

**Aus der Medizinischen Poliklinik Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München**
Kommissarischer Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Die Rolle der Interleukin-1 Rezeptor-assoziierten Kinase-M
in der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Claudia Kantner

aus

München

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Jürgen Schauber
Prof. Dr. Günter Schlimok
Priv. Doz. Dr. Alexander Faußner

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. hum. biol. Maciej Lech

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 14.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Systemischer Lupus erythematoses	9
1.2	Immunsystem	14
1.2.1	Das angeborene Immunsystem.....	14
1.2.2	Das erworbene Immunsystem	19
1.3	Die Toll-like Rezeptor / Interleukin-1 Rezeptor Superfamilie.....	20
1.3.1	Toll-like Rezeptoren, Interleukin-1 Rezeptoren und ihre Liganden	20
1.3.2	Signaltransduktion.....	23
1.3.3	Regulation	25
1.4	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase-M.....	27
1.5	Ziel des Projekts und Hypothese	31
2	Material und Methoden	33
2.1	Material.....	33
2.1.1	Geräte	33
2.1.2	Materialien für die Zellkultur	34
2.1.3	Materialien für Tierexperimente.....	34
2.1.4	Materialien für immunologische Methoden	36
2.1.5	Materialien für molekularbiologische Methoden	38
2.1.6	Materialien für histologische Untersuchungen.....	39
2.2	Zellkultur	40
2.2.1	Zellkulturbedingungen	40
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	40
2.2.3	Isolation von Splenozyten	40
2.2.4	Stimulationsexperimente mit TLR-Liganden.....	41
2.2.5	T-Zell-Proliferations-Experimente	41
2.3	Tierexperimente.....	42
2.3.1	Tierhaltung	42
2.3.2	Studiendesign	42
2.3.3	Herstellung der C57BL/6 ^{lpr/lpr} IRAK-M ^{-/-} Knockout-Mäuse	43
2.3.4	Genotypisierung der Mäuse.....	43

2.3.4.1	Isolierung genomischer DNA	44
2.3.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	44
2.3.4.3	Agarosegel-Elektrophorese	45
2.3.5	Blutentnahme.....	46
2.3.6	Organentnahme	46
2.3.7	TLR7-Blockade	46
2.4	Immunologische Methoden	47
2.4.1	ELISA.....	47
2.4.2	Durchflusszytometrie (FACS).....	48
2.5	Molekularbiologische Methoden.....	50
2.5.1	RNA-Isolation	50
2.5.2	cDNA-Synthese.....	52
2.5.3	Real-time PCR.....	52
2.6	Histologische Untersuchungen	53
2.6.1	Anfertigung histologischer Schnitte.....	53
2.6.2	Auswertung histologischer Schnitte.....	54
2.7	Statistische Auswertung	55
3	Ergebnisse	56
3.1	IRAK-M unterdrückt die Zytokinproduktion von Splenozyten.....	56
3.2	IRAK-M-Defizienz führt zu schwerer Lymphoproliferation in BL/6 ^{lpr/lpr} -Mäusen	58
3.3	IRAK-M supprimiert die Aktivierung dendritischer Zellen.....	63
3.4	IRAK-M und T-Zell-Populationen.....	66
3.5	IRAK-M unterdrückt die Expansion von Plasmazellen	69
3.6	IRAK-M unterdrückt die Produktion von Lupus-Autoantikörpern.....	71
3.7	IRAK-M schützt BL/6 ^{lpr/lpr} Mäuse vor autoimmuner Gewebsschädigung.....	77
3.8	IRAK-M-Defizienz erhöht die Sterblichkeit von BL/6 ^{lpr/lpr} -Mäusen	80
3.9	IRAK-M unterdrückt Autoimmunität durch Blockade der TLR7-Signalwege.....	81
4	Diskussion.....	86
4.1	Bedeutung von IRAK-M in systemischer Autoimmunität.....	86
4.2	Bedeutung von IRAK-M bei entzündlichen Erkrankungen des Menschen	91
4.3	Genetische Risikofaktoren des SLE	93
4.4	TLR-Inhibitoren als Ansatzpunkt therapeutischer Interventionen bei SLE.....	94

5	Zusammenfassung	97
6	Literaturverzeichnis	98
7	Abkürzungsverzeichnis	115
8	Danksagung	118

1 Einleitung

1.1 Systemischer Lupus erythematodes

Der Lupus erythematodes ist eine Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, die vorzugsweise das Bindegewebe befallen. Unter dem systemischen Lupus erythematodes (SLE), auch Lupus erythematodes disseminatus genannt, versteht man eine Systemerkrankung, bei der durch Bildung von Autoantikörpern und Ablagerung von Immunkomplexen, verbunden mit Vaskulitis und Perivaskulitis, zahlreiche Organe geschädigt werden. In Deutschland tritt der SLE mit einer Prävalenz von 50 Erkrankten pro 100.000 Einwohnern auf; Schwarze sind häufiger betroffen als Kaukasier. 90 % der Betroffenen sind Frauen jüngeren Alters [1].

Ätiologie und Pathogenese sind noch nicht vollständig geklärt. Man geht davon aus, dass das Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren zu fehlgeleiteten Immunreaktionen führt (Abbildung 1). Kennzeichnend für Autoimmunität ist ein Toleranzdefekt des Immunsystems. Normalerweise verhindern zahlreiche Toleranzmechanismen die Entstehung einer Autoimmunerkrankung. Dazu gehören beispielsweise die zentrale Deletion neu gebildeter autoreaktiver Lymphozyten in Thymus beziehungsweise Knochenmark, die periphere Anergie, also die Inaktivierung von Lymphozyten bei Fehlen von Costimulatoren, und regulatorische Zellen, die Lymphozyten unterdrücken [2]. Das Versagen dieser Mechanismen führt zum Verlust der Selbst-Toleranz, wodurch autoreaktive Lymphozyten persistieren und Autoantikörper gebildet werden. Zudem kommt es zum vermehrten Absterben von Zellen mit zugleich reduzierter Elimination dieser Zellen. Autoantikörper bilden mit Nukleinsäuren aus apoptotischen Zellen Immunkomplexe, die als endogene Liganden von Toll-like Rezeptor 7 (TLR7) beziehungsweise TLR9 erkannt werden [3, 4]. Dendritische Zellen, die zu den Antigen-präsentierenden Zellen gehören, erkennen Immunkomplexe über TLR7 und TLR9 und präsentieren sie autoreaktiven T-Zellen, woraufhin diese expandieren. Immunkomplexe können B-Zellen über TLR7 und TLR9 direkt aktivieren, was zur T-Zell-unabhängigen Proliferation, zur Differenzierung zu Plasmazellen und zur Produktion weiterer Autoantikörper und Immunkomplexe führt (Abbildung 1). Durch die Ablagerung der Immunkomplexe an Gefäßwänden und im Gewebe und die Aktivierung des Immunsystems mit vermehrter Freisetzung vasoaktiver Peptide, Komplementfaktoren, Chemokine, gewebescheidender Enzyme und proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$,

Interferone und Interleukine entwickelt sich eine chronische Entzündungsreaktion, die Blutgefäße, Haut, Glomeruli der Niere und zahlreiche andere Gewebe schädigt [5, 6].

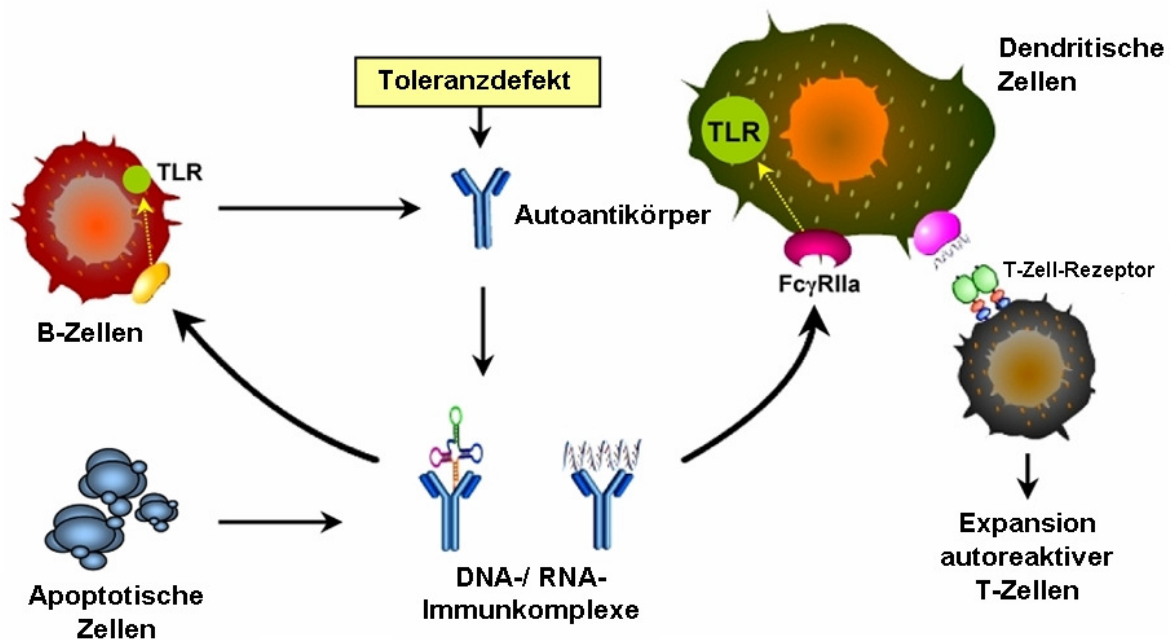


Abbildung 1: Pathophysiologie des systemischen Lupus erythematoses. Das Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren führt zum Verlust der Selbst-Toleranz und zu vermehrter Apoptose. Immunkomplexe aus Nukleinsäuren und Autoantikörpern aktivieren das Immunsystem und induzieren eine chronische Entzündung [5 (modifiziert)].

90 % der an SLE Erkrankten sind Frauen im gebärfähigen Alter. Ein Grund hierfür ist, dass Frauen generell eine höhere Antikörper-Produktion aufweisen als Männer. Östrogene binden an Rezeptoren der B- und T-Zellen, aktivieren diese und begünstigen so eine stärkere und länger andauernde Immunantwort [6]. Des Weiteren wird vermutet, dass ein Ungleichgewicht bei der zufälligen Inaktivierung eines X-Chromosoms bei Frauen für den Verlust von Toleranzmechanismen verantwortlich sein könnte [7]. Wenn die bei der negativen Selektion autoreaktiver Lymphozyten im Thymus beteiligten dendritischen Zellen vorzugsweise ein inaktiviertes paternales X-Chromosom aufweisen, werden die T-Lymphozyten im Thymus vor allem durch dendritische Zellen kontrolliert, die Autoantigene des maternalen X-Chromosoms exprimieren. So könnten autoreaktive T-Zellen, die für ein Autoantigen des paternalen X-Chromosoms spezifisch sind, der negativen Selektion entgehen und in die Peripherie gelangen.

Die genetische Prädisposition, einen SLE zu entwickeln, ist komplex und bislang noch nicht geklärt. Eine Vielzahl von genetischen Polymorphismen trägt jeweils einen kleinen Teil zu

einer abnormalen Immunantwort bei. Die Krankheit entsteht erst, wenn viele Variationen aufeinander treffen und durch Umweltfaktoren getriggert werden. Genetische Risikofaktoren betreffen unter anderen Defekte des Komplementsystems (C1, C2, C4), Clearance apoptotischen Materials (MBL), Antigen-Präsentation (HLA-DR2 und 3) und B-Zell-Reifung (IL-10) [8, 9, 10]. Umweltfaktoren, die zu der Entstehung des SLE beitragen, sind UV-Licht und Infektionen, zum Beispiel mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Beides geht mit Zelltod, Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen und damit vermehrter Präsentation von Autoantigenen einher [6, 11].

Es gibt mehrere immunologische Befunde, die für den SLE typisch, aber nicht unbedingt spezifisch sind. Autoantikörper und Entzündungszeichen lassen sich bei nahezu jedem Patienten nachweisen. Die wichtigsten Autoantikörper sind Antinukleäre Antikörper (ANA), Anti-dsDNA-Antikörper, Anti-Smith und Antiphospholipid-Antikörper. Antinukleäre Antikörper (ANA) sind zwar nicht SLE-spezifisch, aber bei 95 % der Betroffenen nachweisbar und sind damit bestens als Screening-Test geeignet. Anti-dsDNA sind Antikörper gegen doppelsträngige DNA. Sie sind spezifisch für SLE, finden sich zu etwa 70 % und korrelieren zum Teil mit der Krankheitsaktivität. Als Anti-Smith bezeichnet man Antikörper gegen U1snRNP, die bei 20 % der Erkrankten vorkommen und ebenfalls SLE-spezifisch sind. Zu den Antiphospholipid-Antikörpern gehören Anti-Cardiolipin-Antikörper und Anti- β 2-Glykoprotein1-Antikörper, die bei etwa 40 % der Betroffenen nachweisbar sind. Zudem weisen viele SLE-Patienten eine antikörperinduzierte Zytopenie auf, wobei Erythrozyten, Thrombozyten oder Leukozyten antikörperbedingt vermindert sind [1, 6].

Der SLE ist eine Systemerkrankung, die nahezu alle Organe befallen kann. Häufig sind die Beschwerden der Betroffenen unspezifisch und eine Diagnose daher oft schwierig. Meist treten zunächst Allgemeinbeschwerden wie Fieber, Müdigkeit und Leistungsschwäche sowie Muskel- und Gelenkschmerzen auf. Die häufigsten Organmanifestationen sind an Haut, Herz, Lunge, Niere und ZNS zu finden. Die Beteiligung von Herz, Niere und ZNS ist entscheidend für Morbidität und Mortalität der Erkrankten. Aber auch alle anderen Organe wie Gastrointestinaltrakt, Leber und Augen können befallen sein. Dabei sind die Krankheitsverläufe sehr variabel. Schwere Fälle mit Multiorganbeteiligung und erheblicher Morbidität kommen genauso vor wie ein kutaner Lupus erythematoses, der nicht systemisch verläuft, sondern nur die Haut befällt und eine günstige Prognose hat. Die häufigsten Symptome sind in Tabelle 1 aufgelistet [1].

Tabelle 1: Häufige Symptome des SLE.

Allgemeine Beschwerden	95 %	Fieber, Müdigkeit, Schwäche, Gewichtsverlust, Haarausfall, Lymphadenopathie
Muskel-/ Gelenkbeschwerden	> 80 %	Polyarthrit: Gelenkschmerzen und -entzündung, keine Erosionen, evtl. Subluxationen/ Fehlstellungen; Myositis
Hautveränderungen	> 70 %	Schmetterlingserythem an Wangen und Nasenrücken; Diskoider Lupus: Papeln mit Schuppenbildung und Hyperkeratose; Photosensibilität: Lichtempfindlichkeit der Haut, Hautrötung nach Sonnenlicht-Exposition; Orale und nasale Schleimhaut-Ulzerationen
Kardiopulmonale Beteiligung	60-70 %	Pleuritis, Perikarditis mit Ergüssen Endokarditis, Myokarditis, Lupus-Pneumonitis Arteriosklerose mit erhöhtem Myokardinfarkt-Risiko
Nierenbeteiligung	60-70 %	Lupusnephritis: Immunkomplex-Glomerulonephritis vielfältige glomeruläre Läsionen: fokal oder diffus bis hin zu fortgeschritten sklerosierend
Neurologische Veränderungen	60 %	Vielfältiges Bild von Vigilanzdefekten und Kopfschmerzen über Krampfanfälle und Depressionen bis hin zu Status epilepticus, Apoplex und Multiple Sklerose-ähnlichen Verläufen

Die Diagnose des SLE erfolgt mit Hilfe von 11 Kriterien, die vom American College of Rheumatology (ACR) entwickelt wurden (Tabelle 2). Liegen bei einem Patienten 4 von 11 Kriterien vor, so ist die Diagnose SLE wahrscheinlich, jedoch keineswegs sichergestellt. Deshalb stellen diese Kriterien keinen absoluten Maßstab für Diagnose und Therapie dar.

Table 2: SLE-Kriterien des ACR.

Schmetterlingserythem	Flaches oder erhabenes Erythem beider Wangen
Diskoide Hautläsion	Erythematöse Flecken mit keratotischer Schuppung und atrophischen Narben
Photosensibilität	Hauterscheinungen nach Sonnenlicht-Exposition
Ulzerationen	Orale oder nasale Schleimhautulzera
Arthritis	Nichterosive Arthritis von 2 oder mehr Gelenken
Serositis	Pleuritis, Perikarditis
Nierenerkrankung	Proteinurie > 0,5 g/d oder Zylindrurie (Erythrozyten, Hämoglobin)
ZNS-Erkrankung	Krampfanfälle, Psychosen
Hämatologische Befunde	Hämolytische Anämie, Thrombozytopenie (< 100.000/ μ l), Lymphozytopenie (< 1.500/ μ l) oder Leukozytopenie (< 4.000/ μ l)
Immunologische Befunde	Anti-dsDNA-Antikörper, Anti-Smith-Antikörper und/oder Anti-Phospholipid-Antikörper
Antinukleäre Antikörper (ANA)	Nicht medikamentös induzierte Titer-Erhöhung

Die Therapie des SLE besteht aus Linderung der Symptome in Kombination mit Immunsuppression. Symptomatisch werden konsequenter Lichtschutz und nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR) empfohlen. Als Immunsuppressiva werden unter anderen Kortikosteroide, Azathioprin und Cyclophosphamid eingesetzt. Heilbar ist der Lupus erythematodes noch immer nicht. Zudem geht die unspezifische immunsuppressive Therapie mit erheblichen Nebenwirkungen wie tödliche Infektionen und Infertilität einher.

Dennoch ist die Prognose des SLE heute recht gut. Bei höchst unterschiedlichen Krankheitsverläufen beträgt die 10-Jahres-Überlebensrate 90 %. Häufigste Todesursachen sind Myokardinfarkt als Endpunkt einer kardiovaskulären Beteiligung, Nierenversagen in Folge einer Lupus-Nephritis sowie neurologische und septische Komplikationen [1].

1.2 Immunsystem

Jedes Individuum, ob Mensch oder Tier, ist ständig infektiösen Organismen ausgesetzt. Es ist die Aufgabe des Immunsystems, Krankheitserreger zu erkennen und zu eliminieren. Dazu muss es körpereigene von körperfremden und schädliche von harmlosen Antigenen unterscheiden und Pathogene effektiv beseitigen können. Das Immunsystem besteht aus dem angeborenen (Antigen-unspezifischen) und dem erworbenen (Antigen-spezifischen) Immunsystem, wobei beide eng miteinander verknüpft sind. Das angeborene Immunsystem ist entwicklungsgeschichtlich älter und findet sich auch in Pflanzen, Pilzen und Insekten. Es ist für die erste Abwehr von eindringenden Krankheitserregern zuständig. Wichtige Effektorzellen sind Makrophagen, neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen und natürliche Killerzellen. Diese Zellen sorgen für die Phagozytose von Pathogenen, können eine Entzündungsreaktion induzieren und eine spezifische Immunantwort auslösen. Das erworbene Immunsystem hingegen ist durch eine spezifische Pathogenerkennung gekennzeichnet. Die zentralen Effektorzellen sind B- und T-Lymphozyten. Das erworbene Immunsystem bekämpft Infektionen erst in späteren Phasen, kann Pathogene jedoch mittels von B-Zellen produzierten Antikörpern, T-Helfer- und zytotoxischen T-Zellen gezielter angreifen. Zudem zeichnet es sich durch ein immunologisches Gedächtnis aus, das den Organismus vor erneuten Infektionen mit dem gleichen Erreger schützt [2, 12].

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem stellt die erste Station in der Abwehr von Krankheitserregern dar. Die Komponenten des angeborenen Immunsystems sind in Tabelle 3 aufgelistet.

Table 3: Komponenten des angeborenen Immunsystems.

Anatomische Barrieren

- Mechanisch: Epithelien, Haut, Tränen, Speichel, Peristaltik des Gastrointestinaltrakts
- Chemisch: Fettsäuren im Schweiß
Lysozym und Phospholipase in Tränen, Speichel und Nasalsekret
niedriger pH von Schweiß und Magensekret
- Biologisch: Konkurrenz der Normalflora von Haut und Gastrointestinaltrakt mit pathogenen Keimen

Humorale Barrieren

- Komplementsystem, Blutgerinnung, Interferone, Interleukine

Lösliche Mediatoren

- Pentraxine, Collectine, Defensine, Opsonine

Pattern Recognition Rezeptoren

- Mannose-Rezeptor, Scavenger-Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren, Fc-Rezeptoren, Toll-like Rezeptoren

Intrazelluläre Faktoren

- Endosomale Toll-like Rezeptoren (TLRs)
Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren (NLRs)
Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like Rezeptoren (RLRs)

Zelluläre Mechanismen

- Phagozyten
-

Über die angeborene Immunantwort verfügen alle mehrzelligen Organismen. Als mechanische, chemische und biologische Barriere verhindern zunächst die Körperepithelien das Eindringen von Pathogenen. Haut, epitheliale Oberflächen, Lysozym in Tränen und Speichel, Magensäure und die normale bakterielle Besiedelung von Haut und Gastrointestinaltrakt sorgen dafür, dass die meisten Erreger gar nicht erst in das Körperinnere gelangen. Versagt dieser Abwehrmechanismus, versuchen Phagozyten und das Komplementsystem, die eingedrungenen Erreger zu beseitigen. Für die Phagozytose sind im Blut die neutrophilen Granulozyten und im Gewebe Makrophagen zuständig (Abbildung 2).

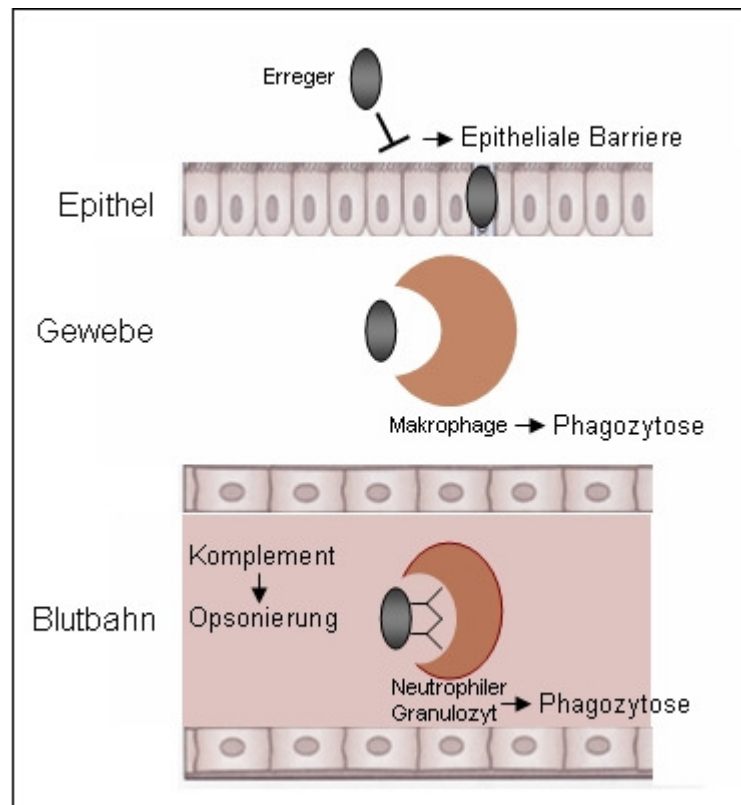


Abbildung 2: Sofortreaktion des angeborenen Immunsystems. Epithelien schützen den Organismus auf mechanische, chemische und biologische Weise vor dem Eindringen von Krankheitserregern. Gelangt dennoch ein Pathogen in das Gewebe, versuchen die gewebständigen Phagozyten, die Makrophagen, den Erreger abzutöten. Dringt dieser in die Blutbahn ein, erfolgt mit Hilfe des Komplementsystems die Phagozytose durch neutrophile Granulozyten [12 (modifiziert)].

Neben der Phagozytose ist eine weitere Aufgabe der Makrophagen, Signale weiterzuleiten und eine Entzündungsreaktion zu induzieren. Aktivierte Toll-like Rezeptoren auf phagozytierenden Makrophagen bewirken eine Ausschüttung diverser Zytokine und Chemokine, insbesondere $\text{TNF-}\alpha$, Interleukine und proinflammatorische Lipidmediatoren. Diese verursachen eine Vasodilatation und erhöhen die Permeabilität der Gefäßwände, sodass Flüssigkeit, Komplementfaktoren und andere Plasmaproteine in das Gewebe gelangen. So entsteht das klassische Bild der Entzündung mit Rötung, Erwärmung, Schwellung und Schmerz. Chemokine mobilisieren zudem Granulozyten und andere Effektorzellen, die aus dem Blut in das Gewebe einwandern und Erreger auf unterschiedliche Art abtöten können, beispielsweise durch Sauerstoffradikale (Abbildung 3).

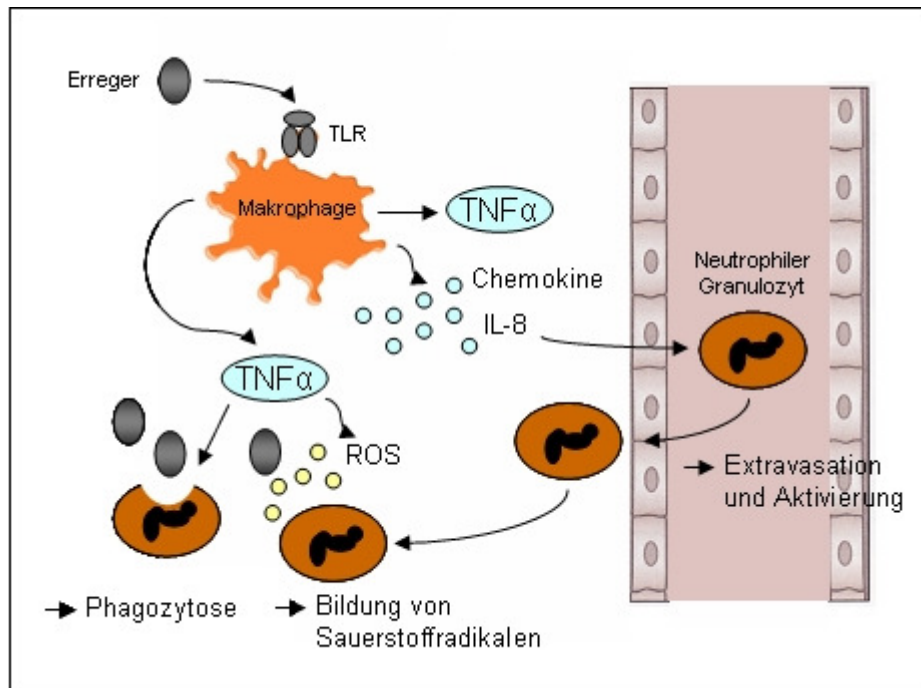


Abbildung 3: Induzierte Mechanismen des angeborenen Immunsystems. Die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) auf Phagozyten führt zur Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen. Diese induzieren eine Entzündungsreaktion und bewirken die Einwanderung weiterer Effektorzellen, die die eingedrungenen Erreger durch Phagozytose und Freisetzung verschiedener mikrobizider Faktoren wie beispielsweise Sauerstoffradikale (reactive oxygen species, ROS) abtöten [12 (modifiziert)].

Neben den Phagozyten sind natürliche Killerzellen (NK-Zellen) weitere Effektorzellen der angeborenen Immunantwort. Sie sind für die Abwehr von intrazellulären Erregern wie Viren zuständig. Daneben leistet auch das Komplementsystem einen Beitrag zur Bekämpfung von Krankheitserregern. Es unterstützt durch Opsonierung eine wirksame Phagozytose und Lyse von Mikroorganismen, fördert aber auch die Antikörperproduktion der erworbenen Immunabwehr [2, 12].

Das angeborene Immunsystem kann Krankheitserreger nicht spezifisch bekämpfen und hat deshalb nicht das Ziel, jedes mögliche Antigen zu erkennen. Die Strategie der angeborenen Immunantwort ist vielmehr die Erkennung von Strukturmustern, die sich auf der Oberfläche einer großen Gruppe verschiedener Mikroorganismen befinden, so genannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs). Diese Strukturen sind sich regelmäßig wiederholende Muster, die gleichzeitig auf vielen verschiedenen Mikroben vorkommen, sodass unterschiedliche Erreger durch eine begrenzte Menge an Rezeptoren erkannt werden. Pathogen-assoziierte Patterns sind beispielsweise bakterielle und virale Bestandteile wie Lipopolysaccharid, Peptidoglykane und doppelsträngige RNA. Sie werden in der Regel nur von Mikroorganismen produziert, nicht aber von Wirtszellen. So kann zwischen „eigen“ und „fremd“ unterschieden werden. Die Rezeptoren, die PAMPs erkennen und eine

Immunantwort induzieren, bezeichnet man als *pattern recognition receptors* (PRRs). Sie sind in der genomischen DNA kodiert und werden auf allen Zellen exprimiert. PRRs umfassen lösliche Rezeptoren, Rezeptoren an der Zelloberfläche und intrazelluläre Rezeptoren, sodass sie Mikroorganismen in allen intra- und extrazellulären Kompartimenten erkennen können (Abbildung 4) [13].

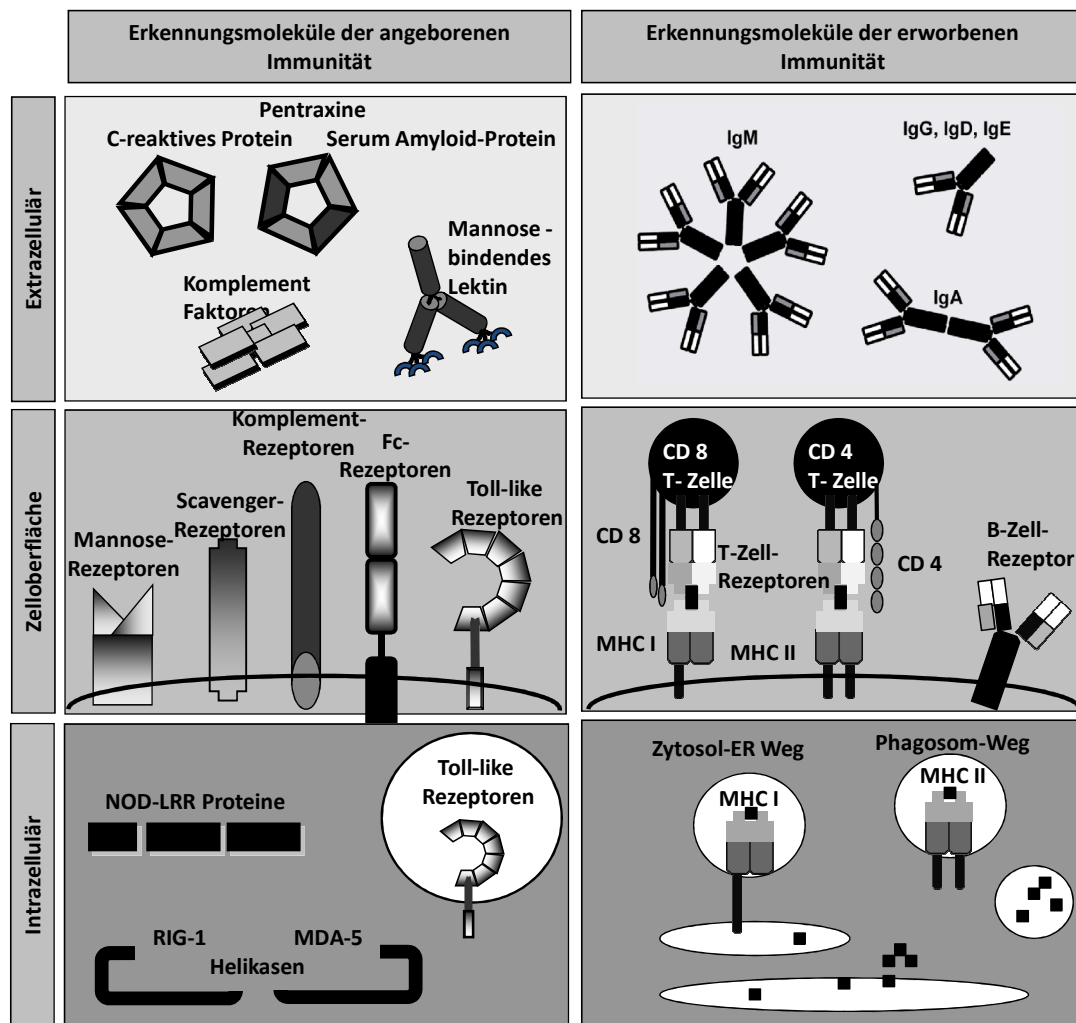


Abbildung 4: Mustererkennungsstrukturen des erworbenen und angeborenen Immunsystems.

Zu den Pathogen-Erkennungsrezeptoren gehören *Toll-like Rezeptoren* (TLRs), *Retinoic acid-inducible gene-I (RIG-I)-like Rezeptoren* (RLRs) und *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren* (NLRs). Sie werden in verschiedenen Zellkompartimenten exprimiert, erkennen verschiedene PAMPs und aktivieren spezifische Signalwege [13]. TLRs sind Transmembranproteine, finden sich sowohl an der Zelloberfläche als auch endosomal und erkennen eine große Spannbreite an PAMPs, von Lipiden über Glykane und Proteine bis hin zu Nukleinsäuren.

RLRs gehören zur Familie der RNA-Helikasen und sind im Zytosol lokalisiert. Ihre Aufgabe ist im Besonderen die Erkennung intrazellulär produzierter viraler RNA. Ihre Signalkaskade resultiert in der Aktivierung von NF- κ B und IRF-3 und führt zur Produktion antiviraler Proteine wie Interferon. Zu dieser Gruppe gehören *Retinoic acid inducible gene 1* (RIG-I), *melanoma differentiation associated gene 5* (MDA5) und *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2) [14].

NLRs bilden eine große Gruppe intrazellulär gelegener PRRs, deren bekannteste Vertreter NOD1, NOD2, NALP3 und NAIP5 sind. Ihre Liganden sind vor allem bakterielle Bestandteile im Zytosol. Alle der über 20 bislang bekannten Rezeptoren dieser Familie besitzen eine Leucin-reiche Domäne, die für die Erkennung mikrobieller Bestandteile verantwortlich ist [15, 16]. NOD-1 und NOD-2 binden Peptidoglykane, NAIP5 erkennt Flagellin [17].

1.2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem, auch adaptive Immunabwehr genannt, ist komplex und wird hier nur grob zusammengefasst dargestellt. Es zeichnet sich durch eine hohe Spezifität der Pathogenerkennung aus. Diese beruht auf Antigen-spezifischen Rezeptoren, die auf der Oberfläche von T- und B-Lymphozyten exprimiert werden. Diese Rezeptoren werden durch Rearrangement einer Vielzahl verschiedener Gensegmente gebildet, sodass jeder Lymphozyt einen strukturell einzigartigen Rezeptor hat. Trifft ein Lymphozyt auf „sein“ Antigen, beginnt er zu proliferieren. Die adaptive Immunantwort greift daher erst in der späteren Phase der Abwehr ein. Effektorzellen der erworbenen Immunabwehr sind B- und T-Lymphozyten. Man unterscheidet zwischen CD8-positiven zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen abtöten, und CD4-positiven T-Helferzellen, die B-Zellen aktivieren. Die humorale Immunantwort wird durch Antikörper (Immunglobuline) vermittelt, die von B-Zellen produziert werden. Immunglobuline binden spezifisch ihr Antigen, wodurch Immunkomplexe entstehen. Diese werden von Makrophagen und neutrophilen Granulozyten erkannt und phagozytiert.

Ein Teil der proliferierenden Lymphozyten differenziert zu Gedächtniszellen und bildet das so genannte immunologische Gedächtnis aus, das bei einem erneuten Eindringen der Erreger eine schnellere und wirksamere Abwehrreaktion ermöglicht [2].

1.3 Die Toll-like Rezeptor / Interleukin-1 Rezeptor Superfamilie

Toll-like Rezeptoren (TLR) bilden eine Familie von Rezeptoren des angeborenen Immunsystems, deren Funktion die Erkennung eindringender Pathogene ist. TLRs sind evolutionär konserviert und finden sich von Pflanzen über Insekten bis hin zu Säugetieren. In der Fruchtfliege, *Drosophila melanogaster*, wurde erstmals 1985 das Protein Toll entdeckt, das eine wichtige Komponente in der Abwehr von Pilzinfektionen ist. Wegen der Strukturähnlichkeit wurde Toll zum Namensgeber der TLR-Familie in Säugetieren [18, 19]. Das erste Homolog des Toll-Rezeptors wurde 1997 entdeckt und ist heute als TLR4 bekannt [20]. Bisher wurden 13 TLRs identifiziert; 10 beim Menschen (TLR1-10) und 12 in Mäusen (TLR1-9 und 11-13). Die Toll-like Rezeptoren 3, 7, 8 und 9 sind endosomal lokalisiert, alle anderen befinden sich an der Zelloberfläche.

