

**Die Bedeutung von Interferon alpha
für das Mikromilieu der Marginalen Zone der Mausmilz
in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses**

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität zu Lübeck

Direktor: PD. Dr. med. Siegfried Görg

Medizinische Fakultät

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

vorgelegt von
Robert Hörster
aus Münster

Lübeck 2008

Meinen Eltern gewidmet

Two roads diverged in a wood, and I—
I took the one less traveled by
And that has made all the difference.

Auszug aus: „The road not taken“
Robert Frost

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Siegfried Görg
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Christoph Hölscher
- Tag der mündlichen Prüfung: 02.09.2009
- Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.09.2009

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	3
II Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung	9
1.1 Angeborene und adaptive Mechanismen des Immunsystems	10
1.1.1 Das Komplementsystem	11
1.1.2 Interferon alpha	13
1.1.3 Die Marginale Zone der Milz	14
1.1.3.1 Mononukleäre Zellen und ihre Marker	15
1.1.3.2 Interferonproduzierende Zellen	16
1.1.3.4 Marginalzonen B-Zellen (MZB)	18
1.2 Systemischer Lupus Erythematoses	19
1.2.1 Zusammenhang zwischen Komplementdefizienz und Entstehung von Systemischem Lupus Erythematoses	23
1.3 Interferon alpha und Systemischer Lupus erythematoses	24
2 Zielsetzung	26
3 Material	28
3.1 Mäuse	28
3.2 Geräte	28
3.3 Laborbedarf	29
3.4 Zellkulturmedien und -zusätze	29
3.5 Chemikalien und Reagenzien	29
3.6 Antikörper	30
3.7 Sekundärreagenzien	31
3.8 Seren 31	
3.9 Primer und Sonden	32
3.10 Lösungen und Kits (gebrauchsfertig)	32
3.11 Zelllinien	32
4 Methoden	34
4.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus der Zellkultur	34

4.2	Immunglobulin-Extraktion mittels Affinitätsaufreinigung	34
4.3	Proteinnachweis quantitativ	36
4.3.1	Bestimmung der Gesamt-Proteinkonzentration mittels Spektroskopie	36
4.3.2	Bestimmung der Immunglobulinkonzentration mittels Spektroskopie	36
4.4	Nachweis der Spezifität der aufgereinigten Immunglobuline	37
4.5	Konjugation von Antikörpern mit Biotin	37
4.6	Immunhistochemie	39
4.6.1	Beschichtung der Objektträger	39
4.6.2	Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern	39
4.6.3	Färbungen	39
4.6.3.1	Zweifarbigen-Färbung	40
4.6.3.2	Intrazelluläre Zytokinfärbung	42
4.7	Isolierung mononukleärer Zellen aus der Milz	44
4.8	Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen	45
4.9	Subklassifizierung mononukleärer Zellen der murinen Milz am Durchflußzytometer	46
4.10	Isolierung von Subpopulationen mononukleärer Zellen der murinen Milz am <i>FACS-Sorter</i>	47
4.11	DNA und RNA-Isolierung aus Zellen	48
4.12	DNA-Verdau	48
4.13	Bestimmung der Gesamt-DNA- bzw. Gesamt-RNA-Konzentration mittels Spektroskopie	49
4.14	Real-time RT-PCR	49
4.15	Relative Quantifizierung der RT-PCR	52
4.15.1	Vergleichende C _T -Methode ($\Delta\Delta C_T$ -Methode)	52
4.16	Bestimmung des Genotyps	53
4.16.1	PCR-Bestimmung des C4 ^{-/-} -Genotyps	53
4.16.2	PCR-Bestimmung des IFNR ^{-/-} -Genotyps	54
4.16.3	Gelelektrophorese	55
4.17	Intravenöse und intraperitoneale Applikation, Immunisierung, Blutentnahme und Serumgewinnung bei Mäusen	56
4.17.1	Intravenöse und intraperitoneale Applikation	56
4.17.2	Immunisierung, Blutentnahme und Serumgewinnung	56
4.18	Statistik	57

5 Ergebnisse	58
5.1 Charakterisierung der Interferon alpha produzierenden Zellen in der marginalen Zone der murinen Milz.....	58
5.1.1 Immunhistochemische Subklassifikation der mononukleären Zellen der murinen Milz	58
5.1.2 Subklassifizierung der mononukleären Zellen der Milz	60
5.1.3 Myeloide dendritische Zellen produzieren Interferon alpha nach Stimulation mit IgM anti dsDNA	66
5.2 Veränderungen des zellulären Mikromilieus der murinen Milz durch Deposition von IgM anti dsDNA und Produktion von Interferon alpha	70
5.2.1 Deposition von IgM anti Doppelstrang-DNA-Immunkomplexen verändert die Zusammensetzung der mononukleären Zellen der Milz.....	70
5.2.2 Verringerte Zahlen von Marginalzonen-B-Zellen durch Immunkomplex-induziertes Interferon alpha.....	72
6 Diskussion	76
6.1 Charakterisierung der Interferon alpha produzierenden Zellen in der murinen Milz	76
6.1.1 Subklassifizierung der Populationen mononukleärer Zellen in der murinen Milz	77
6.1.2 Myeloide dendritische Zellen produzieren IFN- α nach Stimulation mit IgM anti dsDNA.....	79
6.2 Veränderungen des zellulären Mikromilieus der murinen Milz durch Deposition von IgM-anti-dsDNA und Produktion von Interferon alpha.....	81
6.2.1 Veränderungen der mononukleären Zellen der Marginalen Zone der murinen Milz durch IgM-anti-dsDNA Deposition und Produktion von Interferon alpha	81
6.2.2 Veränderungen der Marginalzonen B-Zell-Population der murinen Milz durch IgM-anti-dsDNA Deposition und Produktion von Interferon alpha.....	82
6.2.2.1 Auswirkung der Deposition von IgM-anti-dsDNA Immunkomplexen an der Marginalen Zone auf die Marginalzonen B-Zellen	83
6.2.2.2 Auswirkung von IFN- α auf die Marginalzonen B-Zellen.....	83
6.3 Die Kolokalisation von Marginalzonen-B-Zellen, Interferon-produzierenden Zellen und Chromatin-haltiger Immunkomplexe kann die Ausbildung autoimmuner Phänomene begründen.....	85
7 Zusammenfassung	88

III Publikationen und Kongressbeiträge	90
Publikationen.....	90
Kongressbeiträge.....	91
IV Danksagung	93
V Lebenslauf	94
VI Literaturverzeichnis:	96

II Abkürzungsverzeichnis

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

AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin-Alexa Fluor®
ANA	Antikörper gegen nukleäre Antigene
ACR	American College of Rheumatology
APRIL	A Proliferation-inducing Ligand
BCR	B-Zellrezeptor
BLyS	B-Lymphocyte Stimulator
C	Komplementkomponente
CD	Differenzierungsantigene (Cluster of differentiation)
CMV	Cytomegalie-Virus
CR	Komplementrezeptor
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
C4 def.	C4 defizient (Mäuse)
DC	Dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ssDNA	Einzelstrang-DNA
E	Extinktion
ssDNA	Einzelstrang-DNA
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EBV	Epstein-Barr-Virus
FACS	Flourescence-activated-cell-sorting
Fc	Fragment constant (Teil eines Antikörpers)
Fc- γ -RIIa	Fc-gamma-Rezeptor-IIa
FCS	Fetales Kälberserum (Foetal Calf Serum)
FDC	Follikulär-dendritische Zellen
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FoB-Zelle	Follikuläre B-Zelle
FS	Forward-Scatter
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase)
Ig	Immunglobulin
IgM-IC	IgM Immunkomplex
IC	Immunkomplex
IFN	Interferone

IFN- α	Interferon alpha
IFN γ	Interferon gamma
IFNR def.	Interferon-Rezeptordefizienz (Mäuse)
IL	Interleukine
i.p.	Intraperitoneal
IPC	Interferon-produzierende Zelle
IU	Internationale Einheit
i.v.	Intravenös
MDC	Myelozytäre dendritische Zellen
MAC	Membranangriffskomplex
MHC	Major Histokompatibilitätskomplex
moAB	monoklonaler Antikörper
mRNA	messenger RNA
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-tetrazoliumbromid
MZ	Marginalzone
MZB-Zellen	Marginalzonen B-Zellen
MZM	Marginalzonen Makrophagen
NIPC	Natürlichen Interferonproduzierende Zellen
NP	Nitrophenyl
NK-Zellen	Natürliche Killerzelle
NDV	New Castle Disease Virus
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PBS	Phosphatpuffer (Phosphate buffered saline)
PDC	Plasmazytoide dendritischen Zellen
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Chain Reaction
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNP	2,4,6-Trinitrophenyl
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
rpm	Umdrehungen pro Minute
Unbeh.	Unbehandelt
arb. Units	arbitrary unit (willkürlich gesetzte Einheit)
USA	United States of America
Wt	Wildtyp

1 Einleitung

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine autoimmune Systemerkrankung aus dem rheumatischen Formenkreis, dem pathogenetisch die Bildung von Autoantikörpern und Immunkomplexen vor allem gegen nukleäre Antigene zu Grunde liegt. Auf genetischer Ebene wird eine Assoziation des SLE zu Defekten von Komponenten des klassischen Komplementaktivierungsweges (Komplementkomponenten C1, C4, C2) gesehen. Diese Defekte scheinen prädisponierend für SLE sowohl beim Menschen, als auch bei Tieren zu sein, wie entsprechende tierexperimentelle Studien zeigen [1-7]. Darüber hinaus ist bekannt, dass Patienten mit akutem SLE vermehrt ein aktiviertes Typ I Interferonsystem aufweisen und somit erhöhte Interferon alpha (IFN- α) Spiegel im Serum messbar sind. Weiterhin entwickeln Patienten, die zu therapeutischen Zwecken humanes, rekombinantes IFN- α erhalten teilweise SLE-ähnliche, autoimmunologische Phänomene [8-13]. Neuere Erkenntnisse zeigen, dass in Komplement C4 defizienten Mäusen ein aktiviertes Interferon alpha System vorliegt [14].

Trotz verschiedener Erklärungsansätze für die Induktion dieser Autoimmunerkrankung, bleibt weiterhin unklar, weshalb es in Abwesenheit von C1 oder C4 zu einem Verlust der B-Zelltoleranz kommt, und welche Rolle hierbei das Zytokin IFN- α spielt.

Um Erkenntnisse in dieser Frage zu gewinnen, ist es notwendig festzustellen, wie das IFN- α System in C4 def. Mäusen aktiviert wird, und auf welche Weise dieses aktivierte IFN- α System zu einer aufgehobenen B-Zelltoleranz führt. In dieser Dissertation wurde deshalb die Zellpopulation bestimmt, die IFN- α in C4 def. Mäusen spontan und durch Stimulation mit Frühformen SLE-typischer Antikörper (IgM anti dsDNA) produziert. Hieraus wurden Rückschlüsse auf den Aktivierungsweg dieser Zellen erwartet. Weiterhin wurde die Auswirkung des IFN- α auf das zelluläre Mikromilieu der Milz untersucht, mit besonderem Augenmerk auf die Marginalzonen B-Zellen (MZB-Zellen). Diese Zellpopulation könnte ein geeigneter Kandidat für eine Produktion einer ersten Linie von Autoantikörpern sein, und wäre somit von Bedeutung für die Frühform des SLE.

1.1 Angeborene und adaptive Mechanismen des Immunsystems

Das Immunsystem (lat. *immunis* = frei, unberührt) des menschlichen Körpers ist ein komplexes System aus ineinander greifenden Mechanismen unterschiedlicher Struktur, deren Ziel es ist, den Körper gegen pathogene Einflüsse zu schützen. Es unterscheidet dabei zwischen körpereigenen und körperfremden, sowie zwischen harmlosen und pathogenen Strukturen. Dadurch ist der Organismus in der Lage, gezielt gegen Pathogene wie Viren, Bakterien oder Parasiten vorzugehen. Durch diese Fähigkeit erlangt das Immunsystem eine überlebenswichtige Rolle für den Organismus.

Von ihrer grundlegenden Struktur her lassen sich diese Mechanismen in zellulär versus humoral (lat.: humor = Flüssigkeit) und angeboren versus adaptiv unterscheiden.

Tabelle 1: Wichtige Bestandteile des Immunsystems

unterteilt in angeboren vs. adaptiv und humoral vs. zellulär (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7) [15].

	Angeborene Komponenten	Adaptive Komponenten
Zelluläre Komponenten	Monozyten/Makrophagen dendritische Zellen Natürliche Killerzellen Granulozyten	B-Lymphozyten Plasmazellen Memory B-Zellen T-Lymphozyten (CD4, CD8)
Humorale Komponenten	Komplementsystem C-reaktives Protein	Antikörper

Ein wichtiges System der humoralen, angeborenen Immunantwort stellt das Komplementsystem dar, das aus Serumproteinen besteht. Zelluläre Komponenten des angeborenen Immunsystems sind Monozyten/Makrophagen, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Granulozyten. Die angeborenen Mechanismen haben die Eigenschaft schnell, aber weniger spezifisch auf ein Antigen reagieren zu können.

Bei höheren Lebewesen hat sich zusätzlich das angeborene Immunsystem entwickelt, welches variabel und hochspezifisch auf neue pathogene Reize reagieren kann. Dieses System ist in der Lage in Form eines immunologischen Gedächtnisses, Pathogene, die zuvor bereits den Organismus befallen haben besonders schnell zu erkennen, und

effektiv abzuwehren. Zum adaptiven Immunsystem gehören auf zellulärer Ebene T- und B-Lymphozyten, sowie als humorale Faktoren die Antikörper, die von Plasmazellen sezerniert werden. Plasmazellen stellen Antikörper-produzierende B-Lymphozyten dar. Für die Spezifität des adaptiven Immunsystems wird jedoch Zeit benötigt, bis es zur vollen Entfaltung nach Kontakt mit einem neuen Pathogen kommen kann. Nur das Zusammenspiel aus schneller, unspezifischer, angeborener und langsamer, spezifischer adaptiver Immunität sorgt für eine effiziente Abwehr von Pathogenen [15-17].

Im Folgenden werden die Systeme der Abwehr, die für diese Dissertation von Bedeutung sind näher beschrieben.

1.1.1 Das Komplementsystem

Das Komplementsystem stellt eine Gruppe von Serumproteinen dar und wird zum angeborenen humoralen Immunsystem gerechnet. Komplementkomponenten besitzen die Fähigkeit Bakterien zu lysieren, die an ihren korrespondierenden Antikörper gebunden sind. Durch die Eigenschaft dieser Substanzen die Aktivität von Antikörpern bei der Abwehr von Bakterien zu komplementieren, erhielten sie ihren Namen. Erstmals wurde das Komplementsystem 1896 durch den belgischen Bakteriologen Jules Bordet (1870-1961) beschrieben.

Das Komplement besteht nach heutigem Kenntnisstand aus mehr als 30 verschiedenen Plasmaproteinen mit enzymatischem Charakter, die interagieren und deren Aktivierung als Kaskade abläuft [15].

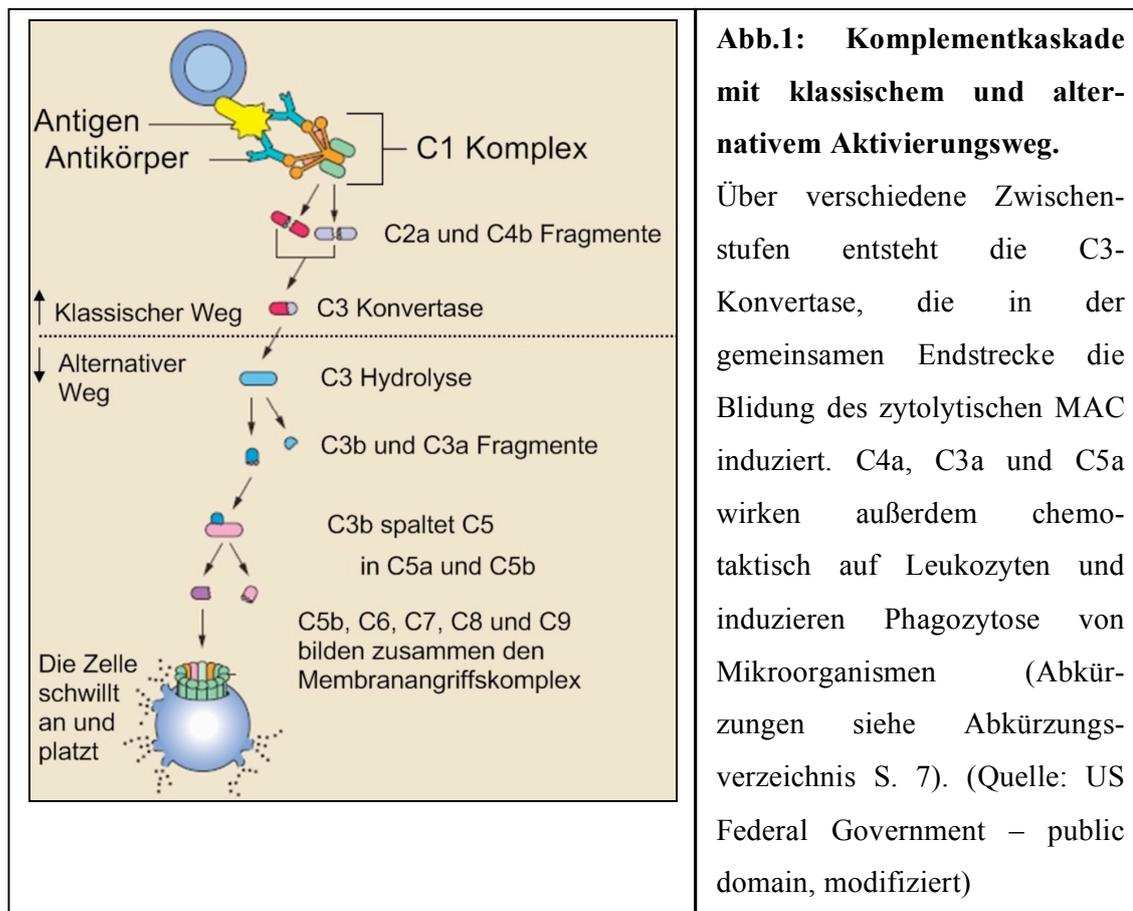
Derzeit sind drei Wege der Komplementaktivierung bekannt: der klassische Weg, der Weg über mannanbindendes Lektin (MBL) und der alternative Weg.

Der klassische Aktivierungsweg des Komplementsystems wird durch einen Immunkomplex (IC) bestehend aus IgG/IgM, dessen spezifischem Antigen und Komplement C1q/r/s induziert. Das in diesem IC komplexierte C1q/r/s aktiviert C4, welches über einen Thioester kovalent an die Oberfläche des Antigens gebunden wird. Komplextiert mit C2 bildet C4 die C3-Konvertase. Beim alternativen Weg wird die spontan aktivierte Komplementkomponente C3 direkt über den Thioester an die Pathogenoberfläche gebunden und bildet zusammen mit weiteren Faktoren ebenfalls eine C3-Konvertase. Ein weiterer Aktivierungsweg erfolgt über Mannan-bindendes-Lektin, welches an Strukturproteine auf der Oberfläche von Bakterien bindet und somit direkt über C4 ohne C1q eine Komplementaktivierung ermöglicht. Die gemeinsame Endstrecke aller drei Wege verläuft über die C3-Konvertase, die in der Lage ist, C3 in

das aktivierte C3b zu konvertieren. C3b induziert die weiteren Komplementfaktoren C5-C9. Diese bilden den Membranangriffskomplex (MAC), der durch Porenbildung eine Zyto- oder Bakteriolyse hervorruft [18, 19]. **Abb. 1** gibt einen Überblick über die Komplementkaskade des klassischen und alternativen Weges.

Komplementspaltprodukte wie C4a, C3a und C5a werden als Anaphylatoxine bezeichnet, die die Vasopermeabilität erhöhen und die Mastzellaktivierung sowie -degranulation stimulieren [20]. 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. Auch an der Abräumung von Immunkomplexen und apoptotischem Zelldetritus sind die Faktoren des klassischen Aktivierungsweges beteiligt.

Im Falle einer Defizienz der Komplementfaktoren des klassischen Aktivierungsweges (C1, C2, C4) resultiert so eine verminderte Abräumung von apoptotischem Material [21].



1.1.2 Interferon alpha

Interferon (IFN) wurde 1935 von Hoskins beschrieben, der feststellte, dass eine Substanz existiert, die nach einer Virusinfektion vor weiteren viralen Infekten schützt. Isaacs und Lindenmann charakterisieren 1957 ein Protein, welches nach einem Virusinfekt mit einer weiteren, gleichzeitigen Infektion „interferiert“, prägten somit den Namen Interferone und erkannten den parakrinen Charakter der Funktion des Interferons [22, 23]: Nach seiner Sezernierung sorgt es für eine antivirale Resistenz der Zellen in der direkten Umgebung.

Mittlerweile weiß man, dass Interferon nicht ein einzelnes Protein darstellt, sondern zwei Proteinfamilien existieren: Die Typ-I- und Typ-II-Interferone. Das einzig bekannte Typ II Interferon ist IFN γ . Im Gegensatz dazu stehen die Typ I Interferone. Sie sind eine Gruppe eng verwandter Proteine, im Menschen kodiert auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9, in der Maus auf Chromosom 4. Dort finden sich mindestens 13 IFN- α Genloci, ebenso wie IFN β , IFN κ , IFN ω und IFN τ [24].

Eine bestimmte Subpopulation dendritischer Zellen wird als Hauptproduzent von IFN- α beschrieben. Sie werden als plasmazytoide-DCs (PDCs) bezeichnet [25-29].

Die wichtigsten Stimuli für die IFN- α Produktion sind dsRNA, DNA- und RNA-Viren [25-31] und bestimmte Oligonukleotide verschiedener Bakterien. Diese so genannte CpG-DNA enthält unmethylierte CpG-Motive [32], welche bei Vertebraten nur in sehr geringer Menge vorkommen. In apoptotischer DNA, wie sie in den SLE-typischen Immunkomplexen vorkommt, finden sich jedoch etwa fünf bis sechs mal mehr unmethylierte CpG-Motive, als in gewöhnlicher, nativer Vertebraten-DNA [33, 34]. Bemerkenswert ist, dass diese Immunkomplexe, in denen humane dsDNA gebunden an IgG-anti-dsDNA Antikörper vorliegt, eine interferogene Wirkung haben [35, 36].

Zunehmend setzt sich die Erkenntnis durch, dass IFN- α nicht allein antiviral wirkt, sondern auch eine wichtige Rolle in der Modulation von angeborener und erworbener Immunität spielt: Das produzierte Typ-I-Interferon induziert die Entwicklung von unreifen Monozyten zu Antigen präsentierenden Zellen, die daraufhin wiederum in der Lage sind T-Helfer Zellen zu stimulieren und zu spezifizieren. Dies gilt vor allem für T-Helfer-Zellen vom Typ Th2. Außerdem rekrutieren sie durch die Produktion von Chemokinen weitere Th1-Zellen an den Ort der Entzündung. [32, 37-43].

Im Bereich der B-Zellen verringert Typ I Interferon die Schwelle zur Aktivierung der Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen [38, 44, 45], verhindert die Apoptose von B-Zellen und sorgt so für verlängertes Überleben [46, 47]. Außerdem sorgt es für

einen Immunglobulinklassenwechsel vom Typ IgM zum Typ IgG durch die Induktion der B-Zell-stimulierenden Moleküle BLys und APRIL (A Proliferation Inducing Ligand) [38, 39, 43, 48].

1.1.3 Die Marginale Zone der Milz

In der Milz unterscheidet man das Parenchym in rote und weiße Pulpa. In der weißen Pulpa sind Leukozyten, in der roten Pulpa Erythrozyten prädominant. Die weiße Pulpa befindet sich zirkulär angeordnet um die Arteriolen, die die Milz mit Blut versorgen. Das Blut gelangt über zentrale Arteriolen und terminale Arteriolen in die marginalen Milzsinus. Dabei verlangsamt sich die Strömungsgeschwindigkeit und der Kontakt zwischen Blutpartikeln und dem Endothel steigt [49]. Jenseits der marginalen Milzsinus liegt die marginale Zone (MZ), in der mononukleäre Zellen und lymphatische Zellen lokalisiert sind. Zu den mononukleären Zellen zählen Monozyten, Marginalzonen Makrophagen (MZM) und myeloide dendritische Zellen (MDCs). Zu den lymphatischen Zellen zählen Marginalzonen B-Zellen (MZB).

Diese Architektur erlaubt einen besonders raschen Kontakt der Abwehrzellen mit Antigenen aus dem Blut [50, 51]. An der MZ werden sowohl IFN- α Produktion [52], als auch das Vorkommen von autoimmunen MZB-Zellen beschrieben [53]. Darüber hinaus kommt es an der MZ zur Ablagerung von intravenös applizierten Immunkomplexen, vom Typ IgM. Bei Injektion von frühen SLE-typischen Antikörpern vom Typ IgM-anti-dsDNA, kommt es zusätzlich konsekutiv zu einer signifikanten Steigerung der IFN- α -Produktion in der Milz [14, 54]. Der Aktivierungsweg für dieses Zytokin, welches eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von SLE spielt, war bisher ungeklärt.

