

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Martin Reincke

**Zur Rolle des langen Pentraxins PTX3 in der Pathogenese des
Systemischen Lupus Erythematodes**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christoph Frieder Römmele

aus

Heidelberg

2014

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jörg Christoph Prinz
Prof. Dr. Günter Schlimock
Prof. Dr. Andreas Jung

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.03.2014

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2008 bis Februar 2010 in der Abteilung für Klinische Biochemie der Medizinischen Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt. Die Arbeit wurde betreut von Herrn Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders und PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech.

Förderung des Projekts

Diese Arbeit wurde durch das DFG Graduiertenkolleg 1202 „Oligonukleotide in Zellbiologie und Therapie“ unter der Leitung von Prof. Dr. Endres gefördert.

Aus dem Promotionsprojekt gingen folgende Originalarbeiten hervor:

Lech M*, Römmele C*, Kulkarni OP, Susanti HE, Migliorini A, Garlanda C, Mantovani A, Anders HJ

Lack of the long pentraxin PTX3 promotes autoimmune lung disease but not glomerulonephritis in murine systemic lupus erythematosus.

PLoS One, 2011. **6**(5): p. e20118.

* geteilte Erstautorenschaft

Lech M*, Römmele C*, Gröbmayr R, Susanti HE, Kulkarni OP, Wang S, Gröne HJ, Uhl B, Reichel C, Krombach F, Garlanda C, Mantovani A, Anders HJ

Endogenous and exogenous pentraxin-3 limits postischemic acute and chronic kidney injury.

Kidney Int. 2013 Apr;83(4):647-61

* geteilte Erstautorenschaft

Eidesstattliche Versicherung

Römmele, Christoph Frieder

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Zur Rolle des langen Pentraxins PTX3 in der Pathogenese des Systemischen Lupus Erythematodes

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 30.08.13

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Systemischer Lupus Erythematoses	2
1.2	Das Immunsystem	12
1.2.1	Das angeborene Immunsystem	13
1.2.2	Das erworbene Immunsystem	17
1.3	Pentraxine	19
1.3.1	Kurze Pentraxine	20
1.3.2	Lange Pentraxine	22
1.3.3	Pentraxin-3	23
1.4	Ziel des Projekts und Hypothese	32

2 Material und Methoden

2.1	Material	34
2.1.1	Geräte	34
2.1.2	Chemikalien	36
2.1.3	Zellkultur	36
2.1.4	Tierzucht und Tierhaltung	37
2.1.5	Histologie	38
2.1.6	Phagozytose Assay	39
2.1.7	Molekularbiologie	39
2.1.8	Immunologie	40
2.2	Methoden	44
2.2.1	Zellkultur	44
2.2.2	Tierexperimente	47
2.2.3	Histologie	51
2.2.4	Phagozytose Assay	53
2.2.5	Molekularbiologie	54
2.2.6	Immunologie	58

3	Ergebnisse	
3.1	Das Fehlen von PTX3 verschlechtert die Clearance apoptotischer Zellen	68
3.2	Expression von PTX3 in-vitro nach Stimulation mit TLR-Agonisten	71
3.3	PTX3 Expression in B6lpr Mäusen	72
3.4	PTX3 unterdrückt die Lymphoproliferation in B6lpr Mäusen	74
3.5	PTX3 unterdrückt spezifisch CD4/CD8 doppel-negative T-Zellen in B6lpr/lpr Mäusen	77
3.6	PTX3 reguliert weder die B-Zell-Expansion noch die Autoantikörper-Produktion in B6lpr Mäusen	79
3.7	PTX3 unterdrückt das Ausmaß der autoimmunen Lungen-, nicht aber der Nierenschädigung in B6lpr Mäusen	82
4	Diskussion	
4.1	Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese	90
4.2	Die Rolle von PTX3 im Krankheitsverlauf	92
4.3	Die Bedeutung von PTX3 bei der Organ-spezifischen Gewebeschädigung	95
4.4	Schlussfolgerung, Limitationen und Ausblick	97
5	Zusammenfassung	100
6	Literaturverzeichnis	102
7	Abkürzungsverzeichnis	111
8	Danksagung	116

Kapitel 1

Einleitung

1 Einleitung

1.1 Systemischer Lupus Erythematoses

Der systemische Lupus erythematoses, kurz SLE, ist eine Autoimmunerkrankung, die zur Gruppe der Kollagenosen gezählt wird. Kollagenosen sind eine heterogene Gruppe von Autoimmunerkrankungen, bei denen ein systemischer Befall von Bindegewebe und Blutgefäßen typisch ist. Im Krankheitsverlauf des SLE kommt es zur Schädigung verschiedenster Organe aufgrund einer systemischen Ablagerung von Immunkomplexen, bestehend aus Autoantikörpern, DNA, Fibrin, und Komplement. Diese Ablagerungen gehen typischerweise mit einer Vaskulitis und Perivaskulitis der kleinen Arterien und Arteriolen einher. Die Bandbreite der klinischen Manifestationen des SLE reicht von einfachem Hautausschlag, Arthritis, Anämie, Thrombozytopenie bis hin zu Serositis, Nephritis, generalisierten Krämpfen und Psychosen. Somit sollte bei fast allen komplexen Erkrankungen stets differentialdiagnostisch an die Möglichkeit des Vorliegens eines Lupus erythematoses gedacht werden [1].

Prävalenz: In Nordeuropa sind annäherungsweise 40/100.000 Menschen von dieser Autoimmunerkrankung betroffen [2]. Im Vergleich zu anderen ethnischen Gruppe wie den schwarzhäutigen Amerikanern (Prävalenz >200/100.000) erkranken Europäern folglich deutlich seltener [2]. Mit einer Prävalenz von 50/100.000 Einwohner zeigt Deutschland für Mitteleuropa eine durchschnittliche Erkrankungshäufigkeit. Die Neuerkrankungsrate liegt bei 5-10 Fällen im Jahr pro 100.000 Einwohner [3]. Über 90% der Erkrankten sind Frauen im Alter zwischen dem 25 und 30 Lebensjahr [4].

Ätiologie und Pathogenese: Pathogenetisch liegt beim SLE eine fehlerhafte Unterscheidung des Immunsystems zwischen körpereigenen Antigenen, sogenannten Autoantigenen, und körperfremden Antigenen vor. Infolge dieser fehlerhaften Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe kommt es zur Schädigung desselben durch das Immunsystem, wobei der exakt zugrunde liegende Pathomechanismus bis heute nicht eindeutig identifiziert werden konnte. Wie bei vielen anderen Autoimmunerkrankungen geht man auch hier von der Annahme aus, dass es sich um eine multifaktorielle Erkrankung handelt: Es muss sowohl eine genetische Prädisposition mit bestimmten Risikogenen, als auch eine Exposition mit verschiedenen Umweltfaktoren vorliegen. Die genetische Prädisposition ist sehr komplex und bis heute noch

nicht vollständig geklärt. Zu den bisher erkannten genetischen Risikofaktoren gehört unter anderem der homozygote Mangel des Komplementfaktors C1q, der bei 90% aller Betroffenen einen SLE zur Folge hat [5, 6]. Auch ein Fehlen der kurzen Pentraxine Serum Amyloid Protein (SAP) und c-reaktives Protein (CRP) kann einen SLE bedingen [7, 8]. Sowohl der Mangel an SAP und CRP als auch das Fehlen von funktionellem C1q führt zu einer verschlechterten *Clearance* apoptotischer Zellen. Annäherungsweise 75% aller SLE Patienten haben mindestens ein humanes Leukozytenantikörper-Gen, welches das Risiko der Ausbildung des SLE erhöht (Subpopulationen von DR2, DR3, DR4 oder DR8) [9, 10]. Allerdings erhöht jedes dieser Allele das Risiko nur um ungefähr das Zweifache im Vergleich zur restlichen Population. Weitere identifizierte prädisponierende Risikogene sind beteiligt an verschiedenen Vorgängen des Immunsystems. Zu nennen wäre hier beispielsweise die Interleukin-10 abhängige B-Zell-Reifung mit dem Risikogen der B-Lymphozyten-Tyrosinkinase [11], die Entfernung apoptotischer Zellen durch das Mannose-bindende Lektin (MBL) und die Antwort auf Interferone durch den *interferon-response-factor 5* (IRF5) sowie dem Signalgeber STAT4 [12-14]. Allerdings gibt es keinen identischen genetischen Polymorphismus der bei allen SLE Patienten vorliegt.

Die Tatsache, dass 90% aller SLE-Patienten weiblich sind [15], stützt die Annahme dass neben den genetischen Prädispositionen auch die geschlechtsspezifischen Hormonunterschiede eine entscheidende Rolle spielen.

Zu den möglichen exogenen Risikofaktoren werden Quarz, Haarfärbemittel, Pestizide, Rauchen, Lösungsmittel, Allergene, Ernährung, Schwermetalle, Stress, UV-Licht, Impfstoffe, und Hormone gezählt. Zudem gelten Infektionen mit bestimmten Bakterien oder Viren, wie dem Epstein-Barr-Virus (EBV) [16], dem Zytomegalievirus (ZMV), dem Varizella-Zoster-Virus (VZV) und verschiedenen weiteren Retroviren als Risikofaktoren für die Ausbildung eines SLE [17]. Die Rolle der Hormone bei der Pathogenese ist noch nicht vollständig geklärt. Entweder sind weibliche Geschlechtshormone ein Auslöser bei der Krankheitsentstehung oder männliche Geschlechtshormone haben einen schützenden Einfluss auf den Organismus. Für den krankheitsförderenden Einfluss weiblicher Geschlechtshormone spricht, dass das Hormon Östradiol vermutlich eine verlängerte Lebenszeit der autoreaktiven T- und B-Lymphozyten bedingt, und hierdurch die Entstehung von Autoimmunerkrankungen fördert [18]. Zudem leiden Frauen, welche Östrogene im Zuge einer postmenopausalen Hormontherapie oder als orale Kontrazeptive einnehmen, unter einem statistisch signifikant erhöhtem Risiko für die Entstehung eines SLE [19, 20]. Eine weitere Rolle spielt wahrscheinlich eine durchgemachte Schwangerschaft, bei der Stammzellen des Fötus im Blut der Mutter zirkulieren und eine

graft versus host Immunreaktion auslösen können [21]. All diese Erkenntnisse stützen die Annahme eines krankheitsfördernden Einflusses der weiblichen Geschlechtshormone, allerdings sind die genauen Auswirkungen durch die Geschlechtshormone bisher nicht hinreichend untersucht.

Die oben genannten Risikofaktoren bewirken eine fehlgeleitete überschießende Immunreaktion und die Entstehung einer Autoimmunerkrankung, d.h. das Immunsystem erkennt fälschlicherweise körpereigenes Gewebe als einen zu bekämpfenden Fremdkörper an. Typisch für diesen Verlust der Immuntoleranz ist eine verminderte Anzahl von regulatorischen T-Zellen, bei gleichzeitig auftretenden autoreaktiven T- und B-Zellen.

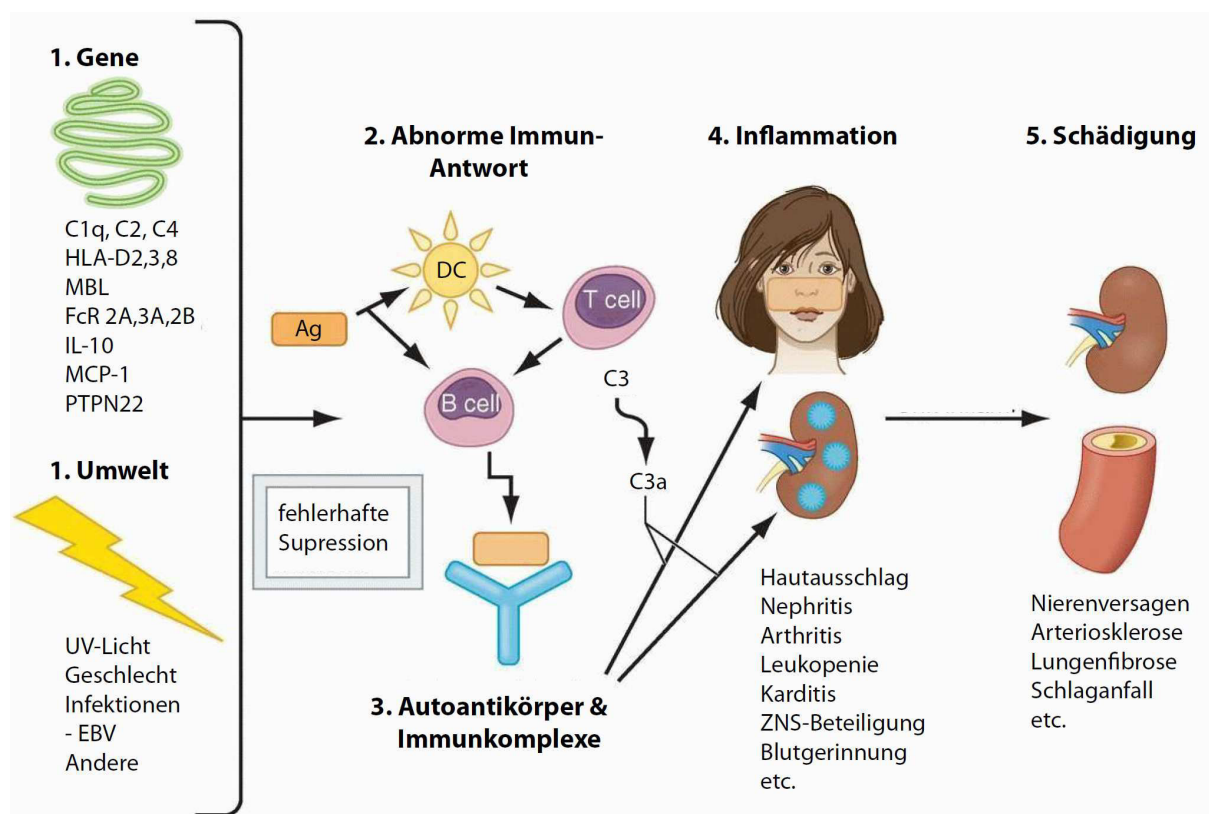


Abbildung 1: Pathogenese des SLE Abbildung nach [22]

Die meisten der exogenen Risikofaktoren bewirken einen vermehrten Zelltod, während viele der genetischen Prädispositionen (Störung von SAP, C1q) die *Clearance* apoptotischer Zellen beeinträchtigen (Abb. 1/1). Beides führt zu einer unzureichenden *Clearance* von Zelldetritus und dadurch zu einer vermehrten Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen was eine vermehrte Präsentation von Autoantigenen zur Folge hat (Abb. 1/2) [1]. So kommt es zu einer Aktivierung des angeborenen Immunsystems und in deren Verlauf zur Bildung von Autoantikörpern und Immunkomplexen aus Autoantikörpern, DNA, Fibrin, und Komplement (Abb. 1/3). Verschiedene Immunkomplexe fungieren als endogene Liganden von *Toll-like*

Rezeptor 7 bzw. 9. Die Aktivierung dieser Rezeptoren sowie die Ablagerung der Immunkomplexe an den Gefäßwänden führt zu einer verstärkten Freisetzung von proinflammatorischen Botenstoffen, wie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Chemokinen, vasoaktiven Peptiden, und Komplementfaktoren. Die hieraus resultierende chronische Entzündungsreaktion (Abb. 1/4) des Bindegewebes sowie der Blutgefäße schädigt je nach der jeweiligen Lokalisation eine Vielzahl verschiedener Organe und Gewebe (Abb. 1/5) [22].

Verlauf und Klinik: Aufgrund des Vorliegens von systemischen Autoantikörpern gegen verschiedene Bestandteile der Zelle, allen voran der Zellkernbestandteile, welche im Blutkreislauf zirkulieren handelt es sich beim SLE um eine Systemerkrankung. Deshalb können beim SLE nahezu alle Organe befallen werden; hierdurch sind die jeweiligen Beschwerden und das klinische Bild sehr vielfältig. Patienten können über eine nur leicht ausgeprägte Symptomatik mit Hautauschlag und Fieber, oder aber über schwersten Gelenk-, Nieren-, Lungen- und Gehirnbefall mit den jeweiligen Ausfallserscheinungen klagen. Im Prodromalstadium der Erkrankung ist die Klinik sehr unspezifisch und es treten Allgemeinsymptome wie Fieber, Müdigkeit, Leistungsschwäche, Abgeschlagenheit, Muskel- und Gelenkschmerzen in den Vordergrund. Beim klinischen sowie auch beim manifesten SLE sind die am häufigsten betroffenen Organe die Haut, das Herz, die Niere, die Lunge und das ZNS. Die häufigsten Symptome des SLE sind in Tabelle 1 aufgelistet [3].

Tabelle 1: Symptome des SLE nach prozentualem Vorkommen Abbildung nach [3] und [23]

Organsystem	Prävalenz	Symptome
Nierenbeteiligung	60-70%	Lupusnephritis: Immunkomplex-GN mit vielfältigen glomerulären Läsionen
Kardiopulmonale Beteiligung	60-70%	Pleuritis, Perikarditis mit Ergüssen, Endokarditis Myokarditis, Lupus-Pneumonitis, Atherosklerose mit erhöhtem Myokardinfarkttrisiko
Neurologische Beteiligung	60%	vielfältiges Bild von Vigilanzdefekten und Kopfschmerzen über Krampfanfälle und Depression bis hin zum Status epilepticus, Apoplex und MS ähnlichen Verläufen
Muskel-/ Gelenkbeschwerden	>80%	Polyarthritits: Gelenkschmerzen u. -Entzündung, keine Erosionen, evtl. Subluxationen/Fehlstellung, Myositis
Hautveränderungen	>70%	Schmetterlingserythem an Wangen u. Nasenrücken diskoider Lupus: Papeln mit Schuppenbildung und Hyperkeratose
Allgemeinbeschwerden	95%	Fieber, Müdigkeit, Schwäche, Gewichtsverlust, Haarausfall, Lymphadenopathie

Die Prognose und der Verlauf der Erkrankung hängen vor allem von dem Ausmaß der Manifestation der Erkrankung am Herzen, der Nieren und dem ZNS ab. Der Verlauf des SLE lässt sich in 5 Phasen gliedern (Tabelle 2).

Tabelle 2: Die fünf Phasen des SLE im Zeitverlauf von links nach rechts. Tabelle nach [24]

Die Phasen des Systemischen Lupus Erythematoses				
Phase 1	Phase 2	Phase 3	Phase 4	Phase 5
Disposition:	Entwicklung:	Prodrom:	klinischer SLE:	manifeste SLE:
- weibliches Geschlecht - genetische Prädisposition - Vorliegen von Umweltfaktoren	Vorliegen von Auto-AK	Vorliegen von Auto-AK	Vorliegen von Auto-AK	Vorliegen von Auto-AK
Symptomatik: - keine	Symptomatik: - keine - Fatigue	Symptomatik: - Malaise	Symptomatik: - typische SLE Symptome	Symptomatik: durch chronische Organschädigung bedingt

Befunde: Es gibt sehr viele immunologische Befunde, die typischerweise beim SLE auftreten, aber leider nicht spezifisch sind. Wie bei vielen Erkrankungen findet man auch hier unspezifische Entzündungsparameter wie eine erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), eine Verringerung des Komplements sowie eine systemische Lymphoproliferation. Zusätzlich zu diesen Allgemeinbefunden finden sich häufig Kombinationen verschiedener Autoantikörper (Tabelle 3).

Tabelle 3: Schädigende Autoantikörper in Systemischen Lupus Erythematoses. Tabelle modifiziert aus [1]

Antikörper	Prävalenz	Lokalisation des Befalls
Anti-double-stranded DNA	70-80%	Nieren, Haut
Nucelosomen	60-90%	Nieren, Haut
Ro	30-40%	Nieren, Haut, fötales Herz
La	15-20%	fötales Herz
Smith (Sm)	10-30%	Nieren
NMDA-Rezeptor	33-50%	Gehirn
Phospholipide	20-30%	Thrombosen, Abort
α -Actinin	20%	Nieren
C1q	40-50%	Nieren

In 97% der Fälle sind für SLE Patienten antinukleäre Antikörper (ANA) nachweisbar. Da dieser Nachweis aber nicht spezifisch ist, eignet er sich lediglich als Screening-Verfahren. Bei Anti-dsDNA handelt es sich um Antikörper gegen doppelsträngige DNA. Diese sind spezifisch für SLE und korrelieren mit der Krankheitsschwere, sind aber nur in 46% der Fälle positiv. Anti-Sm sind Antikörper gegen U1snRNP. Diese Autoantikörper sind ebenfalls SLE-spezifisch, jedoch nur bei 20% der Patienten nachweisbar. Bei 40% der Patienten lassen sich Antiphospholipid-Antikörper, wie die Anti-Kardiolipin- und die Anti- β 2-Glykoprotein1-Antikörper, detektieren. Circa die Hälfte aller SLE-Patienten weist eine durch Antikörper bedingte Zytopenie auf. Interessanterweise sind die Serumwerte von CRP und SAP bei der Mehrzahl der Lupuspatienten im Regelfall niedrig [25, 26]. Dieses Phänomen wurde mit dem Vorliegen von Anti-Pentraxin Antikörpern sowie dem supprimierenden Effekt von $IFN\alpha$ auf die Promotoraktivität der kurzen Pentraxine erklärt [27, 28]. Die Pentraxin-3 (PTX3) Serumwerte sind bei rheumatischen und inflammatorischen Erkrankungen in der Regel erhöht [29, 30]. Beim systemischen Lupus erythematodes schienen die Serumwerte von PTX3, wie auch die der kurzen Pentraxine, vernachlässigbar zu sein [31]. Dieser Auffassung widerspricht eine neue Arbeit bei der in Patienten mit SLE signifikant erhöhte PTX3 Serumwerte, die mit der Krankheitsaktivität korrelierten, nachgewiesen werden konnten [32]. Pentraxin-3 Antikörper sind in Patienten mit SLE im Vergleich zu Gesunden oder Patienten mit anderen rheumatischen Autoimmunerkrankungen signifikant erhöht und stellen bisher einen möglichen Erklärungsansatz für die bisher observierten niedrigen PTX3-Spiegel dar [33].

Diagnose: Die Diagnose des SLE wird durch elf Kriterien unterstützt, die vom *American College of Rheumatology* (ACR) im Jahr 1997 aufgestellt wurden. Wenn vier oder mehr dieser elf Kriterien positiv sind, ist das Vorliegen eines SLE wahrscheinlich, aber nicht nachgewiesen [34, 35]. Die Kriterien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4: Die 11 Kriterien des SLE, aufgestellt vom ACR im Jahr 1997

Kriterien:

1.	Schmetterlingserythem	flaches oder erhabenes Erythem beider Wangen
2.	diskoide Hautläsionen	typische Hautveränderungen bei diskoiden SLE
3.	Photosensibilität	Überempfindlichkeit der Haut nach Sonnenlicht
4.	Ulcera	orale oder nasale Schleimhautulzera, meist schmerzfrei
5.	Arthritis	nicht erosive Arthritis von mindestens 2 peripheren Gelenken, charakterisiert durch Schwellung, Erguss oder Druckschmerzhaftigkeit
6.	Serositis	Pleuritis, Perikarditis
7.	Nierenerkrankungen	persistierende Proteinurie (> 0,5 g/d) oder Ausscheidung zellulärer Zylinder (Erythrozyten, Hämoglobin)
8.	Neurologische Befunde	ZNS-Befall mit u.a. Epilepsien, Psychosen
9.	Hämatologische Befunde	hämolytische Anämie, Thrombozytopenie, Lymphozytopenie oder Leukozytopenie
10.	Immunologische Befunde	Anti-dsDNA-, Anti-Sm- oder Antiphospholipid-Antikörper
11.	Antinukleäre Antikörper	nicht medikamentös induzierte Titer-Erhöhung

Therapie: Die Therapie des SLE richtet sich nach dem Schweregrad des momentanen Krankheitsgeschehens. An erster Stelle der Therapie steht die Vermeidung beziehungsweise die Beseitigung von so genannten Krankheits-*Triggern*. Hierzu gehört das Absetzen von Medikamenten, welche einen Lupus induzieren könnten und das Meiden von starker UV-Exposition. Den Patienten wird empfohlen, ihre Haut mit Sonnenschutzfaktor 60 einzucremen, da selbst die Exposition hinter Glas für den Ausbruch eines Krankheitsschubes ausreichen kann. Bei leichten Krankheitsverläufen ohne den potentiell lebensbedrohlichen Befall von viszeralen Organen wird symptomatisch mit nichtsteroidalen Antirheumatika (NSAR) sowie wohl kausal mit Hydroxychloroquin behandelt [36]. Unter diesem Malariamittel kommt es häufig zu einer Besserung der Gelenkbeschwerden sowie der konstitutionellen Verfassung. Bei entzündlichen Schüben kann mit Kortikosteroiden und evtl. mit zusätzlichen Immunsuppressiva gegengesteuert werden. Bei schweren Krankheitsverläufen mit Beteiligung lebenswichtiger Organe wird mit einer systemischen Kortisonstoßtherapie und/oder einer Immunsuppression mit Medikamenten wie Azathioprin, Cyclosporin A und Cyclophosphamid behandelt. Das Standardmedikament bei einer lebensbedrohlichen Lupusnephritis ist Cyclophosphamid. Cyclophosphamid wird als

Immunsuppressivum bei zahlreichen Autoimmunerkrankungen eingesetzt. Nach Aktivierung in der Leber führt Cyclophosphamid durch eine Alkylierung der Nukleinsäuren zu Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA und RNA. Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung der T-Lymphozyten von den CD4-Helferzellen hin zu den CD8-Suppressorzellen und somit zu einem geringeren Ausmaß der Inflammation [37]. Bei Unverträglichkeit gegenüber Cyclophosphamid wird als Alternative Azathioprin verabreicht [36]. Die bisher verwendeten Medikamente dienen vor allem zur Besserung der Symptome und sind wenig spezifisch für die Pathogenese des SLE. Daher ist ein genaueres Verständnis der genetischen Pathomechanismen und die dadurch verbundene Möglichkeit, diese pharmakologisch gezielt zu unterbinden, für eine effektivere Therapie der SLE Patienten von Nöten. So wird momentan bei therapierefraktären Verläufen in experimentellen Studien mit verschiedenen *Biologicals* behandelt. Diese *Biologicals* sind rekombinant hergestellte Antikörper, Antikörper-Fragmente oder Fusionsproteine welche zur zielgerichteten Blockade einzelner entzündlicher immunologischer Vorgänge führen. Mögliche Ansatzpunkte sind in Abbildung 2 gezeigt.

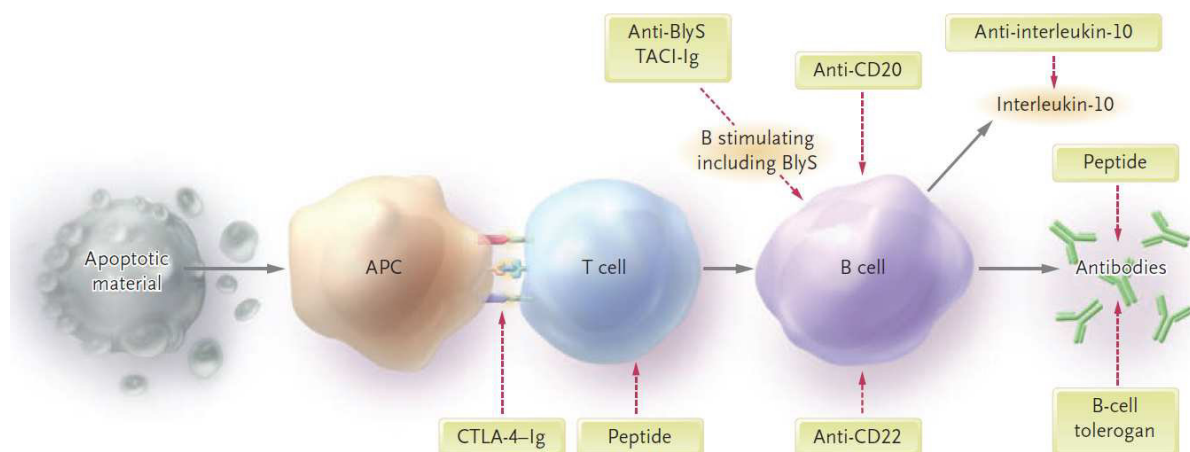


Abbildung 2: Mögliche therapeutische Ansatzpunkte in SLE [1]

Durch das zu lange oder vermehrte Vorliegen von apoptotischen Zellen, kommt es zur Digestion dieser durch Antigen-präsentierende Zellen (APC), wie dendritischen Zellen. Die APC wiederum aktivieren daraufhin die T-Zellen und führen so indirekt auch zur Aktivierung der B-Zellen, welche dann die für den SLE typischen Autoantikörper produzieren. In diesen pathogenetischen Prozess kann man an unterschiedlichen Stellen mittels *Biologicals* eingreifen und dadurch versuchen diesen einzudämmen.

Bei Rituximab handelt es sich um einen Antikörper gegen CD20, einem Oberflächenmarker von unreifen B-Zellen. Durch die Anbindung des Antikörpers an die B-Zellen werden diese in ihrer Proliferation gehemmt und dadurch indirekt auch die Produktion von Antikörpern gegen doppelsträngige DNA [1]. Die Wirksamkeit und Indikation von Rituximab ist momentan heftig umstritten. Zahlreiche klinische Studien [38, 39] sowie die klinische Erfahrung zeigen einen klaren Vorteil durch die Behandlung mit Rituximab v.a. bei Therapie-refraktären

Verläufen [40]. Im Gegensatz hierzu stehen die derzeit beiden einzigen klinisch randomisierten doppelblinden Placebo-kontrollierten Studien LUNAR [41] und EXPLORER [42], welche keinen signifikanten Vorteil durch die Rituximab Gabe erkennen ließen. Um den Stellenwert von Rituximab bei der Lupus-Therapie endgültig zu klären werden weitere klinische-randomisierte Studien sowie ein genauere Untersuchung der Organ-spezifischen Wirkung benötigt.

Prognose: Die Lebenserwartung hat sich in den letzten 60 Jahren dank verbesserter Therapie deutlich erhöht. So betrug das 4-Jahres-Überleben in den 50er Jahren gerade einmal 50% [43], heute leben 80% aller Patienten 15 Jahre nach Diagnosestellung noch [44]. Die 10-Jahresüberlebensrate liegt bei korrekter Behandlung heute bei über 90% [3]. Allerdings werden bei dieser Überlebensrate leichte Verläufe wie der auf die Haut beschränkte kutane Lupus erythematodes mit guter Prognose als auch schwere Erkrankungsverläufe mit Multiorganbeteiligung und hoher Morbidität zusammengefasst. Todesursachen im frühen Stadium der Erkrankung sind vor allem Infektionen und Lupus-bedingte akute Organschädigungen einhergehend mit einem Versagen des Organs. Im späteren Verlauf der Erkrankung sind die limitierenden Faktoren der Lebenserwartung vor allem auftretende Myokardinfarkte sowie Schlaganfälle [17]. Die häufigsten Todesursachen sind Urämie, Herzversagen sowie neurologische und septische Komplikationen.