Bei einer Infektion durch Mikroben wird das angeborene Immunsystem rasch durch Rezeptoren aktiviert, die entweder *pathogen-associated molecular patterns* erkennen oder das Signal proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. Interleukin-1 (IL-1), TNF- α und Interleukin-18 (IL-18), weiterleiten [21]. Die Toll-like Rezeptor / Interleukin-1 Rezeptor (TLR / IL-1R) Superfamilie kann als Antwort auf beide Arten von Stimuli, sowohl Mikroorganismen als auch Zytokine, eine Entzündungsreaktion auslösen [22].

1.3.1 Toll-like Rezeptoren, Interleukin-1 Rezeptoren und ihre Liganden

TLRs und IL-1Rs sind integrale Typ I- Membranproteine, deren intrazelluläre Domänen homolog sind und als Toll / IL-1R (TIR)-Domänen bezeichnet werden [23, 24]. Die einzelnen Mitglieder der TLR / IL-1R Familie unterscheiden sich in der Struktur ihrer extrazellulären Domäne. Die hufeisenförmige extrazelluläre Domäne der TLRs, die Leucin-reiche Motive enthält, bindet bestimmte PAMPs und kann so mikrobielle Pathogene erkennen. PAMPs umfassen bakterielle und virale Nukleinsäuren (erkannt von TLR3, 7, 8, 9), Bestandteile der bakteriellen Zellwand wie beispielsweise Lipopolysaccharid (TLR4) und Peptidoglykan (TLR2) sowie virale Hüllproteine (TLR2, 4) und Bestandteile der Pilzzellwand (TLR2, 4). Die Liganden der Toll-like Rezeptoren 10, 12 und 13 sind bislang noch unbekannt. Tabelle 4 zeigt die bisher identifizierten TLRs und die von ihnen erkannten PAMPs [22, 25, 26].

Table 4: Toll-like Rezeptoren und ihre Liganden.

Toll-like Rezeptor	Ligand / PAMP	Pathogen
TLR1 / TLR2 (Heterodimer)	Triacyl-Lipopeptide	Bakterien, Mykobakterien
TLR2	Peptidoglykan	Alle Bakterien (Zellwand)
	Lipoteichonsäure	Gram-positive Bakterien
	Lipoarabinomannan	Mykobakterien
	Porine	Neisserien
	Glykolipide	Treponemen
	Glykophospholipide	Trypanosomen
	Hämagglutinin	Masern-Virus (Hüllprotein)
	Zymosan	Pilze (Zellwand)
	Phospholipomannan	Candida (Zellwand)
TLR3	Doppelsträngige RNA	Viren
TLR4	Lipopolysaccharide	Gram-negative Bakterien
	HSP60	Chlamydien
	RSV-Hüllprotein	Respiratory-Syncytial-Virus
	MMTV-Hüllprotein	Maus-Mammatumovirus
	Mannan	Candida (Zellwand)
TLR5	Flagellin	Bakterien
TLR6 / TLR2 (Heterodimer)	Diacyl-Lipopeptide	Mykoplasmen
TLR7	Einzelsträngige RNA	Viren
	Imidazoquinoline	Viren
TLR8	Einzelsträngige RNA	Viren
TLR9	CpG DNA	Bakterien, Viren
TLR11	Profilin	Uropathogener E. coli

Toll-like Rezeptoren spielen eine wesentliche Rolle bei der Erkennung von PAMPs und der initialen Immunantwort. Des Weiteren erkennen sie aber auch endogene Liganden, also Liganden, die nicht von Mikroorganismen, sondern vom Organismus selbst stammen (Tabelle 5). Diese Liganden werden aus geschädigten, apoptotischen und nekrotischen Zellen sowie entzündeten Geweben freigesetzt und daher als *damage-associated molecular patterns*

(DAMPs) bezeichnet. DAMPs umfassen Moleküle aus der extrazellulären Matrix wie Heparansulfat und Hyaluronsäure und intrazelluläre Moleküle wie Hitzeschockproteine und Fibrinogen, die aus geschädigten oder toten Zellen freigesetzt werden [27-30]. Endogene Nukleinsäuren gehören ebenfalls zu den DAMPs [3, 31]. Die Erkennung von DNA, RNA und Immunkomplexen aus Autoantikörpern und -antigenen durch TLRs spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie dem Lupus erythematoses [32].

Tabelle 5: Endogene Liganden der Toll-like Rezeptoren.

Toll-like Rezeptor	Endogener Ligand / DAMP	Herkunft
TLR2	Hitzeschockproteine	Zellschaden
TLR3	mRNA dsRNA	Nekrotische Zellen
TLR4	Hitzeschockproteine Fibrinogen Fibronectin Heparansulfat Hyaluronsäure LDL (low density lipoprotein) Biglycan	Zellschaden, nekrotische Zellen
TLR7	RNA/ RNA-Immunkomplexe	Autoantikörper apoptotische/ nekrotische Zellen
TLR9	DNA/ DNA-Immunkomplexe	Autoantikörper apoptotische/ nekrotische Zellen

Im Gegensatz zu den TLRs enthält der extrazelluläre Teil der Interleukin-1 Rezeptoren Immunglobulin-Domänen und bindet verschiedene Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β und IL-18. IL-1 aktiviert die Expression von MIP-2, KC und C-reaktivem Protein, während IL-18 zur Aktivierung von NK-Zellen und Th1-Zellen beiträgt. Die IL-1 Rezeptor Familie umfasst IL-1 Rezeptoren, IL-18 Rezeptoren und Rezeptoren, deren Liganden bislang noch unbekannt sind (Tabelle 6) [33].

Table 6: Die Familie der Interleukin-1 Rezeptoren.

IL-1 Rezeptoren	IL-1RI IL-1RAcP (<i>IL-1R Accessory protein</i>) IL-1RII
IL-18 Rezeptoren	IL-18R α und IL-18R β IL-18BP (<i>IL-18 binding protein</i>)
IL-33 Rezeptoren	T1/ST2
Andere IL-1R-ähnliche Rezeptoren (Ligand unbekannt)	SIGIRR (<i>single Ig IL-1 receptor-related molecule</i>) TIGIRR (<i>three Ig domain-containing IL-1R-related</i>) IL-1RAPL (<i>IL-1 receptor accessory protein-like</i>) IL-1Rrp2 (<i>IL-1 receptor-related protein-2</i>)

1.3.2 Signaltransduktion

Die zu den Toll-like Rezeptoren homologe intrazelluläre TIR-Domäne leitet das Signal der an die extrazelluläre Domäne bindenden Liganden weiter und stößt eine intrazelluläre Signalkaskade an. Die TIR-Domäne enthält ein zentrales fünfsträngiges paralleles Beta-Faltblatt, das auf beiden Seiten von fünf Helices umgeben wird [34]. Diese Domäne ist entscheidend für die Signaltransduktion aller TLRs / IL-1Rs, die eine Signalübertragung in das Zellinnere nach Erkennung eines spezifischen Liganden vermitteln. Sowohl für die Homo- oder Heterodimerisierung der Rezeptoren als auch für die Ausbildung des Signalkomplexes zwischen Rezeptor und Adaptermolekülen ist die TIR-Domäne essentiell [35]. Eine Mutation einer einzigen Aminosäure in der TIR-Domäne kann zu einem Verlust der Signaltransduktion führen [34, 36]. Mit Ausnahme von TLR2 bilden alle TLRs Homodimere und beginnen so die Signaltransduktion. TLR2 bildet Heterodimere mit TLR1 oder TLR6. Manche Rezeptoren formen Komplexe mit Co-Rezeptoren; TLR4 beispielsweise benötigt für die LPS-Bindung MD-2, CD14 und LPS binding protein (LBP).

Erkennen TLRs PAMPs, beginnt die Signalkaskade. TLRs aktivieren Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, Interferon Regulatory Factor (IRF)3, IRF5 und IRF7, die die Expression immunregulatorischer Gene erhöhen, und die freigesetzten Zytokine, Chemokine und Interferone tragen zu einer effektiven Immunantwort bei. Bisher wurden fünf Adaptermoleküle identifiziert, die allesamt eine TIR-Domäne enthalten. Vier davon sind für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verantwortlich, nämlich *Myeloid Differentiation*

Faktor 88 (MyD88), TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN β (TRIF), TRIF related adaptor molecule (TRAM) und TIR domain containing adaptor protein (TIRAP), auch als *MyD88-adaptor-like (Mal)* bezeichnet. MyD88 und TIRAP sind verantwortlich für die Induktion der proinflammatorischen Gene, TRIF und TRAM für die Induktion der Interferone [37, 38, 39]. Das fünfte Adaptermolekül, *sterile alpha and TIR motif containing (SARM)*, ist ein spezifischer negativer Regulator des TRIF-Signalwegs [40]. Weitere Signalmoleküle der TLR / IL-1R Superfamilie sind *TNF Receptor Associated Factors (TRAFs)* und *Interleukin-1 receptor-associated kinases (IRAKs)* [25, 41]. Die Mitglieder der TLR- und IL-1R-Familien bedienen sich gleicher intrazellulärer Signalwege, unterscheiden sich jedoch in der Struktur ihrer Extrazellulärdomänen. Die Aktivierung von TLRs bedingt die Translokation von NF- κ B in den Zellkern, was zur Transkription von Genen führt, die für Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und antimikrobielle Peptide kodieren. IL-1Rs aktivieren die Transkriptionsfaktoren NF- κ B, ATF und AP-1 [42]. Am IL-1R Signalweg sind das Adaptermolekül MyD88, IRAK-4, IRAK-1, TRAF6 und viele andere beteiligt [43-47]. Im Gegensatz zum IL-1R Signalweg kann die TLR-Aktivierung zwei Signalwege induzieren, einen MyD88-abhängigen und einen MyD88-unabhängigen. Die Signalkaskade aller TLRs mit Ausnahme von TLR3 führt über MyD88; TLR3 benötigt das Adapterprotein TRIF. TLR4 kann die Signalkaskade über beide Adaptermoleküle anstoßen [48]. Beide Wege führen letztendlich zur Produktion proinflammatorischer Zytokine und Interferone (Abbildung 5).

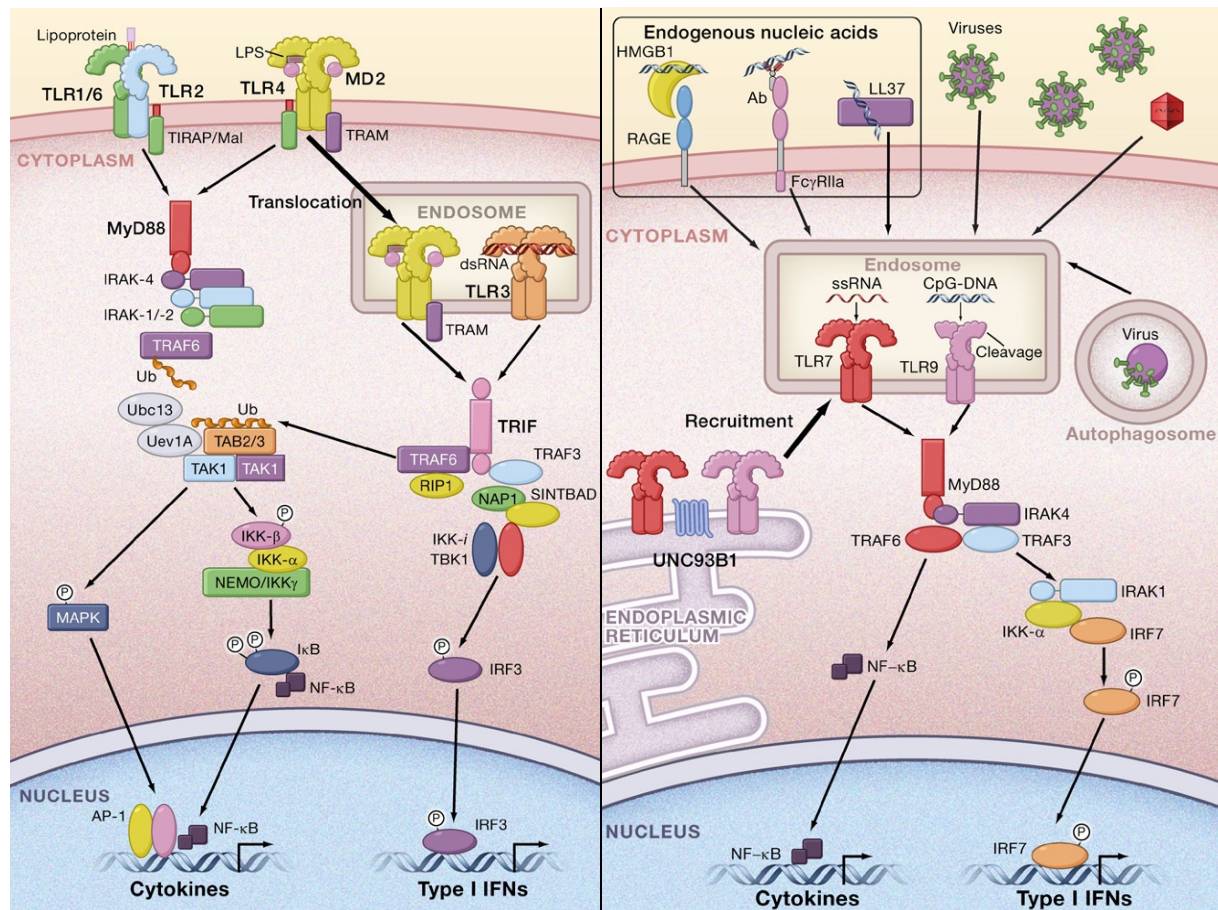


Abbildung 5: Signalwege der Toll-like Rezeptoren. TLRs erkennen ihre Liganden und leiten das Signal über die Adaptermoleküle Myeloid Differentiation Faktor 88 (MyD88), TIR-domain containing adaptor protein inducing IFN β (TRIF), TRIF related adaptor molecule (TRAM) und TIR domain containing adaptor protein (TIRAP) weiter. Über den Transkriptionsfaktor NF κ B führt die Signalkaskade zu einer vermehrten Freisetzung inflammatorischer Zytokine beziehungsweise über IRF3 zu einer vermehrten Expression von Interferonen [13].

1.3.3 Regulation

Überschießende Immunreaktionen mit übermäßiger Freisetzung von Zytokinen können den körpereigenen Geweben und Organen Schaden zufügen. Eine feine Regulation der von TLRs/IL-1Rs vermittelten Immunantwort ist daher von großer Bedeutung.

Es gibt für TLRs/IL-1Rs verschiedene Regulationsmechanismen auf unterschiedlichen Ebenen (Abbildung 6). Als membranständige negative Regulatoren fungieren die Rezeptoren IL-1RII, T1/ST2 und IL-18BP [49]. IL-1RII kann als Transmembranmolekül oder als freier Rezeptor im Zytosol vorliegen, formt einen Komplex mit IL-1RAcP und bindet an IL-1, womit die Interaktion mit dem Rezeptorkomplex verhindert wird [50]. T1/ST2, als dessen Ligand IL-33 identifiziert wurde, bindet an die Adaptermoleküle MyD88 und TIRAP und

inhibiert so die Signalkaskade über IL-33 [51, 52]. IL-18BP, ein potenter Inhibitor von IL-18, ähnelt in Struktur und Funktion IL-1RII [52]. Auch auf der intrazellulären Ebene gibt es Mechanismen, die das TLR / IL-1R Signalling inhibieren. Die Funktion eines negativen Regulators üben unter vielen anderen der Rezeptor SIGIRR, das Enzym Triad3A, das Zytokin SOCS-1 und die Signaltransduktionsmoleküle IRAK-2 und MyD88s aus [53]. SIGIRR, auch als *Toll IL-1R8* (TIR8) bekannt, ist ein Mitglied der IL-1R-Familie, dessen Ligand bislang noch unbekannt ist. SIGIRR bildet einen Komplex mit T1/ST2 und unterbricht den von IL-33 vermittelten Signalweg [54]. Über die Regulierung von Ubiquitinierung und Proteolyse moduliert Triad3A die TLR-Signalwege [55]. MyD88s, eine Spleißvariante von MyD88, inhibiert die IL-1R / TLR-Signaltransduktion, indem es die Rekrutierung von IRAK-4 verhindert [56]. Darüber hinaus wurden einige lösliche TLRs als Inhibitoren der TLR-Signalwege identifiziert, zum Beispiel *soluble TLR2* (sTLR2) und sTLR4 [53]. IRAK-M ist ebenfalls ein negativer Regulator [57].

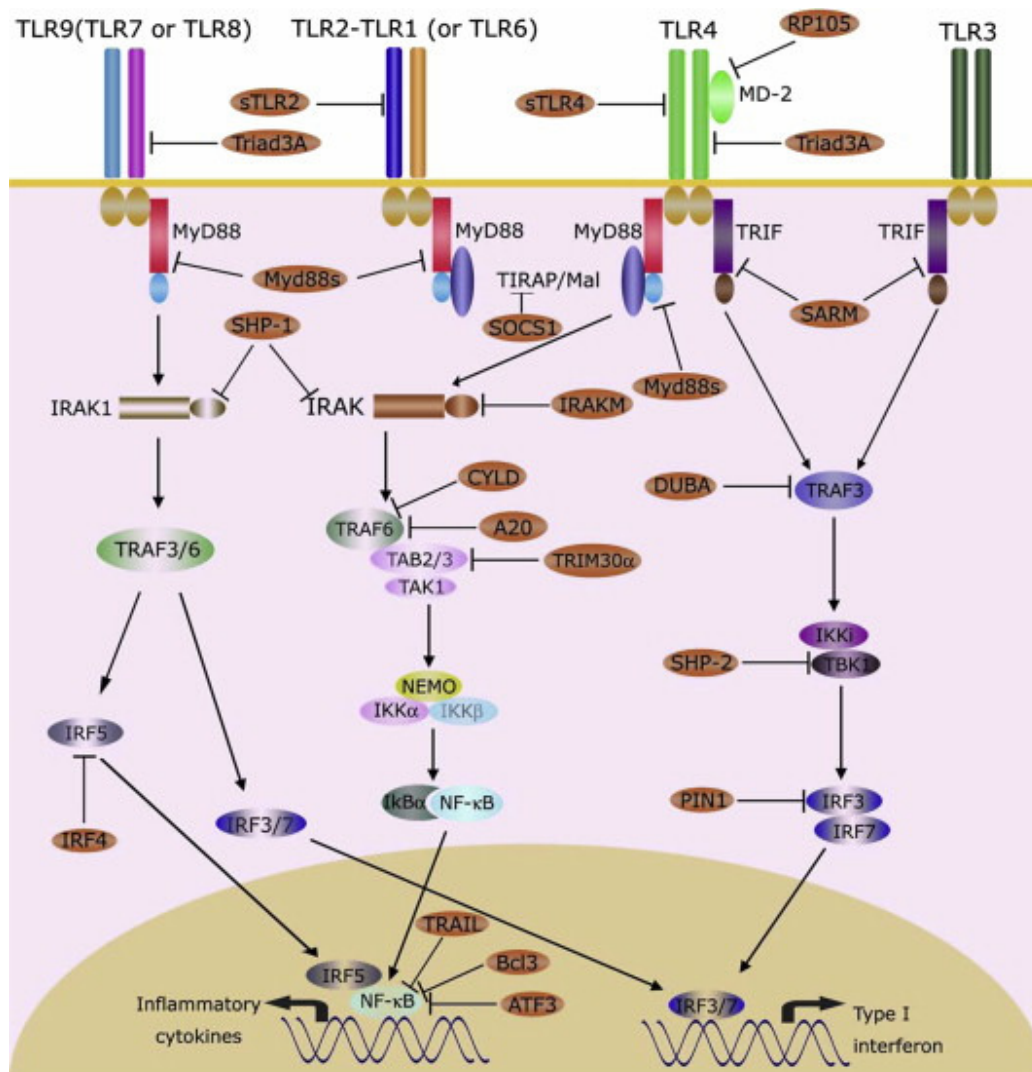


Abbildung 6: Negative Regulatoren der TLR-Signalwege und ihre Zielstrukturen [53].

Insgesamt existiert eine enorme Vielzahl von Molekülen und Mechanismen, die auf unterschiedlichen Ebenen an der negativen Regulation der TLR / IL-1R-Signaltransduktion beteiligt sind. Das Spektrum der Wirkungsweisen reicht dabei von Degradation oder Destabilisierung von Adaptermolekülen sowie anderen Faktoren der Signaltransduktion und deren Deubiquitinylierung bis zu kompetitiver Hemmung [53]. Dies alles sorgt dafür, dass die von TLRs / IL-1Rs vermittelte Immunantwort in geregelten Bahnen verläuft und eine überschießende Immunreaktion mit der Gefahr von Gewebeschädigung durch chronische Entzündung und der Entstehung von Autoimmunerkrankungen verhindert wird.

1.4 Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase-M

Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase-M (IRAK-M), auch bekannt als IRAK-3, wurde erstmals im Jahr 1999 in einer EST-Datenbank-Suche nach bislang unbekanntem Signalmolekülen der TLR / IL-1R-Signalwege, deren Sequenzen ähnlich zu IRAK-1 sind, identifiziert [58]. Der Sequenzvergleich von humanem IRAK-M und IRAK-1 zeigt eine Übereinstimmung von 35 %. Das humane IRAK-M-Gen liegt auf Chromosom 12 an der Position 12q14.1-12q15 und kodiert für ein Protein mit 596 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 68 kDa [58, 59]. Im Jahr 2002 wurde das murine Homolog identifiziert, indem die murinen EST-Datenbanken nach Sequenzen durchsucht wurden, die ähnlich zu humanem IRAK-M sind [60]. Man fand ein Protein mit 609 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 68 kDa, das auf Chromosom 10 kodiert ist. Murines und humanes IRAK-M zeigen eine Sequenz-Übereinstimmung von 71 %, haben gleich strukturierte Domänen und bedienen sich gleicher Signalkaskaden [60]. Biologisch aktives IRAK-M wird hauptsächlich in den Leukozyten des Bluts exprimiert, in Monozyten und Zellen monomyeloischen Ursprungs, weswegen der Name IRAK-M gewählt wurde. Es konnte aber auch in Zellen nichtmyeloischen Ursprungs, beispielsweise in Gallengangs- und Alveolarepithelzellen nachgewiesen werden [61, 62]. Humanes IRAK-M findet sich nur gering in Milz, Lunge und Herz und gar nicht in Niere, Thymus, Leber, Dünndarm und Gehirn [58]. Dagegen konnte mRNA von murinem IRAK-M in allen untersuchten Geweben, nämlich Milz, Niere, Gehirn, Herz, vor allem aber Leber und Thymus nachgewiesen werden [60]. IRAK-M wird in humanen Monozyten konstitutiv exprimiert und nach Stimulation aus dem Zellkern ausgeschleust [63].

Alle vier bekannten IRAKs sind Proteine, die aus einer N-terminalen Death-Domäne und einer zentralen Kinase-Domäne bestehen [64]. Die Death-Domäne ist für die Interaktion mit

anderen Proteinen zuständig und sorgt für die Bindung der IRAKs an das Adaptermolekül MyD88 [59]. Die Kinase-Domäne enthält eine ATP-Bindungsstelle, wobei jedoch nur IRAK-1 und IRAK-4 katalytische Aktivität aufweisen. IRAK-M zeigt nur eine äußerst schwache Kinase-Aktivität.

IRAK-M ist ein negativer Regulator der TLR-Signalwege [57]. IRAK-M ^{-/-} Makrophagen produzieren nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden wie Peptidoglykan (TLR2), LPS (TLR4) und CpG (TLR9) signifikant höhere Zytokin-Spiegel und IRAK-M ^{-/-} Mäuse entwickeln nach Infektion mit Gram-negativen Bakterien sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine deutlich stärkere Entzündungsreaktion [57].

IRAK-M inhibiert die MyD88-abhängigen TLRs, also alle TLRs mit Ausnahme von TLR3. IRAK-M blockiert die TLR-Signalwege, indem es die Dissoziation von IRAK-1 und IRAK-4 vom Adaptermolekül MyD88 verhindert. Dadurch kann IRAK-1 nicht phosphoryliert und der IRAK-TRAF6-Komplex nicht gebildet werden. Somit unterbricht IRAK-M die Signalkaskade von den TLRs über MyD88, IRAK-1/-4 und das Adapterprotein TRAF6 hin zu dem *Transforming Growth Factor- β -activated kinase 1* (TAK1) / *TAK1 binding protein* (TAB1) / TAB2-Komplex, der IKK α/β und MAPKK aktiviert, was letztendlich zu der Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und MAPK führt [59] (Abbildung 7).

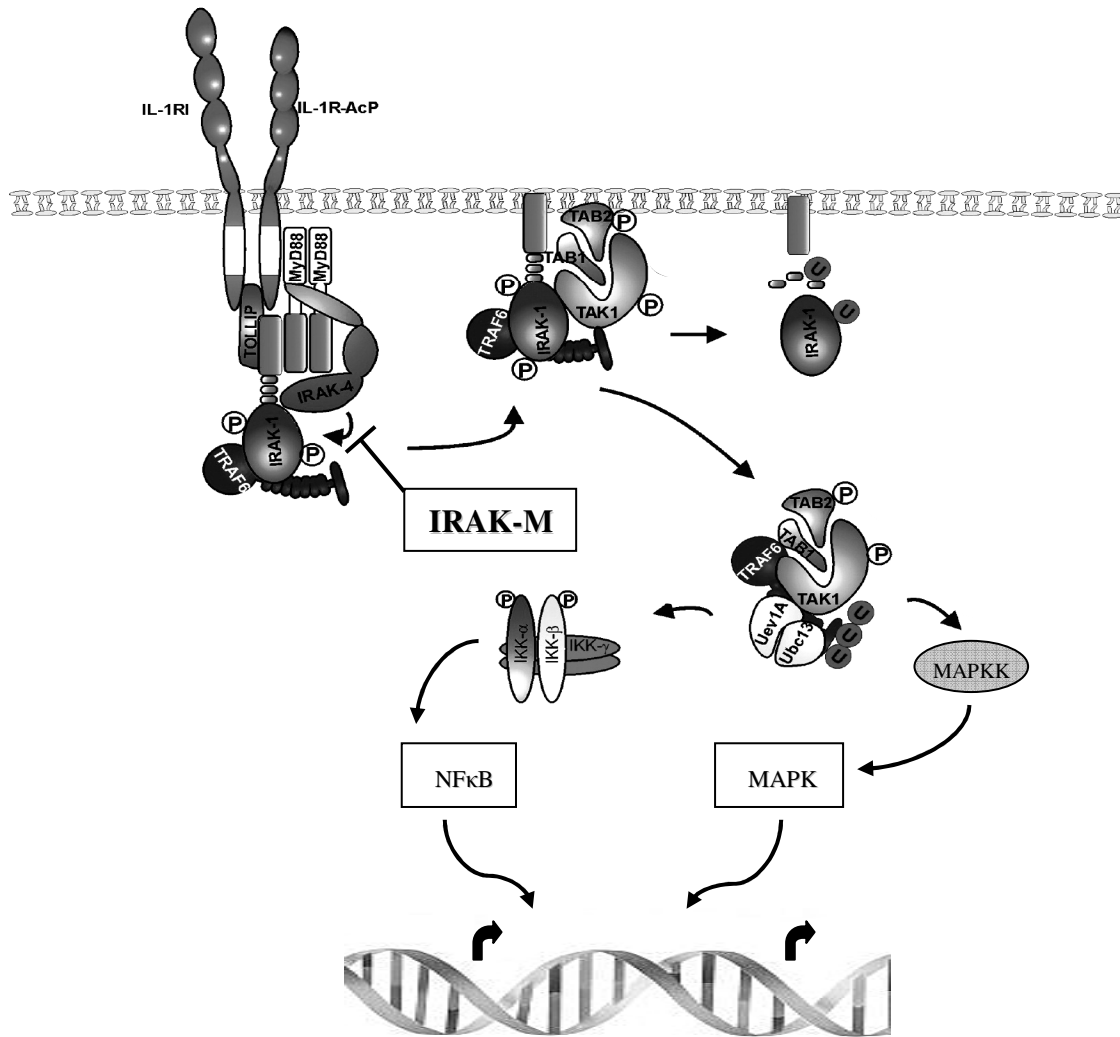


Abbildung 7: IRAK-1-Signalweg. Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase-1 (IRAK-1) wird über TLRs und IL-1Rs und das Adaptermolekül MyD88 phosphoryliert und dadurch aktiviert. IRAK-1 rekrutiert das Adapterprotein TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6 (TRAF6), das daraufhin an der Zellmembran mit dem Komplex aus TGF- β -aktivierter Kinase 1 (TAK1) und den beiden TAK1-Bindungsproteinen TAB1 und TAB2 interagiert. Daraufhin translozieren TRAF6, TAK1, TAB1 und TAB2 ins Zytosol, wo sie mit anderen zytosolischen Proteinen einen Multiproteinkomplex bilden, während IRAK-1 an der Zellmembran verbleibt und dort degradiert wird. Der TAK1-Komplex phosphoryliert Inhibitory- κ B Kinase (IKK) α/β und Mitogen-aktiviertes-protein-kinase kinase (MAPKK), was letztendlich zu der Aktivierung von NF κ B bzw. MAPK und konsekutiver Genexpression führt. IRAK-M verhindert die Phosphorylierung von IRAK-1 und blockiert dadurch die Signalkaskade [50, 59 (modifiziert)].

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass IRAK-M eine entscheidende Rolle in der Entwicklung der Endotoxin-Toleranz spielt. Stimuliert man Makrophagen wiederholt mit LPS, weisen sie eine umso geringere Zytokin-Produktion auf, je länger und je höher dosiert die erste LPS-Stimulation ist [57]. Durch die LPS-Stimulation, die TLR4 aktiviert, wird die IRAK-M-Expression induziert, die Expression von IRAK-1, MyD88 und TRAF6 hingegen

nicht. IRAK-M^{-/-} Makrophagen zeigen eine verminderte Endotoxin-Toleranz; ihre Zytokinspiegel sinken nach LPS-Restimulation nicht oder nur wenig. Im Zusammenhang mit dem akuten Koronarsyndrom wurde genau wie bei septischen Patienten nachgewiesen, dass Entzündungsreaktionen zur Hochregulation von IRAK-M in Monozyten führen und Endotoxin-Toleranz induzieren [65, 66].

IRAK-M als negativer Regulator des TLR-Signalwegs hat eine immunsuppressive Wirkung, die einerseits die Entstehung von Tumoren oder einer Sepsis begünstigen kann. In Leukozyten von Patienten, die an einer Gram-negativen Sepsis leiden, ist IRAK-M hochreguliert; die durch die starke IRAK-M-Expression bedingte Immunsuppression ist ein Indikator für eine schlechte Prognose und mit hoher Mortalität assoziiert [67]. Bei einer durch Infektion der Lunge mit *Pseudomonas* verursachten Sepsis haben IRAK-M-defiziente Mäuse höhere Überlebensraten [68]. In Bezug auf Tumoren wurde gezeigt, dass der Verlust von IRAK-M eine verstärkte Immunabwehr mit geringerem Tumorwachstum nach sich zieht. IRAK-M^{-/-} Mäuse sind nach Injektion von Tumorzellen gegen das Tumorwachstum resistent [69]. Tumorzellen können sogar ihr eigenes Wachstum sichern, indem sie Monozyten durch die Hochregulation der IRAK-M-Expression über CD44 und TLR4 inaktivieren [70]. Andererseits gibt es Hinweise darauf, dass IRAK-M Autoimmunität unterdrückt. Hochregulation von IRAK-M trägt zur Toleranzentwicklung von TLR7 bei, die wiederum Autoimmunerkrankungen verhindern kann [71]. Zudem minimiert IRAK-M bei viralen Infektionen den durch Entzündung hervorgerufenen Schaden. Eine Infektion mit Influenza-Viren, die mit einer durch körpereigene Zytokine und Chemokine vermittelten gewebsschädigenden Entzündung einhergeht, verläuft bei IRAK-M-defizienten Mäusen schwerer und hat eine deutlich höhere Letalität [72]. Interessanterweise führt die mit IRAK-M-Defizienz verbundene stärkere Entzündungs-Reaktion bei Influenza-Infektion zu schlechtem Outcome, während eine starke Immunantwort bei bakteriellen Infektionen die Bekämpfung der Krankheitserreger begünstigt [57, 68].

IRAK-M-Knockout-Mäuse wurden erstmals im Jahr 2002 generiert [57]. Als auffälliger Phänotyp der IRAK-M^{-/-} Mäuse wurde eine schwere Osteoporose beschrieben, die auf eine Aktivierung von Osteoklasten durch vermehrte NFκB- und MAPK-Aktivität, beschleunigte Differenzierung der Osteoklasten und ihre längere Lebenszeit zurückzuführen ist [73]. IRAK-M scheint daher ein wichtiger Regulator der Osteoklasten-Differenzierung und -Aktivierung und damit des Knochenabbaus zu sein. Dies wird unterstützt durch den Nachweis, dass das Kortikosteroid 6-Methylprednisolon IRAK-M in humanen und murinen Osteoklasten

herunterreguliert, somit Osteoklasten aktiviert und den Knochenabbau fördert [74]. Dies könnte eine Erklärung für die Kortikoid-induzierte Osteoporose sein.

Darüber hinaus wurde gezeigt, dass IRAK-M an der Pathogenese von juvenilem persistierendem Asthma bronchiale beteiligt ist [75]. Polymorphismen des IRAK-M-Gens waren demnach mit dem Auftreten von Asthma im Kindesalter assoziiert, der molekulare Mechanismus ist jedoch unklar. Der Verdacht, dass IRAK-M an der Entstehung entzündlicher Gefäßerkrankungen, Morbus Crohn und Colitis ulcerosa oder atopischer Dermatitis beteiligt sein könnte, hat sich hingegen nicht bestätigt [76, 77]. Die Rolle von IRAK-M in der Entstehung von Autoimmunität ist bislang unklar.

1.5 Ziel des Projekts und Hypothese

Dem systemischen Lupus erythematodes liegt ein Toleranzverlust des Immunsystems gegenüber Nukleoproteinen und Chromatinpartikeln mit Bildung von Autoantikörpern zugrunde. Die Aktivierung von Immunzellen mit konsekutiver systemischer Entzündungsreaktion wird von TLRs vermittelt, die Nukleinsäuren als endogene Liganden erkennen [78]. Insbesondere für TLR7, dessen Ligand einzelsträngige RNA ist, konnte eine Beteiligung an der Pathogenese des SLE nachgewiesen werden. TLR7-Agonisten und Überexpression von TLR7 aggravieren den SLE, während TLR7-Antagonisten und eine TLR7-Defizienz die Entstehung eines SLE verhindern [3, 79-83]. Die Bedeutung von TLR9, der als Liganden DNA erkennt, in der Entstehung des SLE ist hingegen komplexer. In vitro ähnelt die Datenlage der von TLR7, bei TLR9-Knockout-Mäusen zeigt sich jedoch ein aggravierter SLE [80, 84-86]. TLR9-Defizienz aggraviert Autoimmunität in Lupus-Mäusen, indem das TLR7-Signalling verstärkt wird [87, 88]. Dementsprechend entwickeln Lupus-Mäuse, bei denen sowohl TLR7 als auch TLR9 inhibiert wurde, ein abgeschwächtes Autoimmunsyndrom [81, 87]. Die Regulatoren der TLR-Signalkaskade spielen eine entscheidende Rolle, da sie das Immunsystem in einer feinen Balance zwischen Aktivierung und Inhibition halten [89]. In der Tat konnte gezeigt werden, dass SIGIRR, ein negativer Regulator der TLR-Signalkaskade aus der Familie der IL-1-Rezeptoren, Autoimmunität unterdrückt. SIGIRR-defiziente C57BL/6^{lpr/lpr} Mäuse zeigen einen aggravierten Verlauf des SLE mit schwerer Lymphoproliferation, Bildung von Autoantikörpern und massiven autoimmunen Gewebeschäden [90]. Dies lässt vermuten, dass auch andere TLR-Inhibitoren wie IRAK-M zur Verhinderung von Autoimmunität bedeutsam sein könnten. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass kürzlich IRAK-1 als Risikogen in der Pathogenese des SLE identifiziert wurde

[91]. Die Defizienz von IRAK-1, das interessanterweise auf dem X-Chromosom liegt und dessen Funktion von IRAK-M blockiert wird, schützt vor der Entstehung eines SLE. Die Rolle von IRAK-M bei Autoimmunität ist jedoch bislang unklar.