Zusammengefasst liegt an der MZ eine Kollokalisierung vor, von:

1. abgelagerten Antigen-enthaltenden IgM-Immunkomplexen,
2. Zellen, die in der Lage sind, Antigen zu phagozytieren, zu präsentieren, und möglicherweise proinflammatorische Zytokine, wie IFN- α zu produzieren,
3. einer signifikanten Steigerung der IFN- α Produktion durch Injektion von dsDNA-enthaltenden Immunkomplexen vom Typ IgM.

Zusammen mit den vorliegenden autoimmun präspezifizierten MZB-Zellen weist dies auf eine wichtige Rolle der MZ in der Pathogenese von Autoimmunität hin, die im Einzelnen jedoch noch nicht bekannt ist.

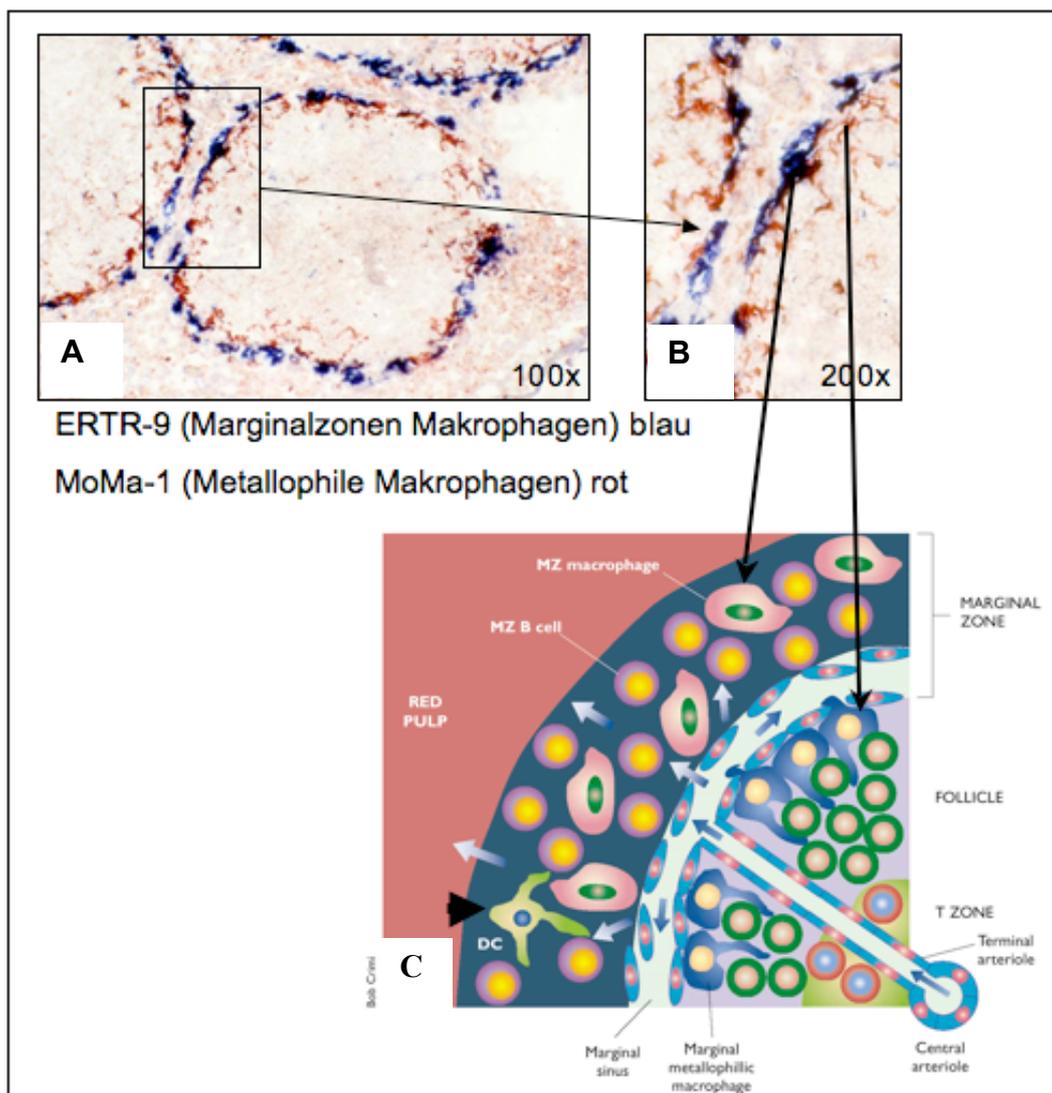


Abb. 2: Darstellung der Marginalen Zone der Milz

A: Immunhistochemische Färbung von Milzschnitten, Marginalzonen Makrophagen (blau), Metallophile Makrophagen (rot), B: Vergrößerung: 100 fach, Ausschnitt 200 fach; C: Schematische Darstellung der MZ [50], MZM und metallophiler Makrophage: lange Pfeile, MDC: Pfeilkopf (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

1.1.3.1 Mononukleäre Zellen und ihre Marker

In der MZ der Milz befinden sich verschiedene Populationen mononukleärer Zellen. Diese gehören zum einen der myeloiden Reihe, zum anderen der plasmazytoiden Reihe an.

Zur myeloiden Reihe gehören die myeloiden Monozyten, die Makrophagen und die myeloiden dendritischen Zellen [55].

Zur plasmazytoiden Reihe gehören die plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDCs).

Myeloide Monozyten können in eine inflammatorische und eine residente Fraktion untergliedert werden. Erstere ist charakterisiert durch starke Expression von CD11b, einem typischen myeloiden Zellmarker, sowie fehlende Expression von CD11c, und fehlender Expression von MHC II, was ihren unreifen Zustand kennzeichnet [55-57]. Die zweite Population von Monozyten ist die residente Population. Sie trägt ebenfalls große Mengen CD11b, zusätzlich aber auch moderate Mengen CD11c. Auch sie haben kein MHC II auf ihrer Oberfläche. Sie verweilen länger im Gewebe und haben eine längere Lebenszeit als inflammatorische Monozyten. Beide Populationen zeigen eine Hochregulierung von CD11c und MHC II und damit Annahme von DC ähnlichem Phänotyp nach inflammatorischem Reiz [55-59].

Myeloide dendritische Zellen (MDCs) sind charakterisiert durch eine große Menge CD11c auf ihrer Oberfläche. Gleichzeitig exprimieren sie den Myeloidenmarker CD11b und den Marker CD4 in unterschiedlicher Menge. An Hand ihrer Expressionsstärke für CD4 sind sie zu unterscheiden in zwei Subpopulationen: Eine Subpopulation ist stark positiv für CD4, eine andere ist negativ [59-61].

Sie exprimieren auf ihrer Oberfläche große Mengen CD11c und MHC II, wenn sie in einem reifen Zustand vorliegen. Zudem exprimieren sie CD45R (B220) auf niedrigem Niveau, welches auch ein Marker für B-Zellen ist, und CD8a in großer Menge. Sie exprimieren kein CD11b.

Die PDCs entwickeln sich aus Vorläufern (pPDCs), die ebenfalls negativ sind für CD11b, aber CD11c, MHC II und CD8a in geringerem Maße tragen als reife PDCs. CD45R (B220) hingegen exprimieren sie stark [27-29, 62]. In zahlreichen Untersuchungen wurde bereits herausgefunden, dass diese Zellen in der Lage sind, große Mengen IFN- α zu produzieren [25, 63, 64]. Dies wird im folgenden Kapitel näher beschrieben.

1.1.3.2 Interferonproduzierende Zellen

Auf Grund der Tatsache, dass IFN- α eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von SLE zu spielen scheint, ist es von Interesse, die Zellpopulation zu identifizieren, die das IFN- α in SLE Patienten und in unserem Mausmodell produziert. Die derzeitige Erkenntnislage über die Natur dieser Zellpopulation ist sehr heterogen:

IFN- α kann grundsätzlich von jeder Zellart synthetisiert werden, wenn diese beispielsweise von einem Virus befallen wird [65, 66]. Darüber hinaus sind PDCs in der

Lage, große Mengen IFN- α zu sezernieren [25, 63, 64]. Es wird aus diesem Grund angenommen, dass sie eine wichtige Rolle in der Pathogenese von SLE spielen [65, 66]. Dem gegenüber stehen Erkenntnisse, dass nicht die PDCs alleine, sondern abhängig von Organ und Stimulus auch die MDCs große Mengen IFN- α sezernieren: Nach Stimulation mit Herpes Simplex Virus produzieren Marginalzonen Makrophagen, Metallophile Makrophagen und MDCs der Milz große Mengen IFN- α . Diese Mengen übertreffen insgesamt sogar die produzierten Mengen der PDCs [52, 67, 68].

Die zelluläre Internalisierung des Stimulus scheint für die Aktivierung der interferonproduzierenden Zellen ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen: Einerseits wird durch die Hemmung der Endozytose durch Chloroquin oder Bafilomycin A die IFN- α -Produktion auf einen Stimulus hin gehemmt [63]. Andererseits spielt bei der Aktivierung der Interferon-Produzenten durch dsDNA enthaltende Immunkomplexe (IC), wie sie beim SLE vorkommen, der Fc-Rezeptor-IIa (Fc γ RIIa) eine entscheidende Rolle. Er sorgt ebenfalls für eine Internalisierung des erkannten Fc-Anteils der Immunglobuline im IC [35, 36, 69]. Innerhalb der Zelle können diese ICs, bzw. die enthaltene dsDNA an zytoplasmatische Strukturen präsentiert werden, wie z.B. den Toll like Rezeptor 9 (TLR9), der intrazellulär, endosomal vorliegt.

Eigene Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass Zellen, die den myeloiden-Marker CD11b in großer Menge exprimieren, IFN- α produzieren:

C4 def. Mäuse besitzen ein spontan aktiviertes IFN- α System. Diese IFN- α Produktion kann in C4 def., wie auch in wt Mäusen durch die Injektion von Vorstufen von SLE typischen Antikörpern von Typ IgM gegen dsDNA gesteigert werden. In beiden Fällen tragen die IFN- α Produzenten große Mengen des myeloiden-Markers CD11b auf ihrer Oberfläche. Weitere Vorergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen in der Immunhistochemischen Färbung, dass die Zellen, die nach Stimulation mit Newcastle Disease Virus (NDV) IFN- α produzieren, sowohl CD11b, als auch CD11c auf ihrer Oberfläche exprimieren [14]. Sie wären demnach der myeloiden Reihe zuzuordnen. Für die weitere Untersuchung der Rolle der C4 Defizienz in der Pathogenese von SLE und in Anbetracht der Tatsache, dass abhängig von Organ und Stimulus unterschiedliche Zellen IFN- α produzieren, war es wichtig zu erfassen, welche Zellen in C4 def. Mäusen spontan und nach Stimulation mit DNA enthaltenden Immunkomplexen IFN- α an der MZ produzieren.

1.1.3.4 Marginalzonen B-Zellen (MZB)

Marginalzonen B-Zellen (MZB) sind eine Population von B-Zellen, die in der Marginalen Zone der Milz lokalisiert sind. Sie zeichnen sich durch eine Kombination aus den Oberflächenmarkern CD21/35, CD1d und CD23 aus [70]. CD 21/35 ist der Komplementrezeptor 2 (CR2), der auf den meisten peripheren B-Lymphozyten, auf residenten Peritonealmakrophagen und folliculär-dendritischen Zellen (FDCs) in der Maus vorhanden ist [71, 72]. Insbesondere auf Marginalzonen B-Zellen kommt CD21 in großer Menge vor. CD1d ist ein Oberflächenprotein mit struktureller Homologie zum MHC I und findet sich auf den meisten peripheren- und Knochenmarkslymphozyten, sowie auf DCs. MZBs exprimieren CD1d stark [73-78]. CD23 ist ein Fc Rezeptor für IgE und findet sich auf reifen, ruhenden B-Zellen, aber nicht auf B1-B-Zellen oder T-Zellen. Auf MZB-Zellen ist CD23 mäßig stark exprimiert [79-82].

MZB-Zellen haben die Aufgabe, die Zeit zwischen dem Einsatz der angeborenen und dem Einsatz der adaptiven Immunität zu überbrücken. Aus diesem Grund wird die Gruppe der Lymphozyten zu denen die MZB-Zellen gehören als innate-like Lymphozyten bezeichnet [70, 83].

Hauptsächlich durch zwei Mechanismen erhalten die MZB-Zellen die Möglichkeit schnell auf Antigene aus dem Blut zu reagieren:

Zum einen reagieren sie unspezifischer als andere B-Zellen vor allem auf Glykolipide und Kohlenhydratketten, wie sie sich in der Hülle von umkapselten Bakterien finden [70].

Zum anderen sind die MZB-Zellen durch ihre Lokalisation in der MZ, wo sich arterielles Blut in die Milzsinus entleert und sich der Blutstrom verlangsamt an einem idealen Platz, um auf die aus dem Blut gefilterten Antigene zu reagieren [51]

Es bestehen zahlreiche Interaktionen von MZB-Zellen mit den Zellen in ihrer direkten Umgebung, vor allem mit MZM und DCs:

Die MZM sind in der Lage Antigene rasch aus der Blutbahn zu filtern und an die MZ zu binden. In unmittelbarer Nähe zu ihnen finden sich ebenfalls DCs durch deren produziertes IFN- α die Überlebenszeit der MZB-Zellen verlängert wird und sie in einen präaktivierten Zustand versetzt [44, 52, 84]. Die DCs sind darüber hinaus eine wichtige Quelle für Proliferations- und Überlebensfaktoren der B-Zellen, v.a. Zytokine aus der TNF Familie, wie die Zytokine BAFF (B-cell activating factor belonging to the TNF family) und APRIL (a proliferation inducing ligand). IFN- α ist ein Induktor für die Sekretion des Zytokins BAFF [85-87].

MZB-Zellen sind wesentlich stärker als folliculäre B-Zellen in der Lage naive CD4 T-Zellen vor zu aktivieren und für ein Antigen zu spezifizieren (engl.: *primen*) [88].

Die genannten Eigenschaften machen die MZB-Zellen auch zu einer möglichen Quelle für autoreaktive Antikörper. So ist es bekannt, dass innerhalb der CD1d hochpositiven Fraktion vermehrt Zellen enthalten sind, die auf dsDNA reagieren. Diese stellen dadurch die Vorläufer für spätere Plasmazellen dar, die Antikörper gegen dsDNA in verschiedenen Maus-Modellen für SLE produzieren [89, 90].

Darüber hinaus findet man in bestimmten SLE Modellen elevierte Zellzahlen innerhalb der MZB Population. Es konnte bislang noch nicht endgültig bewiesen werden, ob die MZB-Zellen selbst die Quelle für die SLE typischen Autoantikörper sind, oder ob sie über die Spezifizierung von CD4 T-Zellen für eine Aktivierung von folliculären B-Zellen sorgen. Die Autoantikörperproduktion durch MZB-Zellen, sowie auf ein gehäuftes Auftreten autoimmuner B-Zellen in der marginalen Zone konnte jedoch in mehreren Experimenten gezeigt werden [91-93].

Fraglich war demnach, ob und welche Veränderungen im Mikromilieu der B-Lymphozyten in der Milz von C4 def. Mäusen vorliegen. Hieraus sollten Rückschlüsse auf die mögliche Aktivierung der MZB Zellen zu ziehen sein.

1.2 Systemischer Lupus Erythematodes

Beim SLE handelt es sich um eine autoimmune Systemerkrankung, die mit der Bildung von Antikörpern gegen nukleäre Antigene einhergeht. Ihre genaue Pathogenese ist bisher ungeklärt, es wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Der SLE verläuft chronisch, wobei unterschiedliche Organe des Körpers befallen werden.

Epidemiologie:

In unterschiedlichen Ethnien existieren unterschiedliche Inzidenzen für die Entwicklung eines SLE. Die Gesamt-Inzidenz aller Ethnien liegt bei 5,1 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner pro Jahr [94]. Die Prävalenz beträgt 52,2/100000. Die höchste Prävalenz haben Menschen afrokaribischen Ursprungs in Großbritannien im Alter von 15-64 Jahren: Mit 159,4/100000 liegt sie mehr als dreimal so hoch, wie innerhalb der Allgemeinbevölkerung [95, 96].

Genetische und hormonelle Faktoren scheinen eine wichtige Rolle in der Pathogenese von SLE zu spielen: im Erwachsenenalter betrifft die Erkrankung Frauen 10-13-mal häufiger als Männer. Etwa 80 % aller SLE-Erkrankungen betreffen Frauen im gebärfähigen Alter [94]. Familienangehörige ersten und zweiten Grades von SLE-Patienten zeigen eine stark erhöhte SLE-Prävalenz [97].

Trotz verbesserter diagnostischer Möglichkeiten und somit früherer Erkennung und Therapie erleiden die Hälfte aller erkrankten Patienten schwere Organschäden [98]. Auch hier sind afroamerikanische Menschen häufiger betroffen als die Allgemeinbevölkerung [99]. Die Mortalität ist gegenüber der Normalbevölkerung dreifach erhöht. Die Überlebensrate liegt 10 Jahre nach Diagnosestellung bei 80 %, 20 Jahre nach Diagnosestellung bei 65 % [100, 101].

Ätiologie und Pathogenese

Die genaue Pathogenese des SLE ist bislang unbekannt. Es existieren jedoch verschiedene Erklärungsmodelle, die eine multifaktorielle Genese annehmen.

Weibliche Geschlechtshormone scheinen ein Faktor für die Penetranz von SLE zu sein, da Frauen im gebärfähigen Alter am häufigsten von der Erkrankung betroffen sind [94]. Insbesondere Polymorphismen von Genen, die die Östrogenhydroxylierung regulieren, weisen eine Assoziation mit der Pathogenese von SLE auf [102, 103].

Ethnische Faktoren scheinen ebenfalls für die Entstehung von SLE zu prädisponieren, wie an der Häufigkeitsverteilung zu erkennen ist.

Es ist lange bekannt, dass UV-Licht die Ausprägung des diskoiden Lupus erythematoses der Haut provoziert und auch bei ca. 20 % der SLE-Patienten systemische Krankheitsexazerbationen verursachen kann [104].

Für verschiedene Medikamente (z.B. Procainamid, Chlorpromazin, u.a.) ist bekannt, dass sie SLE induzieren oder bestehenden SLE verschlimmern [97, 105].

Weiterhin werden Viren wie zum Beispiel Cytomegalie-Virus (CMV), Epstein-Barr-(EBV) und Parvovirus B19 als fördernde Faktoren für die Entstehung eines SLE diskutiert [106, 107].

Der SLE weist eine Assoziation mit verschiedenen genetischen Besonderheiten auf [108-110]: Bei SLE Patienten werden gehäuft Defekte der Komplementkomponenten C1q, C4 und C3 gefunden. Speziell für Komplement C4 besteht ein erheblicher Polymorphismus mit dem Vorkommen von so genannten Null-Allelen, die zu einer

Defizienz des Komplementfaktors C4 führen. Die Defizienz von frühen Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges (C1q, C2, C4) prädisponiert für eine Ausbildung SLE-typischer Antikörper [21, 111-113].

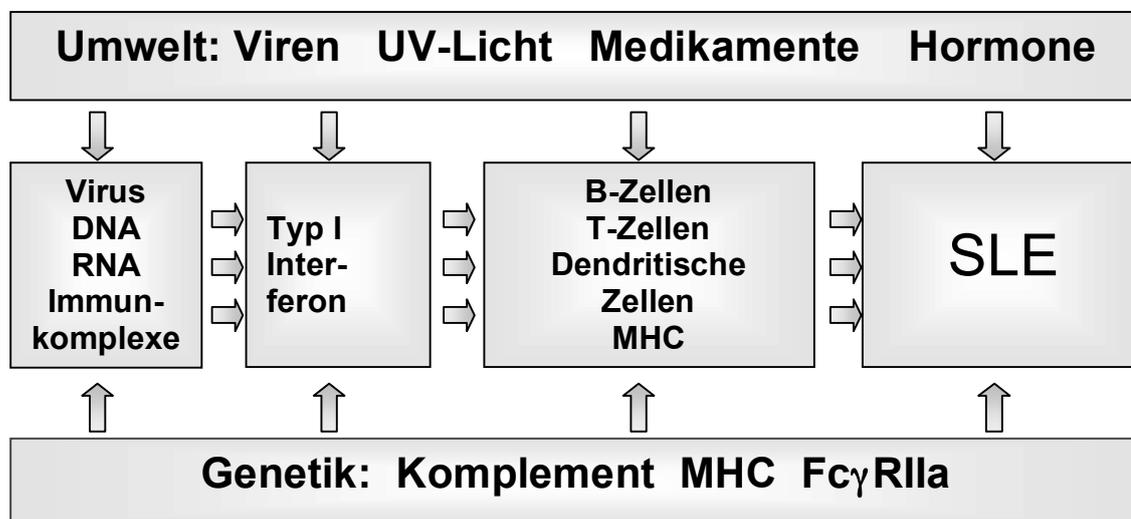


Abb. 3: Schema beeinflussender Faktoren in der Pathogenese des SLE

Systemischer Lupus Erythematodes hat eine multifaktorielle Genese, bei der Umweltfaktoren auf der einen Seite, und genetische Faktoren auf der anderen Seite eine Rolle spielen (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Im Serum von SLE Patienten finden sich verschiedene Autoantikörper, die zur Bildung von Immunkomplexen führen. Diese Immunkomplexe lagern sich besonders in Gefäßwänden und serösen Hüllen ab, verursachen multiple Inflammation und sind somit verantwortlich für die sehr variierenden klinischen Symptome. Pathognomonisch für den SLE sind Antikörper gegen doppelsträngige DNA, die als Chromatin im Zellkern vorliegt und das menschliche Erbgut enthält. Darüber hinaus kommen noch weitere Antikörper gegen nukleäre Antigene vor, wie Antikörper gegen Einzelstrang-DNA (ssDNA), gegen Histone (H1-H4) und Non-Histon-Proteine (Sm, SS-A/Ro, SS-B/La u.a.). Man findet auch Antikörper gegen zytoplasmatische Antigene, gegen Serumkomponenten, zum Beispiel Antiphospholipid-Antikörper, oder gegen Blutzellen, zum Beispiel gegen Oberflächenstrukturen von Erythrozyten.

Gleichzeitig werden gehäuft niedrige Spiegel von Komplementkomponenten gefunden. Dies deutet auf einen Verbrauch oder eine Defizienz hin (s. Kapitel 1.2.1 der Einleitung) [114].

Tabelle 2: Vorkommen und Häufigkeit der Antikörper entsprechend der Richtlinien des American College of Rheumatology (ACR) [114]

(Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7)

Antikörper / Serumabnormität	Häufigkeit
Antinukleäre Antikörper (ANA)	94 %
Antikörper gegen	
• Doppelstrang DNA (anti-dsDNA)	74 %
• Nonhistonproteine	50-70 %
Niedrige Komplementfaktoren	77 %

Klinik

Die Klinik ist sehr variabel, da unterschiedliche Organsysteme befallen werden können. Auch treten nicht alle Symptome gleichzeitig auf, sondern konsekutiv im Laufe des Lebens. Die Diagnose ist weitgehend klinisch zu stellen.

In **Tabelle 3** werden die 11 klinischen Symptome angegeben, die durch das ACR als Diagnosekriterien für SLE bezeichnet werden:

Tabelle 3: Diagnosekriterien für SLE, entsprechend den Kriterien des American College of Rheumatology [114]

(Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7)

Organregion	Symptom
Haut	Gesichtserythem (Schmetterlingserythem) Diskoides Erythem
Photosensitivität	Erytheme als Reaktion auf Sonnenlicht
Schleimhäute	Orale und nasopharyngeale Ulzerationen (häufig schmerzlos)
Gelenke	Non-erosive Arthritis, Befall von >2 Gelenken
Herz und Lunge	Pleuritis ODER Perikarditis
Niere	Persistierende Proteinurie ODER

	Zell-Zylinder (z.B. Erythrozytenzylinder)
Neurologische Phänomene	Bewusstseinstörung ODER Psychose
Hämatologisch	Hämolytische Anämie ODER Leukozytopenie ODER Lymphozytopenie ODER Thrombozytopenie
Immunologische Phänomene	Antikörper gegen: Doppelstrang DNA Phospholipide Sm-nukleäre Antigene
Antinukleäre Antikörper (ANA)	Vorliegen abnormaler Titer von ANA

Liegen gleichzeitig vier oder mehr der oben angegebenen Symptome vor, ohne, dass sie durch Einwirkung eines Medikaments oder einer anderen Erkrankung erklärt werden können, ist die Diagnose SLE mit 95 % Spezifität und 85 % Sensitivität zu stellen.