1.2 Das Immunsystem

Der menschliche Körper ist dauerhaft den Angriffen von infektiösen Organismen ausgesetzt, durch das Immunsystem aber in der Lage, diesen zu widerstehen. Das Immunsystem als Körperabwehr muss die Fähigkeit besitzen, eindringende krankheitserregende Organismen wirksam zu bekämpfen, gleichzeitig allerdings hierbei keine körpereigenen Strukturen anzugreifen. Eine gestörte Unterscheidung zwischen „selbst“ und „fremd“ durch die Körperabwehr ist pathognomonisch für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen. Im Zuge einer solchen Autoimmunerkrankung, wie beispielsweise dem SLE, wird durch die fehlende Erkennung des körpereigenen Gewebes als körpereigen eben jenes zerstört. Das Immunsystem besteht aus einem angeborenen unspezifischen und aus einem erworbenen spezifischen Anteil. Diese beiden Effektorsysteme des Immunsystems sind unterschiedlich organisiert, stehen aber in engen Kontakt miteinander. Nur bei einem guten Zusammenspiel zwischen diesen beiden Systemen ist die Integrität des menschlichen Organismus gewährleistet [45]. Der zeitliche Ablauf bei einem erstmaligen Kontakt mit einem Krankheitserreger läuft in 3 Phasen wie folgt ab:



Abbildung 3: Die drei Phasen der Immunantwort [45]

Die angeborenen Abwehrmechanismen setzen sofort nach Erkennung des infektiösen Agens ein und dauern circa 4 Stunden an gefolgt von der sogenannten frühen induzierten Reaktion, welche bis zu 96h aktiv ist. Bei dieser Antwort kommt es nicht zur Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Erst wenn das infektiöse Agens diese beiden Abwehrlinien durchbrochen hat kommt es zur Ausbildung einer spezifischen Immunantwort 96 Stunden nach Eindringen und Erkennung des Pathogens.

1.2.1 Das angeborene Immunsystem

Das angeborene Immunsystem ist entwicklungsgeschichtlich älter und stellt den ersten Schutz gegenüber Pathogenen dar. Zudem bildet es im Gegensatz zum erworbenen Immunsystem kein immunologisches Gedächtnis aus, so dass es bei einer erneuten Exposition mit dem gleichen Antigen eine identische Abwehrreaktion aufzeigt. Die Hauptaufgaben des angeborenen Immunsystems bestehen in der Aktivierung des spezifischen Immunsystems über eine Präsentation der Antigene, und in der zeitlichen Überbrückung zwischen dem Eindringen eines infektiösen Organismus und dem Einsetzen der spezifischen Immunabwehr. Zudem ist das angeborene Immunsystem wichtig für die Erkennung von so genannten *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs), für die Rekrutierung von Immunzellen mittels Zytokinen und Chemokinen und für die Aktivierung von Wachstumsfaktoren, welche die Zellproliferation und Zelldifferenzierung sowie das Komplementsystem entscheidend beeinflussen [45].

Das angeborene Immunsystem verfügt über eine Vielzahl nachgeschalteter Barrieren um den Körper vor Infektionen zu schützen, die von einem Krankheitserreger erst durchbrochen werden müssen.

Körperepithelien bilden eine mechanische, chemische und biologische Barriere gegenüber eindringenden Erregern. Die mechanische Barriere wird durch feste Zell-Zellverbindungen, sogenannten *tight junctions*, zwischen den einzelnen Epithelzellen gewährleistet. Die Epithelien bilden so einen Schutzwall gegen in Luft und Flüssigkeiten verbreiteten Mikroorganismen. Chemisch wirksam auf den Körperepithelien sind unter anderem sezernierte Lysozyme (Speichel, Schweiß, Tränen), Pepsine (Darm), der niedrige pH-Wert (Schweiß, Magen) und Fettsäuren (Haut). Eine biologische Barriere besteht aufgrund der physiologisch auf der Haut und im Magen-Darm-Trakt vorkommenden Mikroorganismen-Flora, welche eine Ansiedlung pathogener Keime durch Konkurrenz um Nährstoffe und Bindungsstellen an Epithelzellen erschwert, beziehungsweise verhindert [45].

Kommt es trotz der Epithelien zu einem Eindringen von Erregern, so verfügt das angeborene Immunsystem über eine zelluläre Abwehr, die die Fähigkeit zur Phagozytose von eindringenden Organismen durch neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen besitzt. Neben der Phagozytose der Erreger bewirken die Makrophagen als Produzent von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen, allen voran TNF- α , auch eine Modulation und

eine Aktivierung des Immunsystems [45]. Sie initiieren als Antwort auf Pathogene eine klassische Entzündung mit den fünf Entzündungszeichen *rubor* (Rötung) und *calor* (Erwärmung), durch die Vasodilatation der Gefäße, *tumor* (Schwellung) und *dolor* (Schmerz) durch die Extravasation von Leukozyten und weiteren Blutbestandteilen ins Gewebe, und *functio laesa* (eingeschränkte Funktion). Die Entzündung hat drei wichtige Funktionen bei der Bekämpfung von Infektionen. Sie dient erstens dazu, weitere Effektormoleküle und Leukozyten zum Ort der Infektion zu lotsen um dort vor Ort den eingedrungenen Erreger zu bekämpfen. Weiterhin induziert die Entzündung eine lokale Blutgerinnung die eine weitere physikalische Barriere darstellt und somit eine Ausbreitung der Infektion durch den Blutstrom verhindert. Drittens spielt die Entzündung bei der Initiierung der Gewebereparatur eine wichtige Rolle. Zusätzlich verfügt das angeborene Immunsystem über die Möglichkeit, durch natürliche Killerzellen virusinfizierte Zellen und Tumorzellen zu vernichten [45].

Neben der zellulären Abwehr wirken auch humorale Faktoren wie das Komplementsystem, das Gerinnungssystem, Interferone und Interleukin-1 protektiv gegenüber Infektionen. Das Komplementsystem ist eines der wichtigsten Systeme bei der Pathogenerkennung. Es besteht aus Plasmaproteinen, welche entweder direkt durch Pathogene oder indirekt durch an Pathogen gebundene Antikörper aktiviert werden [45]. Interleukin-1 induziert die Ausbildung von Fieber, die Bildung der Akut-Phase-Proteine (wie CRP, SAP, PTX3) und die Bildung antibakterieller Proteine wie Lactoferrin oder Lysozym [45].

Lösliche Mediatoren des angeborenen humoralen Immunsystems beinhalten neben den Komponenten des Komplementsystems lösliche Mustererkennungsrezeptoren, auch *soluble pattern-recognition-receptors* (SPRR) genannt. Diesen Molekülen kommt eine Schlüsselrolle bei der Einleitung einer effektiven Immunantwort zu, da sie wie die übrigen PRR Pathogene aufgrund bestimmter Strukturen, den sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) erkennen [45, 46]. Bei diesen PAMPs handelt es sich um evolutionär konservierte, sich regelmäßig wiederholende molekulare Strukturen, die gleichzeitig auf vielen verschiedenen Mikroorganismen, nicht aber auf unseren körpereigenen Zellen vorhanden sind [47]. Zu der Gruppe der SPRR gehören unter anderem die Pentraxine (CRP, SAP, PTX3), *ficolins* und *collectins* (Surfactant Protein-A/-D). Diese Proteine werden in der genomischen DNA kodiert und sind in der Lage, über Anbindung an Pathogene verschiedene Wirkungen hervorzurufen. Zu diesen Wirkungen gehören eine Neutralisierung, Opsonierung, Agglutination und die Induktion einer Schädigung der Pathogen-Membran. Außerdem rekrutieren diese Proteine weitere lösliche Mediatoren und Immunzellen durch die ausgelöste lokale Inflammation an den Ort des Geschehens. Zudem detektieren PRR apoptotische Zellen über die Erkennung von

so genannten *apoptotic cell-associated molecular patterns* (ACAMP). Somit stellen die löslichen PRR, die eine heterogene Gruppe von Proteinen sind, einen funktionellen Vorläufer der Antikörper dar und nehmen sowohl im Tier als auch im Menschen eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem ein. Sie vernetzen das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem und stellen wichtige Immunsensoren bei der Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen dar [45, 47].

Zu den, an Zelloberflächen gebundenen *pattern-recognition-receptors* (PRR) gehören unter anderem die *Scavenger*-Rezeptoren, die C-Typ Lektin-Rezeptoren, *Toll-like* Rezeptoren (TLRs), Komplement- und Fc-Rezeptoren. Sie alle sind, wie die löslichen PRR in der genomischen DNA kodiert und erkennen die so genannten PAMPs. Dies bedeutet, dass diese Rezeptoren an der Entfernung von körperfremden Substanzen und körpereigenen Abfallprodukten sowie an der Aktivierung einer zellulären Immunantwort beteiligt sind. TLR sind Transmembranproteine, welche sich sowohl in den endosomalen wie in den zellulären Membranen befinden und eine große Spannbreite von PAMPs erkennen [46, 47]. Zu den intrazellulären PRR gehören unter anderem die bereits oben erwähnten endosomalen TLRs, die *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Rezeptoren* (NLRs) [48] und *Retinoic acid-inducible gene-1 (RIG-I)-like Rezeptoren* (RLRs) [49]. Durch das Zusammenspiel der PRR in den verschiedenen Kompartimenten des Körpers werden Mikroorganismen aufgrund ihrer PAMPs im Körper sowohl in den Körperflüssigkeiten als auch intrazellulär und extrazellulär detektiert und bekämpft [45, 47]

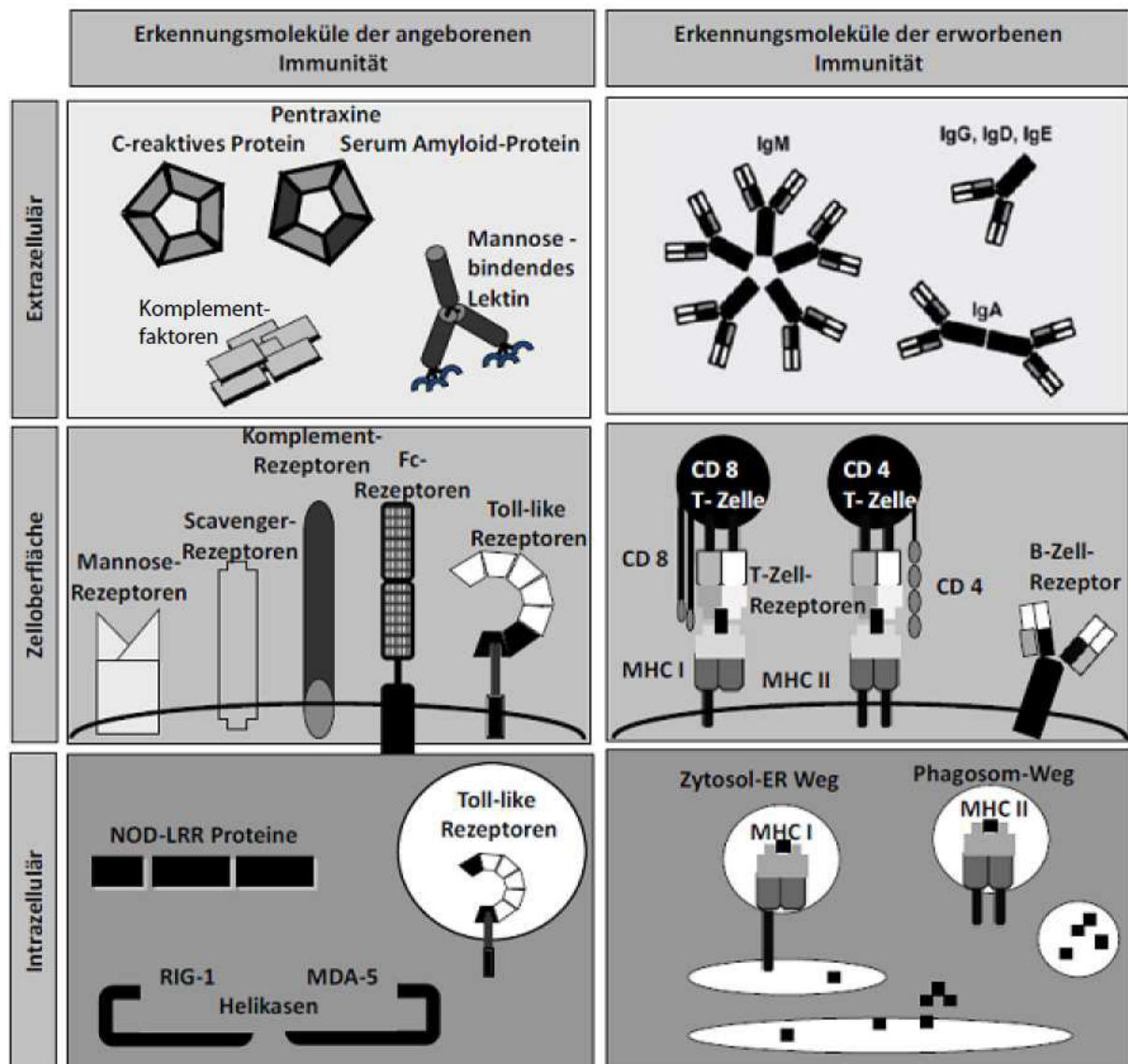


Abbildung 4: Mustererkennungsstrukturen (PRPP) des erworbenen und angeborenen Immunsystems
 Übersicht der verschiedenen PRR in den verschiedenen Kompartimenten des Körpers des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Das erworbene Immunsystem ist in der Lage sich auf verschiedene Erreger einzustellen, im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem, welches nur evolutionär konservierte PAMPs detektiert [Prof. Anders].

1.2.2 Das erworbene Immunsystem

Das erworbene Immunsystem reagiert spezifisch auf unterschiedliche Krankheitserreger. Es benötigt daher bei erstmaligem Kontakt mit einem Pathogen Zeit zur Entwicklung einer Abwehrreaktion im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem. Durch diese Zeitverzögerung kommt das spezifische Immunsystem erst dann zum Einsatz, wenn das angeborene Immunsystem die Situation nicht alleine bewältigen konnte [45]. Es besteht wie auch das angeborene Immunsystem aus einem humoralen Arm, der Antikörperproduktion durch Plasmazellen, und einem zellulären Arm: Der zelluläre Arm wird von den T-Lymphozyten gebildet, welche durch ihre *Cluster of Differentiation* und ihre Funktion in verschiedene Gruppen unterteilt werden können. Eine wichtige Gruppe sind die CD8 positiven zytotoxischen T-Zellen, die infizierte Zellen abtöten [45]. Auch die CD4 positiven T-Helferzellen, die je nach Subpopulation viele verschiedene Funktionen inne haben, sind wie der Name schon impliziert wichtig durch ihre aktivierende und unterstützende Funktionen im Immunsystem. So aktivieren sie unter anderem die B-Zellen, die wiederum zu Plasmazellen ausreifen und Antikörper produzieren [45]. Diese Antikörper binden spezifisch an ihr entsprechendes Antigen und bilden so mit einem Immunkomplex. Dieser Vorgang wird auch als Opsonierung bezeichnet und bewirkt neben der Funktionshemmung des Pathogens auch eine verbesserte Phagozytose derselben und damit eine verbesserte Beseitigung des Pathogens [45]. Nach einer Infektion wird der Krankheitserreger durch das angeborene Immunsystem phagozytiert und das entsprechende Antigen zu den Lymphorganen transportiert, wo es durch naive B- und T-Zellen erkannt wird. Durch klonale Expansion der für dieses Pathogen spezifischen B- und T-Zellen und der Ausdifferenzierung zu sog. Effektorzellen kommt es schließlich zu einer Beseitigung des Erregers. Die zeitliche Verzögerung der spezifischen Immunantwort liegt in der Notwendigkeit der zeitraubenden klonalen Expansion begründet. Bei einem weiteren Kontakt mit demselben Krankheitserreger kommt es aufgrund der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses durch klonale Selektion einer ausdifferenzierten Population von Gedächtniszellen zu einer sehr schnellen, spezifischen und effektiven Abwehrreaktion [45].

Tabelle 5: Unterschiede in der Initiierung einer erworbenen und angeborenen Immunantwort Tabelle modifiziert aus [50].

	angeborene Immunsystem	erworbene Immunsystem
Erkennungsrezeptoren		
Typen	PRR (TLR, Komplement...)	T- und B-Zellrezeptoren
Klonalität	nicht klonal	klonal
Genetik	einzelnes Gen	codiert in Gensegmenten
Rezeptor <i>Rearrangement</i>	nicht benötigt	benötigt
Erkennungsstrukturen	konservierte <i>molecular patterns</i>	Strukturbestandteil
Selbst-Fremd-Unterscheidung	durch Evolution selektiert	individuell selektiert
Zeit bis zur Effektoraktivierung	sofort	verzögert
Antwort des Effektorssystems	Opsonierung, Komplement-Aktivierung, Phagozytose, Proinflammatorische Zytokin- und Chemokine,	klonale Expansion oder Anergie von Antigen-spezifischen B- und T-Zellen

1.3 Pentraxine

Pentraxine gehören zu den löslichen *Pattern-recognition-receptors*. Diese Pentraxine sind eine Gruppe heterogener Plasmaproteine, die eine charakteristische Abfolge von 200 Aminosäuren in der carboxyterminalen sogenannten Pentraxin-Domäne vorweisen. Der Begriff Pentraxin wurde erstmals für die Struktur des c-reaktiven Proteins (CRP) verwendet, da dieses aus fünf identischen Untereinheiten gebildet wird und bereits in den 30er Jahren als Prototyp der Akut-Phase-Proteine entdeckt wurde [51]. Zusätzlich zu der Pentraxin-Domäne verfügt die Gruppe der Pentraxine auch über eine typische Aminosäuresequenz, die aus 8 Aminosäuren besteht [52].

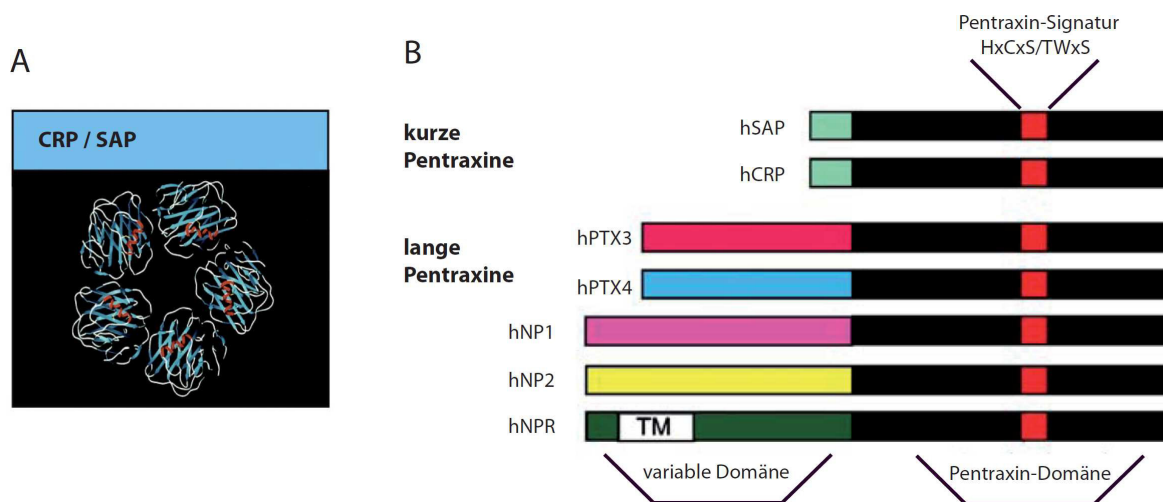


Abbildung 5: Die Pentraxinfamilie – Aufbau und Aminosäuresequenz

A: Die homologe Pentamerstruktur der beiden kurzen Pentraxine SAP und CRP, gebildet von 5 identischen Untereinheiten. Abbildung aus [45].

B: Die Aminosäuresequenz der kurzen und langen Pentraxine mit der typischen c-terminalen Pentraxine-Domäne samt der Pentraxin-Signatur. N-terminal ist die variable Domäne dargestellt, die sich zwischen den kurzen und langen Pentraxinen unterscheidet. Abbildung nach [52].

Pentraxine sind im Laufe der Evolution vom Spinnentier bis zum Säugetier erhalten geblieben. Sie erkennen als Opsonine eine große Spannbreite exogener pathogener Substanzen sowie körpereigener veränderter Zellen und bewirken durch ihre Anbindung eine rasche Entfernung derselben. Weiterhin stellen die Pentraxine flexible Adaptoren des humoralen Armes des angeborenen Immunsystems dar, deren Synthese durch inflammatorische Zytokine wie dem Tumornekrosefaktor- α getriggert wird [52, 53]. Damit gehören sie zur Gruppe der Akut-Phase-Proteine, welche durch Anstieg oder Abfall ihres Serumspiegels unter inflammatorischen Umständen definiert sind. Man unterscheidet in der Gruppe der Pentraxine zwischen den kurzen Pentraxinen CRP und Serum Amyloid Protein (SAP) und den langen Pentraxinen (z.B. PTX3), bezogen auf die Länge der

Aminosäuresequenz des NH₂ terminalen Endes. Im Gegensatz zu den kurzen Pentraxinen CPR und SAP, deren Sequenz und Regulation sich zwischen Maus und Mensch im Laufe der Evolution unterschiedlich entwickelt hat, ist PTX3 im Verlauf der Evolution in hohem Maße unverändert geblieben [53].

1.3.1 Kurze Pentraxine

Kurze Pentraxine sind 25kDa große Proteine, die durch einen gemeinsamen strukturellen Aufbau gekennzeichnet sind. Dieser Aufbau besteht aus 5 bis 10 identischen Untereinheiten, die sich in der Form eines Pentamers anordnen. Prototypen der kurzen Pentraxine sind CRP und SAP [52]. Beide werden in der Leber als Antwort auf inflammatorische Zytokine, vor allem IL-6, gebildet und ahmen durch ihr systemisches Vorliegen und ihre Funktion die Wirkung von Antikörpern des erworbenen Immunsystems nach.

Genetik und Plasmaspiegel: CRP wurde erstmals um das Jahr 1930 im humanen Serum beschrieben und ist der erste entdeckte *pattern-recognition-receptor* überhaupt [51]. Das humane CRP-Gen befindet sich auf Chromosom 1q23 und wird durch 2 Exons codiert. Der CRP Plasmaspiegel gesunder Erwachsener ist kaum messbar (< 3mg/l), kann sich nach einem Akut-Phase-Stimulus (v.a. IL-6) aber um mehr als das 1000-fache steigern. Dies resultiert aus einer erhöhten Transkriptionsrate in der Leber. CRP wird mit einer Latenz von sechs bis acht Stunden gebildet und ist erst nach 12 bis 24 Stunden im Blut nachweisbar [54]. Andere Zellen wie Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen sind in der Lage, CRP zu synthetisieren, scheinen aber keinen Beitrag zur Höhe des CRP Plasmaspiegels zu leisten. Jahre nach der Entdeckung des CRP wurde das humane SAP entdeckt und als ein Verwandter des CRP identifiziert. Bei diesen beiden Proteinen sind 51% der Aminosäuresequenz identisch und beide zeigen elektronenmikroskopisch ein gleichartiges Erscheinungsbild [54-56]. Man vermutet, dass beide Proteine aus der Duplikation eines einzelnen Gens hervorgegangen sind [57]. Zudem sind CRP und SAP ortholog in verschiedenen Säugetierspezies, das heißt, sie sind funktionell miteinander verwandt und stammen vom selben Vorläufer ab (vertikale Evolution). Trotzdem gibt es zwischen diesen beiden Akut-Phasen-Proteinen beachtenswerte Unterschiede wie der basale Serumspiegel und die Veränderung des Spiegels während einer Akut-Phase-Reaktion.

Das humane SAP-Gen befindet sich ebenfalls auf Chromosom 1 in enger räumlicher und genetischer Nähe zum CRP-Locus. Weiterhin besteht das SAP-Gen ebenfalls aus zwei Exons, die identische Anteile des Proteins wie bei CRP codieren. In der Maus stellt SAP das Haupt-Akut-Phase-Protein dar, im gesunden erwachsenen Menschen liegt der Plasmaspiegel bei 30-50µg/ml [58].

Funktion: Als lösliche Mustererkennungsrezeptoren liegt eine Hauptfunktion von CRP und SAP in der teilweise Calcium-abhängigen Ligandenbindung. So erhielt CRP seinen Namen aufgrund seiner Reaktion mit den C-Polysacchariden von *Streptococcus pneumoniae*, die eine Präzipitation hervorruft. Im Gegensatz zu den Antikörpern besitzt CRP als humoraler Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine breitere Spezifität für die Molekülmuster von Pathogenen. So bindet es an den Phosphorylcholin-Anteil bestimmter Lipopolysaccharide in der Zellwand von Bakterien und opsoniert diese dadurch [45]. Neben Bakterien bindet CRP auch weitere Pathogene wie Pilze und Hefe. Auch körpereigene Strukturen wie apoptotische Zellen und Kernbestandteile werden durch CRP als Ligand gebunden. Hierdurch kommt es zu einer Verstärkung des klassischen Komplementweges und damit zu einer verbesserten Phagozytose dieser Zellen durch Makrophagen [54]. Weiterhin kann CRP in der Abwesenheit von Calcium Polykationen wie *poly-L-lysine*, *poly-L-arginine* und *myelin basic protein* binden.

SAP wurde ursprünglich wegen seiner Anbindung an Agarose charakterisiert [59]. Es bindet, allerdings wie CRP, eine Vielzahl von Bakterien, wie *Streptococcus pyogenes* und *Neisseria meningitidis* [59, 60]. Neben den Bakterien kann SAP aber auch an Influenzaviren [61], Lipopolysaccharide [60], Amyloidfibrillen [62] und Kohlenhydrate [63] binden. Zudem ist SAP das Hauptbindungsprotein von DNA und Chromatin im Plasma [64]. CRP und SAP können zusätzlich über die Bindung an den Komplementbestandteil C1q die klassische Komplementkaskade, und damit das Immunsystem, aktivieren [65]. Bei bereits bestehenden Gewebeschäden kann es durch diese Aktivierung zu einer Verstärkung der Schädigung kommen. Die Komplementaktivierung könnte ein Hauptmechanismus zur Entfernung von Zelltrümmern darstellen. In Übereinstimmung hierzu steht die Erkenntnis, dass sowohl CRP als auch SAP die Calcium-abhängige Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen verstärkt [66-68]. Durch die beschleunigte Phagozytose vermeiden die kurzen Pentraxine eine Exposition des Immunsystems mit nukleären Bestandteilen, bei der es zu der Ausbildung einer Autoimmunerkrankung kommen könnte. Analog zum Fehlen vom Komplementfaktor C1q kommt es auch bei der genetischen Fehlanlage von CRP und SAP zu einer verminderten Phagozytose von apoptotischen Zellen und hierdurch zu einem möglichen Einsetzen von SLE

[7, 8]. Des Weiteren interagieren beide Prototypen der kurzen Pentraxine mit Matrixbestandteilen, wie in Tabelle 6 gezeigt wird.

Zusammenfassend führen CRP und SAP, die in der Leber nach Stimulation durch IL-1, IL-6 und TNF- α gebildet werden, zu einer Stimulation des Immunsystems und sind als PRRs an der Beseitigung von toxischen, fremden, abgestorbenen oder veränderten Materialien, die bei Entzündungen und Infektionen freigesetzt werden, beteiligt. CRP spielt eine wichtige Rolle bei kardiovaskulären, infektiösen und autoimmunen Erkrankungen. SAP scheint protektiv gegen durch Autoantigene verursachte Autoimmunerkrankungen durch die Förderung der Entfernung der selbigen zu wirken. So führt ein Mangel an SAP zu einer SLE ähnlichen schweren Glomerulonephritis in Mäusen [7], allerdings ist momentan noch umstritten in wieweit es sich hierbei um ein Einkreuzungsphänomen handelt [69]. Des Weiteren ist SAP an der Pathogenese von Amyloidosen, des Morbus Alzheimer sowie bei Prionenerkrankungen beteiligt [52].

1.3.2 Lange Pentraxine

Prototyp der langen Pentraxinfamilie ist das Pentraxin-3 (PTX3), das auch unter dem Namen *TNF-inducible gene 14 protein* (TSG-14) bekannt ist. Weitere Mitglieder dieser Familie wurden in den 90er Jahren entdeckt als Moleküle, die in bestimmten Geweben als Antwort auf Zytokine exprimiert werden. Zu ihnen gehören: *Guinea pig apelin*, *neuronal pentraxin I* (NP1, NPTX1) *narp* (NP2, NPTX2) und *neuronal pentraxin receptor* (NPR, NPTXR) [70]. Bisher sind diese langen Pentraxine allerdings kaum erforscht. Das *Guinea pig apelin* wurde im Akrosom der Spermatozoen des Schweinespermas entdeckt, seine Funktion ist bisher weitgehend unklar [71]. NP1 wird nur im Gehirn exprimiert und ist für seine Anbindung an das Schlangentoxin Taipoxin beschrieben [72]. NP2 bindet ebenfalls an Taipoxin und wird nicht nur im Gehirn sondern auch im Hoden, Pankreas, Leber und in der Skelettmuskulatur exprimiert. Nach einer neuen Studie stellt NP2 einen potentiellen Tumormarker für das Pankreaskarzinom dar [73]. NPR ist nach neuen Studien ein potentieller Biomarker für neurodegenerative Prozesse wie dem Morbus Alzheimer [74]. Über die genauen Funktionen von NP1, NP2 und NPR können momentan nur Vermutungen angestellt werden. Sie scheinen allerdings eine Rolle bei der Aufnahme von synaptischen Material, Gewebeumbau und Phagozytose zu spielen [72, 75, 76].

1.3.3 Pentraxin-3

1.3.3.1 Die Herkunft von PTX3

Im Gegensatz zu den kurzen Pentraxinen, die von Hepatozyten in die Zirkulation freigesetzt werden, wird PTX3 von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen lokal im geschädigten Gewebe als Antwort auf inflammatorische Signale und die Erkennung von Mikroorganismen gebildet (siehe auch Abbildung 6). Die Produktion erfolgt hauptsächlich durch Leukozyten, in besonderem Maße durch dendritische Zellen und Makrophagen, als Antwort auf die Anbindung von Liganden an *Toll-like* Rezeptoren und auf das Vorhandensein von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 und TNF- α . Der wichtigste Induktor der kurzen Pentraxine IL-6 hat fast keinen steigernden Einfluss auf die PTX3-Produktion [77]. Die Hauptproduzenten des PTX3 sind myeloische dendritische Zellen nach Aktivierung ihrer TLR-2 Rezeptoren [78]. Neben den Leukozyten sind auch Nierenzellen, glatte Muskelzellen, Synovialzellen, Granulosazellen, Adipozyten, Lungenepithelzellen, Fibroblasten und aktivierte Endothelzellen in der Lage PTX3 zu produzieren [79-83]. In neutrophilen Granulozyten (NG) liegt PTX3 bereits vorgefertigt in Granula vor, die umgehend nach Erkennung von Mikroorganismen und bei Entzündungen sezerniert werden [84]. Neutrophile Granulozyten dienen somit als rasch reagierendes Reservoir von PTX3, welches eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem einnimmt. Das freigesetzte PTX3 kann sich weiterhin auch extrazellulär in sog. *neutrophil extracellular traps* (NETs) befinden [84]. Bei NETs handelt es sich um extrazelluläre Strukturen, die durch Extrusion von Chromatin aus lebensfähigen neutrophilen Granulozyten nach Stimulation entstehen und ein fibrilläres Netzwerk ausbilden. Dieses Netzwerk bildet einen fokalen Punkt, an dem antimikrobielle Effektormoleküle, wie PTX3 und Elastase fokussiert werden und das dazu dient Mikroorganismen zu fangen und abzutöten. Neben diesem schützenden Effekt vor Pathogenen haben NETs eventuell auch einen schädigenden Effekt auf den Organismus, da NETs Histone exponieren, welche neuesten Daten zufolge die Entstehung von Autoimmunerkrankungen triggern können [85, 86].