Daher soll in dieser Arbeit die Funktion von IRAK-M in genetisch bedingter Autoimmunität mit Hilfe IRAK-M-defizienter Mäuse untersucht werden. Die Hypothese besagt, dass IRAK-M Autoimmunität unterdrückt, indem es die Stimulation des Immunsystems durch Lupusautoantigene über TLRs blockiert. Dementsprechend ist zu vermuten, dass IRAK-M-defiziente Mäuse einen aggravierten Verlauf des genetisch bedingten SLE zeigen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ELISA-Reader Tecan, GENios Plus	Tecan, Crailsheim, D
ELISA-Washer ELx50	BioTek, Bad Friedrichshall, D
FacsCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, D
Homogenisator Ultra Turrax T25	IKA GmbH, Staufen, D
Lichtmikroskop Leica DMRBE	Leica Microsystems, Wetzlar, D
Lichtmikroskop Leica Wild MPS52	Leica Microsystems, Wetzlar, D
LightCycler 480	Roche Diagnostics, Mannheim, D
MidiMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PCR-Gel-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
pH meter WTW	WTW GmbH, Weilheim, D
Photometer DU 530	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Steril Card Hood Class II, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, Maine, USA
Thermocycler UNO-II	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2™	Scientific Industries, Bohemia, USA
Waage BP 110S	Sartorius, Göttingen, D
Waage Mettler PJ 3000	Mettler Toledo, Gießen, D
Zellinkubator Type B5060 EC-CO2	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Zentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, D

2.1.2 Materialien für die Zellkultur

Zellisolation

Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM)	Invitrogen, Karlsruhe, D
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Fötales Kalb-Serum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, D
Penicillin / Streptomycin (100x)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Dulbecco's PBS (1x)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
NH ₄ Cl	Merck, Darmstadt, D
Cell strainer 70 µm	BD Falcon, Bedford, USA
Preseparationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D

Stimulanzen

Imiquimod	Invivogen, Toulouse, Frankreich
LPS	Invivogen, Toulouse, Frankreich
CpG	Invivogen, Toulouse, Frankreich

T-Zell-Proliferation

MACS magnetic cell sorting	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Anti-CD3 (clone 500A2)	BD Biosciences, San Diego, USA
Bromdesoxyuridin	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
Regulatory T cell staining kit	Ebioscience, San Diego, USA
DNase I	Sigma-Aldrich, Steinheim, D
FITC-Anti-BrdU	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.3 Materialien für Tierexperimente

DNA-Isolation

QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
Proteinase K	Merck, Darmstadt, D
PBND Puffer:	2,5 ml 2M KCl, 1 ml 1M Tris-HCl, 0,25 ml 1M MgCl ₂ , 10 ml 0,1 % Gelatine, 0,45 ml 100 % NP40, 0,45 ml 100 % Tween-20; auf 100 ml Wasser auffüllen

PCR

10xPE-Puffer	Finnzymes, Espoo, Finnland
1,25mM dNTPs	Metabion GmbH, Martinsried, D
25mM MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Taq DNA- Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA
Fasrev	Metabion GmbH, Martinsried, D
Fasfor	Metabion GmbH, Martinsried, D
Lprrev	Metabion GmbH, Martinsried, D
IRA-WT-Fw	Metabion GmbH, Martinsried, D
IRA-WT-Rv	Metabion GmbH, Martinsried, D
IRA-KO-Fw	Metabion GmbH, Martinsried, D
IRA-KO-Rv	Metabion GmbH, Martinsried, D

Gelelektrophorese

Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Loading Dye (6x) (Ladepuffer)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
DNA Ladder Low range	Fermentas, St. Leon-Rot, D

1x TBE-Puffer: 108 g Tris, 55 g Borsäure, 5,84 g EDTA, auf 10 l Wasser auffüllen
 Low range marker: 30 µl DNA Ladder Low range, 15 µl Loading Dye (6x) (Ladepuffer),
 60 µl Wasser

Organentnahme

Formaldehydlösung 18 %	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNA-later	Qiagen GmbH, Hilden, D
Einbettkassetten	Simport, Beloeil, Kanada

Blutentnahme

EDTA	Biochrom KG, Berlin, D
Isofluran Forene®	Abbott, Wiesbaden, D
Mikropipetten 20µl	Blaubrand, Wertheim, D

TLR7-Blockade

IRS 661

(5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3')

TIB Molbiol, Berlin, D

2.1.4 Materialien für immunologische Methoden**ELISA**

Mouse IL-6-ELISA-Set BD OptEIA	BD Biosciences, San Diego, USA
Mouse IL-12 (p40)-ELISA-Set BD OptEIA	BD Biosciences, San Diego, USA
Mouse TNF α -ELISA-MAX-Set	BioLegend, San Diego, USA
Mouse IgG Quantitation Kit	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
HRP-conjugated Goat anti-mouse IgG	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA
TMB Substrate Reagent Set (Tetramethylbenzidin und Wasserstoffperoxid)	BD Biosciences, San Diego, USA
2N H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20 Fluka	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, D
Poly-L-lysine	Trevigen, Gaithersburg, USA
Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Smith Antigen	Zyted Systems, Berlin, D
SnRNP Antigen	ImmunoVision, Springdale, USA
Histon	USB Corporation, Cleveland, USA
dsDNA (aus embryonalen Stammzellen der Maus)	Metabion GmbH, Martinsried, D
PBS:	80 g NaCl, 11,6 g Na ₂ HPO ₄ , 2,0 g KH ₂ PO ₄ , 2,0 g KCl, mit Wasser auf 10 l auffüllen, pH 7,0
TrisNaCl:	6,057 g Tris, 8,1816g NaCl, mit Wasser auf 1 l auffüllen, pH 8,0
Waschpuffer:	PBS mit 0,05 % Tween-20 (IL-6, TNF- α , IL-12) TrisNaCl (IgG, Autoantikörper)
Beschichtungspuffer: 0,1M Natrium Carbonat:	7,13 g NaHCO ₃ , 1,59 g Na ₂ CO ₃ , mit Wasser auf 1 l, pH 9,5 (IL-6, TNF- α)

0,2M Natrium Phosphat:	11,8 g Na ₂ HPO ₄ , 16,1 g NaH ₂ PO ₄ , mit Wasser auf 1 l, pH 6,5 (IL-12)
0,05 M Bicarbonat:	2,1 g NaHCO ₃ , 2,645 g Na ₂ CO ₃ . mit Wasser auf 500 ml, pH 9,6 (IgG, Rheumafaktor, Anti-Smith, Anti-snRNP)
SSC Puffer:	8,8 g NaCl, 4,4 g Natriumcitrat, mit Wasser auf 1000 ml, pH 7,0 (Anti-dsDNA)
Assay Diluent:	PBS mit 10 % FCS, pH 7,0 (IL-6, TNF- α , IL-12) TrisNaCl mit 1 % BSA, pH 8,0 (IgG, Autoantikörper)

Durchflusszytometrie

Dulbecco's PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D
FITC-Anti-mouse CD3	BD Pharmingen, San Diego, USA
APC-Anti-mouse CD4	BD Pharmingen, San Diego, USA
PerCP-Anti-mouse CD8	BD Pharmingen, San Diego, USA
PerCP-Anti-mouse CD25	BD Pharmingen, San Diego, USA
Alexa Fluor-Anti-mouse CD45R (B220)	BD Pharmingen, San Diego, USA
PE-Anti-mouse IgM	BD Pharmingen, San Diego, USA
FITC-Anti-mouse IgD	BD Pharmingen, San Diego, USA
FITC-Anti-mouse CD21	BD Pharmingen, San Diego, USA
PE-Anti-mouse CD23	BD Pharmingen, San Diego, USA
PE-Anti-mouse CD11c	BD Pharmingen, San Diego, USA
FITC-Anti-mouse CD40	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse Neutrophils RPE	AbD Serotec/ MorphoSys, Martinsried, D
FITC-Anti-mouse Ly6G	BD Pharmingen, San Diego, USA
APC-Anti-mouse CD138	BD Pharmingen, San Diego, USA
PE-Anti-K light chain	BD Pharmingen, San Diego, USA
CALTAG Coating beads	Invitrogen, Carlsbad, USA
FOXP3-Flow Kit	BioLegend, San Diego, USA

2.1.5 Materialien für molekularbiologische Methoden

RNA-Isolation

PureLink RNA Mini Kit	Invitrogen, Carlsbad, USA
RNase-Free DNase Set	Qiagen GmbH, Hilden, D
β -Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
100 % Ethanol	Merck, Darmstadt, D
RNase-free-Lösung	Gene Choice Inc, Frederick, USA

cDNA-Synthese

5x First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
25 mM dNTPS	GE Healthcare, München, D
0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
linear-Acrylamid	Ambion, Darmstadt, D
Hexanucleotid	Roche, Mannheim, D
Diethyl-Pyrocbonat (DEPC)	Fluka, Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
RNAsin	Promega, Mannheim, D
Superscript II (Reverse Transkriptase)	Invitrogen, Karlsruhe, D

Realtime-PCR

Gen	Linke Primer Sequenz	Rechte Primer Sequenz
Mx1	TCTGAGGAGAGCCAGACGAT	CTCAGGGTGTTCGATGAGGTC
Ifit1	CAAGGCAGGTTTCTGAGGAG	GACCTGGTCACCATCAGCAT
Bcl-2	GATCCAGGATAACGGAGGCT	GGTCTTCAGAGACAGCCAGG
Baff	CCTCCAAGGCATTTCCTCTT	GACTGTCTGCAGCTGATTGC
IL-6	TGATGCACTTGCAGAAAACA	ACCAGAGGAAATTTTCAATAGGC
IL-12	CTAGACAAGGGCATGCTGGT	GCTTCTCCCACAGGAGGTTT
TLR7	GGATGATCCTGGCCTATCTC	TGTCTCTTCCGTGTCCACAT
TLR9	CAGTTTGTTCAGAGGGAGCCT	CTGTACCAGGAGGGACAAGG
Bcl-6	AGTTTCTAGGAAAGGCCGGA	ACTAGCGTGCCGGGTAAACT
Prdm1	ACCAAGGAACCTGCTTTTCA	TAGACTTCACCGATGAGGGG
T-bet	TCAACCAGCACCAGACAGAG	ATCCTGTAATGGCTTGTGGG
Gata3	ATCCTGTAATGGCTTGTGGG	AGGATGTCCCTGCTCTCCTT

Ifn- γ	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT
IL-4	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT	ACAGCAAGGCGAAAAAGGAT
FoxP3	TTCATGCATCAGCTCTCCAC	TTCATGCATCAGCTCTCCAC
IRAK-M	CACTGCTGGGAGAGCTTTG	CCAGCCAGCTGTTTGAAAGT

2.1.6 Materialien für histologische Untersuchungen

PAS-Färbung

PAS	Bio-Optica, Mailand, Italien
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad, München, D
Xylol	Merck, Darmstadt, D

Immunfluoreszenz

Anti-mouse CD11c (Klon HL3)	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse CD3 (Klon 500A2)	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse CD19 (Klon 1D3)	BD Pharmingen, San Diego, USA
Alexa Fluor 647 goat anti-rat IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA
Alexa Fluor 488 goat anti-hamster IgG	Invitrogen, Carlsbad, USA
Streptavidin Alexa Fluor 555 Konjugat	Invitrogen, Carlsbad, USA

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zellkulturbedingungen

Die Gewinnung von primären Zellen und deren Stimulation erfolgte ausschließlich unter sterilen Bedingungen. Dafür wurde eine Sterilbank genutzt, die mit Filtern und einem laminaren Luftstrom für Keimfreiheit sorgten. Zusätzlich wurde die Oberfläche der Sterilbank mit UV-Licht und - ebenso wie alle Gebrauchsgegenstände wie Medium und Pipetten - mit 70 % Ethanol desinfiziert. Für alle Immunzellen wurde RPMI-1640-Medium unter Zusatz von 10 % fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin-Streptomycin (PS) verwendet. Die Kultivierung und Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂-Begasung.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Zellzahlen wurden mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurde die Zellsuspension nach 1:10- oder 1:30-Verdünnung mit PBS auf die Zählkammer aufgetragen und unter dem Mikroskop mindestens drei Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl errechnet sich aus folgender Formel: (Gezählte Zellen/ Anzahl der ausgezählten Großquadrate) x Verdünnungsfaktor x 10⁴ = Zellzahl / ml.

2.2.3 Isolation von Splenozyten

Primäre Zellen wurden aus erwachsenen Mäusen im Alter von 8-10 Wochen gewonnen. Diese wurden durch zervikale Dislokation getötet. Die Milz wurde nach medianer Laparotomie unter sterilen Bedingungen entnommen und auf Eis in einer Petrischale mit etwas RPMI-Medium mit 10 % FCS und 1 % PS gelagert. Anschließend wurde die Milz mit Hilfe eines Spritzenstempels durch ein 70 µm-Zellsieb gedrückt und mit 5 ml RPMI-Medium nachgespült. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml-Falcon aufgefangen und bei 1200 Umdrehungen pro Minute und 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet zur Lyse der Erythrozyten in 5 ml 0,3-molarem Ammoniumchlorid (NH₄Cl) resuspendiert und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde 10 ml PBS hinzugegeben und die Zellsuspension mit Hilfe eines 30 µm-Preparationsfilters ein weiteres Mal gesiebt. Nach 5 Minuten Zentrifugieren bei 1400 U/min und 4°C wurde der Überstand abgesaugt. Das gewonnene Zellpellet wurde in RPMI-1640-Medium mit 10 % FCS und 1 % PS resuspendiert. Zuletzt wurden die isolierten Splenozyten gezählt und mit einer Konzentration von 5 Millionen Zellen pro 1 ml Medium und einem Gesamtvolumen von 12 ml RPMI-Medium in 12-well- oder 24-well-Platten verteilt. Die Platten wurden bis zur Stimulation der Zellen für 24 Stunden bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert.

2.2.4 Stimulationsexperimente mit TLR-Liganden

Nach der Zellisolation wurden die Splenozyten über 24 Stunden inkubiert. Dabei wurden 5 Millionen Zellen in 1 ml Medium bebrütet. Für die anschließende Stimulation wurden folgende TLR-Liganden verwendet: LPS (TLR4), Imiquimod (TLR7) und CpG (TLR9). Als Negativkontrolle diente Medium. Alle Stimulanzen wurden in einer Konzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Jeweils 2 Vertiefungen der Platten wurden mit demselben Liganden stimuliert. Alle Zellen wurden 24 Stunden inkubiert, bevor der Überstand geerntet und bis zur Auswertung der Zytokin-Produktion mittels ELISA bei -20°C gelagert wurde.

2.2.5 T-Zell-Proliferations-Experimente

Splenozyten wurden wie zuvor beschrieben aus der Milz erwachsener Mäuse isoliert. Aus den Splenozyten wurden CD4⁺ CD25⁺ regulatorische T-Zellen und CD4⁺ CD25⁻ T-Effektor-Zellen in zwei Schritten mittels Zellsortier-Sets isoliert, die auf der Bindung magnetischer Teilchen an den gewünschten Oberflächenantigenen und der anschließenden Sortierung der Zellsuspension im Magnetfeld beruhen. Die übrigen Zellen der Splenozyten wurden als antigenpräsentierende Zellen genutzt. CD4⁺ CD25⁻ Effektor-T-Zellen ($7,5 \times 10^4$ Zellen) wurden in Gegenwart von antigenpräsentierenden Zellen (2×10^4 Zellen) und steigender Anzahl von CD4⁺ CD25⁺ regulatorischen T-Zellen (5 bis 40×10^3 Zellen) mit 0,1 µg/ml Anti-CD3-Antikörper aktiviert [92]. Die Zellen wurden nach Zugabe des Nukleosidanalogons Bromdesoxyuridin (BrdU), das als Marker proliferierender Zellen dient, 60 Stunden kultiviert. Die Aufnahme von BrdU in CD4⁺ FoxP3-T-Effektor-Zellen wurde per Durchflusszytometrie mithilfe eines Treg-Färbe-Kits detektiert. Nach Inkubation mit FoxP3-Antikörpern

wurden die Zellen mit 1 % Paraformaldehyd in PBS fixiert, mit DNase I inkubiert und mit Anti-BrdU-Antikörpern gefärbt. Die Analyse erfolgte anschließend mittels Durchflusszytometrie.

2.3 Tierexperimente

2.3.1 Tierhaltung

Jeweils 5 Mäuse wurden unter sterilen Bedingungen in autoklavierten Käfigen mit Filterdeckel bei einem 12-Stunden-Hell-Dunkel-Rhythmus und freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. Futter und Wasser sowie Einstreu und Watte wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.3.2 Studiendesign

Um die Rolle von IRAK-M in der Pathogenese des SLE zu untersuchen, wurde ein C57BL/6^{lpr/lpr} Mausmodell verwendet. Das autosomal rezessive *lpr* (*lymphoproliferation*)-Gen kodiert für eine mutante Form des Fas/CD95/Apo-1 Rezeptors. Dieser wird auf der Oberfläche hämatopoetischer Zellen (T-Zellen, B-Zellen, Monozyten und Granulozyten) exprimiert und ist für die Induktion von Apoptose zuständig [93]. Durch die Mutation ist die Expression des Fas-Rezeptors stark vermindert. Homozygote *lpr*-Mäuse bilden Autoantikörper gegen einzelsträngige DNA, Chromatin und IgG (Rheumafaktor), weisen autoreaktive CD4- CD8- T-Zellen auf und zeigen zudem eine Lymphadenopathie und Splenomegalie [94, 95]. Somit entwickeln *lpr*-Mäuse - ganz ähnlich wie *gld* (*generalized lymphoproliferative disease*)-Mäuse, denen eine Mutation im Fas-Liganden zugrunde liegt - ein genetisch bedingtes Autoimmunsyndrom, das im Verlauf einem Lupus erythematoses stark ähnelt. Im Hintergrund des C57BL/6-Mausstammes zeigt sich eine milde Autoimmunität mit moderater Autoantikörperproduktion und Lymphadenopathie und leichter Vaskulitis [95]. Die SLE-ähnlichen Manifestationen an inneren Organen wie Nierenerkrankungen und Hautläsionen entwickeln sich erst in erwachsenen Mäusen im Alter ab etwa

24 Wochen und zeigen sich in äußerst geringer Ausprägung. Im Gegensatz dazu zeigen $MRL^{lpr/lpr}$ Mäuse eine schwere Autoimmunerkrankung mit Autoantikörperproduktion bereits im Alter von wenigen Wochen, massiver Lymphoproliferation und früher Organbeteiligung. Die Unterschiede in der Krankheitsschwere ergeben sich aus dem genetischen Hintergrund, denn lpr verstärkt eine bereits vorhandene Disposition, Autoimmunität zu entwickeln [95]. In $C57BL/6^{lpr/lpr}$ Mäuse wurden IRAK-M-defiziente Mäuse eingekreuzt, sodass $C57BL/6^{lpr/lpr}$ IRAK-M^{-/-} Mäuse gezüchtet und untersucht werden konnten. Als Kontrolle dienten $C57BL/6^{lpr/lpr}$ Mäuse. Alle Tiere wurden über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet und der Phänotyp charakterisiert. Zudem wurden IRAK-M-defiziente $BL/6^{lpr/lpr}$ Mäuse mit einem TLR7-Antagonisten behandelt, um aufzuzeigen, ob die Blockade von TLR7 Einfluss auf den Krankheitsverlauf nimmt.

2.3.3 Herstellung der $C57BL/6^{lpr/lpr}$ IRAK-M^{-/-} Knockout-Mäuse

IRAK-M-defiziente Mäuse wurden in den Laboratorien von Richard A. Flavell (Yale University School of Medicine, New Haven, USA) wie im Jahr 2002 beschrieben erzeugt und im $C57BL/6$ -Hintergrund gezüchtet [57]. $C57BL/6^{lpr/lpr}$ Mäuse wurden von Charles River Laboratories (Sulzbach, Deutschland) bezogen und mit IRAK-M^{-/-} Mäusen rückgekreuzt. Die erste Generation von Nachkommen, die sowohl in Hinblick auf IRAK-M als auch auf lpr heterozygot war, wurde untereinander verpaart. Somit konnten bereits in der zweiten Generation homozygote Tiere gewonnen werden, die weiter gezüchtet und vermehrt wurden. Die $C57BL/6^{lpr/lpr}$ IRAK-M^{-/-} Mäuse der Generation F4 wurden schließlich für die Experimente verwendet.

2.3.4 Genotypisierung der Mäuse

Zur Genotypisierung der Mäuse wurde zunächst DNA aus der Schwanzspitze der Mäuse isoliert, mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifiziert und zuletzt in einer Gelelektrophorese aufgetrennt.

2.3.4.1 Isolierung genomischer DNA

Für die Isolierung der DNA wurde ein etwa 2 mm großes Stück der Schwanzspitze abgeschnitten, in ein 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß mit 200 µl PBDN-Puffer und 1 µl Proteinase K gelegt und im 56°C-Thermoblock unter Schütteln 4 Stunden lang angedaut. Nach 2 Minuten Zentrifugieren bei 13.000 U/min wurde der die DNA enthaltende Überstand in ein neues 1,5 ml-Gefäß pipettiert. Zur Aufreinigung der DNA mit Hilfe des Qiagen DNA-Kits wurde gemäß Herstellerprotokoll nun 100 µl AL-Puffer hinzugefügt, gemischt und bei 70°C 10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe mit 100 µl 100% Ethanol vermischt, das Ganze auf eine Säule aufgetragen und 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert, wobei der Durchfluss verworfen wurde. Auf die Säule wurde 500 µl AW1-Puffer pipettiert, 1 Minute bei 8000 U/min zentrifugiert, 500 µl AW2-Puffer hinzugefügt und 3 Minuten bei 14.000 U/min zentrifugiert. Während der Durchfluss verworfen wurde, wurde die Säule in ein neues Gefäß platziert und die DNA eluiert. Dafür wurde zweimal 150 µl AE-Puffer auf die Säule gegeben, jeweils 5 Minuten inkubiert und bei 8000 U/min 1 Minute zentrifugiert. Der nun erhaltene Durchfluss enthielt die genomische DNA, die bis zur PCR bei 4°C und danach bei -20°C gelagert wurde.

2.3.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die gewonnene DNA wurde mittels *Polymerase Chain Reaction* (PCR) amplifiziert. Die PCR ist eine Methode, um bestimmte Abschnitte der DNA in vitro exponentiell zu vervielfältigen, indem ein drei Schritte umfassender Zyklus 20-50-mal durchlaufen wird. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt und die beiden Stränge dadurch voneinander getrennt. Der zweite Schritt, das Annealing, läuft bei etwa 60°C ab. Dabei lagern sich die gewählten Primer spezifisch an die komplementäre Sequenz der DNA an und flankieren den zu amplifizierenden Teil der DNA. Im dritten Schritt, der Amplifikation, synthetisiert das Enzym DNA-Polymerase bei 72°C einen neuen, zur Matrize komplementären DNA-Strang, wobei sie am 3'-Ende des angelagerten Primers beginnt. Dabei bedient man sich eines Thermocyclers und der hitzestabilen Taq-Polymerase, sodass die Zyklen automatisiert ablaufen.

Da die BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse Knockout-Mäuse mit zusätzlicher Mutation hinsichtlich lpr sind, mussten die Tiere sowohl in Bezug auf das IRAK-M- als auch auf das lpr-Gen

genotypisiert werden. Für die Ipr-PCR wurden 2,5 µl 10xPE Puffer, 3,0 µl 1,25 mM dNTPs, je 0,5 µl der Primer Fasrev, Fasfor und Iprrev, 0,5 µl Taq-Polymerase, 15,5 µl H₂O sowie 2,0 µl der isolierten DNA zusammenpipettiert. Für die IRAK-M-PCR mussten pro DNA-Probe zwei Gemische angesetzt werden, eines für die Wildtyp- und eines für die Knockout-Banden. Dafür wurden jeweils 2,5 µl 10xPE-Puffer, 3,0 µl 1,25 mM dNTPs, 1,0 µl 25 mM MgCl₂, 0,5 µl Taq-Polymerase, 13,0 µl H₂O und 2,0 µl der isolierten DNA sowie für Mastermix 1 je 1,5 µl der Primer IRA-WT-Fw und IRA-WT-Rev beziehungsweise für Mastermix 2 je 1,5 µl der Primer IRA-KO-Fw und IRA-KO-Rev vermischt. In jeder PCR wurde neben der DNA, die genotypisiert werden sollte, auch ein Ansatz für die DNA einer Wildtyp-, einer heterozygoten und einer homozygoten Knockout-Maus amplifiziert, um diese bekannten Banden mit den zu untersuchenden vergleichen zu können. Als Negativkontrolle diente jeweils der Mastermix mit destilliertem Wasser anstatt der DNA. Schließlich wurde im Thermocycler die PCR gestartet.

2.3.4.3 Agarosegel-Elektrophorese

Nach Amplifizierung der DNA wurden die Proben mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierfür wurde ein Agarosegel hergestellt, indem 2 g Agarosepulver in 100 ml TBE-Puffer bis zum Kochen erhitzt, 8 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und in einen Gelbehälter mit Tascheneinsatz gegossen wurde. Nach Erkalten des Gels wurde es mit TBE-Puffer übergossen und die Proben in die Taschen des Gels pipettiert. Dafür wurde zu jeder DNA-Probe 4 µl Ladepuffer hinzugefügt und 8 µl dieses Ansatzes in eine Tasche gefüllt. In die erste Tasche wurden 5 µl des DNA-Markers pipettiert. Anschließend wurde für 35 Minuten eine Spannung von 200 V angelegt, sodass sich die DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend auftrennten. Unter UV-Licht konnten die Banden dank des Ethidiumbromids sichtbar gemacht werden. Der Genotyp der zu untersuchenden Mäuse wurde anhand des Vergleichs mit den Banden der bekannten Wildtyp-, heterozygoten und homozygoten Probe bestimmt. Zum Ausschluss einer Verunreinigung mit Fremd-DNA wurde die Negativkontrolle mit destilliertem Wasser verwendet, die keine DNA enthalten sollte und dementsprechend auch keine Bande zeigte.

2.3.5 Blutentnahme

Die Blutentnahme erfolgte monatlich unter Kurznarkose. Mit Hilfe einer Anästhesie-Kammer konnte ein Isofluran-Sauerstoff-Gemisch konstant zugeführt werden. Das Vollblut wurde mit Hilfe einer Glaskapillare aus dem Venenplexus um die Augen entnommen und in einem 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß mit 5 µl 0,5-molarem EDTA aufgefangen. Davon wurde das Plasma durch 5-minütiges Zentrifugieren bei 10.000 U/min gewonnen und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.6 Organentnahme

Im Alter von 1, 3 beziehungsweise 6 Monaten wurden die Mäuse durch zervikale Dislokation getötet und die Organe nach medianer Laparotomie entnommen. Milzen und Lymphknoten wurden als Maß der Lymphproliferation gewogen. Ein Pol der Milz wurde für die RNA-Isolation in 600 µl RNAlater-Stabilisierungsreagenz bei -20°C aufbewahrt. Ein Teil von Niere und Lunge wurde zur histologischen Untersuchung in Einbettkassetten 24 Stunden in 1,8 %-Formalinlösung eingelegt und anschließend für die Anfertigung histologischer Schnitte weiterverarbeitet. Von den 6 Monate alten Mäusen wurden aus dem größten Teil der Milz Splenozyten isoliert und mittels Durchflusszytometrie die einzelnen Zellpopulationen analysiert.

2.3.7 TLR7-Blockade

Immunregulatorische Sequenzen (IRS) sind kurze DNA-Abschnitte, die als Inhibitoren von Toll-like Rezeptoren agieren. BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse wurden mit dem TLR7-Antagonisten IRS 661 (5'-TGCTTGCAAGCTTGCAAGCA-3') behandelt. Dieses Oligodesoxyribonukleotid inhibiert spezifisch das TLR7-Signalling sowohl in vitro als auch in vivo [78, 81]. Im Alter von 13 bis 24 Wochen wurde den Tieren jeden zweiten Tag 40 µg IRS 661 injiziert. Als Kontrolle dienten BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse, denen Kochsalzlösung injiziert wurde. Im Alter von 6 Monaten wurden jeweils die Organe entnommen.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 ELISA

Als *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bezeichnet man ein immunologisches Nachweisverfahren, mit dem Proteine, aber auch Viren und niedermolekulare Verbindungen wie Hormone und Toxine nachgewiesen werden können. Das Verfahren basiert auf der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das nachzuweisende Antigen. Ein an den Antikörper gekoppeltes Enzym katalysiert nach Zugabe eines Substrates eine Farbreaktion, die mit Hilfe eines ELISA-Lesegeräts gemessen werden kann. Für die ELISAs wurde die Sandwich-Methode angewendet, bei der das untersuchte Antigen zwischen zwei spezifischen Antikörpern gebunden wird. Die gemessene Signalstärke ist dabei proportional zu der gesuchten Antigenkonzentration.

Alle ELISAs wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Dazu wurde eine 96-well-Platte mit einem für das nachzuweisende Antigen spezifischen Fängerantikörper (*capture antibody*) beschichtet. Der Fängerantikörper wurde in einem Beschichtungspuffer (*coating buffer*) verdünnt. 100 µl dieser Lösung wurden in jedes well pipettiert und die Platte über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach drei Waschschritten wurden die freien Proteinbindestellen mit 200 µl/well Probenverdünner (*assay diluent*) geblockt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde die Platte dreimal gewaschen und je 100 µl der ggf. mit Assay Diluent verdünnten Proben beziehungsweise des Standards (Verdünnungsreihe mit bekannter Konzentration von 1000 bis 7,8 pg/ml beziehungsweise 1000 bis 7,8 ng/ml) und des Assay Diluents als Leerwert aufgetragen. Es folgten 1-2 Stunden Inkubation und 5 Waschschrritte. Der Detektionsantikörper (*detecture antibody*) mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase, HRP*) wurde in Assay Diluent verdünnt, 100 µl dieser Lösung in jedes well gegeben und 1 Stunde inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 µl/well Substratlösung (*substrate solution*), die aus Tetramethylbenzidin (TMB) und Wasserstoffperoxid im Verhältnis 1:1 hergestellt wurde, gestartet. Die Platte wurde 10-30 Minuten im Dunklen inkubiert und die Farbreaktion dann mit 50 µl/well Stopplösung (2N H₂SO₄) beendet. Anschließend wurde die Absorption bei 450 nm mittels ELISA-Reader gemessen. Anhand der Standardkurve mit bekanntem Proteingehalt wurde die Konzentration des untersuchten Antigens in den Proben berechnet.

Die Analyse der Zytokin-Produktion von Splenozyten wurde wie oben beschrieben mit IL-6 beziehungsweise TNF- α -ELISA-Kits durchgeführt. Die geernteten Zellüberstände wurden hierfür jeweils im Verhältnis 1:1 mit Assay Diluent verdünnt. Die Bestimmung von IL-12 und Immunglobulinen im Blutplasma erfolgte mit Hilfe eines IL-12- beziehungsweise IgG-ELISA-Sets, wobei die Blutproben 1:10 verdünnt wurden. Autoantikörper im Blut wurden wie in Publikationen dargestellt mittels ELISA quantifiziert [90]. Für die Bestimmung der Anti-dsDNA-Antikörper wurden ELISA-Platten zunächst für eine Stunde mit Poly-L-Lysin und anschließend über Nacht mit SSC-Puffer mit 1 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA aus embryonalen Stammzellen der Maus inkubiert. Als Coating buffer für Anti-Smith- und Anti-snRNP-ELISAs diente 0,05 M Bicarbonat mit 1:250 verdünntem Smith-Antigen beziehungsweise snRNP-Antigen. Für Anti-Nukleosomen-Antikörper wurde zunächst für eine Stunde mit Poly-L-Lysin inkubiert. Histon (2 $\mu\text{g/ml}$) und dsDNA (1 $\mu\text{g/ml}$) wurden mit PBS gemischt und die ELISA-Platte damit über Nacht beschichtet. Für die Bestimmung von Rheumafaktor wurde als Coating buffer 10 $\mu\text{g/ml}$ Kaninchen-IgG in 0,05 M Bicarbonat verwendet. Für alle Autoantikörper-ELISAs wurde das Blutplasma 1:10 mit TrisNaCl verdünnt. Als Detektionsantikörper diente jeweils aus Ziegen gewonnenes HRP-konjugiertes Anti-mouse IgG.

2.4.2 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence activated cell sorting*) genannt, ist ein Analyseverfahren, mit dem Zellen oder andere Partikel anhand physikalischer und molekularer Eigenschaften wie Größe, Struktur und Oberflächeneigenschaften charakterisiert und zugleich ihre Anzahl bestimmt werden können. In der Regel werden die Zellen mit gegen bestimmte Zellstrukturen gerichteten Antikörpern markiert, an die ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist. Zur Analyse werden mehrere tausend Zellen einer Zellsuspension durch eine Kapillare gesaugt und einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Die markierten Zellen werden durch den monochromatischen Laserstrahl erfasst und angeregt. Durch das FACS-Gerät wird die Lichtbeugung und -streuung der Zellen detektiert. Das Vorwärtsstreulicht (*forwardscatter*) ist ein Maß für die Beugung des Lichts im flachen Winkel und lässt auf die Größe der Zellen schließen. Über das Seitwärtsstreulicht (*sidewardscatter*), das ein Maß für die Brechung des Lichts im 90° Winkel ist, kann die Granularität der Zellen bestimmt werden. Dadurch lassen sich verschiedene Zellpopulationen einer Zellsuspension voneinander unterscheiden. Eine FACS-Messung lässt sich gleichzeitig mit mehreren Fluoreszenz-

farbstoffen durchführen, da die verschiedenen Farbstoffe sich durch Licht derselben Wellenlänge anregen lassen, aber durch unterschiedliche, jeweils spezifische Emmissionspektren unterschieden werden können [96, 97].

Die Durchflusszytometrie wurde angewendet, um die verschiedenen Zellpopulationen der Milz zu analysieren. Es wurden Färbungen für T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, dendritische Zellen, Plasmazellen, Monozyten und neutrophile Granulozyten angefertigt und mit dem FACS-Gerät deren Anzahl und Eigenschaften anhand von Oberflächenmarkern bestimmt.

Zunächst wurde eine Einzelzellsuspension von Splenozyten vorbereitet. Hierfür wurde die Milz von 6 Monate alten Tieren entnommen und auf Eis durch ein 70 µm-Zellsieb gedrückt. Mit 5 ml gekühltem PBS wurde das Sieb gespült. Die Zellsuspension wurde in einem 50 ml-Gefäß aufgefangen und 5 Minuten bei 1200 U/min und 4°C zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstands wurde das Zellpellet in 5 ml 0,3-molarem NH₄Cl resuspendiert und 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 5 ml gekühltes PBS hinzugefügt und die Suspension mit Hilfe eines 30 µm-Zellfilters erneut gesiebt. Nach 5 Minuten Zentrifugieren bei 1400 U/min und 4°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet auf Eis in 1,5 ml PBS resuspendiert.

Für die anschließende Zellfärbung wurden je 100 µl der Zellsuspension in FACS-Röhrchen gegeben. Dazu wurden je 1,4 µl der Antikörper hinzugefügt, was 2-3 µg entspricht. Folgende an Farbstoffe gekoppelte Antikörper wurden verwendet (Tabelle 7): Für die Analyse der T-Zellen wurden 2 Mastermixe mit CD3, CD4 und CD8 beziehungsweise CD3, CD4 und CD25-Antikörpern angesetzt. Mittels zweier weiterer Ansätze mit B220, CD21 und CD23 beziehungsweise B220, IgM und IgD-Antikörpern wurden die B-Zellen charakterisiert. Als Marker der dendritischen Zellen dienten CD11c und CD40-Antikörper, als Marker der Monozyten und neutrophilen Granulozyten 7/4 und Iy6G. Für die Analyse der Plasmazellen wurden sowohl der Oberflächenmarker Anti-CD138 als auch der intrazellulär bindende Antikörper Anti-κ light chain verwendet. Sämtliche Zellsuspensionen mit Antikörpern wurden eine Stunde bei 4°C inkubiert. Um die Plasmazellen zu färben, wurde mit Hilfe des FOXP3-Kits nach der Färbung mit dem Oberflächenantikörper Anti-CD138 die Zellmembran permeabilisiert, bevor der intrazelluläre Antikörper Anti-κ light chain hinzugegeben wurde.

Table 7: Zellfärbungen bei der FACS-Analyse und ihre Interpretation.

T-Zellen	CD3+	T-Zellen
	CD3+ CD4+	T-Helferzellen
	CD3+ CD8+	Zytotoxische T-Zellen
	CD3+ CD4- CD8-	Autoreaktive T-Zellen
	CD3+ CD4+ CD25+	Regulatorische T-Zellen
B-Zellen	B220+ IgM+ IgD+	Reife B-Zellen
	B220+ CD21 ^{high} CD23 ^{low}	Marginalzonen B-Zellen
	B220+ CD21 ^{low} CD23 ^{high}	Follikuläre B-Zellen
Dendritische Zellen	CD11c+ CD40+	
Monozyten/	7/4+ Iy6G-	Monozyten
Neutrophile Granulozyten	7/4+ Iy6G+	Neutrophile Granulozyten
Plasmazellen	CD138+ κ light chain+	

Nach der Inkubationszeit wurden alle Zellen zweimal mit 2 ml gekühltem PBS gewaschen und 5 Minuten bei 1400 U/min und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 400 µl PBS resuspendiert und gründlich gemischt. Für die Zellzählung wurden 100 µl Counting beads zu der Zellsuspension gegeben.

Die FACS-Analyse wurde mit einem FACScalibur Gerät und CellQuest Software (BD Pharmingen) durchgeführt. Dabei wurde jeweils die Anzahl der Zellen einer Population pro Milz bestimmt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 RNA-Isolation

RNA wurde aus Zellen der Milz isoliert. Dazu wurden die Organe nach Entnahme in 600 µl RNAlater-Stabilisierungsreagenz eingelegt und bei -20°C aufbewahrt. Für die RNA-Isolation wurden sterile Gefäße verwendet und Arbeitsplatz sowie Geräte wie Pipetten und Homogenisator mit RNase-Free-Lösung behandelt, um eine Kontamination mit RNase zu verhindern.