1.2.1 Zusammenhang zwischen Komplementdefizienz und Entstehung von Systemischem Lupus Erythematoses

In den Seren von Patienten mit SLE werden regelmäßig verminderte Spiegel an Komplementfaktoren gefunden [114]. Dies ist einerseits auf einen Verbrauch von Komplementfaktoren während der Bildung von Immunkomplexen begründet, andererseits wird auf genetischer Ebene eine Assoziation des SLE zu Defekten von frühen Komponenten des klassischen Komplementaktivierungsweges (Komplement C1, C4, C2) gesehen. Verschiedene Experimente zeigen, dass diese Defekte für SLE prädisponieren, sowohl im Tiermodell [3] als auch im Menschen [1]. 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 [2, 4, 6, 7] oder C4-Proteines [4-6] haben die höchste Anfälligkeit (>80 %) und schwersten Verläufe. Defekte von Komplementfaktor C2 sind wesentlich seltener mit SLE assoziiert und verlaufen deutlich gutartiger [4, 6]. C3 Defizienz ist weder in Mäusen noch im Menschen mit SLE assoziiert [115].

In Komplement C1q-defizienten-Mäusen wurden erhöhte Mengen apoptotischen Materials in der Niere gefunden. Diese Mäuse wiesen dabei eine Glomerulonephritis auf, die ebenfalls ein typisches Symptom des SLE ist [21]. Es zeigt sich darüber hinaus, dass in Mäusen, die defizient für C1q und C4 sind, eine signifikant verminderte Aufnahme intraperitoneal injizierter apoptotischer Zellen durch Peritonealmakrophagen haben. Dies gilt in schwächerer Form ebenso für Komplement C4 defiziente Mäuse. Dass dieses Ergebnis auf das fehlende Komplement zurückzuführen ist, konnte dadurch gezeigt werden, dass die gleichzeitige Injektion von löslichem Komplement C1q zu einer signifikanten Steigerung der Aufnahme apoptotischer Zellen führte [116]. Dieses apoptotische Material enthält Strukturen wie dsDNA und nukleäre Histon-Proteine, die Antigene von SLE-typischen Autoantikörpern darstellen [117].

Bemerkenswert ist, dass in Individuen mit SLE erhöhte Spiegel apoptotischer DNA im Serum vorliegen [118]. In bisher unveröffentlichten Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe fanden wir ebenfalls signifikant erhöhte Spiegel an endogener DNA in C4-def. Mäusen. In mehreren Studien konnte in in-Vitro-Experimenten gezeigt werden, dass apoptotisches Material in der Lage ist IFN- α zu induzieren, wenn es mit IgG anti-dsDNA als Immunkomplex vorliegt [35, 36, 119].

Zusammenfassend wird deutlich, dass Komplementdefizienz und die konsekutive Einlagerung apoptotischen Materials mit der Pathogenese des SLE eng verknüpft sind. Es verbleibt unklar, auf welche Weise apoptotische DNA, die in komplementdefizienten Individuen vermehrt vorliegt, die Produktion von Autoantikörpern durch B-Lymphozyten aktiviert. Durch apoptotische DNA induziertes IFN- α könnte als zweiter Stimulus für autoimmun präspezifizierte B-Lymphozyten fungieren. Im folgenden Kapitel wird der Zusammenhang zwischen IFN- α und SLE beschrieben.

1.3 Interferon alpha und Systemischer Lupus erythematoses

In den Seren von an SLE erkrankten Menschen zeigen sich erhöhte IFN- α Spiegel, wenn diese unter einem akuten entzündlichen Schub der Erkrankung leiden [11-13, 120]. Es scheint darüber hinaus eine Korrelation zwischen der Schwere der Erkrankung und der Höhe der Serum IFN- α Spiegel zu geben [10].

In der jüngeren Vergangenheit konnte mit Hilfe von so genannten *Microarrays* ein Expressionprofil der Gene von peripheren mononukleären Blutzellen von SLE-

Patienten erstellt werden. Es wurde gezeigt, dass bei ca. der Hälfte aller SLE-Patienten eine Aktivierung Interferon-regulierter Gene nachweisbar ist [121-124]. Darüber hinaus scheinen diese Veränderungen mit der Krankheitsintensität und der Organmanifestation zu korrelieren [125, 126].

Die Entstehung von Autoantikörpern und Autoimmunerkrankungen ist eine Nebenwirkung der Therapie mit rekombinantem IFN- α [8, 9]. Bei 19 % der Patienten, die eine Langzeitbehandlung mit IFN- α erhielten, manifestierte sich eine Autoimmunerkrankung [127-129]. Bei 8 % aller Patienten konnten nach Interferontherapie Antikörper gegen dsDNA nachgewiesen werden und in 22 % der Fälle fand man ANAs [130].

Nach Interferontherapie werden nicht nur die Induktion von SLE, sondern auch von verschiedenen anderen Autoimmunerkrankungen wie perniziöse Anämie, autoimmune Thyreoiditis und Myasthenia gravis, autoimmune Hepatitis, insulinpflichtiger Diabetes mellitus, rheumatoide Arthritis, Polymyositis, Vaskulitis [131, 132] beschrieben, ohne dass es bislang einen ausreichenden Erklärungsansatz für diese Phänomene gibt. Die Gründe für dieses weite Spektrum an Autoimmunerkrankungen sind nicht bekannt.

Eine Typ I IFN-Behandlung beeinträchtigt die Toleranzerhaltung und ist in der Lage eine de novo autoimmune Reaktion zu initiieren. Bereits existierende, aber klinisch bis dahin unauffällige autoimmune Prozesse können durch Typ I IFN-Behandlung exazerbieren [65, 66].

Wie schon beschrieben sind Immunkomplexe bestehend aus Chromatin und IgG anti-dsDNA aus Seren von SLE-Patienten in der Lage IFN- α zu induzieren. Hier wird noch einmal der Zusammenhang zwischen den SLE-pathognomonischen IgG anti-dsDNA-Immunkomplexen und dem aktivierten IFN- α -System deutlich [35, 36, 119].

Zusammenfassend ist festzustellen, dass ein Zusammenhang zwischen der Defizienz von Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges, der konsekutiven Deposition von apoptotischer DNA in Geweben, sowie der darauf folgenden Synthese von IFN- α zu bestehen scheint. Dieses IFN- α wiederum scheint eine wichtig Rolle in der Pathogenese von SLE zu spielen.

Sowohl der Aktivierungsweg des IFN- α -Systems durch apoptotische DNA, als auch die Art der Aktivierung von B-Lymphozyten möglicherweise durch IFN- α verbleiben bislang unklar.

2 Zielsetzung

Der Systemische Lupus Erythematoses ist eine Systemerkrankung, die durch die Ablagerung von Immunkomplexen autoimmuner Antikörper in verschiedenen Geweben des Körpers ausgelöst wird. Eine Assoziation besteht zur Defizienz früher Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges (C1, C2 und C4). Als Erklärung für diese Assoziation wird derzeit einerseits eine verringerte Phagozytose von apoptotischem Material postuliert, andererseits eine gestörte Regulation autoreaktiver B-Lymphozyten. Neuere Erkenntnisse zeigen eine erhöhte Menge von endogener DNA, wie sie in apoptotischem Material vorkommt, sowohl in C4 defizienten Mäusen, als auch in Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses.

Ein weiterer bedeutender Faktor scheint das antivirale Zytokin Interferon- α zu sein, da bei Patienten mit systemischem Lupus Erythematoses regelmäßig ein aktiviertes Interferon- α -System beobachtet wird. Die Applikation von Interferon- α zu therapeutischen Zwecken weist gelegentlich die Induktion von für systemischen Lupus Erythematoses typischen Autoantikörpern als Nebenwirkung auf.

In Komplement C4 defizienten Mäusen liegt ein spontan aktiviertes Interferon- α System vor. Die Injektion von frühen, für systemischen Lupus Erythematoses typischen Antikörpern vom Typ IgM führt zu einer Ablagerung dieser Antikörper an der Marginalen Zone der Milz und zu einer konsekutiven Aktivierung des Interferon- α Systems.

Diese Beobachtungen veranlassten zu folgender Hypothese:

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 an der marginalen Zone steigert die lokale Produktion von Interferon- α . Diese Interferon- α Sekretion unterstützt die humorale Immunreaktion gegen die im Immunkomplex gebundenen Antigene und führt somit zu Bildung von Autoantikörpern gegen nukleäre Antigene durch die, an der marginalen Zone vorkommenden Marginalzonen B-Zellen.

In der vorliegenden Dissertation soll die Rolle des Interferon- α innerhalb dieser Hypothese näher untersucht werden:

Ziel ist es, die Population, die für die Produktion des Interferon- α verantwortlich ist zu identifizieren und die Auswirkung der erhöhten Interferon- α Spiegel auf die Zellen der marginalen Zone der Milz zu untersuchen. Von besonderem Interesse sind hier die

Interferon- α -Produzenten selbst, sowie die Marginalzonen B-Zellen, die eine Quelle für die für den systemischen Lupus Erythematoses typischen Autoantikörper darstellen.

Die Subpopulationen der mononukleären Zellen der Milz sollen mit Hilfe von Durchflußzytometrie-unterstützter Zellsortierung aufgetrennt, und bezüglich ihrer Interferon- α Produktion mittels Real Time Polymerase Kettenreaktion untersucht werden. Die Mäuse sollen zuvor mit frühen, Lupus-typischen Antikörpern vom Typ IgM stimuliert werden.

Um Hinweise auf die Entstehung von Autoimmunität und die Rolle von Interferon- α zu bekommen, werden in einem zweiten Schritt die Auswirkungen von Interferon- α auf das zelluläre Mikromilieu der Marginalen Zone der Milz untersucht. Hierzu soll eine durchflußzytometrische Analyse der mononukleären Zellen und der Marginalzonen B-Zellen in Wildtyp, Komplement C4 defizienten und in Komplement C4-Interferon-Rezeptor defizienten Mäusen durchgeführt werden.

Die Zielsetzung dieser Arbeit liegt daher in der Charakterisierung des Zusammenhangs zwischen interferonproduzierenden, und den von Interferon aktivierten Zellen im Mikromilieu der marginalen Zone der Milz. Hieraus können wichtige Erkenntnisse über die Entstehung von systemischem Lupus Erythematoses gewonnen und neue Therapieoptionen abgeleitet werden.

3 Material

3.1 Mäuse

Verwendet wurden Wildtyp (wt) und C4 defiziente (C4-/-) Mäuse vom Stamm C57BL/6 (Charles River Laboratories, Wilmington/USA). Der genetische Hintergrund der C4-/-Mäuse ist die Kreuzung der Stämme C57BL/6. Der genetische Hintergrund der verwendeten Interferon-Rezeptor defizienten (IFNR-/-) Mäuse, welche uns freundlicherweise vom DKFZ Heidelberg überlassen wurden, ist ebenfalls der Stamm C57BL/6.

Der Tierversuchsantrag für dieses Projekt gemäß des Antrags mit der Nummer 29/c/04, Aktenzeichen V742-72241.122-33 (1-1/04) vom 26.03.2004 wurde durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein bewilligt. Der Tierversuchsantrag für dieses Projekt gemäß des Antrags mit der Nummer 29/d/05, Aktenzeichen V 742-72241.122-33 (6-1/05) vom 19.04.2005 wurde durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein bewilligt. Der Tierversuchsantrag für dieses Projekt gemäß des Antrags mit der Nummer 29/A04/06, Aktenzeichen V 312-72241.122-33 vom 17.11.2005 wurde durch das Ministerium für Natur und Umwelt des Landes Schleswig-Holstein bewilligt. Die Einwilligung der Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck liegt ebenfalls vor.

3.2 Geräte

- Taqman RT-PCR Cycler: ABI Prism 7700 (Applied Biosystem, Weiterstadt)
- Coulter Counter T-660 (Beckman Coulter, Krefeld)
- Coulter Counter ACT 8 (Beckman Coulter, Krefeld)
- Durchflußzytometer Epics[®] XL-MCL (Beckman Coulter, Krefeld)
- Durchflußzytometer Cytomics[®] FC 500 (Beckman Coulter, Krefeld)
- Gene Amp PCR System 2400 (Perkin Elmer, Wellesley/USA)
- BD-FACS-Vantage[™] SE (Becton, Dickinson, Heidelberg, Deutschland)

3.3 Laborbedarf

- Dialyseschlauch Dialysis Tubing Cellulose Membrane, 25x16 mm (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- HiTrap™ IgM Purification Column (Amersham Biosciences, Freiburg)
- 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)
- Separationssäulen Größe MS (Miltenyi, Biotec, Bergisch Gladbach)

3.4 Zellkulturmedien und –zusätze

- bovines Serumalbumin (BSA) (Fluka Biochemika, Neu Ulm)
- Fetales Kälberserum (FCS), Mycoplex (PAA Laboratories Inc., Österreich)
- Kulturmedium RPMI 1640 (BioWhittaker, Heidelberg)
- L- Glutamin (BioWhittaker, Heidelberg)
- 2-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt)
- Natrium-Pyruvat (BioWhittaker, Heidelberg)
- Penicillin 10000 E/ml, Streptomycin 10000µg/ml (BioWhittaker, Heidelberg)

3.5 Chemikalien und Reagenzien

- Biotinamidocaproate N-Hydroxysuccinimide Ester (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- humanes Albumin (DRK Blutspendedienst, Springe)
- Fast Blue BB Base (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Ficoll Typ 400 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Jung Einbettmedium für Gefrierschnitte (Leica instruments, Nussloch)
- Levamisole (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Naphthol AS-MX Phosphate (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Poly-L-Lysin (Sigma, Taufkirchen)
- Protein-G-Agarose (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

- Saponin (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- TNP-(AECM)-Ficoll (Biosearch Technologies, USA)
- Tween 20 (Merck, Darmstadt)

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]

Markierung mit Peroxidase (HRP):

- Anti-Fluorescein (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

Markierung mit Biotin:

- Maus anti-Ratte IgG1/2a [Klon G28-5]
- Ratte anti-Maus IgG2b CD11b [Klon M1/70]
- Ratte anti-Maus IgM ERTR-9 [Klon SIGNR1] (BMA Biomedicals AG, Augst/Schweiz)
- Ratte anti Maus IgG2b 1-A/1-E (MHC II) [Klon M5/114.15.2]
- Ratte anti Maus IgG2a CD45R/B220 [Klon RA3-6B2]
- Ratte anti Maus IgG2a CD23 [Klon B3B4]

Markierung mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC):

- Ratte anti Maus IgG2b CD4 [Klon YTS191.1] (Immunotech, Krefeld)
- Ratte anti-Maus IgG2b CD11b [Klon M1/70]
- Ratte anti-Maus IgG2b CD21/CD35 [Klon 7G6]
- Ratte anti-Maus MOMA-1 IgG2b (ImmunoKontakt AMS Biotechnology GmbH, Wiesbaden)
- Isotypkontrolle anti Ratte IgG2b (eBioscience)

Markierung mit Phycoerythrin (PE):

- Hamster anti Maus IgG1 lambda CD11c [Klon HL3]
- Ratte Anti Maus IgG2b CD1d [Klon1B1]
- Isotypkontrolle anti Hamster IgG1 (eBioscience)

Markierung mit PE-Cy5:

- Ratte anti Maus IgG 2a CD45R (B220) [Klon RA3-6B2]
- Ratte anti Maus IgG2a CD8a [Klon 53-6.7]
- Isotypkontrolle anti Ratte IgG2a (eBioscience)

Markierung mit magnetischen Beads:

- B220-Beads (Miltenyi Biotec, Weilheim)
- CD11b-Beads (Miltenyi Biotec, Weilheim)
- CD90.2 (Thy1.2)-Beads (Miltenyi Biotec, Weilheim)
- CD 19-Beads (Miltenyi Biotec, Weilheim)

3.7 Sekundärreagenzien

Avidin ist ein Glycoprotein, das eine hohe Affinität zu Biotin hat und mit ihm einen festen Komplex bildet. Verschiedene Antikörper wurden in biotinylierter Form eingesetzt. Zur Verwendung am Durchflußzytometer ist deshalb eine Sekundärbehandlung mit Avidin nötig, an das Fluorochrome konjugiert sein müssen. In der Immunhistochemie kommen ebenfalls biotinylierte Antikörper zum Einsatz. Hier ist eine Sekundärbehandlung nötig mit Avidin, an das alkalische Phosphatase (AP) und Horse Radish Peroxidase (HRP) gekoppelt sind. Letztere werden durch die Umsetzung von Substrat für die Lichtmikroskopie sichtbar (s.u.).

- Avidin PE (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Avidin PE-Cy5 (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Avidin AP (Sigma-Aldrich, Steinheim)
- Avidin HRP (Sigma-Aldrich, Steinheim)

3.8 Seren

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

Die Hybridomzelllinie 4EA1 produziert einen Ratte-anti-Maus Antikörper gegen Interferon Alpha vom Typ IgG1 und wurde freundlicherweise von Rainer Zawatzky (DKFZ Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Beide Zelllinien wachsen in folgendem Zellmedium: BioWhittaker™ RPMI 1640. Es wird zusätzlich mit 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % Penicillin-Streptomycin (Biochrom, Berlin) auf 500 ml Medium versetzt.

4 Methoden

4.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper aus der Zellkultur

Die verwendeten monoklonalen Antikörper sind spezifisch gegen dsDNA gerichtete Immunglobuline vom Typ IgM. Sie werden von der Hybridomzelllinien 111s.19 produziert.

Für die Herstellung einer solchen monoklonalen Hybridomzelllinie werden antigenspezifische B-Lymphozyten mit einer Zelllinie nicht-sekretorischer Maus-Myelomzellen fusioniert. Auf diese Weise kombiniert man die spezifische Sekretion monoklonaler Antikörper der B-Zellen mit der Langlebigkeit und steten Teilungsfähigkeit der Myelom-Zellen. Die produzierten Antikörper werden von den Zellen in das Kulturmedium abgegeben. Zweimal in der Woche werden die Zellen zentrifugiert (1200 rpm, 10 Min.), die Kulturüberstände gesammelt und die Zellen in frisches 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 IgM anti dsDNA, Klon 111s.19 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 anti IFN- α , Klon 4EA1 erfolgt mit Hilfe von Protein G-Agarose- Säulen.

Puffer

Protein G-Agarose (Boehringer, Mannheim) Bindungspuffer

1,08 g NaH₂PO₄ H₂O

3,27 g Na₂HPO₄ 7H₂O

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**Protokoll****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 (66).

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 (66).

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

[ϵ für IgG = 13,6; ϵ für IgM = 11,8 (ϵ = Extinktionskoeffizient)]

4.4 Nachweis der Spezifität der aufgereinigten Immunglobuline

Der *Dotplot* 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.

Puffer

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)

4.5 Konjugation von Antikörpern mit Biotin

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

Puffer

Pufferlösungen0,2 M Borsäure1,24 g H₃BO₃

ad 100 ml Aqua bidest.

0,2 M di-Natriumtetraborat-Decahydrat7,62 g Na₂B₄O₇ x 10 H₂O

ad 100 ml Aqua bidest.

Biotinamidocaproate N-Hydroxysuccinimide Ester

(Sigma-Aldrich, Steinheim)

Stopp-Lösung

1 M Ammoniumchlorid

53,5 g NH₄Cl

ad 1 Liter Aqua bidest.

Protokoll**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 µg für 1 mg Protein)
- 2 h bei Raumtemperatur rühren
- Reaktion stoppen mit 1 M NH₄Cl – pro µg Biotin 2 µl Stopp-Lösung
- Dialyse (Dialysis Tubing Cellulose Membrane) und Aufkonzentrierung mittels Amicon[®] Mikrokonzentratoren

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

4.6 Immunhistochemie

4.6.1 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.

4.6.2 Gewebebehandlung und Fixierung auf Objektträgern

Die der Maus entnommenen Gewebe werden in Einbettmedium (Tissue-Tek) platziert und bei -80°C eingefroren.

Zum Schneiden der Gewebe mittels Mikrotom (LEICA CM 1850) wird dieses auf eine Temperatur von -20°C gekühlt. Die Schnittdicke der Gewebe beträgt 5-8 μm . Die Gefrierschnitte werden auf die beschichteten Objektträger gebracht und 1 h getrocknet. Anschließend werden sie für 10 Min. in Aceton (4°C) fixiert und wiederum 1 h luftgetrocknet. Danach können sie bei -20°C eingefroren und gelagert werden.

4.6.3 Färbungen

Mit Hilfe der Färbungen können auf den Gefrierschnitten spezifische Antigene lokalisiert werden. Es gibt verschiedene Methoden der Anfärbung der Antigene: Es können entweder Antikörper oder Reagenzien verwendet werden, die sich direkt gegen das Antigen richten und an die das färbende Agens bereits konjugiert ist. Oder es werden zunächst Antikörper verwendet, die kein färbendes Agens an sich gebunden haben. Sie werden erst indirekt mit einem konjugierten Sekundärantikörper oder Reagenz das gegen den primären Antikörper gerichtet ist mit einem färbenden Agens verbunden, sodass es zur Farbreaktion und Lokalisation des Antigens kommen kann.

Als färbende Agenzien werden die Enzyme alkalische Phosphatase (AP) oder Horseradish Peroxydase (HRP) verwendet. Im Falle der Konjugierung eines Antikörpers mit Biotin wird Avidin, konjugiert mit AP oder HRP als Sekundärreagenz verwendet.

Bei allen Methoden entsteht durch die enzymatische Umsetzung eines Substrates 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.

4.6.3.1 Zweifarben-Färbung

Bei der Zweifarben-Färbung können gleichzeitig zwei unterschiedliche Antigenstrukturen nachgewiesen werden. Es ist sowohl möglich, die Antigene direkt mit konjugierten Antikörpern zu markieren, als auch indirekt mit Hilfe von konjugierten Sekundärantikörpern. Bei der enzymatischen Umsetzung der Substrate ist zu beachten, dass erst das AP-Substrat zur Reaktion gebracht wird und als zweites das HRP-Substrat.

Puffer

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 (Biomeda Corp. Foster City/USA)

Protokoll

Zweifarbigen-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 μ l N,N Dimethylformamid lösen
- Die Lösung zu 40 ml Tris-Puffer hinzufügen
- 10 mg Fast Blue BB Base in 250 μ l 2 N HCl lösen, 250 μ l 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 μ m 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 μ l AEC-Lösung zu 9,75 ml 0,05 M Natriumacetat-Puffer geben
- Lösung filtern; lichtgeschützt aufbewahren
- vor Gebrauch 5 μ l 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

4.6.3.2 Intrazelluläre Zytokinfärbung

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

Zu diesem Zweck werden Zellen in Gewebeschnitten eingesetzt, die auf o. gen. Weise gewonnen werden. Um intrazellulär lokalisierte Zytokine mit dem spezifischen Antikörper zu erreichen ist es nötig, die Membran der Zellen zu perforieren. Dies geschieht mit dem Zellgift Saponin. Damit bei diesem Vorgang die Integrität der Zellen erhalten bleibt ist es nötig das Gewebe zuvor mit Paraformaldehyd zu fixieren. Da bei dem Perforationsvorgang die Oberflächenantigene der Zellen, die man gegebenenfalls

zusätzlich anfärben möchte zerstört werden können, ist es wichtig, dass ihre Markierung vor der Perforation vorgenommen wird.

Puffer

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

Protokoll

Intrazelluläre IFN- α Färbung mit dem 4EA1-Antikörper

- Acetonfixierte 7 μ 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- α -AK (4EA1) (10 μ 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 Isolierung mononukleärer Zellen aus der Milz

Die Zellseparation ist eine präparative Methode, bei der mononukleäre Zellen, die in einer homogenen Zellsuspension vorliegen durch Dichtezentrifugation aufgetrennt werden.

Zu diesem Zweck wird ein Leukozytenpräparationsmedium verwendet, das eine höhere Dichte als die Zellsuspension aufweist. Dieses wird in einem Reaktionstube mit der Zellsuspension überschichtet, sodass sich zwei Phasen ausbilden. Bei der Zentrifugation wandern Zellen mit höherer Dichte, wie z.B. Erythrozyten durch die Medium-Phase auf den Grund des Tubes, Zellen mit geringerer Dichte, z.B. Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, sammeln sich in der Interphase und können hier mit einer Pipette abgenommen werden.

Puffer

Lymphozyten-Separationsmedium LSM 1077

Protokoll**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 µM 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

4.8 Aufreinigung von Zellen nach Oberflächenantigenen

Die Aufreinigung von Zellen anhand ihrer spezifischen Oberflächenmarker ist möglich mit Antikörpern, an welche magnetische Partikel, so genannte Beads gekoppelt sind. Der eigentliche Aufreinigungsschritt erfolgt über spezielle Säulen, in denen Stahlwolle durch ein Magnetfeld diese Beads zurückhält, während die restliche Zellsuspension ungehindert hindurchfließt. Die Antikörper-Beads (MACS-Beads) wurden von der Firma Miltenyi (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) bezogen.

Puffer**MACS-Puffer**

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

Protokoll**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 µg 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 vorseülen
- 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

4.9 Subklassifizierung mononukleärer Zellen der murinen Milz am Durchflußzytometer

Die Durchflußzytometrie stellt ein bekanntes Verfahren dar, mit dessen Hilfe Partikel in einem Flüssigkeitsstrom fokussiert werden können. Für diese Dissertation wurde das Cytomics FC 500 der Firma Beckmann Coulter, (Krefeld, Deutschland) verwendet. Es hat Detektoren für fünf verschiedene Frequenzen emittierten Lichts. Für eine genaue Beschreibung der Methode der Durchflußzytometrie wird auf die Fachliteratur verwiesen [133].