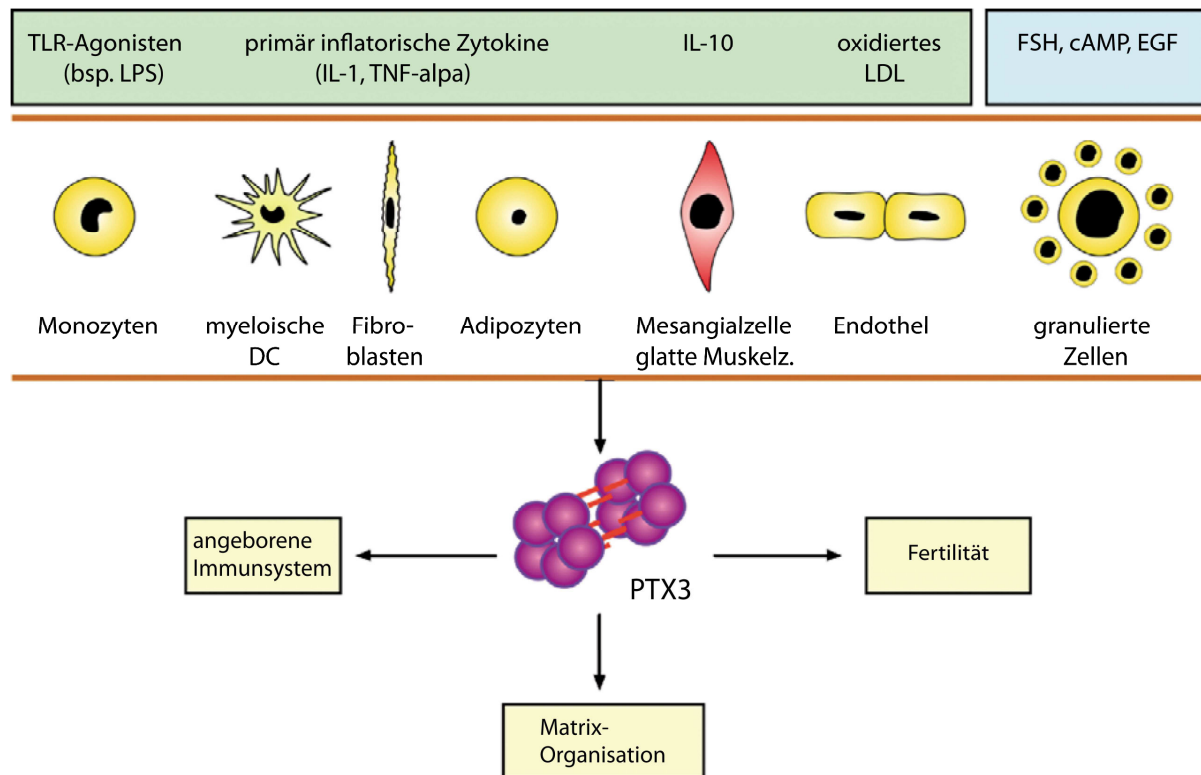


Abbildung 6: Die Hauptstimuli, -produzenten und -aufgabengebiet von PTX3. Abbildung nach [52].

1.3.3.2 Das PTX3 Gen

Das PTX3 Gen ist auf dem Chromosom 3q25.6 lokalisiert. Es liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem PTX3 Gen um das Produkt einer Fusion von zwei unterschiedlichen Genen handelt. Eine Genregion codierte ursprünglich für ein unbekanntes Protein unbekannter Funktion und codiert heute das N-terminale Ende von PTX3. Die andere Region des PTX3-Gens codiert für ein Polypeptid, homolog zu dem c-terminalen Ende der kurzen Pentraxine und scheint auch aus diesem Gen hervorgegangen zu sein. Das PTX3-Gen besteht aus drei Exons, welche durch zwei Introns voneinander getrennt sind. Die ersten beiden Exons codieren das Hauptpeptid sowie die N-terminale Domäne des Proteins, das dritte Exon codiert die Pentraxin-Domäne von PTX3 [87], die genau mit dem der anderen Pentraxinen übereinstimmt. Die exakte Größe des Transkriptes beträgt 1861 Nukleotide [88]. Die mRNA von PTX3 wird stark induziert durch die Anwesenheit von IL-1 und TNF- α , nicht jedoch durch IL-6, dem Hauptinduktor der kurzen Pentraxine CRP und SAP in der Leber. Das PTX3-Gen ist während der Evolution, im Gegensatz zu den kurzen Pentraxinen, nahezu unverändert geblieben, so dass das menschliche PTX3-Gen mit dem der Maus zu 82% identisch ist [79].

1.3.3.3 Der Aufbau von PTX3

PTX3 hat glykolysiert eine Molekülmasse von 45 kD und besteht aus 381 Aminosäuren. Die c-terminale Domäne ist 203, die n-terminale Domäne ist 178 Aminosäuren lang. Die c-terminale Domäne ist homolog zu der der kurzen Pentraxine. Die n-terminale Domäne ist deutlich länger und nicht homolog zu anderen bekannten Proteinen (siehe auch Abb. 5B) [87].

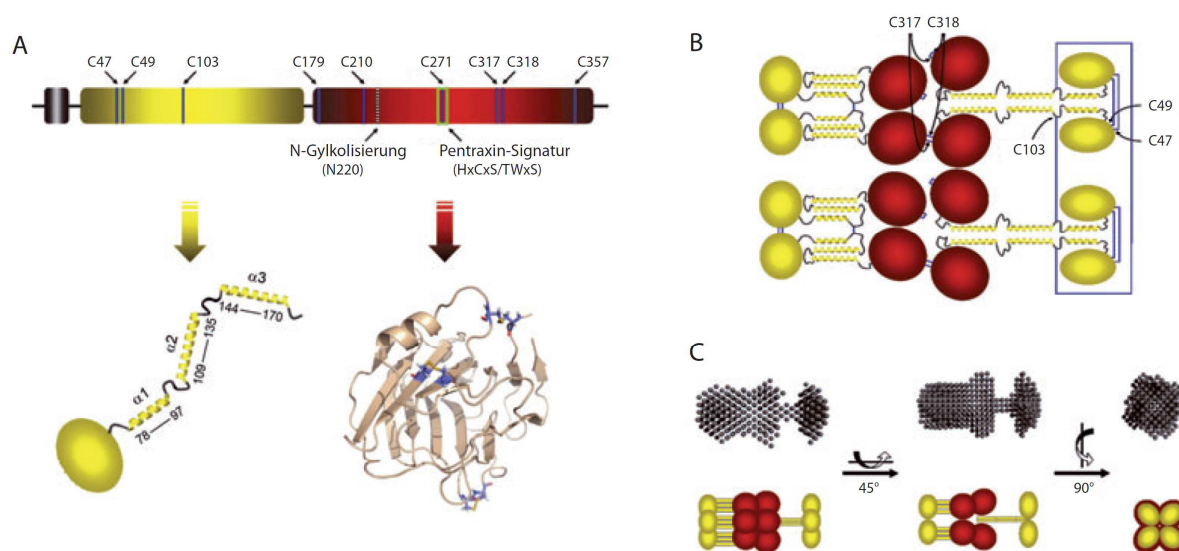


Abbildung 7: Der Aufbau und die Struktur von PTX3 [89]

A: zeigt in gelb, die N-terminale und in rot die C-terminale Domäne, mit der Pentraxinstruktur sowie der Glykolysierungsstelle an Asn220, von PTX3. Die Pfeile deuten auf die vermutete Struktur der jeweiligen Domäne. Hierbei bildet die N-terminale Domäne das Kopfteil, bestehend aus 3 Ketten in α -helikaler Anordnung. B: zeigt die typische Anordnung von PTX3 als Oktamer, stabilisiert durch Disulfidbrücken. C: zeigt in gelb zwei verschiedene Möglichkeiten der Anordnung der N-terminalen Domäne

Charakteristisch für PTX3 ist eine β -Faltblatt-Sekundärstruktur und eine α -helikale Anordnung der Domänen. Die typische Sekundärstruktur wird über eine Disulfidbrücke stabilisiert, die durch zwei Cystine an den Aminosäurepositionen 210 und 271, welche in allen Mitgliedern der Pentraxinfamilie vorhanden sind, geformt wird. Das Protein bildet ein Oktamer bestehend aus 8 Ketten. Je 4 Ketten bilden hierbei ein Tetramer, die durch verschiedene Disulfidbrücken stabilisiert werden. Eine Disulfidbrücke zwischen den Cystinen 317 und 318 ist verantwortlich für die Verbindung der zwei Tetramere zu einem Oktamer, der typischen Proteinstruktur des PTX3 [90] (Abb. 7B).

Posttranslationale Veränderungen von Proteinen können deren Funktion und Wirkung auf verschiedenste Art und Weise entscheidend beeinflussen. Ein typischer Mechanismus besteht in der Glykosylierung beziehungsweise der Änderung einer bereits vorliegenden Glykosylierung. So kann durch diesen Mechanismus die Ligandenbindung, -erkennung sowie die Faltung der Proteine entscheidend beeinflusst werden [91, 92]. Zudem ändert sich die

Glykosylierung von Akut-Phasen-Proteinen typischerweise unter entzündlichen Bedingungen, was sich auf die Funktion des Proteins auswirkt [93]. PTX3 kann variabel glykosyliert vorliegen. Im Normalfall macht die Glykolisierung circa 10 % des molekularen Gewichts aus, d.h. deglykolisiert reduziert sich die Masse des Proteins von 45kDa auf 40kDa [94]. PTX3 enthält in der Pentraxindomäne an der Aminosäureposition 220 ein Asparagin, das bei den natürlich vorkommenden PTX3 vollständig N-verbunden glykolisiert vorliegt, und somit das Vorkommen von O-verbundenen Oligosacchariden ausschließt [94] (Abb. 7A). Im Fall von PTX3 liegt die Glykolisierungstelle in der Pentraxin-Domäne, welche unter anderem für die C1q-Erkennung verantwortlich ist. Eine enzymatische Deglykolisierung von PTX3 führt zu einer um das 2-3fach gesteigerten Anbindung von PTX3 an C1q, im Vergleich zum natürlichen vorkommenden PTX3 [95]. Diese verstärkte Anbindung scheint nicht ursächlich in einer Neuordnung der Proteinstruktur zu liegen, sondern vielmehr scheint die Deglykolisierung von PTX3 den PTX3/C1q-Komplex zu stabilisieren und hierdurch die Rate der Dissoziation zu vermindern, anstatt die Assoziationsrate zu erhöhen. Im Einklang hierzu steht eine Verstärkung des klassischen Komplementweges, detektierbar an der C3 und C4 Deposition. Das Phänomen, dass an der Proteinoberfläche gebundenen Oligosaccharide sich auf die Proteinfunktion auswirken, machen sich verschiedene Pathogene wie auch Immunzellen zu Nutze. So spalten manche Pathogene mittels Exoglykosidasen, die an der Proteinfläche expremierten Oligosaccharide und beeinflussen so die Interaktion von PTX3 mit anderen Bestandteilen des Immunsystems über eine Änderung des Zuckerstatus.

1.3.3.4 Ligandenbindung und Funktionen von PTX3

Wie die kurzen Pentraxine CRP und SAP, besitzt auch PTX3 die Fähigkeit an sehr viele und sehr unterschiedliche Liganden wie Pathogene, Matrixproteine und Komponenten des Immunsystems spezifisch zu binden und somit bestimmte Reaktionen auszulösen. Im Gegensatz zu den kurzen Pentraxinen ist die Anwesenheit von Calcium nicht generell notwendig für die Anbindung von PTX3 [55]. Eine Auswahl an Liganden und das Bindungsverhalten der Pentraxine SAP, CRP und PTX3 ist in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Ligandenbindung der Pentraxine. Tabelle nach [96], NT = not tested

Ligand	CRP	SAP	PTX3	Ca-abhängig
Komplement-Komponenten				
C1q	+	+	+	-
Faktor H	+	NT	+	+
C4b-binding Protein	+	+	+	
Extrazelluläre Matrixproteine				
TSG-6	NT	NT	+	+
Inter- α -Trypsin Inhibitor	-	NT	+	+
Hyaluronan	NT	NT	-	
Laminin	+	+	-	
Kollagen IV	NT	+	-	
Fibronectin	+	+	-	
Wachstumsfaktoren				
FGF1 und FGF4	NT	NT	-	
FGF2	+/-	NT	+	+
Membranbestandteile				
PC	+	-	-	
PE	-	+	-	
LPS	-	+	-	
KpOmpA	NT	NT	+	+
Adhäsionsmoleküle				
Selectin-P	-	NT	+	
Pathogene				
Bakterien	+	+	+	NT
Pilze	+	+	+	-
Viren	-	+	+	-

Der zuerst und am besten beschriebene Ligand von PTX3 ist der Komplementbestandteil C1q [94, 97]. Sowohl C1q als auch PTX3 werden unter anderem von unreifen dendritischen Zellen als Antwort auf TLR-Anbindung produziert und beeinflussen durch ihre Interaktion die Komplementfunktionen. PTX3 bildet Homodimere aus, die mit ihrer c-terminalen Domäne mit den globulären Kopfreionen (gC1q) aller drei C1q-Ketten (gC1qA, gC1qB, gC1qC) interagieren [97, 98]. Im Gegensatz zu den beiden kurzen Pentraxinen CRP und SAP, die

beide vor einer optimalen Anbindung an C1q eine Konformationsänderung in Form einer chemischen Quervernetzung benötigen, ist dies bei PTX3, vermutlich aufgrund der stabileren Struktur, nicht der Fall [99]. Die Anbindung von PTX3 an C1q ist eine calciumunabhängige Reaktion, die eine wichtige Rolle bei der Phagozytose apoptotischer Zellen spielt. Interagiert PTX3 dosisabhängig mit an Oberflächen-immobilisiertem C1q, so führt dies zur Aktivierung des klassischen Komplementweges und zu einer vermehrten Phagozytose der apoptotischen Zellen. Außerdem bewirkt PTX3, dass die Deposition von C1q und C3 auf den Oberflächen apoptotischer Zellen, an denen bereits PTX3 angebunden ist, verstärkt wird [97, 100]. Interagiert PTX3 mit frei schwimmendem C1q, so führt dies über eine kompetitive Blockierung wichtiger Interaktionsstellen von C1q, unter anderem für Immunglobuline, zu einer verminderten C1q-vermittelten Phagozytose. Auch wird die Deposition von C1q und C3 auf den Oberflächen der apoptotischen Zellen durch PTX3 unter diesen Umständen reduziert [97]. Sowohl CRP als auch SAP hemmen kompetitiv die Anbindung von PTX3 an immobilisiertes C1q, was den Schluss nahe legt, dass die kurzen Pentraxine an einer verwandten oder der gleichen Bindungsstelle wie PTX3 anbinden. Somit hat PTX3 einerseits eine fördernde und andererseits eine hemmende Wirkung auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen, abhängig von der Art und Weise der C1q-Präsentation. Das Ausmaß der Glykosylierung von PTX3 ist für die Ausprägung der Interaktion mit C1q entscheidend, so führt eine vollständige Deglykosylierung von PTX3 zu einer signifikant stärker ausgeprägten Anbindung an C1q [95]. Nach neuen Erkenntnissen bindet PTX3 auch an das Regulator-Protein *C4b-binding* Protein des Komplementsystems und beeinflusst auch hierdurch indirekt dessen Funktionen und Wirkungen [101]. Neben der Anbindung und der hiermit verbundenen Beeinflussung des klassischen Komplementweges über C1q kann PTX3 über die Bindung an Faktor H, den wichtigsten löslichen Regulator des alternativen Komplementsystems, auch das alternative Komplementsystem beeinflussen [102, 103].

PTX3 bindet für sich allein, wie SAP und CRP auch, an einzelne Membrandomänen von spät-apoptotischen Zellen, an Zelltrümmern sowie an Histonen. Die Erkennung und Anbindung an apoptotische Zellen führt zu einer Hemmung ihrer Phagozytose durch dendritische Zellen (DCs), nicht aber zu einer Hemmung der Phagozytose durch Makrophagen [104]. Somit scheint PTX3 zu verhindern, dass Antigen-präsentierende Zellen (APC) apoptotische Zellen phagozytieren und hierdurch die Bildung autoreaktiver T-Zellen triggern könnten. Diese Daten legen nahe, dass PTX3 eine wichtige Rolle bei der Entfernung körpereigener zu Grunde gegangener Zellen spielt, und hierbei der Entstehung einer Autoimmunerkrankungen durch Limitierung der Antigenpräsentation von sterbenden Zellen, entgegen wirkt.

Weiterhin bindet PTX3 nicht an die klassischen Liganden der kurzen Pentraxine, wie Phosphatidylethanolamin (PE), Phosphatidylcholin (PC) und verschiedene Zyto- sowie Chemokine [94].

PTX3 inhibiert den fibroblast-growth-factor-2 (FGF-2) durch Anbindung an dessen n-terminale Domäne [105]. Durch diese Inhibierung kann FGF-2 nicht an Zellen anbinden und diese zur Proliferation und Differenzierung anregen. Zudem spielt FGF-2 eine Schlüsselrolle in der Induktion, Proliferation, Migration und dem Überleben der vaskulären glatten Muskelzelle, bei der Neovaskualisierung, der Förderung der Angiogenese, der Wundheilung, bei Entzündungen, bei Tumorwachstum und der Arteriosklerose [106]. Somit ist PTX3 ein wichtiges Protein für die Gewebshyperplasie und die Narbenbildung durch die Beeinflussung der FGF-2-Aktivität und hat eine Schlüsselrolle inne bei Erkrankungen wie der Arteriosklerose. An die anderen Mitglieder der FGF-Familie bindet PTX3 nicht [107].

Weiterhin spielt PTX3 eine entscheidende Rolle in der Matrixorganisation. So bindet PTX3 an *TNF-stimulated-gene-6* (TSG-6), einem Protein, welches über Interaktion mit Hyaluronsäure an der Organisation der Cumulusmatrix beteiligt ist. Homozygote PTX3-defiziente Mäuse sind unfruchtbar aufgrund einer gestörten Organisation der Cumulusmatrix. Diese Tatsache veranschaulicht die bedeutende Rolle von PTX3 in der Organisation und Stabilisierung der Hyaluronsäure-reichen Cumulusmatrix [108].

PTX3 hat eine weitere wichtige Funktion bei der Regulation der Leukozytenrekrutierung in entzündetes Gewebe durch die Anbindung an Selectin-P. Bei Selectin-P handelt es sich um ein Zelladhäsionsmolekül (CAM), welches verstärkt unter inflammatorischen Bedingungen auf der Oberfläche von Endothelzellen exprimiert wird. Selectin-P bindet an das P-Selectin Glykoprotein-1 (PSG-1), das sich auf der Oberfläche der Leukozyten befindet. Diese Interaktion bewirkt ein vermehrtes Anbinden (*firm adherence*) und Einwalzen (*rolling flux*) von Leukozyten sowie Thrombozyten am Endothel der Blutgefäße. Dies ermöglicht den Kontakt der Leukozyten mit inflammatorischen extrazellulären Stimuli und führt hierdurch zu einer vermehrten Migration von Leukozyten aus dem Blutkreislauf in das entzündete Gewebe [109-111]. PTX3 wiederum bindet an Selectin-P und verhindert durch diese Anbindung eine Interaktion zwischen Selectin-P und PSG-1. Hierdurch limitiert PTX3 die Leukozytenmigration in das entzündete Gewebe [112]. PTX3 stellt somit einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar, da PTX3 vermehrt unter entzündlichen Umständen sezerniert wird und gleichzeitig eine weitere Migration von Leukozyten an den Ort der Entzündung hemmt.

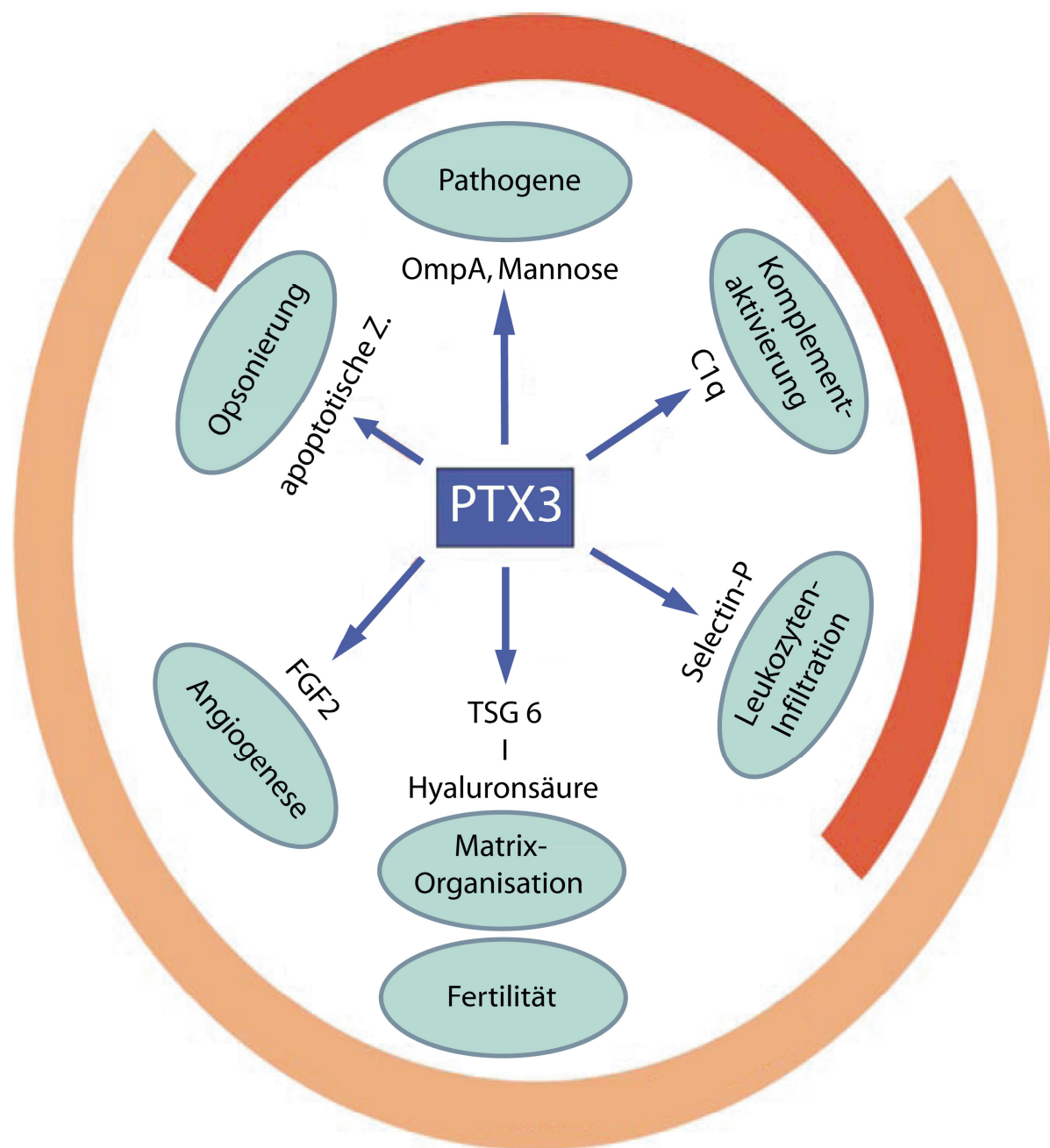
Tabelle 7: Die Funktionen von PTX3. Tabelle frei nach [52, 53].

Bereich	Mechanismus	Funktion
angeborenes Immunsystem	Opsonierung	Pathogenbekämpfung
	Neutralisierung	
	Aktivierung des Komplements	
Entzündungen	Anbindung und Hemmung von Selectin-P	Limitierung der Leukozyteninfiltration
	Modulation des Komplements über C1q und Faktor H	Beeinflussung der Entzündungen
Autoimmunerkrankungen	Opsonierung	Körpereigen/-fremd
	Verhinderung der Phagozytose durch APC	Unterscheidung
Angiogenese	Anbindung und Hemmung von FGF-2	Arteriosklerose
		Neovaskularisierung
		Wundheilung
		Proliferation glatter Muskelzellen
weibliche Fruchtbarkeit	Anbindung an TSG-6	Cumulusmatrix-organisation
Pathologie	Akut-Phase Protein	Marker für Aktivität des angeborenen Immunsystems

PTX3 als Akut-Phase Protein hat folglich zahlreiche verschiedene Funktionen in unterschiedlichsten Prozessen des Körpers und hierbei häufig zweischneidige Aufgaben inne [89]. So hat PTX3 einerseits eine inflammatorische Wirkung nach Anbindung an Keimb Bestandteile durch seine opsonierende und komplementaktivierende Funktion und verstärkt so indirekt die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung. Andererseits hat PTX3 eine antiinflammatorische Wirkung indem es die Leukozytenmigration an den Ort der Entzündung über Bindung an Selectin-P limitiert [112]. Hierdurch verhindert PTX3 die für die Selectin-P vermittelte Leukozytenmigration notwendige Interaktion mit dem an der Leukozytenoberfläche gebundenen PSG-1. Ähnlich verhält es sich mit der einerseits fördernden andererseits hemmenden Wirkung auf die Phagozytose von apoptotischen Zellen. Diese Wirkung ist abhängig von der Art und Weise der C1q-Präsentation, des Milieus und der

Zytokine [65]. Somit kann PTX3 einerseits vor der Entstehung einer Autoimmunerkrankung schützen oder andererseits diese gar *triggern*. Zudem könnte PTX3 ein neuer diagnostischer und prognostischer Marker für die Aktivität des angeborenen Immunsystems und dem Ausmaß von Entzündung im klinischen Alltag darstellen, da er früher und schneller als CRP ansteigt und besser mit dem Ausmaß der Erkrankung korreliert.

Angeborenes Immunsystem



Inflammation & Gewebereumbau

Abbildung 8: Die Funktionen von PTX3. Abbildung nach [52].

1.4 Ziel des Projekts und Hypothese

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und wenn ja wie, PTX3 das Ausmaß und das Krankheitsgeschehen beim systemischen Lupus erythematoses beeinflusst. Typisch für die Pathogenese des SLE sind zum einen vermehrtes Vorliegen von abgestorbenen Zellen zum anderen eine eingeschränkte Entfernung dieser vermehrt angefallenen Zelltrümmer. Dies führt zu einer vermehrten Aktivierung Antigen-präsentierender Zellen, die wiederum das Vorliegen autoreaktiver Lymphozyten und die Produktion von Autoantikörpern begünstigen; es kommt jetzt zur Immunkomplexbildung, die einhergeht mit einer Vaskulitis und Perivaskulitis in verschiedenen Organen. Durch diese Entzündung kommt es zu einer Schädigung der Organe und abhängig von der betroffenen Lokalisation zu der für den SLE typischen mannigfaltigen Klinik. Bereits bekannt ist, dass ein Fehlen der beiden kurzen Pentraxine CRP und SAP über eine verschlechterte *Clearance* apoptotischer Zellen zur Ausbildung eines SLE führen kann. PTX3 hat als Akut-Phase Protein wie CRP und SAP zahlreiche Funktionen im Immunsystem inne. Zum einen beeinflusst PTX3 die Phagozytose von apoptotischen Zellen, zum anderen limitiert PTX3 über Anbindung an das Adhäsionsmolekül Selectin-P die Leukozyten-Infiltration in das Gewebe. Somit hat PTX3 sowohl entzündliche als auch antientzündliche Funktionen.

Die Beantwortung der Frage, welche Rolle PTX3 in der Pathogenese des SLE spielt, würde wichtige Erkenntnisse für ein besseres Verständnis des Krankheitsgeschehens liefern. Des Weiteren könnte man ein neues Risikogen für die Entstehung eines SLE identifizieren und neue Behandlungsmöglichkeiten würden sich durch die Gabe von rekombiantem PTX3 oder PTX3-Antikörper eröffnen. Um dieser Frage nachzugehen wurde ein Tiermodell verwendet. Ausgewählt wurden hierfür B6lpr-Mäuse, welche ein SLE ähnliches Autoimmunsyndrom entwickeln, und zudem wurden *Ptx3*-defiziente B6lpr-Mäuse generiert. Zwischen diesen beiden Genotypen wurden dann einen Phänotypvergleich durchgeführt.

