulation vorhanden ist.

Die Aktivierung von CD11b+ Zellen der marginalen Zone durch IgM anti-dsDNA Immunkomplexe zur Produktion von IFN  $\alpha$  scheint auf besondere Rezeptoren angewiesen zu sein. Diese unterscheiden sich von denen, die typische T-zellunabhängige Antigene (TNP-Ficoll) benötigen, da die Lokalisation von TNP-Ficoll innerhalb der marginalen Zone nicht zu einer Aktivierung von IFN  $\alpha$  führte. Neben der Lokalisation der Antigene an der marginalen Zone der Milz ist also eine besondere Art bzw. Struktur der Antigene erforderlich, um die Internalisierung und Aktivierung bestimmter Rezeptoren zu induzieren.

Es wurde gezeigt, dass B-Zellen durch DNA-IgG-Komplexe aktiviert werden können und diese effektive Aktivierung auf eine Kreuzvernetzung des B-Zellrezeptors mit einem zweiten DNA-reaktiven Rezeptor zurückzuführen ist. Der Fc $\gamma$ RIIa (CD32) fungiert bei IgG-Immunkomplexen anscheinend als dieser Rezeptor (Means et al. 2005). Die Aktivierung der B-Zellen schlägt bei MyD88-Defizienz fehl, oder wenn die TLR 9 Kaskade durch Chloroquin blockiert ist. TLR 9 ist also das Schlüsselement, um eine DNA-IC-bedingte Zellaktivierung zu erreichen (Marshak-Rothstein et al. 2004). TNP-Ficoll wird nicht von TLR 9 erkannt und führt deswegen wohl nicht zu einer erhöhten IFN  $\alpha$  Expression.

Die Stimulation von TLR 9 ist abhängig von der Anwesenheit unmethylierter DNA, welche zudem reich an „CpG-motifs“ sein sollte (Krieg et al. 1995). Es wird beschrieben, dass Vertebraten-DNA generell nicht immunstimulatorisch wirkt (Messina et al. 1991), es sei denn, sie wird in Zellen transfiziert (Zhu et al. 2003). Dies weist darauf hin, dass die Internalisierung des Chromatins bzw. DNA eine wichtige Rolle für die Zellaktivierung spielt. Der TLR 9 gehört zu den intrazellulär liegenden Rezeptoren (O'Neill 2004), deshalb ist eine Internalisierung der Liganden zu seiner Aktivierung notwendig. Verschiedene Wege sind hierfür denkbar, z.B. könnte durch große Mengen des Antigens bzw. der IC eine Versorgung des Rezeptors mittels Phagozytose stattfinden, aber auch das Vorhandensein eines speziellen DNA-Rezeptors wird diskutiert (H. Wagner, Vortrag beim Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie 2004). Für IgG-IC wurde die Internalisierung über CD32 (Fc $\gamma$ RIIa) zu TLR 9 gezeigt (Means et al. 2005). CD32 kann allerdings kein IgM binden und daher wäre hierfür also ein weiterer Rezeptor erforderlich. Li et al. (2004) konnten jedoch auch eine Stimulierung von B-Zellen mit Vertebraten-DNA zeigen; sie unterschieden hierbei zwischen aktiver (DNA von Mitogen-stimulierten Milzzellen) und nicht aktiver DNA (DNA von unstimulierte Milzzellen).

Die bessere Immunogenität bakterieller DNA wird hauptsächlich auf das vermehrte Vorhandensein unmethylierter „CpG-motif“ zurückgeführt. Vertebraten-DNA enthält

auch einige wenige unmethylierte „CpG-motif“, welche somit als mögliche Liganden zur Stimulierung dienen könnten (Cross et al. 1997).

Vertebraten DNA kann aber auch in komplexierter Form mit Immunglobulinen DC zur IFN  $\alpha$  Produktion anregen. DNA-Immunkomplexe, welche aus dem Serum von SLE Patienten isoliert wurden, aktivieren humane plasmazytoide dendritische Zellen IFN  $\alpha$  *in vitro* zu produzieren (Vallin et al. 1998 und 1999). Weiterhin führte die Verabreichung von apoptotischen Zellen zusammen mit IgG von SLE-Patienten ebenfalls zu einer IFN  $\alpha$  -Induktion in der Zellkultur (Bäve et al. 2001). Untersuchungen zu IgM und DNA bzw. IgM-Chromatin-Immunkomplexen fehlten bisher vollständig. Dabei scheint die Rolle von IgM als natürlicher und erster Antikörper (Ochsenbein und Zinkernagel 2000) und sein spezielles Verhalten im Organismus von großer Bedeutung zu sein, da IgM-IC im Gegensatz zu IgG-IC *in vivo* eine besondere Affinität zu der marginalen Zone der Milz haben (Youd et al. 2002, Zachrau et al. 2004). Da die MZ Makrophagen als IFN  $\alpha$  Produzenten gelten (Eloranta und Alm 1999), war ein zentraler Bestandteil der Hypothese, dass IgM-IC aufgrund ihrer Anlagerung an die MZ Makrophagen zu einer IFN  $\alpha$  Produktion führen. Dazu wurden erstmals IgM anti-dsDNA *in vivo* verwendet.

### 6.2.3.2 IFRG28 mRNA Produktion nach IgM anti-dsDNA-Applikation

Als indirekter Nachweis der IFN  $\alpha$  Proteinausschüttung nach IgM anti-dsDNA-Applikation wurde das interferoninduzierbare Gen IFRG28 untersucht.

Die IFRG28 mRNA wurde nach Stimulation mit IgM anti-dsDNA in CD11b<sup>+</sup> Zellen stärker exprimiert. IFN  $\alpha/\beta$  ist im „Priming“ von Zellen im Sinne einer autokrinen Regulation beteiligt (Taniguchi und Takaoka 2001). Die Expression von IFN  $\alpha$  mRNA und IFRG28 mRNA in denselben Zellen spricht für solch einen „Feedback“-Mechanismus.

In dieser Arbeit konnte in B-Zellen keine Steigerung von IFRG28 nach IgM anti-dsDNA-Stimulation nachgewiesen werden. Rozzo et al. (2001) fanden jedoch eine erhöhte Expression des interferoninduzierten Gens Ifi202 in B-Zellen von Lupus-Modell-Mäusen (NZB/NZW). Das daraus resultierende Protein p202 ist unter anderem in die Inhibition der Apoptose involviert. Somit könnte die Inhibition der Apoptose autoreaktiver B-Zellen bei erhöhter p202 Expression einer der Mechanismen sein, über welche eine Lupusanfälligkeit entsteht. Mit dem eigenen Nachweis des interferoninduzierten Gens IFRG28 und des beschriebenen Nachweises von Ifi202 konnte also gezeigt werden, dass IFN  $\alpha$  zumindest auf CD11b<sup>+</sup> und auf B-Zellen in der Milz eine Wirkung hat. Der Anstieg der IFRG28 mRNA in der CD90<sup>+</sup> Fraktion könnte

auch auf die gesteigerte Produktion von IFN  $\gamma$  zurückzuführen sein, da IFRG28 auch durch IFN  $\gamma$  induzierbar ist und dieses Zytokin auf T-Zellen wirkt.

### **6.2.3.3 Interferon gamma und Interleukin 12 mRNA Produktion nach IgM anti-dsDNA-Applikation**

Nach IgM-Applikation ist auch eine signifikante Steigerung von IFN  $\gamma$  und IL-12 in den CD11b+ Zellen messbar. Von Boule et al. (2004) wurde beschrieben, dass die Bindung von DNA-IgG-IC zu einem charakteristischen Zytokinprofil für die Zytokine BAFF und IL-12 *in vitro* führt, und dieses wurde unter anderem über TLR 9 vermittelt.

Bei einigen untersuchten SLE-Patienten wurden erhöhte Spiegel von IL-12 und IFN  $\gamma$  im Serum gefunden. IL-12 ist in der Lage, proinflammatorische Zytokine wie IFN  $\gamma$  zu induzieren (Tokano et al. 1999). Bei den erhöhten Spiegeln von IL-12 wird ein Zusammenhang mit pulmonalen Erkrankungen gesehen, während kein Zusammenhang zu renalen Erkrankungen nachweisbar war (Tokano et al. 1999), allerdings bei erhöhten IFN  $\gamma$ -Spiegeln ein Zusammenhang zu renalen Erkrankungen gezeigt wurde (Al-Janadi et al. 1993). Die IL-12 Spiegel im Serum von SLE-Patienten variieren sehr stark und bisher ist kein auslösender bzw. regulierender Faktor eindeutig identifiziert worden, auch die Rolle des IL-12 insgesamt scheint unklar. Wahrscheinlich ist, dass diese proinflammatorischen Zytokine bei den entzündlichen Vorgängen des SLE von Bedeutung sind (Smolen et al. 2005).