Auf mononukleären Mauszellen befinden sich häufig Fc-Rezeptoren (CD16/32), die IgG unspezifisch zu binden vermögen. Vor Anfärbung dieser Zellen müssen die Fc-Rezeptoren deshalb mit Antikörpern blockiert werden.

Protokoll

Subklassifizierung mononukleärer Zellen der Mausmilz:

- 2µl unmarkierten Antikörper gegen CD16/32 (FC Rezeptor) pro 1×10^6 Zellen
- 10 Min. Inkubation bei 4°C
- 2µl fluorochromierten Antikörper pro 1×10^6 Zellen (im Fall von Antikörpern der Firma Pharmingen)
- 10 Min. Inkubation bei 4°C
- 5 Min. Zentrifugieren bei 2000 rpm
- Überstand verwerfen
- Zellen in PBS aufnehmen

Es folgte die Messung am Durchflußzytometer. Es wurden mindestens 1×10^5 Zellen untersucht, um auch kleinere Populationen problemlos darstellen zu können.

4.10 Isolierung von Subpopulationen mononukleärer Zellen der murinen Milz am *FACS-Sorter*

Der *FACS-Sorter* ist ein Gerät, mit dessen Hilfe man Zellpopulationen in einer Lösung voneinander separieren kann. Für diese Dissertation wurde das BD-FACS-Vantage™ SE verwendet. Für eine genaue Beschreibung der Methode der Durchflußzytometrie wird auf die Fachliteratur verwiesen [133].

Da es das Ziel war, aus den separierten Zellen nachfolgend mRNA zu isolieren war es nötig, dass eine möglichst große Anzahl Zellen der Zielpopulation separiert wurde. Aus diesem Grund wurde ein Pool aus 5 C4 def. Mäusen mit 20µl IgM anti dsDNA i.v. behandelt und nach 6 Stunden Inkubationszeit getötet zur Organentnahme von Milz und Blut.

Um die Zielpopulation einzugrenzen erfolgte vor dem Sortiervorgang eine Lymphozytendepletion mittels magnetischen Beads gegen den T-Zell-Marker (CD90.1) und den B-Zell-Marker (CD19).

Protokoll

Separierung von Zellen am *FACS-Sorter*

- 2µl unmarkierten Antikörper gegen CD16/32 (FC Rezeptor) pro 1×10^6 Zellen
- 10 Min. Inkubation bei 4°C
- 1µl anti CD90.1 Mikrobeads + 1µl anti CD19 Mikrobeads pro 1×10^6 Zellen
- 10 Min. Inkubation bei 10°C
- 5 Min. Zentrifugieren bei 2000 rpm
- 2µl fluorochromierten Antikörper pro 1×10^6 Zellen (im Fall von Antikörpern der Firma Pharmingen)
- 10 Min. Inkubation bei 4°C
- 5 Min. Zentrifugieren bei 2000 rpm
- Überstand verwerfen
- Zellen in PBS aufnehmen

Es folgt der *Sorter*-Vorgang, bei dem die Zellen in 200µl fetalem Kälber Serum (FCS) appliziert werden. Nach dem Sorten schließt sich unmittelbar die mRNA Isolierung an.

4.11 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.

4.12 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.

Protokoll

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.

4.13 Bestimmung der Gesamt-DNA- bzw. Gesamt-RNA-Konzentration mittels Spektroskopie

Durch folgende Formel ist die Proteinkonzentration in guter Näherung photometrisch bestimmbar (66).

DNA/RNA-Konzentration ($\text{ng}/\mu\text{l}$) = (260 nm – 320 nm) x OD DNA bzw. RNA x Verdünnungsfaktor

OD DNA = 50; OD RNA = 40

4.14 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 wurde IFN- α mRNA gewonnen und auf diese Weise die Menge an produziertem Zytokin quantifiziert.

Puffer

RNasefreies Wasser

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

Puffer

PCR-Mastermix (Menge je Probe) für IFN- α (steril)

2x Master Mix	25 μ l
Multiscribe/RNase Inhibitor	1,25 μ l
Forward-Primer IFN- α 20 μ M	0,75 μ l
Reverse-PrimerI IFN- α 20 μ M	0,75 μ l
Reverse-PrimerII IFN- α 20 μ M	0,75 μ l
Sonde IFN- α 5 μ M	0,3 μ l
Rodent GAPDH Primer I	0,2 μ l
Rodent GAPDH Primer II	0,2 μ l
Rodent GAPDH Sonde	0,2 μ l
MgCL ₂ 25 mM	3 μ l
Wasser (RNasefrei)	7,6 μ l

Puffer

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

2x Master Mix	25 μ l
Multiscribe/RNase Inhibitor	1,25 μ l
Forward-Primer IFRG28 20 μ M	0,75 μ l
Reverse-PrimerI IFRG28 20 μ M	0,75 μ l
Sonde IFRG28 5 μ M	0,4 μ l
MgCL ₂ 25 mM	2 μ l
Wasser (RNasefrei)	9,85 μ l

Puffer

GAPDH-Kontrolle im separaten PCR-Tube

2x Master Mix	25 μ l
---------------	------------

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.

4.15 Relative Quantifizierung der RT-PCR

Bei dieser Form der Quantifizierung soll die Zielsequenz (IFN- α) 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 so genannte 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 unbekannt Proben werden als n-facher Unterschied relativ zum Kalibrator bestimmt.

4.15.1 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- α [0,028]

IFRG28 [0,016]

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

4.16 Bestimmung des Genotyps

Es wurden spezifische PCR etabliert um den Genotyp der Mäuse aus der C4^{-/-} bzw. IFNR^{-/-} 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.

4.16.1 PCR-Bestimmung des C4^{-/-} -Genotyps

Puffer

PCR-Mastermix (Menge je Tube) für C4^{-/-}-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

Protokoll

PCR-Ansatz für die C4^{-/-} -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	∞	

4.16.2 PCR-Bestimmung des IFNR-/- -Genotyps

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

Puffer

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

10x PE Puffer	5 µl
MgCl ₂	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

Puffer

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

10x PE Puffer	5 µl
MgCl ₂	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

Protokoll

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	∞	

4.16.3 Gelelektrophorese

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

Puffer

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)

Puffer

1x TBE-Puffer

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

Puffer

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

Puffer

Gelladepuffer

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

Puffer

123 bp-Leiter

120 µl 123bp Leiter + 40 µl 10xPCR-Puffer + 80 µl Gelladepuffer + 160 µl aqua
dest.

Protokoll

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

Protokoll

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.

4.18 Statistik

Die statistische Analyse der Ergebnisse sowie die Berechnungen der Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Graph-Pad-Prism© 4.0c für Apple-Macintosh durchgeführt. Die Signifikanzen wurden mit dem parametrischen t-Test für zwei unabhängige Stichproben mit Gauss'scher Verteilung ermittelt.

5 Ergebnisse

5.1 Charakterisierung der Interferon alpha produzierenden Zellen in der marginalen Zone der murinen Milz

In der Pathogenese des systemischen Lupus Erythematoses spielt das Zytokin Interferon alpha eine zentrale Rolle. Eine Defizienz früher Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges (C1q, C2, C4) ist mit der Entstehung eines SLE assoziiert. Da in C4 def. Mäusen ein aktiviertes IFN- α -System vorliegt, scheint hier eine Verbindung der beiden genannten Phänomene zu existieren. IFN- α -Produktion kann in Wildtyp, wie auch in C4 def. Mäusen durch die Injektion von Vorstufen für SLE typischer Antikörper vom Typ IgM gegen dsDNA gesteigert werden.

Um den Zusammenhang von durch SLE-typische-Antikörper induziertem IFN- α , Komplement-Defizienz und der Pathogenese von SLE zu verstehen, ist es von großem Interesse, die IFN- α produzierenden Zellen in diesem Modell zu kennen. Vorergebnisse zeigen, dass sie den Oberflächenmarker CD11b in großer Menge exprimieren, und in der marginalen Zone der Milz lokalisiert sind.

5.1.1 Immunhistochemische Subklassifikation der mononukleären Zellen der murinen Milz

Über die IFN- α Produzenten war bekannt, dass sie immunhistochemisch in der MZ der Milz zu lokalisieren sind, dass sie positiv sind für den Oberflächenmarker CD11b und zum Teil ebenfalls für den Marker CD11c. Zur weiteren Subklassifizierung der IFN- α Produzenten in der murinen Milz wurde eine Immunhistochemische Doppelfärbung an Gefrierschnitten der Milz durchgeführt. Zur Etablierung der Methode wurden die Mäuse zunächst mit dem sehr interferogenen *Newcastle Disease Virus* (NDV) (Stamm „Ulster“, erhalten von der Arbeitsgruppe Tumovirusimmunologie, DKFZ Heidelberg) stimuliert. Hierbei zeigte sich, dass die CD11b positiven Zellen doppelpositiv mit dem Marker ERTR-9 (**Abb. 4 B**), und negativ für den Marker MoMa-1 sind (**Abb. 4 D**).

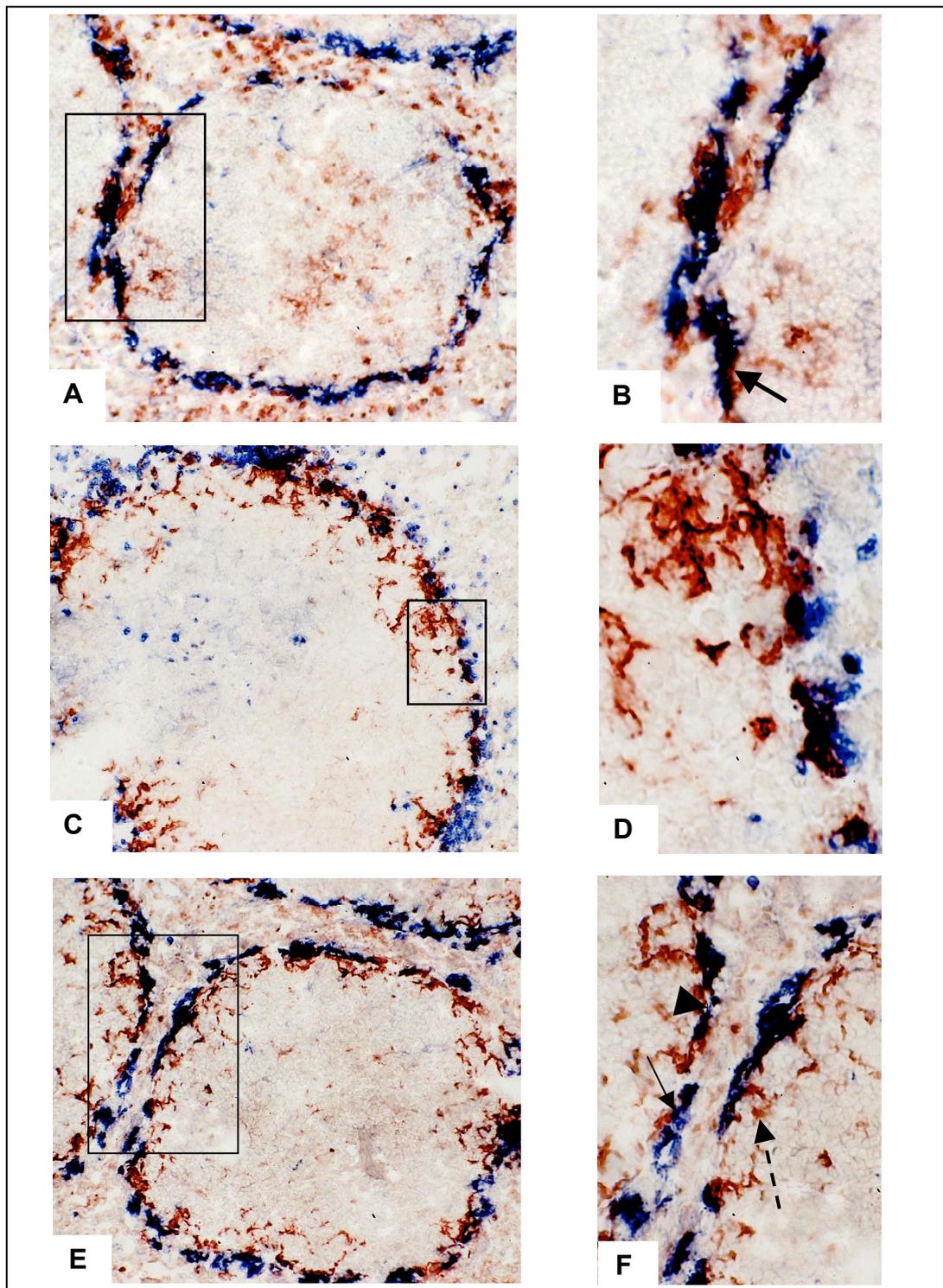


Abb. 4: Immunhistochemische Färbungen verschiedener Oberflächenmarker an Gefrierschnitten der Milz einer mit Newcastle Disease Virus (NDV) (Stamm „Ulster“) - behandelten Wildtyp Maus.

Dargestellt ist weiße Pulpa periarterieller lymphatischer Scheiden, begrenzt von der marginalen Zone. MoMa-1 positive metallophile Makrophagen (rot, gestrichelter Pfeil)

finden sich diesseits, ERTR-9 positive Marginalzonen Makrophagen (blau, dünner Pfeil) finden sich in der Marginalzone jenseits des marginalen Sinus (Pfeilkopf).

A (100x): ERTR-9 (blau) gegen CD11b (rot). B (200x) Ausschnittsvergrößerung von A (Kasten) teilweise Doppelpositivität (dicker Pfeil) von CD11b und ERTR-9 in der marginalen Zone. C (100x): CD11b (blau) gegen MoMa-1 (rot). D (400x): Ausschnittsvergrößerung von C (Kasten), keine Doppelpositivität von CD11b und MoMa-1. E (100x): ERTR-9 (blau) gegen MoMa-1 (rot). F (200x): Ausschnittsvergrößerung von E (Kasten), keine Doppelpositivität von ERTR-9 und MoMa-1 (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

5.1.2 Subklassifizierung der mononukleären Zellen der Milz

Um die vorcharakterisierten Zellen nun weiter zu bestimmen und eine Zuordnung zu einer Subpopulation zu ermöglichen wurden die mononukleären Zellen der Milz unstimulierter Mäuse mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Hier wurden für eine erste Analyse die Oberflächenmarker CD11b und CD11c mit MoABs angefärbt. Ziel war es, sowohl myeloide, als auch plasmazytoide dendritische Zellen zu erfassen. Diese Analysen ergaben ein Vorliegen von fünf verschiedenen Populationen mit unterschiedlichem Expressionsmuster von CD11b und CD11c (**Abb. 5**):

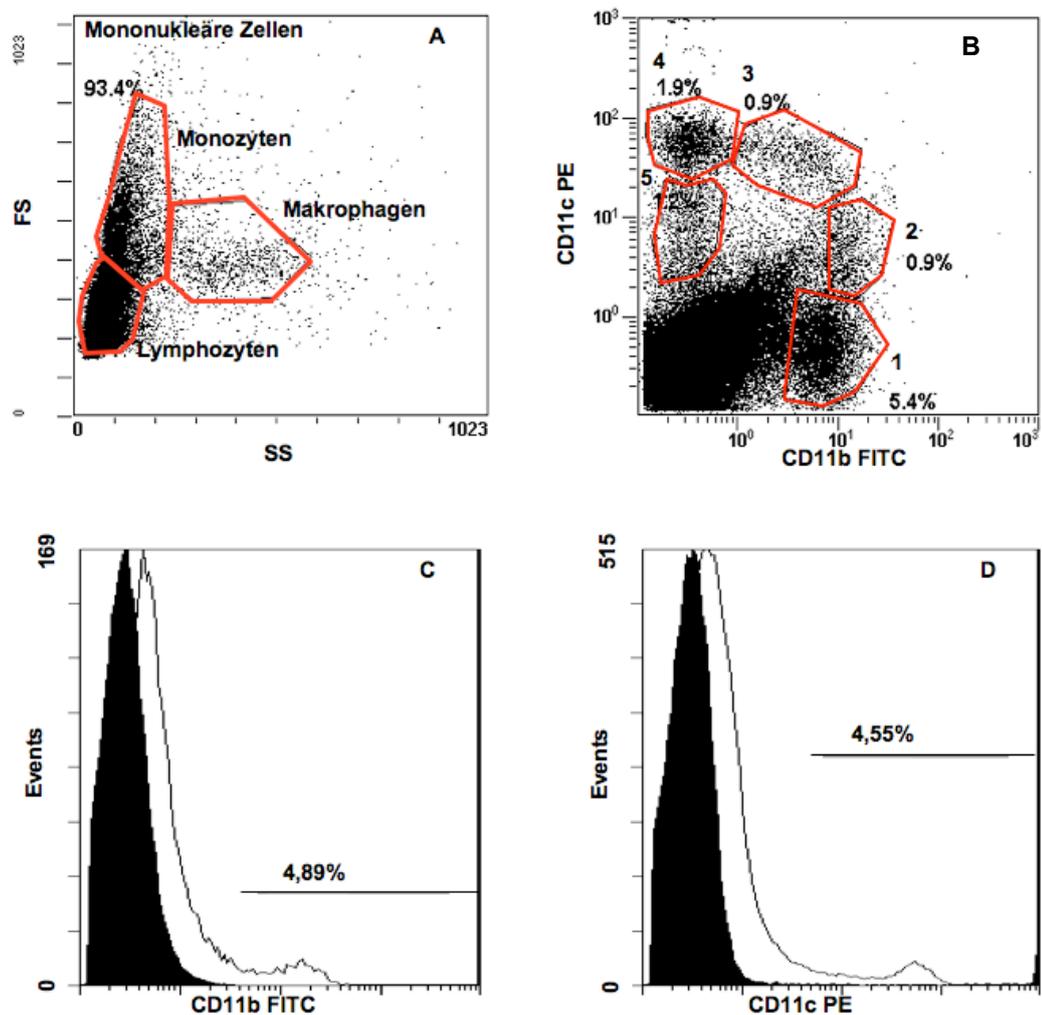


Abb. 5: Durchflußzytometrische Analyse der mononukleären Zellen der Milz

Mononukleäre Zellen der Milz unstimulierter Mäuse, aufgereinigt durch Dichtezentrifugation. A: Dotplot mit Vorwärts-Seitwärts-Scatter. Es stellen sich drei Populationen mononukleärer Zellen dar: Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen. B: *Dotplot*: Färbung der Splenozyten mit CD11b FITC, CD11c PE. Es stellen sich fünf Populationen mit unterschiedlicher Expression dieser Marker dar (Gate 1-5) C: *Histogramm-Plot*: Splenozyten mit CD11b FITC gefärbt (weiß) mit Isotypkontrolle (schwarz). D: *Histogramm-Plot*: Splenozyten mit CD11c PE gefärbt (weiß) mit Isotypkontrolle (schwarz). (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Diese fünf Populationen wurden daraufhin auf ihr Expressionsmuster für die in **Tabelle 4** aufgeführten Oberflächenmarker untersucht, die spezifisch sind für unterschiedliche

Subklassen mononukleärer Zellen. **Abb. 6-8** zeigen diese Expressionsmuster der einzelnen Populationen.

Tabelle 4: Oberflächenmarker monozytärer Zellen in der murinen Milz

Zusammenfassung der Oberflächenmarker der einzelnen Subpopulationen mononukleärer Zellen. Expressionsstärken der Marker: +++ hochgradig positiv; ++ mittelgradig positiv; + gering positiv; - negativ (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

	Population	Population	Population	Population	Population
	1	2	3	4	5
CD11b	+++	+++	++	-	-
CD11c	-	++	+++	+++	++
MHC II	-	+++	+++	+++	+
CD8a	-	-	-	+++	++
B220	-	-	+	+	+++

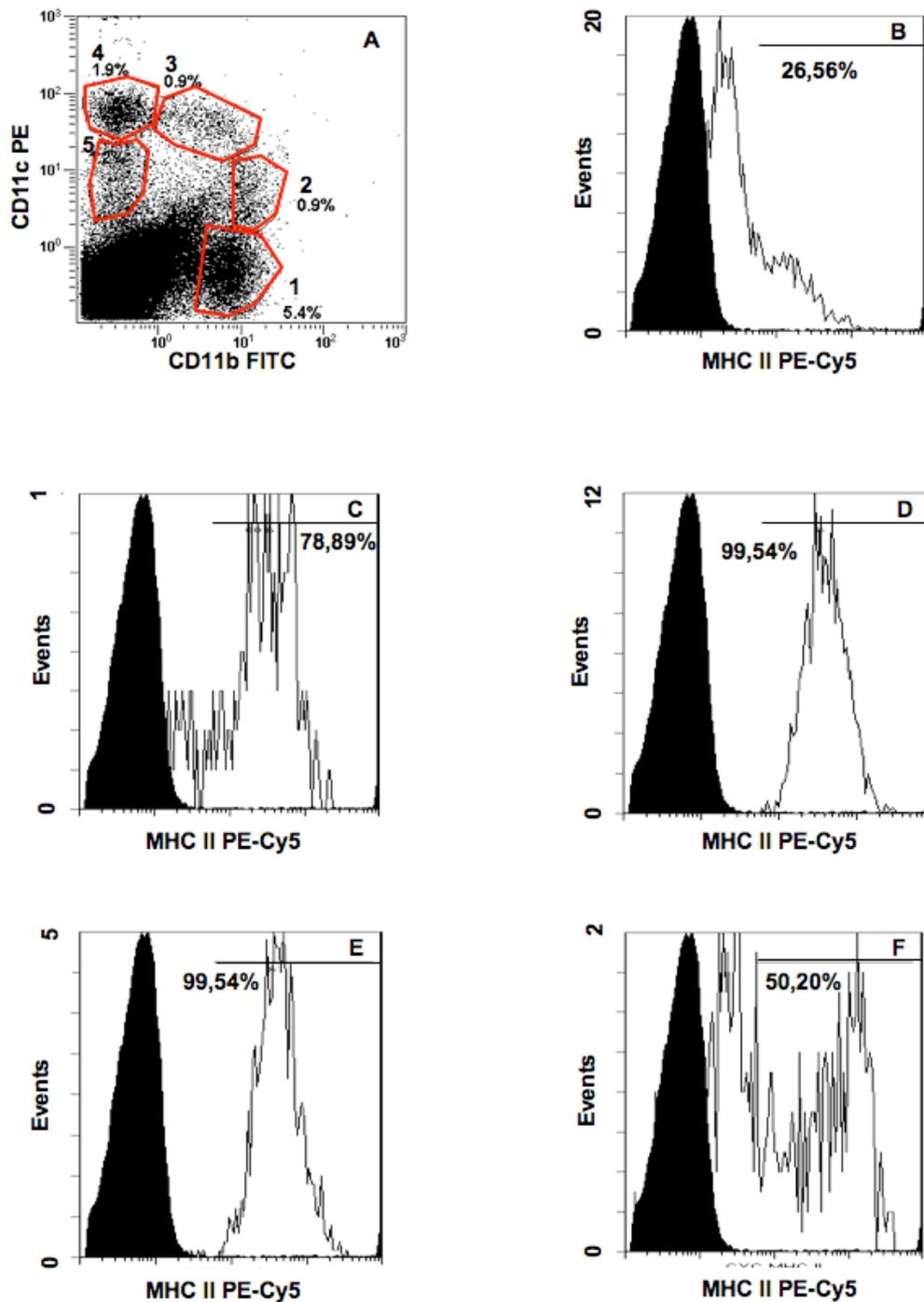


Abb. 6: Durchflußzytometrische Analyse mononukleärer Zellen der Milz auf ihr Expressionsmuster von MHC II

Splenozyten, durch Dichtezentrifugation aufgereinigt werden durchflußzytometrisch analysiert. Im Vorwärts-Seitwärts-Scatter werden mononukleäre Zellen *gated*. A: *Dotplot* CD11b FITC und CD11c PE. B-F zeigen die Expressionsstärke (weiß) samt Isotypkontrolle (schwarz) für MHC II der *Gates* 1-5 (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