Als erster Schritt wurde das Gewebe lysiert. Dazu wurde 600 µl Lysepuffer mit 1 % β-Mercaptoethanol gemischt und etwa 30 mg eines Organs hinzugegeben. Mit Hilfe eines Homogenisators wurde das Gewebe 30 Sekunden bei 17.500 U/min homogenisiert. Nach 5 Minuten Zentrifugieren bei 12.000 U/min wurden 350 µl des Überstandes mit 350 µl 70 % Ethanol gründlich gemischt. Um die RNA an die Säule zu binden, wurden diese 700 µl im Anschluss mittig auf die Säule pipettiert und bei 12.000 U/min 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde erneut auf die Säule gegeben und nochmals bei 12.000 U/min 15 Sekunden zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die Säule mit 350 µl des Waschpuffers I gewaschen und bei 12.000 U/min 15 Sekunden zentrifugiert. Nun folgte der DNase-Verdau, um eine reinere RNA zu erhalten. Dazu wurde die Säule in ein neues Auffanggefäß überführt und mit 70 µl RDD-Puffer und 10 µl DNase-I-Stammlösung 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurde erneut mit 350 µl Waschpuffer I gewaschen und 15 Sekunden zentrifugiert. In einem neuen Auffanggefäß wurde die Säule zweimal mit je 500 µl Waschpuffer II gewaschen, zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Um die Membran zu trocknen, wurde bei 12.000 U/min 1 Minute zentrifugiert. Danach wurde die RNA aus der Säule eluiert. Hierfür wurde die Säule in ein steriles 1,5 ml-Eppendorf-Gefäß umgesetzt, 35 µl RNase-freies Wasser mittig daraufgegeben, 1 Minute inkubiert und 2 Minuten zentrifugiert. Durch das Wasser löste sich die RNA von der Membran und gelangte in das Eppendorf-Gefäß.

Anschließend wurde die Reinheit der erhaltenen RNA-Lösung analysiert, indem mittels Photometer die optische Dichte der Proben bestimmt wurde. Dazu wurden 2 µl der eluierten RNA mit 98 µl RNase-freiem Wasser 1:50 verdünnt. Die Absorption dieser 100 µl jeder Probe wurde im Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Als Nullwert diente RNase-freies Wasser. Anhand des Quotienten der Werte bei 260 nm und 280 nm konnte eine Aussage über die Reinheit der gewonnenen RNA getroffen werden. Reine Proben erzielten einen Quotient zwischen 1,7 und 2,0. Werte darunter sprachen für eine Protein-Kontamination, Werte darüber für eine DNA-Kontamination. Mit Hilfe des Absorptionswertes bei 260 nm wurde die Ausbeute bestimmt. Die Konzentration der isolierten RNA wurde nach folgender Formel berechnet: Absorptionswert bei 260 nm x 50 (Verdünnungsfaktor) x 40 / 1000 = Konzentration in µg/µl.

2.5.2 cDNA-Synthese

Für die Analyse der exprimierten Gene mittels Real-time PCR musste die isolierte RNA in *complementary DNA* (cDNA) umgeschrieben werden. Hierfür wurden 2 µg RNA in 10 µl RNase-freiem Wasser verdünnt und 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Zu der RNA wurden 8 µl 5x Puffer, 0,8 µl 25 mM dNTPs, 2 µl DTT, 0,5 µl linear-Acrylamid, 0,43 µl Hexanucleotide, 16,4 µl DEPC-Wasser, 1 µl RNAsin und 0,87 µl Reverse Transkriptase (Superscript) hinzugefügt und im Thermomixer zunächst 90 Minuten bei 42°C und schließlich 5 Minuten bei 85°C gemischt. Die gewonnene cDNA wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.5.3 Real-time PCR

Die Real-time quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) ist eine Methode, die nach dem Prinzip der klassischen PCR die Vervielfältigung von DNA und zugleich deren Quantifizierung erlaubt. Die PCR basiert auf einem drei Schritte umfassenden Zyklus, der eine exponentielle Amplifikation eines gewünschten DNA-Abschnitts ermöglicht. Im ersten Schritt, der Denaturierung, wird der DNA-Doppelstrang durch Erhitzen auf 95°C in die zwei Einzelstränge aufgetrennt. Im zweiten Schritt, dem Annealing, lagern sich die gewählten, spezifischen Primer bei einer Temperatur von etwa 60°C an die entsprechenden Abschnitte der DNA-Einzelstränge an und flankieren den gewünschten DNA-Abschnitt. Im dritten Schritt, der Amplifikation, erfolgt bei 72°C ausgehend vom 3'-Ende des angelagerten Primers die Synthese eines neuen DNA-Stranges durch das hitzestabile Enzym DNA-Polymerase. Die Quantifizierung der vervielfältigten DNA erfolgt anhand von Fluoreszenz-Messungen nach jedem PCR-Zyklus. Dabei ist die gemessene Fluoreszenz-Intensität direkt proportional zur Menge der amplifizierten DNA, was einen Rückschluss auf die ursprünglich eingesetzte Menge an mRNA erlaubt. Für jede Probe wurde die Anzahl von PCR-Zyklen ermittelt, die nötig sind, um einen festgesetzten Fluoreszenz-Schwellenwert zu überschreiten und sich von der Hintergrund-Fluoreszenz zu unterscheiden. Je mehr cDNA und damit ursprünglich mRNA in einer Probe enthalten ist, desto weniger Zyklen genügen zur Messung einer signifikanten Fluoreszenz. Alle Proben, deren Fluoreszenz-Intensität nach 35 Zyklen Amplifikation nicht über das Hintergrund-Signal anstieg, wurden als nicht nachweisbar festgesetzt. Es wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt, bei der das Verhältnis von Zielsequenz zu einer Referenzsequenz bestimmt wurde. Als Referenzgen diente 18s rRNA,

eine Ribonukleinsäure aus den Ribosomen aller Eukaryoten, die als sogenanntes Housekeeping-Gen in allen Proben gleichermaßen enthalten ist.

Für die RT-PCR wurde zunächst ein SYBR Green Mastermix angesetzt. Hierfür wurden 2 ml 10x Taq-Puffer, 150 µl 25 mM dNTPs, 4 ml PCR optimizer, 200 µl BSA (20 mg/ml), 40 µl SYBR Green, 2,4 ml 25 mM MgCl₂ und 1,21 ml H₂O vermischt. Die Primer, jeweils ein Forward- und ein Reverse-Primer, wurden 1:10 in RNase-freiem Wasser verdünnt. Auf eine 96-well-Platte wurde pro well 10 µl SYBR Green Mastermix, jeweils 0,6 µl des verdünnten Forward- und Reverse-Primers, 0,16 µl Taq-Polymerase, 0,4 µl der cDNA sowie 8,24 µl RNase-freies Wasser pipettiert. Die Platten wurden mit Folie fest verschlossen und die Analyse mit Hilfe des LightCycler gestartet. Als Negativkontrolle zum Ausschluss einer Kontamination mit genomischer DNA dienten Proben mit destilliertem Wasser, die weder für Ziel- noch für Housekeeping-Gene eine Amplifikation beziehungsweise eine Fluoreszenz-Zunahme zeigten.

2.6 Histologische Untersuchungen

2.6.1 Anfertigung histologischer Schnitte

Für die Analyse der Schädigung von Niere und Lunge wurden die entnommenen Organe zunächst in Histokassetten 24 Stunden in 10 % Formalin eingelegt und anschließend in Paraffin eingebettet. Mit einem Schneidegerät wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt, auf mit Ammoniumpersulfat vorbehandelten Objektträgern aufgetragen und für 12 Stunden bei 37°C getrocknet.

Für die Färbung wurden die Schnitte zuerst in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 70 %, 50 %) entparaffiniert und mit wässriger Lösung gespült. Für die Bewertung der autoimmunen Gewebeschädigung der Niere und Lunge wurde die *Periodic Acid Schiff* (PAS)-Färbung verwendet. Die Färbung erfolgte nach Herstellerangaben. Hierfür wurden die Schnitte zunächst mit PAS-Lösung für 10 Minuten gefärbt, mit destilliertem Wasser gewaschen und 20 Minuten mit Schiff-Reagenz inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde Kalium-Methabisulfit-Lösung aufgetragen, nach 2 Minuten abgegossen und Fixierlösung hinzugefügt. Nach 2 Minuten wurde der Objektträger gewaschen und Meyer's Hemalum-Reagenz für 3 Minuten aufgetropft. Abschließend wurden die Schnitte mit Wasser gespült, mit Ethanol dehydriert und mit Xylol aufgehellt.

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurde die Milz entnommen und in Einbettmedium bei -80°C eingefroren. Mit einem Schneidegerät wurden $7\ \mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger aufgetragen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet. Mit einem 10-minütigen Acetonbad wurden die Schnitte fixiert. Anschließend wurden die getrockneten Schnitte für 5 Minuten mit PBS rehydriert und die unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % Ziegen Serum in PBS für 20 Minuten blockiert. Als erste Antikörper wurden Anti-CD3 (Bindung an T-Zellen), Anti-CD19 (Bindung an B-Zellen) und Anti-CD11c (Bindung an dendritische Zellen) verwendet, die jeweils 1:50 in PBS mit 2,5 % Ziegen Serum verdünnt wurden. Nach einer Stunde Inkubation bei Raumtemperatur folgten mehrere Waschschrte mit PBS. Als zweite Antikörper dienten an verschiedene Farbstoffe gekoppelte Ziegen-anti-Ratten-IgG, Ziegen-anti-Hamster-IgG und Streptavidin-Konjugat, die alle in einer Verdünnung von 1:200 in PBS mit 2,5 % Ziegen Serum eingesetzt wurden. Nach 45 Minuten Inkubation und Waschschrten erfolgte eine 4-minütige Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS. Abschließend wurden die Schnitte mit Mowiol eingedeckt und gründlich getrocknet. Das Auswerten und Fotografieren der Schnitte erfolgte mithilfe eines Olympus BX 61-Mikroskops und CellP Software.

2.6.2 Auswertung histologischer Schnitte

Histologische Schnitte der Lungen und Nieren wurden unter dem Mikroskop in 100-beziehungsweise 400-facher Vergrößerung ausgewertet. Für die Analyse der Lupus-Nephritis wurden die PAS-gefärbten Schnitte der Niere von 6 Monate alten Mäusen herangezogen. Das Ausmaß der entzündlichen Nierenbeteiligung wurde für jeden Schnitt anhand eines Aktivitäts- und eines Chronizitäts-Index bewertet, wie für die Lupus-Nephritis des Menschen beschrieben [98]. Die Kriterien für jeden Index umfassten verschiedene glomeruläre und tubulointerstitielle Veränderungen (Tabelle 8).

Table 8: Kriterien der Aktivitäts- und Chronizitäts-Indices der Lupus-Nephritis.

Aktivitäts-Index	Chronizitäts-Index
Glomeruläre Zellproliferation	Glomerulus-Sklerose
Glomeruläre Leukozyten-Infiltration	Fibröse Halbmondbildung
Glomeruläre Nekrosen oder Karyorrhexis	Tubulointerstitielle Fibrose
Zelluläre Halbmondbildung	Tubularatrophie
Glomeruläre hyaline Matrix	
Tubulointerstitielle Zellinfiltration	

Jedes der Kriterien wurde auf einer Skala von 0 (keine Veränderung der jeweiligen Niere) bis 3 (maximale Veränderung) Punkten bewertet. Die einzelnen Punkte wurden zu einer Gesamtpunktzahl addiert, wobei glomeruläre Nekrosen und zelluläre Halbmondbildung doppelt gewertet wurden. Somit ergab sich für den Aktivitäts-Index eine Punktzahl von 0 bis 24, für den Chronizitätsindex eine Punktzahl von 0 bis 12.

Die Bewertung der autoimmunen Gewebsschädigung der Lunge erfolgte anhand der PAS-gefärbten Schnitte. Für jeden Lungenschnitt wurden die Entzündungsinfiltrate um größere Bronchien im Sinne einer Peribronchitis auf einer semiquantitativen Skala von 0 (keine Entzündung) bis 3 (ausgedehnte Entzündungsinfiltrate) Punkten bewertet.

2.7 Statistische Auswertung

Alle Ergebnisse sind als Mittelwert mit *standard error of the mean* (SEM) angegeben. Für die Berechnung der statistischen Signifikanz wurde der zweiseitige Student's t-Test angewendet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant angenommen und mit „*“ markiert. Die Fehlerindikatoren zeigen den SEM. Überlebensraten wurden in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 IRAK-M unterdrückt die Zytokinproduktion von Splenozyten

IRAK-M ist ein negativer Regulator des TLR-Signallings; IRAK-M $-/-$ Makrophagen produzieren nach Stimulation mit TLR-Liganden signifikant höhere Zytokinspiegel [57]. Um der Frage nachzugehen, ob dies bei BL/6^{lpr/lpr} Mäusen reproduzierbar ist, wurden Splenozyten aus der Milz erwachsener BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M $-/-$ Mäuse isoliert und mit TLR-Liganden stimuliert. Dafür wurden Lipopolysaccharid (Ligand von TLR4), Imiquimod (TLR7) und CpG-DNA (TLR9) verwendet. Ohne Stimulation, das heißt nur mit Medium, zeigten BL/6^{lpr/lpr} Splenozyten keine nachweisbare, BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M $-/-$ Splenozyten eine äußerst geringe Produktion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α . Nach Stimulation mit LPS, Imiquimod und CpG stieg die Produktion von Interleukin-6 sowohl bei BL/6^{lpr/lpr} als auch bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M $-/-$ Zellen massiv an, jedoch produzierten IRAK-M-defiziente Splenozyten signifikant mehr IL-6. Den stärksten Effekt auf den IL-6-Spiegel zeigte dabei die Stimulation mit CpG (Abbildung 8A). BL/6^{lpr/lpr} Splenozyten reagierten auf die Stimulation mit TLR-Liganden mit einer geringen Produktion von TNF- α , während in den Zellüberständen von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M $-/-$ Splenozyten nach Stimulation mit CpG und insbesondere mit Imiquimod signifikant höhere TNF- α -Spiegel nachweisbar waren (Abbildung 8B).

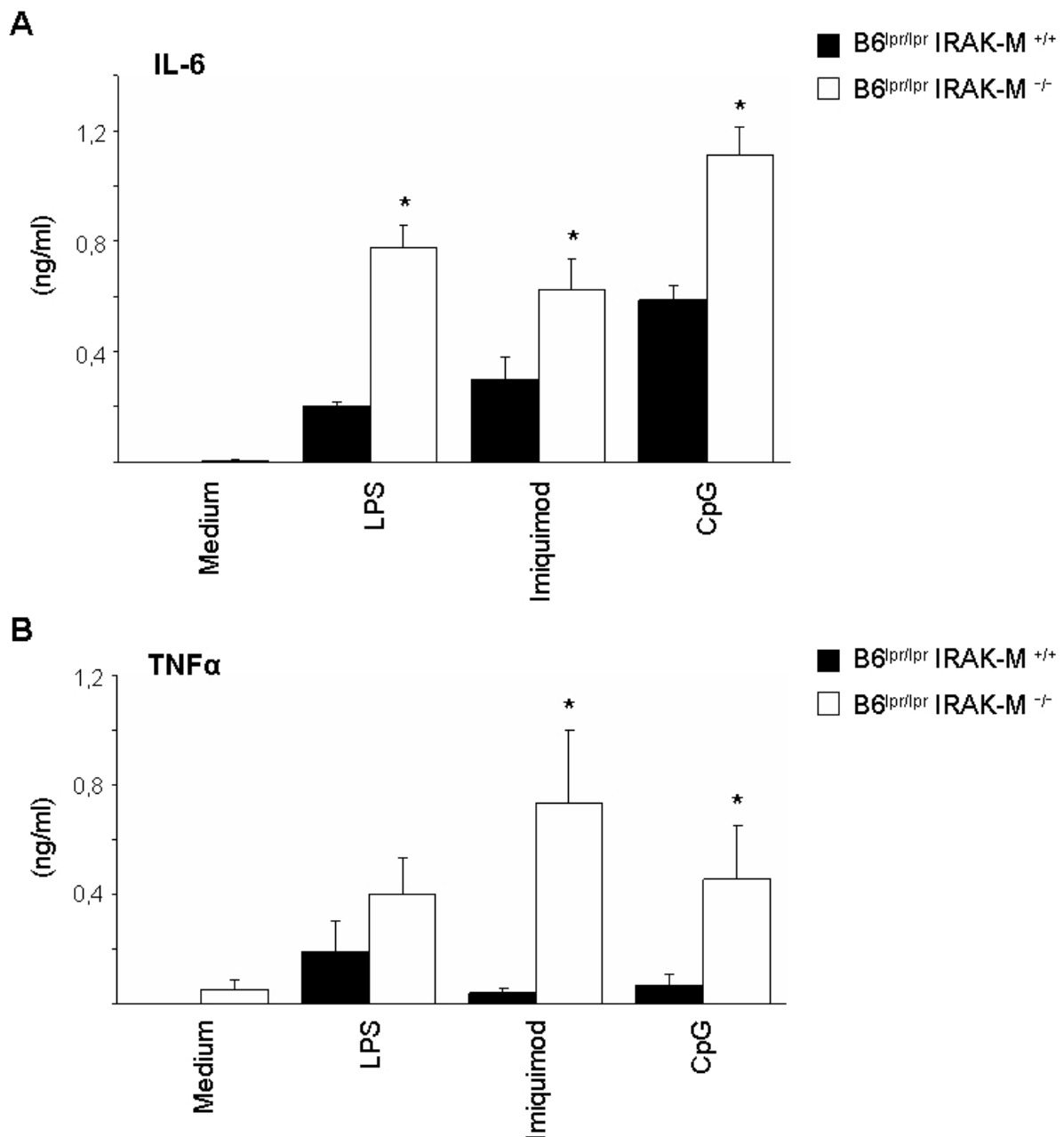


Abbildung 8: Zytokinproduktion von Splenozyten nach Stimulation mit TLR-Liganden. Von BL/6^{pr/pr} und BL/6^{pr/pr} IRAK-M^{-/-} Mäusen wurden Splenozyten isoliert und mit den TLR-Liganden LPS (TLR4), Imiquimod (TLR7) und CpG (TLR9) stimuliert. Nach 24 Stunden wurden die Überstände geerntet und Interleukin-6 (A) beziehungsweise TNF- α (B) mit ELISA gemessen. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM von drei unabhängigen Experimenten.

IRAK-M-Defizienz in BL/6^{pr/pr} Splenozyten führt also zu einer vermehrten Produktion proinflammatorischer Zytokine vor allem nach Stimulation von TLR7 und TLR9. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass IRAK-M die TLR7- und TLR9-Signalwege blockiert, was im Kontext des SLE besonders interessant ist. Denn diese TLRs erkennen nicht nur RNA beziehungsweise DNA von Bakterien und Viren, sondern auch endogene Nukleinsäuren und

Immunkomplexe aus Autoantikörpern und -antigenen, was eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Lupus erythematoses spielt [3, 31, 32].

3.2 IRAK-M-Defizienz führt zu schwerer Lymphoproliferation in BL/6^{lpr/lpr}-Mäusen

Um die Rolle von IRAK-M im Lupus erythematoses zu identifizieren, wurde als erstes untersucht, ob IRAK-M-defiziente BL/6 Mäuse ein Autoimmunsyndrom entwickeln. In 12 Monate alten BL/6 IRAK-M ^{-/-} Mäusen wurden keinerlei Zeichen von Autoimmunität wie z.B. Autoantikörper gegen doppelsträngige DNA oder gegen andere DNA- und RNA-Autoantigene gefunden (Abbildung 23). Auch die T- und B-Zell-Populationen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Expansion nicht von Wildtyp-Tieren (Abbildung 17 und 19). Das Fehlen von IRAK-M allein führte also nicht zur Entwicklung eines SLE. Daraufhin wurden IRAK-M-defiziente BL/6^{lpr/lpr} Mäuse gezüchtet. Das Autoimmunsyndrom in homozygoten BL/6^{lpr/lpr} Mäusen wird durch die Mutation eines einzigen Gens (*lpr*) hervorgerufen und ähnelt im Verlauf einem milden Lupus erythematoses. Zunächst wurde die Expression von IRAK-M mRNA in Milzen von BL/6^{lpr/lpr} Mäusen im Alter von 1, 3 und 6 Monaten untersucht. Dabei zeigte sich eine zunehmende Expression von IRAK-M mRNA über die Zeit (Abbildung 9).

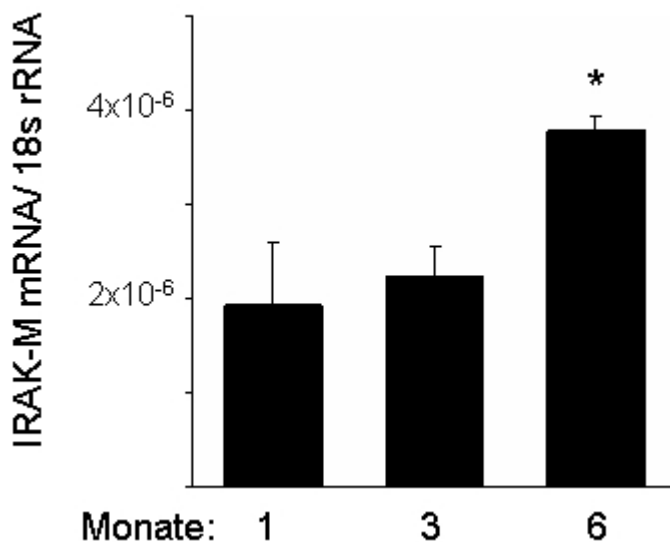


Abbildung 9: IRAK-M mRNA-Expression in Milzen von BL/6^{lpr/lpr} Mäusen. IRAK-M mRNA wurde aus Milzen von weiblichen BL/6^{lpr/lpr} Mäusen im Alter von 1, 3 und 6 Monaten gewonnen und mittels Realtime-PCR analysiert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte ± SEM des Verhältnisses der spezifischen RNA zu 18s rRNA (Housekeeping-Gen) von 6-12 Mäusen zu jedem Zeitpunkt. Die Expression von IRAK-M stieg über die Zeit an und war bei 6 Monate alten Mäusen signifikant höher als im Alter von 1 Monat.

BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse konnten nach Mendelschen Verhältnissen gezüchtet werden und wiesen im Vergleich zu BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{+/+} Mäusen keinen Unterschied in Wachstum und Körpergewicht auf (Abbildung 10). Auch das Verhalten der gezüchteten Mäuse zeigte keine Auffälligkeiten.

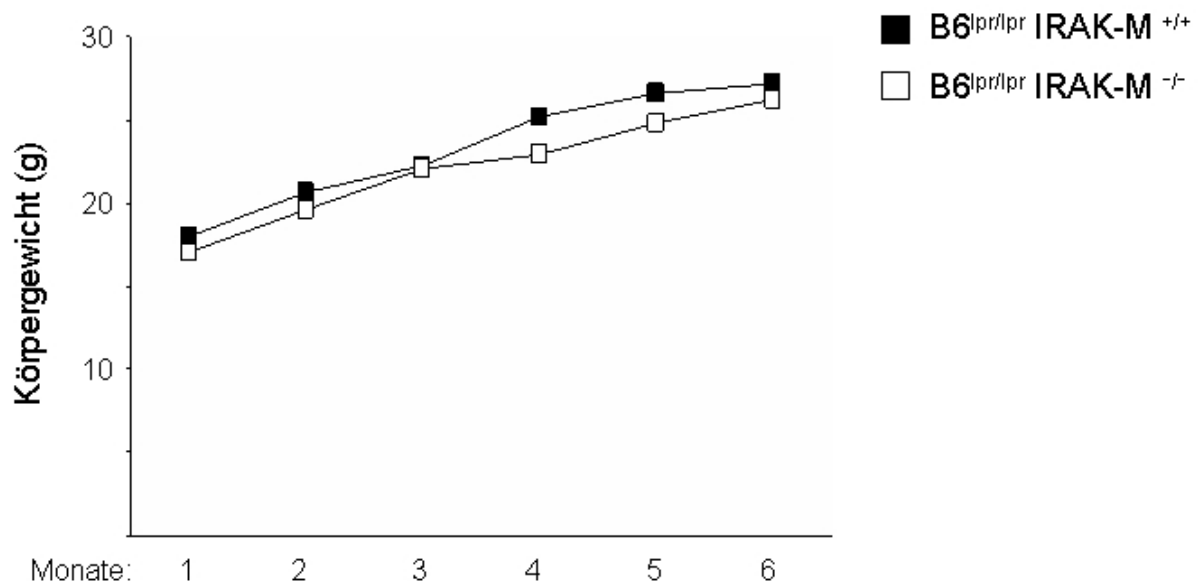


Abbildung 10: Zunahme des Körpergewichts von BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen in Abhängigkeit vom Lebensalter. Alle Tiere wurden monatlich gewogen. Dabei zeigte sich in Bezug auf Wachstum und Körpergewicht kein Unterschied zwischen beiden Gruppen.

Für die Analyse des Phänotyps der BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse wurden die Tiere über einen Zeitraum von 6 Monaten beobachtet. Ab dem Alter von 4 Monaten zeigten IRAK-M-defiziente Mäuse vergrößerte Lymphknoten im Bereich des Halses. Im Alter von 6 Monaten wiesen alle IRAK-M^{-/-} BL/6^{lpr/lpr} Mäuse stark vergrößerte zervikale Lymphknoten auf, die bereits äußerlich sichtbar waren, während dies bei keiner der BL/6^{lpr/lpr} Mäuse zu beobachten war (Abbildung 11A).

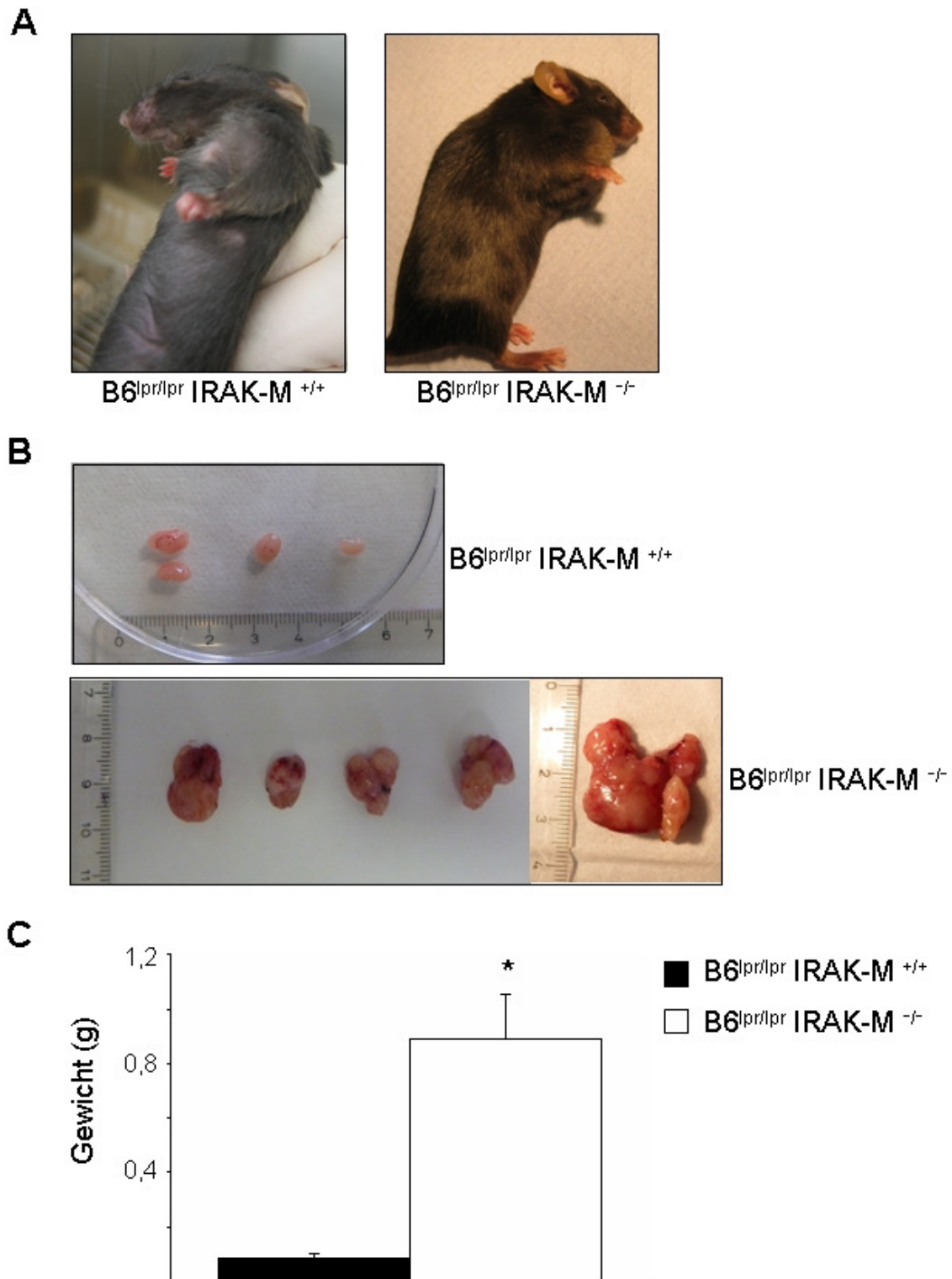


Abbildung 11: Lymphoproliferation in BL/6^{lpr/lpr} Mäusen im Alter von 6 Monaten. A: Alle IRAK-M -/-, jedoch keine IRAK-M +/+ BL/6^{lpr/lpr} Mäuse hatten stark vergrößerte, äußerlich sichtbare Halslymphknoten. B: Repräsentative zervikale Lymphknoten von 6 Monate alten Tieren. C: Lymphknotengewicht als Mittelwert von mindestens 12 Mäusen pro Gruppe.

Sowohl zervikal als auch mesenterial fanden sich in BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen massiv vergrößerte Lymphknoten in einer Größenordnung von 8 mm bis nahezu 2 cm, was sich in einem signifikant höheren Lymphknotengewicht im Vergleich zu lpr-Mäusen widerspiegelte (Abbildung 11B und 11C).

Zudem zeigte sich in IRAK-M-defizienten Mäusen eine Splenomegalie (Abbildung 12A). Sowohl die Größe als auch das Gewicht der Milzen von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen waren im Vergleich zu lpr-Mäusen signifikant erhöht (Abbildung 12B und 12C). Die Bestimmung der Gesamt-Zellzahl der Milzen mittels Durchflusszytometrie bestätigte die massive Lymphoproliferation (Abbildung 12C).

Die Histomorphologie von Milzen von 6 Monate alten Tieren offenbarte bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} eine Hyperplasie der Lymphfollikel mit Expansion der T-Zellen und dendritischen Zellen, während die B-Zell-Areale sich nicht von BL/6^{lpr/lpr} Mäusen unterschieden (Abbildung 13).

Das Fehlen von IRAK-M induziert also im Kontext eines zusätzlichen Lupus-Gens (lpr) eine schwere Lymphoproliferation.

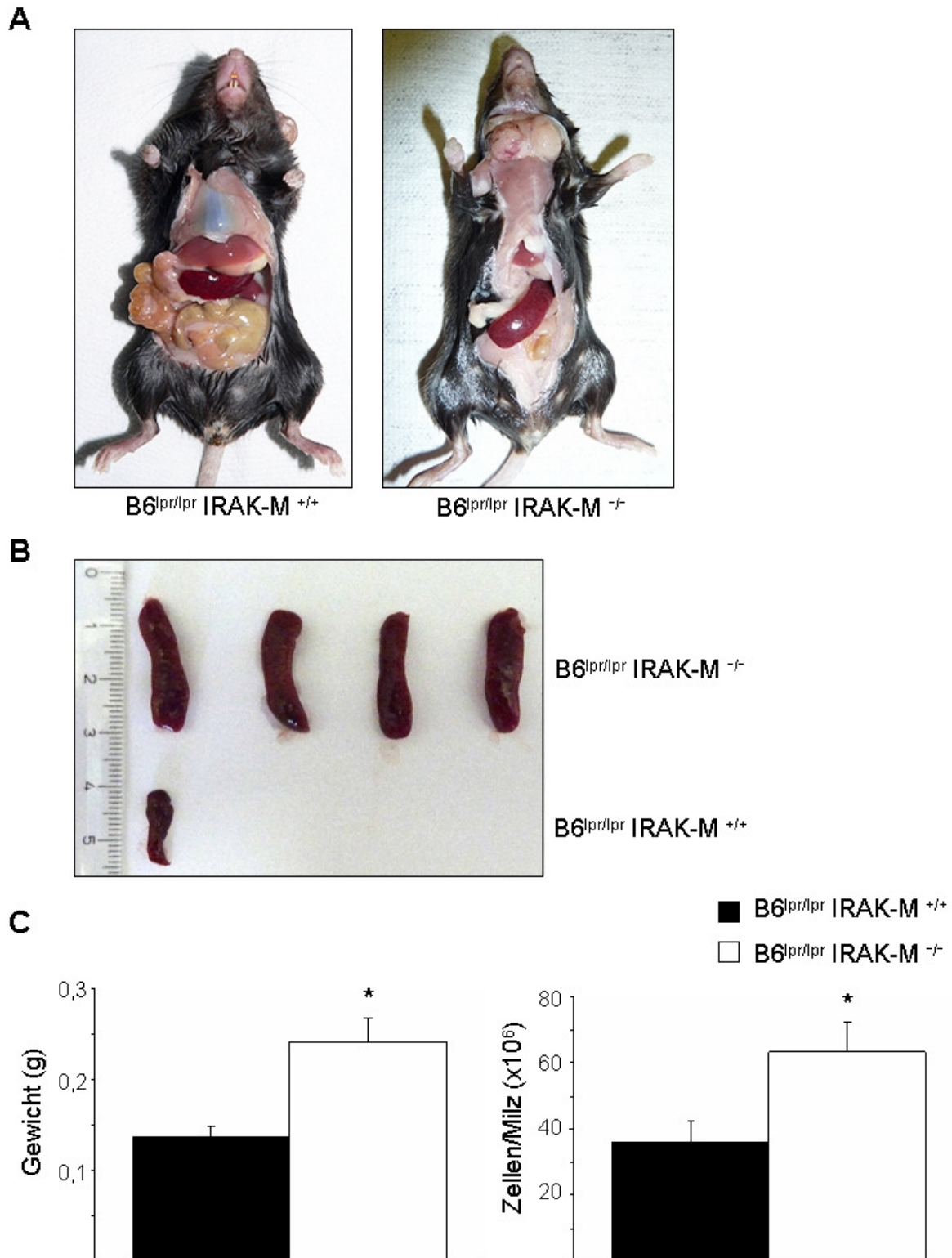


Abbildung 12: Splenomegalie in BL/6^{lpr/lpr} Mäusen. A: Repräsentative IRAK-M +/+ und IRAK-M -/- BL/6^{lpr/lpr} Mäuse im Alter von 6 Monaten. IRAK-M-defiziente Mäuse wiesen eine Hyperplasie zervikaler Lymphknoten sowie vergrößerte Milzen auf. B: Im Vergleich zu IRAK-M +/+ lpr-Mäusen waren die Milzen von IRAK-M -/- lpr-Mäusen deutlich vergrößert. C: Entsprechend waren sowohl das Milzgewicht als auch die mittels FACS bestimmte Gesamtzellzahl pro Milz signifikant höher.