### **6.2.4 IgM anti-dsDNA-Applikation induziert IgG-Autoantikörper**

Die zweifache Applikation von IgM anti-dsDNA am Tag 0 und am Tag 19 führte zu einem Immunglobulinklassenwechsel und zu einer IgG-Immunantwort gegen dsDNA messbar an den Tagen 10, 19 und 27. Auch an den Tagen 66 und 94 waren noch langanhaltende deutlich erhöhte IgG anti-dsDNA Titer nachweisbar. Diese dauerhafte Produktion von autoreaktivem IgG führte zur Deposition von IgG-Immunkomplexen in den Glomeruli der Niere und somit zu ersten pathologischen Symptomen des SLE.

Die DNA an sich ist ein schlechtes Antigen und die Selbsttoleranz ihr gegenüber ist schwer zu überwinden. Eine generelle Induktion von Antikörpern gegen dsDNA in nichtautoimmunen Mäusen erwies sich bisher als problematisch (Isenberg et al. 1994).

Da in dieser Arbeit aber lediglich durch die Applikation des IgM anti-dsDNA (im Sinne einer passiven Immunisierung) eine aktive langanhaltende IgG-Immunantwort ausgelöst werden konnten, scheint die Anwesenheit von IgM bzw. das Komplexbilden der DNA mit dem IgM eine wichtige Rolle zu spielen.

Die Lokalisation der DNA-IC an der marginalen Zone scheint dabei von großer Bedeutung zu sein, da z.B. in NZB/NZW Mäusen die MZ B-Zellen als anti-DNA-Antikörper produzierenden Zellen identifiziert wurden (Zeng et al. 2000, Grimaldi et al. 2001). Untersuchungen beschrieben zu dem eine vermehrte Anzahl autoreaktive B-Zellen, die sich gehäuft in der marginalen Zone aufhalten (Li et al. 2002).

B-Zellen von SLE-Patienten und von Lupus-Modell-Mäusen neigen zu einer Überreaktion nach einem immunologischen Stimulus (Grammer und Lipsky 2003). Diese Überreaktion könnte durch das an der marginalen Zone gebildete IFN  $\alpha$  ausgelöst werden, da dieses immunstimulatorische Effekte hat (Le Bon et al. 2001). In dieser Arbeit konnte mittels der IgM-Applikation auch eine Autoimmunreaktion in per se nicht autoimmunen Mäusen (Wt) ausgelöst werden. Zwar können auch transgene anti-dsDNA-B-Zellen in nicht autoimmunen Mäusen persistieren, aber es kommt normalerweise zur keiner Sekretion antinukleärer Antikörper (Nakamura et al. 1987, Pisetsky et al. 1990, Fields et al. 2003).

Paul et al. (2002) zeigte, dass nach LPS-Gabe die B-Zellen drei Monate alter C4<sup>-/-</sup> Mäuse, welche bis zu diesem Zeitpunkt noch gesund waren, IgM anti-dsDNA produzierten. B-Zellen von C4<sup>+/+</sup> Mäuse produzierten auch IgM, allerdings kein autoreaktives. Da LPS ebenfalls ein Interferon-Induktor ist (Maehara und Ho 1977), könnte dies ein weiteres Indiz sein dafür sein, dass IFN  $\alpha$  autoreaktive B-Zellen aktiviert. Dazu passen auch die Ergebnisse von Bengtsson et al. (2000), welche zeigen, dass die erhöhten IFN  $\alpha$  Serumwerte bei Patienten mit dem Aktivitätsgrad des SLE, Fieber und mit der Autoantikörperproduktion korrelieren. Der Nachweis einer langanhaltenden IgG anti-dsDNA-Produktion (nach 66 und 94 Tagen) könnte ebenfalls auf die Aktivität von IFN  $\alpha$  zurückzuführen sein, da dieses nicht nur die humorale Immunantwort verstärkt, sondern darüber hinaus an der Induktion langanhaltender Antikörperproduktion und der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses beteiligt ist (Le Bon et al. 2001).

Bislang war es also schwer auch Langzeit-Antikörperantworten gegen DNA bzw. transgene autoreaktive B-Zellen in vivo zur Antikörperproduktion anzuregen. In dieser Arbeit gelang die Generierung einer langanhaltenden IgG-Immunantwort lediglich durch die passive Immunisierung mit einem IgM anti-dsDNA und dies zeigt, dass die Anwesenheit von IgM bzw. das Komplexbilden der DNA im Immunkomplex von besonderer Bedeutung hierfür ist.

### 6.2.5 Blockierung von Interferon alpha

Da die IFN  $\alpha$  -Produktion mit der Bildung von IgG-Autoantikörpern einhergeht, wurde versucht die zentrale Rolle des IFN  $\alpha$  zu verifizieren. IFNR $^{-/-}$  Mäuse haben einen Defekt in dem Klasse I Interferonrezeptor und sind nicht in der Lage, Typ I bzw. Typ II Interferon vermittelte Signale umzusetzen. Es wurde versucht, in IFNR $^{-/-}$  Mäusen eine ähnliche Immunreaktion nach IgM-Gabe zu reproduzieren. Die IFNR $^{-/-}$  Tiere zeigten jedoch eine signifikant verminderte IgG-Bildung als die Wildtyp Mäuse.

Weitere Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass ein blockierender anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper ebenfalls zu einer Reduktion der autoreaktiven IgG anti-dsDNA-Antwort führt. Bei dem blockierenden anti-IFN  $\alpha$ -Antikörper 4EA1 handelt es sich um einen Ratte anti-Maus IgG1-Antikörper, aber bisher fehlt ein geeigneter Kontrollantikörper für diese Untersuchungen. Deshalb wurde zunächst nur das IgM anti-dsDNA allein als Kontrolle genutzt und somit sind die Daten mit dem Interferon-blockierenden Antikörper 4EA1 als vorläufig zu betrachten.

Die Verkreuzung von Lupus-Modell-Mäusen (lpr/lpr, NZB/NZW) mit IFNR $^{-/-}$  Mäusen führten ebenfalls zu einer deutlichen Verminderung der Krankheitssymptome, Organschädigung und Sterblichkeit sowie zu einer Reduktion der Anzahl der anti-dsDNA IgG-produzierenden Zellen. Außerdem waren die anti-dsDNA-IgG Serumspiegel deutlich vermindert (Braun et al. 2003, Kono et al. 2003, Santiago-Raber et al. 2003). In der vorgelegten Arbeit konnte eine IgG-Autoantikörperbildung nicht bei allen Mäusen mit Interferonrezeptordefizienz verhindert werden, die durchschnittlichen Serumspiegel sanken dennoch signifikant.

Viele frühe Studien zeigten, dass das Typ I Interferon-System bei Patienten mit SLE aktiviert ist. Dies zeigte sich in erhöhten Serumwerten (Hooks et al. 1979, Preble et al. 1982, Strannegard et al. 1982, Ytterberg und Schnitzer 1982) sowie bei neueren Untersuchungen mittels Mikroarray-Analyse auch für interferonregulierte Gene (Han et al. 2003, Crow et al. 2003, Baechler et al. 2003, Bennett et al. 2003).

Die Effekte von IFN  $\alpha$  auf das Immunsystem beinhalten die Stimulation von Th1-Zellen und B-Zellantworten, sowie die Proliferation von „Memory“ CD8 $^{+}$ -T-Zellen (Blanco et al. 2001, Rönnblom und Alm 2002). Die Entstehung von Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen ist eine häufige Nebenwirkung bei mit IFN  $\alpha$  behandelten Patienten (Rönnblom et al. 1991, Schilling et al. 1991, Brassard et al. 2002). Die Prädisposition für SLE konnte auch bei Mäusen durch die Behandlung mit IFN  $\alpha$  zu einer manifesten Erkrankung führen. Dies war sowohl der Fall bei direkter Behandlung

mit IFN  $\alpha$ , als auch bei Behandlung mit starken IFN  $\alpha$  Induzenten wie „Poly Inosinic acid: Poly Cytidylic acid“ (Sergiescu et al. 1979, Heremans et al. 1978, Braun et al. 2003, Mathian et al. 2005).

Daneben ist das Interferon in der Lage, die Immunantwort zu verstärken, einen Ig-Klassenwechsel zu induzieren, die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses und die Langzeit-Antikörperproduktion zu beeinflussen (Le Bon et al. 2001).

Eine erhöhte Interferonproduktion kann ebenfalls die Differenzierung und Reifung von dendritischen Zellen (Blanco et al. 2001) und die Entwicklung von Autoantikörpern und Autoimmunität zur Folge haben (Rönnblom und Alm 2002).