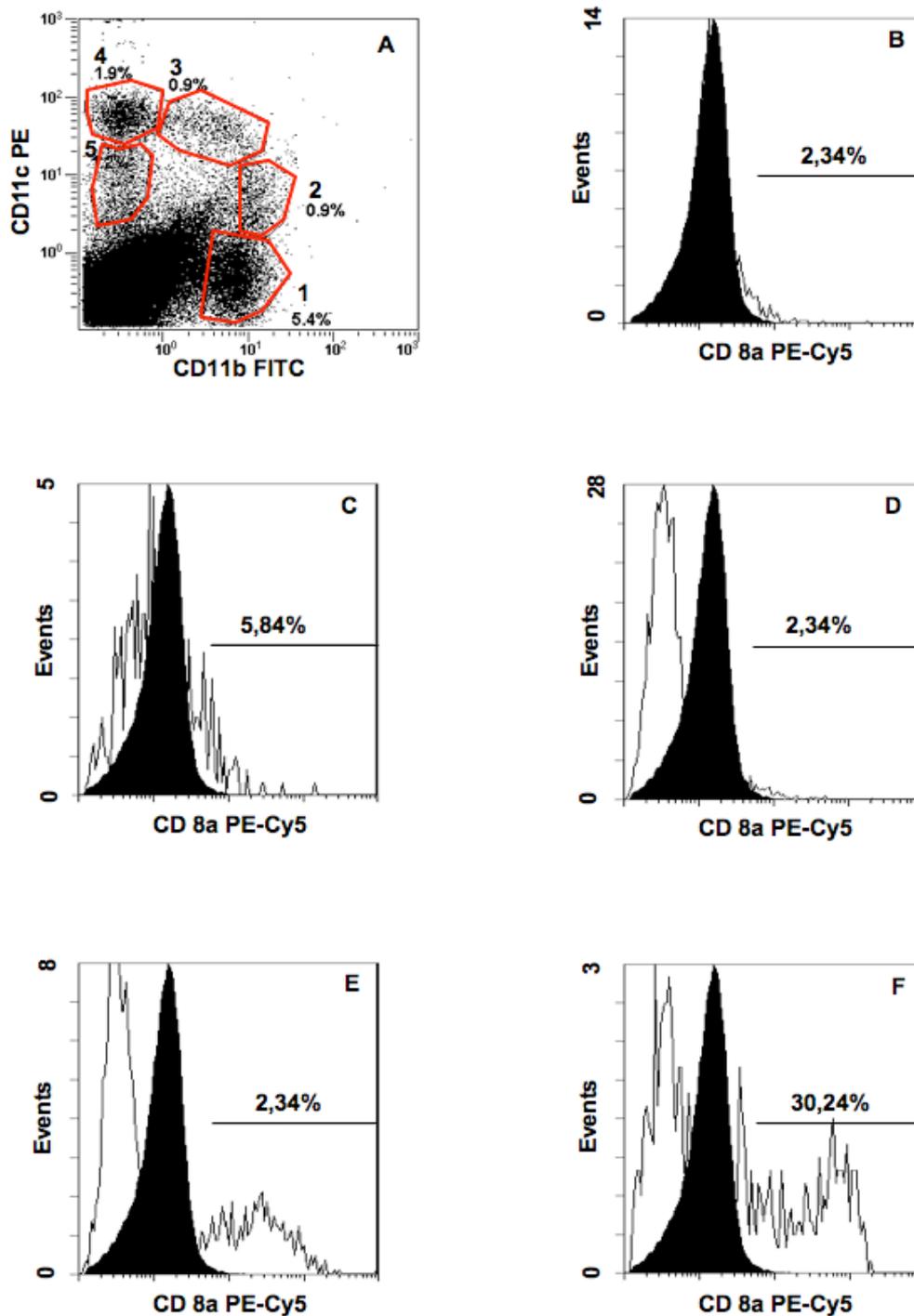


Abb. 7: Durchflußzytometrische Analyse mononukleärer Zellen der Milz auf ihr Expressionsmuster von CD8a

Splenozyten, durch Dichtezentrifugation aufgereinigt werden durchflußzytometrisch analysiert. Im Vorwärts-Seitwärts-Scatter werden mononukleäre Zellen *gated*. A: *Dotplot* CD11b FITC und CD11c PE. B-F zeigen die Expressionsstärke (weiß) samt Isotypkontrolle (schwarz) für CD8a der *Gates* 1-5 (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

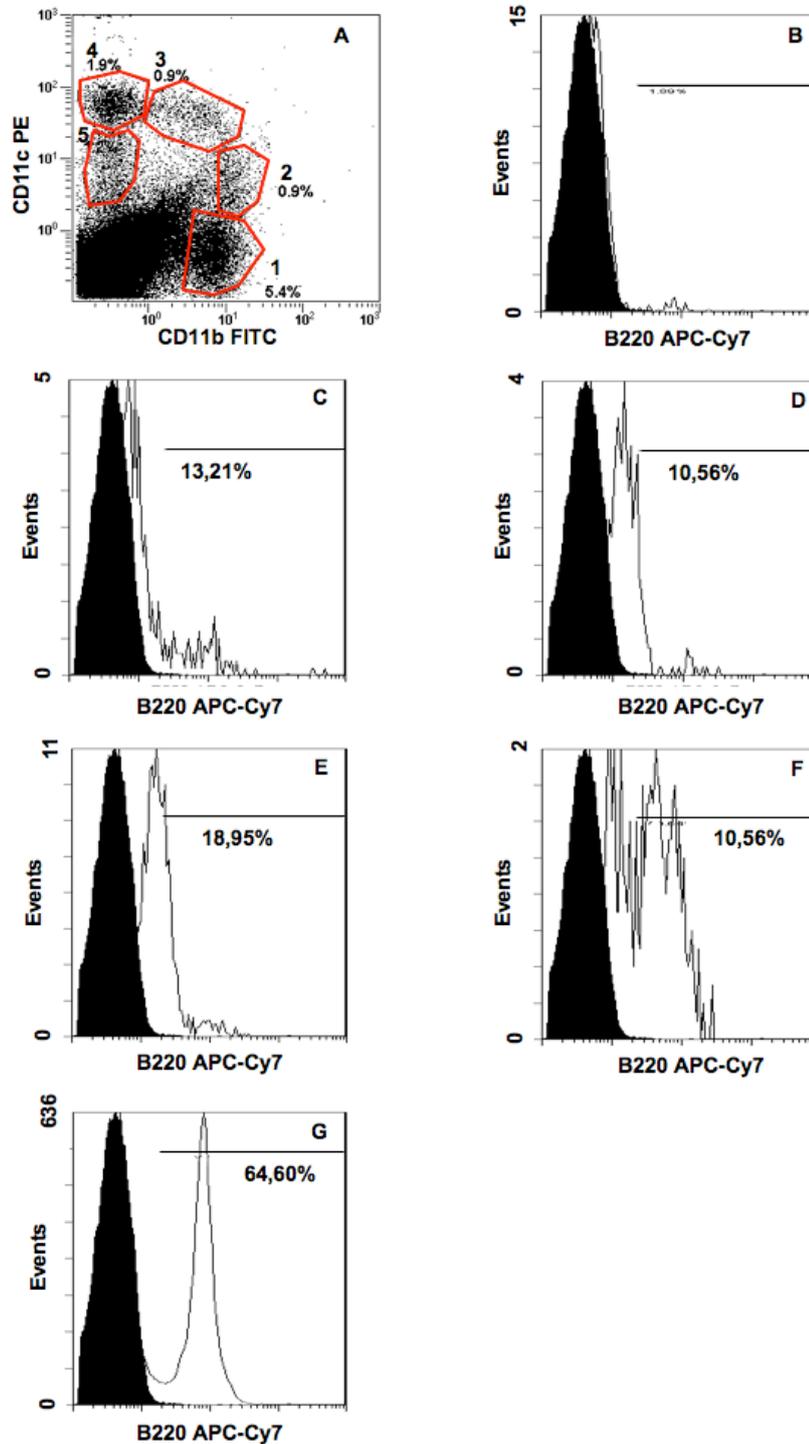


Abb. 8: Durchflußzytometrische Analyse mononukleärer Zellen der Milz auf ihr Expressionsmuster von B220.

Splenozyten, durch Dichtezentrifugation aufgereinigt werden durchflußzytometrisch analysiert. Im Vorwärts-Seitwärts-Scatter werden mononukleäre Zellen *gated*. A: *Dotplot* CD11b FITC und CD11c PE. B-F zeigen die Expressionsstärke (weiß) samt Isotypkontrolle (schwarz) für B220 der *Gates* 1-5. G: B220 Expression aller

mononukleären Zellen zur Verdeutlichung der klaren positiv-negativ-Abgrenzung (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

5.1.3 Myeloide dendritische Zellen produzieren Interferon alpha nach Stimulation mit IgM anti dsDNA

Die Aufreinigung mittels anti CD11b Microbeads zeigte die spontane IFN- α Produktion in C4 def. Mäusen innerhalb der CD11b positiven Population [14]. Vor diesem Hintergrund war es das weitere Ziel, herauszufinden, welche der CD11b positiven Populationen das IFN- α produzierte.

Zunächst wurde versucht, das entstehende IFN- α auf proteinärer Ebene intrazellulär nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurden Milzzellen mittels Dichtezentrifugation isoliert (s. Material und Methoden 4.6.3.3). Es war das Ziel, mit Antikörpern gegen die Oberflächen-Marker CD11b und CD11c, sowie einem Antikörper gegen intrazellulär gelegenes IFN- α anzufärben. Um dem Antikörper Zugang zu dem intrazellulären IFN- α zu gewähren, musste die Membran der Zellen mit Saponin perforiert werden. Da hierdurch die Integrität der Zellen zerstört würde, muss zuvor eine Fixierung mit Paraformaldehyd vorgenommen werden. Paraformaldehyd jedoch zerstört die Epitope für die MoABs gegen CD11b und CD11c, sodass vorher mit den MoABs gefärbt werden musste.

Leider war es trotz ausgiebiger Bemühungen und Modifikationen des Versuchsaufbaus nicht möglich, auf diese Weise intrazelluläres IFN- α nachzuweisen.

Es wurde deshalb auf die Methode der Taqman RT-PCR zurückgegriffen, die schon das spontan produzierte IFN- α in C4 def. Mäusen nachgewiesen hatte.

Wie aus der oben stehenden Abbildung zu sehen existieren verschiedene Populationen, die positiv für den Marker CD11b sind und sich in ihrem Expressionsgrad an CD11c unterscheiden. Da die magnetischen Microbeads gegen CD11b an möglichst jede Zelle binden, die CD11b trägt, und diese in der Separationssäule zurückhalten, ist diese Methode nicht geeignet, die einzelnen Subpopulationen CD11b positiver Zellen aufzutrennen.

Ideal für dieses Problem ist die Methode der fluoreszenz-markierten Zell-Sortierung. Diese Methode erlaubt auf der Grundlage eines *FACS* Dotblots eine Sortierung der Zellen verschiedener Gates in verschiedene Reagenzgefäße.

Dieser Versuch wurde im Forschungszentrum Borstel im Labor für Immunzellanalytik durchgeführt:

Nach Markierung mit MoABs gegen CD11b (FITC) und CD11c (PE) fand die Sortierung der Zellen in die beiden CD11b positiven Hauptpopulationen (CD11b+++ / CD11c-; CD11b++ / CD11c++) statt.

Aus den auf diese Weise gewonnen Zellpopulationen, die eine Reinheit von bis zu 90 % aufwiesen, wurde die RNA isoliert und in der beschriebenen Taqman RT PCR auf ihren IFN- α mRNA Anteil untersucht.

Es zeigte sich, dass die Population 3 (CD11b++ CD11c++) signifikant mehr IFN- α mRNA produziert als die Population 1 (CD11b+++ CD11c-) ($p < 0,05$). Die exprimierten Mengen an IFN- α -mRNA der einzelnen Populationen sind in **Tabelle 5** aufgeführt.

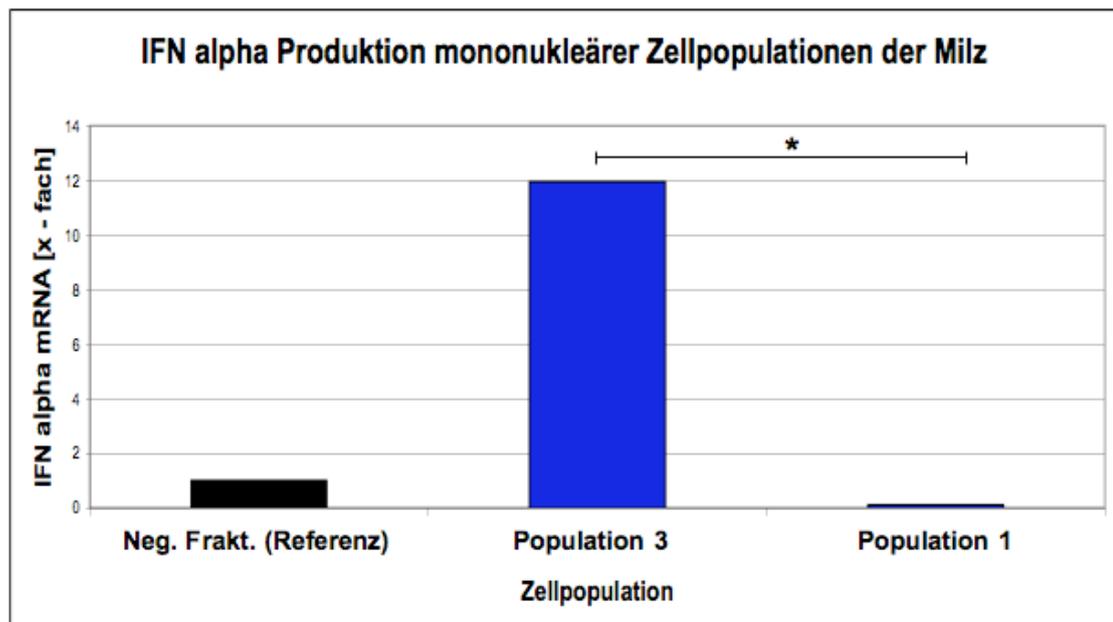


Abb. 9: Vergleich der IFN- α Produktion innerhalb verschiedener Populationen von Splenozyten.

Taqman RT-PCR für IFN- α mRNA sechs Stunden nach Stimulation mit 20 μ g IgM anti dsDNA i.v. Die CD11b++, CD11c+++ Zellen (Population 3) produzieren signifikant mehr IFN- α , als die CD11b+++ , CD11c- Zellen (Population 1) ($p < 0,05$; N = vier Pools aus je fünf Mäusen): Hauptquelle der IFN- α -mRNA sind die CD11b++ CD11c+++ Zellen. Der Negativ Fraktion (schwarz) wurde als Referenz der Wert 1 zugewiesen. Die anderen Werte beziehen sich x-fach auf diesen Wert (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Tabelle 5: IFN- α -mRNA Expression der unterschiedlichen Zellpopulationen

IFN- α -mRNA Produktion in mononukleären Zellpopulationen der murinen Milz. Die Expression der Negativ-Fraktion wird als Referenzwert verwendet und erhält den Wert 1. Die weiteren Werte beziehen sich x-fach auf diesen Wert (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Population	Referenz: Neg. Frkt.	Population 3: CD11b++; CD11c +++	Population 1: CD11b+++; CD11c -
IFN-α m-RNA [Kopien x-fach zur Referenz]	1	11,9381	0,1138

Da in der Literatur vor allem die pPDCs als die hauptsächlichen IFN- α Produzenten angesehen werden sollte ausgeschlossen werden, dass sich in dem Anteil an Verunreinigung (ca. 10 %) der CD11b ++ CD11c +++ Population pPDCs befanden. Wiederum wurden C4 def. Mäuse mit IgM anti dsDNA stimuliert und nach sechs Stunden getötet. Die mononukleären Zellen der Milz wurden durch Dichtezentrifugation aufgereinigt. Die aufgereinigten Zellen wurden mit Beads konjugierten MoABs gegen B220 inkubiert und somit in eine B220 positive und eine B220 negative Fraktion gespalten. Aus diesen beiden Fraktionen wurde die RNA isoliert und der Anteil an IFN- α mRNA mit Hilfe der Taqman RT PCR bestimmt. Es zeigte sich, dass die B220 negative Fraktion mehr IFN- α mRNA produziert, als die B220 positive Fraktion ($p < 0.005$).

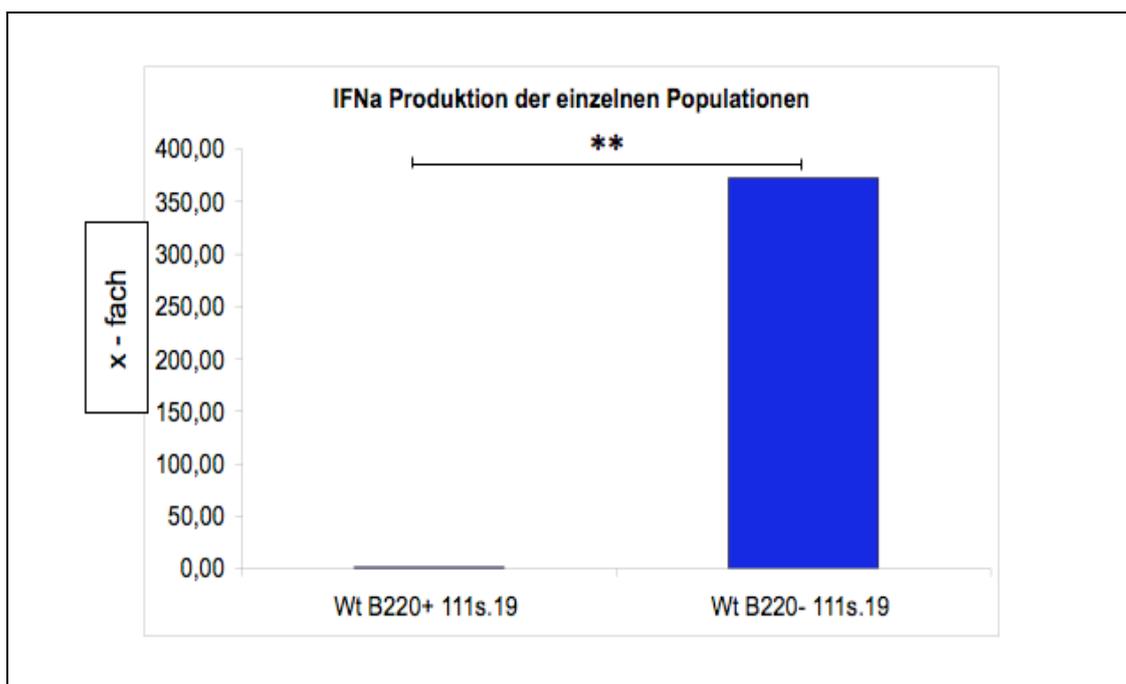


Abb. 10: Ausschluss von Verunreinigungen durch pPDCs innerhalb der sortierten Zellpopulationen:

MACS-Bead-Sorting der Splenozyten von C4 def. Mäusen mit anti B220 Microbeads. Taqman RT-PCR für IFN- α mRNA, sechs Stunden nach Stimulation mit IgM-anti-dsDNA (Klon 111s19). Die B220 negativen Zellen produzieren mehr IFN- α -mRNA als die B220 positiven ($p < 0,005$; $N > 8$).

Wt B220+/- 111s19: Wildtypmaus, B220 positive/negative Zellen, Behandlung mit IgM-anti-dsDNA (Klon111s19).

Tabelle 6: IFN- α -mRNA-Expression B220 positiver und negativer Splenozyten

Aufreinigung von B220-positiven und B220-negativen Splenozyten von C4 def. Mäusen nach Behandlung mit 20 μ g IgM anti-dsDNA (Klon 111s19). B220 positiven Zellen wird als Referenz der Wert 1 zugewiesen (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Population	B220 positiv (Referenz)	B220 negativ
IFN- α -mRNA [Kopien x-fach zur Referenz]	1	370,35

5.2 Veränderungen des zellulären Mikromilieus der murinen Milz durch Deposition von IgM anti dsDNA und Produktion von Interferon alpha

Es war von Interesse, die lokalen Auswirkungen von IFN- α auf das Mikromilieu der Milz zu untersuchen, um Erkenntnisse über den Aktivierungsweg autoimmuner B-Lymphozyten zu gewinnen.

5.2.1 Deposition von IgM anti Doppelstrang-DNA-Immunkomplexen verändert die Zusammensetzung der mononukleären Zellen der Milz

Es sollte untersucht werden, ob IgM anti dsDNA Anlagerung, und daraufhin erhöhte IFN- α Spiegel einen Einfluss auf die mononukleären Zellen der Mausmilz haben.

Verglichen wurden die Populationsgrößen von unbehandelten C4 def. Mäusen, die natürlicherweise erhöhte IFN- α mRNA Spiegel haben, wt Mäusen, die mit 20 μ g IgM anti dsDNA i.v. behandelt waren (sechs Stunden nach Injektion) und unbehandelten wt Mäusen.

Die Zellen wurden wieder mit anti-CD11b FITC und anti-CD11c PE angefärbt, die Größe dieser Populationen wurde im Durchflußzytometer ermittelt.

Es zeigte sich, dass es einen signifikanten Zuwachs in der Größe der CD11b hochpositiven, CD11c negativen Population gab, wenn wt Mäuse mit IgM anti dsDNA behandelt wurden ($p < 0,05$). C4 def. Mäusen weisen ebenfalls vermehrte Zellpopulationen verglichen mit wt Mäusen auf ($p < 0,005$).

In den anderen Zellpopulationen gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten wt Mäusen und den verschiedenen mit IFN- α stimulierten Modellen.

Tabelle 7 zeigt die Populationsgrößen mononukleärer Zellpopulationen [%] der gesamten mononukleären Zellen.

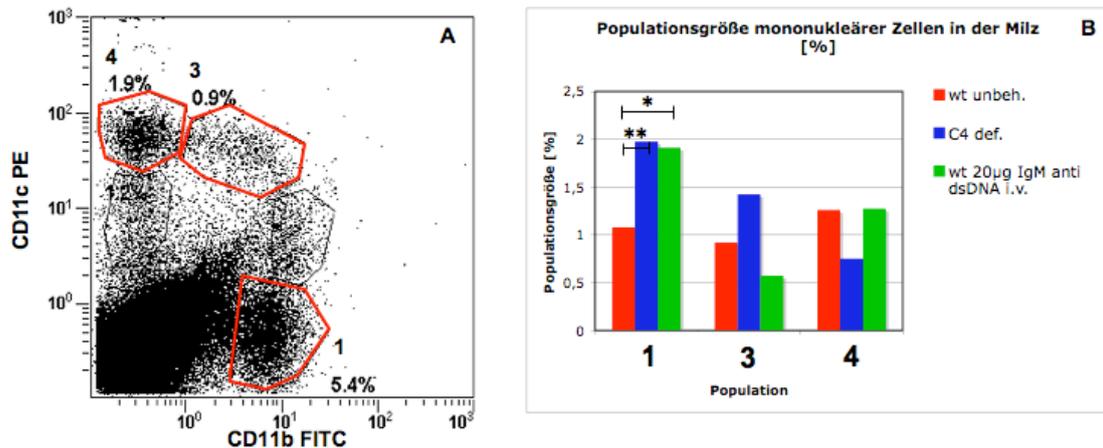


Abb. 11: Vergleich der Größe verschiedener Populationen mononukleärer Zellen in der Milz. Splenozyten von wt, C4 def. und mit 20 µg IgM anti dsDNA i.v. behandelten Mäusen. A: Durchflußzytometrische Analyse von durch Dichtezentrifugation aufgereinigten Zellen. Färbung mit anti CD11b FITC und anti CD11c PE. B: C4 def. und mit IgM anti dsDNA behandelte Mäuse zeigen signifikante Vergrößerung der CD11b⁺⁺⁺, CD11c⁻ Population (Population 1) verglichen mit unbehandelten wt Mäusen $p < 0,05$ (IgM), $p < 0,005$ (C4 def.), $N \geq 8$). Populationen 3 und 4 zeigen keinen signifikanten Unterschied (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Tabelle 7: Populationsgröße unterschiedlicher Mausstämme

Populationsgröße [%] der Mononukleären Zellen der murinen Milz von unbehandelten wt-Mäusen, C4 def. Mäusen und wt + 20µg IgM anti-dsDNA (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

	wt unbehandelt	C4 def.	wt + 20µg IgM anti dsDNA i.v.
1: 11b⁺⁺⁺, 11c⁻	1,08	1,975	1,9125
3: 11b⁺, 11c⁺⁺⁺	0,92	1,425	0,575
4: 11b⁻, 11c⁺⁺⁺	1,26	0,75	1,275

5.2.2 Verringerte Zahlen von Marginalzonen-B-Zellen durch Immunkomplex-induziertes Interferon alpha

Um die Frage zu beantworten, welche Auswirkungen das lokal produzierte IFN- α auf die B-Lymphozyten der Milz hat, wurde die Populationsgröße der MZB Zellen von wt Mäusen, C4 def. Mäusen und mit 20 μ g IgM anti dsDNA behandelten wt Mäusen miteinander verglichen.

Zu diesem Vergleich der Populationsgröße wurde wieder die Methode der durchflußzytometrischen Analyse gewählt:

Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen CD21/35 (FITC), CD1d (PE) und CD23 (PE-Cy5) markiert. Die so präparierten Zellen wurden im *FACS* untersucht.