Die Hypothese für diese Arbeit wurde wie folgt formuliert:

PTX3 spielt eine Rolle bei der Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses;

- entweder führt es zu einer Verschlimmerung des SLE durch proinflammatorische Effekte
- oder es führt zu einer Besserung des SLE durch die verbesserte *Clearance* apoptotischer Zellen und den hemmenden Effekt auf die Leukozytenmigration

Kapitel 2

Material und Methoden

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

ELISA-Reader:

Tecan, GENios Plus Tecan, Crailsheim, D

ELISA-Washer:

Microplate-Washer ELx50 Biotek, Bad Friedrichshall, D

Durchflusszytometer:

FacsCalibur™ BD Bioscience, Heidelberg, D

Light Cycler

LightCycler 480 Roche, Mannheim, D

Mikroskope:

Leitz Wild MPS52 Leica Microsystems, Wetzlar, D

Leitz DMRBE Leica Microsystems, Wetzlar, D

Olympus BX 61 Olympus, Hamburg, D

CellP software Olympus, Hamburg, D

Pipetten:

Multikanalpipette Eppendorf AG, Hamburg, D

Pipetten Pipetman® Gilson, Middleton, WI, USA

Pipettierhilfe Pipetus®-classic Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D

Pipettenspitzen Typ Gilson® Peske, Aindling-Arnhofen, D

Pipettenspitzen epT.I.P.S Eppendorf AG, Hamburg, D

Serologische Pipetten 5, 10, 25 Falcon®/BD, Heidelberg, D

Spectrophotometer:

Beckman DU® 530 Beckman Coulter, Fullerton, USA

Waagen:

BP 110S Sartorius, Göttingen, D

EC-211 Acculab Sartorius Group, Bohemia, USA

Mettler PJ 3000 Mettler Toledo, Gießen, D

Mettler P 1200 N Mettler Toledo, Gießen, D

Zellkultur & -inkubator:

Heracell 150	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Steril Card Hood CII, Typ A/B3	Baker Company, Sanford, Maine, USA
Typ B5060 EC-CO 2	Heraeus Sepatech, Osterode, D
UV-Licht	Bachofer Laborgeräte, Reutlingen, D
Zählkammer Neubauer	Roth, Karlsruhe, D

Zentrifugen:

Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Centrifuge 5418	Eppendorf, Hamburg, D
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode, D
Universal 16	Hettich, Bäch, CH

Sonstiges:

BioMax XAR Film Kodak	Sigma Aldrich, Deisenhofen, D
Entwickler Curix 60	AGFA, Köln, D
Eppendorfgefäße 1,5ml	TPP, Trasadingen, CH
Falcons 15ml, 50ml	TPP, Trasadingen, CH
Gel-Elektrophorese-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
Homogenisator	Ultra Turrax T25 IKA GmbH, Staufen, D
MidiMACS	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
PCR-Gel-Kammer	PeqLab Biotechnologie, Erlangen, D
pH-Meter WTW	WTW GmbH, Welheim, D
Rotilabo [®] -Mikropistill	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, D
Schneidergerät Jung CM 3000	Leica, Solms, D
Semi-Dry Blotting System	BioRad, München, D
Sicherheitswerkb. Microflow [®]	Nunc GmbH, Wiesbaden, D
Sonicater	Branson, Danbury, CT, USA
Stuart [®] Roller Mixer SRT6	Bibby Scientific, Stone, UK
TaqMan ABI pris 7700	Biosystems, Weiterstadt, D
Thermocycler UNO-II	Biometra, Göttingen, D
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortex Genie 2 TM	Scientific Industries, Bohemia, USA
Wasserbad HI 1210	Leica Microsystems, Solms, D

2.1.2 Chemikalien

Ammoniumchlorid (NH ₄ Cl)	Merck, Darmstadt, D
BSA	Roche Diagnostics, Mannheim, D
DMSO	Merck, Darmstadt, D
EDTA	Biochrom KG, Berlin, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
Glycerol	Roth, Karlsruhe, D
H ₂ SO ₄	Roth, Karlsruhe, D
HCl	Merck, Darmstadt, D
NaCl	Merck, Darmstadt, D
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, D
Methanol	Merck, Darmstadt, D
Tris	Roth, Karlsruhe, D
Tween-20	Sigma, Deisenhofen, D

2.1.3 Zellkultur

DMEM-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Dulbecco's PBS (1x)	PAN Biotech KG, Aidenbach, D
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom KG, Berlin, D
Opti-MEM-Medium	GIBCO/Invitrogen, Paisley, UK
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, A
RPMI 1640-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, D
Trypan Blau	Sigma, Deisenhofen, D
Trypsin / EDTA	PAN Biotech KG, Berlin, D
6 well-Platte	Costar Corning, Schiphol-Rijk, NL
24 well-Platte	Nunc, Wiesbaden, D
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellschaber 24 cm	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb, Cell strainer 70µm	BD Falcon, Bedford, USA

Zellsortierung:

CD4 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD8 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD11b MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD11c MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
CD19 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MACS Separation Column	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
MACS magnetic cell sorting	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Pre-Separation Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D

Zytokine und Stimulanzen:

Camptothecin	Calbiochem, San Diego, USA
CpG	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Imiquimod	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Lipofectamin	Invitrogen, Eugene, USA
LPS	Invivogen, Toulouse, Frankreich
Pam3Cys	Invivogen, Toulouse, Frankreich
pHrodo™	Invitrogen, Eugene, USA
Poly I:C	Invivogen, Toulouse, Frankreich
rm Flt3	ImmunoTools, Friesoythe, D
rm GM-CSF	ImmunoTools, Friesoythe, D
rm M-CSF	ImmunoTools, Friesoythe, D
rm TNF α	ImmunoTools, Friesoythe, D

2.1.4 Tierzucht und Tierhaltung**Mäuse:**

C57Bl/6lpr/lpr	CharlesRiver Laboratories, Calco, Italien
C57Bl/6 <i>Ptx3</i> -/-	C. Garlanda/A. Mantovani, Istituto Clinico Humanitas, IRCSS, Rozzano, I

Genotypisierung:

Agarosepulver	Invitrogen, Karlsruhe, D
DNA Ladder Low range	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, D
Loading Dye (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot, D
Primer	Metabion, Martinsried, D
Proteinkinase K	Merck, Darmstadt, D
QIAmp DNA Mini Kit	Qiagen, Hilden, D
1x TBE-Puffer	108g Tris; 55g Borsäure; 5,84g EDTA, 10l H ₂ O

Organentnahme:

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

sonstiges Zubehör:

Isofluran Forene®	Abbott, Wiesbaden, D
Mikropipetten 20µl	Blaubrand, Wertheim, D

2.1.5 Histologie

ABC-Substrat-Lösung	Vector, Burlingame, USA
Ammoniumpersulfat	BioRad, München, D
Methylgrün	Sigma, Deisenhofen, D
Mounting Med. VectaMount	Vector, Burlingame, USA
PAS	Bio-Optica, Mailand, I
biotinierter Sekundär-AK	Vector, Burlingame, USA
Xylol	Merck, Darmstadt, D

verwendete Antikörper für Immunhistologie:

Anti-m-CD3e 1:50	BD Pharmingen, San Diego, USA
Anti-mouse IgM-mu-chain	Vector, Burlingame, USA
C9 Komplement	M. Daha, Univ. Leiden, NL

Selectin-P	mAB Rb40.34 (D. Vestweber)
Mac2 1:5000	Cederlane Laboratories, Hornby, Canada
Rat anti-mouse neutrophils	Serotec, Oxford, UK

2.1.6 Phagozytose Assay

Bepanthen® Augensalbe	Bayer AG, Leverkusen, D
BBL-Thioglykolat-Medium	BD, Franklin Lakes, USA
HBSS	PAN-Biotech GmbH, Aldenbach, D
Isofluran Forene®	Abbott, Wiesbaden, D
Nadeln Microlance 26 Gx ½	BD, Heidelberg, D
Novalgin®	Aventis Pharma, Frankfurt, D
Spritzen BD Plastipak 1,2,5ml	BD, Heidelberg, D

2.1.7 Molekularbiologie

2.1.7.1 RNA-Isolation

PureLink RNA Mni kit	Invitrogen, Karlsruhe, D
RNase-Free DNase Set	Qiagen, Hilden D
RNase-free-Spray	Gene Choice, Frederick, USA

2.1.7.2 cDNA-Synthese:

linear Acrylamid	Ambion, Darmstadt, D
0,1M DTT	Invitrogen, Karlsruhe, D
5x First strand Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, D
Hexanucleotide	Roche, Mannheim, D
25mM dNTPs	GE Healthcare, München, D
RNAsin	Promega, Mannheim, D
Superscript II	Invitrogen, Karlsruhe, D

2.1.7.3 Real-time PCR

25mM MgCl ₂	Fermentas, St. Leon-Rot, D
1,25mM dNTPs	Metabion, Martinsried, D
10xPE-Puffer	Finnzymes, Espoo, Finland
SYBR Green Dye detection	Applied Biosystems, Norwalk, USA
Taq DNA- Polymerase	New England BioLabs, Ipswich, USA

Primer: Metabion, Martinsried, D

Gen	rechte Primersequenz	linke Primersequenz
PTX3	CCTGCTTTGTGCTCTC TGGT	TCTCCAGCATGATGAACAGC
E-Selectin	TCTATTTCCCACGATGCATTT	CTGCCAAAGCCTTCAATCAT
L-Selectin	TTCATGGCTTTCCTTTCACA	CTGGCATTCTCATTGGCT
P-Selectin	GGACACTTGATGGCTTCACA	CAGTTCATGTGCGATGAAGG
PECAM-1	TCCTTCCTGCTTCTTGCTAGCT	GAGCCCAATCACGTTTCAGTTT
IP-10	GGCTGGTCACCTTTCAGAAG	ATGGATGGACAGCAGAGAGC
Cxcr3	TCTCGTTTTCCCCATAATCG	AGCCAAGCCATGTACCTTGA

2.1.8 Immunologie

2.1.8.1 FACS Antikörper und Zubehör

AnnexinV- FITC Apoptosis K.	BD Biosciences, San Diego, USA
Anti-mouse B220-APC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD3-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD4-APC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD8-PerCp	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD11b-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD11c-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD21-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD23-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD25-PerCp	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD40-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD138-APC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse CD206-FITC	AbD Serotec, Düsseldorf, D

Anti-mouse F4/80	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse FoxP3 PE	eBiosciences, Frankfurt, D
Anti-mouse 7/4-PE	AbD Serotec, Düsseldorf, D
Anti-mouse Ly6G-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse MHCII-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse IgD-FITC	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse IgM-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Anti-mouse κ light chain-PE	BD Pharmingen, Heidelberg, D
Counting beads	Invitrogen, Eugene, USA

2.1.8.2 ELISA

dsDNA	Metabion, Martinsried, D
Histone	USB, Cleveland, USA
HRP-goat-anti-mouse IgG	Rockland, Gilbertsville, USA
IgG _{gesamt} , IgG ₁ , IgG _{2a/c} , IgG ₃	BethyLabs, Montgomery, USA
Mouse IL-12 OptEiA	BD Biosciences, Heidelberg, D
Mouse PTX3/TSG-14	RD Systems, Minneapolis, USA
Mouse TNF- α	BioLegend, San Diego, USA
Nucleosome	BethyLabs, Montgomery, USA
NUNC maxisorp ELISA plates	ThermoFisher, Waltham, USA
Poly-L-lysine	RD Systems, Minneapolis, USA
Rabbit IgG	Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA
RF IgG	Jackson Immunoresearch, West Grove, USA
Smith antigen	Immunovision, Springdale, USA
Sn-RNP-complex	Immunovision, Springdale, USA
TMB Substrate Reagent Set	BD Biosciences, San Diego, USA
Puffer:	
0,1M Natrium-Carbonat	7,1g NaHCO ₃ ; 1,6g Na ₂ CO ₃ , 1l H ₂ O
Natrium-Citrat pH 7,0	8,8 NaCl; 4,4g Natriumcitrat, 1l H ₂ O
0,2M Natrium-Phosphat	11,8gNa ₂ HPO ₄ ; 16,1g NaH ₂ PO ₄ , 1l H ₂ O
0,05M Bikarbonat pH 9,6	2,1g NaHCO ₃ ; 2,7g Na ₂ CO ₃ , 500ml H ₂ O
PBS pH 7,0	80g NaCl; 11,6g Na ₂ HPO ₄ ; 2g KH ₂ PO ₄ ; 2g KCl, 10l H ₂ O
Tris-NaCl pH 8,0	6,1g Tris; 8,2g NaCl; 1l H ₂ O

2.1.8.3 Immunfluoreszenzdiagnostik

Critidia luciliae slide	BioRAD, Redmond, USA
Kallestad TM Hep-2 Cell line	BioRAD, Redmond, USA
FITC-conj. anti-mIgG DA	Invitrogen, Oregon, USA
DAPI staining	Vector, Burlingame, USA

2.1.8.4 Western Blot

Acrylamide	Roth, Karlsruhe, D
β-Actin	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M., D
Ammoniumpersulfat	BioRad, München, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
ECL WB Detection Reagents	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Immobilon-PVDF Membran	Millipore, Eschborn, D
Protein-Marker II	Peqlab, Erlangen, D
SDS	BioRad, München, D
TEMED	BioRad, München, D
Western Blocking Reagent	Roche Diagnostics, Mannheim, D
<i>Whatman papers</i> [®]	Millipore, Schwalbach, D

verwendete Antikörper:

anti-mouse PTX3	Alpha Diagnostic International, San Antonio, USA
anti-P-Selectin mAB RB40	BD Biosciences, Heidelberg, D
anti-rat IgG AB	Cell Signaling Technology, Frankfurt a. M., D

Puffer:

loading buffer:	30mM Tris-HCl, 5% Glycerol, 1% SDS, 0,0025% Bromphenolblau 30µl/ml β-Mercaptoethanol
Sammelgel:	1,3ml 30% Acrylamidmix; 6,1 ddH ₂ O; 2,5ml; 2,5ml stacking buffer, 50µl APS, 10µl TEMED
stacking buffer:	6,05mg 0,5mM Tris-HCL; 50ml ddH ₂ O; HCl bis pH 6,8, dann ddH ₂ O bis 100ml; 400mg SDS,
Trenngel:	4ml 30% Acrylamidmix; 3,5 ddH ₂ O; 2,5ml; 2,5ml separating buffer, 3µl APS, 6,66µl TEMED
separating buffer:	18,2mg 1,5mM Tris-HCL; 50ml ddH ₂ O; HCl bis pH 8,8; dann ddH ₂ O bis 100ml;400mg SDS,
TBS	24,22g 200mM Tris; 80g 1,37M NaCl; 1l H ₂ O, HCl bis pH 7,6:
transfer buffer :	17,46g Tris; 8,79g Glycin; 11,25ml SDS 10%; 600ml Methanol; 3l H ₂ O

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Kultivierung der Zellen fand in einem Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C und einem CO₂-Gehalt der Luft von 5% statt. Die Stimulationsexperimente und Passagen der Zellen und Zellkulturen wurden ausschließlich unter möglichst sterilen Bedingungen durch Verwendung einer Werkbank durchgeführt. Die Werkbank verfügt über einen Filter und einen steten laminaren Luftstrom, welche für eine keimfreie Umgebung sorgen und wurde zusätzlich täglich für 30 Minuten mit einem UV-Licht bestrahlt. Sämtliche Oberflächen und Gebrauchsgegenstände, wie Pipetten, Medien und Pipettenspitzen wurden vor Ingebrauchnahme mit Desinfektionsmittel gereinigt beziehungsweise bei 120°C für 20min autoklaviert. Um die Zellzahl feststellen zu können wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Hierfür wurde eine Zellsuspension in einer 1:10 Verdünnung auf die Zählkammer gegeben und 4 Großquadrate ausgezählt. Um eventuell auftretende tote Zellen zu detektieren, wurden die Zellen vor der Zählung zusätzlich noch mit Trypanblau gefärbt. Hierbei handelt es sich um einen anionischen Farbstoff der selektiv in das Zytoplasma toter Zellen aufgrund deren durchlässigen Zellmembran eindringt und diese dadurch blau anfärbt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$\text{Zellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der gezählten Großquadrate}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

2.2.1.1 EL-4 Zelllinie und Induktion der Apoptose

EL4 Zellen benötigten DMEM-Medium mit 2,5% fötalem Kälberserum (FCS) sowie 1% eines Penicillin-Streptomycin-Gemisches (P/S) um Infektionen durch Bakterien vorzubeugen. Da es sich bei dieser Zelllinie um T-Lymphozyten handelt, sind diese Zellen nicht adhären und schwimmen daher frei im Medium. Somit erfolgte das Teilen der Zellen durch die Entnahme von 1ml der Zellsuspension und der Zugabe von neuem Medium.

Um die EL4 T-Lymphozyten in Apoptose zu treiben, wurden verschiedene Konzentrationen des zelltoxischen Alkaloids Camptothecin verwendet (30, 60 und 90µM). Camptothecin ist

ein potenter Inhibitor der Topoisomerase I und wird als Extrakt aus den Samen, der Rinde und dem Holz von *Camptotheca acuminata* gewonnen. Durch die Hemmung der Topoisomerase I kommt es zu einer gestörten DNA-Synthese und dadurch zu einer vermehrten Apoptoseinduktion. 1×10^6 /ml EL4-Zellen wurden über einen Zeitraum von 4 Stunden mit Camptothecin bei 37°C und einem pCO₂ von 5% inkubiert und anschließend mittels FACS nach einer Färbung mit dem *FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit 1* auf den Anteil der Apoptose-Induktion hin untersucht (2.2.6.1.2).

2.2.1.2 Gewinnung von primären Zellen

Primäre Zellen wurden stets aus erwachsenen Mäusen, welche durch zervikale Dislokation getötet wurden, gewonnen. Die Organentnahme erfolgte unter sterilen Bedingungen und die entnommenen Organe wurden unverzüglich auf Eis gelegt.

Für die Gewinnung von Zellen aus der Milz wurden diese mit Hilfe eines Spritzenkolbens und PBS durch einen 70µm Zell-Sieb gedrückt und in ein 50ml Röhrchen gespült. Dieser wurde nun für 5min bei 1.200rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Dann erfolgte die Zugabe von 5ml 0,3 molarem NH₄Cl für 10min um die Erythrozyten zu verdauen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und erneut durch einen 30µm Filter gegossen, um eventuell auftretende Koagel zu entfernen. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer wurden die Splenozyten, je nach weiterem Verwendungszweck und benötigter Konzentration, auf 6-well-Platten gegeben und mit RPMI Medium mit 1% PS und 5% Hitze inaktiviertem FCS kultiviert.

Um die Zellen nach ihrer Gewinnung aus dem Organ näher charakterisieren zu können, wurden diese aufgrund ihrer unterschiedlichen *Cluster of Differentiation* (CD) in verschiedene Subpopulationen aufgetrennt. Dies geschah mit Hilfe von magnetischer Zellsortierung, so genanntem MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*). Die Gewinnung der Zellen aus den unterschiedlichen Organen erfolgte im Wesentlichen wie oben beschrieben. Allerdings wurden je 10^7 Zellen im letzten Arbeitsschritt mit 90µl sterilem Puffer, welcher aus PBS mit 0,5% bovinem Serum-Albumin (BSA) und 2mM EDTA bestand, resuspendiert. Hinzu kamen 10µl *MicroBeads*, welche jeweils für die gewünschte CD-Zellpopulation spezifisch waren. Bei diesen *MicroBeads* handelt es sich um etwa 50nm große Magnetpartikel, an die Antikörper gebunden sind. Diese Antikörper binden spezifisch an die Oberflächen der Zellen und markieren so die verschiedenen *Cluster of Differentiation*

Zellpopulationen. Die so markierten Zellen wurden nach einer 20-minütigen Inkubationszeit bei 4°C gemeinsam mit den unmarkierten Zellen auf eine, sich in einem Magnetfeld befindliche, bereits mit Puffer befeuchtete Säule gegeben. Die nicht markierten Zellen liefen aufgrund fehlender Anbindung an die *MicroBeads* durch die Säule hindurch, die markierten Zellen blieben jedoch aufgrund des Magnetfeldes in der Säule hängen. Um auch die letzten unmarkierten Zellen aus der Säule zu gewinnen, wurde anschließend dreimal mit Puffer gewaschen. Nun wurde die Säule aus dem magnetischen Feld entnommen und unter Druck die Säule dreimal mit Puffer gespült. Das Ergebnis dieses Procederes war eine aufgereinigte Zellpopulation. Mit dieser Methode wurden unter anderem CD11b, CD11c, CD4/8 und CD19 positive und negative Zellen isoliert.

2.2.1.3 Stimulation der Splenozyten

Die isolierten Splenozyten (wie unter 2.2.1.2 beschrieben) wurden mit verschiedenen Stimuli für 6 Stunden behandelt. Verwendet wurden hierzu 2µg/ml des Lipoproteins Pam3Cys (P3C), 25µg/ml pI:C-RNA, 2µg/ml Lipopolysaccharid (LPS), 2µg/ml Imiquimod (Imi), oder 1µM CpG-DNA. Sowohl CpG-DNA als auch pI:C-RNA wurden mit Lipofectamin vorbehandelt, um eine Stimulation der Zellen zu ermöglichen. Lipofectamin ermöglicht das Eindringen von hydrophilen Substanzen durch die lipophile Zellmembran. Hierfür wurde Lipofectamin 1:1 mit pI:C-RNA und CpG-DNA gemischt und nach einer kurzen Inkubation zu den Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen für eine spätere RNA-Isolation, wie unter 2.2.5.1 geschildert, gewonnen.

2.2.2 Tierexperimente

2.2.2.1 Tierzucht und Tierhaltung

Verwendet wurden C57Bl/6lpr/lpr (B6lpr) Mäuse, die aufgrund des autosomal rezessiv vererbten lymphoproliferativ- (lpr-) Gens, ein mildes, genetisch bedingtes Autoimmunsyndrom entwickeln. Dieses Autoimmunsyndrom ist begründet durch eine Mutation in dem Fas/CD95/Apo-1 Rezeptor, der auf hämatopoetischen Zellen exprimiert wird und eine wichtige Rolle bei der Induktion der Apoptose spielt [113]. In Folge dieser Mutation und der dadurch gestörten apoptotischen Mechanismen vor allem unreifer und potentiell autoreaktiver T-Lymphozyten bilden homozygote *knockout*-Tiere Autoantikörper gegen einzelsträngige DNA, Chromatin und Immunoglobulin G. Zudem weisen diese Mäuse autoreaktive CD4/8 doppelnegative T-Zellen und eine Lymphadenopathie auf [114, 115]. Der Verlauf der Erkrankung ähnelt dem Verlauf des systemischen Lupus erythematoses, und dient daher als gängiges Mausmodell zur Untersuchung des murinen SLE. Die mit der SLE vergleichbaren Haut- und Nierensymptomatik entwickelt sich ab einem Alter von circa 16 Wochen. Maximal 5 Mäuse wurden gemeinsam unter sterilen Bedingungen in Käfigen vom Typ Makrolone IIR gehalten. Sie hatten unbeschränkten Zugang zu Wasser und Futter und waren einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus unterworfen. Käfige, Futter sowie Streu und Wasser wurden vor Gebrauch durch Autoklavieren sterilisiert.

In C57Bl/6lpr/lpr-Mäuse wurden *Ptx3 knockout*-Tiere eingekreuzt, welche wie zuvor beschrieben [116] hergestellt wurden. Da die homozygoten *Ptx3 knockout*-Weibchen unfruchtbar sind, wurden heterozygote Weibchen mit homozygoten Männchen verpaart, um homozygote C57Bl/6lpr/lpr *Ptx3* *-/-* (B6lpr *Ptx3* *-/-*) Mäuse zu generieren. Der Genotyp jeder einzelnen Maus wurde mittels Genotypisierung bestätigt (siehe auch 2.2.2.2).

2.2.2.2 Genotypisierung

Der Genotyp der gezüchteten Mäuse wurde mittels Genotypisierung überprüft. Hierzu wurde zunächst DNA aus den Schwänzen der Mäusen gewonnen und nach einer Amplifikation durch eine Polymerase-Kettenreaktion in einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Isolierung der DNA wurde den Mäusen ein 2-5mm langes Stück der Schwanzspitze entfernt und in 200µl PBDN-Puffer mit 1µl Proteinkinase K (Konzentration: 20 mg/ml) eingelegt. Diese Mischung wurde dann für mindestens 3 Stunden bei 56°C in einem Thermoblock unter ständigem Schütteln verdaut. Anschließend wurden die Proben für 5 Minuten bei 14.000rpm zentrifugiert. In dem flüssigen Überstand befand sich nun genomische DNA.

Um die DNA-Abschnitte, die die zu untersuchenden Gene enthält, gezielt zu amplifizieren wurde eine *Polymerase Chain Reaction* (PCR) durchgeführt. Nur durch eine solche Vervielfältigung ist es möglich, den Genotyp nach Auftrennung per Gelelektrophorese zu bestimmen. Aus dem bei der Isolierung der genomischen DNA gewonnen Überstand wurde 1µl entnommen und zu 24µl eines PCR-Mixes gegeben. Dieser enthielt folgende Bestandteile: 2,5µl 10x PE Buffer, 2,5µl 25 mM dNTPs, 14,5µl Aqua ad injectabile, 1µl Primer 1, 1µl Primer 2, 1µl Primer 3 und 0,5µl Taq-Polymerase in einer Konzentration von 5.000 U/ml. Der Vorgang der Polymerase-Kettenreaktion besteht im Wesentlichen aus drei Schritten: der Denaturierung, dem *Annealing* und der Elongation (siehe hierzu auch 2.2.5.3).

2.2.2.3 Agarosegel-Elektrophorese

Nach Amplifikation der DNA wurden die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Für die Herstellung des 2% Gels wurden 2g Agarose in 100ml 1x TBE-Puffer gelöst und in einer Mikrowelle bis zum Sieden erhitzt. Anschließend wurde 8µl Ethidiumbromid zugegeben und das Gemisch in einen Gelbehälter samt Tascheneinsatz eingegossen. Nach Aushärten des Gels wurde es in TBE-Puffer eingebettet, der Tascheneinsatz entnommen und je 4µl 6x Glycerinladepuffer plus 4µl der Probe in die Taschen pipetiert. Des Weiteren wurde Wildtyp-DNA als Negativkontrolle und DNA von bekannt hetero- und homozygoten Mäusen als Positivkontrolle verwendet. Zusätzlich wurde Wasser in eine der Taschen gegeben um eine mögliche Kontamination des Puffers oder des Gels zu detektieren. Nach dem Einfüllen

der Proben in die Taschen wurde 200V Strom bei 400A für 35 Minuten auf das Gel angelegt. Durch das Anlegen der Spannung trennten sich die DNA-Fragmente nach Größe und Ladung entsprechend auf. Diese Auftrennung wurde anschließend dank des Ethidiumbromids mit Hilfe von UV-Licht sichtbar gemacht. Der Genotyp der verschiedenen Proben wurde anhand ihres Vergleichs mit den Banden des bekannten Wildtyps, Heterozygoten und Homozygoten bestimmt.

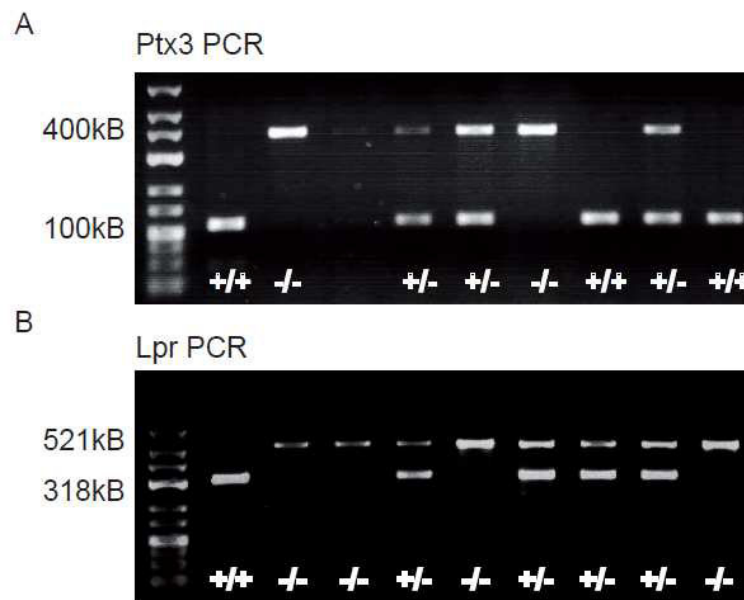


Abbildung 9: Genotypisierung der Mäuse

A: Anhand des links mitlaufenden Standards kann die Länge des DNA-Fragments charakterisiert werden. Eine solitäre Bande bei 100kB zeigte einen Wildtyp bei 400kB ein *Ptx3*^{-/-} *Knockout* an. Das Vorliegen beider Banden spricht für einen heterozygoten Genotyp.

B: Die 521kB Bande zeigt den *lpr* Genotyp an. Der Wildtyp wird durch die Bande bei 318kB angezeigt.

2.2.2.4 Urin- und Blutentnahme

Monatlich erfolgte sowohl bei den B6^{lpr} *Ptx3*^{-/-} als auch bei den B6^{lpr} Kontrollmäusen eine Gewichtsmessung, sowie eine Urin- und Blutentnahme. Der Urin wurde nach Blasenstimulation durch Bauchmassage gewonnen. Für die Blutentnahme erhielten die Mäuse eine Kurznarkose in einer Anästhesie-Kammer. In dieser Kammer wurde ein Sauerstoff-Isfluran-Gemisch konstant aufrechterhalten um die Mäuse zu narkotisieren. Die Blutentnahme erfolgte aus dem sich im vorderen Augenwinkel befindlichen Venenplexus mittels Glaskapillare. Das Vollblut wurde in einem Eppendorf-Gefäß aufgefangen und mit 5µl 0,5 molarem EDTA antikoaguliert. Nun folgte eine Zentrifugation für 5 Minuten bei

10.000rpm. Das nun überstehende Plasma wurde abpipetiert und für weiterführende Experimente bei -20°C eingefroren.

2.2.2.5 Organentnahme

Die Mäuse wurden im Alter von 1, 3 oder 6 Monaten durch zervikale Dislokation getötet und die Organe mittels einer medianen Laparotomie gewonnen. Hierbei wurde das Gewicht, die Größe und das Aussehen der Milz und der Lymphknoten festgehalten, um das Ausmaß der Lymphproliferation makroskopisch beurteilen zu können. Entnommen wurden zudem beide Nieren, die Milz, die Lunge, die Leber sowie Dick- und Dünndarm. Die Organe wurden nun gedrittelt. Ein Drittel dieser Organe wurde für eine spätere RNA-Isolation in RNAlater-Lösung eingelegt und bei -20°C aufbewahrt. Das zweite Drittel wurde in Einbettkassetten in 1,8% Formalin für 24h konserviert um Schnitte aus diesen Organen für morphologische und histologische Untersuchungen anzufertigen. Der dritte Teil wurde bei -80°C aufbewahrt um eventuelle spätere Untersuchungen durchführen zu können.

2.2.3 Histologie

2.2.3.1 Färbung

Zur Vorbereitung der Paraffinschnitte wurden die Lungen, Nieren und Milzen der Mäuse nach einer 24-stündigen Fixierung in 1,8% Formalin in Paraffin eingebettet. Mittels eines Schneidegerätes wurden aus diesen Paraffinblöcken 2µm dünne Schnitte angefertigt und diese dann auf mit Ammoniumpersulfat vorbehandelten Objektträgern aufgetragen und für 12 Stunden bei 37°C in einer Trockenkammer getrocknet. Für jede Färbung wurden die jeweiligen Schnitte zuerst in Xylol und dann mittels einer absteigenden Alkoholreihe entparaffiniert und anschließend mit wässriger Lösung gespült. Zur Beurteilung der Histologie wurde die *Periodic Acid Schiff* (PAS)-Färbung verwendet. Weiterhin wurden Spezialfärbungen für verschiedene Zellen und Zellsubpopulationen durchgeführt, um diese quantifizieren zu können.

Die Durchführung der PAS-Färbung erfolgte nach den Herstellerangaben. Zunächst wurden die Schnitte 10min durch eine PAS-Lösung angefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser abgewaschen. Anschließend wurden die Schnitte 20min mit Schiff-Reagenz inkubiert. Nach Ablauf der 20min wurden die Schnitte erneut abgewaschen und mit Kaliummetabisulfid-Lösung für 2min behandelt. Diese Lösung wurde nicht abgewaschen, sondern lediglich abgetropft und für 2min in Fixierlösung gegeben. Nach einer 3-minütigen Behandlung mit Mayer's Hemalum-Reagenz wurden sie erneut gewaschen. Abschließend wurde den nun angefärbten Schnitten mit Hilfe von Ethanol das Wasser entzogen und diese mit Xylol aufgehellt.

Für die Durchführung der Immunhistologie mussten die Schnitte noch weiter vorbereitet werden. Hierfür wurden sie nach erfolgter Entparaffinierung noch mit einer H₂O₂-Methanol-Mischung für 20min inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte noch das 20-minütige Einlegen in eine Demaskierungslösung sowie das Abkochen der Schnitte gefolgt von jeweils einer 15-minütigen Inkubation mit Avidin und Biotin. Die Schnitte wurden nun je nach Antikörper für eine dafür vorgesehene Zeitdauer und Konzentration mit diesem primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurde der passende sekundäre Antikörper für 30min zugegeben und die Schnitte für weitere 30min in ABC-Lösung eingelegt. Nach Anfärbung der Schnitte mit Methylgrün und einem abschließenden Waschen der Schnitte in hochprozentigem Alkohol wurden sie fixiert.

2.2.3.2 Auswertung der Schnitte

Das Ausmaß des Nierenschadens in den Mäusen wurde mit Hilfe des Aktivitäts- und Chronizitätsscores für humane Lupusnephritis bewertet [117]. Hierfür wurden die angefertigten PAS-Schnitte unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung zwischen 100x und 400x auf glomeruläre, interstitielle und tubuläre pathologische Veränderungen hin untersucht. In den Aktivitätsindex flossen sechs Kriterien ein: glomeruläre Proliferation, Leukozyteninfiltrate, glomeruläre Nekrosen, zelluläre Halbmondbildung, hyaline Ablagerungen und interstitielle Inflammation. Jedes dieser Kriterien wurde nach Vorhandensein mit 0 (kein Vorliegen) bis 3 (extensives Vorliegen) Punkten bewertet. Da sowohl die Nekrose als auch die Halbmondbildung zweifach in die Wertung eingingen, ergab sich für den Aktivitätsindex eine maximale Punktzahl, im Sinne einer maximalen histologischen Ausprägung der Lupusnephritis, von 24 Punkten. Für den Chronizitätsindex gab es folgende 4 Kriterien: glomeruläre Sklerose, fibröse Halbmonde, tubuläre Atrophie und interstitielle Fibrose. Wie beim Aktivitätsscore, wurde auch hier jedes Kriterium mit 0 - 3 Punkten bewertet, was einen maximalen *score* von 12 bedeutet.