Bereits bei niedrigen Spiegeln von Typ I und Typ II Interferonen werden die Zellen in ein Zustand erhöhter zellulärer Reaktivität gegenüber Antigenen versetzt, ein Phänomen welches als „Priming“ bezeichnet wird (Taniguchi und Takaoka 2001). Außerdem wurde gezeigt, dass niedrige Dosen von IFN  $\alpha$ , die noch nicht antiviral wirksam sind, in der Lage sind, das Krankheitsgeschehen in Lupus-Modell-Mäusen (NZB) zu fördern (Heremans et al. 1978). Ähnlich wie die Entstehung der Autoimmunerkrankung von verschiedenen Faktoren abhängt (Chen et al. 2000, Paul et al. 2002) scheinen weitere Faktoren (z.B. Infektionen, Apoptose bzw. vermehrte DNA im Serum) ebenfalls eine Rolle in der Aktivierung des IFN-Systems zu spielen.

Obwohl die Defizienz des Interferonrezeptors sowohl in der vorgelegten Arbeit als auch in verschiedenen Kreuzungsexperimenten mit Lupus-Modell-Mäusen (Iprlpr, NZB/NZW) (Braun et al. 2003, Kono et al. 2003, Santiago-Raber et al. 2003) eine veringerte Autoantikörperproduktion zeigten, konnte praktisch kein positiver Effekt bei MRL/Iprlpr-IFNR<sup>-/-</sup> Mäusen gesehen werden (Hron und Peng 2004). MRL/Iprlpr-Mäuse sind die Lupus-Modelle mit den schwersten Krankheitsverläufen und einer Lebenserwartung von unter sechs Monaten. Möglicherweise können diese Mäuse daher nicht von der Defizienz des Interferonrezeptors profitieren.

Interessanterweise werden bei SLE-Patienten nicht nur Autoantikörper gegen nukleäre Antigene, sondern auch gegen diverse andere Antigene nachgewiesen z.B. IFN  $\alpha$  und C1q (Panem et al. 1982, 1983 und 1984, Görg et al. 1993, Hogarth et al. 1996). Sowohl bei Patienten mit SLE als auch im Mausmodell scheinen hohe Antikörpertiter gegen dsDNA mit der Entwicklung von anti-C1q-Autoantikörpern korreliert zu sein (Hogarth et al. 1996, Siegert et al. 1991).

Bengtsson et al. (2000) zeigte, dass erhöhte dsDNA-IgG-Serumspiegel auch mit erhöhten IFN  $\alpha$  Serumspiegeln einhergehen.

Interessanterweise werden IFN  $\alpha$  und C1q vermehrt in der marginalen Zone der Milz gebildet. Autoimmunreaktionen gegen diese Selbstantigene führen daher zu der

Vermutung, dass der IFN  $\alpha$  Stimulus an der marginalen Zone noch weitere persistierende autoreaktive B-Zellen in der MZ aktiviert, die dann gegen dort vorhandene MZ-(Selbst) Antigene eine Immunantwort generieren.

### 6.2.6 Neue Therapieoptionen beim Systemischen Lupus erythematoses

Während der letzten zwei Dekaden hat sich die Prognose beim SLE durch frühere Diagnostik und effektivere therapeutische Möglichkeiten erheblich verbessert. Die 10-Jahres-Überlebensrate liegt in den meisten westlichen Länder bei ca. 95%. Therapeutisch werden in erster Linie Immunsuppressiva wie Corticosteroide oder Cyclophosphamid eingesetzt. Wenn auch die Lebenserwartung durch diese Therapie entscheidend verlängert werden konnte, führt dieses chronische Leiden häufig zu Frühinvalidität oder zu Dialysepflicht. Daneben sind diese Therapieformen mit diversen Nebenwirkungen behaftet und es scheint wünschenswert, neue Therapieoptionen zu prüfen.

Daher gibt es Überlegungen, die Neutralisierung von IFN  $\alpha$  durch blockierende monoklonale Antikörper in die Behandlung von Lupus einzubinden (Schmidt und Ouyang 2004).

Bei anderen Autoimmunerkrankungen wie dem insulinpflichtigen Diabetes mellitus, bei dem ebenfalls ein Zusammenhang mit IFN  $\alpha$  besteht (Chehadeh et al. 2000), schützt die Behandlung von Diabetes-Mäusen mit blockierenden Interferon-Antikörper vor der Erkrankung (Stewart 2003). Der Ansatz, gegen die IFN  $\alpha$  -Induktoren bzw. die gebildeten Immunkomplexe vorzugehen, erweist sich als wenig erfolgversprechend, da offenbar verschiedene Substanzen IFN  $\alpha$  induzieren können (apoptotische Zellen, dsDNA, dsDNA-IC, etc.). Zudem wirkten die therapeutische Antikörper gegen die IC pathogen und führten zu einer weiteren IFN  $\alpha$  -Produktion (Stewart 2003).

Eine der Gefahren bei der anti-IFN  $\alpha$ -Therapie zeigt sich darin, dass IFNR<sup>-/-</sup> Mäuse offenbar anfälliger gegenüber viralen Infektionen sind (Müller et al. 1994). Andererseits kommt es jedoch durch Blockierung des IFN-Signalweges zu einer deutlichen Reduktion von MZ B-Zellen und dies geht mit einer Reduktion der polyklonalen und autoreaktiven Immunglobuline einher (Zeng et al. 2000, Grimaldi et al. 2001, Kono et al. 2003).

Die B-Zellproliferation scheint beim SLE von verschiedenen Zytokinen beeinflusst zu werden. IL-6, IL-12 und das IFN  $\alpha$  induzierte BAFF scheinen bei Überexpression SLE-ähnliche Symptome zu fördern (Banchereau et al. 2000, Mackay et al. 2003).

Proinflammatorischen Zytokinen, wie z.B. TNF  $\alpha$ , IFN  $\gamma$ , IL-18, IL-6 und IL-1 werden als Verstärker der entzündlichen Symptome beim Lupus diskutiert. TNF  $\alpha$  wird dabei für die Entzündungsreaktionen und die Gewebeerstörung beim SLE mitverantwortlich gemacht (Smolen et al. 2005). Allerdings zeigt sich bei der Therapie mit einem TNF  $\alpha$ -Blocker ein erhöhtes Risiko Antikörper gegen dsDNA auszubilden (Aringer et al. 2004) und das Interferonsystem zu aktivieren (Palucka et al. 2005).

Untersuchungen von SLE-Patienten zeigten, dass nach Behandlung mit Glucocorticoiden eine Abschwächung der IFN  $\alpha$ -Signatur in Leukozyten zu beobachten war. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, IFN  $\alpha$  als mögliches Ziel in der Behandlung von SLE zu diskutieren um ggf. die Glucocorticoiddosen reduzieren zu können (Bennett et al. 2003).

Ein weiterer therapeutischer Ansatzpunkt könnte in der Modifikation des TLR 9 Signalweges liegen. TLR 9 wird als der Rezeptor für endogene DNA angesehen und ist neben der IFN  $\alpha$ -Induktion offenbar direkt in die B-Zellregulation und IgM-Produktion involviert (Rutz et al. 2004, He et al. 2004). Das ursprünglich in der Malariaphylaxe eingesetzte Chloroquin findet auch Anwendung bei mildereren Formen des SLE. Mittlerweile ist bekannt, dass Chloroquin offenbar in den Signaltransduktionsweg des TLR 9 eingreift, indem es durch die pH-Verschiebung in intrazellulären Lysosomen die TLR 9-Aktivierung behindert (Rutz et al. 2004).

Das Serum von SLE-Patienten besitzt die Fähigkeit, die DC-Differenzierung zu induzieren, wobei dies auf der Anwesenheit und Funktion des IFN  $\alpha$  beruht. Man könnte daher von einer Dysregulation der DC durch die gesteigerte IFN  $\alpha$ -Produktion bei SLE-Patienten sprechen. Deshalb wäre es eine weitere Möglichkeit diese IFN  $\alpha$ -produzierende Zellen als zentrales Ziel für neue therapeutische Ansätze zu nutzen (Blanco et al. 2001, Pascual et al. 2001).

Insgesamt konnte in dieser Arbeit die Bedeutung des IFN  $\alpha$ -Systems für die Induktion des SLE gezeigt werden. Dabei scheint die Induktion des IFN  $\alpha$  durch körpereigene endogene DNA im IC über TLR 9 zu erfolgen. Die Bereitstellung großer Mengen von Selbstantigenen durch die verminderte Clearance von apoptotischen Materials beim Mangel der Komplementkomponente C4 scheint diesen Vorgang zu begünstigen. Offenbar ist IFN  $\alpha$  ein zentrales Zytokin für die Induktion von Autoantikörpern gegen dsDNA.

Neue therapeutische Ansätze umfassen daher die Elimination von zirkulierender endogener DNA oder von DNA-enthaltenden Immunkomplexen, die Modifizierung des TLR 9 Signalweges, die Beeinflussung der interferonproduzierenden Zellen, sowie die Blockade des IFN selbst bzw. dessen Rezeptors. Das in dieser Arbeit vorgestellte

Modell der IgM anti-dsDNA induzierten Autoantikörperproduktion konnte den Erfolg einer IFN  $\alpha$  Blockade belegen und eröffnet daher auch die Möglichkeit weitere therapeutische Optionen zu prüfen.