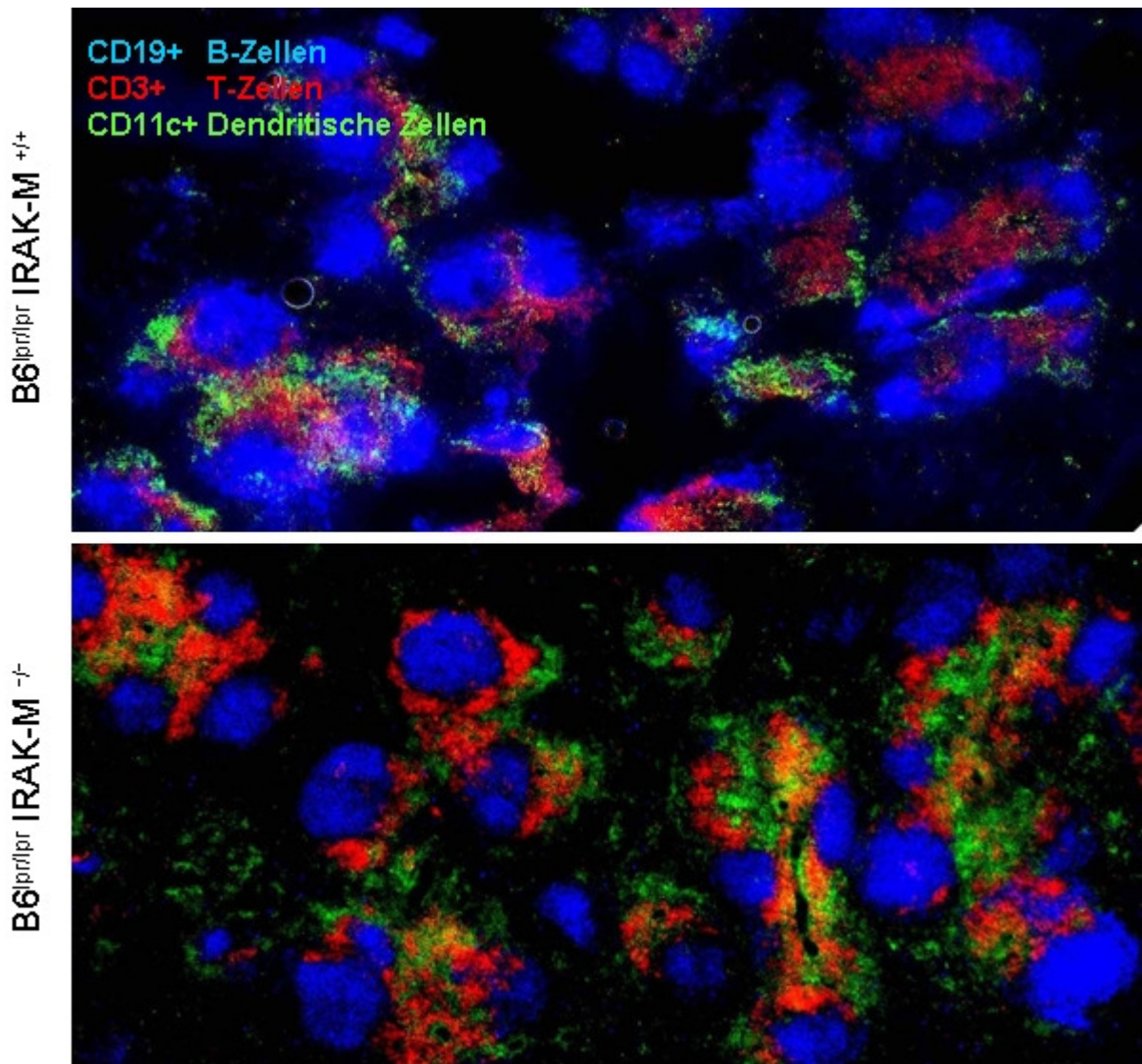


Abbildung 13: Immunfluoreszenzfärbung der Milz. Milzschnitte von 6 Monate alten $BL/6^{pr/pr}$ -Wildtyp und $-IRAK-M^{-/-}$ Mäusen sind in 100-facher Vergrößerung dargestellt. $IRAK-M$ -Defizienz ist mit der Expansion von T-Zellen ($CD3+$, rot) und dendritischen Zellen ($CD11c+$, grün), nicht aber von B-Zellen ($CD19+$, blau) assoziiert.

3.3 IRAK-M supprimiert die Aktivierung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen. Ihre Funktion im Immunsystem ist die Aufnahme als fremd erkannter Strukturen sowie die Prozessierung und Präsentation dieser Antigene. Durch die Expression von Rezeptoren und die Ausschüttung von Zytokinen interagieren sie mit T- und B-Zellen. DCs spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des SLE, da sie nicht nur Mikroorganismen, sondern auch Lupus-Autoantigene präsentieren, wodurch sie autoreaktive Lymphozyten aktivieren. Daher stellte sich die Frage, ob IRAK-M, das die TLR-Signalwege vor allem in Monozyten und Makrophagen moduliert,

auch einen Einfluss auf die Aktivierung von dendritischen Zellen hat. Mittels Durchflusszytometrie wurden CD11c+ dendritische Zellen aus der Milz charakterisiert. Bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen exprimierten signifikant mehr CD11c+ Zellen den Aktivierungsmarker CD40 als bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{+/+} Mäusen (Abbildung 14A). IRAK-M-Defizienz führte also zu einer vermehrten Aktivierung dendritischer Zellen. Um herauszufinden, ob dies mit einer vermehrten Expression immunregulatorischer Gene einherging, wurden CD11b+ dendritische Zellen isoliert und eine Realtime-PCR durchgeführt. IRAK-M-Defizienz in CD11b+ Splenozyten war mit einem erhöhten mRNA-Level der Zytokine IL-6, IL-12 und TNF- α und der Interferon- α -abhängigen Gene Mx1, TLR7 und TLR9 assoziiert (Abbildung 14B). Diese immunstimulatorischen Gene wurden also in der Tat vermehrt exprimiert. Interessanterweise war IFN- β mRNA vermindert. Die Expression von Baff und Bcl2, die das Überleben von B- und T-Zellen sichern, und von Bcl6 und Blimp1, die die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen fördern, war in IRAK-M^{-/-} DCs ebenfalls erhöht (Abbildung 14B). In Übereinstimmung mit vermehrter Aktivierung dendritischer Zellen fand sich bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen im Vergleich zu BL/6^{lpr/lpr} Mäusen ein erhöhter Blutspiegel von IL-12 (Abbildung 14C).

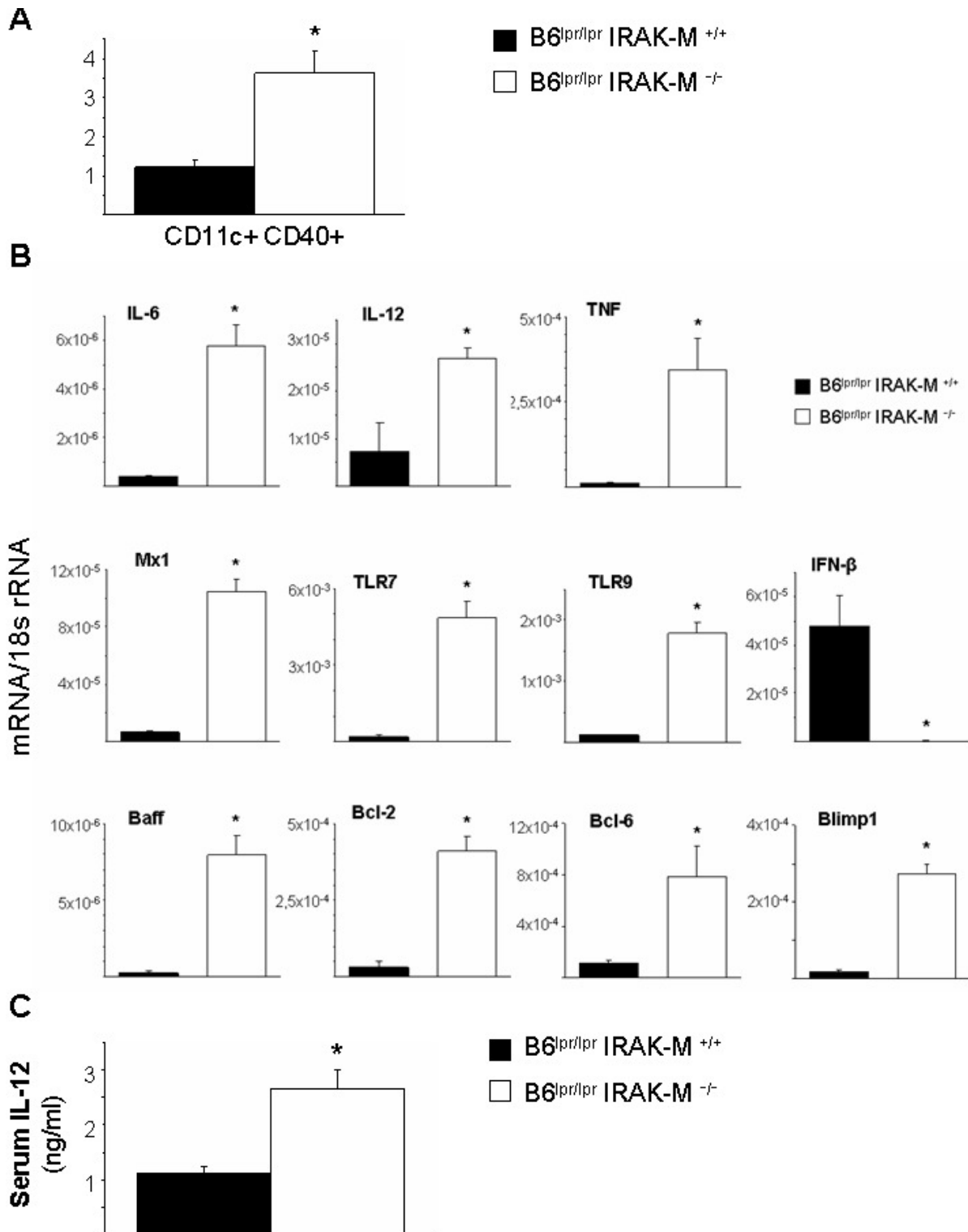


Abbildung 14: Aktivierung dendritischer Zellen in BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen. A: CD11c⁺ Zellen der Milz wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert, wobei die Expression des Oberflächenmoleküls CD40 als Marker für die Aktivierung der Zellen diente. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SEM von 10 Mäusen pro Gruppe. B: Aus CD11b⁺ Zellen der Milzen von BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen wurde RNA isoliert und eine Realtime-PCR durchgeführt. Die Daten sind als Verhältnis der spezifischen RNA zu 18s rRNA (Housekeeping-Gen) dargestellt. C: Blutproben von 6 Monate alten BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen wurden mit ELISA auf IL-12p40 untersucht. Die Daten sind Mittelwerte von mindestens 7 Tieren pro Gruppe.

3.4 IRAK-M und T-Zell-Populationen

Mittels Durchflusszytometrie wurden die T-Lymphozyten in der Milz untersucht. Dazu wurde eine Splenozytensuspension mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene CD3, CD4, CD8 und CD25 markiert und die T-Zell-Populationen hinsichtlich ihrer Zellzahl pro Milz analysiert. Im Einklang mit der beobachteten Expansion der T-Zell-Areale in der Milz (Abbildung 13) zeigte sich bei IRAK-M-defizienten *lpr*-Mäusen im Vergleich zu *BL/6^{lpr/lpr}*-Mäusen eine erhöhte Gesamt-T-Zellzahl (CD3+) sowie eine erhöhte Anzahl der CD4+, CD8+, CD4- CD8- „autoreaktiven“ und der CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen (Abbildung 15).

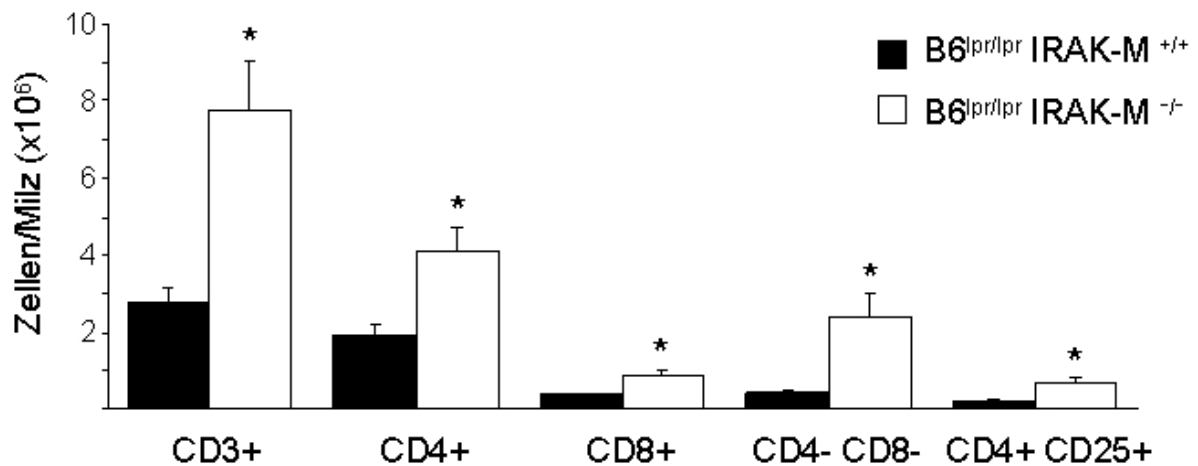


Abbildung 15: T-Zell-Populationen in der Milz. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anzahl der verschiedenen T-Zellen in Milzen 6 Monate alter Mäuse bestimmt. Bei IRAK-M-Defizienz waren alle Subklassen, nämlich CD3+ (T-Zellen gesamt), CD4+ (T-Helferzellen), CD8+ (zytotoxische T-Zellen), CD4- CD8- (autoreaktive T-Zellen) und CD4+ CD25+ (regulatorische T-Zellen) vermehrt. Das Histogramm zeigt Mittelwerte \pm SEM von 8 beziehungsweise 14 Mäusen pro Gruppe.

Sowohl CD4+ (T-Helferzellen) als auch CD8+ (zytotoxische) T-Zellen waren bei *BL/6^{lpr/lpr}* IRAK-M^{-/-} Mäusen signifikant vermehrt. Die Expansion der CD4+ T-Zellen beeinflusste dabei nicht das Gleichgewicht zwischen Th1- und Th2-Zellen. In IRAK-M-defizienten *BL/6^{lpr/lpr}* Mäusen war die mRNA-Expression der Th1-Marker T-bet und IFN- γ sowie der Th2-Marker GATA3 und IL-4 gleichermaßen verstärkt (Abbildung 16A). Die prozentuell stärkste Erhöhung der Zellzahl in Milzen von Mäusen zeigte sich bei CD4/CD8 doppeltnegativen T-Zellen (Abbildung 15). CD4- CD8- T-Zellen sind autoreaktive Zellen, die sich in kleiner Zahl in jedem gesunden Organismus nachweisen lassen, aber bei Autoimmunerkrankungen in verstärktem Maß auftreten. Überraschenderweise war auch die

Zahl der CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen erhöht, die im gesunden Organismus autoreaktive Zellen unterdrücken. Damit übereinstimmend war die Expression von FoxP3 mRNA in CD4+ CD25+ T-Zellen erhöht (Abbildung 16A). FoxP3 ist ein Transkriptionsfaktor, der eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen spielt und für diese ein spezifischer Marker ist. Es war fraglich, inwiefern sich die Expansion regulatorischer T-Zellen bei IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr}-Mäusen auf die Kontrolle der T-Zell-Proliferation auswirkte. Um dies zu beantworten, wurden aktivierte T-Effektor-Zellen aus der Milz beider Mausstämmen mit antigenpräsentierenden Zellen und einer steigenden Anzahl von CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen kultiviert. Während bei BL/6^{lpr/lpr} Mäusen die Proliferation der Effektor-T-Zellen mit steigender Anzahl der regulatorischen T-Zellen zunehmend gehemmt wurde, wiesen die IRAK-M-defizienten CD4+ CD25+ regulatorischen T-Zellen ein deutlich verringertes Potential auf, die T-Zell-Proliferation zu unterdrücken (Abbildung 16B). CD4+ CD25+ T-Zellen erfüllen demnach bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen ihre regulatorische Funktion nur unzureichend.

IRAK-M verhindert also in BL/6 lpr-Mäusen die Expansion sämtlicher T-Zell-Populationen, insbesondere von autoreaktiven T-Zellen, und erhält das Potential der regulatorischen T-Zellen, die T-Zell-Proliferation zu hemmen.

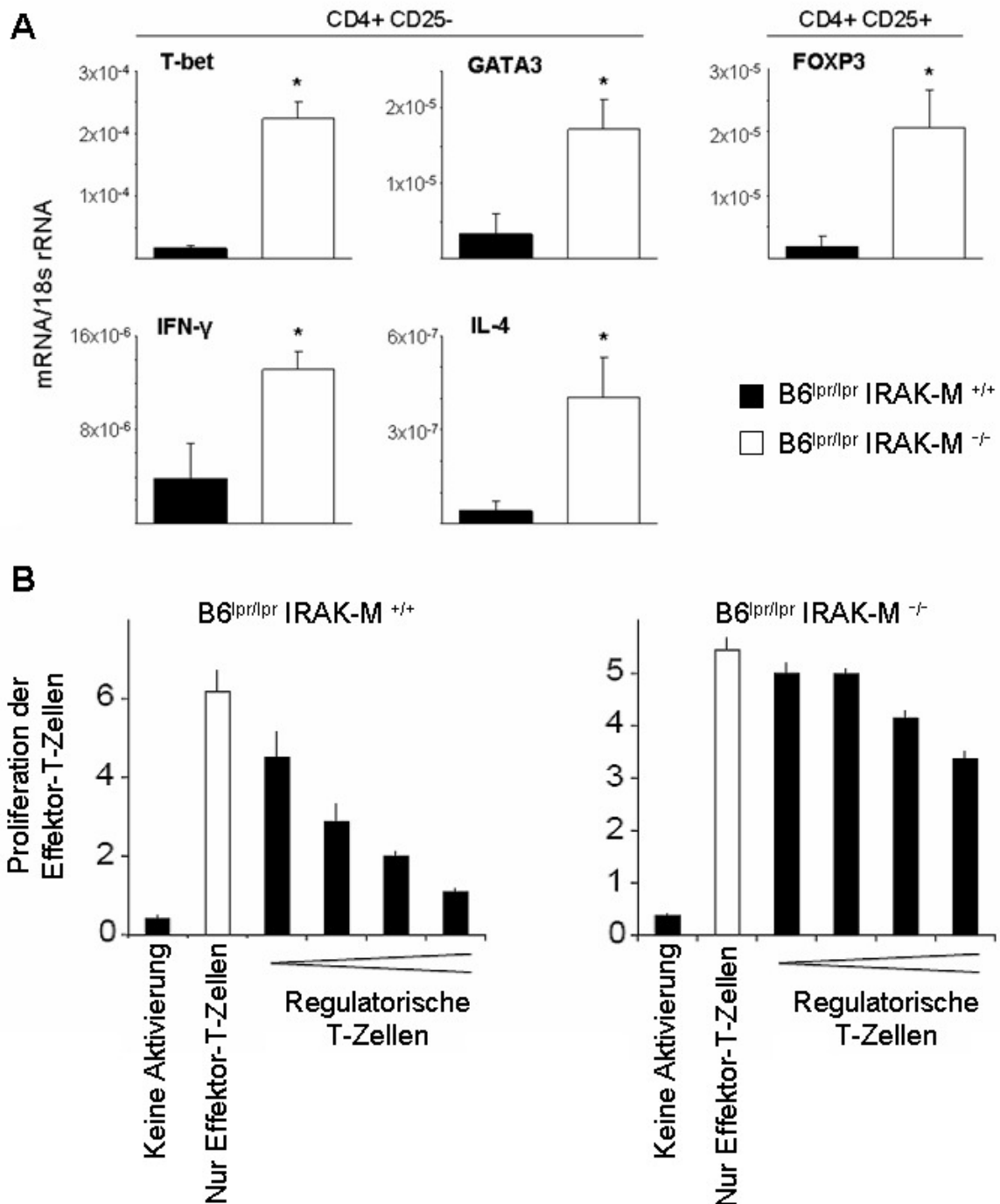


Abbildung 16: Einfluss von IRAK-M auf CD4+ T-Zellen. A: Aus der Milz von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M ^{+/+} und IRAK-M ^{-/-} Mäusen wurden CD4+ CD25- und CD4+ CD25+ Zellen isoliert. Aus diesen Zellen wurde mRNA isoliert und mittels Realtime-PCR analysiert. Die Daten sind als Mittelwert des Verhältnisses der spezifischen RNA zu 18s rRNA \pm SEM dargestellt. B: CD4+ CD25- T-Effektor-Zellen, CD4+ CD25+ regulatorische T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen wurden aus der Milz von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M ^{+/+} und IRAK-M ^{-/-} Mäusen isoliert. T-Effektor-Zellen wurden mit Anti-CD3-Antikörper aktiviert und in Anwesenheit von antigenpräsentierenden Zellen mit steigender Anzahl regulatorischer T-Zellen kultiviert. Nach 3 Tagen wurde die Proliferation der T-Effektor-Zellen mittels Durchflusszytometrie durch die Inkorporation von Bromdesoxyuridin (BrdU) bestimmt. BrdU diente als Marker proliferierender Zellen. Das Diagramm zeigt die mittlere BrdU-Fluoreszenz-Intensität von CD4+ FoxP3- T-Zellen. Die Fehlerindikatoren geben den SEM von n=3 an.

Um herauszufinden, ob bereits IRAK-M-Defizienz allein, also ohne Vorliegen der zusätzlichen *lpr*-Mutation, Einfluss auf die T-Lymphozyten hat, wurden in Milzen von BL/6 IRAK-M^{-/-} Mäusen im Alter von 6 Monaten die T-Zell-Populationen analysiert. Im Vergleich zu BL/6 IRAK-M^{-/-} Mäusen war bei BL/6^{*lpr/lpr*} IRAK-M^{-/-} Mäusen sowohl die Gesamt-T-Zellzahl (CD3+) als auch die Anzahl der T-Helferzellen (CD4+), autoreaktiven T-Zellen (CD4- CD8-) und regulatorischen T-Zellen (CD4+ CD25+) signifikant höher (Abbildung 17). Das Fehlen von IRAK-M führt also bei Mäusen ohne *lpr*-Mutation nicht zur Expansion von T-Zellen. Tritt IRAK-M-Defizienz jedoch zusammen mit dem Lupus-Suszeptibilitätsgen *lpr* auf, proliferieren sämtliche T-Zell-Populationen.

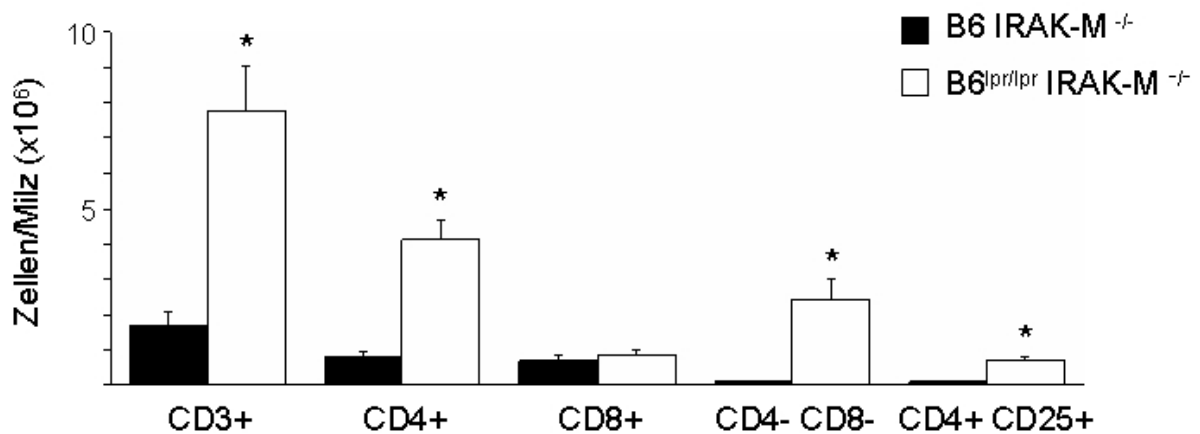


Abbildung 17: T-Zell-Populationen in der Milz von BL/6 IRAK-M^{-/-} Mäusen. Für die Analyse der T-Lymphozyten von 6 Monate alten Mäusen wurde die Durchflusszytometrie verwendet. IRAK-M-Defizienz führte nur bei zusätzlicher *lpr*-Mutation zu einer massiven Proliferation sämtlicher T-Zell-Populationen, insbesondere der autoreaktiven T-Zellen.

3.5 IRAK-M unterdrückt die Expansion von Plasmazellen

Die Charakterisierung der B-Lymphozyten in der Milz erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Dafür wurden Milzzellen mit Antikörpern gegen die Oberflächenantigene B220, IgM, IgD, CD21 und CD23 gefärbt. Dabei zeigte sich weder in der Gesamt-B-Zellzahl (B220+) noch in der Zahl reifer B-Zellen (B220+ IgM+ IgD+) ein Unterschied zwischen IRAK-M-defizienten und Wildtyp-*lpr*-Mäusen. Auch die Populationen von folliculären B-Zellen (B220+ CD21^{low} CD23^{high}) sowie Marginalzonen-B-Zellen (B220+ CD21^{high} CD23^{low}) unterschieden sich hinsichtlich der Anzahl von Zellen in der Milz beider Mausstämmen nicht signifikant. IRAK-M-Defizienz führte also nicht zur Proliferation reifer, folliculärer und Marginalzonen-B-Zellen. Die Anzahl von Plasmazellen, der Immunglobulin-bildenden Zellen, war hingegen in

der Milz von IRAK-M $-/-$ Mäusen signifikant erhöht. Dies lässt darauf schließen, dass IRAK-M die Proliferation von Plasmazellen unterdrückt (Abbildung 18).

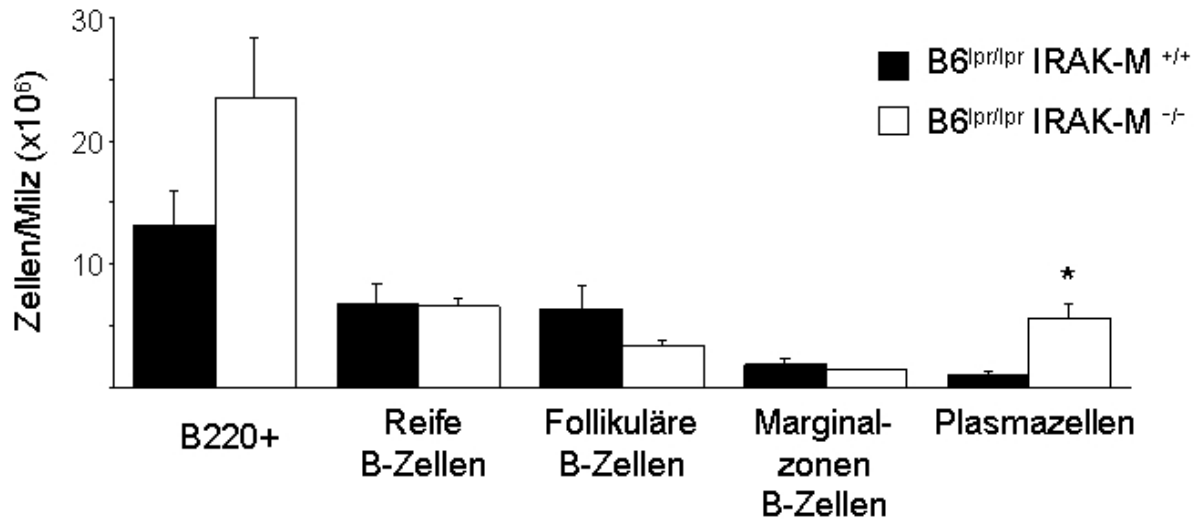


Abbildung 18: B-Zell-Populationen in der Milz. Mit Hilfe der Durchflusszytometrie wurde die Zahl der B-Zellen in Milzen von BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M $-/-$ Mäusen im Alter von 6 Monaten bestimmt. Bei B-Zellen gesamt (B220+), reifen B-Zellen (IgD+ IgM+), follikulären B-Zellen (CD21^{low} CD23^{high}) und Marginalzonen-B-Zellen (CD21^{high} CD23^{low}) zeigte sich kein Unterschied zwischen beiden Gruppen. Plasmazellen (CD138+ κ light chain+) waren bei IRAK-M-Defizienz signifikant vermehrt. Das Histogramm zeigt Mittelwerte \pm SEM von 8 – 14 Mäusen pro Gruppe.

Im Vergleich von BL/6 IRAK-M $-/-$ und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M $-/-$ Mäusen zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der Anzahl der gesamten B-Zellen (B220+) und der reifen B-Zellen (B220+ IgM+ IgD+). Die Anzahl der Antikörper-bildenden Plasmazellen war bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M $-/-$ Mäusen um ein Vielfaches höher als bei BL/6 IRAK-M $-/-$ Mäusen (Abbildung 19). IRAK-M-Defizienz ohne das Vorliegen zusätzlicher Lupus-Suszeptibilitäts-gene führt also nicht zur Plasmazell-Expansion. Im Kontext der lpr-Mutation unterdrückt IRAK-M jedoch die Proliferation von Plasmazellen.

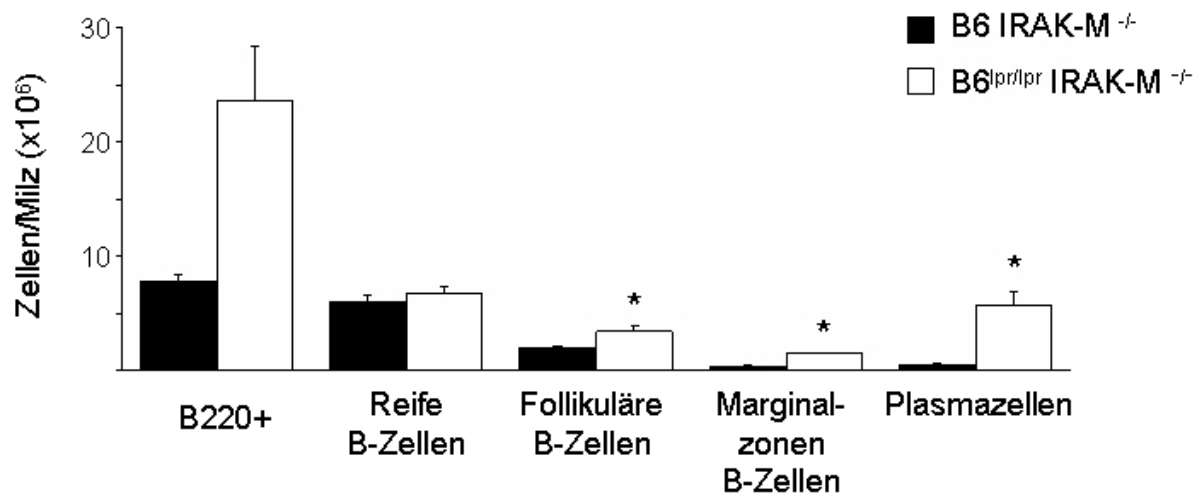


Abbildung 19: B-Zell-Populationen in der Milz von BL/6 IRAK-M^{-/-} Mäusen. Mittels Durchflusszytometrie wurde die Anzahl von B-Zellen in Milzen von 6 Monate alten BL/6 IRAK-M^{-/-} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen bestimmt. Bei IRAK-M^{-/-} Mäusen fand sich keine Proliferation der Plasmazellen, während IRAK-M-Defizienz bei zusätzlicher Mutation in dem Suszeptibilitätsgen *lpr* zu einer massiven Expansion der Plasmazellen führte.

3.6 IRAK-M unterdrückt die Produktion von Lupus-Autoantikörpern

Der Einfluss von IRAK-M auf die Aktivierung von dendritischen Zellen und die Proliferation von Plasmazellen könnte sich in der Produktion von Immunglobulinen, insbesondere von Antikörpern gegen Autoantigene widerspiegeln. Die Produktion von Antikörpern gegen körpereigene Strukturen ist typisch für Autoimmunerkrankungen. Solche Autoantikörper sind beim Lupus erythematoses am häufigsten gegen doppelsträngige DNA, snRNP, Smith-Antigen und IgG (Rheumafaktor) gerichtet. Um zu untersuchen, ob die Defizienz von IRAK-M die Autoantikörperproduktion von *lpr*-Mäusen beeinflusst, wurde in monatlichen Intervallen Blutplasma entnommen und mittels ELISA analysiert.

In der Tat entwickelten BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse im Vergleich mit BL/6 *lpr* Wildtyp eine stärkere Hypergammaglobulinämie. Die vermehrte Bildung von Immunglobulinen zeigte sich ab einem Alter von 4 Monaten und war im Alter von 6 Monaten signifikant (Abbildung 20A). Von den IgG-Subklassen waren bei 6 Monate alten Mäusen vor allem IgG_{2c} und IgG₃, nicht so sehr IgG_{2a} und IgG₁ erhöht (Abbildung 20B).

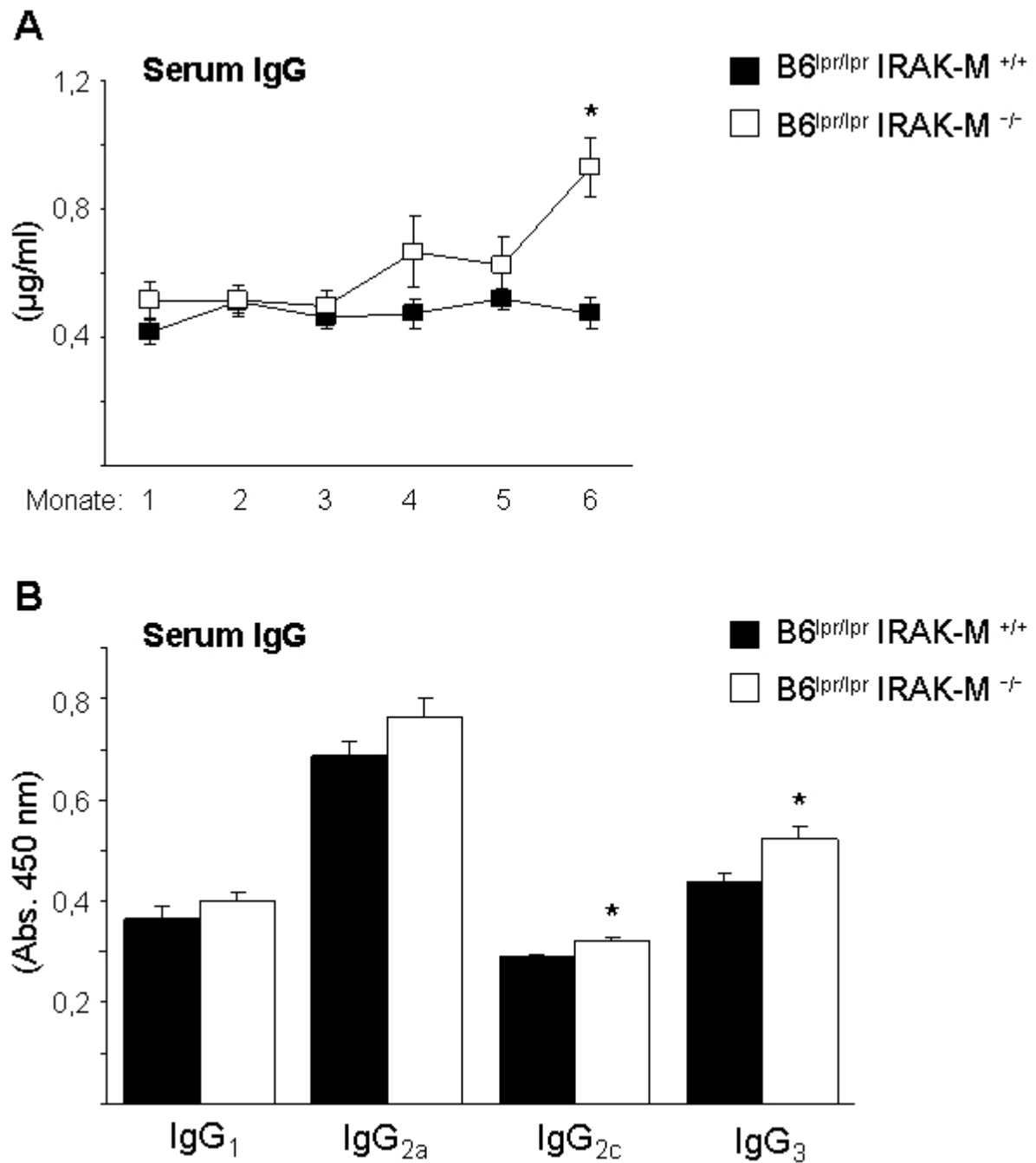


Abbildung 20: Immunglobulin G im Blut von BL/6^{lpr/lpr} Mäusen. A: BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen wurde in monatlichen Abständen Blut abgenommen. Mit ELISA wurde der Plasmaspiegel von Gesamt-IgG bestimmt. B: Im Blut von 6 Monate alten Mäusen wurden die IgG-Subklassen mit ELISA differenziert.

Als nächstes wurde der Einfluss von IRAK-M auf die Produktion von Autoantikörpern bei lpr-Mäusen im Zeitverlauf untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Produktion von Anti-Smith- und Anti-snRNP-Antikörpern sowohl bei BL/6^{lpr/lpr} als auch bei IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr} Mäusen von Monat zu Monat kontinuierlich zunahm, wobei der Anstieg bei letzteren deutlich stärker ausgeprägt war. Ab dem Alter von 5 Monaten wiesen IRAK-M-defiziente Mäuse einen signifikant höheren Blutspiegel von Anti-snRNP und Anti-Smith auf.

Anti-Nukleosomen-Antikörper ließen sich bei BL/6^{lpr/lpr} Mäusen in jedem Alter nur in geringem Ausmaß nachweisen, während das Fehlen von IRAK-M zu einem massiven Anstieg der Anti-Nukleosom-Produktion im 5. und 6. Lebensmonat führte. Die Produktion von Rheumafaktor, einem gegen IgG gerichteten Autoantikörper, nahm hingegen in beiden Gruppen bereits vom ersten Lebensmonat an kontinuierlich zu. 6 Monate alte IRAK-M-defiziente Mäuse wiesen im Vergleich zu BL/6^{lpr/lpr} Mäusen nur einen gering, nicht signifikant erhöhten Rheumafaktor-Blutspiegel auf (Abbildung 21).