Es zeigte sich, dass die MZB-Zellpopulation in wt Mäusen signifikant größer ist, als in C4 def. Mäusen ($p < 0,005$). Aus diesem Experiment ging jedoch noch nicht hervor, ob dieser Effekt als Folge auf das in C4 def. Mäusen erhöhte IFN- α oder auf den Mangel an Komplement C4 auftritt. Deshalb wurden in einem nächsten Schritt die MZB Zellen von Interferonrezeptor (IFN-R) / Komplement-C4-doppelknockout Mäusen untersucht. Es zeigte sich, dass diese IFN-R/C4 def. Mäuse signifikant mehr MZB Zellen besitzen, als C4 def. Mäuse (0,05), und dass kein Unterschied besteht zwischen der MZB Zell Anzahl von IFN-R/C4 def. und wt Mäusen ($p = 0,73$). Darüber hinaus zeigte sich auch in mit 20 μ g IgM anti dsDNA i.v. behandelten wt Mäusen nach sechsständiger Inkubation eine signifikante Verminderung der MZB Zellen verglichen mit unbehandelten wt Mäusen ($p < 0,05$). **Tabelle 8** zeigt die Populationsgrößen der MZB-Zellen [%] der Gesamt-Lymphozyten.

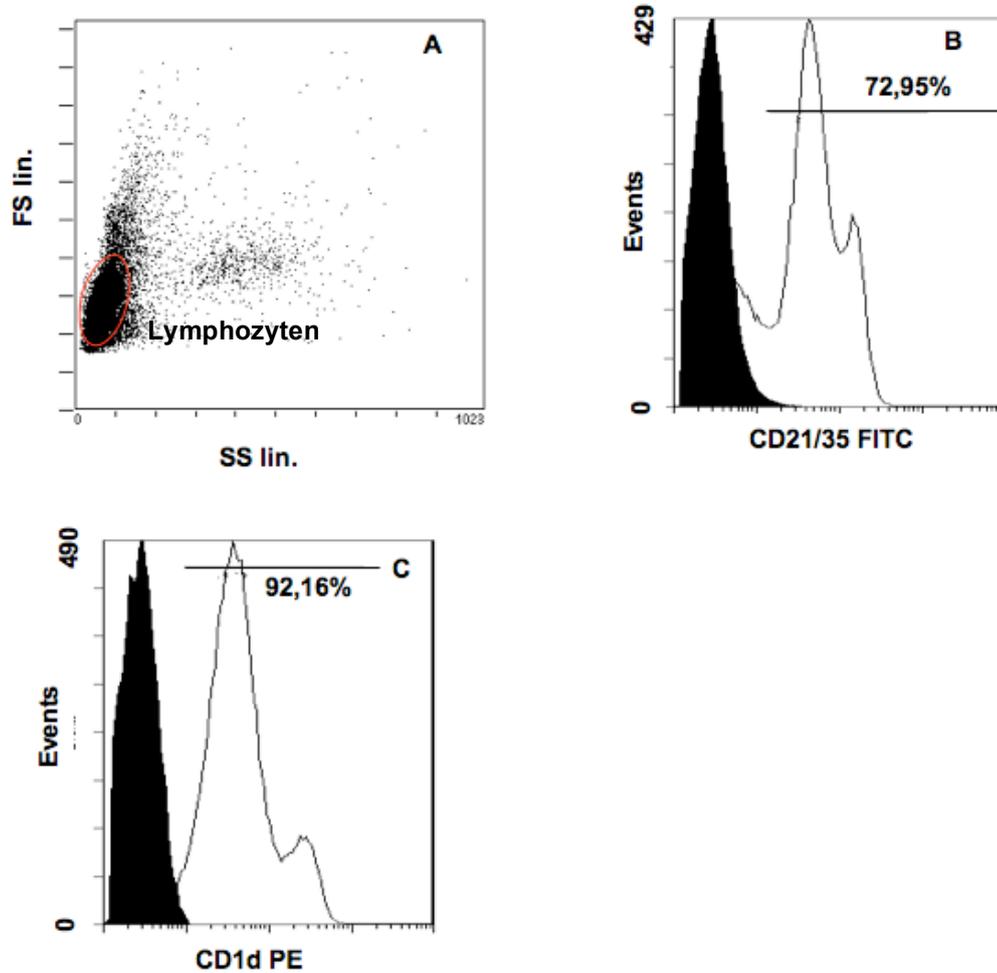


Abb. 12: B-Zellcharakterisierung in Splenozyten

A: Murine Splenozyten im Vorwärts-Seitwärts-Scatter, Lymphozyten (rotes Gate) sind gegatet. B und C: Histogramm-Plot der verwendeten Oberflächenmarker CD21/35 FITC und CD1d PE (weiß) mit Isotypkontrolle (schwarz) Marginalzonen-B-Zellen sind hoch-positiv für CD 21/35, sowie für CD1d. (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

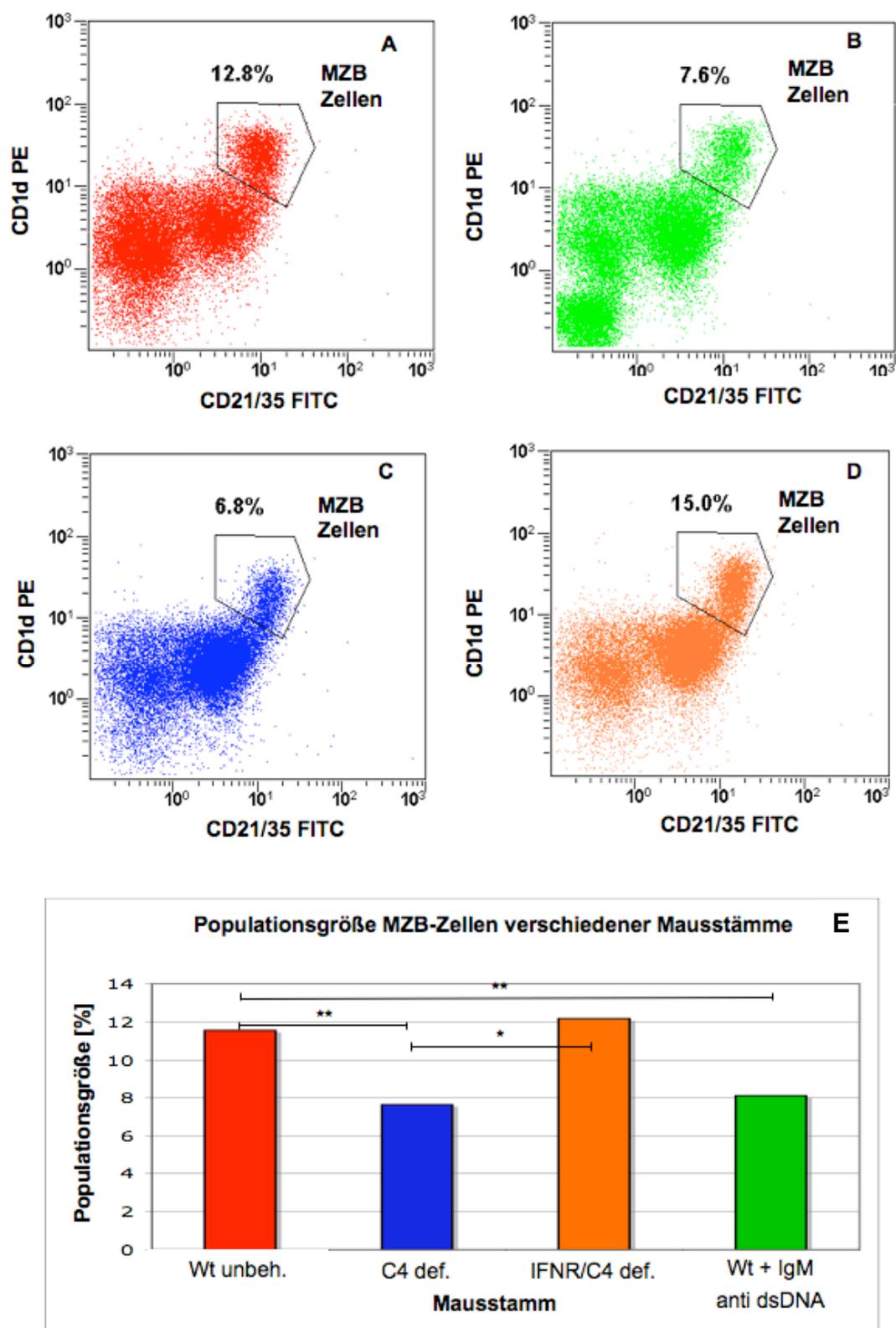


Abb. 13: Vergleich der Populationsgröße von Marginalzonen-B-Zellen in verschiedenen Mausstämmen

Durchflußzytometrische Analyse von Splenozyten. Anfärbung der B-Zellen mit CD21/35 FITC, CD1d PE.

Populationsgröße der Marginalzonen-B-Zellen von wt-Mäusen (A), C4 def. Mäusen(B), IFN-R/C4 def. Mäusen (C) und wt Mäusen + 20µg IgM anti dsDNA (D). E: Diagramm: C4 def. Mäuse haben signifikant weniger MZB Zellen, als wt Mäuse ($N \geq 8$, $p < 0,005$). IFN-R/C4 def. Mäuse haben signifikant mehr MZB Zellen, als C4 def. Mäuse ($N \geq 8$, $p < 0,05$). Mit IgM anti dsDNA behandelte Mäuse haben signifikant weniger MZB Zellen, als wt Mäuse ($N \geq 8$, $p < 0,05$) (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Tabelle 8: Populationsgröße von MZB-Zellen unterschiedlicher Mausstämme

MZB-Zellen von unbehandelten wt-, C4-def. und IFN-R/C4 def.-Mäusen, sowie wt Mäusen, behandelt mit 20µg IgM-anti-dsDNA (Klon111s19). Vergleich der Populationsgröße [%] der Gesamtlymphozyten (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

Mausstamm	wt unbeh.	C4 def.	IFN-R/C4 def.	wt + IgM anti dsDNA
Populationsgröße [%]	11,55	7,63	12,18	8,10

6 Diskussion

Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE) ist eine autoimmune Systemerkrankung, deren Entstehung einerseits mit der Defizienz früher Komplementkomponenten (C1, C4, C2) des klassischen Aktivierungsweges der Komplementkaskade vergesellschaftet ist. Andererseits besteht eine Assoziation des SLE zu einem aktivierten Interferon alpha System. Bislang existieren keine Hypothesen, die diese Phänomene vereinigend erklären.

Beobachtungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass in Komplement C4 defizienten (C4 def.) Mäusen das IFN- α System aktiviert ist. Außerdem zeigt, sich, dass in C4 def. Mäusen die Abräumung apoptotischen Materials gestört ist. Der Grund hierfür ist wahrscheinlich die mangelnde Opsonisierung durch Komplementfaktoren.

Laut unserer Hypothese lagert sich apoptotische DNA, vermittelt durch natürlich vorkommende Antikörper vom Typ IgM, an der marginalen Zone der Milz ab. Auf Grund der dortigen Zellarchitektur, dem gleichzeitigen Vorkommen von potentiell antigen präspezifizierten Marginalzonen-B-Zellen und IFN- α -produzierenden-Phagozyten der myeloiden Zellreihe, kann es zu einer Antikörperproduktion durch gegen DNA präspezifizierte MZB-Zellen kommen. Endogene DNA kann hierbei als erstes, IFN- α als zweites notwendiges Signal für die Aktivierung der MZB-Zellen fungieren. In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass myeloide dendritische Zellen in C4 def. Mäusen IFN- α produzieren, und dass dies zu verschiedenen, inflammatorischen Veränderungen im Mikromilieu der MZ führt. Im Folgenden sollen diese Ergebnisse diskutiert werden.

6.1 Charakterisierung der Interferon alpha produzierenden Zellen in der murinen Milz

Vor dem Hintergrund der Erkenntnis, dass dem Zytokin IFN- α in der Pathogenese von SLE eine Schlüsselrolle zukommt [64, 134-136] ist es von entscheidender Bedeutung, auf welche Weise und durch welchen Stimulus das Typ I IFN System aktiviert wird, und welches die Interferon-produzierenden Zellen sind.

Der Ursprung dieses Zytokins wird in der Literatur kontrovers diskutiert:

Es ist seit längerem bekannt, dass vor allem unter den PBMCs die PDCs in der Lage sind, große Mengen Typ-I-IFN zu produzieren. Dies geschieht, wie in der Einleitung

beschrieben bei Stimulation durch Viren, verschiedener Bakterien und durch Chromatin enthaltende Immunkomplexe [27-29, 35, 36, 64, 68, 136]. Letztere sind im Rahmen der Pathogenese von SLE von großem Interesse.

Neuere Erkenntnisse zeigen, dass außer den PDCs auch MDCs nach Stimulation mit Herpes-Simplex-Virus IFN- α produzieren. Dabei wurde beobachtet, dass die PDCs gemessen an der Zytokin-Menge pro Zelle die größten Mengen IFN- α produzieren, wegen des größeren Anteils an MDCs im Gewebe, diese aber hauptsächlich für die gemessene IFN- α -Menge verantwortlich sind [67, 68].

Zur Klärung der Frage, welche Zellen im vorliegenden Mausmodell von SLE die hauptsächlichsten IFN- α -Produzenten sind, mussten zunächst die in der murinen Milz vorhandenen mononukleären Zellpopulationen identifiziert werden.

6.1.1 Subklassifizierung der Populationen mononukleärer Zellen in der murinen Milz

In der durchflußzytometrischen Analyse der mononukleären Zellen der murinen Milz konnten an Hand ihrer Expressionsstärke von CD11b und CD11c sechs unterschiedliche Populationen differenziert werden. **Tabelle 9** (entspricht Tabelle 4) zeigt Subpopulationen mononukleärer Zellen in der Mausmilz

Tabelle 9: Populationen mononukleärer Zellen in der Mausmilz

Zusammenfassung der Oberflächenmarker der einzelnen Subpopulationen mononukleärer Zellen. Expressionsstärken der Marker: +++ hochgradig positiv; ++ mittelgradig positiv; + gering positiv; - negativ (Abkürzungen siehe Abkürzungsverzeichnis S. 7).

	1: Inflam- torische Monozyten	2: residente Gewebs- monozyten	3: Myeloide dendritische Zellen	4: Plasmazytoide dendritische Zellen	5: Plasmazytoide Vorläufer- zellen
CD11b	+++	+++	++	-	-
CD11c	-	++	+++	+++	++
MHC II	-	++	+++	+++	+
CD8a	-	-	-	+++	++
B220	-	-	+	+	+++

An Hand der für mononukleäre Zellen charakteristischen Oberflächenmarkern konnten diese Populationen identifiziert werden.

Population 1.)

Inflammatorischen Monozyten: Sie sind positiv für CD11b, negativ für CD11c. Da es sich um unreife Zellen handelt, ist MHC II, welches vor allem auf reifen Zellen zu finden ist, überwiegend negativ [55, 56, 137].

Population 2.)

Residente Gewebsmonozyten: Die Zellen sind mäßig positiv für CD11c und positiv für CD11b sind. Auch sie tragen, da unreif, kein MHC II auf ihrer Oberfläche [55, 56, 137].

Population 3.)

Myeloide dendritische Zellen (MDCs) – Diese Zellen sind hochpositiv für CD11c und mittelgradig positiv für CD11b. Sie teilen sich in eine CD4 positive und eine CD4 negative Population auf. Es handelt sich um reife antigenpräsentierende Zellen, die große Mengen MHC II tragen [61].

Population 4.)

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs): Diese Zellen sind hochpositiv für CD11c, negativ für den für Zellen der myeloiden Reihe charakteristischen Marker CD11b, hochpositiv für CD8a und schwach positiv für B220. Auch diese sind reife Zellen und tragen große Mengen MHC II [25, 27-29, 62].

Population 5.)

Plasmazytoide Vorläufer-Zellen (prä-PDCs): Diese Population ist mittelgradig positiv für den Dendritenmarker CD11c, negativ für CD11b, hoch positiv für B220. Der Reifemarker MHC II ist nur schwach positiv. Auch CD8a, welches erst im Zuge der Reifung von PDCs exprimiert wird, ist weniger positiv als auf reifen PDCs. Es handelt sich bei dieser Population um Vorläufer von PDCs, so genannte prä-PDCs. Dieses ist die Population, die im peripheren Blut die Hauptmenge IFN- α produziert [25, 27-29, 62].

6.1.2 Myeloide dendritische Zellen produzieren IFN- α nach Stimulation mit IgM anti dsDNA

In den Vorergebnissen der Arbeitsgruppe zeigte sich, dass die Zellen, die in unbehandelten C4 def. Mäusen die größte Menge an IFN- α -mRNA produzierten, positiv waren für den Oberflächenmarker CD11b. Ebenso waren in mit IgM-anti-dsDNA behandelten Mäusen die Haupt-IFN- α Produzenten positiv für CD11b.

Innerhalb der CD11b positiven Population konnte mittels durchflußzytometrisch-unterstütztem Zellsorting gezeigt werden, dass in mit IgM-anti-dsDNA behandelten C4 def. Mäusen die IFN- α -produzierenden Zellen positiv waren für CD11b und hochpositiv für CD11c. Dieser Phänotyp entspricht dem von MDCs [61].

Wie in der Einleitung erwähnt sind PDCs, jedoch weniger MDCs bekannt für ihre Fähigkeit, durch virale Stimulation, aber auch durch Stimulation mit CpG-DNA und Chromatin-enthaltenden Immunkomplexen große Mengen IFN- α zu produzieren [25, 63, 64]. In unserem Modell musste deshalb eine IFN- α -Produktion durch PDC-Verunreinigungen ausgeschlossen werden: PDCs exprimieren in großer Menge den Oberflächenmarker B220 [27-29]. Wir konnten zeigen, dass die IFN- α -produzierenden Zellen diesen Marker nicht exprimieren, und somit keine PDCs sein konnten.

Bislang konnte eine IFN- α -Produktion durch nicht-PDCs lediglich bei viraler Stimulation der Zellen nachgewiesen werden. Nach Stimulation mit Herpes simplex Virus (HSV) produzierten Marginalzonenmakrophagen und metallophilen Makrophagen der murinen Milz große Mengen IFN- α [52]. Dies konnten wir in immunhistochemischen Färbungen von Milz-Schnitten durch mit Newcastle-disease Virus stimulierten Mäusen bestätigen. Mehrfach konnte durch andere Arbeitsgruppen IFN- α -Produktion nach viraler Stimulation in MDCs nachgewiesen werden [67, 138, 139]. CpG-DNA und Chromatin-enthaltende Immunkomplexe zeigten bislang jedoch ihre interferogene Wirkung vermehrt auf PDCs.

Eine Erklärung für unsere Ergebnisse bietet die Tatsache, dass sich IgM-enthaltende Immunkomplexe an der Marginalen Zone der Milz ablagern, wo sie über den Komplementrezeptor 2 (CD21/CR2) an Marginalzonen-B-Zellen gebunden werden [14, 140, 141]. Für diese Bindung ist ein intaktes Komplementsystem essentiell. Bei Defizienz von CD21/CR2, oder der Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges (beschrieben für C1q und für C4) können die IC nicht an die MZB Zellen binden. Sie werden in diesem Fall von Zellen der myeloiden Reihe phagozytiert. CR2/CD21 def. wirkt sich hierbei stärker aus, als C1q def. [140, 141]. Auf diese Weise

können Chromatin-haltige IC in C4-Mäusen in Zellen der myeloiden Reihe internalisiert werden.

Es zeigt sich, dass eine solche Internalisierung für die Aktivierung des IFN- α Systems unerlässlich ist:

Auf PDCs scheint hierfür der Fc-Rezeptor II (CD32/Fc γ RII) verantwortlich zu sein. Dieser kommt jedoch auf MDCs nicht vor [138, 139, 142, 143]. Er ist für die Erkennung der Fc-Fragmente von IgG Immunkomplexen zuständig. In Blockierungsversuchen des Fc γ RII zeigt sich eine deutlich verminderte Sezernierung von IFN- α [138, 139, 142]. Ein Erklärungsversuch für dieses Phänomen beinhaltet die Involvierung des *pattern recognition receptors* Toll-like-Rezeptor 9 (TLR 9). Dieser liegt intrazellulär unter anderem in den Endosomen vor, in die internalisierte IC gelangen [33, 143-146]. Er hat sich als notwendig für die In-vitro-Aktivierung des IFN- α -Systems in PDCs durch Chromatin-haltige IC herausgestellt [35, 36, 143]. Einen weiteren Hinweis auf die Involvierung des TLR 9 in die Aktivierung des IFN- α Systems in unserem Modell liefern bisher unveröffentlichte Ergebnisse, nach denen es nach Stimulation mit IgM anti dsDNA zu einer Vermehrung der TLR 9 mRNA innerhalb der IFN- α produzierenden Zellpopulation kommt.

Interessanterweise scheint die IFN- α -Produktion der MDCs im Gegensatz zu den PDCs unabhängig vom TLR 9 zu sein:

MDCs aus Milz und Knochenmark produzieren IFN- α auf Stimulation mit Herpes-simplex Virus in-vitro unabhängig vom TLR9, [68]. Mit Säugetier-DNA transfizierte DCs aus dem Knochenmark produzieren ebenfalls unabhängig vom TLR 9 IFN- α [147, 148]. Es wird eine Aktivierung über so genannte *Interferon-responsive-Factors* angenommen, die ebenfalls intrazellulär vorliegen [147, 148]. Diese stellen eine Promotor-Region auf dem Genlocus von Typ-I-IFN dar [149]. Der gleiche Aktivierungsweg wird auch für die TLR unabhängige, massive Aktivierung des Typ-I-IFN Systems in DNase-II defizienten Mäusen angenommen, bei denen es zu einer Einlagerung apoptotischer DNA in den Endosomen der Lebermakrophagen kommt [150].

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in unserem SLE-Modell die MDCs für die IFN- α -Produktion durch Stimulation mit Chromatin-haltigen IC verantwortlich waren, obwohl bislang vermehrt PDCs hierfür verantwortlich gemacht wurden. Es konnte noch nicht endgültig geklärt werden, ob diese IFN- α -Produktion in unserem Modell vom TLR9 abhängig ist, oder nicht. Bisher unveröffentlichte Daten weisen jedoch auf eine

TLR9-Abhängigkeit hin. In jedem Fall erscheint eine Internalisierung der IC notwendig zu sein, da sowohl der TLR9, als auch die *Interferon-Response-Factors* ausschließlich intrazellulär vorliegen. Diese Internalisierung kann durch die in Komplement-defizienten Individuen vermehrt auftretende Phagozytose von an der MZ abgelagerten IgM-enthaltenden IC durch Phagozyten der myeloiden Reihe erfolgen [140, 141].

6.2 Veränderungen des zellulären Mikromilieus der murinen Milz durch Deposition von IgM-anti-dsDNA und Produktion von Interferon alpha

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, spielt das proinflammatorische Zytokin Interferon alpha eine entscheidende Rolle in der Pathogenese von Systemischem Lupus Erythematodes. Um diese Rolle genauer zu verstehen sollte im Rahmen dieser Dissertation die Auswirkung des IFN- α auf das zelluläre Mikromilieu der Milz untersucht werden.

Vorergebnisse der Arbeitsgruppe zeigen, dass es durch die Injektion von Antikörpern vom Typ IgM-anti-dsDNA einerseits zu einer Ablagerung von endogener-DNA-enthaltenden IC an der marginalen Zone und andererseits zu einer signifikanten Erhöhung der IFN α - mRNA-Spiegel in CD11b pos. Zellen der murinen Milz kommt. Auf diese Weise sollte ein frühes Stadium von SLE simuliert werden [14].

6.2.1 Veränderungen der mononukleären Zellen der Marginalen Zone der murinen Milz durch IgM-anti-dsDNA Deposition und Produktion von Interferon alpha

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass ein aktiviertes IFN- α System zu einer Invasion einer bestimmten Population mononukleärer Zellen führt. Diese ist an Hand ihres Phänotyps als inflammatorische Monozyten zu bezeichnen: Sie sind hochpositiv für CD11b, negativ für CD11c und negativ für MHC [55, 56, 58, 137]. Bei wt-Mäusen, die mit IgM anti dsDNA immunisiert wurden zeigten sich nach sechsständiger Inkubation signifikant erhöhte Zellzahlen innerhalb dieser Population verglichen mit unbehandelten wt-Mäusen. Auch bei C4 def. Mäusen, die ein spontan aktiviertes IFN- α -System besitzen, war verglichen mit unbehandelten wt-Mäusen die Population der inflammatorischen Monozyten signifikant vergrößert.

Inflammatorische Monozyten migrieren aus der Blutbahn an den Ort einer Inflammation, wo sie Phagozytose betreiben und daraufhin rasch beginnen, CD11c und MHC II Moleküle zu exprimieren [56]. Danach kommt es bei einem Teil dieser eingewanderten Monozyten zu einer weiteren Ausreifung zu MDCs, sodass sie im abführenden Lymphknoten wieder gefunden werden [56], wo sie T-Zell-abhängige Immunität initiieren können. Ein anderer Teil der Zellen verbleibt im Gewebe als Makrophagen [58]. Durch die Injektion von IgM anti dsDNA kommt es zu einer teilweise signifikanten Erhöhung von proinflammatorischen Zytokinen, wie IFN γ und IFN- α [14]. Dies ist eine mögliche Begründung für die Invasion der inflammatorischen Monozyten. Weiterhin ist es ein Hinweis auf ein spontan bestehendes entzündliches Geschehen an der MZ der Milz C4 defizienter Mäuse. Neuere Ergebnisse zeigen ein Korrelat hierzu im humanen System: MDCs von Patienten mit SLE weisen einen abnormen Phänotyp auf, der charakterisiert ist durch raschere Ausreifung und Differenzierung von Monozyten zu MDCs mit konsekutiv vermehrter Aktivierung von allogeenen T-Zellen [151].