Die histologische Auswertung der autoimmunen Lungenschädigung erfolgte ebenfalls mit Hilfe der angefertigten PAS-Schnitte unter dem Mikroskop bei einer Vergrößerung zwischen 100- und 400-fach. Für die semiquantitative Auswertung wurden die einzelnen Schnitte je nach Ausmaß der peribronchialen, perivaskulären und interstitiellen Leukozyteninfiltrate mit Werten von 0 - 4 bewertet, wobei ein Wert von 0 einer physiologischen nicht pathologisch veränderten Lunge und ein *score* von 4 massiven Infiltraten entsprach [118].

Die immunhistologischen Schnitte wurden unter dem Mikroskop bei 100-facher Vergrößerung quantitativ ausgezählt. Hierfür wurden jeweils 10 repräsentative Gesichtsfelder pro Schnitt ausgezählt und gemittelt.

2.2.4 Phagozytose Assay

Die Durchführung des in vivo Phagozytose Assay erfolgte nach folgendem Zeitplan:

0h:	intraperitoneale Injektion von Thioglykolat
68h:	Apoptose-Induktion der EL4-Zellen
73h:	intraperitoneale Injektion der gefärbten EL4-Zellen
73h40min:	Durchführung der Peritoneallavage

Für die Herstellung der Thioglykolatlösung wurden 4g des Thioglykolat-Pulvers in 100ml milipore H₂O über Nacht mit Hilfe eines rotierenden Magnetes gelöst. Die hergestellte Lösung wurde anschließend autoklaviert und in *Aliquots* aufgeteilt. Vor Anwendung wurde das Thioglykolat mindestens 5 Tage stehen gelassen, da die Intensität der Wirkung auch von der Dauer der Lagerung abhängig ist. Den Mäusen wurden 500µl angewärmte 4% Thioglykolat-Lösung intraperitoneal (i.p.) injiziert.

Für die Apoptose-Induktion der EL4 Zellen wurde 68 Stunden nach Injektion des Thioglykolates in die Mäuse 1×10^6 /ml EL4-Zellen mit 90µM Camptothecin in Apoptose getrieben. Anschließend wurden die Zellen 4h bei 37°C und einem pCO₂ von 5% inkubiert (siehe auch 2.2.1.1). Nach Ablauf der Inkubationsdauer (72h nach Injektion des Thioglykolates) wurden die Zellen zweimalig mit PBS gewaschen und circa 1×10^6 /ml Zellen mit pHrodo™ in einer Konzentration von 125ng/µl angefärbt. PHrodo™ ist ein Farbstoff, der unter neutralen pH-Bedingungen nicht, in saurem Milieu jedoch rötlich fluoresziert. Die Zellen wurden anschließend jeweils für eine halbe Stunde im Dunkeln mit dem Farbstoff inkubiert. Daraufhin wurden sie zweimalig mit PBS gewaschen und abschließend in PBS resuspendiert. 73h nach intraperitonealer Injektion des Thioglykolates wurde den Mäusen 200µl der mit pHrodo™ gefärbten apoptotischen Zellen intraperitoneal injiziert.

Nach einer 40-minütigen Inkubationsdauer mit den intraperitoneal gegebenen apoptotischen Zellen, d.h. 73 Stunden und 40min nach Injektion des Thioglykolates, wurde die Peritoneallavage durchgeführt. Hierfür wurde den Mäusen zuerst 2ml eiskaltes HBSS + 4mM EDTA i.p. injiziert. Daraufhin wurden die Mäuse mittels eines Sauerstoff-Isofluran-Gemisches in einer Anästhesiekammer narkotisiert. Unter der Kurznarkose wurde den Mäusen 1ml Flüssigkeit aus dem Peritonealraum abgezogen und für die weiteren Untersuchungen verwendet. Hierfür wurde die gewonnene Bauchflüssigkeit zentrifugiert, Teile des Überstandes eingefroren und der restliche Überstand verworfen. Die Zellen wurden

mit 1ml HBSS + 4mM EDTA gewaschen und das *pellet* nach einem Waschvorgang in 500ml HBSS + 4mM EDTA resuspendiert. Für die weitere FACS-Analyse wurden nur 100µl benötigt, so dass die restlichen 400µl für weitere Analysen bei -20°C aufbewahrt wurden.

2.2.5 Molekularbiologie

2.2.5.1 RNA-Isolierung

Von einem in RNAlater-Lösung konserviertem Organ wurde ein Stück abgeschnitten und in 500µl *Lysis* Puffer β -Mercaptoethanol-Gemisch gelegt. Das Organstück wurde nun mit Hilfe eines Mörsers (Mikropistills) in einem Eppendorfgefäß homogenisiert und anschließend mit Hilfe eines Vortexers ausführlich gemischt. Die nun anschließende RNA-Isolierung aus dem viskösen Zellmaterial erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe eines RNA *Mini Kits*. Nach Auftauen und Mischen der Proben wurde 70% Ethanol im Verhältnis 1:1 zur Probe zugemischt. Anschließend wurde von diesem Lysat-Ethanol-Gemisch maximal 700µl mittig auf eine RNA-Säule, welche sich in einem 2ml fassenden Röhrchen befand, pipettiert. Dann wurde für 90 Sekunden bei 7.000rpm zentrifugiert, wodurch die RNA auf der Membran der Säule hängen blieb, die Flüssigkeit jedoch durch die Membran in das Röhrchen lief. Die durch die Säule gelaufene Flüssigkeit wurde erneut auf die Säule aufpipettiert, dann bei 5.000rpm für 1min zentrifugiert und anschließend endgültig verworfen. Nun wurde die Säule mit 350µl Waschpuffer 1 gewaschen und anschließend wieder für 30 Sekunden bei 10.000rpm zentrifugiert. Nachdem das Filtrat verworfen wurde, wurden 10µl einer DNase mit 70µl RDD-Puffer vermischt und mittig auf die Säule gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubationsdauer, folgte ein erneuter Waschdurchgang mit Waschpuffer 1. Daraufhin wurden die Röhrchen gewechselt und die Säulen mit 500µl Waschpuffer 2 gewaschen und anschließend zentrifugiert. Nach einer Wiederholung dieses Schrittes mit 350µl Waschpuffer 2 wurden die Säulen bei 12.000rpm für zwei Minuten lang trocken zentrifugiert. Nach Zugabe von 50µl RNase-freiem Wasser auf die Säule, welche sich nun in einem sterilen Eppendorfgefäß befand, erfolgte eine 2-minütige Inkubationszeit. Daraufhin wurde das Eppendorfgefäß samt Säule für 2 Minuten bei 12.000 Umdrehungen/Minute zentrifugiert. Diese Zentrifugation bewirkte, dass die an der Säulenmembran gebundene RNA in das Eppendorfgefäß gewaschen wurde. Um die RNA-Konzentration in der Lösung zu bestimmen

wurde eine Spektrometrie durchgeführt. Hierzu wurden 10µl der Probe mit 40µl TE-Puffer vermischt und die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 260nm bzw. 280nm gemessen. Der Wert der Extinktion multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor, ergab so die RNA-Konzentration in µg/ml pro Probe. Ab einem Verhältnis von 1,6 bis 2,2 kann die RNA-Probe als rein angesehen werden. Bei einem Wert unterhalb 1,6 liegt eine Protein-Kontamination vor, ein Wert oberhalb von 2,2 spricht für eine DNA-Kontamination. Die dadurch isolierte RNA konnte nun bei -20°C aufbewahrt werden.

2.2.5.2 Umschreiben der RNA in cDNA

Für die Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion musste die gewonnene RNA in eine *complementary*-Einzelstrang-DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Hierzu wurden die RNA-Proben derart verdünnt, dass sich letztlich in einem neuen sterilen Eppendorfgefäß 1-2µg RNA in 10µl RNase freiem Wasser befanden. Diese Lösung wurde nun für 5 Minuten in einem Schüttler bei 65°C inkubiert und dann auf Eis gestellt. Währenddessen wurde ein Mastermix hergestellt, bestehend aus 8µl 5x-Puffer, 0,8µl einer 25mM dNTP-Mischung, 2µl 0,1M DTT, 0,5µl 15µl/ml Lin Acrylamid, 0,43µl Hexanucleotide und 16,4µl RNase freiem Wasser pro Probe. Daraufhin wurde der Mix mit dem Vortexer gemischt und es folgte die Zugabe der Enzyme, konkret 1µl 40U/µl RNasin und 0,87µl Superscript II. Bei Superscript II handelt es sich um eine reverse Transkriptase, die bei den Negativkontrollen im Versuchsansatz durch eine entsprechende Menge RNase freiem Wasser ersetzt wurde. Nun erfolgte die Zugabe von 30µl des Mastermixes zu den verdünnten RNA-Proben. Diese wurden zuerst für 90min bei 42°C, abschließend für 5min bei 85°C in einem Schüttler inkubiert und dann zur weiteren Aufbewahrung in -20°C eingefroren.

2.2.5.3 Real-time PCR

Um die mRNA Expression in den Zellen zu beziffern, wurde eine quantitative *real-time* Polymerase-Kettenreaktion (RTq-PCR) durchgeführt, bei der die cDNA vervielfältigt wird. Die quantitative *real-time* PCR beruht auf demselben Prinzip wie die klassische PCR, erlaubt allerdings durch zeitgleich durchgeführte photometrische Fluoreszenzmessungen eine

Aussage über die stattfindende Amplifikationsreaktion. Die Werte der Fluoreszenzmessung sind in jedem Zyklus direkt proportional mit der Menge der vervielfältigenden DNA, da sich der Farbstoff SYBR Green nur an doppelsträngige DNA anlagert und es hierdurch zu einer Verstärkung der Fluoreszenz kommt.

Der Vorgang läuft wie die klassische PCR auch in 3 Schritten ab. Als erster Arbeitsschritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen auf 95°C in zwei komplementäre Einzelstränge aufgebrochen. In der zweiten Phase, dem so genannten *annealing* lagert sich bei einer Temperatur von 60°C der zugegebene Primer (siehe Tabelle 8) an die komplementäre DNA-Sequenz des Stranges an und dient so als Startstelle für den Polymerisationsvorgang. Bei den Primern handelt es sich um zwei verschiedene Sequenzen, für jeden Komplementärstrang einen, welche die zu vermehrende DNA-Sequenz einschließen und für die cDNA-Sequenz des Gens spezifisch sind. Der Polymerisationsvorgang findet im dritten Arbeitsschritt, der Elongation, statt. Die zugegebene hitzestabile Taq-DNA-Polymerase synthetisiert den neuen Strang komplementär zur Matrize, beginnend am 3'-Ende des Primers.

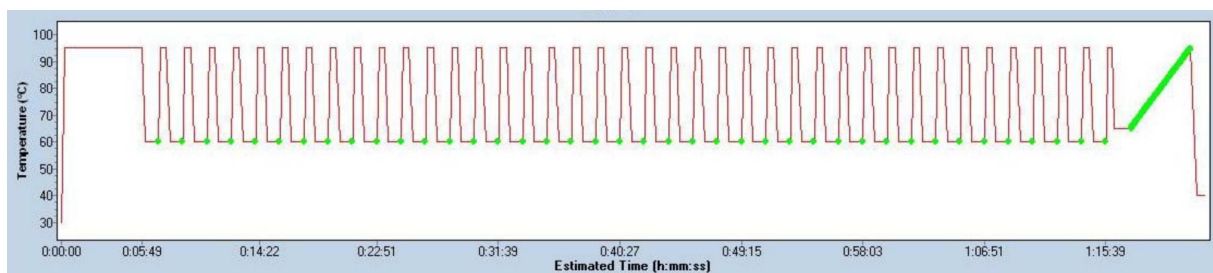


Abbildung 10: Darstellung der eingestellten PCR-Phasen

Auf der x-Achse ist die Zeit, auf der y-Achse die jeweilige Temperatur aufgezeichnet. Wie auf der Abbildung ersichtlich beginnt die PCR mit einer 5min Inkubation bei 95°C zur Auftrennung des doppelsträngigen DNA-Stranges, gefolgt von 40 Zyklen mit rhythmisch wiederkehrenden Temperaturänderungen zwischen 60°C und 95°C.

Für jede Probe wird die Anzahl der Zyklen, die notwendig sind um sich von der Fluoreszenzhintergrundsignalen abzuheben, bestimmt. Dies geschieht mit Hilfe der Fluoreszenzmessung und die Anzahl der Zyklen werden als Ct-Wert (*cycle threshold*), einem Schwellenwert bei exponentiellem Wachstum, angegeben. Diese Bestimmung erlaubt Rückschlüsse auf die Güte der Primer und auf die Menge des Ausgangsubstrats, da bei mehr cDNA, und damit ursprünglich mehr mRNA, weniger Zyklen benötigt werden um eine signifikante Fluoreszenz durch Amplifikation der DNA-Sequenz zu messen. War der Ct-Wert bei Proben gleich oder gar größer als 35 wurden die Proben als nicht nachweisbar angesehen (sogenannte $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Analyse für die relative Quantifizierung). Zudem wurde eine relative

Quantifizierung durch Zugabe eines so genannten *housekeeping*-Gens durchgeführt. Bei dieser endogenen Referenz, handelt es sich um ein Gen, das in allen Proben gleichmäßig enthalten ist, hier 18s rRNA. Durch das Verhältnis zwischen Zielsequenz und Referenzsequenz lassen sich Aussagen über die Stärke der Expression der untersuchten DNA-Sequenz ableiten. Als Negativkontrollen wurde zweifach-distilliertes Wasser (ddH₂O) verwendet, bei dem sowohl das Zielgen als auch die *housekeeper genes* nicht nachweisbar waren. Alle Schritte wurden nach den MIQUE-Richtlinien durchgeführt [119].

Tabelle 8: verwendete Primer für die Messung der jeweiligen Genexpression mittels RT-PCR

Gen	rechte Primersequenz	linke Primersequenz
PTX3	CCTGCTTTGTGCTCTC TGGT	TCTCCAGCATGATGAACAGC
E-Selectin	TCTATTTCCCACGATGCATTT	CTGCCAAAGCCTTCAATCAT
L-Selectin	TTCATGGCTTTCCTTTCACA	CTGGCATTCTCATTGGCT
P-Selectin	GGACACTTGATGGCTTCACA	CAGTTCATGTGCGATGAAGG
PECAM-1	TCCTTCCTGCTTCTTGCTAGCT	GAGCCCAATCACGTTTCAGTTT
IP-10	GGCTGGTCACCTTTCAGAAG	ATGGATGGACAGCAGAGAGC
Cxcr3	TCTCGTTTTCCCCATAATCG	AGCCAAGCCATGTACCTTGA

2.2.6 Immunologie

2.2.6.1 Durchflusszytometrie (FACS)

Das Prinzip der Durchflusszytometrie, auch FACS (*fluorescence-activated cell sorting*) genannt, beruht auf der unterschiedlichen Streuung eines Laserstrahls durch passierende Partikel abhängig von deren Größe, Granularität, Struktur und Oberflächeneigenschaften. Somit erlaubt die Durchflusszytometrie sowohl Aussagen über die Anzahl der Zellen als auch über deren physikalische und molekulare Eigenschaften [112]. Die sich in Lösung befindlichen Zellen werden in eine Kapillare eingesaugt und ein laminarer Flüssigkeitsstrom erzeugt. In diesem Strom werden die Zellen perlenkettenartig an dem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet, der hierdurch gebrochen wird. Um die verschiedenen brechenden Partikel näher zu beschreiben werden spezifische Antikörper gegen Oberflächeneigenschaften zur Markierung von bestimmten Zellen nach dem Antigen-Antikörper-Prinzip verwendet. Diese Antikörper können direkt an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sein oder mit Hilfe eines sekundär fluoreszenzmarkierten Antikörpers nachgewiesen werden. Durch den Laserstrahl werden die Fluoreszenzfarbstoffe angeregt und emittieren Licht einer bestimmten Wellenlänge. Diese ausgesendete Wellenlänge variiert zwischen den einzelnen Fluoreszenzfarbstoffen und wird durch das Gerät detektiert und aufgezeichnet. Die emittierte Photonenkonzentration verhält sich proportional zur Menge an gebundenen Antikörpern pro Zelle [112]. Zudem können über die Streuung des Lichtes weitere Aussagen über die Eigenschaften der Zellen getroffen werden. Im *forward scatter*, dem Vorwärtsstreulicht, kann eine Aussage über die Zellgröße getroffen werden. Große Zellen erzeugen hierbei ein großes Vorwärtsstreulicht, kleine Zellen verhalten sich umgekehrt. Im *side scatter*, dem Seitwärtsstreulicht, welches etwa im rechten Winkel zum Laserstrahl entsteht kann die Granularität der Zelle beurteilt werden. Je mehr Granula in einer Zelle desto höher ist das Streulicht. Zusätzlich kann man aufgrund der spezifischen Bindung von Antikörpern an bestimmte Oberflächenantigene, Rückschlüsse auf die Oberflächeneigenschaften der detektierten Zelle ziehen. Da es bei Messungen mehrerer Antikörper gleichzeitig, zur Überlappung einzelner emittierter Wellenlängen kommen kann, ist eine Kompensation notwendig, um eine aussagekräftige Analyse durchführen zu können [120]. Bei dieser Kompensation werden Zellen mit einem Antikörper markiert und als Kontrollen verwendet, um den Anteil der Streuung, die in andere Detektionskanäle streut, eliminieren zu können.

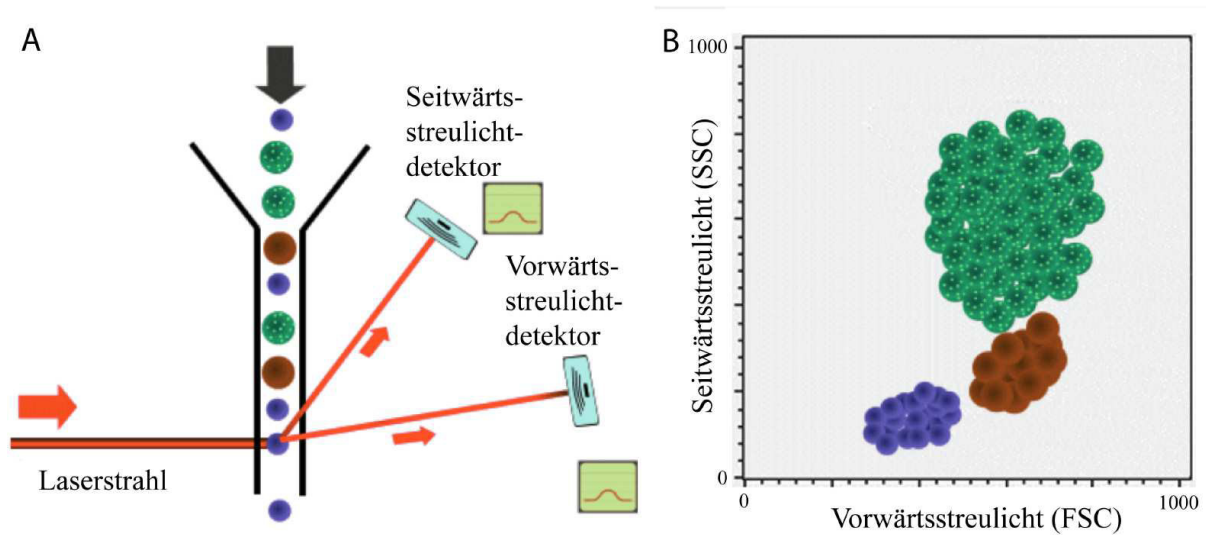


Abbildung 11: Das Prinzip der Durchflusszytometrie. Abbildung nach [120].

A: Streuung des Laserstrahls durch die vorbeigeleiteten Zellen und deren Detektion.

B: typische Darstellung der Ergebnisse im *Dot Plot*. Auf der x-Achse die Ergebnisse des Vorwärts-, auf der y-Achse des Seitwärtsstreulichtes aufgetragen.

Die Durchflusszytometrie wurde sowohl für die Auswertung des Phagozytose Assays, für die Überprüfung der Apoptose-Induktion in den EL4-Zellen durch Camptothecin, sowie für die Bestimmung der verschiedenen Zellpopulationen der Milz verwendet. Die Analyse der verschiedenen Proben wurde mit dem FacsCalibur™-Gerät und der CellQuest Software (BD Pharmingen) durchgeführt.

2.2.6.1.1 Auswertung der Zellpopulationen der Milz

Für die Analyse der verschiedenen Zellpopulationen in der Milz wurde mit verschiedenen anti-*mouse* Antikörpern gegen T-, B-, Dendritische Zellen, Monozyten, Neutrophile Granulozyten und Plasmazellen gearbeitet. Der Anteil an apoptotischen, nekrotischen und lebenden Zellen in der Milz wurde mit Hilfe des *Annexin-V-FITC Kit* bestimmt. Folgende Antikörper, beziehungsweise Antikörperkombinationen wurden für die nähere Charakterisierung der Zellen genutzt (Tabelle 9).

Tabelle 9: verwendete Zellfärbungen bei der Durchflusszytometrie und ihre Deutung

Zellen	Verwendete Antikörper	Zelltyp
T-Lymphozyten	CD3+	T-Zellmarker
	CD4+	T-Helferzellen
	CD8+	zytotoxische T-Zellen
	CD3+ CD4- CD8-	autoreaktive T-Zellen
	CD3+ CD4+ CD25+	regulatorische T-Zellen
	CD3+ CD4+ CD25+ Foxp3+	Funktion der regulatorischen T-Zellen
B-Lymphozyten	B220+	B-Zellmarker
	B220+ IgM+ IgD+	reife B-Zellen
	B220+ CD21 ^{low} CD23 ^{high}	follikuläre B-Zellen
	B220+ CD21 ^{high} CD23 ^{low}	marginale B-Zellen
	CD138+ κ light chain+	Plasmazellen
Dendritische Zellen	CD11c+	Dendritische Zellen
	CD11c+CD40+	aktivierte Dendritische Zellen
Makrophagen	F4/80+	Makrophagen
	CD11b+ MHCII+	M1 Makrophagen
	CD11b+ CD206+	M2 Makrophagen
Monozyten	7/4 ^{high} Ly6G-	
Neutrophile	7/4 ^{low} Ly6G+	
lebende Zellen	FITC- PI-	
apoptotische Zellen	FITC+ PI-	
nekrotische Zellen	FITC+ PI+	

2.2.6.1.2 Auswertung des Phagozytose Assays

Das Ausmaß der erfolgten Apoptose-Induktion der EL4-Zellen die mit Camptothecin behandelten wurden, wurde mittels *Annexin-V-FITC Kit* bestimmt. Hierfür wurden die mit Camptothecin behandelten EL4 Zellen nach vierstündiger Inkubation mit kaltem PBS gewaschen und für 5min bei 6.000rpm bei 4°C zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand verworfen und die Zellen in kaltem Puffer auf eine Konzentration von circa 10^5 - 10^6 Zellen/ml verdünnt. Zu jeweils 490µl der Zellsuspension wurden 5µl Annexin-V-FITC und 5µl Propidiumjodid gegeben. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 4°C im Dunkeln wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie ausgewertet.

Um die durch die Peritoneallavage gewonnenen Zellen auszuwerten, wurden diese in HBSS + 4mM EDTA resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 1,4 µl des Farbstoffs F4/80 gefärbt und für 40min in 4°C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zweimalig in PBS gewaschen und abschließend so resuspendiert, dass in jedes FACS *tube* 300µl der Mischung pipettiert wurde. Mittels FACS Analyse wurde nach den Zellen gefahndet, welche sowohl F4/80, als auch pHrodoTM positiv waren. Hierbei handelte es sich um Makrophagen, welche die mit pHrodoTM markierten apoptotischen Zellen phagozytiert hatten.

2.2.6.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Unter *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) versteht man ein immunologisches Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion beruht. Mittels dieses Verfahrens ist man in der Lage Proteine jeglicher Art nachzuweisen. Hierzu verwendet man die Eigenschaft von Antikörpern (AK) spezifisch an ihr Antigen, d. h. an die nachzuweisende Substanz, zu binden. Die Elisa Platten wurden je nachdem ob ein Antikörper oder ein Antigen nachgewiesen werden sollte, mit dem entsprechenden komplementären Antigen oder Antikörper beschichtet. Dies führte dann zu einer spezifischen Antikörper-Antigen-Bindung und somit zu einer Fixierung des gesuchten Antikörpers/Antigens. Diese Anbindung wurde mittels eines zweiten Antikörpers, welcher an ein Enzym gekoppelt ist, nachgewiesen. Das gebundene Enzym katalysiert nach Zugabe des Substrats eine Farbreaktion, deren Signalstärke proportional zu der gesuchten Antigen- bzw. Antikörperkonzentration ist.

Alle ELISAs wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. (siehe auch Tabelle 10). Der erste Arbeitsschritt, das so genannte *coating*, bestand darin, den Fängerantikörper (*capture antibody=CAB*) oder das Fängerantigen in einem Beschichtungspuffer (*coating buffer*) auf die gewünschte Konzentration zu verdünnen. Hiervon wurden 100µl pro *well* für eine bestimmte Zeitdauer bei 4°C in eine 96-*well*-Platte geben, um diese zu beschichten. Nach dreimaligem Waschen wurde die Platte mit 200µl/*well* Probenverdünner (*assay diluent*) für 1h bzw. 30min geblockt um eventuell auftretende unspezifische Reaktionen durch freie Proteinbindungsstellen zu verhindern. Nach erneutem dreimaligem Waschen, wurden jeweils 100µl/*well* der Proben und eine zuvor hergestellte Standardreihe aufgetragen, bei der die Konzentrationen des gesuchten Antigens bekannt war. Nach ein- bzw. zweistündiger

Inkubationsdauer bei Raumtemperatur wurde die Platte fünfmal gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 100µl/well des Detektionsantikörpers (*detection antibody=DAB*) mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) in der benötigten Konzentration (meist 1 : 50000) gefolgt von einer einstündigen Inkubation. Nach mehrmaligem Waschen wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 100µl/well Substratlösung gestartet. Hierbei handelte es sich um ein Gemisch, welches 1:1 aus Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und Tetramethylbenzidin (TMB) bestand. Nach einer 10- bis 30- minütigen Inkubation im Dunkeln wurde die stattfindende Farbreaktion durch die Zugabe von 50µl/well Stopplösung gestoppt. Bei der Stopplösung handelte es sich um 1molare Schwefelsäure (H₂SO₄). Abschließend wurde die abgelaufene Farbreaktion mit Hilfe des ELISA-Readers bei einer Absorption von 450nm gemessen und anhand der Standardkurve, welche sich aus den Werten der Standardreihe ergab, die Konzentrationen der Proben berechnet. Als Negativkontrolle wurde das Serum von 24 Wochen alten B6 Mäusen verwendet.

Tabelle 10: Protokolle der durchgeführten ELISAs

ELISA	PTX3	TNF α	Anti-dsDNA*	RF	Smith	Nucleosome*	U1SNRP	IL12
Wasch- lösung	PBS mit 0,05% Tween	PBS mit 0,05% Tween	Tris-NaCl	Tris-NaCl	Tris-NaCl	Tris-NaCl	Tris-NaCl	PBS mit 0,05% Tween
<i>Coating/ CAB</i>	PTX3 1:180	TNF- α 1:200	dsDNA (2 μ g/ml)	Rabbit IgG (10 μ g/ml)	Smith-Ag 1:250	dsDNA (2 μ g/ml) Histone (2 μ g/ml)	Sn-RNP 1:250	IL12 1:250
<i>Coating buffer</i>	PBS	0,05M Natrium- carbonat	Natrium- citratpuffer	0,05M Bikarbonat- puffer	0,05M Bikarbonat- puffer	0,05M Bikarbonat- puffer	0,05M Bikarbonat- puffer	0,2M Natrium- phosphat
Inkubations- dauer	ÜN	ÜN	1h	ÜN	ÜN	ÜN	ÜN	ÜN
<i>Assay diluent</i>	PBS mit 1% BSA	PBS mit 10% FCS	Tris-NaCl mit 1% Albumin	Tris-NaCl mit 1% Albumin	Tris-NaCl mit 1% Albumin	Tris-NaCl mit 1% Albumin	Tris-NaCl mit 1% Albumin	PBS mit 10% FCS
DAB	1:200	1:1000	1:50000 IgG _{Gesamt} , IgG ₁ IgG _{2a/c} , IgG ₃	1:50000	1:50000	1:50000	1:50000	1:250

* ELISA-Platten wurden für 1h mit Poly-L-lysine und PBS 1:1 vorgecoatet

2.2.6.3 Immunfluoreszenzdiagnostik mit *Crithidia luciliae* und HEp2 Zellen

Um das gewonnene Plasma auf Autoantikörper zu untersuchen wurde zum einen mit dem *Crithidia*-Immunfluoreszenztest nach dem Vorliegen von Antikörpern gegen doppelsträngige DNA (dsDNA) gefahndet. Für diesen Test diente der Kinetoplast des Flagellaten *Crithidia luciliae* als Substrat. Ein Kinetoplast besteht aus einem Netzwerk reiner doppelsträngiger DNA (dsDNA) und kommt in dem mitochondrialen Genom von *Kinetoplastea*, einzelligen Organismen, welche zu den Protozoen gezählt werden, vor [121]. Zum anderen wurde mittels eines indirekten Immunfluoreszenztestes für antinukleäre Antikörper auf HEp2 Zellen nach dem Auftreten derselbigen gefahndet. Hierbei diente ein molekularer Film humaner Epithelzellen, welche aus einer Larynxkarzinomzelllinie isoliert wurde und durch ihre hohe Teilungsaktivität sämtliche Stadien der Mitose aufzeigen, als Substrat. Falls Autoantikörper vorhanden waren, banden diese an das verwendete Substrat und wurden auch durch das Waschen mit PBS nicht entfernt. Durch Zugabe eines gegen die Autoantikörper gerichteten Detektionsantikörpers, der an einen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist, wurden die an das Substrat gebundenen ANA oder Anti-dsDNA nachgewiesen. Die gewonnenen Plasmaproben wurden mit PBS 1:50 verdünnt, mit Hilfe des Vortexers gemischt und jeweils 40µl in die verschiedenen *wells* auf die speziell vorgefertigten Objektträger pipettiert. Darauf folgte eine 30-minütige Inkubation im Dunkeln. Nach Ablauf der Inkubation wurde der Objektträger mit PBS gewaschen und 30µl des in PBS 1:1000 verdünnten *FITC-conjugated goat anti-mIgG*-Detektionsantikörper in die *wells* gegeben. Nach einer erneuten Inkubationsdauer von 30min und einem erneuten Waschen mit PBS wurden in die *wells* 3µl eines speziellen Fixierungsmediums gegeben und der Objektträger mit einem Deckglas verschlossen. Vor Auswertung der Objektträger unter dem Fluoreszenzmikroskop wurden die Proben über Nacht im Dunkeln bei 4°C belassen. Um eine quantitative Aussage über das Vorliegen der Antikörper zu treffen wurde ein semiquantitativer *score* von 0 bis 3 verwendet.