## 7 Zusammenfassung

Der Systemische Lupus erythematoses ist eine Immunkomplexerkrankung autoimmuner Ursache aus dem Formenkreis der Kollagenosen. Eine genetische Assoziation wird unter anderem zu den frühen Komplementkomponenten C1, C2 und C4 gesehen. Aktuelle Erklärungsmodelle postulieren eine ungenügende B-Zellregulation beim Mangel von C1, C4 oder C2 als auch eine reduzierte Elimination apoptotischer Körperchen. Einen weiteren zentralen Faktor scheint das antivirale Zytokin Interferon  $\alpha$  darzustellen, da bei Patienten mit Systemischen Lupus erythematoses regelmäßig erhöhte Interferon  $\alpha$  Spiegel oder eine erhöhte Expression von Interferon induzierten Genen beobachtet werden. Des Weiteren wurde bei Applikation von Interferon  $\alpha$  zu therapeutischen Zwecken gelegentlich die Induktion von Systemischen Lupus erythematoses typischen Autoantikörpern als Nebenwirkung beobachtet.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass bei Komplementdefizienz eine gesteigerte Expression von Interferon  $\alpha$  in der Milz schon vor der ersten Krankheitsmanifestation auftritt. Junge, noch gesunde C4 defiziente Mäuse zeigen ein leicht aktiviertes Interferonsystem, während Interleukin-12 und Interferon  $\gamma$  zu diesem Zeitpunkt nicht auffällig waren. Eine besondere Rolle für die Interferon  $\alpha$ - und Autoantikörperproduktion kommt hierbei der marginalen Zone der Milz zu. Zunächst konnten CD11b positive Zellen der marginalen Zone als die Interferon  $\alpha$ -produzierenden Zellen identifiziert werden. Zudem kam es hier zur Deposition von *in vivo* gebildeten Immunkomplexen aus IgM anti-Doppelstrang-DNA und körpereigener DNA, welches zu einer signifikant gesteigerten Interferon  $\alpha$ - und Interferon  $\gamma$ -Produktion in den CD11b positiven Zellen führte. Die IgM-Immunkomplexe induzierten eine humorale Immunreaktion gegen die im Immunkomplex gebundenen Antigene und führten zur Bildung von IgG-Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene. Diese IgG-Autoantikörper waren auch nach 94 Tagen noch nachweisbar und es kam zu einer renalen Ablagerung. Schließlich konnte durch Blockierung des Interferon  $\alpha$  bzw. des Interferonrezeptors die Produktion der IgG-Autoantikörper deutlich reduziert werden. Diese Ergebnisse bestätigen die Hypothese, dass der Mangel der Komplementkomponente C4 zu einer ungenügenden Elimination endogener DNA führt. Antikörper vom Typ IgM können anschließend eine Immunkomplexbindung mit der DNA eingehen und dies führt zu einer Anlagerung in der marginalen Zone der Milz. Diese Deposition führt zur gesteigerten Produktion von Interferon  $\alpha$  und somit zur langfristigen Bildung von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene. Demzufolge könnte die Beeinflussung des Interferon alpha-Systems einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt in der Behandlung der Autoimmunerkrankung Systemischer Lupus erythematoses darstellen.

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Al-Janadi M, Al-Balla S, Al-Dalaan A, Raziuddin S.**  
Cytokine profile in systemic lupus erythematosus, rheumatoid arthritis, and other rheumatic diseases. *J Clin Immunol* 1993; 13(1): 58-67.
2. **Amigorena S, Bonnerot C, Drake JR, Choquet D, Hunziker W, Guillet JG, Webster P, Sautes C, Mellman I, Fridman WH.**  
Cytoplasmic Domain Heterogeneity and Functions of IgG Fc Receptors in B Lymphocytes. *Science*. 1992;256(5065):1808-12.
3. **Aringer M, Graninger WB, Steiner G, Smolen JS.**  
Safety and efficacy of tumor necrosis factor alpha blockade in systemic lupus erythematosus: an open-label study. *Arthritis Rheum*. 2004;50(10):3161-9.
4. **Arnett FC, Reveille JD.**  
Genetics of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*. 1992;18(4):865-92.
5. **Atkinson JP.**  
Complement deficiency: predisposing factor to autoimmune syndromes. *Clin Exp Rheumatol*. 1989;7 Suppl 3:S95-101.
6. **Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK, Behrens TW.**  
Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 ;100(5):2610-2615.
7. **Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.**  
Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
8. **Bäve U, Vallin H, Alm GV, Ronnblom L.**  
Activation of natural Interferon- $\alpha$  producing cells by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines. *J Autoimmun* 2001, 17; 71-80.

9. **Bengtsson AA, Sturfelt G, Truedsson L, Blomberg J, Alm GV, Vallin H, Rönnblom L.**  
Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus*. 2000;9(9):664-71.
10. **Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V.**  
Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med*. 2003;197(6):711-23.
11. **Bhakdi S, Hugo F, Tranum-Jensen J.**  
Functions and relevance of the terminal complement sequence. *Blut*. 1990 Jun;60(6):309-18
12. **Bijsterbosch MK, Klaus GG.**  
Crosslinking of Surface Immunoglobulin and Fc Receptors on B Lymphocytes Inhibits Stimulation of Inositol Phospholipid Breakdown Via the Antigen Receptors. *J Exp Med*. 1985;162(6):1825-36.
13. **Bitter-Suermann D, Burger R.**  
C3 Deficiencies. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1990;153:223-33.:223-33.
14. **Blanco P, Palucka AK, Gill M, Pascual V, Banchereau J.**  
Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*. 2001;294(5546):1540-3.
15. **Blomberg S, Eloranta ML, Cederblad B, Nordlin K, Alm GV, Rönnblom L.**  
Presence of cutaneous interferon-alpha producing cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2001;10(7):484-90.
16. **Boulé MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR.**  
Toll-like Receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobuline G complexes. *J Exp Med* 2004, 199 (12); 1631-1640.
17. **Brassard DL, Grace MJ, Bordens RW.**  
Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein. *J Leukoc Biol*. 2002;71(4):565-81.

18. **Braun D, Geraldès P, Demengeot J.**  
Type I Interferon controls the onset and severity of autoimmune manifestations in lpr mice. *J Autoimmun* 2003, 20: 15-25.
19. **Bret L, Lulé J, Alary C, Appolinaire-Pilipenko S, Pourrat JP, Fournié GJ.**  
Quantitation of blood plasma DNA as an index of in vivo cytotoxicity. *Toxicology* 1990; 61: 283-292
20. **Botto M, Dell'Agnola C, Bygrave AE, Thompson EM, Cook HT, Petry F, Loos M, Pandolfi PP, Walport MJ.**  
Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies. *Nat. Genet.* 1998, 19:56-59.
21. **Cambier JC, Pleiman CM, Clark MR.**  
Signal Transduction by the B Cell Antigen Receptor and Its Coreceptors. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:457-86.
22. **Campbell RD, Carroll MC, Porter RR.**  
The molecular genetics of component of complement. *Adv. Immunol.* 1986, 38; 203-244.
23. **Carter RH, Fearon DT.**  
CD19: Lowering the Threshold for Antigen Receptor Stimulation of B Lymphocytes. *Science* 1992;256(5053):105-7.
24. **Casciola-Rosen LA, Anhalt G, Rosen A.**  
Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med.* 1994;179(4):1317-30.
25. **Cederblad B, Blomberg S, Vallin H, Perers A, Alm GV, Rönnblom L.**  
Patients with systemic lupus erythematosus have reduced numbers of circulating natural interferon-alpha- producing cells. *J Autoimmun.* 1998;11(5):465-70.
26. **Cehadeh W, Weill J, Vantighem MC, Alm G, Lefebvre J, Wattré P, Hober D.**  
Increased level of interferon-alpha in blood of patients with insulin-dependent diabetes mellitus: relationship with coxsackievirus B infection. *J Infect Dis.* 2000;181(6):1929-39.