Chromatin-enthaltende Immunkomplexe stimulieren somit die Sekretion von Typ I IFN, welches wiederum zu einer vermehrten Invasion und Ausreifung von T-Zell-stimulierenden MDCs, sowohl im Mausmodell, als auch im humanen SLE zu führen scheint [56, 58].

6.2.2 Veränderungen der Marginalzonen B-Zell-Population der murinen Milz durch IgM-anti-dsDNA Deposition und Produktion von Interferon alpha

Die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, dass unbehandelte C4 defiziente Mäuse, verglichen mit unbehandelten wt Mäusen signifikant weniger Marginalzonen B-Zellen (MZB-Zellen) besitzen. In C4 def. Mäusen jedoch, die zusätzlich auch für den Interferon Rezeptor (IFN-R) defizient waren, so genannte doppelknockout-Mäuse (IFN-R/C4 def.) fanden sich ebenso viele MZB Zellen, wie in wt Mäusen, und damit signifikant mehr, als in C4 def. Mäusen. Außerdem zeigten auch wt Mäuse, die mit IgM anti dsDNA behandelt wurden nach sechsstündiger Inkubation eine signifikante Verringerung ihrer MZB Zellen, verglichen mit unbehandelten wt Mäusen.

Zumindest im Fall der C4 def. Mäuse ist demnach das IFN- α für die Verringerung der MZB-Zellen verantwortlich. Auf welche Weise intravenös injiziertes IgM anti dsDNA zu einer Verringerung der MZB-Zellen führt bleibt zunächst unklar. Es gibt jedoch

verschiedene Erklärungsversuche für dieses Phänomen, die im Folgenden erörtert werden.

6.2.2.1 Auswirkung der Deposition von IgM-anti-dsDNA Immunkomplexen an der Marginalen Zone auf die Marginalzonen B-Zellen

Bei intravenöser Injektion von IgM-anti-dsDNA kommt es zu einer Deposition der gebildeten Immunkomplexe an der marginalen Zone der Milz [14]. Ähnliche Ergebnisse zeigen sich auch bei Injektion von Immunkomplexen aus IgM-anti-Nitrophenyl (NP) und ihrem Liganden Trinitrophenyl (TNP) [54].

Diese IC werden an der marginalen Zone über den Komplementrezeptor 2 (CR2/CD21) an MZB-Zellen abgelagert. Als Folge dessen wandern die MZB-Zellen aus der marginalen Zone in den Follikel, wo sie später in Assoziation mit follikulären-dendritischen Zellen (FDC) gefunden werden [54, 140, 141]. Dies geschieht innerhalb der ersten zehn Stunden nach der Injektion. Somit kann dieses Ergebnis eine Begründung für die verringerte Anzahl MZB-Zellen in mit IgM-anti-dsDNA behandelten wt Mäusen sein.

Weiterhin zeigt dieses Ergebnis die Fähigkeit von IgM-Antikörpern, Immunkomplexe an die MZ zu vermitteln [140, 141]. Eine vermehrte Ablagerung von in C4 def. Mäusen erhöhter endogener DNA mittels natürlich vorkommendem IgM-anti-dsDNA erscheint somit sehr wahrscheinlich.

6.2.2.2 Auswirkung von IFN- α auf die Marginalzonen B-Zellen

Wie bereits im Ergebnisteil (Kapitel 5.2.2) beschrieben liegen in IFN-R/C4 def. Mäusen normale MZB-Zellzahlen vor. Auf Grund dieser Tatsache kann man annehmen, dass der Hauptgrund für die geringere Menge an MZB-Zellen in der MZ von C4 def. Mäusen die erhöhten IFN- α Spiegel in diesen Mäusen sind.

Zwei Mechanismen sind in der Literatur beschrieben, die dieses Ergebnis erklären können:

Le Bon et al. fanden heraus, dass IFN- α , sowohl direkt injiziert, als auch induziert durch die synthetisch hergestellte Doppelstrang-RNA (dsRNA) Poly-I:C die humorale Immunantwort auf gleichzeitig injiziertes Antigen signifikant verstärkte [39]. Die Defizienz des Interferon-Rezeptors (IFN-R def.) führte zu einer signifikanten Minderung der Immunantwort [38, 39, 43, 152, 153]. IFN- α wirkt dabei direkt auf die B-Zellen ein. Nur zu geringen Teilen haben DCs einen Einfluss auf diese Stimulation:

Zum einen führte der Transfer von IFN-R positiven DCs in IFN-R def. Mäuse nur zu einer geringen Verstärkung der Immunantwort. Zum anderen führte die gezielte Inaktivierung des IFN-R in B-Zellen zu einer signifikanten Minderung der Immunantwort [38, 39, 43, 152, 153]. IFN- α ist in der Lage, die Bildung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen aus naiven B-Zellen zu fördern und ist notwendig für eine effektive Bildung dieser Plasmazellen: Ohne von PDCs gebildetes IFN- α findet in gemeinsamen in vitro Kulturen keine Ausreifung von B-Zellen zu Plasmazellen statt wenn diese mit Viren inkubiert werden. Wichtig hierfür ist allerdings eine vorherige Spezifizierung und Aktivierung der B-Zellen durch das Virus [154].

Nicht nur in CpG-DNA stimulierten humanen Mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) werden B-Zellen aktiviert und reifen konsekutiv zu Plasmazellen aus. In In-vitro-Kulturen, in denen sich ausschließlich PDCs und B-Zellen befinden, werden diese B-Zellen ebenfalls aktiviert und reifen zu Plasmazellen aus. Sie produzieren hierbei hauptsächlich Antikörper vom Typ IgM. Wichtiger Stimulus der B-Zellen ist das IFN- α , welches von den PDCs nach Stimulation mit CpG-DNA produziert wird. Besonders effektiv verläuft diese Aktivierung und Antikörperproduktion, wenn die B-Zellen gleichzeitig mit einem Liganden für den B-Zell-Rezeptor behandelt werden [155].

Diese Aktivierung der B-Zellen erfolgt auch, wenn B-Zellen über ihren B-Zellrezeptor (BCR) Immunkomplexe aufnehmen, die aus Chromatin und IgG-anti-Chromatin bestehen. Hierbei findet eine Aktivierung über den TLR-9 statt [119, 156]. Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht nur CpG-DNA, die physiologisch seltener im Vertebraten zu finden ist, sondern auch Immunkomplexe aus autoimmunen Seren, B-Zellen über den BCR aktivieren können.

In den bisher beschriebenen Untersuchungen stellte sich für die weitere Aktivierung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen die vorherige Spezifizierung der B-Zellen für ein bestimmtes Antigen als wichtiger Faktor heraus [154, 157]. Im Rahmen der Produktion von Autoantikörpern nehmen die MZB-Zellen unter anderem deshalb eine exponierte Stellung ein, da sich in verschiedenen Experimenten gezeigt hat, dass in Modellmäusen für SLE die MZB-Zellen vermehrt gegen nukleäre Antigene präspezifiziert sind und in Modellen für Autoimmunität für Produktion von Autoantikörpern verantwortlich sind [53, 91, 158-160]. Weiterhin führt der adoptive Transfer autoreaktiver B-Zellen in wt Mäuse zu einer Migration dieser Zellen in die MZ [157].

Eine Aktivierung und Ausreifung von B-Zellen zu antikörperproduzierenden Plasmazellen könnte demnach stattfinden, wenn diese B-Zellen über ihren BCR Antigen erkennen, bei gleichzeitiger Stimulation mit IFN- α . Bemerkenswert ist in diesem Zusammenhang, dass der gleiche Stimulus, nämlich Chromatin-enthaltende-IC sowohl eine B-Zell-Aktivierung, als auch eine IFN- α Antwort in dendritischen Zellen hervorruft [35, 36, 119, 156]. Bei dieser Interaktion weisen MZB Zellen die nötige vorherige Spezifizierung gegen Chromatin auf und reifen zu Plasmazellen aus. Sie verlassen daraufhin innerhalb von Stunden die MZ und verlieren ihren MZB Zellphänotyp [71, 161]. Hieraus kann folgende Hypothese abgeleitet werden:

An gegen DNA präspezifizierten MZB-Zellen abgelagerte endogene DNA, wie sie in C4 def. Mäusen vermehrt vorkommt, führt zusammen mit ebenfalls vermehrt vorliegendem IFN- α als zweitem Signal zu einer gesteigerten Ausreifung von MZB Zellen zu Plasmazellen.

Diese Hypothese wird durch neuere Erkenntnisse gestützt, laut derer in SLE-prädisponierten C1q-defizienten Mäusen ebenfalls verringerte Zahlen an MZB-Zellen und vermehrt Plasmazellen vorliegen [162].

6.3 Die Kolokalisation von Marginalzonen-B-Zellen, Interferonproduzierenden Zellen und Chromatin-haltiger Immunkomplexe kann die Ausbildung autoimmuner Phänomene begründen.

Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass in Komplement C4 defizienten Mäusen spontan vermehrt IFN- α produziert wird, verglichen mit wt Mäusen. Weiterhin führt die Injektion IgM enthaltender Immunkomplexe zu einer Deposition der IC an der MZ. Bestehen diese IC aus frühen SLE-typischen Antikörpern (IgM anti dsDNA) und endogener DNA, so kommt es zu einer Steigerung der IFN- α Produktion in C4 def. Mäusen durch eine Zellpopulation, die den Oberflächenmarker CD11b exprimiert.

In der murinen Milz können sechs verschiedene Subpopulationen mononukleärer Zellen an Hand der Oberflächenmarker CD11b und CD11c differenziert werden. In dieser Dissertation konnte die in diesem Modell IFN- α -produzierende Subpopulation identifiziert werden: Sie ist hochgradig positiv für CD11c und mittelgradig positiv für CD11b. Damit gehört sie zu den MDCs [61]. Dieses Ergebnis steht in einigem Widerspruch zu zahlreichen Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, die die PDCs als

Haupt-IFN- α -Produzenten identifiziert haben [27-29, 35, 36, 64, 68]. Mittlerweile mehren sich jedoch die Ergebnisse, in denen auch MDCs IFN- α zu produzieren vermögen [67, 68].

In keinem anderen Versuchsaufbau wurden hierfür jedoch Immunkomplexe aus frühen SLE-typischen Antikörpern (IgM anti-dsDNA) und deren Antigen endogener DNA verwendet, welches in C4 def. Mäusen gehäuft vorkommt. Damit befindet sich unser Modell deutlich näher an der Pathogenese des humanen SLE, als es z.B. die Verwendung von CpG-DNA als Antigen für injizierte Antikörper zuließe.

In Abhängigkeit des vermehrt in C4 def. Mäusen produzierten IFN- α kommt es zu signifikanter Verringerung der MZB Zellen, verglichen mit wt Mäusen. In IFN-R/C4 def. Mäusen findet sich diese Veränderung nicht: Sie weisen den gleichen Phänotyp auf, wie wt Mäuse.

Wie beschrieben kommen an der MZ gehäuft Zellen mit autoimmuner Präspezifizierung vor, als in anderen Kompartimenten des Körpers [53, 91, 154, 157]. IFN- α ist in der Lage zusammen mit dem spezifischen Antigen die Ausreifung einer B-Zelle zur Autoantikörper-produzierenden Plasmazelle zu bewirken. Sie verliert daraufhin ihren vorherigen Phänotyp. Die verringerte Anzahl an MZB-Zellen in C4 def. Mäusen weist demnach möglicherweise auf eine vermehrte Ausreifung zu autoimmunen Plasmazellen hin, die abhängig ist von durch MDCs produziertem IFN- α . Endogen vermehrt vorliegende dsDNA in C4 def. Mäusen sorgt demnach einerseits für eine Stimulation der MDCs zur IFN- α Produktion, andererseits für eine Aktivierung der autoimmun präspezifizierten MZB-Zellen, zusammen mit dem zuvor sezernierten IFN- α .

Abb. 14 gibt eine zusammenfassende Übersicht der Hypothese der Arbeitsgruppe, über den Zusammenhang zwischen Komplement C4-Defizienz und der Entstehung von systemischem Lupus Erythematoses.

Die Schlüsselrolle des IFN- α in der Pathogenese des SLE wird hier sehr deutlich. An dieser Stelle könnte z.B. ein therapeutischer Ansatz mit humanisierten monoklonalen Antikörpern gegen IFN- α in der SLE-Therapie ansetzen.

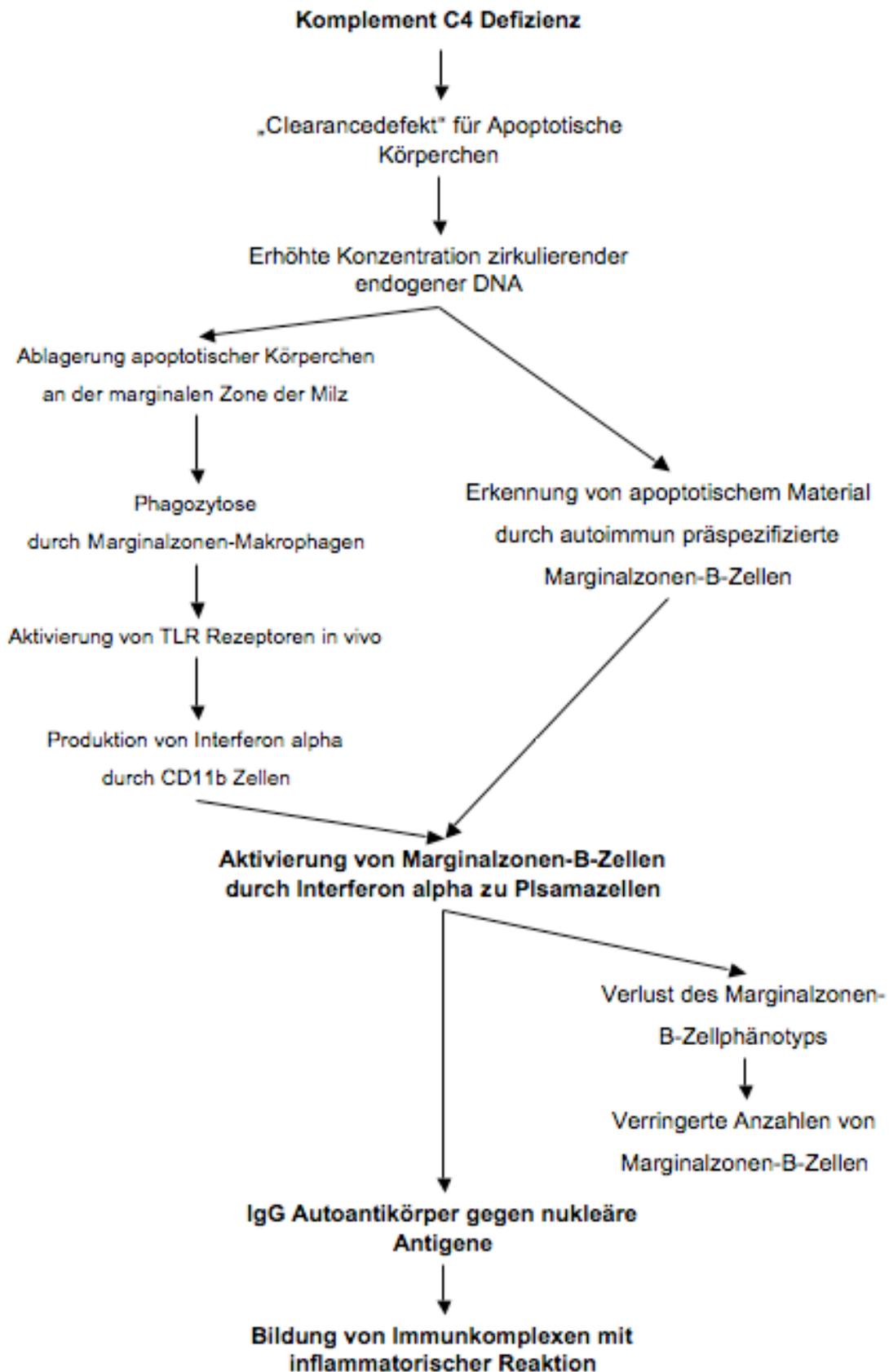


Abb. 14: Hypothese der Arbeitsgruppe

Schematische Darstellung des Zusammenhangs zwischen Komplement C4-Defizienz und der Entstehung von systemischem Lupus Erythematoses.

7 Zusammenfassung

Der Systemische Lupus Erythematoses ist eine autoimmune Systemerkrankung für die eine Ablagerung von Immunkomplexen in Geweben mit nachfolgender Entzündung charakteristisch ist. Seine Entstehung ist zum einen mit der Defizienz früher Komplementkomponenten des klassischen Aktivierungsweges (C1, C4, C2), zum anderen mit einem aktivierten Typ-I-Interferonsystem assoziiert. Bislang existieren keine gesicherten Kenntnisse, die beide Phänomene zusammenhängend erklären.

Vorarbeiten der Arbeitsgruppe zeigen, dass Komplement C4-defiziente Mäuse sowohl erhöhte Konzentrationen endogener DNA im Serum, als auch ein spontan aktiviertes Interferon-alpha-System aufweisen. Die Expression von Interferon alpha kann durch gezielte Ablagerung von DNA an der marginalen Zone der Milz gesteigert werden. Dieses wird erreicht durch die intravenöse Applikation von apoptotischer DNA oder von für Systemischen Lupus Erythematoses typischen Antikörpern vom Typ IgM gegen Doppelstrang-DNA.

Unklar war bisher, welche Zellen genau innerhalb der marginalen Zone für die Interferon alpha-Produktion verantwortlich sind und welche Auswirkungen Interferon auf das zelluläre Mikromilieu der marginalen Zone hat.

Es wurde die Interferon alpha-Produktion von mononukleären Zellen aus Milzen von Wildtyp- und Komplement-C4-defizienten Mäusen, jeweils unbehandelt und mit IgM gegen Doppelstrang-DNA behandelt, untersucht. Die Isolation dieser Zellen erfolgte mit Hilfe von Antikörper-besetzten magnetischen Partikeln und durchflußzytometrischer Zellaufreinigung. Obwohl bekannt ist, dass im Menschen typischerweise die CD11b negativen, CD11c positiven plasmazytoiden dendritischen Zellen Interferon alpha produzieren, zeigte es sich, dass in diesem Modell die Interferon alpha-produzierenden Zellen auf ihrer Oberfläche die für myeloide dendritische Zellen charakteristischen Marker CD11b und CD11c exprimieren. Interferon alpha-Produktion wurde in myeloiden dendritischen Zellen im Mausmodell, bislang nur bei viraler Stimulation nachgewiesen, jedoch nicht, bei Stimulation mit DNA-enthaltenden Immunkomplexen. An der marginalen Zone abgelagerte endogene DNA könnte demnach mit Hilfe des Toll-like-Rezeptors 9 erkannt werden und zu der beobachteten Produktion signifikanter Mengen von Interferon alpha führen.

Lokal produziertes Interferon alpha hat offenbar unmittelbare Auswirkungen auf die zelluläre Zusammensetzung der marginalen Zone: Die durchflußzytometrische Analyse

zeigte eine signifikante Vermehrung der inflammatorischen Monozyten und eine verringerte Anzahl von Marginalzonen-B-Zellen in C4-defizienten Mäusen, verglichen mit unbehandelten Wildtyp-Mäusen. Ist die Signaltransduktion des Interferon alpha durch Defizienz des Interferon-Rezeptors unterbrochen, liegen trotz gleichzeitiger C4-Defizienz normale Zellzahlen vor. Es konnte so bewiesen werden, dass die beobachteten Veränderungen ursächlich auf vermehrtes Interferon alpha zurückzuführen sind. Gleichzeitiger Kontakt autoimmun präspezifizierter Marginalzonen-B-Zellen mit endogener DNA, sowie mit Interferon alpha könnte zu einer Ausreifung zu Plasmablasten und konsekutivem Verlust ihres Phänotyps führen.

Auf ein entzündliches Geschehen an der Marginalen Zone unter aktiviertem Typ-I-Interferon-System deutet weiterhin die Vermehrung der, als inflammatorische Monozyten zu klassifizierenden Mononukleären Zellen hin.

In dieser Dissertation konnte die besondere Rolle der Marginalen Zone der Milz in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematoses gezeigt werden. Diese kommt zustande durch die Kolokalisation von Interferon alpha produzierenden myeloiden Phagozyten und Marginalzonen-B-Zellen, denen eine gehäufte autoimmune Präspezifizierung zugeschrieben wird, und deren Mikromilieu signifikant verändert ist unter einem durch DNA Ablagerung aktivierten Interferon alpha System.

III Publikationen und Kongressbeiträge

Publikationen

Finke D, Randers K, Hoerster R, Henning H, Zawatzky T, Brockmann C, Klempt-Giessing K, Jacobsen K, Kirchner H, Goerg S.

Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for the induction of Systemic Lupus Erythematosus
Eur. J. Immunol. 2007 Jun; 37(6)

Wagner, D.; Hörster, R.; Lange, B.; Lange, C.:

Stellenwert der T-Zell-Interferon- γ -Sekretionstests in der Tuberkulosedagnostik
Deutsche medizinische Wochenschrift 2008 Feb;133(2)

Robert Hörster, Barbara Kalsdorf, Claudia Jafari, Ulf Greinert, Martin Ernst, Christoph Lange

Diagnose der Tuberkulose in der klinischen Praxis. Resultat radiologischer, mikrobiologischer, immunologischer, molekularbiologischer und histologischer Methoden
Der Klinikarzt 2008; 37(4)

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.

Myeloid dendritic cells of the marginal zone are the IFN- α producing cells involved in the induction of systemic lupus erythematosus in C4 deficient mice. In Vorbereitung.

Kongressbeiträge

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- α) 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

Ich danke besonders meinem Doktorvater PD Dr. med. Siegfried Görg. Nur durch seine kreativen Ideen und sein kritisches Hinterfragen jedes Ergebnisses konnte diese Dissertation in der vorliegenden Form erstellt werden.

Ebenfalls danke ich ganz besonders meiner Arbeitsgruppe, Dr. Doreen Finke, Dr. Kirstin Faust, Dr. med. Christian Brockmann, Katharina Randers und Kirsten Jacobsen für sehr gute Zusammenarbeit und uneingeschränkte Hilfsbereitschaft (auch morgens um 3:00 Uhr).

Ich danke Dr. Martin Ernst und Dr. Kathleen Marienfeld vom Forschungszentrum in Borstel, die mich bei der Durchführung der *FACS-Sorter*-Versuche nach Kräften unterstützt haben, und ohne die diese Versuche nicht möglich gewesen wären.

Herzlich danken möchte ich Dipl. biol. Jochen Behrens für kreative, fachliche Diskussionen, für steten Zuspruch und für die entstandene Freundschaft.

Uta Fernekorn und Torsten Schulze, deren beider Anwesenheit in Lübeck schmerzlich vermisst wird danke ich für ausgesprochen interessante Gespräche und fröhliche Abende.

Meinen Kolleginnen und Kollegen im ZK danke ich für ein hervorragendes Arbeitsklima.

Großen Dank schulde ich auch meiner Familie, die für mich in jeder Lebenslage eine Stütze ist. Ohne ihre Unterstützung und ihre stete Zuversicht wäre weder mein Studium der Medizin, noch diese Dissertation möglich gewesen.

Ich danke in Liebe meiner Freundin und Partnerin Friederike Jacobs. Sie ist die Triebfeder in meinem Leben.