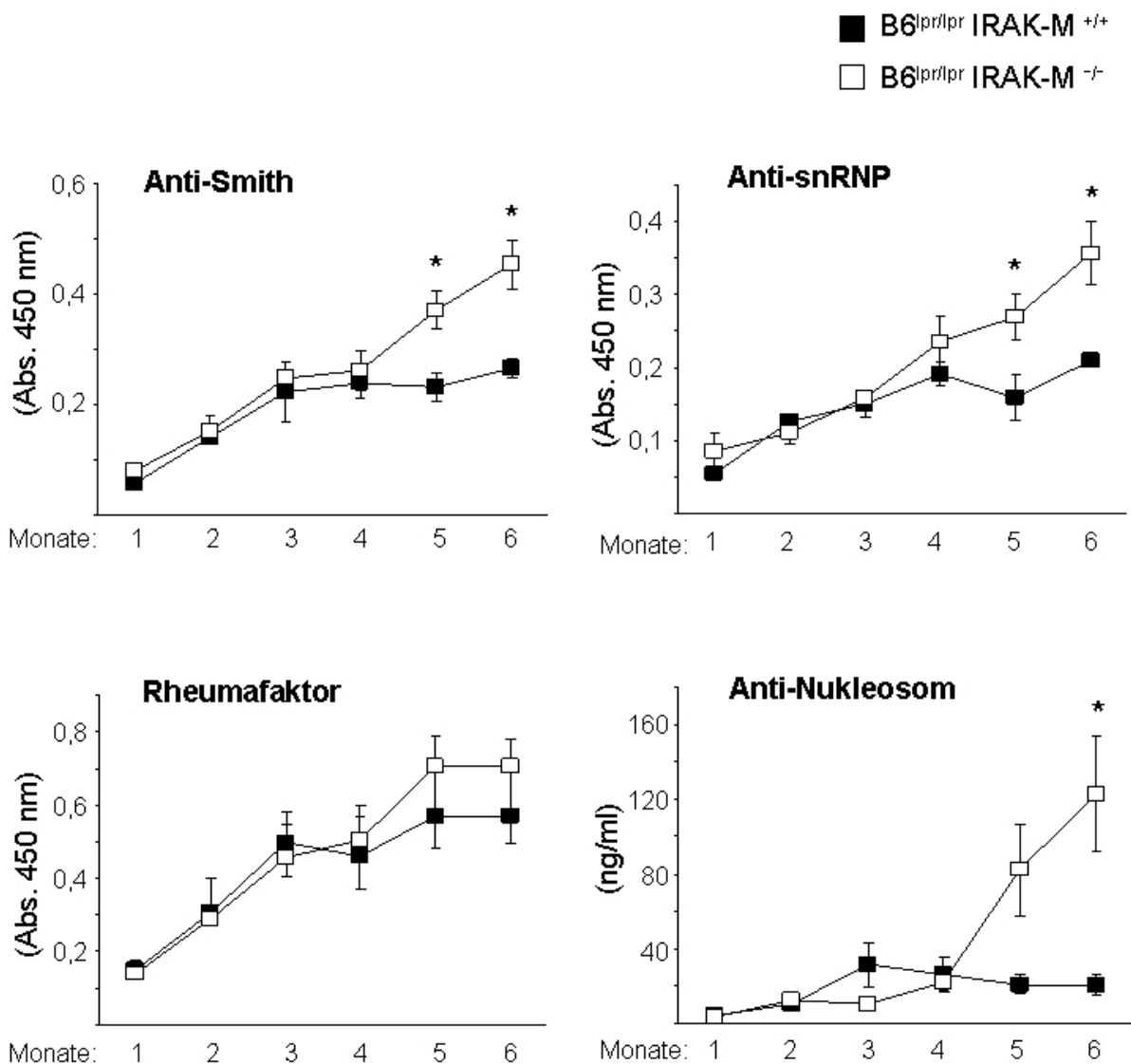


Abbildung 21: Blutplasma-Spiegel von Anti-Smith-, Anti-snRNP- sowie Anti-Nukleosom-Autoantikörpern und Rheumafaktor im Zeitverlauf. Den Mäusen wurde monatlich Blut abgenommen und mit ELISA auf verschiedene Lupus-Autoantikörper untersucht. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM von mindestens 6 Tieren pro Gruppe.

Autoantikörper gegen doppelsträngige DNA sind besonders charakteristisch für SLE. Gesamt-IgG-Antikörper gegen dsDNA stiegen im Blutplasma von BL/6^{lpr/lpr} Mäusen im Lauf der Monate nur leicht an, während IRAK-M-Defizienz in einem starken Anstieg ab dem 4. Monat und einem signifikant höheren Anti-dsDNA-Spiegel im Alter von 6 Monaten resultierte. Bei der Untersuchung der einzelnen IgG-Subklassen der Anti-dsDNA-Autoantikörper im Blutplasma von 6 Monate alten Mäusen zeigte sich, dass sowohl IgG₁ als auch IgG_{2a}, IgG_{2c} und IgG₃ Anti-dsDNA-Antikörper bei IRAK-M-defizienten Mäusen im Vergleich zu BL/6^{lpr/lpr} Mäusen erhöht waren (Abbildung 22).

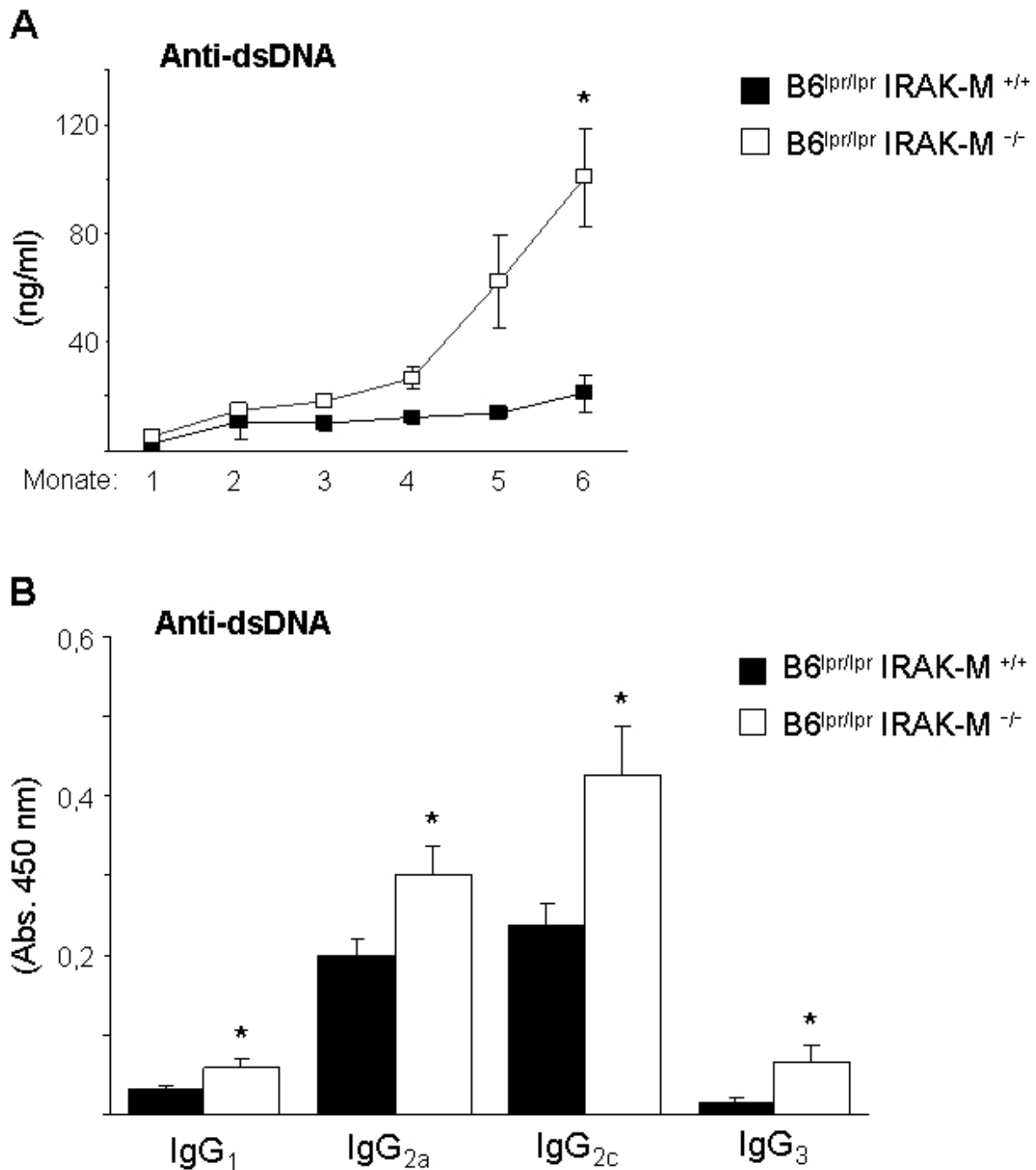


Abbildung 22: Blutspiegel von Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA. A: Anti-dsDNA-Antikörper (Gesamt-IgG) im Zeitverlauf. B: Die verschiedenen IgG-Subklassen der Anti-dsDNA-Antikörper wurden mit ELISA bei 6 Monate alten Mäusen analysiert.

Dabei stellte sich die Frage, ob allein das Fehlen von IRAK-M bereits die Entwicklung eines spontanen autoimmunen Syndroms nach sich zieht. Daher wurden 6 Monate alte IRAK-M-defiziente B6-Mäuse, die also keine *lpr*-Mutation aufwiesen, hinsichtlich der Produktion von Autoantikörpern untersucht. Bei diesen Mäusen konnten jedoch genau wie bei Wildtyp-Tieren keine erhöhten Spiegel von Anti-dsDNA-, Anti-Nukleosom-, Anti-snRNP- und Anti-Smith-Antikörpern nachgewiesen werden. Auch 12 Monate alte IRAK-M^{-/-} B6-Mäuse

wiesen keine Autoantikörper auf. IRAK-M-Defizienz ohne den Kontext der *lpr*-Mutation führt demnach nicht zu Autoimmunität und zur Produktion von Autoantikörpern gegen DNA (Abbildung 23).

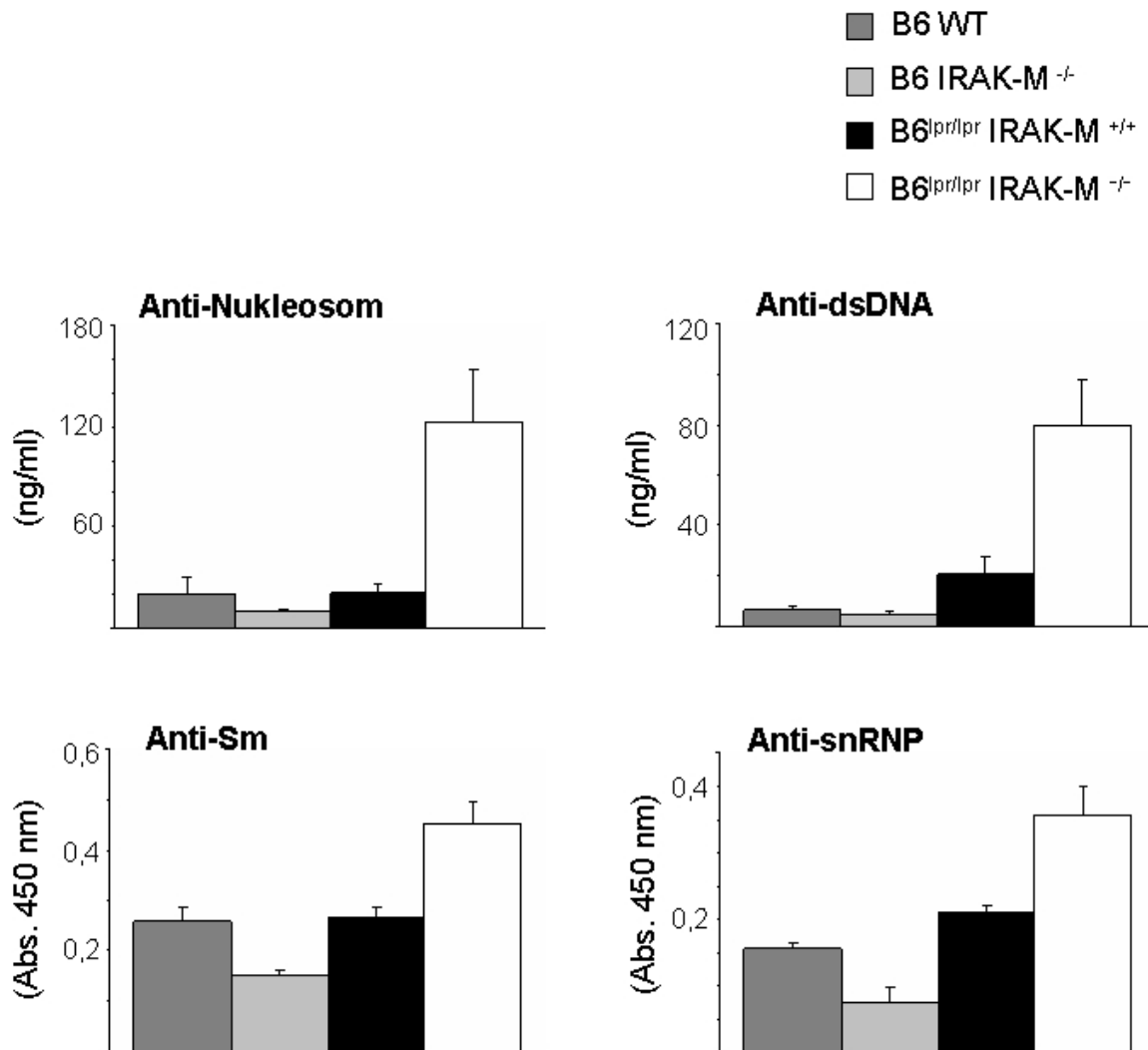


Abbildung 23: Autoantikörper bei BL/6 WT und BL/6 IRAK-M ^{-/-} Mäusen. Blutplasma von 6 Monate alten Mäusen wurde mittels ELISA auf Autoantikörper untersucht. IRAK-M-Defizienz ohne zusätzliche Mutation des Suszeptibilitätsgens *lpr* führte nicht zu einer vermehrten Produktion von Autoantikörpern gegen RNA- und DNA-Autoantigene.

IRAK-M unterdrückt also im Kontext des Suszeptibilitätsgens *lpr* eine Hypergammaglobulinämie sowie die Produktion von SLE-typischen Autoantikörpern gegen RNA- und DNA-Autoantigene.

3.7 IRAK-M schützt BL/6^{lpr/lpr} Mäuse vor autoimmuner Gewebsschädigung

IRAK-M führt zur Produktion von Autoantikörpern und beeinflusst also die systemische Autoimmunreaktion. Diese kann eine Schädigung von Gewebe nach sich ziehen, muss aber nicht zwangsweise damit assoziiert sein. Letztlich definiert sich der systemische Lupus erythematoses durch die entzündliche Schädigung von Geweben und inneren Organen. Daher wurden Nieren und Lungen auf autoimmune Läsionen untersucht, da diese Organe bei SLE sowohl beim Menschen als auch bei der Maus besonders betroffen sind.

Die Untersuchung der Lunge auf autoimmune Schädigung erfolgte anhand PAS-gefärbter histologischer Schnitte. BL/6^{lpr/lpr} Mäuse zeigten keine beziehungsweise nur vereinzelte Entzündungsinfiltrate um größere Bronchien. IRAK-M-defiziente BL/6^{lpr/lpr} Mäuse hingegen wiesen eine schwere Peribronchitis mit ausgedehnten Entzündungsinfiltraten und Ödem auf (Abbildung 24A). Dementsprechend betrug der Lungenschädigungs-Score $0,3 \pm 0,2$ für BL/6^{lpr/lpr} vs. $2,6 \pm 0,1$ für BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} (Abbildung 24B).

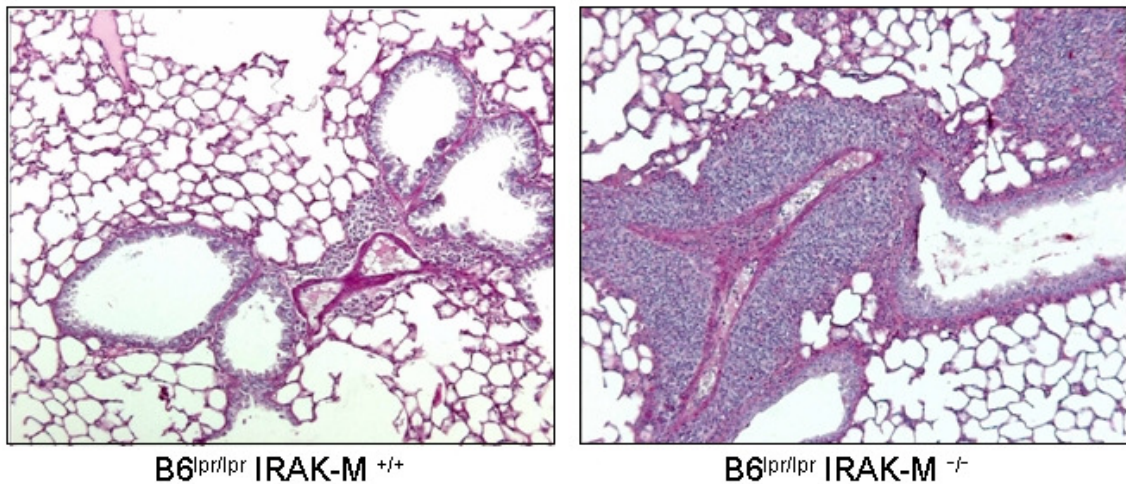
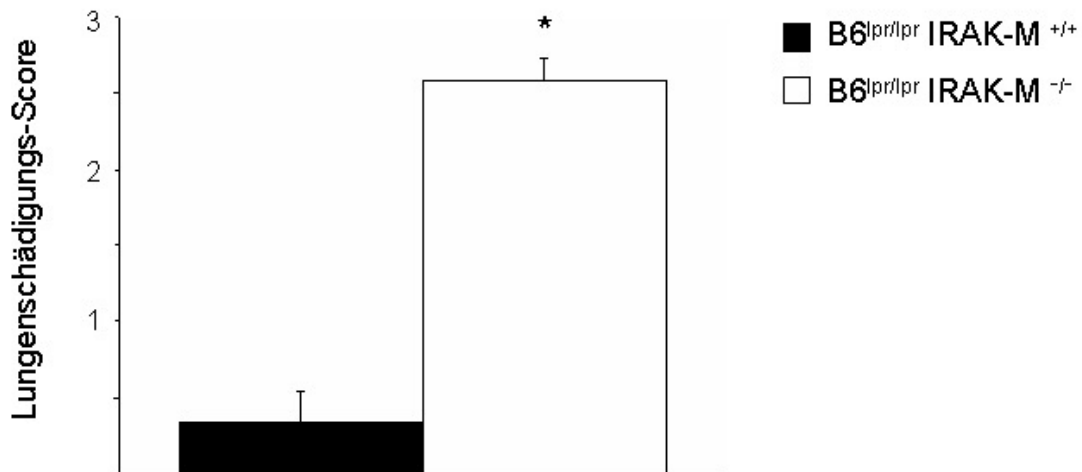
A Lunge, PAS-Färbung**B**

Abbildung 24: Autoimmune Gewebsschädigung der Lunge. A: Schnitte der Lunge von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M +/+ und IRAK-M -/- Mäusen wurden mit PAS gefärbt. Bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M -/- Tieren zeigen sich ausgeprägte Entzündungsinfiltrate. Die Bilder sind in 100-facher Vergrößerung dargestellt und sind repräsentativ für mindestens 12 Tiere pro Gruppe. B: Der semiquantitative Lungenschädigungs-Score bezieht das Ausmaß der Peribronchitis. Die Skala reicht von 0 (keine Entzündung) bis 3 Punkte (ausgedehnte Entzündungsinfiltrate um größere Bronchien).

Für die Bewertung der Nierenschädigung im Sinne einer Lupus-Nephritis wurden PAS-gefärbte Schnitte herangezogen. Nieren von Mäusen der Stämme BL/6 Wildtyp, BL/6 IRAK-M -/-, BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M +/+ sowie BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M -/- wurden auf glomeruläre und tubulointerstitielle Veränderungen untersucht. Dabei wiesen Nieren von BL/6 IRAK-M -/- Mäusen genauso wenig krankhafte Veränderungen auf wie die Vergleichs-Wildtyp-Tiere. IRAK-M-Defizienz ohne den Kontext der *lpr*-Mutation führte demnach nicht zu einer Organschädigung. BL/6^{lpr/lpr} Mäuse entwickelten eine milde Glomerulonephritis mit glomerulärer Zellproliferation und glomerulärer hyaliner Matrixbildung. Keines dieser Tiere

zeigte jedoch schwerere oder chronische Läsionen in Form von Sklerosierung, Nekrosen oder interstitieller Fibrose. IRAK-M-defiziente BL/6^{lpr/lpr} Mäuse hingegen entwickelten eine schwere diffuse mesangio-proliferative Glomerulonephritis mit glomerulärer Hyperzellularität, Leukozyten-Infiltration und hyaliner Matrixbildung (Abbildung 25A).

Meist fanden sich zudem glomeruläre Nekrosen, tubulointerstitielle Entzündungsinfiltrate und sklerosierte Glomeruli. Die schwere Nierenschädigung spiegelte sich sowohl im Aktivitäts- als auch im Chronizitäts-Index für Lupus-Nephritis wider. In den Aktivitätsindex fließen glomeruläre Zellproliferation, Entzündungsinfiltrate, Nekrosen, Halbmondbildung, Matrixexpansion sowie interstitielle Zellinfiltration ein. Der Index war $7,9 \pm 0,8$ für BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} und $3,4 \pm 0,4$ für BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{+/+}. Der Chronizitätsindex umfasst Glomerulosklerose, fibröse Halbmondbildung, interstitielle Fibrose und Tubularatrophie. Er betrug $1,4 \pm 0,2$ beziehungsweise $0,0 \pm 0,0$ (Abbildung 25B).

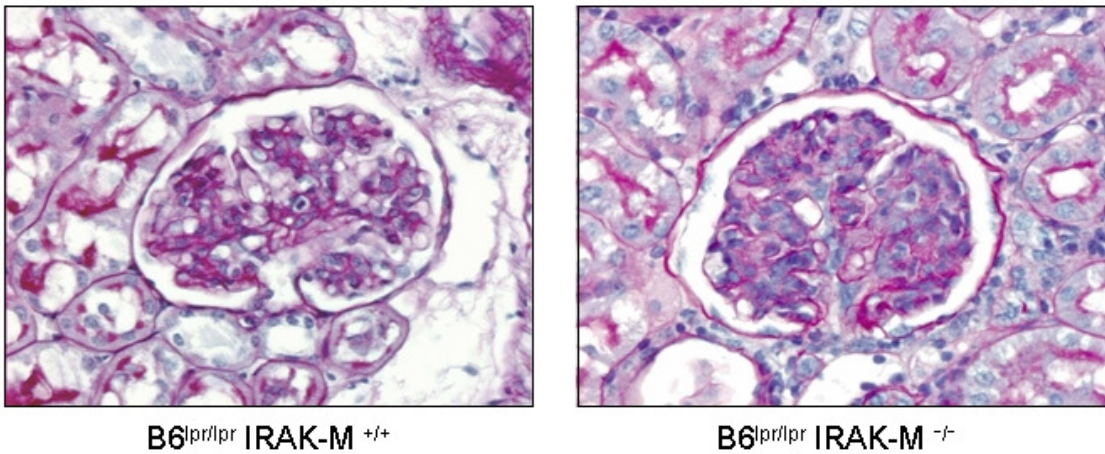
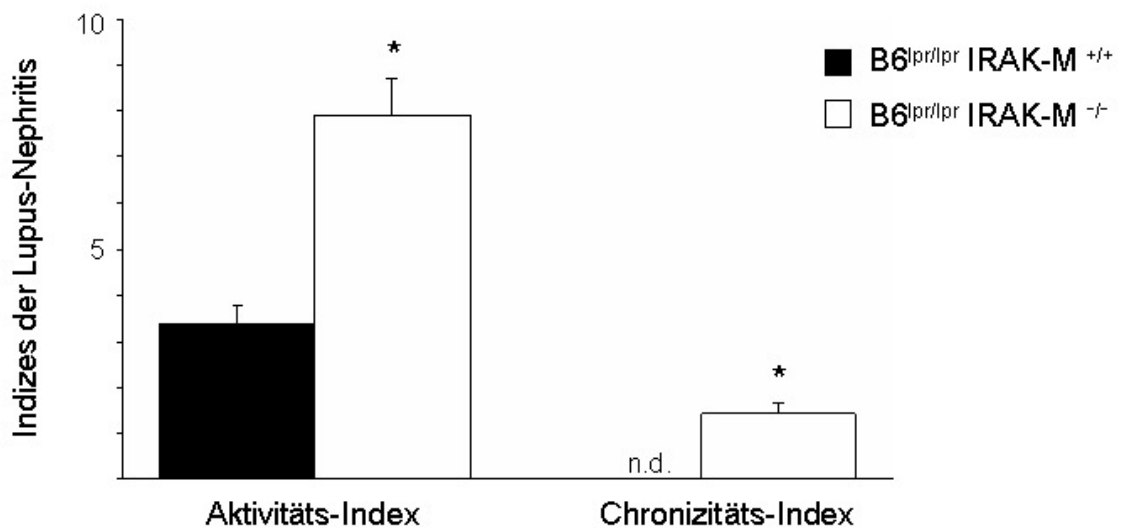
A Niere, PAS-Färbung**B**

Abbildung 25: Lupus-Nephritis in BL/6^{lpr/lpr} Mäusen. A: Schnitte der Nieren von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{+/+} und IRAK-M^{-/-} Mäusen wurden mit PAS gefärbt. Die in 400-facher Vergrößerung gezeigten Bilder sind repräsentativ für mindestens 12 Tiere pro Gruppe. B: Der Aktivitäts- und der Chronizitäts-Index der Lupus-Nephritis spiegeln die schwere Nierenschädigung der BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse wider. Der Chronizitäts-Index bei IRAK-M^{+/+} Mäusen betrug 0 (n.d. = nicht detektierbar).

3.8 IRAK-M-Defizienz erhöht die Sterblichkeit von BL/6^{lpr/lpr} -Mäusen

Um der Frage nachzugehen, ob sich IRAK-M-Defizienz bei BL/6^{lpr/lpr} Mäusen auf die Überlebenswahrscheinlichkeit auswirkt, wurde über einen Zeitraum von 12 Monaten eine Überlebenskurve erstellt. Dafür wurden jeweils 15 BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{+/+} und IRAK-M^{-/-} Mäuse weiblichen Geschlechts ein Jahr lang ohne Interventionen beobachtet. IRAK-M-defiziente BL/6^{lpr/lpr} Mäuse zeigten dabei eine deutlich höhere Sterberate. Die ersten IRAK-M^{-/-} Mäuse starben bereits im Alter von 10 Wochen; nach 8 Monaten war nur noch

die Hälfte dieser Mäuse am Leben. $BL/6^{lpr/lpr}$ Mäuse zeigten hingegen in Bezug auf die Überlebenszeit keinen Unterschied zu Wildtyp-Mäusen. Während für IRAK-M $+/+$ $BL/6^{lpr/lpr}$ Mäuse die Wahrscheinlichkeit, 12 Monate zu überleben, bei 100 % lag, betrug sie für IRAK-M $-/-$ $BL/6^{lpr/lpr}$ nur 37 %. Die Überlebensraten aller Mäuse wurden in einer Kaplan-Meier-Kurve dargestellt (Abbildung 26). IRAK-M-Defizienz führt also bei $BL/6^{lpr/lpr}$ Mäusen nicht nur zu systemischer Autoimmunität mit entzündlicher Mitbeteiligung und Schädigung innerer Organe, sondern wirkt sich auch in früherer Sterblichkeit aus.

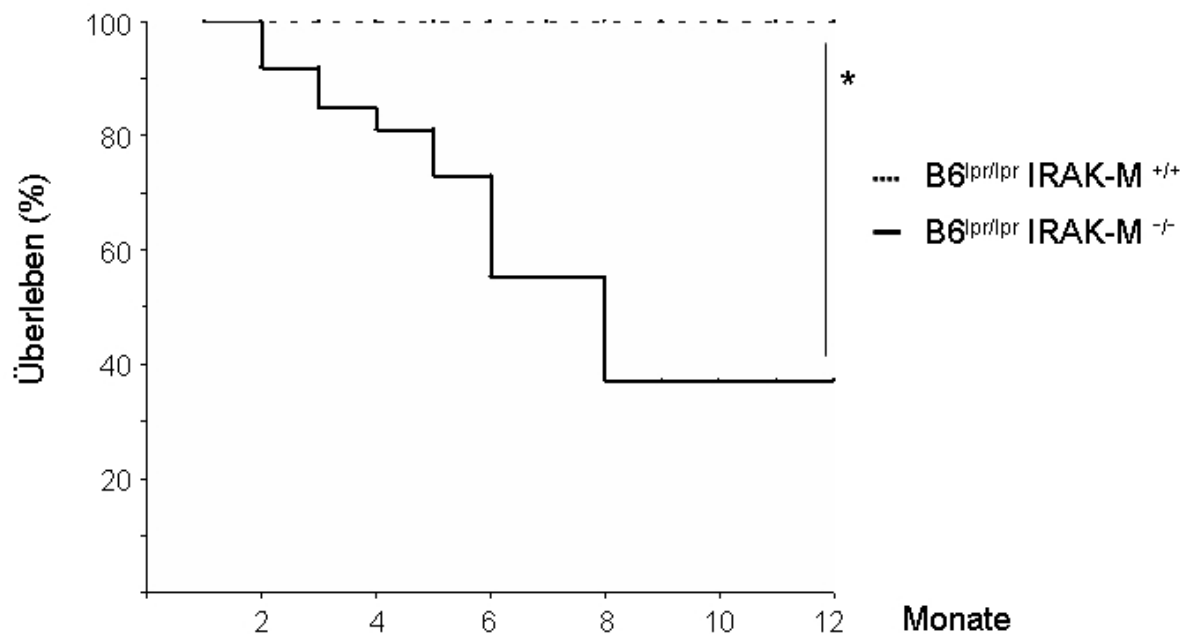


Abbildung 26: Überlebensraten von $BL/6^{lpr/lpr}$ Mäusen. Pro Genotyp wurden jeweils 15 Mäuse weiblichen Geschlechts 12 Monate lang beobachtet, wobei keine Interventionen vorgenommen wurden. Während alle $BL/6^{lpr/lpr}$ Mäuse ein Jahr überlebten, hatten $BL/6^{lpr/lpr}$ IRAK-M $-/-$ Mäuse nach 8 Monaten eine Überlebensquote von 50 %.

3.9 IRAK-M unterdrückt Autoimmunität durch Blockade der TLR7-Signalwege

Endogene Nukleinsäuren entfalten über TLR7 immunstimulatorische Effekte und spielen dadurch eine wichtige Rolle in der Pathogenese des Lupus erythematoses [88, 99]. Da IRAK-M die TLR-Signalwege inhibiert, könnte die bei IRAK-M-Defizienz beobachtete Aggravierung des SLE in $BL/6^{lpr/lpr}$ Mäusen hauptsächlich durch verminderte Blockade von TLR7 bedingt sein. Um dies zu prüfen, wurde bei $BL/6^{lpr/lpr}$ und $BL/6^{lpr/lpr}$ IRAK-M $-/-$ Mäusen das TLR7-Signalling blockiert und der Effekt auf den Krankheitsverlauf untersucht. Dafür wurden Mäuse beider Genotyps mit IRS 661 behandelt, einem Oligodesoxynukleotid, das den TLR7-Signalweg in vitro und in vivo inhibiert [78, 81]. Bei der Charakterisierung der

T-Lymphozyten in der Milz zeigte sich bei 6 Monate alten IRAK-M-defizienten *lpr*-Mäusen unter TLR7-Blockade keinerlei Expansion der T-Zell-Populationen, auch nicht der CD4-CD8- autoreaktiven T-Zellen (Abbildung 27). Sowohl die Gesamt-T-Zellzahl (CD3+) als auch die Anzahl der T-Helferzellen (CD4+), zytotoxischen T-Zellen (CD8+), autoreaktiven T-Zellen (CD4- CD8-) und regulatorischen T-Zellen (CD4+ CD25+) lag bei mit dem TLR7-Antagonisten behandelten IRAK-M-defizienten *lpr*-Mäusen im Bereich der BL/6^{*lpr/lpr*} IRAK-M +/+ Mäuse. Auf die T-Zell-Populationen bei BL/6^{*lpr/lpr*} IRAK-M +/+ Mäusen hatte die Blockade von TLR7 hingegen keinen Einfluss.

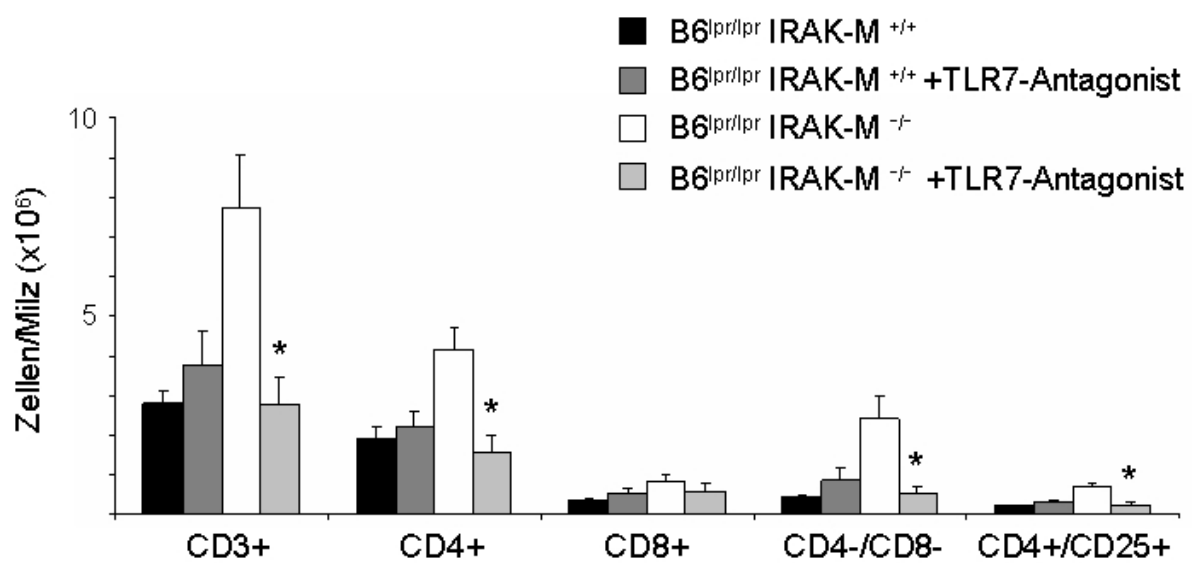


Abbildung 27: T-Zell-Populationen in der Milz unter TLR7-Blockade. BL/6^{*lpr/lpr*} und BL/6^{*lpr/lpr*} IRAK-M -/- Mäuse wurden mit einem TLR7-Antagonisten behandelt. Die T-Lymphozyten in der Milz dieser Tiere wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Das Diagramm zeigt Mittelwerte \pm SEM von 6-14 Mäusen pro Gruppe. Unter Blockade von TLR7 war die Anzahl der gesamten T-Zellen (CD3+), T-Helferzellen (CD4+), autoreaktiven T-Zellen (CD4- CD8-) und regulatorischen T-Zellen (CD4+ CD25+) bei BL/6^{*lpr/lpr*} IRAK-M -/- Mäusen signifikant niedriger als bei den Tieren ohne Behandlung und erreichte das Niveau von BL/6^{*lpr/lpr*} IRAK-M +/+ Mäusen.

Im Alter von 6 Monaten wurden die Tiere auf Organschädigung von Niere und Lunge untersucht. Während IRAK-M-defiziente BL/6^{*lpr/lpr*} Mäuse ohne Behandlung eine schwere mesangio-proliferative Lupusnephritis mit sklerosierten Glomeruli und Nekrosen aufwiesen, entwickelten sie unter TLR7-Blockade nur eine milde Glomerulonephritis (Abbildung 28A). Entsprechend waren sowohl der Aktivitäts-Index der Lupusnephritis, der glomeruläre Zellproliferation, Entzündungsinfiltrate und Nekrosen beinhaltet, als auch der Chronizitäts-Index, in den Glomerulussklerose, Fibrosierung und Tubularatrophie einfließen, bei BL/6^{*lpr/lpr*} IRAK-M -/- Mäusen mit TLR7-Antagonisten signifikant niedriger (Abbildung 28A). Die

Lunge von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen wies ohne Behandlung eine schwere, unter TLR7-Blockade eine äußerst leichte Peribronchitis auf (Abbildung 28B). Dies spiegelte sich im Lungenschädigungs-Score wider, der unter Behandlung mit dem TLR7-Antagonisten signifikant geringer war und das Niveau von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{+/+} Mäusen erreichte (Abbildung 28B). Auf den milden Lupus-Phänotyp von BL/6^{lpr/lpr} Mäusen hatte die Blockade von TLR7 in Bezug auf die Schädigung von Niere und Lunge jedoch nur einen geringen, nicht signifikanten Effekt.