- 
27. **Chen X, Martin F, Forbush KA, Perlmutter RM, Kearney JF.**  
Evidence for selection of a population of multireactive B cells into splenic marginal zone. *Int Immunol.* 1997; 9(1): 27-41.
28. **Chen Z, Koralov SB, Kelsoe G.**  
Complement C4 inhibits systemic autoimmunity through a mechanism independent of complement receptors CR1 and CR2. *J Exp Med.* 2000; 192(9):1339-52.
29. **Cross SH, Lee M, Clark VH, Craig JM, Bird AP, Bickmore WA.**  
The chromosomal distribution of CpG islands in the mouse: evidence for genome scrambling in the rodent lineage. *Genomics.* 1997;40(3):454-6.
30. **Crow MK, Kirou KA, Wohlgemuth J.**  
Microarray analysis of interferon-regulated genes in SLE. *Autoimmunity.* 2003; 36(8):481-90.
31. **Cutler AJ, Botto M, van Essen D, Rivi R, Davies KA, Gray D, Walport MJ.**  
T cell-dependent immune response in c1q-deficient mice: defective Interferon gamma production by antigen-specific t cells. *J Exp Med.* 1998;187(11):1789-97.
32. **Cyster JG**  
B cells on the front line. *Nat Immunol.* 2000;1(1):9-10.
33. **Da Costa XJ, Brockman MA, Alicot E, Ma M, Fischer MB, Zhou X, Knipe DM, Carroll MC.**  
Humoral response to herpes simplex virus is complement-dependent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(22):12708-12.
34. **Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT.**  
C3d of Complement As a Molecular Adjuvant: Bridging Innate and Acquired Immunity. *Science.* 1996;271(5247):348-50.
35. **Dragon-Durey MA, Quartier P, Fremeaux-Bacchi V, Blouin J, de Barace C, Prieur AM, Weiss L, Fridman WH.**  
Molecular basis of a selective C1s deficiency associated with early onset multiple autoimmune diseases. *J Immunol.* 2001;166(12):7612-6.

- 
- 36. Einav S, Pozdnyakova OO, Ma M, Carroll MC.**  
Complement C4 is protective for lupus disease independent of C3. *J Immunol.* 2002;168(3):1036-41.
- 37. Eloranta ML, Alm GV.**  
Splenic marginal metallophilic macrophages and marginal zone macrophages are the major interferon-alpha/beta producers in mice upon intravenous challenge with herpes simplex virus. *Scand. J. Immunol.* 1999, 49:391-394.
- 38. Fang Y, Xu C, Fu YX, Holers VM, Molina H.**  
Expression of Complement Receptors 1 and 2 on Follicular Dendritic Cells Is Necessary for the Generation of a Strong Antigen-Specific IgG Response. *J Immunol.* 1998;160(11):5273-9.
- 39. Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL.**  
Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/beta-producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Pathol.* 2001;159(1):237-43.
- 40. Fearon DT, Ahearn JM.**  
Complement Receptor Type 1 (C3b/C4b Receptor; CD35) and Complement Receptor Type 2 (C3d/Epstein-Barr Virus Receptor; CD21). *Curr Top Microbiol Immunol.* 1990;153:83-98.
- 41. Fearon DT, Carter RH.**  
The CD19/CR2/TAPA-1 Complex of B Lymphocytes: Linking Natural to Acquired Immunity. *Annu Rev Immunol.* 1995;13:127-149.
- 42. Fields ML, Seo SJ, Nish SA, Tsai JH, Caton AJ, Erikson J.**  
The regulation and activation potential of autoreactiv B cells. *Immunol Res* 2003, 27; 219-233.
- 43. Fischer MB, Ma M, Goerg S, Zhou X, Xia J, Finco O, Han S, Kelsoe G, Howard RG, Rothstein TL, Kremmer E, Rosen FS, Carroll MC.**  
Regulation of the B Cell Response to T-Dependent Antigens by Classical Pathway Complement. *J Immunol.* 1996;157(2):549-56.

- 
- 44. Fischer MB, Goerg S, Shen L, Prodeus, AP, Goodnow CC, Kelsoe G, Carroll MC.**  
Dependence of Germinal Center B Cells on Expression of CD21/CD35 for Survival. *Science* 1998;280(5363):582-585.
- 45. MM, Fries LF.**  
The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunol Today*. 1991;12(9):322-6.
- 46. Grammer AC, Lipsky PE**  
B cell abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res Ther* 2003, 5; 22-27.
- 47. Grimaldi CM, Michael DJ, Diamond B.**  
Expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen induced lupus. *J Immunol*. 2001; 167: 1886-1890.
- 48. Grimaldi CM, Hill L, Xu X, Peeva E, Diamond B.**  
Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. *Mol Immunol*. 2005;42(7):811-20.
- 49. Goerg S, Klouche M, Wilhelm D, Kirchner H.**  
Interferon-alpha-Antikörper zeigen keine Kreuzreaktionen mit typischen Autoimmunantikörpern. *Immun. Infekt*. 1993, 21:54-56.
- 50. Goerg S.**  
The association between systemic lupus erythematosus and deficiencies of the complement system. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 2002;48(3):237-45.
- 51. Golan TD, Dan S, Haim H, Varda G, Sol K.**  
Solar ultraviolet radiation induces enhanced accumulation of oxygen radicals in murine SLE-derived splenocytes in vitro. *Lupus*. 1994;3(2):103-6.
- 52. Han GM, Chen SL, Shen N, Ye S, Bao CD, Gu YY.**  
Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun* 2003, 4, 177-186.

- 
- 53. Hartung K, Baur MP, Coldewey R, Fricke M, Kalden JR, Lakomek HJ, Peter HH, Schendel D, Schneider PM, Seuchter SA.**  
Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1346-51.
- 54. Havell EA, Spitalny GL.**  
Endotoxin-induced interferon synthesis in macrophage cultures. *J Reticuloendothel Soc.* 1983;33(5):369-80.
- 55. He B, Qiao X, Cerutti A.**  
CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10. *J Immunol* 2004, 173;4479-4491.
- 56. Heremans H, Billiau A, Colombatti A, Hilgers J, de Somer P.**  
Interferon treatment of NZB mice: accelerated progression of autoimmune disease. *Infect Immun.* 1978;21(3):925-30.
- 57. Hertzog PJ, O'Neill LA, Hamilton JA.**  
The interferon in TLR signaling: more than just antiviral. *Trends Immunol* 2003, 24; 534-539.
- 58. Heyman B.**  
Functions of antibodies in the regulation of b cell responses in vivo. *Springer Semin Immunopathol.* 2001a;23(4):421-32.
- 59. Heyman B, Dahlstrom J, De Stahl TD, Getahun A, Wernersson S, Karlsson MC.**  
No evidence for a role of FcγRIIB in suppression of in vivo antibody responses to erythrocytes by passively administered IgG. *Scand J Immunol.* 2001b;53(4):331-4.
- 60. Hogarth MB, Norsworthy PJ, Allen PJ, Trinder PKE, Loos M, Morley BJ, Walport MJ, Davies KA.**  
Autoantibodies to the collagenous region of C1q occur in three strains of lupus-prone mice. *Clin Exp Immunol* 1996, 104; 241-246.

- 61. Hooks JJ, Moutsopoulos HM, Geis SA, Stahl NI, Decker JL, Notkins AL.**  
Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med.* 1979;301(1):5-8.
- 62. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G.**  
Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *J Immunol.* 2002, 168; 4531-4537.
- 63. Hoskins M.**  
A prophylactic action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in macacus rhesus. *Amer J Trop Med Hyg* 1935;15:675-680.
- 64. Hron JD, Peng SL.**  
Type I IFN protects against murine lupus. *J Immunol.* 2004;173(3):2134-42.
- 65. Huang X, Yuang J, Goddard A, Foulis A, James RF, Lernmark A, Pujol-Borrell R, Rabinovitch A, Somoza N, Stewart TA.**  
Interferon expression in the pancreases of patients with type I diabetes. *Diabetes.* 1995;44(6):658-64.
- 66. Ikeda K, Sannoh T, Kawasaki N, Kawasaki T, Yamashina I.**  
Serum Lectin With Known Structure Activates Complement Through the Classical Pathway. *J Biol Chem.* 1987;262(16):7451-4.
- 67. Ioannou Y, Isenberg DA.**  
Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum.* 2000;43(7):1431-42.
- 68. Isaacs A, Lindenmann J.**  
Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. B* 1957;147:429-438.
- 69. Isenberg DA, Ehrenstein MR, Longhurst C, Kalsi JKK.**  
The origin, sequence, structure, and consequences of developing anti-DNA antibodies. *Arthritis Rheum.* 1994; 37(2): 169-180.

- 70. Ishikawa R, Biron CA.**  
IFN induction and associated changes in splenic leukocyte distribution. *J Immunol* 1993, 150; 3713-3727.
- 71. Ito T, Amakawa R, Fukuhara S.**  
Roles of Toll-like receptors in natural interferon-producing cells as sensors in immune surveillance. *Hum Immunol* 2002, 63; 1120-1125.
- 72. Ivashkiv LB.**  
Type I Interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: potential role in sle pathogenesis. *Autoimmunity* 2003, 36; 473-479.
- 73. Jackson CG, Ochs HD, Wedgwood RJ.**  
Immune Response of a Patient With Deficiency of the Fourth Component of Complement and Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med.* 1979;300(20):1124-9.
- 74. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M.**  
*Immunobiology*. 5th ed. New York and London: Garland Publishing; c2001.
- 75. Johnstone A, Thorpe R.**  
*Immunochemistry in Practice*. Third edition ed. Blackwell Science; 1996.
- 76. Kälkner KM, Rönblom L, Karlsson Parra AK, Bengtsson M, Olsson Y, Öberg K.**  
Antibodies against double-stranded DNA and development of polymyositis during treatment with interferon. *QJM*. 1998;91(6):393-9.
- 77. Karlsson MC, Wernersson S, Diaz de Stahl T, Gustavsson S, Heyman B.**  
Efficient IgG-Mediated Suppression of Primary Antibody Responses in Fcgamma Receptor-Deficient Mice. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1999;96(5):2244-9.
- 78. Karlsson MC, Getahun A, Heyman B.**  
FcgammaRIIB in IgG-Mediated Suppression of Antibody Responses: Different Impact in Vivo and in Vitro. *J Immunol*. 2001;167(10):5558-64.