2.2.6.4 Western Blot

Unter Western Blot versteht man ein immunologisches Nachweisverfahren, das zum Nachweis von Proteinen dient. Grundlage dieses Nachweisverfahrens ist die Fixierung des Proteins an eine Trägermembran (sog. *blotting*), welches dann mittels Kopplung spezifischer Antikörper nachgewiesen wird. Zuerst wird das Proteingemisch auf ein Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Das Gel besteht hierbei aus 2 verschiedenen Bestandteilen, welche aus *separating buffer* und *stacking buffer* hergestellt werden. In die Vertiefungen des sogenannten Sammelgels, hergestellt aus *stacking buffer*, werden die Proben aufgetragen und konzentriert. Im folgenden Trenngel, hergestellt aus *separating buffer*, werden die Proteine nach ihrer Größe wie in einem Sieb durch ein elektrisches Feld aufgetrennt. Da die Proteine eine negative Ladung haben, wandern sie von der Anode zur Kathode. Kleine Proteine wandern schneller als große durch das Gel zur Kathode.

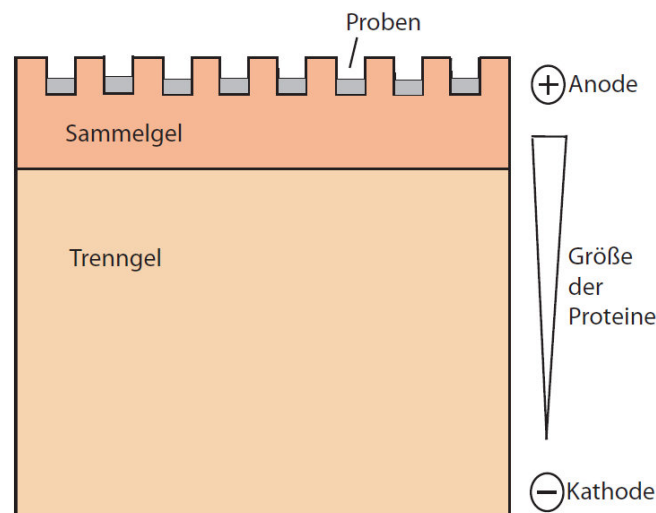


Abbildung 12: Westernblot-Gelelektrophorese

Anschließend erfolgt die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Membran durch erneutes Anlegen eines elektrischen Feldes und der Zugabe des spezifisch an das Protein bindenden Antikörpers. Der nächste Schritt besteht in der Zugabe eines Sekundärantikörpers. An diesem ist ein Enzym, die Meerrettichperoxidase, die eine Chemilumineszenz-Reaktion katalysiert, gekoppelt. Durch die eintretende chemische Reaktion wird elektromagnetische Strahlung im Bereich des sichtbaren Lichts emittiert. Das emittierte Licht kann nun mit einem Film aufgezeichnet werden; dadurch wird das gesuchte Protein als Bande sichtbar gemacht. Durch die Ausprägung der Bande, auch im Vergleich zur Kontrolle, kann eine quantitative Aussage über die Expression des Proteins gemacht werden. Western Blot Analysen wurden

aus Proteinen der Lunge, Niere und Milz durchgeführt. Alle Western Blots wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

Der erste Arbeitsschritt bestand in der Herstellung eines Polyacrylamid-Gels zur Auftrennung der Proteinbanden mittels Elektrophorese. Um das Gel herzustellen wurde zuerst *separating buffer* in eine Gelkammer gegossen und ausgehärtet. Auf das nun polymerisierte Trenngel wurde *stacking buffer* gegeben, inklusive eines Kammes um Vertiefungen für die Auftragung der Proben zu erhalten, und das Gel über Nacht bei 4°C ausgehärtet. Anschließend wurden die Proteine durch Zugabe eines *loading buffer* (Laemmli *buffer* [122]) in eine Konzentration von ca. 2µg/µl gebracht und bei 95°C degradiert. 20µl des Proteingemisches und 1,5µl eines Proteinmarkers wurden in die Taschen des Gels aufgetragen und für circa 1h bei 60V gefolgt von 2h bei 140V elektrophoretisch aufgetrennt. Die nun aufgetrennten Proteine wurden beim so genannten „*blotting*“ auf eine Immobilon-P Membran mittels *transfer buffer* und *Whatman papers*® bei 15V für 1h transferiert. Daraufhin wurde die Membran für 1h mit 1% *Western Blocking Reagent* geblockt, der erste sich in TBS befindende Primärantikörper auf die Membran gegeben und über Nacht (bei PTX3 und Selectin P) beziehungsweise 1h (bei β-actin) bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde die Membran mit TBS-Puffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper für 1h inkubiert. Danach erfolgten ein erneutes Waschen mit TBS-Puffer und die Detektion der emittierten Strahlung auf einem Film durch die enzymatische Chemilumineszenzreaktion (ECL) und die ECL-Detektions-Reagenzien A und B.

Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper beim Western Blot

Antikörper	Herkunft	Verdünnung	Inkubationsdauer
Primärantikörper:			
anti-mouse Ptx3	Alpha Diagnostic Internat.	1:1000	12h
anti-P-Selectin mAB RB40	BD Bioscience	1:500	12h
β-actin	Cell Signaling Technology	1:1000	1h
Sekundärantikörper:			
anti-rat IgG AB	Cell Signaling Technology	1:10 000	1h

Kapitel 3

Ergebnisse

3 Ergebnisse

3.1 Das Fehlen von PTX3 verschlechtert die Clearance apoptotischer Zellen

Um in den EL-4 Zellen den programmierten Zelltod (Apoptose) zu induzieren wurden diese, wie beschrieben (2.2.1.1), mit Camptothecin behandelt. Das Ausmaß der erfolgten Apoptoseinduktion wurde mit dem *Annexin-V-FITC Detection Kit* und der Durchflusszytometrie bestimmt. In der Frühphase der Apoptose wird das sich unter physiologischen Bedingungen in der inneren Schicht der Zellmembran befindliche Phosphatidylserin (PS) in die äußere Schicht transloziert. Annexin V besitzt eine hohe Affinität zu PS und kann nach dessen erfolgter Translokation in die äußere Schicht der Zellmembran in einer Calcium-abhängigen Reaktion ankoppeln. Da Annexin V an FITC gebunden ist, kann die Bindung von Annexin V an PS über FITC via FACS nachgewiesen werden. Um einen Defekt der Zellmembran ausschließen zu können, verwendet man zusätzlich Propidiumjodid (PI). Propidiumjodid kann nicht durch die intakte Zellmembran lebender oder früh apoptotischer Zellen in das Zellinnere gelangen. Durch die Benutzung dieser beiden Bestandteile des *Annexin-V-FITC Detection Kit* kann man folgende Schlüsse ziehen: gesunde Zellen sind FITC und PI negativ, früh apoptotische Zellen dagegen FITC positiv und PI negativ, spät apoptotische Zellen sind FITC und PI doppelpositiv, nekrotische Zellen sind FITC negativ und PI positiv [123]. Zur Induktion der Apoptose wurden drei unterschiedliche Konzentrationen von Camptothecin (30, 60 und 90 μ M) sowie Medium als Kontrolle verwendet. Die Versuche zeigten, dass der größte Anteil an früh apoptotischen Zellen (FITC+ / PI-) bei einer Camptothecin-Konzentration von 90 μ M nach einer 4-stündigen Inkubation entstand. Diese so gewonnenen apoptotischen Zellen wurden für weitere Experimente verwendet.

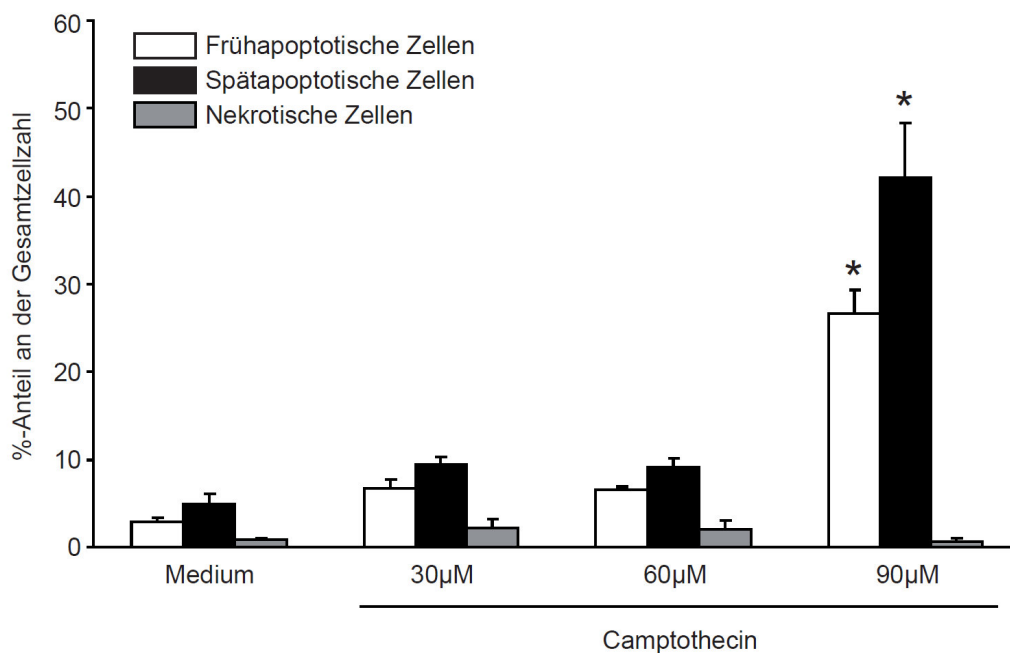


Abbildung 13: Apoptoseinduktion in EL4-Zellen mittels Camptothecin

EL4-Zellen wurden mit Medium sowie mit Camptothecin für 4h behandelt. Die Auswertung erfolgte mittels FACS und einem *Annexin-V-FITC Detection Kit*. Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der FITC+ und PI+ Zellen an der Gesamtzellanzahl. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 2 unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten. * $p < 0,05$ gegenüber der Mediumkontrolle, 30µM und 60µM Camptothecin.

PTX3 wurde bereits als Regulator der C1q vermittelten *Clearance* apoptotischer Zellen *in vitro* in der Literatur beschrieben [65, 97]. Da eine verminderte *Clearance* apoptotischer Zellen ein typischer Pathomechanismus für die Entstehung eines SLE ist [124], wurde die Fähigkeit der *Ptx3*-defizienten B6lpr Mäuse zur Phagozytose apoptotischer Zellen *in vivo* getestet. Hierzu wurden B6lpr und B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen intraperitoneal apoptotische EL4 Zellen injiziert, welche zuvor mit pHrodoTM gefärbt worden waren. PHrodoTM ist ein Farbstoff, der erst nach einer Verschiebung des pH-Wertes in den sauren Bereich wie in den Phagosomen der Makrophagen rötlich fluoresziert. Nach 45min wurde eine Peritoneallavage durchgeführt und zum einen mittels ELISA die vorliegende PTX3 Konzentrationen und zum anderen mittels Durchflusszytometrie der Anteil der pHrodoTM + F4/80+ Makrophagen analysiert. Die intraperitoneale Gabe apoptotischer Zellen in B6lpr Mäuse führte im Vergleich zu der Negativkontrolle zu einer signifikant vermehrten PTX3-Expression (Abbildung 14A). Die Injektion apoptotischer Zellen in *Ptx3*-defiziente Mäuse führte folgerichtig zu keiner PTX3 Produktion. Bei der Analyse der Durchflusszytometrie zeigten die F4/80+ peritonealen Makrophagen der B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäuse eine signifikant geringere Aufnahme apoptotischer Zellen im Vergleich zu den B6lpr Mäusen (Abb. 14C und D), bei einer vergleichbaren Gesamtanzahl an F4/80 positiven Makrophagen (Abb. 14B). Hieraus folgt, dass das Fehlen von PTX3 mit einer verminderten *Clearance* apoptotischer Zellen einhergeht.

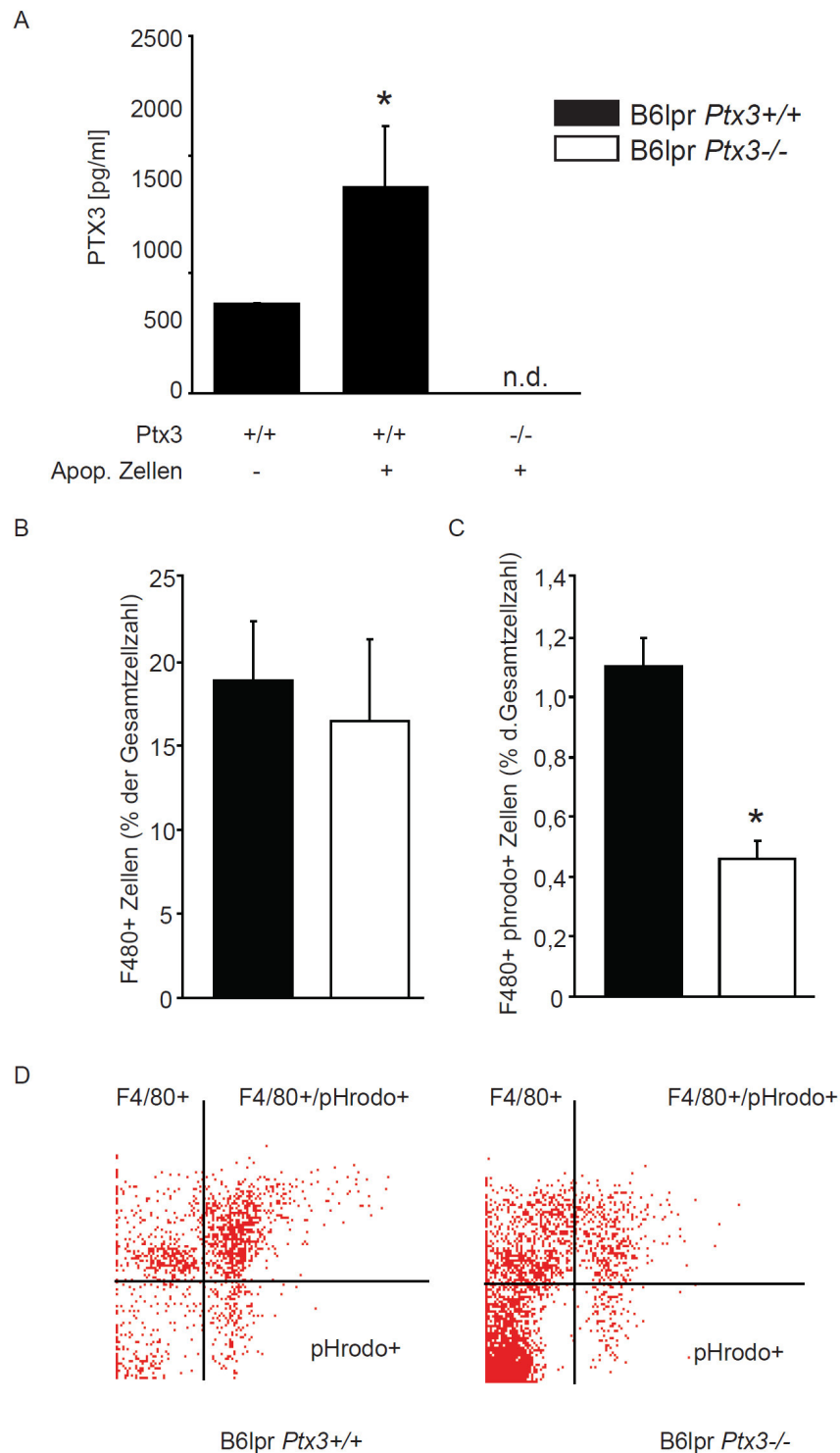


Abbildung 14: PTX3 fördert die Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen

2×10^5 pHrodoTM markierte apoptotische Zellen wurden intraperitoneal in B6lpr *Ptx3*^{-/-} und B6lpr Mäuse injiziert und nach 45min eine Peritoneallavage durchgeführt.

A: Der PTX3 Spiegel in der Lavage wurde mittels PTX3 Elisa bestimmt. Eine Expression von PTX3 war in den *Ptx3*-defizienten Mäusen nicht detektierbar (n.d.). Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 5 Mäusen pro Gruppe.

B: Zeigt den prozentualen Anteil der F4/80+ peritonealen Makrophagen an der Gesamtzahl der Zellen, die bei der Durchführung der Peritoneallavage gewonnen wurde. Diese unterschied sich nicht zwischen den B6lpr und den *Ptx3*^{-/-} B6lpr Mäusen.

C und D: Zeigen die Anzahl der doppelpositiven F4/80+pHrodo+ Zellen. Diese war in den *Ptx3*-defizienten Tieren im Vergleich zu den B6lpr Tieren signifikant vermindert. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3 voneinander unabhängigen Experimenten. * $p < 0,05$ gegen B6lpr Mäuse.

3.2 Expression von PTX3 in-vitro nach Stimulation mit TLR-Agonisten

Es ist bekannt, dass die Aktivierung mancher TLR wie beispielsweise TLR7 und -9 bei der Pathogenese des SLE eine entscheidende Rolle spielt (siehe auch 4.1). Durch eine vermehrte Aktivierung kommt es zu einem erhöhten Vorliegen proinflammatorischer Zytokine, die die Krankheitsentstehung fördern. Um der Frage nachzugehen, ob TLR Stimulanzen zu einer vermehrten PTX3 Produktion führen, wurde die Gesamtpopulation der isolierten Splenozyten auf eine Induzierbarkeit von PTX3 untersucht. Verwendet wurde dazu als Kontrolle Medium sowie als Stimulanzen 2µg/ml P3C, 25µg/ml pl:C-RNA, 2µg/ml LPS, 2µg/ml Imiquimod, und 1µM CpG-DNA und die Zellen hiermit für 6h inkubiert (Abb. 15). Sowohl CpG-DNA als auch pl:C-RNA wurden mit Lipofectamin vorbehandelt, um eine Stimulation der Zellen zu ermöglichen. Bei Lipofectamin handelt es sich um eine Transfektionsreagenz, welche es ermöglicht, dass verschiedene nicht Zellmembran-gängige Stoffe, wie Nukleinsäuren, in die Zelle geschleust werden können. P3C bzw. Imiquimod führten als TLR2 bzw. 7 Agonisten zu einer leicht vermehrten Expression von PTX3. Die einzelsträngige DNA Sequenz CpG, welche im Immunsystem als PAMP fungiert und über TLR9 zu einer Immunstimulation führt, bewirkte ebenfalls eine leicht vermehrte Expression von PTX3. Die Stimulation der Splenozyten mit LPS, einem Bestandteil der äußeren Bakterienmembran von gram-negativen Bakterien, in dessen Folge es zu einer TLR4 vermittelten Freisetzung des proinflammatorischen Transkriptionsfaktors NF-κB kommt, führte zu einer vermehrten Expression der PTX3 mRNA. Wohingegen eine Stimulation der Zellen mit pl:C, einem synthetische hergestellten Analogon doppelsträngiger RNA, als TLR3 Ligand zu keiner Induktion der PTX3 mRNA Expression führte.

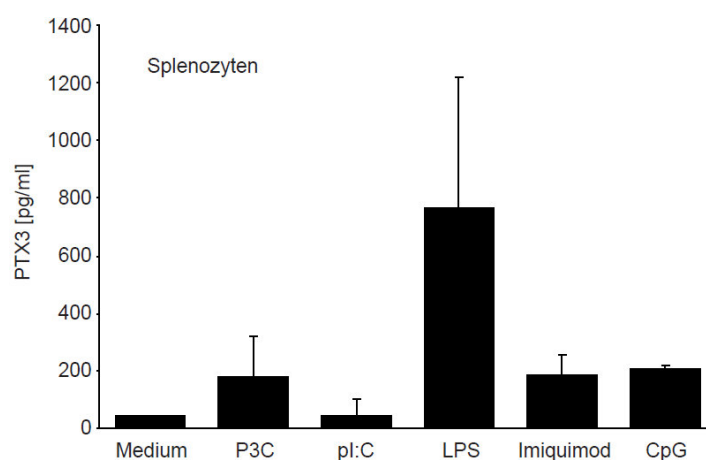


Abbildung 15: PTX3 mRNA Expression in Splenozyten nach Stimulation

Die Splenozyten wurden aus den Milzen 8 Wochen alter B6 Mäuse gewonnen, mit Stimulanzen für 6h behandelt und ein PTX3 ELISA durchgeführt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von 2 voneinander unabhängigen Experimenten.

3.3 PTX3 Expression in B6lpr Mäusen

Um die Funktion von PTX3 bei Autoimmunerkrankungen näher charakterisieren zu können, ist es erforderlich, zuerst die Expression und das Vorkommen von PTX3 in erkrankten Mäusen zu untersuchen. Weder in *Ptx3*-defizienten noch in altersentsprechenden B6 Wildtyp-Mäusen konnten pathologische Organveränderungen und Antikörper im Blut die auf einen SLE hindeuten, nachgewiesen werden. Zudem konnte bei beiden Mäusestämmen keine Antikörperbindung an die DNA des Kinetoplasten mittels *Crithidia luciliae*-Immunofluoreszenztest und auch keine Anbindung an HEp2 nachgewiesen werden. All diese Daten legen den Schluss nahe, dass ein Mangel an PTX3 allein für die Entstehung einer Autoimmunerkrankung bei B6 Mäusen nicht ausreicht. Daher wurden für die Untersuchungen als Krankheitsmodell B6lpr Mäuse verwendet. Diese Mäuse leiden aufgrund einer Mutation im *lpr*-Gen unter einer gestörten Apoptose, so dass es zu einem SLE-ähnlichen Krankheitsverlauf kommt, der als Tiermodell eines SLE etabliert ist. Zuerst wurde die Expression von PTX3 mRNA in den Organen von 8 Wochen alten B6lpr Mäusen charakterisiert. PTX3 mRNA war am stärksten exprimiert im Knochenmark. Unter den soliden Organen waren die PTX3 mRNA Spiegel in Herz und Lunge im Vergleich zur Harnblase und der Niere deutlich erhöht (Abb. 16A). Die PTX3 Proteinexpression wurde mittels *Western blot* in Milz, Niere und Lunge von B6lpr Mäusen überprüft. Im Zeitverlauf nahm die PTX3 Expression in der Milz und Niere ab, während die systemische Autoimmunität im Krankheitsverlauf der B6lpr Mäuse über die Zeit zunahm (Abb. 16B). Dieses Ergebnis stimmte überein mit der Beobachtung, dass der PTX3 Plasmaspiegel in ELISA Analysen ebenfalls im Zeitverlauf eher sank. Zudem zeigten die B6lpr Mäuse niedrigere PTX3-Spiegel im Vergleich zu den B6 Mäusen. (Abb.16C). Im Gegensatz hierzu nahm die PTX3 Proteinexpression in der Lunge von 6 Monate alten B6lpr Mäusen zu. Dieses Ergebnis legt den Schluss nahe, dass eine lokale PTX3 Produktion in der Lunge von B6lpr Mäusen, die normalerweise einer autoimmunbedingter Gewebeschädigung ausgesetzt sind, stattfindet. Folglich steigt die PTX3 Expression in der Lunge während des Fortschreitens der Autoimmunerkrankung in B6lpr Mäusen an. Diese Beobachtung erhärtet den Verdacht, dass PTX3 eine wichtige Rolle in der Pathogenese bei der Lunge spielt, wohingegen dies bei der Milz und den Nieren nicht der Fall zu sein scheint.

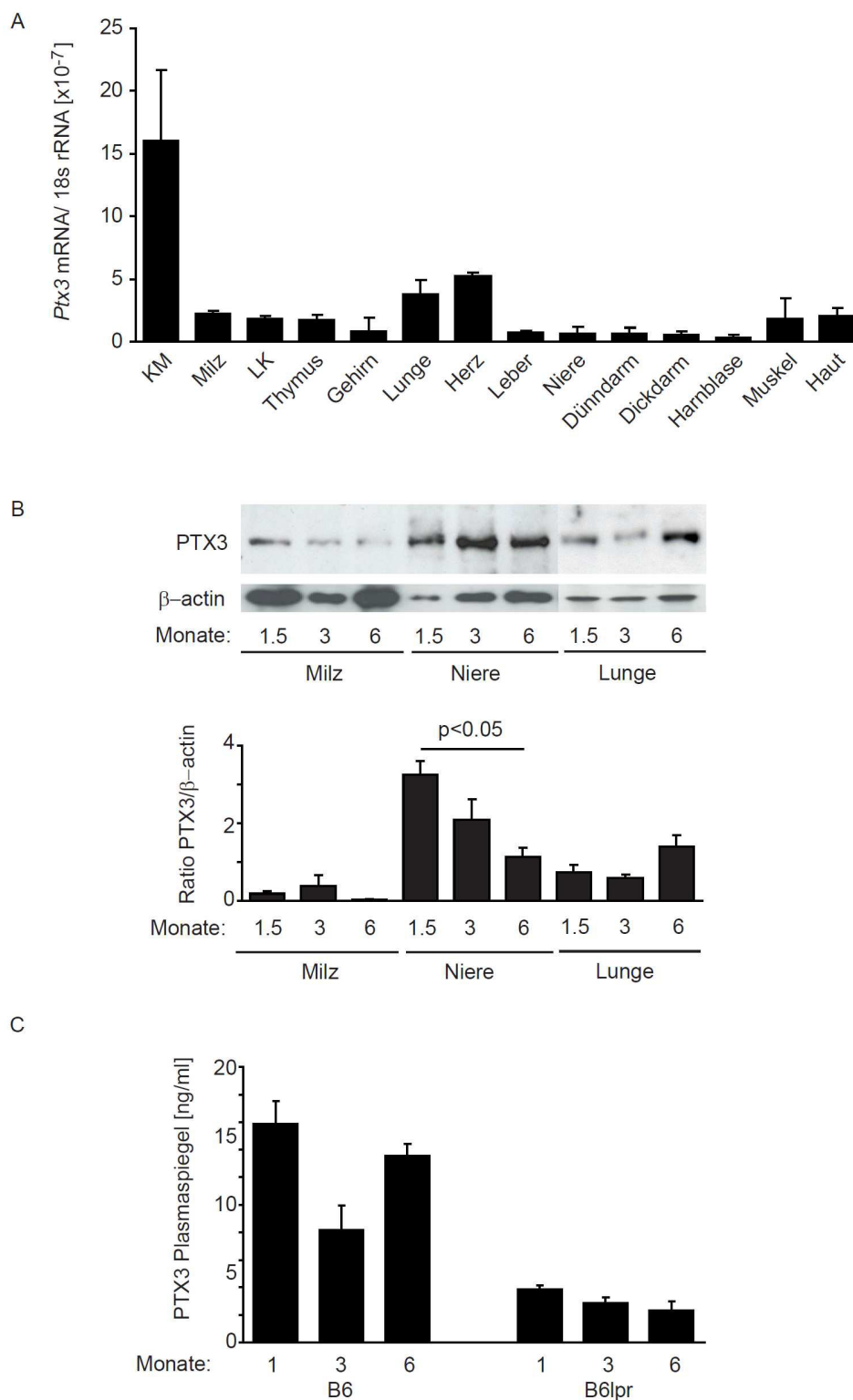


Abbildung 16: PTX3 Expression in der Maus

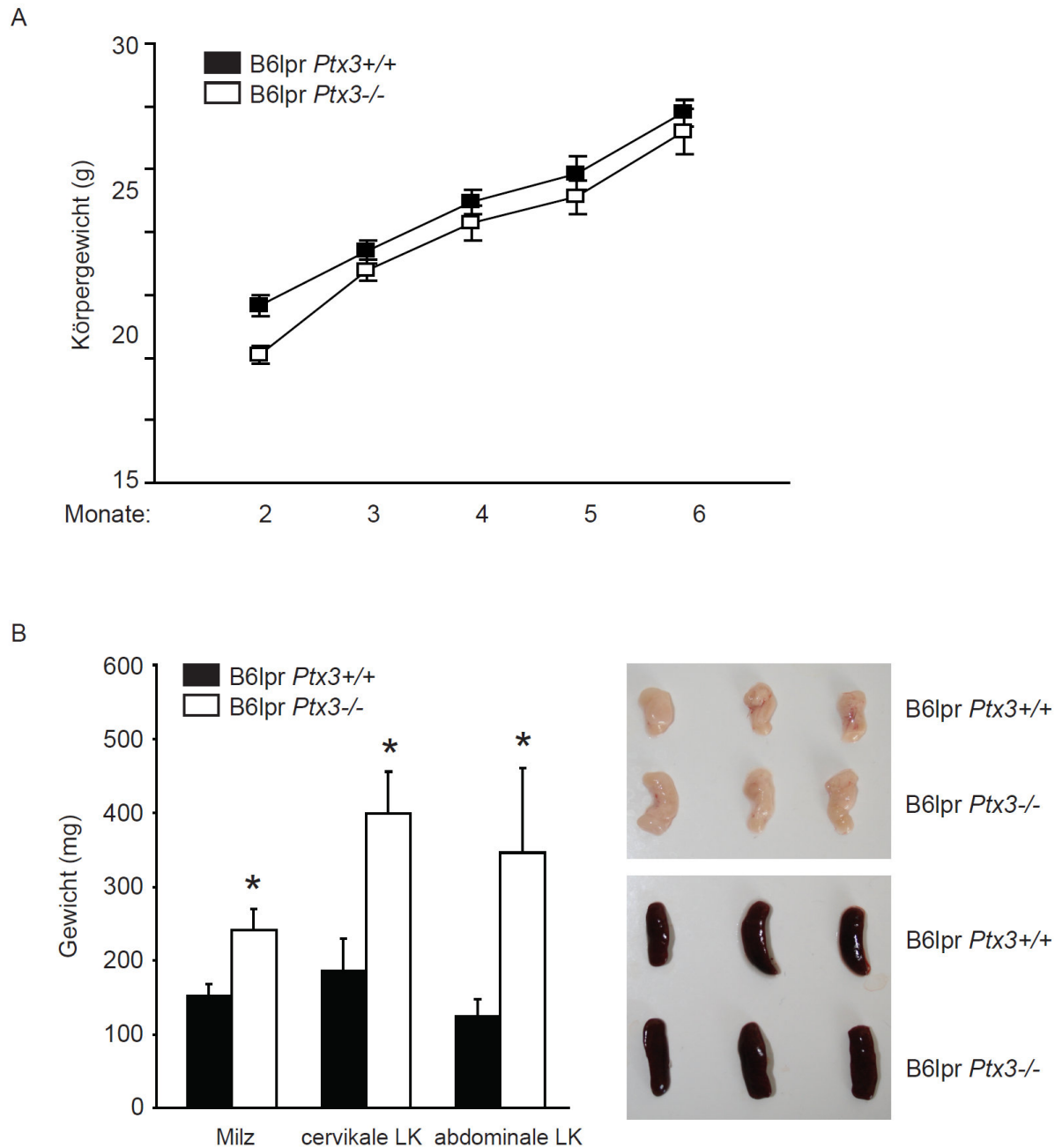
A: RNA wurde aus den Organen von 8 Wochen alten B6lpr Mäusen für RT-PCR Analysen gewonnen. (LK=Lymphknoten, KM=Knochenmark) Die Daten stellen Mittelwerte aus dem Verhältnis der spezifischen mRNA gegenüber der 18S rRNA \pm SEM dar.