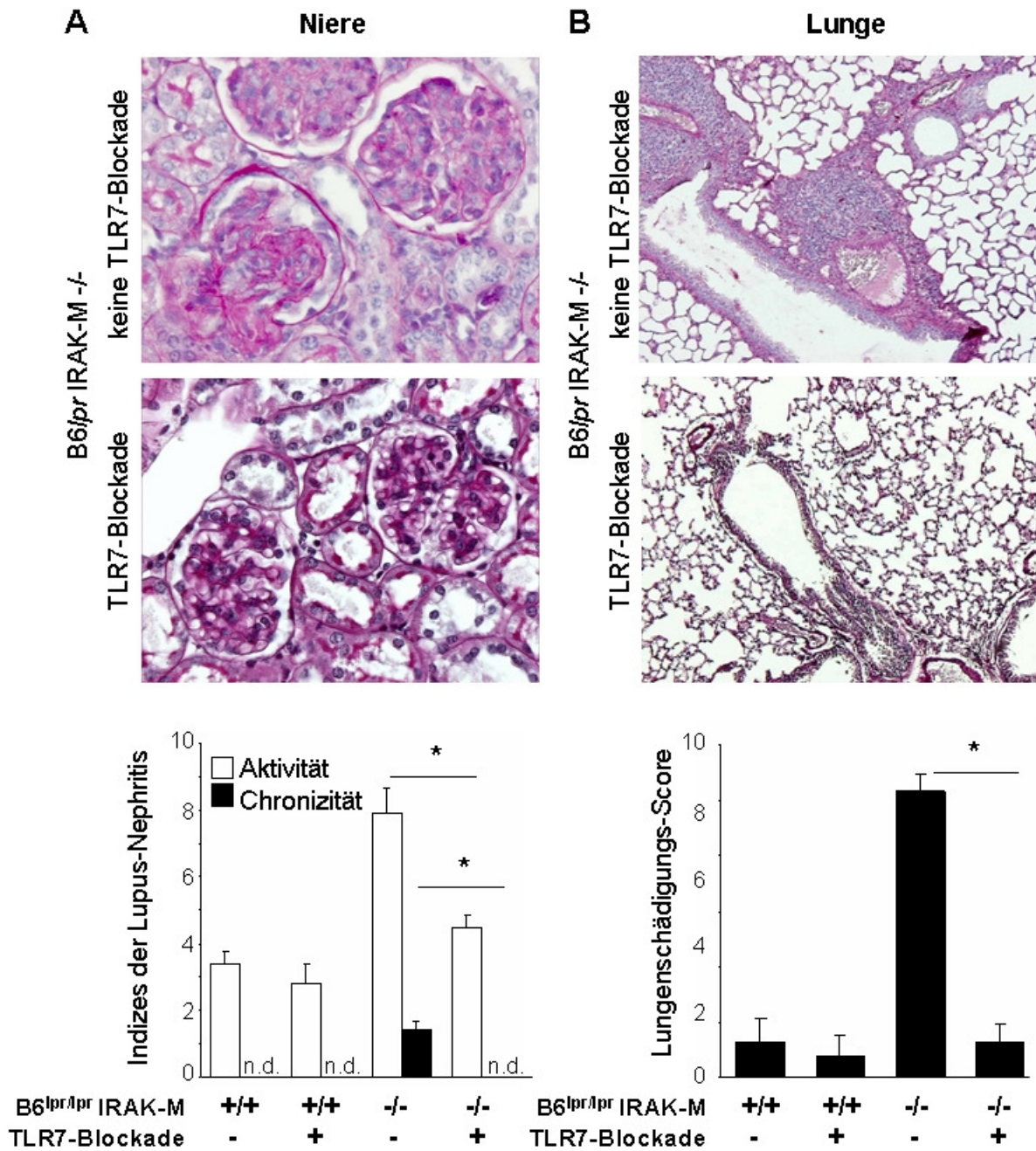


Abbildung 28: Einfluss der Blockade von TLR7 auf die Organschädigung bei IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr} Mäusen. Von Nieren (A) und Lungen (B) wurden Schnitte angefertigt und mit PAS gefärbt. Vergrößerung 400x (A) bzw. 100x (B). Die Bilder sind repräsentativ für 6 Mäuse pro Gruppe. Die Indizes der Lupus-Nephritis (A) und der Lungenschädigungs-Score (B) machen deutlich, dass die bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen beobachtete Organschädigung durch TLR7-Blockade gänzlich verhindert wurde.

Der aggravierte Phänotyp, der bei IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr} Mäusen zu beobachten war, die schwere Entzündung von Lunge und Nieren, war unter TLR7-Blockade völlig verschwunden. TLR7 ist demnach essentiell für die Organschädigung. Interessanterweise starb während der 6-monatigen Beobachtungszeit keine der mit dem TLR7-Antagonisten behandelten BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse, während nur 73 % der unbehandelten BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse 6 Monate überlebten (Abbildung 29). TLR7-Blockade verhindert bei IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr} Mäusen nicht nur Organläsionen, sondern auch die frühere Sterblichkeit.

Das Fehlen von IRAK-M führt zu einer verstärkten Aktivierung von TLR7 und aggraviert dadurch den SLE bei BL/6^{lpr/lpr} Mäusen. IRAK-M unterdrückt also Autoimmunität, indem es den TLR7-Signalweg inhibiert.

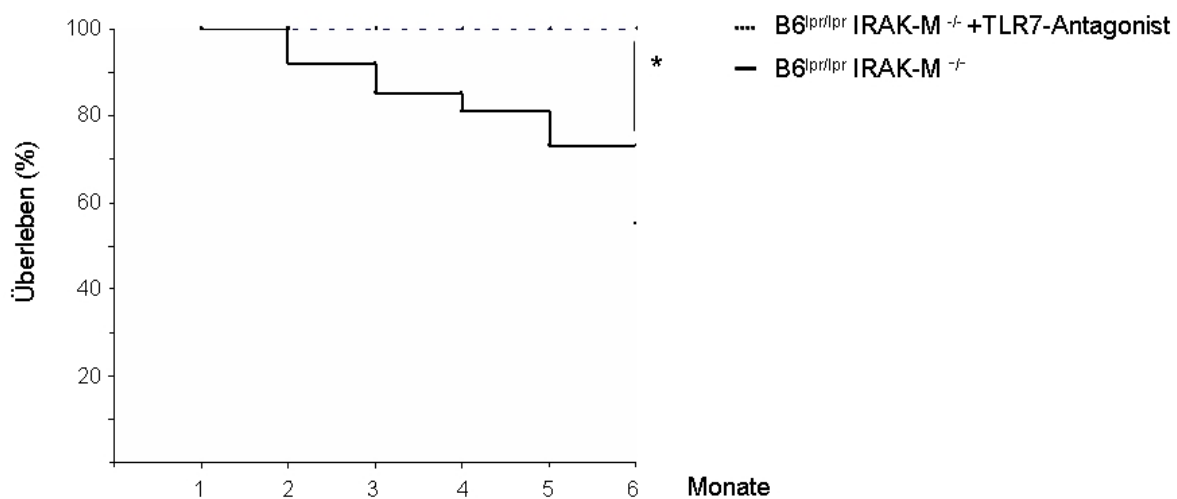


Abbildung 29: Überlebensraten von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen mit und ohne Blockade von TLR7. Alle BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse, die mit dem TLR7-Antagonisten behandelt wurden, überlebten die Beobachtungszeit, während nur 73 % der unbehandelten Tiere nach 6 Monaten noch am Leben waren.

4 Diskussion

Der Signalweg von TLR7, der durch virale RNA, aber auch durch RNA-Immunkomplexe aus RNA-Autoantikörpern und endogener RNA oder Ribonukleoproteinen angestoßen wird, führt zu einer Entzündungsreaktion und trägt damit zur Entstehung des systemischen Lupus erythematoses bei [99, 100]. IRAK-M fungiert als Inhibitor der TLR-Signalwege, vermindert die Expression proinflammatorischer Zytokine und Interferone und hemmt dadurch Entzündungsreaktionen. Daher lag die Vermutung nahe, dass IRAK-M Autoimmunität unterdrücken könnte. Die dargestellten Daten unterstützen diese Hypothese und zeigen, dass IRAK-M-Defizienz zu einem aggravierten Verlauf des SLE bei BL/6^{lpr/lpr} Mäusen mit massiver Lymphoproliferation, Aktivierung dendritischer Zellen, vermehrter Expression immunstimulatorischer Gene, Expansion autoreaktiver T-Zellen und Plasmazellen, Produktion von Autoantikörpern, autoimmuner Gewebsschädigung sowie erhöhter Sterblichkeit führt. Zudem konnte gezeigt werden, dass die spezifische Blockade von TLR7 diesen aggravierten autoimmunen Phänotyp gänzlich verhindert.

4.1 Bedeutung von IRAK-M in systemischer Autoimmunität

Der systemische Lupus erythematoses ist eine Autoimmunerkrankung, die durch Lymphoproliferation, Expansion autoreaktiver B- und T-Zellen und Produktion polyklonaler Autoantikörper gegen Nukleinsäuren und Chromatinpartikel gekennzeichnet ist [101]. Autoantikörper richten sich beim SLE in erster Linie gegen doppelsträngige DNA und Chromatin sowie gegen RNA-Autoantigene wie snRNP, wobei die SLE-spezifischen Antikörper gegen dsDNA besonders für die Schädigung von Geweben und Organen verantwortlich gemacht werden [102]. TLRs spielen eine entscheidende Rolle in der Pathogenese des SLE, da endogene Nukleinsäuren und Immunkomplexe aus RNA- und DNA-Autoantikörpern und -antigenen über TLR7 und TLR9 dendritische Zellen stimulieren, woraufhin diese inflammatorische Zytokine sezernieren [31, 100, 103]. Die Produktion von Autoantikörpern, die Ablagerung von Immunkomplexen und die Entzündungsreaktion in Folge der Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine durch gewebständige Immunzellen verursachen eine Schädigung von Blutgefäßen, Haut, Niere und zahlreichen anderen Organen.

Als Modell eines latenten Autoimmunsyndroms wurden C57BL/6^{lpr/lpr} Mäuse gewählt, da weibliche BL/6^{lpr/lpr} Mäuse Lupus-Autoantikörper bilden, aber keine schweren autoimmunen Gewebsschäden entwickeln [94]. In Übereinstimmung mit früheren Studien wiesen BL/6^{lpr/lpr} Mäuse in den hier beschriebenen Experimenten keine entzündliche Schädigung von Nieren oder Lunge auf [94, 104]. Andere gut untersuchte Mausstämmen, die ein spontanes Lupus-ähnliches Autoimmunsyndrom entwickeln, sind MRL^{lpr/lpr} Mäuse, die ebenfalls die *lpr*-Mutation im Fas-Rezeptor-Gen tragen, und der BXSb-Stamm, der das Autoimmun-Gen *Yaa* auf dem Y-Chromosom trägt [105]. Der Vorteil der *lpr*-Mäuse im Hintergrund C57BL/6 gegenüber dem häufiger untersuchten Mausstamm MRL^{lpr/lpr} liegt in der langsamen Entwicklung des Autoimmunsyndroms und dessen milder Ausprägung. Die Wahl von *lpr*-Mäusen im genetischen Hintergrund C57BL/6 erlaubte zudem die einfache Einkreuzung von IRAK-M-defizienten BL/6 Mäusen, wodurch BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse gezüchtet und vermehrt werden konnten. Durch das Einführen von IRAK-M-Defizienz in BL/6^{lpr/lpr} Mäuse verschlimmerte sich ihr autoimmuner Phänotyp hinsichtlich der Produktion von Autoantikörpern und der entzündlichen Schädigung innerer Organe in dramatischer Weise. Beides trat früher auf und war zu dem definierten Zeitpunkt von 6 Monaten stärker ausgeprägt.

IRAK-M-Defizienz allein löste jedoch keine Autoimmunität in BL/6 Mäusen aus. In BL/6 IRAK-M^{-/-} Mäusen fand sich weder eine erhöhte Anzahl autoreaktiver T-Zellen oder Plasmazellen noch konnten im Blut Autoantikörper gegen DNA- oder RNA-Autoantigene nachgewiesen werden. Massive Lymphoproliferation, entzündliche Organschäden oder erhöhte Sterblichkeit traten bei diesen Tieren nicht auf. IRAK-M wirkt also im Verbund mit der *lpr*-Mutation eher als modifizierendes oder verstärkendes Gen. Offenbar reicht die *lpr*-Mutation, die einen Defekt des für Apoptose zuständigen Rezeptors Fas verursacht, aus, um einen Verlust der Selbst-Toleranz und damit die Entwicklung von Autoimmunität zu bewirken. Für die Entstehung einer manifesten Autoimmunerkrankung mit Organläsionen ist jedoch mindestens ein weiteres prädisponierendes Gen wie beispielsweise dysfunktionelles IRAK-M nötig.

Diese Daten stehen in Einklang mit vorangegangenen Studien, die TLR9- oder SIGIRR-Defizienz in BL/6^{lpr/lpr} Mäuse einführen [85, 90]. Beides führte zu einer verstärkten Produktion von Autoantikörpern und zu einer Aggravierung des autoimmunen Phänotyps. Es ist beachtenswert, dass sowohl TLR9- als auch SIGIRR-Defizienz Autoimmunität in Lupus-Mäusen verstärken, indem sie den TLR7-Signalweg in antigenpräsentierenden Zellen wie beispielsweise dendritischen Zellen fördern [87, 88, 90]. Selbiges können die gezeigten

Ergebnisse auch in Bezug auf IRAK-M nachweisen. Bei BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen fanden sich sowohl eine vermehrte Anzahl als auch eine vermehrte Aktivierung dendritischer Zellen. Zudem zeigte sich eine vermehrte Expression immunstimulatorischer Gene, beispielsweise der Zytokine TNF- α und IL-12 oder Interferon-abhängiger Gene wie Mx1 und TLR7. In mehreren Arbeiten konnte die Bedeutung von TLR7 in der Entstehung von Autoimmunität sowie als möglicher Angriffspunkt neuer therapeutischer Strategien gezeigt werden. Ribonukleoproteine wie U1snRNP sowie RNA-Immunkomplexe sind endogene Liganden von TLR7 und aktivieren genau wie virale RNA dendritische Zellen und B-Zellen über TLR7 [103, 106, 107]. Somit ist der TLR7-Signalweg bei der Expression von Zytokinen, Typ I-Interferonen und durch Interferon induzierter Gene beteiligt. Indem er dendritische Zellen und andere antigenpräsentierende Zellen aktiviert, trägt TLR7 zudem zur verstärkten Präsentation von Autoantigenen bei, wodurch die für Autoimmunität typischen autoreaktiven T- und B-Zellen aktiviert werden [100, 108]. Diese führen letztendlich zur autoimmunen Schädigung von Geweben und Organen. Der Vergleich von BL/6^{lpr/lpr} und BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen zeigte auf, dass all das soeben Erwähnte auch auf den BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Genotyp zutraf. IRAK-M-Defizienz führte zur Exazerbation des SLE in BL/6^{lpr/lpr} Mäusen mit massiver Produktion von Autoantikörpern, schweren Organläsionen und erhöhter Mortalität. Da die Blockade von TLR7 mit einem spezifischen Antagonisten den aggravierten autoimmunen Phänotyp von BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen vollständig verhinderte, kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass IRAK-M-Defizienz Autoimmunität verstärkt, indem es die Signaltransduktion über TLR7 steigert.

Die Überexpression von TLR7 geht mit der Produktion von antinukleären Antikörpern (ANAs) und einer Lupus-ähnlichen Erkrankung in Mäusen einher [82, 83]. Im Gegensatz dazu zeigen TLR7-defiziente MRL^{lpr/lpr} Mäuse weniger Lymphoproliferation, eine verminderte Aktivierung dendritischer Zellen und weniger autoimmune Schädigung von Lunge und Nieren [80]. Darüber hinaus führt die Blockade von TLR7 mit dem synthetischen Oligodesoxyribonukleotid IRS 661, das als immunregulatorische Sequenz spezifisch TLR7 inhibiert, zu einer erheblichen Reduktion der autoimmunen Organläsionen [81]. MRL^{lpr/lpr} Mäuse, die mit einem TLR7-Inhibitor behandelt wurden, ähneln also hinsichtlich des Phänotyps TLR7-defizienten Tieren. IRS 661 reduziert zudem die Anzahl autoreaktiver T-Zellen in der Milz signifikant [81]. Diese Zellpopulation expandiert in MRL^{lpr/lpr} Mäusen kontinuierlich, da in diesen Tieren autoreaktive Zellen nicht über die Interaktion des Apoptose-Rezeptor Fas mit dem Fas-Liganden zerstört werden können [94]. TLR7 beziehungsweise TLR9 sind nötig, um Autoantikörper gegen Nukleinsäuren oder

Nukleinsäurepartikel wie snRNP oder dsDNA zu bilden [80, 109]. In Übereinstimmung damit war der Spiegel von Anti-snRNP und Anti-dsDNA im Blutplasma von MRL^{lpr/lpr} Mäusen nach Behandlung mit dem TLR7-Inhibitor IRS 661 vermindert [81]. Die hier dargestellten Daten stehen in Einklang mit diesen Studien. Es gelang der Nachweis, dass IRAK-M-Defizienz in BL/6^{lpr/lpr} Mäusen das Autoimmunsyndrom aggraviert, indem es die Signaltransduktion über TLR7 steigert. Durch Behandlung der BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse mit IRS 661 wurde der exazerbierte autoimmune Phänotyp vollständig verhindert. Die Blockade von TLR7 führte zu einer erheblichen Reduktion der autoreaktiven T-Zellen sowie der autoimmunen Organschädigung. Damit bestätigt sich die Bedeutung von TLR7 in der Entstehung von Autoimmunität nicht nur bei MRL^{lpr/lpr}, sondern auch bei IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr} Mäusen.

Die Rolle von TLR9 in der Pathogenese des SLE erschien lange Zeit komplex. TLR9 erkennt als Liganden DNA und DNA-Immunkomplexe, beispielsweise aus dsDNA und Anti-dsDNA-Autoantikörpern [78]. In vitro ähnelt die Datenlage der von TLR7, das heißt TLR9-Defizienz führte in vitro zur Abschwächung von Entzündungsreaktionen. Bei TLR9-defizienten Mäusen zeigte sich jedoch ein aggravierter SLE mit verstärkter Produktion von Autoantikörpern und autoimmunen Organläsionen [80, 84, 85]. Inzwischen weiß man, dass TLR9-Defizienz Autoimmunität aggraviert, indem die Signaltransduktion über TLR7 in dendritischen Zellen verstärkt wird [87, 88]. Wie die Daten dieser Arbeit zeigen, trifft der gleiche Mechanismus auf IRAK-M zu – IRAK-M-Defizienz aggraviert den SLE durch Aktivierung der TLR7-Signalkaskade. Lupus-Mäuse, bei denen sowohl TLR7 als auch TLR9 inhibiert wurden, entwickelten dementsprechend ein abgeschwächtes Autoimmunsyndrom, da das TLR7-Signalling bei diesen Tieren trotz TLR9-Defizienz nicht gesteigert ist. [81, 87]. Der gleiche Phänotyp lässt sich bei Blockade nur von TLR7 beobachten [81].

Die Bedeutung der Aktivierung von TLRs in der Pathogenese des SLE scheint also gut belegt. IRAK-M ist jedoch an weiteren Pathomechanismen beteiligt, die im SLE aberrant sind. IRAK-M reguliert die Induktion der Typ I-Interferone. Zahlreiche Studien konnten nachweisen, dass die Aktivierung insbesondere von IFN- α eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Lupus erythematoses innehat [110, 111].

Neue Erkenntnisse über die Aktivierung von Viruserkennungsrezeptoren durch endogene Nukleinsäuren und deren Bedeutung in der Pathogenese des SLE führen zum Konzept der pseudoviralen Immunreaktion [108]. Im gesunden Organismus verhindern verschiedene Mechanismen, dass körpereigenes Chromatin und Ribonukleoprotein-Partikel Rezeptoren wie TLR7 und TLR9 aktivieren, die virale Nukleinsäuren erkennen sollen. Dazu gehören

beispielsweise das Vorkommen von Chromatin nur im Zellkern, wo es keine Viruserkennungsrezeptoren gibt, sowie die rasche Beseitigung apoptotischer Zellen, sodass das Immunsystem und insbesondere antigenpräsentierende Zellen körpereigenen Nukleinsäuren gar nicht erst exponiert sind. Die Struktur der menschlichen DNA, die wenig immunstimulatorische CG-Motive enthält, sowie epigenetische Modifizierungen verhindern eine Bindung an TLRs. Bekannte genetische SLE-Risikofaktoren beeinträchtigen diese Mechanismen, die normalerweise das immunstimulatorische Potential endogener Nukleinsäurepartikel maskieren [10, 112]. Auf dem Boden genetischer Defekte können körpereigenes Chromatin und Ribonukleoproteine Rezeptoren aktivieren, die für die Erkennung viraler Nukleinsäuren zuständig sind [108]. Dadurch werden antigenpräsentierende Zellen aktiviert und induzieren die Expression von Zytokinen und Typ I-Interferonen. Diese zentralen Mediatoren der antiviralen Immunität spielen im SLE eine ähnliche proinflammatorische Rolle. Dies erklärt die Überlappung von klinischen Manifestationen und Immunpathologie bei systemischer viraler Infektion und SLE. Chromatin, Histone, Ribonukleoproteinpartikel und Immunkomplexe aus endogenen Nukleinsäuren und DNA- oder RNA-Autoantikörpern ähneln in ihrer Struktur viralen Bestandteilen und besitzen ein ähnlich starkes immunstimulatorisches Potential. Sie aktivieren antigenpräsentierende Zellen und lösen dadurch antigen-spezifische B- und T-Zell-Antworten sowie die Expansion autoreaktiver Lymphozyten aus. Somit wird durch genetische Defekte ermöglicht, dass endogene Nukleinsäuren gewissermaßen eine pseudoantivirale Immunreaktion hervorrufen [108].

IRAK-M wurde als Inhibitor der TLR-Signalkaskade beschrieben. IRAK-M blockiert den TLR4-Signalweg, indem es die Aktivierung von IRAK-1 und IRAK-4 verhindert, die beide essentielle Bestandteile der TLR4-MyD88-Signalkaskade sind [57]. TLR7 und TLR9 bedienen sich desselben MyD88-abhängigen Signalwegs [13]. Dies steht in Einklang mit den oben aufgeführten Ergebnissen, dass IRAK-M-defiziente Monozyten der Milz nach Stimulation sowohl mit TLR4-Liganden als auch mit TLR7- und TLR9-Agonisten in vitro erhöhte Spiegel der proinflammatorischen Zytokine TNF- α und IL-6 produzieren. Auch andere Studien konnten nach Hemmung von IRAK-M in RAW-Makrophagen ein gesteigertes TLR2- und TLR7-Signalling nachweisen [113]. TLR2 stößt ebenfalls dieselbe Signalkaskade über MyD88 an wie TLR7. Zudem konnte gezeigt werden, dass eine wiederholte Exposition mit TLR7-Agonisten die Induktion von IRAK-M nach sich zog, wodurch die Entzündung von Nervengewebe in einem Enzephalomyelitis-Mausmodell unterdrückt wurde [71]. Eine entzündliche Erkrankung konnte also dadurch gemildert werden, dass über die

Hochregulation von IRAK-M eine Toleranz von TLR7 induziert wurde. Diese Studie lässt erahnen, dass IRAK-M eine inhibitorische Rolle bei Autoimmunität und damit verbundener entzündlicher Organschädigung innehaben könnte.

Als Risikogen in der Pathogenese des SLE wurde kürzlich IRAK-1 identifiziert [91]. Im Modell mit Mäusen, die ein Lupus-Suszeptibilitätsgen trugen, schützte IRAK-1-Defizienz die Tiere vor der Manifestation des Autoimmunsyndroms. Beim Menschen waren SNPs im IRAK-1-Gen mit der Entstehung des SLE assoziiert [91]. Die hier gezeigten Daten stehen in Einklang mit dieser Studie, da IRAK-M das TLR-Signalling inhibiert, indem es die Aktivierung von IRAK-1 und IRAK-4 verhindert und so die Signalkaskade über MyD88 unterbricht [57]. Interessanterweise ist IRAK-1 auf dem X-Chromosom kodiert. Bisher machte man in erster Linie die Sexualhormone für den Unterschied in der Häufigkeit des SLE zwischen Männern und Frauen verantwortlich. Östrogene binden an Rezeptoren der B- und T-Zellen, aktivieren diese und begünstigen so eine vermehrte Produktion von Immunglobulinen und eine stärkere Immunantwort [6]. Der Geschlechtsunterschied könnte aber zum Teil auf Gene zurückzuführen sein, die wie IRAK-1 auf den Geschlechtschromosomen lokalisiert sind.

4.2 Bedeutung von IRAK-M bei entzündlichen Erkrankungen des Menschen

Die Bedeutung von IRAK-M im SLE bei der Maus zieht die Frage nach sich, ob IRAK-M auch ein relevantes Gen im Lupus des Menschen sein könnte. Bereits in früheren Arbeiten konnte ein Zusammenhang zwischen einer reduzierten Funktion von IRAK-M und dem Auftreten entzündlicher Erkrankungen beim Menschen nachgewiesen werden. Es wurde gezeigt, dass einige loss-of-function SNPs im humanen IRAK-M-Gen mit juvenilem persistierendem Asthma assoziiert sind [75].

Als SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) bezeichnet man in der Bevölkerung häufig vorkommende Variationen einzelner Basenpaare in der DNA, gewissermaßen eine Art Punktmutation. Meist handelt es sich um einen Austausch von Cytosin gegen Thymin, da Cytosin in der DNA häufig methyliert vorliegt und durch spontane Desaminierung in Thymin umgewandelt wird. Treten SNPs in kodierenden Abschnitten der DNA auf, können sie zum Austausch einer Aminosäure und damit zur Veränderung des Proteins bis hin zu dessen Funktionsverlust führen. Zu einem Funktionsverlust von Proteinen kommt es bei sogenannten *loss-of-function* SNPs. Solche Polymorphismen tragen häufig zur Entstehung von Krankheiten bei.

Polymorphismen des IRAK-M-Gens erhöhen demnach das Risiko, im Kindesalter an Asthma bronchiale zu erkranken [75]. Dies weist darauf hin, dass IRAK-M entzündliche Erkrankungen beim Menschen unterdrückt. In welcher Weise IRAK-M in die Entwicklung atopischer Erkrankungen involviert ist, ist jedoch noch nicht ganz klar. TLRs spielen eine entscheidende Rolle in der Aktivierung des Immunsystems und in der Entstehung entzündlicher Erkrankungen der Lunge [114]. IRAK-M wird nach TLR-Stimulation induziert und hemmt die Entzündungsreaktion [58, 65]. Die Aktivierung von TLRs hielt man vorrangig für mit der Initiierung einer Th1-Antwort verbunden. Diese könnte vor einer Asthma-Sensibilisierung schützen, aber auch Asthma-Symptome verschlimmern, wenn die allergische Erkrankung bereits ausgebrochen ist [115]. Neuere Studien weisen darauf hin, dass die Aktivierung von TLRs auch Th2-Zytokine und die Entwicklung eines experimentellen Asthmas induzieren könnte [116, 117]. Auch die Exposition gegenüber dem TLR4-Liganden Lipopolysaccharid in Dosen, wie sie auch in der Umwelt vorkommen, löst eine Th2-Antwort aus [118]. Einige Studien konnten eine Assoziation zwischen SNPs in verschiedenen TLRs und dem Auftreten von atopischen Erkrankungen wie Asthma nachweisen [119]. Eine Fehlregulation der TLR-Signalwege scheint also in der Pathogenese allergischer Erkrankungen von Bedeutung zu sein; daraus lässt sich vermuten, dass das gleiche auch auf Autoimmunität zutrifft.

Bei Studien des biomedizinischen Instituts Lopez-Neyra aus Granada / Spanien in Verbindung mit eigenen Laborarbeiten wurden eine spanische Kohorte von mehr als 800 Lupus-Patienten und 1200 gesunde Kontrollpersonen auf drei bekannte loss-of-function SNPs im IRAK-M-Gen untersucht. Bei Lupus-Patienten zeigte sich im Vergleich zu gesunden Kontrollen eine signifikant erhöhte Häufigkeit der seltener vorkommenden Allele zweier SNPs. Variationen im IRAK-M-Gen erhöhen demnach beim Menschen das Risiko, an Lupus erythematoses zu erkranken. IRAK-M könnte also nicht nur bei der Maus, sondern offenbar auch beim Menschen ein relevantes SLE-Risikogen sein. Andere Studien untersuchten Polymorphismen von TLR7 und TLR9 bei SLE-Patienten und gesunden Probanden in einer brasilianischen Population. Dabei zeigten SNPs in den Genen von TLR7 und TLR9 eine Assoziation mit dem Auftreten des SLE, sodass auch TLR7 und TLR9 als genetische Risikofaktoren beim Menschen identifiziert werden konnten [120]. In ähnlicher Weise könnten Polymorphismen der Gene IRF5 und STAT4 an der Pathogenese des Lupus erythematoses beteiligt sein. Diese Gene, die an der Regulation derselben Signalwege wie TLR7 und IRAK-M mitwirken, wurden in genomweiten Assoziationsstudien als SLE-Risikogene identifiziert [112, 121].

4.3 Genetische Risikofaktoren des SLE

Die Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses ist noch nicht vollständig geklärt. Das Zusammenspiel von genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren führt zu einem Toleranzverlust des Immunsystems, was in einer systemischen Entzündungsreaktion mit äußerst variabler Manifestation an inneren Organen resultiert. Als gesicherte Umweltfaktoren, die die Entstehung des SLE triggern, gelten unter anderen Tabakrauch-Exposition sowie Infektionen beispielsweise mit dem Epstein-Barr-Virus [122, 123]. Genetische Faktoren tragen ebenfalls zu der Manifestation des SLE bei. Die Erkrankung zeigt eine familiäre Häufung; zudem gibt es zwischen monozygoten und dizygoten Zwillingen große Unterschiede in der Konkordanzrate. Studien beziffern die Konkordanzrate für SLE auf 24-69 % für eineiige und auf 2-9 % für zweieiige Zwillinge, was den großen Einfluss genetischer Faktoren belegt [124, 125]. Der Beitrag der Gene zur Krankheitsentstehung scheint beim SLE noch größer zu sein als bei anderen klassischen Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis, Multipler Sklerose, Typ I-Diabetes oder Morbus Basedow [126].

Die Rolle der Gene in der Pathogenese des SLE ist äußerst komplex. Es gibt viele Suszeptibilitätsgene, die das SLE-Risiko eines Individuums leicht erhöhen, jedoch keineswegs zur Manifestation der Erkrankung führen müssen. Erst wenn mehrere, möglicherweise sehr viele genetische Risikofaktoren mit Umweltfaktoren zusammentreffen, manifestiert sich der SLE [126]. Mehrere genomweite Assoziationsstudien konnten genetische Risikofaktoren des SLE identifizieren [112]. Darunter finden sich Gene, die eine wichtige Rolle im adaptiven Immunsystem und in der Produktion von Autoantikörpern spielen (beispielsweise HLA Klasse II, BANK1) sowie Proteine, die – genauso wie IRAK-M – für das angeborene Immunsystem und die Interferon-Signalwege relevant sind, wie beispielsweise IRF5, ITGAM und STAT4 [127].

Zu den Genomregionen, für die eine signifikante Assoziation mit dem SLE-Risiko nachgewiesen werden konnte, gehört die HLA-Region auf Chromosom 6. Diese Region enthält mehrere Dutzend Gene, von denen viele immunologische Funktionen haben und die auch als Risikofaktoren für andere Autoimmunerkrankungen des Menschen identifiziert wurden. Insbesondere Gene der HLA-Klassen I und II sowie Komplementfaktoren aus der HLA-Klasse III sind als SLE-Risikogene bekannt [126, 128]. Gene der HLA-Klassen I und II kodieren für Membranproteine, die Peptide für die Erkennung durch T-Lymphozyten präsentieren und weisen viele Polymorphismen auf. Viele davon, beispielsweise HLA-DR2 und DR3, zeigen eine Assoziation mit SLE [129]. Von den Komplementfaktoren, die für die

Oponierung von Immunkomplexen zuständig sind, ist insbesondere C4A ein Risikogen des SLE [128].

Mehrere Studien belegen die Rolle des Interferon-Signalwegs in der Pathogenese des SLE. Insbesondere für den Interferon-regulatorischen Faktor 5 (IRF5) wurde eine Assoziation nachgewiesen. SNPs im IRF5-Gen beeinflussen in komplexer Weise das SLE-Risiko [130, 131, 132]. Der Transkriptionsfaktor STAT4, der an der Signaltransduktion mehrerer Zytokine sowie der Differenzierung der proinflammatorischen Th1- und Th17-Zellen beteiligt ist, ist ebenfalls ein SLE-Risikogen [133, 134]. Ein weiterer SLE-Locus ist IL-10 [127]. IL-10 ist ein immunregulatorisches Zytokin, das hemmend auf die Immunabwehr wirkt und wichtig für die Entwicklung der Selbsttoleranz ist [135]. SNPs im IL-10-Gen sind nicht nur mit einem erhöhten Risiko für SLE, sondern auch für Colitis ulcerosa und Typ I-Diabetes assoziiert [127].

Genau wie IL-10 erhöhen einige Gene nicht nur das Risiko, an SLE zu erkranken, sondern auch an anderen entzündlichen Erkrankungen, deren Pathogenese man sich teilweise ähnlich vorstellt. Interessanterweise zeigen aber viele SLE-Risikogene keine Assoziation mit anderen Autoimmunerkrankungen wie zum Beispiel der rheumatoiden Arthritis, die genau wie der SLE mit entzündlicher Schädigung von Körperstrukturen einhergeht [136]. Dies weist darauf hin, dass die genetische Komponente dieser beiden Autoimmunkrankheiten entscheidend zur Ausprägung des jeweiligen Phänotyps der Erkrankung beiträgt.

Viele der SLE-Risikogene wie beispielsweise IRF5 und STAT4 sind an der Regulation derselben Signalkaskaden wie IRAK-M beteiligt. Die in dieser Arbeit dargestellten Daten deuten darauf hin, dass IRAK-M, das als regulatorisches Protein TLRs inhibiert, ebenfalls einen genetischen Risikofaktor des SLE darstellt. Es bedarf jedoch weiterer Forschung, um die Bedeutung, die Wirkungsweise und das Zusammenspiel der bekannten und bislang unbekannt genen Risikofaktoren des SLE zu präzisieren.

4.4 TLR-Inhibitoren als Ansatzpunkt therapeutischer Interventionen bei SLE

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass IRAK-M ein relevantes Gen in der Pathogenese des Lupus ist. IRAK-M unterdrückt Entzündung, indem es TLR7 inhibiert. Die Blockade von TLR7 bei IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr} Mäusen wiederum verhinderte die Entstehung des schweren Autoimmunsyndroms. Dieser Mechanismus könnte möglicherweise von therapeutischem Nutzen sein. Für die Behandlung des systemischen Lupus erythematoses ist man noch immer auf unspezifische Immunsuppressiva angewiesen, die mit teils erheblichen

Nebenwirkungen einhergehen. Dank des immer besseren Verständnisses der komplexen Signalkaskaden, die zu Entzündung und Organschädigung führen, ergibt sich jedoch eine Vielzahl neuer Angriffspunkte für die Therapie des SLE.

Es hat sich gezeigt, dass sich trotz der Komplexität dieser Signalwege durch die Ausschaltung eines einzigen Proteins wie beispielsweise des proinflammatorischen Zytokins TNF- α ein großer therapeutischer Erfolg bei der Behandlung von Autoimmunerkrankungen erzielen lässt [137]. Antikörper gegen TNF- α werden z.B. bei Patienten mit rheumatoider Arthritis bereits heute erfolgreich eingesetzt. Inhibitoren gegen andere Zytokine wie Interleukin-6 werden derzeit erforscht. Die Behandlung mit einem Antikörper gegen den IL-6-Rezeptor führte in Pilotstudien bei Patienten mit SLE zu verminderter Krankheitsaktivität und einem Rückgang der Autoantikörper im Blut [138]. TLR-Antagonisten scheinen ein besonders großes Potential als therapeutische Mittel zu haben. Erfolg versprechend in der Behandlung des SLE sind in erster Linie Inhibitoren von TLR7 und TLR9. CPG-52364, ein spezifischer Inhibitor von TLR7, TLR8 und TLR9, bewirkte in Tiermodellen eine verminderte Aktivität des SLE und wird derzeit in klinischen Phase I-Studien getestet [139, 140]. Andere TLR7- und TLR9-Antagonisten wie IRS-954 und IMO-3100 werden in präklinischen Studien erforscht und scheinen ebenfalls die Entzündung und Organschädigung beim SLE unterdrücken zu können [140]. Derzeitig gängige Optionen in der Behandlung des SLE beinhalten das Antimalaria-Mittel Hydroxychloroquin, von dem man inzwischen weiß, dass es als TLR9- und als schwacher TLR7- und TLR8-Antagonist agiert und auf diesem Weg die Entzündungsreaktion unterdrückt [141, 142]. Es gibt demnach bereits heute etablierte Medikamente, deren Wirkung sich über die Hemmung von TLRs entfaltet.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse bestätigen, dass die TLR-Signalwege, vor allem TLR7, eine bedeutende Rolle bei der Produktion von Autoantikörpern und in der Entstehung autoimmuner Organläsionen spielen. Es gelang der Nachweis, dass unter Blockade von TLR7 Autoimmunität verhindert werden kann. Allerdings muss man hierbei anmerken, dass in diesen Studien mit dem TLR7-Antagonisten lediglich BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse behandelt wurden, bei denen sich der aggravierte SLE noch nicht manifestiert hatte. Bei diesen Tieren konnte die Entstehung des SLE verhindert werden. Ob das schwere Autoimmunsyndrom bei bereits erkrankten BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäusen unter TLR7-Blockade rückläufig ist und sich der SLE somit bei diesen Mäusen durch einen TLR7-Antagonisten therapieren lässt, ist nicht bekannt und bedarf weiterer Untersuchungen. Dennoch deuten die Daten darauf hin, dass die TLR-Signalkaskaden und insbesondere deren

negative Regulatoren wie IRAK-M ein aussichtsreiches Ziel therapeutischer Interventionen beim SLE sind.