- 
- 79. Karounos DG, Grudier JP, Pisetsky DS.**  
Spontaneous expression of antibodies to DNA of various species origin in sera of normal subjects and patients with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1988;140(2):451-5.
- 80. Kono DH, Baccala R, Theofilopoulos AN.**  
Inhibition of lupus by genetic alteration of the interferon- $\alpha/\beta$  receptor. *Autoimmunity* 2003, 36(8); 503-510.
- 81. Korngold R, Blank KJ, Murasko DM.**  
Effect of Interferon on thoracic duct lymphocyte output: Induction with either poly I:poly C or vaccinia virus. *J Immunol* 1983, 130(5):2236-2240.
- 82. Krieg AM.**  
CpG DNA: A pathogenic factor in systemic lupus erythematosus? *J Clin Immunol.* 1995;15(6):284-92.
- 83. Lahita RG.**  
The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol.* 1999 Sep;11(5):352-6.
- 84. Laemmli UK.**  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(259):680-5.
- 85. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A.**  
Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002, 416; 603-607.
- 86. Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF.**  
Type I interferons potently enhance immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001, 14: 461-470.
- 87. Li H, Zhang YY, Sun YN, Huang XY, Jia YF, Li D.**  
Induction of systemic lupus erythematosus syndrome in BALB/c mice by immunization with active chromatin. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25(6):807-11.

- 
- 88. Li Y, Li H, Weigert M.**  
Autoreactive B cells in marginal zone that express dual receptors. *J Exp Med.* 2002, 195(2): 191-188.
- 89. Mackay F, Schneider P, Rennert P, Browning J.**  
BAFF and APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003, 21: 231-265.
- 90. MacLennan ICM, Toellner KM, Cunningham AF, Serre K, Sze DMY, Zúniga E, Cook MC, Vinuesa CG.**  
Extrafollicular antibody responses, *Immunol Rev.* 2003, 194; 8-18.
- 91. Maehara N, Ho M.**  
Cellular origin of interferon induced by bacterial lipopolysaccharide. *Infect Immun.* 1977 Jan;15(1):78-83.
- 92. Manderson AP, Botto M, Walport MJ.**  
The role of complement in the development of Systemic Lupus erythematosus. *Annu Rev immunol* 2004, 22:431-456.
- 93. Marion TN, Krishnan MR, Desai DD, Jou, NT, Tillman DM.**  
Monoclonal anti-DNA antibodies: structure, specificity, and biology. *Methods* 1997;11:3-11.
- 94. Marshak-Rothstein A, Busconi L, Lau, CM, Tabor, AS, Leadbetter EA, Akira S, Krieg AM, Lipford GB, Viglianti GA, Rifkin IR.**  
Comparison of CpGs-ODNs, chromatin immune complexes, and dsDNA fragment immune complexes in the TLR9-dependent activation of rheumatoid factor B cells. *J Endotoxin Res.* 2004, 10(4) : 247-251.
- 95. Mathian A, Weinberg A, Gallegos M, Banchereau J, Koutouzov S.**  
IFN- $\alpha$  induces early lethal Lupus in preautoimmune (New Zealand Black x New Zealand White)<sub>F</sub><sub>1</sub> but not in BALB/c Mice. *J Immunol* 2005: 174: 2499-2506.
- 96. Mayer MM.**  
Highlights of complement research during the past twenty-five years. *Immunochemistry.* 1970;7(5):485-96.

- 97. Mayer MM.**  
Complement. Historical perspectives and some current issues. Complement. 1984;1(1):2-26.
- 98. McCoubrey-Hoyer A, Okarma TB, Holman HR.**  
Partial purification and characterization of plasma DNA and its relation to disease activity in systemic lupus erythematosus. Am J Med. 1984 Jul;77(1):23-34.
- 99. Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD.**  
Human lupus antibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. J Clin Invest. 2005;115(2):407-417.
- 100. Messina JP, Gilkeson GS, Pisetsky DS.**  
Stimulation of in vitro murine lymphocytes proliferation by bacterial DNA. J Immunol. 1991, 147(6), 1759-1763.
- 101. Mills JA.**  
Systemic lupus erythematosus. N Engl J Med. 1994; 330(26):1871-9.
- 102. Mogensen KE, Daubas P, Gresser I, Sereni D, Varet B.**  
Patient with circulating antibodies to alpha-interferon. Lancet 1981;2(8257): 1227-8.
- 103. Morse HC, Kearney JF, Isaacson PG, Carroll M, Fredrickson TN, Jaffe ES.**  
Cells of the marginal zone- origins, function and neoplasia. Leukemia Res 2001; 25: 169-178.
- 104. Müller U, Steinhoff U, Reis LFL, Hemmi S, Pavlovic J, Zinkernagel RM, Aguet M.**  
Functional role of type I and type II Interferons in antiviral defense. Science 1994;264: 1918-1921.
- 105. Muta T, Kurosaki T, Misulovin Z, Sanchez M, Nussenzweig MC, Ravetch JV.**  
A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates b-cell receptor signalling. Nature 1994;368(6466):70-3.

- 106. Nakamura M, Burastero SE, Ueki Y, Larrick JW, Notkins AL, Casali P.**  
Probing the normal and autoimmune B cell repertoire with Epstein-Barr virus. Frequency of B cells producing monoreactive high affinity autoantibodies in patients with Hashimoto's disease and systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1988;141(12):4165-72.
- 107. Nash JT, Taylor PR, Botto M, Norsworthy PJ, Davies KA, Walport MJ.**  
Immune complex processing in C1q-deficient mice. *Clin Exp Immunol* 2001, 123: 196-202.
- 108. Navratil JS, Ahearn JM.**  
Apoptosis and Autoimmunity: Complement Deficiency and Systemic Lupus Erythematosus revisited. *Curr Rheuma Rep* 2000, 2:32-38.
- 109. Ochsenbein AF, Zinkernagel RM.**  
Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity. *Immunol Today.* 2000;21(12):624-30.
- 110. O'Neill LAJ.**  
After the toll rush. *Science* 2004; 303:1481-1482.
- 111. Palucka AK, Banchereau, Blanko P, Pascual V**  
The interplay of dendritic cell subsets in systemic lupus erythematosus. *Immun Cell Biol* 2002, 80(5), 484-488.
- 112. Palucka AK, Blanck JP, Bennett L, Pascual V, Banchereau J.**  
Cross-regulation of TNF and IFN-alpha in autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(9):3372-7.
- 113. Panem S, Check IJ, Henriksen D, Vilcek J.**  
Antibodies to alpha-interferon in a patient with systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 1982; 129(1):1-3.
- 114. Panem S, Ordonez N, Vilcek J.**  
Renal deposition of alpha interferon in systemic lupus erythematosus. *Infec Immun* 1983, 42(1): 368-373.

- 115. Panem S.**  
Antibodies to interferon in man. *Interferon* 1984, 2: 175-183.
- 116. Paul E, Pozdnyakova OO, Mitchell E, Carroll MC.**  
Anti-DNA autoreactivity in C4-deficient mice. *Eur J Immunol* 2002, 32: 2672-2679.
- 117. Pascual V, Banchereau J, Palucka AK.**  
The central role of dendritic cells and interferon- $\alpha$  in SLE. *Curr Opin Rheumatol.* 2003, 15:548-556.
- 118. Pepys MB.**  
Role of complement in induction of antibody production in vivo. effect of cobra factor and other C3-reactive agents on thymus-dependent and thymus-independent antibody responses. *J Exp Med.* 1974;140(1):126-45.
- 119. Phillips NE, Parker DC.**  
Cross-linking of B lymphocyte Fc gamma receptors and membrane immunoglobulin inhibits anti-immunoglobulin-induced blastogenesis. *J Immunol.* 1984;132(2):627-32.
- 120. Pickering MC, Botto M, Taylor PR, Lachmann PJ, Walport MJ.**  
Systemic lupus erythematosus, complement deficiency, and apoptosis. *Adv Immunol.* 2000; 76:227-324.
- 121. Potter PK, Cortes-Hernandez J, Quartier P, Botto M, Walport MJ.**  
Lupus-prone mice have an abnormal response to thioglycolate and an impaired clearance of apoptotic cells. *J Immun* 2003, 170:3223-3232.
- 122. Preble OT, Black RJ, Friedman RM, Klippel JH, Vilcek J.**  
Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon. *Science.* 1982; 216(4544):429-31.
- 123. Prodeus AP, Goerg S, Shen LM, Pozdnyakova OO, Chu L, Alicot EM, Goodnow CC, Carroll MC.**  
A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity.* 1998; 9(5):721-31.