B: Proteinproben wurden aus Milz, Niere und Lunge von B6lpr Mäusen im Alter von 1,3 und 6 Monaten gewonnen. PTX3 *Western Blot* stellt die quantitative (20 μ g Proteinladung pro *well*) PTX3 Proteinexpression in den jeweiligen Organen zu den verschiedenen Zeitpunkten dar. Das Histogramm zeigt das Verhältnis der PTX3 Expression zur Expression der β -actin Kontrolle

C: PTX3 Plasmaspiegel wurden in 1, 3 und 6 Monate alten B6lpr und B6 Mäusen bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

3.4 PTX3 unterdrückt die Lymphoproliferation in B6lpr Mäusen

Um die Rolle von PTX3 bei der Entstehung einer Autoimmunität zu untersuchen, wurde neben den B6lpr Mäusen noch B6lpr *Ptx3*^{-/-} Tiere generiert, da das alleinige Fehlen von PTX3 zu keiner Ausbildung einer Autoimmunerkrankung in den B6 Mäusen führte. Da B6lpr Mäuse erst sehr spät antinukleäre Antikörper sowie eine geringfügige Glomerulonephritis ausbilden, konnten sie unter Berücksichtigung der Mendelschen Gesetze mit dem *Ptx3* *knockout*-Stamm gekreuzt und ein B6lpr *Ptx3*^{-/-} Stamm gezüchtet werden. Zwischen den B6lpr und den B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mausstämmen konnten keine Unterschiede bezüglich des Körpergewichts festgestellt werden (Abb.17A). Zudem unterschied sich die Überlebenskurve nicht zwischen den beiden Mausstämmen. Um den SLE Phänotyp genauer zu untersuchen, wurden sowohl die Größe als auch das Gewicht der Milz sowie der cervikalen und abdominalen Lymphknoten im Alter von 6 Monaten in beiden Genotypen bestimmt. Hierbei zeigten sich im Vergleich signifikant vergrößerte Lymphknoten und Milzen in den B6lpr *Ptx3*^{-/-} *knockout*-Tieren gegenüber den B6lpr Tieren. Diese Beobachtung bestätigte sich auch durch die Gewichtsbestimmung der Lymphknoten sowie der Milz (Abb. 17B). Folglich führt ein Mangel von PTX3 dann zu einer verstärkten Lymphoproliferation in Mäusen, wenn diese bereits durch einen weiteren Defekt im „lpr-Gen“, vorbelastet sind.



Da das Fehlen von PTX3 mit einer verschlechterten Clearance apoptotischer Zellen einherging, und es in den B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen zu einer Lymphoproliferation mit Splenomegalie kam, wurde mittels *Annexin-V-FITC Kit* der Anteil der lebenden, apoptotischen und spätapoptotischen beziehungsweise nekrotischen Zellen in der Milz beider Mausstämme untersucht. Hierbei zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Gesamtzahl der apoptotischen Zellen (FITC+ PI+) in der Milz zwischen den beiden Genotypen. Der Anteil der nekrotischen und spätapoptotischen Zellen unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den B6lpr und den B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen. Folglich ist das erhöhte Gewicht der Milz in den *Ptx3*-defizienten Mäusen nicht mit dem vermehrten Vorliegen abgestorbener Körperzellen aufgrund der eingeschränkten Clearance in der Milz assoziiert.

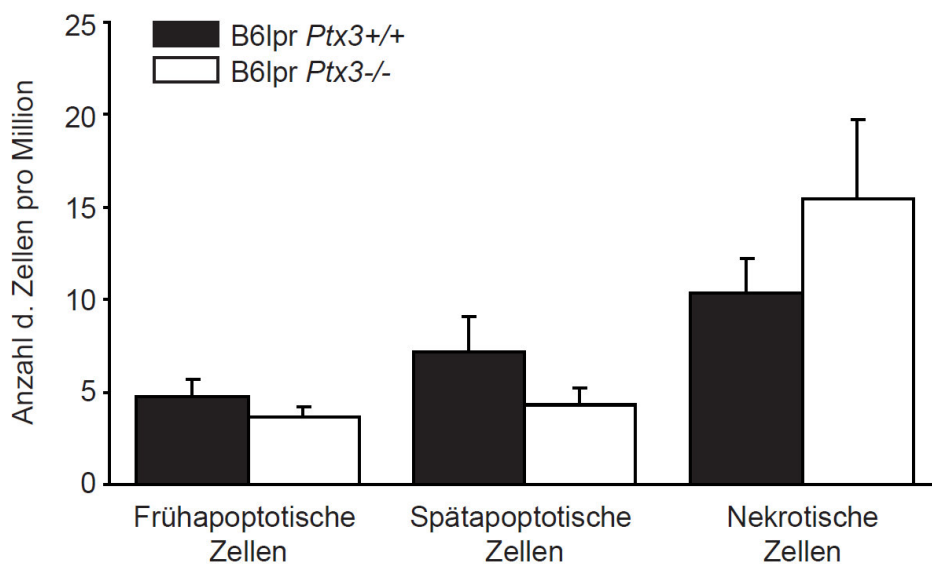


Abbildung 18: Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen der Milz

Die Splenozyten wurden wie unter 2.2.1.2 gewonnen und anschließend erfolgte mittels FACS und einem *Annexin-V-FITC Detection Kit* die Auswertung. Die Grafik zeigt den prozentualen Anteil der frühapoptotischen (FITC+ und PI-), spätapoptotischen (FITC+ und PI+) und nekrotischen Zellen (FITC- und PI+) an der Gesamtzellzahl. Die Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 5 Mäusen pro Genotyp.

3.5 PTX3 unterdrückt spezifisch CD4/CD8 doppel-negative T-Zellen in B6lpr/lpr Mäusen

Aufgrund der Entdeckung, dass ein Defizit von PTX3 mit einer verminderten *Clearance* apoptotischer Zellen einhergeht, wurde folgende Hypothese aufgestellt. Die verlängerte Exposition des Immunsystems mit körpereigenen toten Zellen geht mit einer vermehrten Aktivierung von dendritischen Zellen und hierdurch zu einer Zunahme von vorhandenen autoreaktiven Lymphozyten im Kontext des SLE, wie in E8-Mag oder DNase 1-defizienten Mäusen, einher [125, 126]. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde eine FACS Analyse der nicht stimulierten CD11b+ dendritischen Zellen direkt nach Entnahme der Milz von 6 Monaten alten Mäusen durchgeführt, um sowohl deren Zahl als auch deren Aktivität zu erfassen. Wider Erwarten war die Anzahl der CD11c+/CD40+ dendritischen Zellen zwischen den beiden Genotypen identisch. Auch die Anzahl der Monozyten, der CD11b+MHCII+ Makrophagen und Neutrophilen Granulozyten war nicht unterschiedlich zwischen den beiden Mausstämmen (Abb. 19A). In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung waren die Plasmaspiegel von IL-12, was auf eine verstärkte Aktivität der dendritischen Zellen hindeuten würde, durch die PTX3-Defizienz in den B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen ebenfalls unverändert (Abb.19B). Allerdings war die Anzahl der CD4/CD8 doppelnegativen „autoreaktiven“ T-Zellen in den *Ptx3* *knockout*-Mäusen signifikant erhöht (Abb. 19C). Im Gegensatz hierzu war die Anzahl der anderen T-Lymphozyten Populationen, wie CD3+, CD4+, CD8+, und CD4+CD25+ „regulatorische“ T-Zellen, zwischen den beiden Mausstämmen vergleichbar. Um auch die Funktionalität der regulatorischen T-Zellen zu untersuchen, wurde neben den CD4 und CD25 Antikörpern auch FoxP3 verwendet. Bei FoxP3 (*forkhead box P3*) handelt es sich um ein Familienmitglied der Fox-Proteine, welches eine essentielle Rolle bei der Entwicklung und Funktionalität der regulatorischen T-Zellen spielt. Bei SLE weisen diese Zellen häufig eine relative Dysfunktionalität auf. Die Milzen der beiden Mausstämme zeigten allerdings keinen signifikanten Unterschied in der Anzahl dieser Zellen. Jedoch schien es so, als hätten die B6lpr Mäuse tendenziell mehr CD4+CD25+FoxP3+ Zellen (Abb. 19D). Aus diesen Untersuchungen der Zellpopulationen der Milz konnte gefolgert werden, dass PTX3 selektiv die Vermehrung von CD4-CD8- doppelnegativen T-Zellen in B6lpr Mäusen unterdrückt und hierbei aber keinen Einfluss auf im Blut zirkulierende proinflammatorische Zytokine wie IL-12 hat.

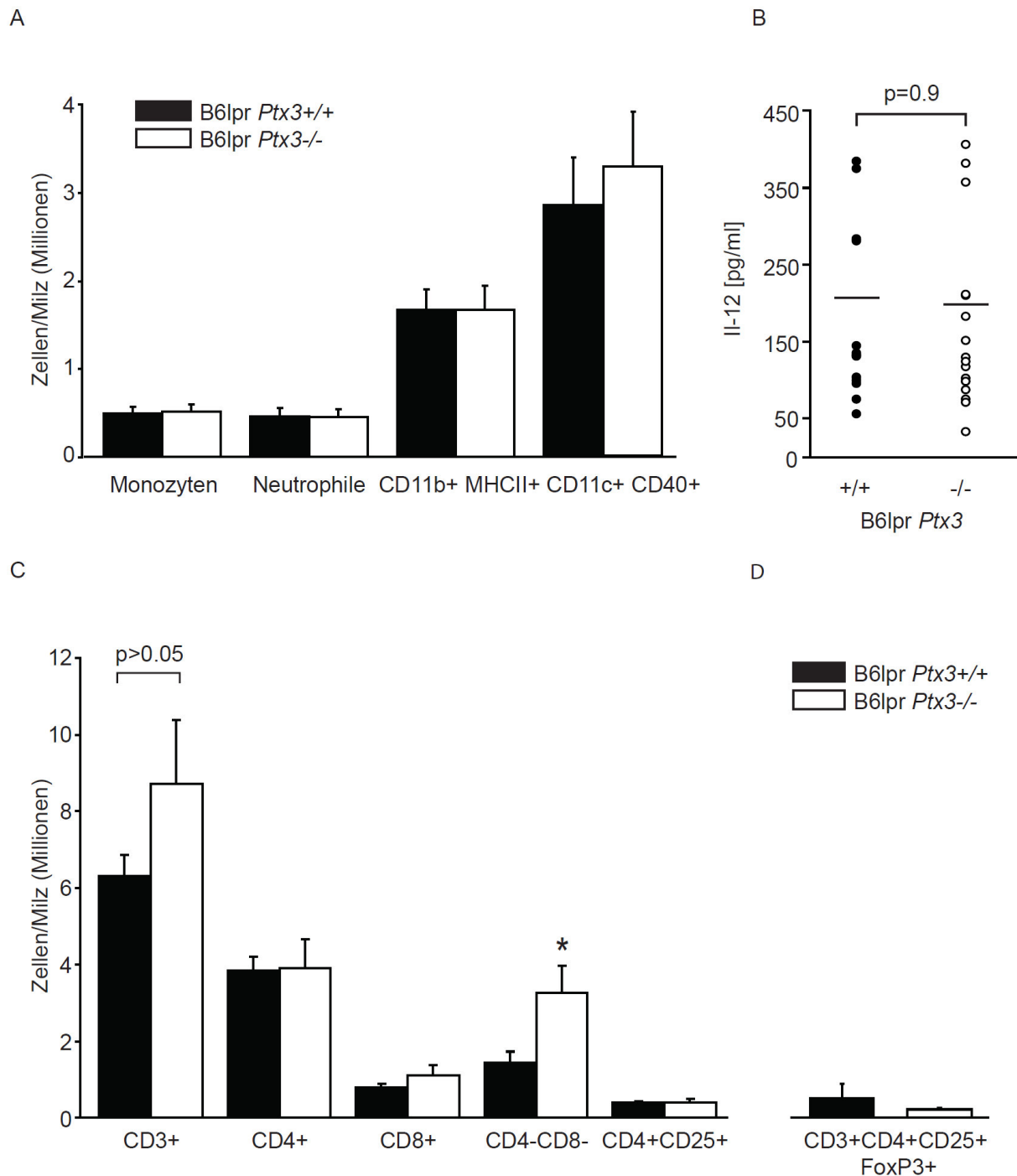


Abbildung 19: PTX3 Mangel beeinflusst die T-Zellpopulationen in B6lpr Mäusen

A: Monozyten, Neutrophile, CD11b+ und CD11c+ Zellen aus der Milz von B6lpr *Ptx3*^{-/-} und B6lpr Mäusen wurden mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Weiterhin wurde die Expression der Oberflächenmarker MHCII und CD40 als Indikator für den Aktivitätsgrad der dendritischen Zellen verwendet. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 10 Mäusen pro Gruppe.

B: Plasmaspiegel von IL-12p40 wurde bei 6 Monate alten Mäusen beider Genotypen mittels ELISA evaluiert und Daten mittels *dot blot* dargestellt.

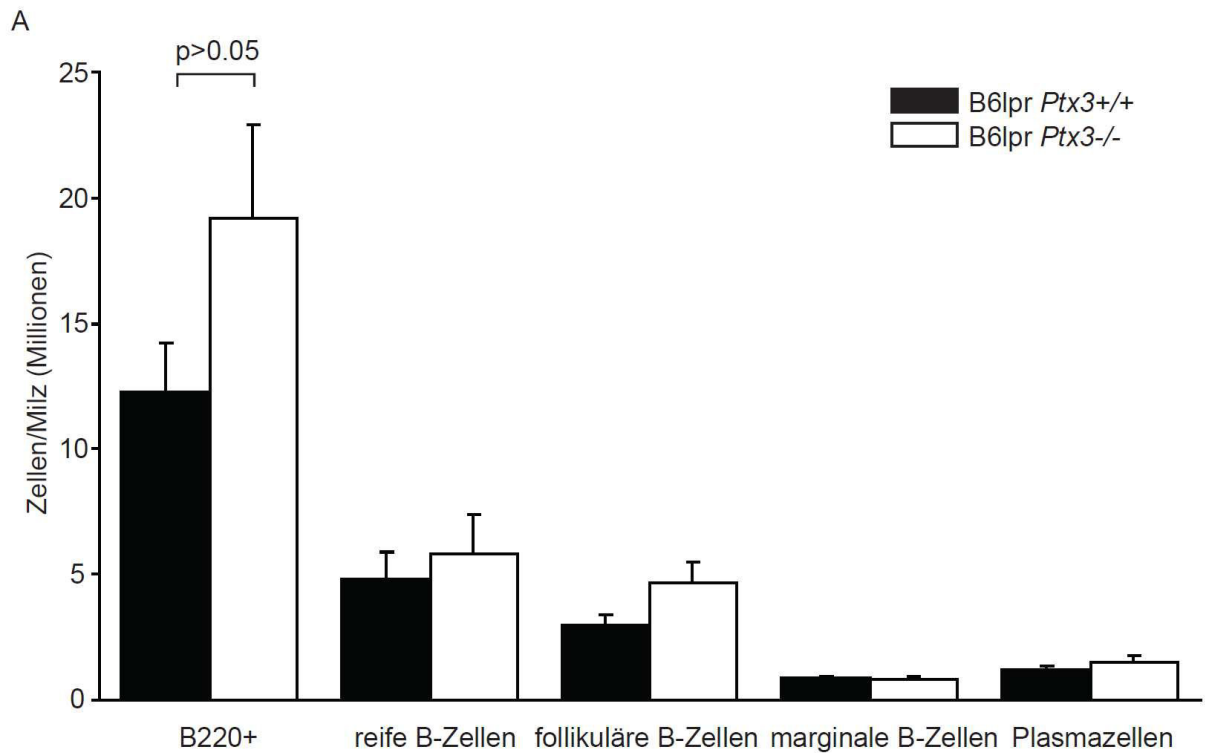
C: Die Zusammensetzung der verschiedenen T-Zellsubpopulationen der Milz beider Genotypen wurde mittels FACS im Alter von 6 Monaten analysiert.

D: Zur Überprüfung der Funktionalität zusätzliche Analyse der CD3+CD4+CD25+ Zellen mit FoxP3 mittels FACS. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von 8-14 Mäusen pro Gruppe.

3.6 PTX3 reguliert weder die B-Zell-Expansion noch die Autoantikörper-Produktion in B6lpr Mäusen

Homozygote B6lpr Mäuse leiden unter einem autoimmunen Phänotyp aufgrund einer einzelnen Mutation in einem „Lupus“-Risikogen (*lpr*). Diese Genmutation bewirkt eine verminderte Fas-induzierte Apoptose, die das Vorliegen von autoreaktiven B- und T-Zellen zur Folge hat [114]. Typisch für B6lpr Mäuse ist die späte Ausbildung antinukleärer Antikörper, die unter anderem deshalb eine geringfügigere Glomerulonephritis ausbilden. Um die B-Zellpopulation sowie vorhandene Autoantikörpern in den beiden Mausstämmen zu vergleichen, wurden unter anderem Analysen der Milz mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Diese zeigten keinerlei Unterschiede in der Anzahl der ausgereiften B-Zellen, der folliculären B-Zellen, der B-Zellen der Marginalzone sowie den Plasmazellen zwischen den B6lpr *Ptx3*^{-/-} und den B6lpr Mäusen (Abb. 20A). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Beobachtung, dass die IgM⁺ Plasmazell-Areale in der Milz beider Genotypen eine vergleichbare Größe hatten (Abb. 20B).

In Übereinstimmung mit diesen Erkenntnissen zeigten die beiden Mausstämme ein vergleichbares Ausmaß an Hypergammaglobulinämie. Die Hypergammaglobulinämie tritt im Zuge des autoimmunen Geschehens aufgrund einer Expansion der IgG-Antikörper auf, welche sich beispielsweise in der Vermehrung der γ -Fraktion bei der Plasmaelektrophorese demarkiert (Abb. 21A). Die Abwesenheit von PTX3 hatte nur einen geringen Effekt auf den dsDNA Autoantikörperspiegel gemessen am IgG_{Gesamt}, IgG₁, IgG_{2/a} und IgG₃. So waren lediglich die IgG_{2/a} sowie die IgG₃ Fraktion in den *Ptx3* *knockout*-Mäusen signifikant erniedrigt. Die Spezifität der dsDNA- Autoantikörper wurde mittels des *Crithidia luciliae*-Immunofluoreszenztest bestätigt. Verdünnte Seren von B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen zeigten eine vergleichbare Anbindung an die doppelsträngige DNA des Flagellatenkinetoplasten zu den verdünnten Seren der B6lpr Mäusen. Weiterhin zeigte das Fehlen von PTX3 in *Ptx3* *knockout*-Mäusen keinen Effekt auf die Plasmaspiegel von anti-Smith IgG-, anti-U1snRNP IgG- und antinukleosom IgG-Antikörper sowie auf den Rheumafaktor im Vergleich zu den B6lpr Mäusen (Abb.21B). Zudem zeigten *Ptx3*-defiziente Wildtyp B6 Mäuse bis in das Alter von 12 Monaten keine Anzeichen einer spontanen Autoimmunität (siehe auch 3.5), wie das Vorliegen von Autoantikörper gegen ANA, dsDNA oder RF. Folglich ist PTX3 nicht notwendig für die Expansion von B- und Plasma-Zellen. Auch wird der überwiegende Anteil der verschiedenen Autoantikörperproduktionen bei Autoimmunerkrankungen nicht ausschlaggebend durch PTX3 beeinflusst.



B

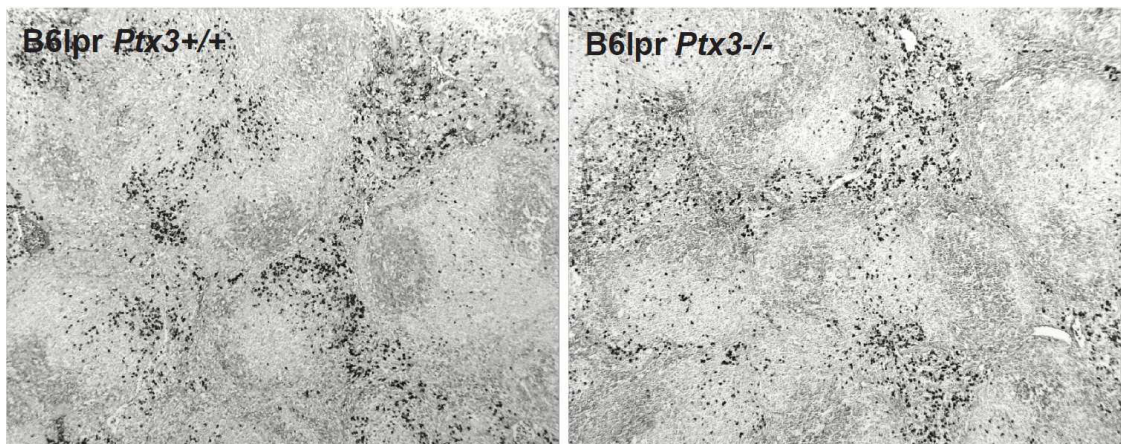


Abbildung 20: PTX3 und B-Zelltypen in der Milz von B6lpr und B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen

A: Durchflusszytometrie wurde verwendet um die Gesamtzahl verschiedener B-Zellsubpopulationen in der Milz 6 Monate alter B6lpr und B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäuse zu bestimmen. Die Grafik zeigt Daten von Mittelwerten \pm SEM von 8-14 Mäusen pro Gruppe.

B: Die Milzen derselben Mäuse wurden zur Detektion von IgM angefärbt um Plasmazellareale identifizieren zu können. Bei den Histologieschnitten handelt es sich um repräsentative 100x vergrößerte Ausschnitte für mind. 6 Mäusen pro Gruppe.

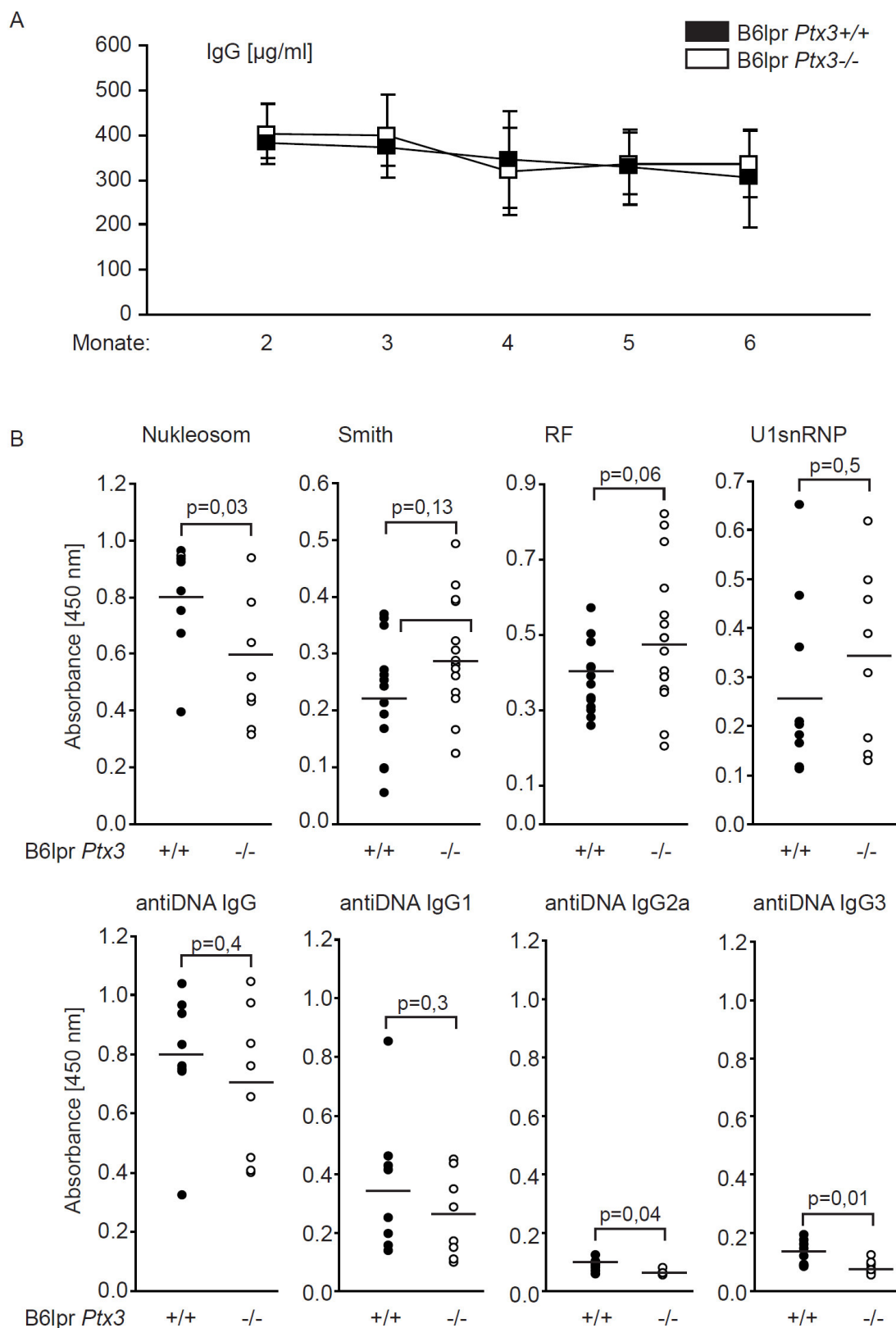


Abbildung 21: PTX3 und die humorale Immunantwort in Lupus in B6lpr und B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen

A: B6lpr und *Ptx3*^{-/-}-B6lpr Mäusen wurde monatlich Blut abgenommen um den Plasmaspiegel von IgG-Antikörpern bestimmen zu können. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 12 Mäusen pro Zeitpunkt und Gruppe.

B: dsDNA Autoantikörper und verschiedene weitere Lupusautoantikörper wurden mittels ELISA aus Blutproben von 6 Monate alten Mäusen bestimmt und Daten als *dot blot* präsentiert. Signifikant unterschiedlich zwischen den beiden Genotypen waren die antiDNA IgG_{2a} sowie die IgG₃ Autoantikörper. Daten zeigen Maus-Seren von mindestens 6 Mäusen pro Gruppe.

3.7 PTX3 unterdrückt das Ausmaß der autoimmunen Lungen-, nicht aber der Nierenschädigung in B6lpr Mäusen

Systemischer Lupus erythematoses geht mit einer mild bis schwer verlaufenden Gewebeschädigung einher [1]. B6lpr Mäuse entwickeln keine stark ausgeprägte, autoimmunbedingte Gewebeschädigung. Allerdings weisen diese Tiere im Alter von 6 Monaten eine Glomerulonephritis auf [114]. Histologische Analysen der Lungen 6 Monate alter B6lpr *Ptx3*^{-/-} zeigten in der PAS Färbung eine signifikant stärkere Lungenschädigung im Vergleich zu den B6lpr Mäusen (Abb. 22A und 23). Besonders auffällig hierbei waren die stark ausgeprägten peribronchialen und perivaskulären Infiltrate. Um diese Lungenschädigung sowie die Infiltrate des Lungengewebes in den *Ptx3* *knockout*-Mäusen näher zu charakterisieren wurden Spezialfärbungen für CD3⁺ T-Zellen, Mac2⁺ Makrophagen und neutrophile Granulozyten angefertigt (Abb. 23). In diesen Schnitten zeigten sich in Übereinstimmung zu der stärker ausgeprägten Schädigung eine signifikant erhöhte Anzahl aller 3 Zellpopulationen, welche in den histologisch gesunden Lungen der B6lpr Mäusen nicht zu beobachten waren (Abb. 22B).

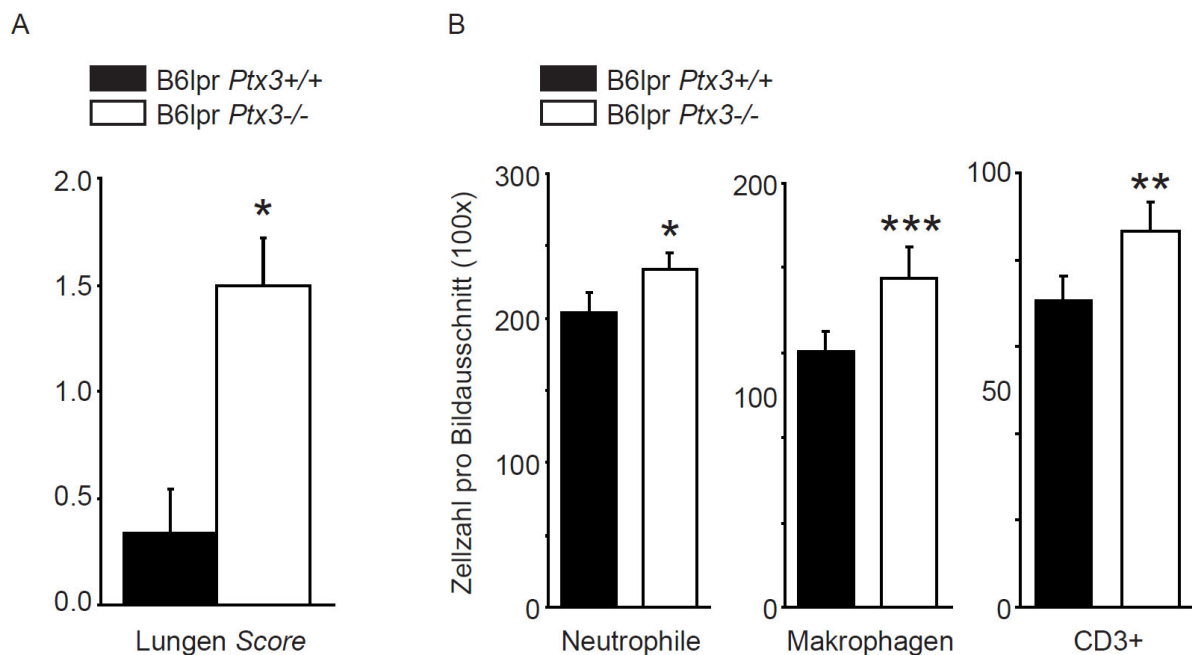


Abbildung 22: Quantitative Auswertung der Lungenschädigung in den beiden Mausstämmen

A: Die PAS Schnitte der Lunge wurden nach Schweregrad 0-4, je nach Ausmaß der peribronchialen und interstitiellen Inflammation, wie unter 2.2.3.2 beschrieben, bewertet. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8-12 Mäusen pro Gruppe.

B: Quantitative Auswertung der positiv angefärbten CD3⁺ Lymphozyten, Mac-2 Makrophagen und neutrophilen Granulozyten. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von mindestens 8-12 Mäusen pro Gruppe, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ gegenüber B6lpr Mäusen.