5 Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematoses ist eine Autoimmunerkrankung, die auf dem Toleranzverlust des Immunsystems beruht. Autoantikörper gegen körpereigene Nukleinsäuren bilden mit RNA- und DNA-Autoantigenen Immunkomplexe, die von Toll-like Rezeptoren erkannt werden. Durch TLRs wird eine Signalkaskade angestoßen, die in der Ausschüttung von Zytokinen und Interferonen mündet und eine systemische Entzündungsreaktion hervorruft, die zahlreiche innere Organe schädigt.

Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase-M (IRAK-M) ist ein Inhibitor der TLR-Signalwege und hat somit eine antientzündliche Funktion. Daher ergab sich die Hypothese, dass IRAK-M Autoimmunität unterdrückt.

In der Tat zeigte sich, dass IRAK-M-Defizienz bei BL/6^{lpr/lpr} Mäusen, die einen genetisch bedingten milden SLE entwickeln, zu einer dramatischen Aggravierung der Erkrankung führt. BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse wiesen im Alter von 6 Monaten eine massive Lymphoproliferation mit vergrößerten Lymphknoten und Splenomegalie sowie eine vermehrte Aktivierung antigenpräsentierender dendritischer Zellen auf. Zudem zeigten sich bei diesen Tieren eine Expansion autoreaktiver T-Zellen und Plasmazellen sowie eine massive Produktion von Autoantikörpern gegen RNA- und DNA-Autoantigene. In Lungen und Nieren der IRAK-M-defizienten BL/6^{lpr/lpr} Mäuse fand sich eine ausgeprägte entzündliche Schädigung der Organe. Da TLR7, dessen Liganden virale RNA und RNA-Immunkomplexe sind, ein zentraler Rezeptor in der Pathogenese des SLE ist, wurden BL/6^{lpr/lpr} IRAK-M^{-/-} Mäuse vor Manifestation des Autoimmunsyndroms mit einem spezifischen TLR7-Antagonisten behandelt. Unter Blockade von TLR7 wurde der zuvor beobachtete aggravierte Phänotyp vollständig verhindert. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass IRAK-M-Defizienz zu einer verstärkten Aktivierung von TLR7 führt und dadurch den SLE verstärkt. Anders ausgedrückt bedeutet dies, dass IRAK-M Autoimmunität unterdrückt, indem es die Signaltransduktion über TLR7 hemmt.

IRAK-M schützt vor der Entstehung des Lupus erythematoses und ist somit ein neuer genetischer Risikofaktor des SLE.

6 Literaturverzeichnis

- 1 Herold, G: Innere Medizin. Eine vorlesungsorientierte Darstellung. Herold, Köln 2008
- 2 Murphy K, Travers P, Walport M: Janeway Immunologie. 7. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2009
- 3 Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, Christensen SR, Shlomchik MJ, Viglianti GA, Rifkin IR, Marshak-Rothstein A: RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med.* 2005 Nov 7;202(9):1171-7
- 4 Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN: TLR-dependent and TLR-independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity. *Nat Med.* 2007 May;13(5):543-51
- 5 Kim WU, Sreih A, Bucala R: Toll-like receptors in systemic lupus erythematosus; prospects for therapeutic intervention. *Autoimmun Rev.* 2009 Jan;8(3):204-8
- 6 Braunwald, E, Fauci, A, Kasper, D, Hauser, S, Longo, D und Jameson, J: Harrison's Principles of Internal Medicine. 17. Auflage, McGraw-Hill 2008
- 7 Libert C, Dejager L, Pinheiro I: The X chromosome in immune functions: when a chromosome makes the difference. *Nat Rev Immunol.* 2010 Aug;10(8):594-604
- 8 Goodnow, CC: Multistep pathogenesis of autoimmune disease. *Cell.* 2007 Jul 13;130(1):25-35
- 9 Gregersen, PK, Olsson, LM: Recent advances in the genetics of autoimmune disease. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:363-91
- 10 Nagata, S: Autoimmune diseases caused by defects in clearing dead cells and nuclei expelled from erythroid precursors. *Immunol Rev.* 2007 Dec;220:237-50

- 11 Rahman A, Isenberg DA: Systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2008 Feb 28;358(9):929-39
- 12 Vollmar A, Zündorf I: *Immunologie. Grundlagen und Wirkstoffe.* Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2005
- 13 Takeuchi O, Akira S: Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010 Mar 19;140(6):805-20. Review
- 14 Yoneyama M, Fujita T: Structural mechanisms of RNA recognition by the RIG-I-like receptors. *Immunity* 2008; 29:178
- 15 Inohara N, Chamaillard, McDonald C, Nunez G: NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005; 74:355
- 16 Meylan E, Tschopp J, Karin M: Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; 442:39
- 17 Molofsky AB, Byrne BG, Whitfield NN, Madigan CA, Fuse ET, Tateda K, Swanson MS: Cytosolic recognition of flagellin by mouse macrophages restricts legionella pneumophila infection. *J Exp Med* 2006 Apr; 203(4):1093-1104
- 18 Anderson KV, Bokla L, Nüsslein-Volhard C: Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: the induction of polarity by the toll gene product. *Cell* 1985 Oct; 42(3): 791-798
- 19 Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C: Establishment of dorsal-ventral polarity in the drosophila embryo: genetic studies on the role of the toll gene product. *Cell* 1985 Oct; 42(3): 779-789
- 20 Medzhitov R, Preston-Hulburt P, Janeway CA: A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997 Jul; 388(6640):394-397

- 21 Janeway CA Jr, Medzhitov R: Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol.* 2002; 20:197-216
- 22 Takeda K, Kaisho T, Akira S: Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76
- 23 Jin MS, Lee JO: Structures of the toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity,* 2008 Aug 15;29(2):182-91
- 24 Bowie A, O'Neill LA: The interleukin-1 receptor/ toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000 Apr;67(4):508-14
- 25 Akira S, Takeda K: Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004; 4:499-511
- 26 Kawai T, Akira S: The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84
- 27 Johnson GB, Brunn GJ, Kodaira Y, Platt JL: Receptor-mediated monitoring of tissue well-being via detection of soluble heparan sulfate by Toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2002 May 15;168(10):5233-9
- 28 Taylor KR, Trowbridge JM, Rudisill JA, Termeer CC, Simon JC, Gallo RL: Hyaluronan fragments stimulate endothelial recognition of injury through TLR4. *J Biol Chem.* 2004 Apr 23;279(17):17079-84
- 29 Vabulas RM, Wagner H, Schild H: Heat shock proteins as ligands of toll-like receptors. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2002;270:169-84
- 30 Smiley ST, King JA, Hancock WW: Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol.* 2001 Sep 1;167(5):2887-94

- 31 Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD: Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest.* 2005 Feb;115(2):407-17
- 32 Means TK, Luster AD: Toll-like receptor activation in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Ann N Y Acad Sci.* 2005 Dec;1062:242-51
- 33 Boraschi D, Tagliabue A: The interleukin-1 receptor family. *Vitam Horm.* 2006;74:229-54
- 34 Xu Y, Tao X, Shen B, Hornig T, Medzhitov R, Manley JL, Tong L: Structural basis for signal transduction by the Toll/ interleukin-1 receptor domains. *Nature*, 2000 Nov 2;408(6808):111-5
- 35 Martin MU, Wesche H: Summary and comparison of the signaling mechanisms of the toll/ interleukin-1 receptor family. *Biochem Biophys Acta* 2002; 1592:265-80
- 36 Radons J, Gabler S, Wesche H, Korherr C, Hofmeister R, Falk W: Identification of essential regions in the cytoplasmatic tail of interleukin-1 receptor accessory protein critical for interleukin-1 signaling. *J Biol Chem*, 2002 May 10;277(19):16456-63
- 37 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al.: Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature* 2002; 420:324-329
- 38 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al.: Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 2003; 301:640-643
- 39 Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al.: TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* 2003; 4:1144-1150
- 40 Carty M, Goodbody R, Schroder M, Stack J, Moynagh PN, Bowie AG: The human adaptor SARM negatively regulates adaptor protein TRIF-dependent Toll-like receptor signaling. *Nat Immunol* 2006 Oct; 7(10):1074-81

- 41 Beutler B: Interferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature*, 2004 8;430:257-63
- 42 Dinarello CA: interleukin-1 and interleukin-18 as mediators of inflammation and the aging process. *Am J Clin Nutr*, 2006 Feb;83(2):447-455
- 43 Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z. MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex. *Immunity*. 1997; 7(6):837-47
- 44 Li S, Strelow A, Fontana EJ, Wesche H. IRAK-4: a novel member of the IRAK family with the properties of an IRAK-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(8):5567-72
- 45 Suzuki N, Suzuki S, Duncan GS, Millar DG, Wada T, Mirtsos C, Takada H, Wakeham A, Itie A, Li S, Penninger JM, Wesche H, Ohashi PS, Mak TW, Yeh WC. Severe impairment of interleukin-1 and Toll-like receptor signalling in mice lacking IRAK-4. *Nature*. 2002; 416(6882):750-6
- 46 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV. TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature*. 1996; 383(6599):443-6
- 47 Li X, Commane M, Burns C, Vithalani K, Cao Z, Stark GR. Mutant cells that do not respond to interleukin-1 (IL-1) reveal a novel role for IL-1 receptor-associated kinase. *Mol Cell Biol*. 1999; 19(7):4643-52
- 48 Kawai T, Akira S: TLR signaling. *Cell Death Differ* 2006;13:816-825
- 49 Mantovani A, Garlanda C, Locati M, Rodriguez TV, Feo SG, Savino B, Vecchi A: Regulatory pathways in inflammation. *Autoimmun Rev*. 2007 Nov;7(1):8-11
- 50 Lang D, Knop J, Wesche H, Raffetseder U, Kurrle R, Boraschi D, Martin MU: The type II IL-1 receptor interacts with the IL-1 receptor accessory protein: a novel mechanism of regulation of IL-1 responsiveness. *J Immunol*. 1998 Dec 15;161(12):6871-7

- 51 Brint EK, Xu D, Liu H, Dunne A, McKenzie AN, O'Neill LA, Liew FY: ST2 is an inhibitor of interleukin 1 receptor and Toll-like receptor 4 signaling and maintains endotoxin tolerance. *Nat Immunol.* 2004 Apr;5(4):373-9
- 52 Garlanda C, Anders HJ, Mantovani A: TIR8/SIGIRR: an IL-1R/TLR family member with regulatory functions in inflammation and T cell polarization. *Trends Immunol.* 2009 Sep;30(9):439-46
- 53 Wang J, Hu Y, Deng WW, Sun B: Negative regulation of Toll-like receptor signaling pathway. *Microbes Infect.* 2009 Mar;11(3):321-7
- 54 Bulek K, Swaidani S, Qin J, Lu Y, Gulen MF, Herjan T, Min B, Kastelein RA, Aronica M, Kosz-Vnenchak M, Li X: The essential role of single Ig IL-1 receptor-related molecule/Toll IL-1R8 in regulation of Th2 immune response. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):2601-9
- 55 Chuang TH, Ulevitch RJ: Tiad3A, an E3 ubiquitin-protein ligase regulating Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2004 May;5(5):495-502
- 56 Burns K, Janssens S, Brissoni B, Olivos N, Beyaert R, Tschopp J: Inhibition of interleukin 1 receptor/Toll-like receptor signaling through the alternatively spliced, short form of MyD88 is due to its failure to recruit IRAK-4. *J Exp Med.* 2003 Jan 20;197(2):263-8
- 57 Kobayashi K, Hernandez LD, Galán JE, Janeway CA Jr, Medzhitov R, Flavell RA: IRAK-M is a negative regulator of Toll-like receptor signaling. *Cell.* 2002 Jul 26;110(2):191-202
- 58 Wesche H, Gao X, Li X, Kirschning CJ, Stark GR, Cao Z: IRAK-M is a novel member of the Pelle/interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK) family. *J Biol Chem.* 1999 Jul 2;274(27):19403-10
- 59 Janssens S, Beyaert R: Functional diversity and regulation of different Interleukin-1 Receptor Associated Kinase (IRAK) family members. *Molecular Cell.* 2003 Feb; 11(2):293-302. Review

- 60 Rosati O, Martin MU: Identification and characterization of murine IRAK-M. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002 May 24;293(5):1472-7
- 61 Harada K, Isse K, Sato Y, Ozaki S, Nakanuma Y: Endotoxin tolerance in human intrahepatic biliary epithelial cells is induced by upregulation of IRAK-M. *Liver Int.* 2006 Oct;26(8):935-42
- 62 Skerrett SJ, Liggitt HD, Hajjar AM, Ernst RK, Miller SI, Wilson CB: Respiratory epithelial cells regulate lung inflammation in response to inhaled endotoxin. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004 Jul;287(1):L143-52
- 63 Su J, Xie Q, Wilson I, Li L: Differential regulation and role of interleukin-1 receptor associated kinase-M in innate immunity signaling. *Cell Signal.* 2007 Jul;19(7):1596-601
- 64 Neumann D, Kollwe C, Resch K, Martin MU: The death domain of IRAK-1: an oligomerization domain mediating interactions with MyD88, Tollip, IRAK-1, and IRAK-4. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Mar 23;354(4):1089-94
- 65 Escoll P, del Fresno C, García L, Vallés G, Lendínez MJ, Arnalich F, López-Collazo E: Rapid up-regulation of IRAK-M expression following a second endotoxin challenge in human monocytes and in monocytes isolated from septic patients. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003 Nov 14;311(2):465-72
- 66 del Fresno C, Soler-Rangel L, Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, González-León MC, Gómez-García L, Mendoza-Barberá E, Rodríguez-Rojas A, García F, Fuentes-Prior P, Arnalich F, López-Collazo E: Inflammatory responses associated with acute coronary syndrome up-regulate IRAK-M and induce endotoxin tolerance in circulating monocytes. *J Endotoxin Res.* 2007;13(1):39-52
- 67 Wiersinga WJ, van't Veer C, van den Pangaart PS, Dondorp AM, Day NP, Peacock SJ, van der Poll T: Immunosuppression associated with interleukin-1R-associated-kinase-M upregulation predicts mortality in Gram-negative sepsis (melioidosis). *Crit Care Med.* 2009 Feb;37(2):569-76

- 68 Deng JC, Cheng G, Newstead MW, Zeng X, Kobayashi K, Flavell RA, Standiford TJ: Sepsis-induced suppression of lung innate immunity is mediated by IRAK-M. *J Clin Invest.* 2006 Sep;116(9):2532-42
- 69 Xie Q, Gan L, Wang J, Wilson I, Li L: Loss of the innate immunity negative regulator IRAK-M leads to enhanced host immune defense against tumor growth. *Mol Immunol.* 2007 Jul;44(14):3453-61
- 70 del Fresno C, Otero K, Gómez-García L, González-León MC, Soler-Ranger L, Fuentes-Prior P, Escoll P, Baos R, Caveda L, García F, Arnalich F, López-Collazo E: Tumor cells deactivate human monocytes by up-regulating IL-1 receptor associated kinase-M expression via CD44 and TLR4. *J Immunol.* 2005 Mar 1;174(5):3032-40
- 71 Hayashi T, Gray CS, Chan M, Tawatao RI, Ronacher L, McGargill MA, Datta SK, Carson DA, Corr M: Prevention of autoimmune disease by induction of tolerance to Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Feb 24;106(8):2764-9
- 72 Seki M, Kohno S, Newstead MW, Zeng X, Bhan U, Lukacs NW, Kunkel SL, Standiford TJ: Critical role of IL-1 receptor-associated kinase-M in regulating chemokine-dependent deleterious inflammation in murine influenza pneumonia. *J Immunol.* 2010 Feb 1;184(3):1410-8
- 73 Li H, Cuartas E, Cui W, Choi Y, Crawford TD, Ke HZ, Kobayashi KS, Flavell RA, Vignery A: IL-1 receptor-associated kinase M is a central regulator of osteoclast differentiation and activation. *J Exp Med.* 2005 Apr 4;201(7):1169-77
- 74 Soares-Schanoski A, Gómez-Piña V, del Fresno C, Rodríguez-Rojas A, García F, Glaría A, Sánchez M, Vallejo-Cremades MT, Baos R, Fuentes-Prior P, Arnalich F, López-Collazo E: 6-Methylprednisolone down-regulates IRAK-M in human and murine osteoclasts and boosts bone-resorbing activity: a putative mechanism for corticoid-induced osteoporosis. *J Leukoc Biol.* 2007 Sep;82(3):700-9

- 75 Balaci L, Spada MC, Olla N, Sole G, Loddo L, Anedda F, Naitza S, Zuncheddu MA, Maschio A, Altea D, Uda M, Pilia S, Sanna S, Masala M, Crisponi L, Fattori M, Devoto M, Doratiotto S, Rassu S, Mereu S, Giua E, Cadeddu NG, Atzeni R, Pelosi U, Corrias A, Perra R, Torrazza PL, Pirina P, Ginesu F, Marcias S, Schintu MG, Del Giacco GS, Manconi PE, Malerba G, Bisognin A, Trabetti E, Boner A, Pescollerungg L, Pignatti PF, Schlessinger D, Cao A, Pilia G: IRAK-M is involved in the pathogenesis of early-onset persistent asthma. *Am J Hum Genet.* 2007 Jun;80(6):1103-14
- 76 Weersma RK, Oostenbrug LE, Nolte IM, Van Der Steege G, Oosterom E, Van Dullemen HM, Kleibeuker JH, Dijkstra G: Association of interleukin-1 receptor-associated kinase M (IRAK-M) and inflammatory bowel diseases. *Scand J Gastroenterol.* 2007 Jul;42(7):827-33
- 77 Beygo J, Parwez Q, Petrasch-Parwez E, Epplen JT, Hoffjan S: No evidence of an association between polymorphisms in the IRAK-M gene and atopic dermatitis in a German cohort. *Mol Cell Probes.* 2009 Feb;23(1):16-9
- 78 Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL: Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med.* 2005 Oct 17;202(8):1131-9
- 79 Berland R, Fernandez L, Kari E, Han JH, Lomakin I, Akira S, Wortis HH, Kearney JF, Ucci AA, Imanishi-Kari T: Toll-like receptor 7-dependent loss of B cell tolerance in pathogenic autoantibody knockin mice. *Immunity.* 2006 Sep;25(3):429-40
- 80 Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ: Toll-like receptor 7 and TLR9 dictate autoantibody specificity and have opposing inflammatory and regulatory roles in a murine model of lupus. *Immunity.* 2006 Sep;25(3):417-28

- 81 Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ: Inhibition of Toll-like receptor-7 (TLR-7) or TLR-7 plus TLR-9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus. *J Am Soc Nephrol.* 2007 Jun;18(6):1721-31
- 82 Subramanian S, Tus K, Li QZ, Wang A, Tian XH, Zhou J, Liang C, Bartov G, McDaniel LD, Zhou XJ, Schultz RA, Wakeland EK: A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 27;103(26):9970-5
- 83 Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S: Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science.* 2006 Jun 16;312(5780):1669-72
- 84 Barrat FJ, Meeker T, Chan JH, Guiducci C, Coffman RL: Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur J Immunol.* 2007 Dec;37(12):3582-6
- 85 Lartigue A, Courville P, Auquit I, François A, Arnoult C, Tron F, Gilbert D, Musette P: Role of TLR9 in anti-nucleosome and anti-DNA antibody production in lpr mutation-induced murine lupus. *J Immunol.* 2006 Jul 15;177(2):1349-54
- 86 Ehlers M, Fukuyama H, McGaha TL, Aderem A, Ravetch JV: TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med.* 2006 Mar 20;203(3):553-61
- 87 Nickerson KM, Christensen SR, Shupe J, Kashgarian M, Kim D, Elkon K, Shlomchik MJ: TLR9 regulates TLR7- and MyD88-dependent autoantibody production and disease in a murine model of lupus. *J Immunol.* 2010 Feb 15;184(4):1840-8
- 88 Santiago-Raber ML, Dunand-Sauthier I, Wu T, Li QZ, Uematsu S, Akira S, Reith W, Mohan C, Kotzin BL, Izui S: Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J Autoimmun.* 2010 Jun;34(4):339-48

- 89 Liew FY, Xu D, Brint EK, O'Neill LA: Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2005 Jun;5(6):446-58
- 90 Lech M, Kulkarni OP, Pfeiffer S, Savarese E, Krug A, Garlanda C, Mantovani A, Anders HJ: Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens. *J Exp Med*. 2008 Aug 4;205(8):1879-88
- 91 Jacob CO, Zhu J, Armstrong DL, Yan M, Han J, Zhou XJ, Thomas JA, Reiff A, Myones BL, Ojwang JO, Kaufman KM, Klein-Gitelman M, McCurdy D, Wagner-Weiner L, Silverman E, Ziegler J, Kelly JA, Merrill JT, Harley JB, Ramsey-Goldman R, Vila LM, Bae SC, Vyse TJ, Gilkeson GS, Gaffney PM, Moser KL, Langefeld CD, Zidovetzki R, Mohan C: Identification of IRAK1 as a risk gene with critical role in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Apr 14;106(15):6256-61
- 92 Anz D, Koelzer VH, Moder S, Thaler R, Schwerd T, Lahl K, Sparwasser T, Besch R, Poeck H, Hornung V, Hartmann G, Rothenfusser S, Bourquin C, Endres S: Immunostimulatory RNA blocks suppression by regulatory T cells. *J Immunol*. 2010 Jan 15;184(2):939-46
- 93 Watanabe D, Suda T, Hashimoto H, Nagata S: Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders. *EMBO J*. 1995 Jan 3;14(1):12-8
- 94 Cohen PL, Eisenberg RA: Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol*. 1991;9:243-69
- 95 Cohen PL, Creech E, Nakul-Aquarone D, McDaniel R, Ackler S, Rapoport RG, Sobel ES, Eisenberg RA: Antigen nonspecific effect of major histocompatibility complex haplotype on autoantibody levels in systemic lupus erythematosus-prone lpr mice. *J Clin Invest*. 1993 Jun;91(6):2761-8
- 96 FACSLab: Was ist Durchflußzytometrie.
<http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/zytometrie.jsp>

- 97 Hellma Analytics: Prinzip der Durchflusszytometrie.
<http://www.hellma-worldwide.com/text/728/de/prinzip-der-durchflusszytometrie.html>
- 98 Austin HA 3rd, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE: Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int.* 1984 Apr;25(4):689-95
- 99 Anders HJ, Krug A, Pawar RD: Molecular mimicry in innate immunity? The viral RNA recognition receptor TLR7 accelerates murine lupus. *Eur J Immunol.* 2008 Jul;38(7):1795-9
- 100 Marshak-Rothstein A, Rifkin IR: Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:419-41
- 101 Kotzin BL: Systemic lupus erythematosus. *Cell*1996; 85:303
- 102 Winfield JB, Faiferman I, Koffler D: Avidity of anti-DNA antibodies in serum and IgG glomerular eluates from patients with systemic lupus erythematosus. Association of high avidity antinative DNA antibody with glomerulonephritis. *J Clin Invest.* 1977 Jan; 59(1):90-6
- 103 Savarese E, Chae OW, Trowitzsch S, Weber G, Kastner B, Akira S, Wagner H, Schmid RM, Bauer S, Krug A: U1 small nuclear ribonucleoprotein immune complexes induce type I interferon in plasmacytoid dendritic cells through TLR7. *Blood.* 2006 Apr 15;107(8):3229-34
- 104 Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science* 1995 Mar 10; 267(5203):1449-56
- 105 Theofilopoulos AN, Dixon FJ: Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 1985; 37:269–390

- 106 Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C: Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1529-31
- 107 Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S: Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*. 2004 Mar 5;303(5663):1526-9
- 108 Anders HJ: Pseudoviral immunity - a novel concept for lupus. *Trends Mol Med*. 2009 Dec;15(12):553-61
- 109 Kono DH, Haraldsson MK, Lawson BR, Pollard KM, Koh YT, Du X, Arnold CN, Baccala R, Silverman GJ, Beutler BA, Theofilopoulos AN: Endosomal TLR signaling is required for anti-nucleic acid and rheumatoid factor autoantibodies in lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Jul 21;106(29):12061-6
- 110 Baechler EC, Gregersen PK, Behrens TW: The emerging role of interferon in human systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Immunol*. 2004 Dec;16(6):801-7
- 111 Rönnblom L, Alm GV, Eloranta ML: Type I interferon and lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2009 Sep;21(5):471-7
- 112 Moser KL, Kelly JA, Lessard CJ, Harley JB: Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Genes Immun*. 2009 Jul;10(5):373-9
- 113 Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Naiki Y, Komatsu T, Koide N, Yoshida T, Yokochi T: Involvement of interleukin-1 receptor-associated kinase (IRAK)-M in toll-like receptor (TLR) 7-mediated tolerance in RAW 264.7 macrophage-like cells. *Cell Immunol*. 2009;256(1-2):99-103
- 114 Basu S, Fenton MJ: Toll-like receptors: function and roles in lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2004 May;286(5):L887-92

- 115 Gangloff SC, Guenounou M: Toll-like receptors and immune response in allergic disease. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2004 Apr;26(2):115-25
- 116 Redecke V, Häcker H, Datta SK, Fermin A, Pitha PM, Broide DH, Raz E: Cutting edge: activation of Toll-like receptor 2 induces a Th2 immune response and promotes experimental asthma. *J Immunol*. 2004 Mar 1;172(5):2739-43
- 117 Piggott DA, Eisenbarth SC, Xu L, Constant SL, Huleatt JW, Herrick CA, Bottomly K: MyD88-dependent induction of allergic Th2 responses to intranasal antigen. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):459-67
- 118 Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K: Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;196(12):1645-51
- 119 Yang IA, Fong KM, Holgate ST, Holloway JW: The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2006 Feb;6(1):23-8
- 120 Dos Santos BP, Valverde JV, Rohr P, Monticeli OA, Brenol JC, Xavier RM, Chies JA: TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in Systemic Lupus Erythematosus patients from Southern Brazil. *Lupus* 2011 Nov 7
- 121 Hom G, Graham RR, Modrek B, Taylor KE, Ortmann W, Garnier S, Lee AT, Chung SA, Ferreira RC, Pant PV, Ballinger DG, Kosoy R, Demirci FY, Kamboh MI, Kao AH, Tian C, Gunnarsson I, Bengtsson AA, Rantapää-Dahlqvist S, Petri M, Manzi S, Seldin MF, Rönnblom L, Syvänen AC, Criswell LA, Gregersen PK, Behrens TW: Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX. *N Engl J Med*. 2008 Feb 28;358(9):900-9
- 122 Costenbader KH, Kim DJ, Peerzada J, Lockman S, Nobles-Knight D, Petri M, Karlson EW: Cigarette smoking and the risk of systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. *Arthritis Rheum*. 2004 Mar;50(3):849-57

- 123 James JA, Kaufman KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehman TJ, Harley JB: An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest.* 1997 Dec 15;100(12):3019-26
- 124 Block SR, Winfield JB, Lockshin MD, D'Angelo WA, Christian CL: Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med.* 1975 Oct;59(4):533-52
- 125 Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P, Walker A, Mack TM: A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992 Mar;35(3):311-8
- 126 Criswell LA: The genetic contribution to systemic lupus erythematosus. *Bull NYU Hosp Jt Dis.* 2008;66(3):176-83
- 127 Gateva V, Sandling JK, Hom G, Taylor KE, Chung SA, Sun X, Ortmann W, Kosoy R, Ferreira RC, Nordmark G, Gunnarsson I, Svenungsson E, Padyukov L, Sturfelt G, Jönsen A, Bengtsson AA, Rantapää-Dahlqvist S, Baechler EC, Brown EE, Alarcón GS, Edberg JC, Ramsey-Goldman R, McGwin G Jr, Reveille JD, Vilá LM, Kimberly RP, Manzi S, Petri MA, Lee A, Gregersen PK, Seldin MF, Rönnblom L, Criswell LA, Syvänen AC, Behrens TW, Graham RR: A large-scale replication study identifies TNIP1, PRDM1, JAZF1, UHRF1BP1 and IL10 as risk loci for systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2009 Nov;41(11):1228-33
- 128 Walport MJ: Complement and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Res.* 2002;4 Suppl 3:S279-93
- 129 Graham RR, Ortmann W, Rodine P, Espe K, Langefeld C, Lange E, Williams A, Beck S, Kyogoku C, Moser K, Gaffney P, Gregersen PK, Criswell LA, Harley JB, Behrens TW: Specific combinations of HLA-DR2 and DR3 class II haplotypes contribute graded risk for disease susceptibility and autoantibodies in human SLE. *Eur J Hum Genet.* 2007 Aug;15(8):823-30

- 130 Sigurdsson S, Nordmark G, Göring HH, Lindroos K, Wiman AC, Sturfelt G, Jönsen A, Rantapää-Dahlqvist S, Möller B, Kere J, Koskenmies S, Widén E, Eloranta ML, Julkunen H, Kristjansdottir H, Steinsson K, Alm G, Rönnblom L, Syvänen AC: Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet.* 2005 Mar;76(3):528-37
- 131 Graham RR, Kozyrev SV, Baechler EC, Reddy MV, Plenge RM, Bauer JW, Ortmann WA, Koeth T, González Escribano MF; Argentine and Spanish Collaborative Groups, Pons-Estel B, Petri M, Daly M, Gregersen PK, Martín J, Altshuler D, Behrens TW, Alarcón-Riquelme ME: A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat Genet.* 2006 May;38(5):550-5
- 132 Graham RR, Kyogoku C, Sigurdsson S, Vlasova IA, Davies LR, Baechler EC, Plenge RM, Koeth T, Ortmann WA, Hom G, Bauer JW, Gillett C, Burt N, Cunninghame Graham DS, Onofrio R, Petri M, Gunnarsson I, Svenungsson E, Rönnblom L, Nordmark G, Gregersen PK, Moser K, Gaffney PM, Criswell LA, Vyse TJ, Syvänen AC, Bohjanen PR, Daly MJ, Behrens TW, Altshuler D: Three functional variants of IFN regulatory factor 5 (IRF5) define risk and protective haplotypes for human lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Apr 17;104(16):6758-63
- 133 Watford WT, Hissong BD, Bream JH, Kanno Y, Muul L, O'Shea JJ: Signaling by IL-12 and IL-23 and the immunoregulatory roles of STAT4. *Immunol Rev.* 2004 Dec;202:139-56
- 134 Remmers EF, Plenge RM, Lee AT, Graham RR, Hom G, Behrens TW, de Bakker PI, Le JM, Lee HS, Batliwalla F, Li W, Masters SL, Booty MG, Carulli JP, Padyukov L, Alfredsson L, Klareskog L, Chen WV, Amos CI, Criswell LA, Seldin MF, Kastner DL, Gregersen PK: STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med.* 2007 Sep 6;357(10):977-86
- 135 Diveu C, McGeachy MJ, Cua DJ: Cytokines that regulate autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 2008 Dec;20(6):663-8

- 136 Suarez-Gestal M, Calaza M, Dieguez-Gonzalez R, Perez-Pampin E, Pablos JL, Navarro F, Narvaez J, Marenco JL, Herrero-Beaumont G, Fernandez-Gutierrez B, Lamas JR, de la Serna AR, Ortiz AM, Carreño L, Cañete JD, Caliz R, Blanco FJ, Balsa A, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A: Rheumatoid arthritis does not share most of the newly identified systemic lupus erythematosus genetic factors. *Arthritis Rheum.* 2009 Sep;60(9):2558-64
- 137 O'Neill LA: Targeting signal transduction as a strategy to treat inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Jul;5(7):549-63
- 138 Illei GG, Shirota Y, Yarboro CH, Daruwalla J, Tackey E, Takada K, Fleisher T, Balow JE, Lipsky PE: Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis Rheum.* 2010 Feb;62(2):542-52
- 139 Parkinson T: The future of toll-like receptor therapeutics. *Curr Opin Mol Ther.* 2008 Feb;10(1):21-31
- 140 Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA: Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Apr;9(4):293-307. Review
- 141 Macfarlane DE, Manzel L: Antagonism of immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides by quinacrine, chloroquine, and structurally related compounds. *J Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1122-31
- 142 Sun S, Rao NL, Venable J, Thurmond R, Karlsson L: TLR7/9 antagonists as therapeutics for immune-mediated inflammatory disorders. *Inflamm Allergy Drug Targets.* 2007 Dec;6(4):223-35

7 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
ANA	Antinukleäre Antikörper
AP-1	Activator protein 1
APC	Antigen presenting cell
Baff	B-cell activating factor
Bcl 2	B-cell lymphoma 2
Blimp 1	B-lymphocyte-induced maturation protein 1
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serum-Albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary-Desoxyribonukleinsäure
DAMP	damage-associated molecular pattern
DC	Dendritic cell
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNTPs	deoxynucleotide triphosphates
dsRNA	Doppelstrang-Ribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FAS (APT1)	apoptosis antigen 1
FCS	Fetal calf serum, fötales Kälberserum
FoxP3	Forkhead Box P3
gld	generalized lymphoproliferative disease
HLA	Human leukocyte antigen
HRP	Horseradish peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IkB	Inhibitory kappa B
IKK	Inhibitory kappa B kinase
IL	Interleukin
IL-18BP	IL-18 binding protein

IL-1R	Interleukin-1 receptor
IL-1RAcP	IL-1R Accessory protein
IL-1RAPL	IL-1 receptor accessory protein-like
IL-1Rrp2	IL-1 receptor-related protein-2
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	Interferon-regulierender Faktor
IRS	Immunregulatorische Sequenz
JAK	Janus-aktivierte Kinase
KC	keratinocyte-derived chemokine
LBP	LPS binding protein
LGP2	Laboratory of genetics and physiology 2
lpr	lymphoproliferation
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	Leucin-rich-repeat, Leucin-reiche Wiederholungen
Mal	MyD88 adaptor-like protein
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	Mitogen-activated protein kinase kinase
MAVS	Mitochondrial antiviral-signaling protein
MBL	Mannose-bindendes Lektin
MD-2	myeloid differentiation protein 2
MDA5	Melanoma differentiation-associated gene-5
MHC	Major-histocompatibility-complex
MIP-2 (CXCL2)	macrophage inflammatory protein 2
Mx1	myxovirus (influenza virus) resistance 1
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
NAIP5	NLR family, apoptosis inhibitory protein 5
NALP3	NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3
n.d.	nicht detektierbar
NFκB	Nuclear factor-kappa B
NK-Zellen	Natürliche Killer-Zellen
NLR	NOD-like receptor
NOD	nucleotide-binding oligomerization domain
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns

PAS	Periodic-acid Schiff
PBS	Phosphate-buffered-saline
PCR	Polymerase-chain-reaction
PRR	Pattern-recognition-receptor
PS	Penicillin-Streptomycin
RIG-I	Retinoic acid inducible gene I
RLR	RIG-I-like receptor
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI-Medium	Roswell Park Memorial Institute-Medium
RSV	Respiratory syncytial virus
RT	Reverse Transkriptase
SARM	sterile alpha and HEAT/armadillo motif protein
SEM	Standard error of the mean
SIGIRR	single immunoglobulin IL-1-related receptor
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SNP	single nucleotide polymorphism
snRNP	small nuclear ribonucleoproteins
SOCS-1	suppressor of cytokine signaling 1
ss/ds	single-, double-stranded
TAB	TAK binding protein
TAK	Transforming Growth Factor- β -activated kinase
T-bet	T-box-expressed in T-cells
Th1/Th2	T-Helferzellen Typ1/2
TIGIRR	three immunoglobulin domain-containing IL-1R-related
TIR	Toll-interleukin-1 receptor
TIRAP	TIR-assoziertes Protein
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF	TNF Receptor Associated Factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	Toll/IL-1R-domain-containing adaptor protein inducing interferon- β
U/min	Umdrehungen pro Minute
ZNS	Zentrales Nervensystem

8 Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Prof. Dr. Hans-Joachim Anders und Dr. Maciej Lech für ihre beständige Unterstützung und wertvollen Ratschläge.

Außerdem bedanke ich mich bei Dan Draganovici für die unschätzbare Hilfe bei der Anfertigung histologischer Schnitte, bei Ekaterina Vlasova für die Unterstützung bei der Immunfluoreszenzfärbung sowie bei Dr. David Anz für die Untersuchungen von regulatorischen T-Zellen.

Zuletzt ein herzliches Dankeschön an alle diejenigen, die durch Einarbeitung in wissenschaftliche Methodik und Tierhaltung oder durch ideengebende Diskussionen einen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet haben.

Diese Arbeit wurde im Rahmen des Promotionsstudiengangs Molekulare Medizin des Förderprogramms für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Ludwig-Maximilians-Universität München gefördert.