- 124. Raanani P, Ben-Bassat I.**  
Immune-mediated complications during interferon therapy in hematological patients. *Acta Haematol.* 2002;107(3):133-44.
- 125. Rickert RC, Rajewsky K, Roes J.**  
Impairment of T-Cell-dependent B-cell responses and B-1 cell development in CD19-deficient mice. *Nature* 1995;376(6538):352-5.
- 126. Rönnblom LE, Alm GV, Öberg KE.**  
Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors. *Ann Intern Med.* 1991;115(3):178-83.
- 127. Rönnblom L, Alm GV.**  
The natural interferon-alpha producing cells in systemic lupus erythematosus. *Hum Immunol.* 2002;63(12):1181-93.
- 128. Rönnblom L, Eloranta ML, Alm GV.**  
Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity. *Autoimmunity.* 2003;36(8):463-72.
- 129. Rosen A, Casciola-Rosen L, Ahearn J.**  
Novel packages of viral and self-antigens are generated during apoptosis. *J Exp Med.* 1995;181(4):1557-61.
- 130. Rozzo SJ, Allard JD, Choubey D, Vyse TJ, Izui S, Peltz G, Kotzin BL.**  
Evidence for an Interferon-inducible gene, *Ifi202*, in the susceptibility to systemic lupus. *Immunity* 2001, 15: 435-443.
- 131. Rumore PM, Steinman CR.**  
Endogenous circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Occurrence as multimeric complexes bound to histone. *J Clin Invest.* 1990 Jul;86(1):69-74.
- 132. Rupert KL, Moulds JM, Yang Y, Arnett FC, Warren RW, Reveille JD, Myones BL, Blanchong CA, Yu CY.**  
The molecular basis of complete complement C4A and C4B deficiencies in a systemic lupus erythematosus patient with homozygous C4A and C4B mutant genes. *J Immunol.* 2002;169(3):1570-8.

- 133. Rutz M, Metzger J, Gellert T, Luppä P, Lipford GB, Wagner H, Bauer S.**  
Toll-like receptor 9 binds single-stranded CpG-DNA in a sequence- and pH-dependent manner. *Eur J Immunol.* 2004, 34: 2541-2550.
- 134. Santiago-Raber ML, Baccala R, Haraldsson KM, Choubey D, Stewart TA, Kono DH, Theofilopoulos AN.**  
Type-I Interferon receptor deficiency reduces lupus-like disease in NZB mice. *J Exp Med* 2003, 197(6), 777-788.
- 135. Schilling PJ, Kurzrock R, Kantarjian H, Gutterman JU, Talpaz M.**  
Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukemia. *Cancer* 1991, 68; 1536-1537.
- 136. Schmid P, Itin P, Cox D, McMaster GK, Horisberger MA.**  
The type I interferon system is locally activated in psoriatic lesions. *J Interferon Res.* 1994;14(5):229-34.
- 137. Schmidt KN, Ouyang W.**  
Targeting interferon- $\alpha$ : a promising approach for systemic lupus erythematosus therapy. *Lupus* 2004, 13: 348-352.
- 138. Schur PH.**  
Inherited complement components abnormalities. *Annu Rev Med* 1986, 37; 333-346.
- 139. Schur PH.**  
Genetics of systemic lupus erythematosus. *Lupus.* 1995;4(6):425-37.
- 140. Sen GC, Lengyel P.**  
The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem.* 1992 Mar 15;267(8):5017-20.
- 141. Sergiescu D, Cerutti I, Efthymiou E, Kahan A, Chany C.**  
Adverse effects of interferon treatment on the life span of NZB mice. *Biomedicine.* 1979 Apr;31(2):48-51.

- 
- 142. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ.**  
The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999, 284:1835-1837.
- 143. Siegert C, Daha M, Westedt ML, van der Voort E, Breedveld F.**  
IgG autoantibodies against C1q are correlated with nephritis, hypocomplementemia, and dsDNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.* 1991;18(2):230-4.
- 144. Skaer TL.**  
Medication-induced systemic lupus erythematosus. *Clin Ther.* 1992; 14(4):496-506; discussion 495.
- 145. Smolen JS, Steiner G, Aringer M.**  
Anti-Cytokine therapy in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 2005;14:189-191.
- 146. Steinman CR.**  
Free DNA in serum and plasma from normal adults. *J Clin Invest.* 1975; 56:512-515.
- 147. Steinman CR.**  
Circulating DNA in systemic lupus erythematosus. Isolation and characterization. *J Clin Invest.* 1984 Mar;73(3):832-41
- 148. Stewart TA.**  
Neutralizing interferon alpha as a therapeutic approach to autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2003;14(2):139-54.
- 149. Stollar BD, Zon G, Pastor RW.**  
A recognition site on synthetic helical oligonucleotides for monoclonal anti-native DNA autoantibody. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986 Jun;83(12):4469-73.
- 150. Stone NM, Williams A, Wilkinson JD, Bird G.**  
Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency. *Br J Dermatol.* 2000; 142(3):521-4.

- 151. Strannegard O, Hermodsson S, Westberg G.**  
Interferon and natural killer cells in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 1982; 50(2):246-52.
- 152. Sun S, Zhang X, Tough DF, Sprent J.**  
Type I Interferon-mediated Stimulation of T Cells by CpG DNA. *J. Exp. Med.* 1998, 188(12): 2335-2342.
- 153. Takai T, Ono M, Hikida M, Ohmori H, Ravetch JV.**  
Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc Gamma RII-deficient Mice. *Nature.* 1996;379(6563):346-9.
- 154. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF, Schaller JG, Talal N, Winchester RJ.**  
The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25(11):1271-7.
- 155. Taniguchi T, Takaoka A.**  
A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2(5):378-86.
- 156. Taylor PR, Carugati A, Fadok VA, Cook HAT, Andrews M, Carroll MC, Savill JS, Henson PM, Botto M, Walport MJ.**  
A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo. *J Exp Med* 2000, 192(3):359-366.
- 157. Tokano Y, Morimoto S, Kaneko H, Amano H, Nozawa K, Takasaki Y, Hashimoto H.**  
Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)--relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clin Exp Immunol.* 1999;116(1):169-73.
- 158. Uramoto KM, Michet CJ Jr, Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE.**  
Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis Rheum.* 1999; 42(1):46-50.

**159. Vallin H, Perers A, Alm GV, Rönnblom LE.**

Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous interferon- $\alpha$  inducer in systemic lupus erythematosus. *J Immunol* 1998, 163; 6306-6313.

**160. Vallin H, Blomberg G, Alm GV, Cederblad B, Rönnblom LE.**

Patients with systemic lupus erythematosus (SLE) have a circulating inducer of interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) production acting on leucocytes resembling immature dendritic cells. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 196-202.

**161. von Wussow P, Jakschies D, Hochkeppel H, Horisberger M, Hartung K, Deicher H.**

MX homologous protein in mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1989; 32(7):914-8.

**162. Wagner H.**

Vortrag beim Herbsttagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Maastricht/Niederlande 2004.

**163. Weiner HL.**

Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol.* 2004;61(10):1613-5.

**164. Wernersson S, Karlsson MC, Dahlstrom J, Mattsson R, Verbeek JS, Heyman B.**

IgG-Mediated Enhancement of Antibody Responses Is Low in Fc Receptor Gamma Chain-Deficient Mice and Increased in Fc Gamma RII-Deficient Mice. *J Immunol.* 1999;163(2):618-22.

**165. William J, Euler C, Christensen S, Shlomchik MJ.**

Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers. *Science.* 2002;297(5589):2066-70.

**166. Youd ME, Ferguson AR, Corley RB.**

Synergistic roles of IgM and complement in antigen trapping and follicular localization. *Eur J Immunol.* 2002;32(8):2328-37.

**167. Ytterberg SR, Schnitzer TJ.**

Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25(4):401-6.

**168. Zachrau B, Finke D, Kropf K, Gosink HJ, Kirchner H, Goerg S.**

Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4 deficient mice. *Int Immunol.* 2004, 16(12):1685-90.

**169. Zalman LS, Muller-Eberhard HJ.**

Comparison of channels formed by poly C9, C5b-8 and the membrane attack complex of complement. *Mol Immunol.* 1990 Jun;27(6):533-7.

**170. Zandman-Goddard G, Shoenfeld Y.**

SLE and infections. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2003; 25(1):29-40.

**171. Zandvoort A, Timens W.**

The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood borne antigens. *Clin Exp Immunol.* 2002; 130: 4-11.

**172. Zeng D, Lee MK, Tung J, Brendolan A, Strober S.**

Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice. *J Immunol.* 2000;164(10):5000-4.