V Lebenslauf

Robert Hörster

Persönliche Daten

Geboren am 22.07.1979

Als Sohn der Apotheker
Dres. Eva und Heinz Hörster
Eine Schwester, Ruth Hörster

Nationalität: deutsch

**Ausbildung
(Schule)**

**Von August 1989 bis Juni 1999
Graf-Adolf-Gymnasium Tecklenburg,
Tecklenburg, Deutschland**

Abschluss mit der
Allgemeinen Hochschulreife (Abitur)
Mit der Gesamtnote 1,6

Sommer 1997

**TASIS England Summer School, Thorpe, Surrey,
UK**

Award for excellence
In the TASIS English Language Programme

Sprachen:

Deutsch, Englisch

**Ausbildung
(Hochschule)**

Von Oktober 2000 bis Juni 2007

ordentlich immatrikulierter Student
**der Universität zu Lübeck,
Lübeck, Deutschland**

September 2002: Ärztliche Vorprüfung
Note: gut (2,3)

September 2003: 1. Staatsprüfung Medizin
Note: ausreichend

März 2005: 2. Staatsprüfung Medizin
Note: gut (1,6)

Juni 2007: 3. Staatsprüfung Medizin
Note: sehr gut

Gesamtnote: gut (1,83)

Im Juni 2007: Approbation als Arzt

Stipendium

Juli 2003 bis Dezember 2004

Förderung der Dissertation durch ein Stipendium im Rahmen des Studienprogrammes „Experimentelle Medizin“

Vortrag:

September 2004

**Joint annual Meeting
of the German and Dutch Society for Immunology**

Thema:

“Characterisation of mononuclear cells which produce Interferon alpha (IFN- α) spontaneously in the spleen of complement C4 deficient (C4^{-/-}) mice”

Beschäftigungsverhältnis:

Seit August 2007

Beschäftigt als
Assistenzarzt zur Weiterbildung

in der

**Medizinischen Klinik
des Forschungszentrums Borstel,
Borstel, Deutschland**

VI Literaturverzeichnis:

1. Atkinson, J.P., *Complement deficiency: predisposing factor to autoimmune syndromes*. Clin Exp Rheumatol, 1989. **7 Suppl 3**: p. S95-101.
2. Dragon-Durey, M.A., et al., *Lack of evidence of a specific role for C4A gene deficiency in determining disease susceptibility among C4-deficient patients with systemic lupus erythematosus (SLE)*. Clin Exp Immunol, 2001. **123**(1): p. 133-9.
3. Prodeus, A.P., et al., *A critical role for complement in maintenance of self-tolerance*. Immunity, 1998. **9**(5): p. 721-31.
4. Rhee, M.S., et al., *Enhancement of granulocyte oxidative metabolism in sera from patients with C2 deficiency and systemic lupus erythematosus*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1983. **72**(1): p. 46-52.
5. Rupert, K.L., et al., *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): p. 1570-8.
6. Rynes, R.I., R.E. Urizar, and R.J. Pickering, *Heterogeneity of the clinical syndrome in patients with systemic lupus erythematosus and genetic deficiency of the second complement component*. Clin Exp Immunol, 1978. **32**(1): p. 59-68.
7. Stone, N.M., et al., *Systemic lupus erythematosus with C1q deficiency*. Br J Dermatol, 2000. **142**(3): p. 521-4.
8. Brassard, D.L., M.J. Grace, and R.W. Bordens, *Interferon-alpha as an immunotherapeutic protein*. J Leukoc Biol, 2002. **71**(4): p. 565-81.
9. Schilling, P.J., et al., *Development of systemic lupus erythematosus after interferon therapy for chronic myelogenous leukemia*. Cancer, 1991. **68**(7): p. 1536-7.
10. Bengtsson, A.A., et al., *Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies*. Lupus, 2000. **9**(9): p. 664-71.
11. Hooks, J.J., et al., *Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease*. N Engl J Med, 1979. **301**(1): p. 5-8.
12. Preble, O.T., et al., *Systemic lupus erythematosus: presence in human serum of an unusual acid-labile leukocyte interferon*. Science, 1982. **216**(4544): p. 429-31.
13. Strannegard, O., S. Hermodsson, and G. Westberg, *Interferon and natural killer cells in systemic lupus erythematosus*. Clin Exp Immunol, 1982. **50**(2): p. 246-52.
14. Finke, D., et al., *Elevated levels of endogenous apoptotic DNA and IFN-alpha in complement C4-deficient mice: implications for induction of systemic lupus erythematosus*. Eur J Immunol, 2007. **37**(6): p. 1702-9.
15. Janeway, C., et al., *Janeway's Immunobiology, Seventh Edition*. 7. ed. 2007: Garland Science, Taylor & Francis Group.
16. Janeway, C.A., Jr., *How the immune system protects the host from infection*. Microbes Infect, 2001. **3**(13): p. 1167-71.
17. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
18. Bhakdi, S., F. Hugo, and J. Tranum-Jensen, *Functions and relevance of the terminal complement sequence*. Blut, 1990. **60**(6): p. 309-18.

19. Zalman, L.S. and H.J. Muller-Eberhard, *Comparison of channels formed by poly C9, C5b-8 and the membrane attack complex of complement*. Mol Immunol, 1990. **27**(6): p. 533-7.
20. Frank, M.M. and L.F. Fries, *The role of complement in inflammation and phagocytosis*. Immunol Today, 1991. **12**(9): p. 322-6.
21. Botto, M., et al., *Homozygous C1q deficiency causes glomerulonephritis associated with multiple apoptotic bodies*. Nat Genet, 1998. **19**(1): p. 56-9.
22. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
23. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. J Interferon Res, 1987. **7**(5): p. 429-38.
24. Ivashkiv, L.B., *Type I interferon modulation of cellular responses to cytokines and infectious pathogens: potential role in SLE pathogenesis*. Autoimmunity, 2003. **36**(8): p. 473-9.
25. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. Science, 1999. **284**(5421): p. 1835-7.
26. Sun, S., et al., *Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2335-42.
27. Asselin-Paturel, C., et al., *Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology*. Nat Immunol, 2001. **2**(12): p. 1144-50.
28. Nakano, H., M. Yanagita, and M.D. Gunn, *CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **194**(8): p. 1171-8.
29. Nakano, S., et al., *Role of pathogenic auto-antibody production by Toll-like receptor 9 of B cells in active systemic lupus erythematosus*. Rheumatology (Oxford), 2007.
30. Havell, E.A. and G.L. Spitalny, *Endotoxin-induced interferon synthesis in macrophage cultures*. J Reticuloendothel Soc, 1983. **33**(5): p. 369-80.
31. Korngold, R., K.J. Blank, and D.M. Murasko, *Effect of interferon on thoracic duct lymphocyte output: induction with either poly I:poly C or vaccinia virus*. J Immunol, 1983. **130**(5): p. 2236-40.
32. Krug, A., et al., *Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells*. Eur J Immunol, 2001. **31**(7): p. 2154-63.
33. Krieg, A.M., *CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 709-60.
34. Sano, H., et al., *Binding properties of human anti-DNA antibodies to cloned human DNA fragments*. Scand J Immunol, 1989. **30**(1): p. 51-63.
35. Vallin, H., et al., *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**(1): p. 196-202.
36. Vallin, H., et al., *Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 1999. **163**(11): p. 6306-13.
37. Cella, M., et al., *Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization*. Nat Immunol, 2000. **1**(4): p. 305-10.
38. Le Bon, A., et al., *Direct stimulation of T cells by type I IFN enhances the CD8+ T cell response during cross-priming*. J Immunol, 2006. **176**(8): p. 4682-9.

39. Le Bon, A., et al., *Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo*. *Immunity*, 2001. **14**(4): p. 461-70.
40. Luft, T., et al., *Type I IFNs enhance the terminal differentiation of dendritic cells*. *J Immunol*, 1998. **161**(4): p. 1947-53.
41. Rissoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. *Science*, 1999. **283**(5405): p. 1183-6.
42. Santini, S.M., et al., *Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice*. *J Exp Med*, 2000. **191**(10): p. 1777-88.
43. Le Bon, A., et al., *Cutting edge: enhancement of antibody responses through direct stimulation of B and T cells by type I IFN*. *J Immunol*, 2006. **176**(4): p. 2074-8.
44. Braun, D., I. Caramalho, and J. Demengeot, *IFN-alpha/beta enhances BCR-dependent B cell responses*. *Int Immunol*, 2002. **14**(4): p. 411-9.
45. Ruuth, K., et al., *Interferon-alpha promotes survival of human primary B-lymphocytes via phosphatidylinositol 3-kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **284**(3): p. 583-6.
46. Akbar, A.N., J.M. Lord, and M. Salmon, *IFN-alpha and IFN-beta: a link between immune memory and chronic inflammation*. *Immunol Today*, 2000. **21**(7): p. 337-42.
47. Marrack, P., J. Kappler, and T. Mitchell, *Type I interferons keep activated T cells alive*. *J Exp Med*, 1999. **189**(3): p. 521-30.
48. Litinskiy, M.B., et al., *DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL*. *Nat Immunol*, 2002. **3**(9): p. 822-9.
49. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histology: A Text and Atlas*. Fifth ed. Vol. 1. 2006: Lippincott Williams & Wilkins. 906.
50. Ansel, K.M., et al., *A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles*. *Nature*, 2000. **406**(6793): p. 309-14.
51. Kraal, G., *Cells in the marginal zone of the spleen*. *Int Rev Cytol*, 1992. **132**: p. 31-74.
52. Eloranta, M.L. and G.V. Alm, *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**(4): p. 391-4.
53. Kenny, J.J., et al., *Autoreactive B cells escape clonal deletion by expressing multiple antigen receptors*. *J Immunol*, 2000. **164**(8): p. 4111-9.
54. Zachrau, B., et al., *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): p. 1685-90.
55. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
56. Geissmann, F., S. Jung, and D.R. Littman, *Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties*. *Immunity*, 2003. **19**(1): p. 71-82.
57. Palframan, R.T., et al., *Inflammatory chemokine transport and presentation in HEV: a remote control mechanism for monocyte recruitment to lymph nodes in inflamed tissues*. *J Exp Med*, 2001. **194**(9): p. 1361-73.
58. Randolph, G.J., et al., *Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo*. *Immunity*, 1999. **11**(6): p. 753-61.

59. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(1): p. 19-30.
60. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(3): p. 151-61.
61. Vremec, D., et al., *CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen*. J Immunol, 2000. **164**(6): p. 2978-86.
62. O'Keeffe, M., et al., *Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus*. J Exp Med, 2002. **196**(10): p. 1307-19.
63. Fitzgerald-Bocarsly, P., *Natural interferon-alpha producing cells: the plasmacytoid dendritic cells*. Biotechniques, 2002. **Suppl**: p. 16-20, 22, 24-9.
64. Ronnblom, L. and G.V. Alm, *A pivotal role for the natural interferon alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in the pathogenesis of lupus*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. F59-63.
65. Ronnblom, L. and G.V. Alm, *Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(2): p. 68-75.
66. Ronnblom, L., M.L. Eloranta, and G.V. Alm, *Role of natural interferon-alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity*. Autoimmunity, 2003. **36**(8): p. 463-72.
67. Diebold, S.S., et al., *Viral infection switches non-plasmacytoid dendritic cells into high interferon producers*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 324-8.
68. Hochrein, H., et al., *Herpes simplex virus type-1 induces IFN-alpha production via Toll-like receptor 9-dependent and -independent pathways*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(31): p. 11416-21.
69. Batteux, F., et al., *FCgammaRII (CD32)-dependent induction of interferon-alpha by serum from patients with lupus erythematosus*. Eur Cytokine Netw, 1999. **10**(4): p. 509-14.
70. Lopes-Carvalho, T. and J.F. Kearney, *Development and selection of marginal zone B cells*. Immunol Rev, 2004. **197**: p. 192-205.
71. Oliver, A.M., F. Martin, and J.F. Kearney, *IgMhighCD21high lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 7198-207.
72. Takahashi, K., et al., *Mouse complement receptors type 1 (CR1;CD35) and type 2 (CR2;CD21): expression on normal B cell subpopulations and decreased levels during the development of autoimmunity in MRL/lpr mice*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1557-69.
73. Amano, M., et al., *CD1 expression defines subsets of follicular and marginal zone B cells in the spleen: beta 2-microglobulin-dependent and independent forms*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1710-7.
74. Brossay, L., et al., *Mouse CD1 is mainly expressed on hemopoietic-derived cells*. J Immunol, 1997. **159**(3): p. 1216-24.
75. Porcellini, S., M. Panigada, and F. Grassi, *Molecular and cellular aspects of induced thymus development in recombinase-deficient mice*. Eur J Immunol, 1999. **29**(8): p. 2476-83.
76. Roark, J.H., et al., *CD1.1 expression by mouse antigen-presenting cells and marginal zone B cells*. J Immunol, 1998. **160**(7): p. 3121-7.
77. Szalay, G., et al., *Cutting edge: anti-CD1 monoclonal antibody treatment reverses the production patterns of TGF-beta 2 and Th1 cytokines and ameliorates listeriosis in mice*. J Immunol, 1999. **162**(12): p. 6955-8.

78. Szalay, G., et al., *Participation of group 2 CD1 molecules in the control of murine tuberculosis*. *Microbes Infect*, 1999. **1**(14): p. 1153-7.
79. Rao, M., W.T. Lee, and D.H. Conrad, *Characterization of a monoclonal antibody directed against the murine B lymphocyte receptor for IgE*. *J Immunol*, 1987. **138**(6): p. 1845-51.
80. Waldschmidt, T., et al., *B-cell subsets defined by the Fc epsilon R*. *Ann N Y Acad Sci*, 1992. **651**: p. 84-98.
81. Waldschmidt, T.J., D.H. Conrad, and R.G. Lynch, *The expression of B cell surface receptors. I. The ontogeny and distribution of the murine B cell IgE Fc receptor*. *J Immunol*, 1988. **140**(7): p. 2148-54.
82. Waldschmidt, T.J. and L.T. Tygrett, *The low affinity IgE Fc receptor (CD23) participates in B cell activation*. *Adv Exp Med Biol*, 1992. **323**: p. 149-56.
83. Bendelac, A., M. Bonneville, and J.F. Kearney, *Autoreactivity by design: innate B and T lymphocytes*. *Nat Rev Immunol*, 2001. **1**(3): p. 177-86.
84. Barchet, W., et al., *Virus-induced interferon alpha production by a dendritic cell subset in the absence of feedback signaling in vivo*. *J Exp Med*, 2002. **195**(4): p. 507-16.
85. Balazs, M., et al., *Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses*. *Immunity*, 2002. **17**(3): p. 341-52.
86. Batten, M., et al., *BAFF mediates survival of peripheral immature B lymphocytes*. *J Exp Med*, 2000. **192**(10): p. 1453-66.
87. Schiemann, B., et al., *An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway*. *Science*, 2001. **293**(5537): p. 2111-4.
88. Attanavanich, K. and J.F. Kearney, *Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells*. *J Immunol*, 2004. **172**(2): p. 803-11.
89. Zeng, D., et al., *Subsets of transgenic T cells that recognize CD1 induce or prevent murine lupus: role of cytokines*. *J Exp Med*, 1998. **187**(4): p. 525-36.
90. Zeng, D., et al., *Cutting edge: a role for CD1 in the pathogenesis of lupus in NZB/NZW mice*. *J Immunol*, 2000. **164**(10): p. 5000-4.
91. Li, Y., et al., *Anti-DNA B cells in MRL/lpr mice show altered differentiation and editing pattern*. *J Exp Med*, 2002. **196**(12): p. 1543-52.
92. Rifkin, I.R., et al., *Immune complexes present in the sera of autoimmune mice activate rheumatoid factor B cells*. *J Immunol*, 2000. **165**(3): p. 1626-33.
93. Shlomchik, M., et al., *Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation*. *J Exp Med*, 1990. **171**(1): p. 265-92.
94. Uramoto, K.M., et al., *Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(1): p. 46-50.
95. Danchenko, N., J.A. Satia, and M.S. Anthony, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden*. *Lupus*, 2006. **15**(5): p. 308-18.
96. D'Cruz, D.P., M.A. Khamashta, and G.R. Hughes, *Systemic lupus erythematosus*. *Lancet*, 2007. **369**(9561): p. 587-96.
97. Mills, J.A., *Systemic lupus erythematosus*. *N Engl J Med*, 1994. **330**(26): p. 1871-9.
98. Gladman, D., et al., *The development and initial validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics/American College of Rheumatology damage index for systemic lupus erythematosus*. *Arthritis Rheum*, 1996. **39**(3): p. 363-9.

99. Stoll, T., B. Seifert, and D.A. Isenberg, *SLICC/ACR Damage Index is valid, and renal and pulmonary organ scores are predictors of severe outcome in patients with systemic lupus erythematosus*. Br J Rheumatol, 1996. **35**(3): p. 248-54.
100. Abu-Shakra, M. and P. Lee, *Mortality in systemic sclerosis: a comparison with the general population*. J Rheumatol, 1995. **22**(11): p. 2100-2.
101. Bernatsky, S., et al., *Mortality in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(8): p. 2550-7.
102. Grimaldi, C.M., et al., *Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 811-20.
103. Lahita, R.G., *The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Rheumatol, 1999. **11**(5): p. 352-6.
104. Golan, T.D., et al., *Solar ultraviolet radiation induces enhanced accumulation of oxygen radicals in murine SLE-derived splenocytes in vitro*. Lupus, 1994. **3**(2): p. 103-6.
105. Skaer, T.L., *Medication-induced systemic lupus erythematosus*. Clin Ther, 1992. **14**(4): p. 496-506; discussion 495.
106. Zandman-Goddard, G., Y. Levy, and Y. Shoenfeld, *Intravenous immunoglobulin therapy and systemic lupus erythematosus*. Clin Rev Allergy Immunol, 2005. **29**(3): p. 219-28.
107. Zandman-Goddard, G. and Y. Shoenfeld, *SLE and infections*. Clin Rev Allergy Immunol, 2003. **25**(1): p. 29-40.
108. Arnett, F.C. and J.D. Reveille, *Genetics of systemic lupus erythematosus*. Rheum Dis Clin North Am, 1992. **18**(4): p. 865-92.
109. Goerg, S., *The association between systemic lupus erythematosus and deficiencies of the complement system*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2002. **48**(3): p. 237-45.
110. Hartung, K., et al., *Major histocompatibility complex haplotypes and complement C4 alleles in systemic lupus erythematosus. Results of a multicenter study*. J Clin Invest, 1992. **90**(4): p. 1346-51.
111. Manderson, A.P., M. Botto, and M.J. Walport, *The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. s431-56.
112. Manderson, A.P., et al., *The in vivo expression of actin/salt-resistant hyperactive DNase I inhibits the development of anti-ssDNA and anti-histone autoantibodies in a murine model of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res Ther, 2006. **8**(3): p. R68.
113. Schur, P.H., *Inherited complement component abnormalities*. Annu Rev Med, 1986. **37**: p. 333-46.
114. American College of Rheumatology ad hoc Committee on Systemic Lupus Erythematosus Guidelines, *Guidelines for Referral and Management of Systemic Lupus Erythematosus in Adults*. 1999. **42**: p. 1785-1796.
115. Einav, S., et al., *Complement C4 is protective for lupus disease independent of C3*. J Immunol, 2002. **168**(3): p. 1036-41.
116. Taylor, P.R., et al., *A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo*. J Exp Med, 2000. **192**(3): p. 359-66.
117. Casciola-Rosen, L.A., G. Anhalt, and A. Rosen, *Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes*. J Exp Med, 1994. **179**(4): p. 1317-30.

118. Steinman, C.R., U. Deesomchok, and H. Spiera, *Proceedings: Detection of antibody to nature DNA (N-DNA): increased specificity for active SLE by using a synthetic N-DNA antigen free of contaminating single-stranded DNA (ss-DNA)*. Arthritis Rheum, 1975. **18**(3): p. 284.
119. Leadbetter, E.A., et al., *Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors*. Nature, 2002. **416**(6881): p. 603-7.
120. Ytterberg, S.R. and T.J. Schnitzer, *Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(4): p. 401-6.
121. Crow, M.K., *Interferon pathway activation in systemic lupus erythematosus*. Curr Rheumatol Rep, 2005. **7**(6): p. 463-8.
122. Crow, M.K. and K.A. Kirou, *Interferon-alpha in systemic lupus erythematosus*. Curr Opin Rheumatol, 2004. **16**(5): p. 541-7.
123. Crow, M.K. and J. Wohlgemuth, *Microarray analysis of gene expression in lupus*. Arthritis Res Ther, 2003. **5**(6): p. 279-87.
124. Han, G.M., et al., *Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray*. Genes Immun, 2003. **4**(3): p. 177-86.
125. Baechler, E.C., et al., *Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(5): p. 2610-5.
126. Bennett, L., et al., *Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood*. J Exp Med, 2003. **197**(6): p. 711-23.
127. Ronnblom, L.E., G.V. Alm, and K. Oberg, *Autoimmune phenomena in patients with malignant carcinoid tumors during interferon-alpha treatment*. Acta Oncol, 1991. **30**(4): p. 537-40.
128. Ronnblom, L.E., G.V. Alm, and K.E. Oberg, *Autoimmunity after alpha-interferon therapy for malignant carcinoid tumors*. Ann Intern Med, 1991. **115**(3): p. 178-83.
129. Ronnblom, L.E., et al., *Characterization of anti-interferon-alpha antibodies appearing during recombinant interferon-alpha 2a treatment*. Clin Exp Immunol, 1992. **89**(3): p. 330-5.
130. Kalkner, K.M., et al., *Antibodies against double-stranded DNA and development of polymyositis during treatment with interferon*. Qjm, 1998. **91**(6): p. 393-9.
131. Ioannou, Y. and D.A. Isenberg, *Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(7): p. 1431-42.
132. Raanani, P. and I. Ben-Bassat, *Immune-mediated complications during interferon therapy in hematological patients*. Acta Haematol, 2002. **107**(3): p. 133-44.
133. Ibrahim, S.F. and G. van den Engh, *Flow cytometry and cell sorting*. Adv Biochem Eng Biotechnol, 2007. **106**: p. 19-39.
134. Banchereau, J. and V. Pascual, *Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 383-92.
135. Nacionales, D.C., et al., *Deficiency of the type I interferon receptor protects mice from experimental lupus*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(11): p. 3770-83.
136. Ronnblom, L. and G.V. Alm, *The natural interferon-alpha producing cells in systemic lupus erythematosus*. Hum Immunol, 2002. **63**(12): p. 1181-93.

137. Sunderkotter, C., et al., *Subpopulations of mouse blood monocytes differ in maturation stage and inflammatory response*. J Immunol, 2004. **172**(7): p. 4410-7.
138. Lovgren, T., et al., *Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(6): p. 1861-72.
139. Lovgren, T., et al., *Induction of interferon-alpha by immune complexes or liposomes containing systemic lupus erythematosus autoantigen- and Sjogren's syndrome autoantigen-associated RNA*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(6): p. 1917-27.
140. Ferguson, A.R., M.E. Youd, and R.B. Corley, *Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells*. Int Immunol, 2004. **16**(10): p. 1411-22.
141. Youd, M.E., A.R. Ferguson, and R.B. Corley, *Synergistic roles of IgM and complement in antigen trapping and follicular localization*. Eur J Immunol, 2002. **32**(8): p. 2328-37.
142. Bave, U., et al., *Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic cells combined with lupus IgG*. J Immunol, 2003. **171**(6): p. 3296-302.
143. Means, T.K. and A.D. Luster, *Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. Ann N Y Acad Sci, 2005. **1062**: p. 242-51.
144. Horng, T., et al., *The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 329-33.
145. Latz, E., et al., *TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome*. Nat Immunol, 2004. **5**(2): p. 190-8.
146. Latz, E., et al., *Mechanisms of TLR9 activation*. J Endotoxin Res, 2004. **10**(6): p. 406-12.
147. Martin, D.A. and K.B. Elkon, *Intracellular mammalian DNA stimulates myeloid dendritic cells to produce type I interferons predominantly through a toll-like receptor 9-independent pathway*. Arthritis Rheum, 2006. **54**(3): p. 951-62.
148. Zhu, J., X. Huang, and Y. Yang, *Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways*. J Virol, 2007. **81**(7): p. 3170-80.
149. Taniguchi, T., et al., *IRF family of transcription factors as regulators of host defense*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 623-55.
150. Okabe, Y., et al., *Toll-like receptor-independent gene induction program activated by mammalian DNA escaped from apoptotic DNA degradation*. J Exp Med, 2005. **202**(10): p. 1333-9.
151. Ding, D., et al., *Aberrant phenotype and function of myeloid dendritic cells in systemic lupus erythematosus*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5878-89.
152. Le Bon, A., et al., *Cross-priming of CD8+ T cells stimulated by virus-induced type I interferon*. Nat Immunol, 2003. **4**(10): p. 1009-15.
153. Le Bon, A. and D.F. Tough, *Links between innate and adaptive immunity via type I interferon*. Curr Opin Immunol, 2002. **14**(4): p. 432-6.
154. Jego, G., et al., *Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6*. Immunity, 2003. **19**(2): p. 225-34.

155. Poeck, H., et al., *Plasmacytoid dendritic cells, antigen, and CpG-C license human B cells for plasma cell differentiation and immunoglobulin production in the absence of T-cell help*. Blood, 2004. **103**(8): p. 3058-64.
156. Leadbetter, E.A., I.R. Rifkin, and A. Marshak-Rothstein, *Toll-like receptors and activation of autoreactive B cells*. Curr Dir Autoimmun, 2003. **6**: p. 105-22.
157. Chen, X. and J.F. Kearney, *Generation and function of natural self-reactive B lymphocytes*. Semin Immunol, 1996. **8**(1): p. 19-27.
158. Takahashi, T. and S. Strober, *Natural killer T cells and innate immune B cells from lupus-prone NZB/W mice interact to generate IgM and IgG autoantibodies*. Eur J Immunol, 2008. **38**(1): p. 156-65.
159. Liu, Y., et al., *Lupus susceptibility genes may breach tolerance to DNA by impairing receptor editing of nuclear antigen-reactive B cells*. J Immunol, 2007. **179**(2): p. 1340-52.
160. Brummel, R. and P. Lenert, *Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides*. J Immunol, 2005. **174**(4): p. 2429-34.
161. Martin, F., A.M. Oliver, and J.F. Kearney, *Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens*. Immunity, 2001. **14**(5): p. 617-29.
162. Fossati-Jimack, L., et al., *C1q deficiency promotes the production of transgenic-derived IgM and IgG3 autoantibodies in anti-DNA knock-in transgenic mice*. Mol Immunol, 2008. **45**(3): p. 787-95.