**173. Zhu FG, Reich CF, Pisetsky DS.**

Effect of cytofectins on the immune response of murine macrophages to mammalian DNA. *Immunology.* 2003;109(2):255-62.

### III Publikationen und Kongressbeiträge

#### PUBLIKATIONEN

**Finke D, Brandt C.**

Observations of passerine birds in Blæsedalen, Disko Island, W. Greenland. Reports for polar research 330, 78-91, 1999.

**Marxen JC, Becker W, Finke D, Hasse B, Epple M.**

Early mineralization in *Biomphalaria glabrata*: Microscopic and structural results. *J Moll Stud.* 2003, 69:113-121.

**Marxen JC, Witten PE, Finke D, Reelsen O, Rezgaoui M, Becker W.**

A light- and electron-microscopic study of enzymes in the embryonic shell-forming tissue of the freshwater snail, *Biomphalaria glabrata*. *Invert Biol* 2003, 122, 4; 313-325.

**Zachrau B, Finke D, Kropf K, Gosink HJ, Kirchner H, Goerg S.**

Antigen localization within the splenic marginal zone restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4 deficient mice. *Int Immunol.* 2004;16(12):1685-90.

**Finke D, Randers K, Hoerster R, Klempt-Giessing K, Hennig H, Zawatzky R, Marion T, Brockmann C, Kirchner H, Goerg S.**

*The role of Interferon alpha for the development of systemic lupus erythematosus in Complement C4 deficient mice. 2005 eingereicht.*

**Lueddecke K, Finke D, Klempt-Giessing K, Zachrau B, Schlenke P, Kirchner H, Goerg S.**

*Antigen-driven B cell apoptosis in germinal centers does not abrogate antibody production. 2005 eingereicht.*

**Randers K, Finke D, Hoerster R, Jacobsen K, Marion T, Brockmann C, Kirchner H, Goerg S.**

*Longterm production of IgG anti-dsDNA antibodies can be induced by application of IgM anti-dsDNA and causes renal involvement in non-autoimmune mice. In Vorbereitung.*

**Hoerster R, Brockmann C, Finke D, Randers K, Marienfeld K, Jacobsen K, Marion T, Zawatzky R, Kirchner H, Goerg S.**

*CD11b positive cells marginale zone macrophages are the IFN  $\alpha$  producing cells involved in the induction of systemic lupus erythematosus in C4 deficient mice. In Vorbereitung.*

## **KONGRESSBEITRÄGE**

**Zachrau B, Kropf K, Finke D, Carroll MC, Ma M, Kirchner H, Goerg S.**

Antigen localization on marginal zone macrophages restores humoral immune response and IgG class switch in complement C4 deficient mice. XIX. International Complement Workshop. Palermo/Italien 2002.

**Finke D, Kropf K, Lueddecke K, Zachrau B, Schlenke P, Kirchner H, Goerg S.**

The expression of follicular dendritic cell (FDC) specific markers is influenced by complement C4. 33. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie. Marburg 2002.

**Lueddecke K, Finke D, Kropf K, Zachrau B, Schlenke P, Kirchner H, Goerg S.**

Antigen-driven B-cell apoptosis in germinal centres does not abrogate antibody production completely. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie. Berlin 2003.

**Finke D, Kropf K, Hennig H, Hoerster R, Lueddecke K, Zawatzky R, Goerg S.**

A Role of Interferon alpha for the Development of Systemic Lupus Erythematosus in Complement C4 deficient Mice. 34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie. Berlin 2003.

**Finke D, Hoerster R, Brockmann C, Kropf K, Randers K, Hennig H, Zawatzky R,**

**Goerg S.** Interferon alpha mRNA in splenic CD11b positive marginal zone macrophages of C4 deficient mice. International Congress for SLE and related Conditions. New York/USA 2004.

**Finke D, Hoerster R, Brockmann C, Kropf K, Randers K, Hennig H, Zawatzky R,**

**Goerg S.** Interferon alpha mRNA in splenic CD11b positive marginal zone

macrophages of C4 deficient mice. Meeting of the scandinavian society of Immunology. Aarhus/Dänemark 2004.

**Hoerster R, Brockmann C, Kropf K, Marienfeld K, Randers K, Finke D, Goerg S.**

Characterisation of mononuclear cells which produce Interferon alpha (IFN $\alpha$ ) spontaneously in the spleen of complement C4 deficient (C4 $^{-/-}$ ) mice. 35. Joint Annual Meeting of the Dutch and German Society of Immunology. Maastricht/Niederlande 2004.

**Finke D, Randers K, Kropf K, Brockmann C, Hoerster R, Hennig H, Marion T, Zawatzky R, Goerg S.** The development of Systemic Lupus Erythematosus is accompanied by interferon alpha production in CD11b positive cells. 35. Joint Annual Meeting of the Dutch and German Society of Immunology. Maastricht/Niederlande 2004.

**Finke D, Randers K, Brockmann C, Hoerster R, Hennig H, Marion T, Zawatzky R, Goerg S.** The development of autoantibodies typical for Systemic Lupus Erythematosus is accompanied by Interferon alpha production in CD11b positive cells. 27. Arbeitstagung der Norddeutschen Immunologen. Borstel 2004

## IV Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. med. Siegfried Görg - ohne seine Ideen und seine stete Bereitschaft zu anregenden Diskussionen wäre das Entstehen dieser Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Ich konnte jederzeit auf die außerordentlich gute und freundliche Betreuung zählen.

Ich danke Prof. Dr. med. H. Kirchner, der diese Dissertation gefördert und unterstützt hat. Durch den interdisziplinären Dialog und die exzellenten Forschungsmöglichkeiten die sein Institut mir geboten hat, konnte diese Arbeit in der Form entstehen.

Danken möchte ich ebenfalls Prof. Dr. Rainer Zawatzky für seine große Hilfsbereitschaft. Seine beratende Funktion war für diese Arbeit von großer Bedeutung.

Meiner Arbeitsgruppe, bestehend aus Dr. med. Berit Zachrau, Kirstin Lüddecke, Robert Hörster, Dr. med. Christian Brockmann, Katharina Randers und Kirsten Jacobsen, danke ich für eine sehr gute Zusammenarbeit, ihre hilfreiche Unterstützung und viele gemeinsame Laborstunden, die ohne sie nur halb soviel Spaß gemacht hätten.

Dr. med. Christian Brockmann gilt mein besonderer Dank für die Beratung und Unterstützung bezüglich der Statistik.

Mein Dank gilt auch Katja Klempt-Gießing, MTA, für die Vermittlung ihres umfangreichen methodischen Wissens und dafür, dass sie mir immer geholfen hat, wenn Hilfe nötig war.

Uta Fernekorn und Torsten Schulze danke ich für ihre Unterstützung in allen Stimmungslagen und für die zwischen uns entstandene Freundschaft.

Meinen Kollegen und Kolleginnen im ZK danke ich für ein hervorragendes Arbeitsklima und die stete Möglichkeit zum gegenseitigen Austausch von Wissen, Klatsch und Material.

Für die Hilfe und Unterstützung bei den Arbeiten mit dem radioaktiven Material danke ich dem Institut für Nuklearmedizin und Strahlentherapie, besonders Herrn Dr. rer. nat. Hans-Jürgen Gosink für sein außerordentliches Engagement in diesem Bereich.

Meinen Freunden sei für ihre Geduld und moralische Unterstützung mir gegenüber gedankt. Besonders Franziska Widmann, welche die „qualvolle“ Aufgabe der orthographischen Durchsicht dieser Arbeit übernommen hat, gilt ein besonderer Dank.

Großen Dank schulde ich auch meiner Familie, insbesondere meiner Mutter, meiner Schwester und meinem Schwager für ihre unerschütterliche Treue und das Vertrauen in meine Person, die sehr zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen hat.

## V Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN

Name	Doreen Finke
Anschrift	Arnimstrasse 24, 23566 Lübeck
Geburtsdatum/-ort	10.12.1974, Hamburg
Konfession	evangelisch-lutherisch
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### SCHULBILDUNG

1981 - 1985	Grundschule Moorflagen, Hamburg
1985 - 1994	Gymnasium Ohmoor, Hamburg Abschluss Abitur

### HOCHSCHULBILDUNG

10/1994 - 03/1998	Grundstudium der Biologie an der Universität Hamburg
04/1998 - 03/2000	Hauptstudium Fachrichtung Zoologie (Schwerpunkt Stoffwechselphysiologie) an der Universität Hamburg
04/2000 - 01/2001	Anfertigung der Diplomarbeit am Zoologischen Institut und Museum, Universität Hamburg; Thema: „Untersuchung zur Entwicklung der Embryonalschale bei <i>Biomphalaria glabrata</i> (SAY)“; Note „Sehr Gut“
04/2001 - 03/2005	Anfertigung der Dissertation am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin der Universität zu Lübeck