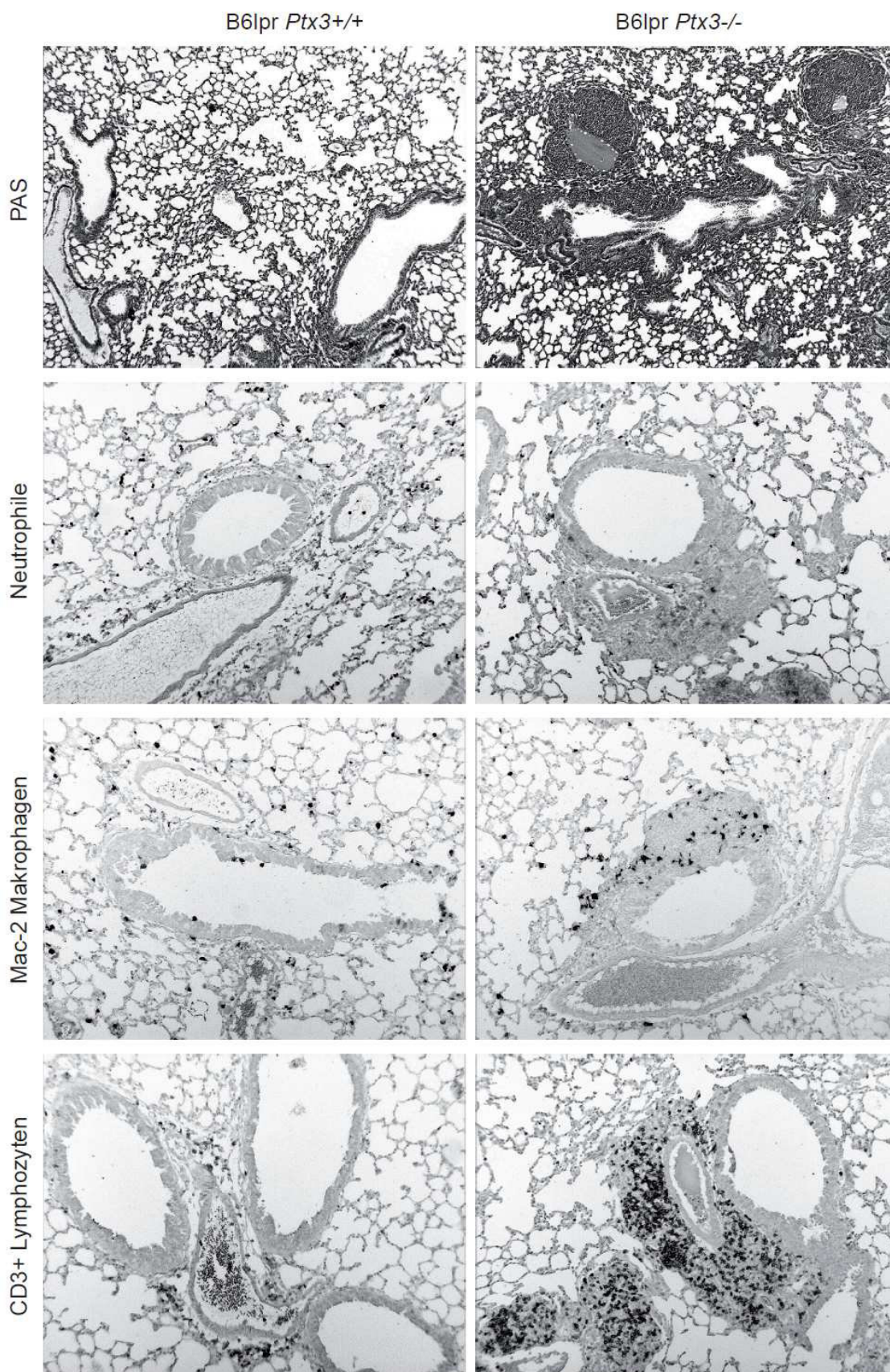


Abbildung 23: Lungenschädigung in B6lpr und B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen

Lungenschnitte wurden mit PAS sowie mit spezifischen Antikörper für Makrophagen, Neutrophile oder T-Lymphozyten angefärbt. Bildausschnitt ist 100x bzw. 200x vergrößert und repräsentativ für mindestens 12 Mäuse pro Gruppe.

Da PTX3 über die Interaktion mit P-Selectin die Einwanderung von Leukozyten in die Lunge hemmt [112], wurde die mRNA Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selectin, E-Selectin, L-Selectin, PECAM sowie des Chemokins IP10 und des Chemokinrezeptor Cxcr3 in den Lungen beider Mausstämmen verglichen. Die Abwesenheit von PTX3 war assoziiert mit einer erhöhten mRNA Expression von P-Selectin und E-Selectin, aber einer gleichbleibenden Expression von L-Selectin, PECAM, IP10 und CXCR3 in den Lungen 6 Monate alter B6lpr Mäuse (Abb. 24A). In Übereinstimmung zu den mRNA Daten war auch die Proteinexpression von P-Selectin in den Lungen der *Ptx3 knockout*-Mäuse sowohl in der histologischen Anfärbung (Abb. 24B) als auch in den *Western blot* Analysen erhöht (Abb. 24C).

Um die Organ-spezifische Wirkungsweise von PTX3 weiter zu charakterisieren wurde primär die Nierenhistologie beider Mausstämmen untersucht. Hierbei zeigten sich weder in der PAS noch in der Komplement-C9-Färbung signifikante Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen (Abb. 25A/B). Auch die Funktionalität der Nieren, gemessen am Serum Albumin/Kreatinin-Quotienten, unterschied sich nicht zwischen den beiden Genotypen (Abb. 25C). Zudem konnte beobachtet werden, dass die mRNA Expression von P- und E-Selectin zwischen den B6lpr und den B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen, welche sich in der Lunge signifikant unterschied, nicht relevant verändert hatte (Abb. 25D). Um eine mögliche verstärkte Infiltration der Niere der *Ptx3*-defizienten Mäusen durch Leukozyten auszuschließen, wurden die Nieren zudem noch immunhistologisch auf neutrophile Granulozyten, Makrophagen sowie CD3⁺ T-Lymphozyten angefärbt. Doch auch hier konnte die in der Lunge verstärkt beobachtete Infiltration in das Gewebe durch den PTX3-Mangel nicht festgestellt werden (Abb. 26).

Abschließend lässt sich aus diesen Observationen schlussfolgern, dass das PTX3 Protein B6lpr Mäuse vor autoimmun bedingter Lungenschädigung, aber nicht vor der Lupus-bedingten Nephritis schützt.

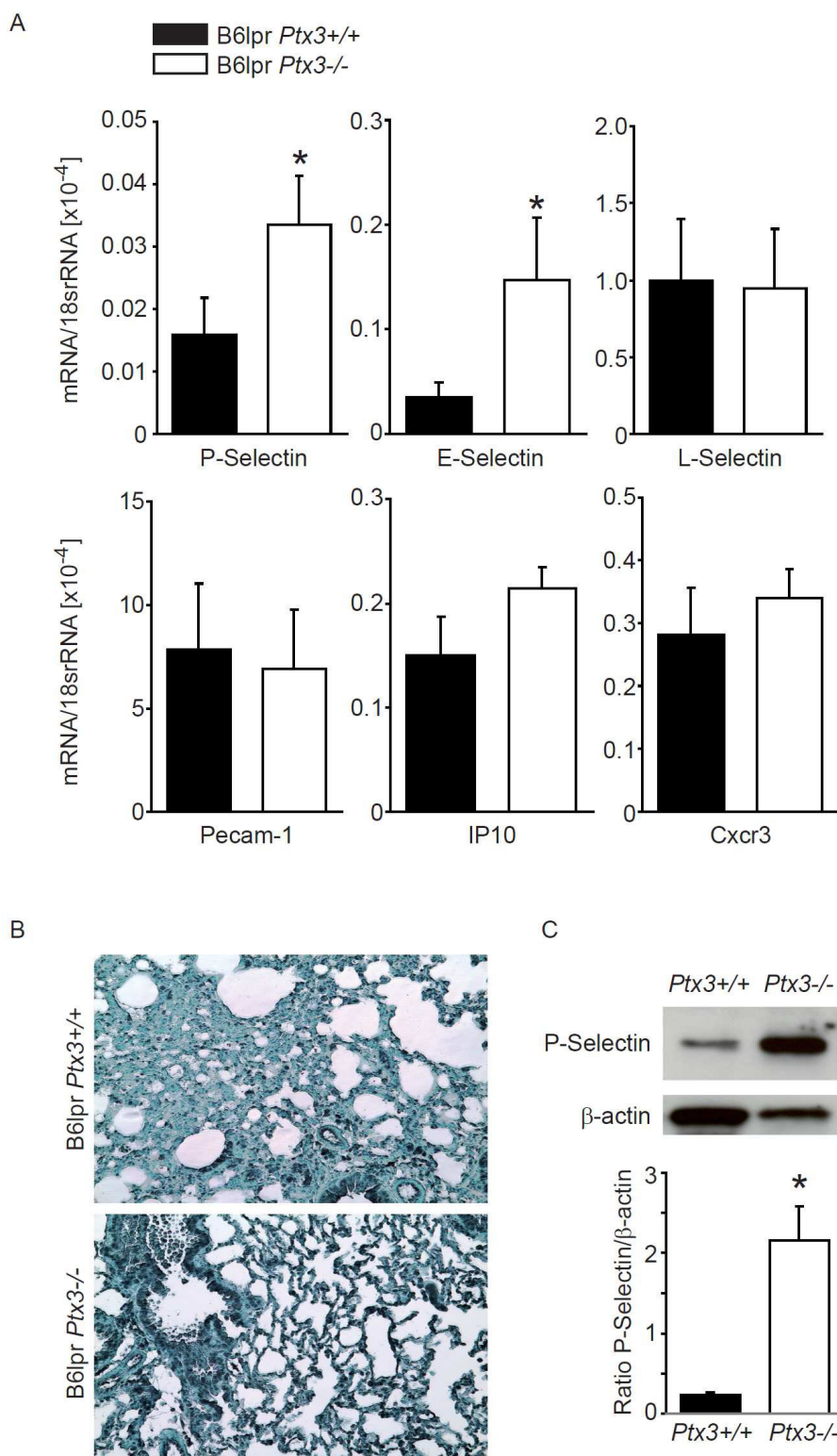


Abbildung 24: Genexpression in den geschädigten Lungen der B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäuse

A: RNA wurde aus den Lungen 6 Monate alter B6lpr und B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäuse gewonnen und eine RT-PCR durchgeführt. Daten stellen Mittelwerte von mindestens 5 Mäusen aus dem Verhältnis der spezifischen mRNA gegenüber der 18S rRNA \pm SEM dar. * $p < 0,05$ gegenüber den B6lpr Mäusen.

B: Die Lungenschnitte wurden mittels Antikörper gegen Selectin-P angefärbt. Bildausschnitte sind 100x vergrößert und repräsentativ für mindestens 12 Mäuse pro Gruppe.

C: Proteinproben wurden aus den Lungen 6 Monate alter B6lpr *Ptx3*^{-/-} und B6lpr Mäusen gewonnen. Selectin-P Western Blot stellt die quantitative (20 μ g Proteinladung pro well) Proteinexpression von Selectin-P in der Lunge dar. Das Histogramm zeigt das Verhältnis der Selectin-P Expression zur Expression der β -actin Kontrolle.

Daten repräsentieren Mittelwerte \pm SEM von drei voneinander unabhängigen Experimenten.

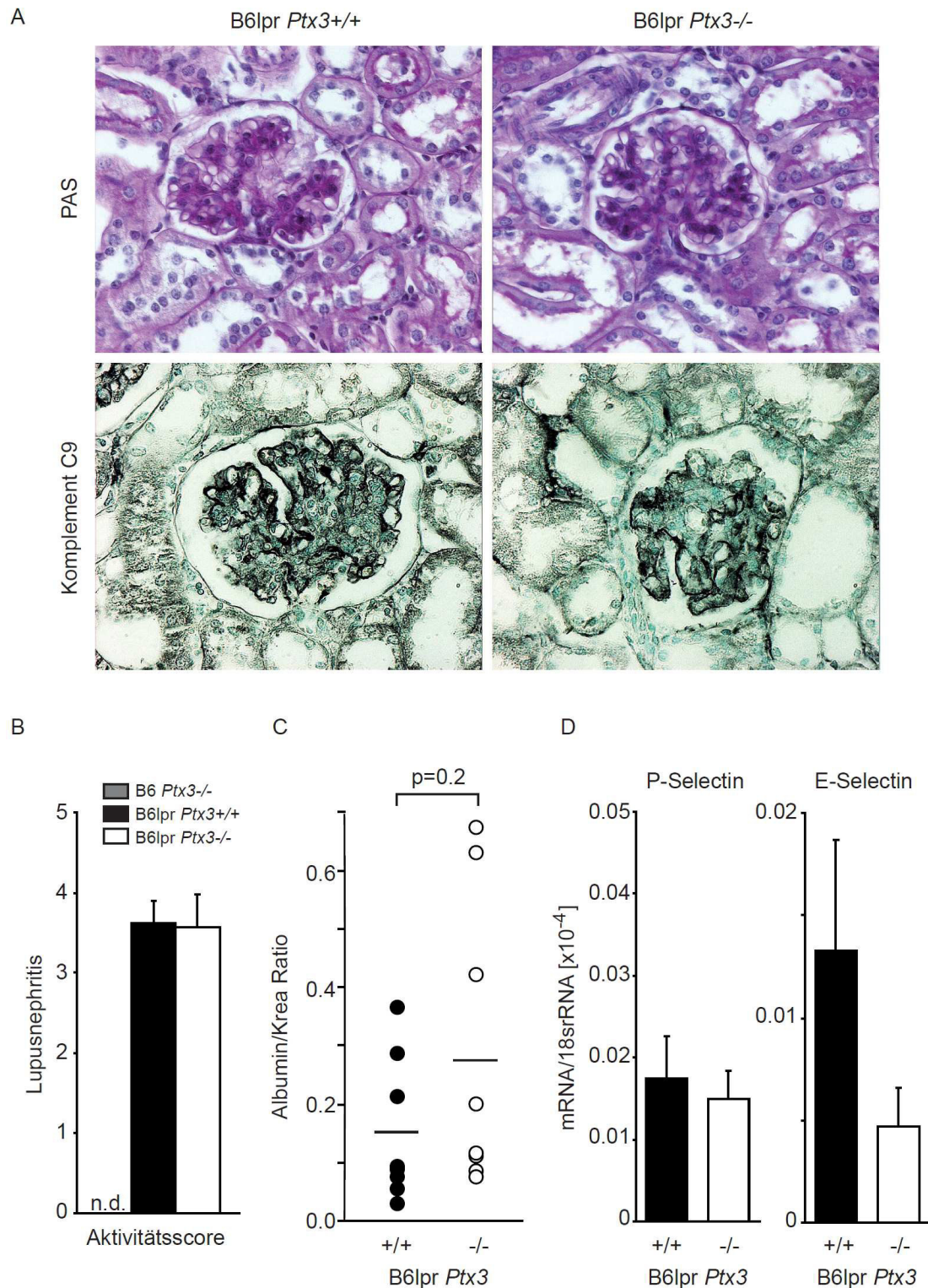


Abbildung 25: PTX3 und Lupusnephritis in B6lpr Mäusen

A: Nierenschnitte wurden mit PAS und Komplement C9 Färbung angefärbt. Bildausschnitt ist 400x vergrößert und repräsentativ für mindestens 12 bzw. 5 Mäuse pro Gruppe.

B: Die einzelnen Nierenschnitte wurden mit Hilfe des Lupusaktivitätsindex (0-24) bewertet und zusammengefasst, wie in den Methoden unter (2.2.3.2) beschrieben. Daten repräsentieren Mittelwerte ± SEM von mindestens 8-12 Mäusen pro Gruppe.

C: Das Verhältnis der Albumin-/Kreatinin-Konzentrationen wurde im Alter von 6 Monate aus dem Urin der beiden Mausstämmen als funktioneller Marker für den glomerulären Schaden bestimmt. Die Albuminkonzentration wurde mittels ELISA, die Kreatininkonzentration colorimetrisch bestimmt.

D: Die renale P- und E-Selectin mRNA-Expression wurde mittels RT-PCR bestimmt. Daten stellen Mittelwerte von 12 Mäusen je Gruppe aus dem Verhältnis der spezifischen mRNA gegen die der 18S rRNA ± SEM dar.

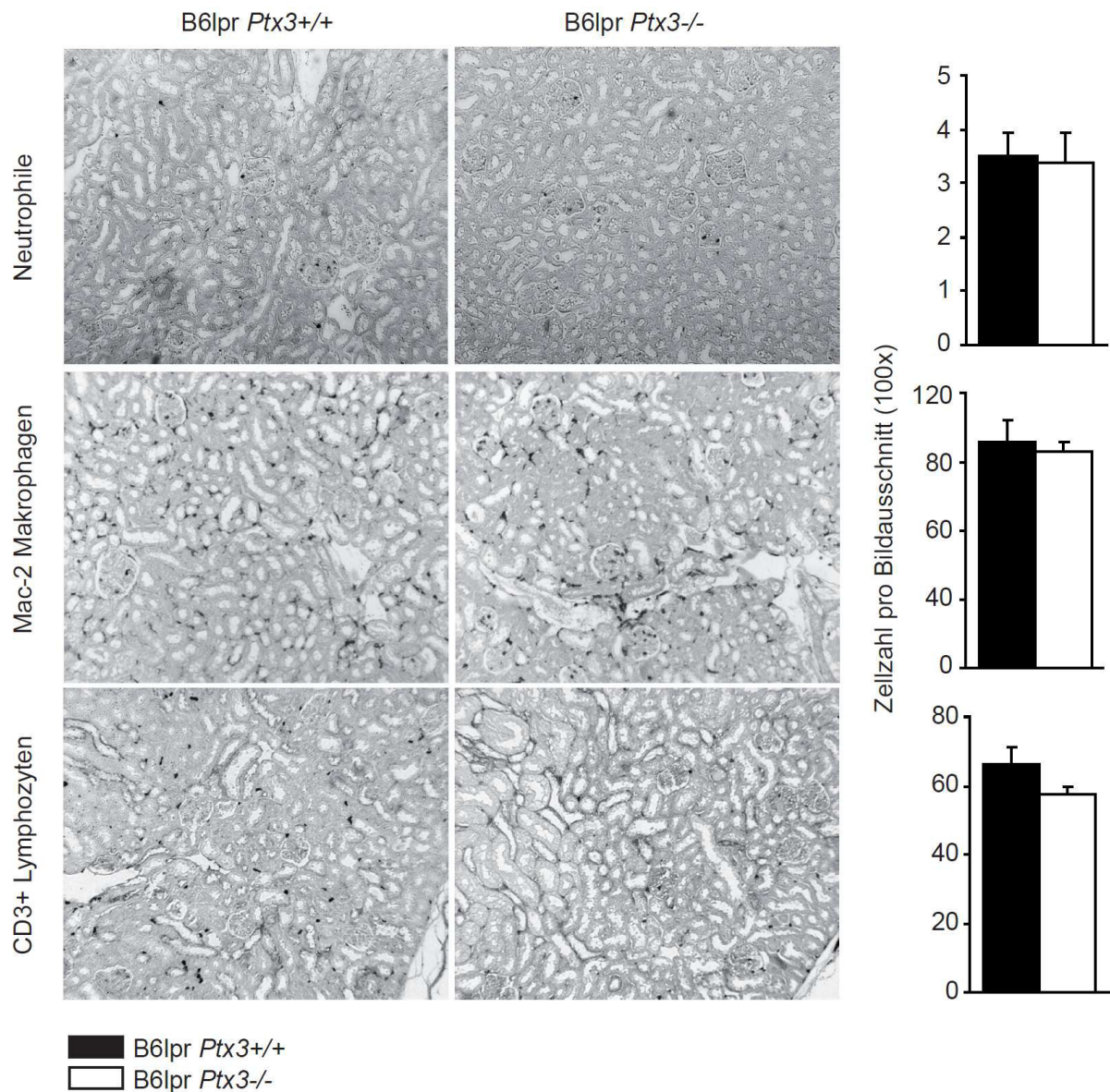


Abbildung 26: Immunhistologische Färbung der Nieren der B6lpr und B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäuse

Nierenschnitte wurden auf neutrophile Granulozyten, Mac-2 Makrophagen und CD3+ T-Lymphozyten gefärbt und bei 100x Vergrößerung quantitativ ausgezählt. Daten stellen Mittelwerte ± SEM von mindestens 12 Mäusen pro Gruppe dar.

Kapitel 4

Diskussion

4 Diskussion

Das lange Pentraxin PTX3 wird im Gegensatz zu den durch die Leber produzierten systemischen kurzen Pentraxinen (CRP und SAP) lokal nach Stimulation mit inflammatorischen Stimuli in verschiedenen Geweben durch eine Vielzahl von Zelltypen produziert. PTX3 hat, ähnlich wie die kurzen Pentraxine, als Akut-Phase-Protein zahlreiche regulatorische Funktionen im angeborenen Immunsystem. So moduliert es die Opsonierung von Pathogenen sowie von abgestorbenen Zellen, aktiviert und moduliert das Komplementsystem und beeinflusst die Rekrutierung von Leukozyten in entzündetes Gewebe. Das Fehlen der kurzen Pentraxine kann durch die dann eingeschränkte *Clearance* apoptotischer Zellen und der dadurch stattfindenden Exposition des Immunsystems mit nukleären Antigenen zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung, wie dem systemischen Lupus erythematodes, führen [7, 8]. PTX3 beeinflusst aber ebenfalls die Phagozytose von apoptotischen Zellmaterial. Da all diese Funktionen eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen und der dadurch resultierenden Gewebeschädigung spielen [127], wurde vermutet, dass PTX3 die systemische Autoimmunität entscheidend beeinflusst. Entweder unterdrückt PTX3 eine Autoimmunität über eine verbesserte *Clearance* apoptotischer Zellen oder PTX3 fördert die Entstehung einer Autoimmunität aufgrund seiner proinflammatorischen Wirkungen.

Um diese Annahme zu überprüfen wurden *Ptx3 knockout*-Mäuse in den genetischen Hintergrund der B6lpr Mäuse eingekreuzt. Diese leiden unter einer Autoimmunerkrankung, die mit dem humanen SLE vergleichbar ist.

Die gewonnenen Daten zeigen, dass die Entstehung des SLE weitestgehend unabhängig von PTX3 ist, aber das Ausmaß der autoimmunen Lungenschädigung entscheidend von dem langen PTX3 bestimmt wird.

4.1 Die Bedeutung der Apoptose in der Pathogenese

Das Akut-Phase Protein PTX3 wird lokal vor allem durch Leukozyten unter inflammatorischen Umständen produziert. PTX3 hat zum einen proinflammatorische Funktionen, u.a. durch die Aktivierung des Komplementsystems, zum anderen hat PTX3 auch zahlreiche Immunsystem modulierende und limitierende Funktionen. So interagiert PTX3 mit dem Komplementfaktor C1q und beeinflusst so die Phagozytose apoptotischer Zellen je nach Umgebungsmilieu [97]. Drei Studien zeigten übereinstimmend, dass gelöstes PTX3 die Kapazität kultivierter Makrophagen und dendritischer Zellen zur Phagozytose apoptotischer Zellen schmälert. Durch diese Beobachtung schlossen die Autoren auf einen konträren Effekt des langen Pentraxins PTX3 bei der Opsonierung toter Zellen im Vergleich zu den kurzen Pentraxinen, welche die Opsonierung und dadurch die Entfernung jener Zellen beschleunigen [104, 128, 129]. Eine neuere Studie beschrieb einen gegenteiligen Effekt von membrangebundenem PTX3 an apoptotischen neutrophilen Zellen. Hiernach sei PTX3 eine Art „eat me“ Signal, welches die phagozytotische Entfernung toter Zellen durch Makrophagen beschleunige [100] und hierdurch einen vergleichbaren Effekt wie die kurzen Pentraxine habe.

Um diesen Sachverhalt zu klären wurde ein in vivo Phagozytose Assay in *Ptx3*-defizienten und Wildtyp-Mäusen durchgeführt. Die Ergebnisse, in dem durchgeführten Versuch stimmen mit der Annahme der neueren Studie überein und zeigten das PTX3 eine rasche *Clearance* apoptotischer T-Zellen durch peritoneale Makrophagen fördert.

Die multifaktorielle Genese des SLE erschwert eine Identifikation der einzelnen exakt zugrunde liegenden Pathomechanismen. Bekannt ist allerdings, dass das vermehrte Anfallen von abgestorbenen Körperzellen oder die gestörte Entfernung dieser Zelltrümer einen wichtigen Anteil an der Krankheitsentstehung haben. Falls keine ausreichende Clearance stattfindet oder die Apoptosemechanismen gestört sind kommt es zu einer vermehrten Phagozytose dieser Zelltrümer durch Antigen-Präsentierende Zellen (APC). Diese APC wiederum schütten proinflammatorische Zytokine aus und initiieren hierdurch eine Entzündungsreaktion. Ein Beispiel für diesen Pathomechanismus ist unter anderem der homozygote Mangel des Komplementfaktors C1q. Durch den Wegfall der opsonierenden Wirkung von C1q kommt es zu einer verschlechterten Clearance apoptotischer Zellen und in 90% der Fälle dadurch zur Ausbildung eines SLE [5, 6]. Auch das Fehlen der kurzen Pentraxine CRP und SAP kann durch eine eingeschränkte Clearance apoptotischer Zellen zur

Ausprägung einer Autoimmunerkrankung wie dem systemischen Lupus erythematoses führen [7, 8]. Neben diesen extrazellulären Faktoren einer raschen Entfernung abgestorbener Körperzellen ist auch die Degradation von anfallender DNA von entscheidender Bedeutung um die Entstehung autoimmuner Erkrankungen zu verhindern. Eine Schlüsselrolle kommt hier den DNasen zu. DNase II, welche sich in den Lysosomen von Phagozyten befindet ist für die Verdauung der aufgenommenen DNA verantwortlich. Fehlt dieses Enzym oder ist es defekt, kommt es zu einer Akkumulation von Einschlusskörperchen mit unverdauter DNA in den Phagozyten der betroffenen Mäuse [130]. Kommt es nun zusätzlich zu einer verminderten Aktivität weiterer intrazellulärer DNasen, dann zeigen die Mäuse einen vermehrten Spiegel proinflammatorischer Zytokine sowie eine gestörte Thymusentwicklung [131]. Noch deutlicher wird die entscheidende Rolle der Degradation der DNA im Fall der DNase I. Die DNase I liegt im Serum vor und ist essentiell für die Entfernung von anfallender DNA im Blutkreislauf. DNase I-defiziente Mäuse zeigen einen Lupus-ähnlichen Phänotyp mit Glomerulonephritis sowie antinukleären Antikörpern auf [126]. Diese Erkenntnisse zeigen, dass Störungen in der Apoptose der Zellen als auch in deren effektiven Entfernung und Verdauung zur Entstehung von Autoimmunerkrankungen führen kann und daher eine richtige Balance zwischen proapoptotischen und antiapoptotischen Mechanismen essentiell für die Homöostase des Körpers ist [132].

Folglich liegt der Verdacht nahe, dass es durch das Fehlen von PTX3, ähnlich wie bei den kurzen Pentraxinen, über eine verschlechterte Clearance apoptotischer Zellen zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung kommen kann.

Allerdings zeigten die beobachteten *Ptx3*-defizienten B6 Mäuse keinerlei Anzeichen einer spontanen Autoimmunität. Weder die Überlebenskurve, das Körpergewicht noch die Haut zeigten Auffälligkeiten im Vergleich zu den B6 Tieren. Auch eine Beurteilung der Größe und des Gewichts der Lymphknoten sowie der Milzen beider Mausstämme zeigte keinen Phänotyp. Da PTX3 neben seinen Funktionen in der Inflammation und dem angeborenen Immunsystem auch für die extrazelluläre Matrixorganisation essentiell ist, waren homozygote *Ptx3 knockout*-Weibchen aufgrund der gestörten Cumulusmatrixorganisation in Übereinstimmung mit der Literatur unfruchtbar [108]. Daher wurden heterozygote Weibchen mit homozygoten Männchen verpaart um homozygote *Ptx3*^{-/-} Mäuse zu generieren. Das alleinige Fehlen von PTX3 scheint somit nicht ausreichend für die Ausbildung einer Autoimmunerkrankung zu sein.

Um die Bedingungen zu untersuchen, die eine vermehrte Produktion von PTX3 induzieren, wurden in-vitro Stimulationsexperimente mit TLR-Agonisten an gewonnenen Splenozyten

durchgeführt. Mehrere Studien zeigten, dass TLR-*signaling*, vor allem TLR7 und -9 eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des SLE spielt. Durch die Aktivierung der TLR kommt es zu einer vermehrten Interferonproduktion sowie einem vermehrtem Vorliegen von proinflammatorischen Zytokinen, die die Entwicklung eines SLE beschleunigen. So führt eine Überexpression von TLR7, der durch einzelsträngige RNA aktiviert wird, zu einer Lupus-ähnlichen Autoimmunerkrankungen in Mäusen [133, 134]. Die Rolle von TLR9, der durch DNA aktiviert wird, in der Pathogenese des SLE erscheint komplexer im Vergleich zu TLR7. Eine Überexpression von TLR9 wirkt über das vermehrte Vorliegen proinflammatorischer Zytokine ebenfalls krankheitsfördernd [73]. Überraschenderweise wurde die *Ptx3*-m-RNA nicht, beziehungsweise kaum vermehrt exprimiert nach Exposition mit Antigenen wie Imiquimod als TLR7 und CpG-DNA als TLR9 Agonist. Vielmehr führte die Exposition der Splenozyten mit LPS, dem Bestandteil der bakteriellen Zellmembran, zu einer vermehrten *Ptx3* m-RNA Expression. Folglich scheinen die beim Phagozytose assay beobachteten erhöhten PTX3-Spiegel in der Peritoneallavage vor allem durch das Vorliegen der apoptotischen Zellen bedingt zu sein und nicht durch das TLR-*signaling*. Somit wird PTX3 durch das Vorliegen von apoptotischen Zellen vermehrt exprimiert und limitiert über eine verbesserte Clearance apoptotischer Zellen die Ingestion der Zelltrümer durch Antigen-präsentierenden Zellen und damit verbunden auch eine Entzündungsreaktion.

4.2 Die Rolle von PTX3 im Krankheitsverlauf

Um den genauen Einfluss von PTX3 bei der Entstehung von SLE zu überprüfen wurde die Entscheidung getroffen, die Expression von PTX3 im Krankheitsverlauf in den einzelnen Organen sowie im Blut zu untersuchen. Hierfür wurden B6lpr Mäuse verwendet, die aufgrund einer gestörten Apoptose, bedingt durch eine Mutation in dem Fas/CD95/Apo-1 Rezeptor, ein mildes genetisch bedingtes Autoimmunsyndrom, welches dem Verlauf des SLE ähnelt, entwickeln [113].

Die erhobenen Daten zeigen, dass die Expression von PTX3 mRNA in den Organen 6 Wochen alter B6lpr Mäuse vor allem im Knochenmark stattfand. Zudem zeigten typischerweise durch SLE betroffene Organe wie die Niere und die Lunge sowie die Milz und die Lymphknoten der Mäuse Organ-spezifisch große Unterschiede. Während die mRNA vermehrt in der Lunge, Milz und im Herz exprimiert war, zeigten die Nieren und auch die

Harnblase eine sehr geringe Expression. Die Proteinexpression nahm im Zeitverlauf in der Milz und Niere ab, obwohl die systemische Autoimmunität zunahm. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit dem sinkenden PTX3 Plasmaspiegel während des Krankheitsverlaufes. Interessanterweise nahm die PTX3 Protein Expression in der Lunge im Krankheitsverlauf zu. Diese Daten suggerieren, dass eine lokale Produktion in den einzelnen Organen für das Vorliegen von PTX3 entscheidend ist. Aufgrund dieser Erkenntnisse liegt der Schluss nahe, dass PTX3 nicht nur die Pathogenese des SLE beeinflusst sondern auch Organ-spezifische pathogenetische Wirkungen hat.

In den genetischen Hintergrund der B6lpr Mäuse wurden *Ptx3 knockout*-Tiere eingekreuzt. Der B6lpr Hintergrund wurde ausgewählt, da andere gut untersuchte Mausstämmen, welche einen spontanen Lupus entwickeln, wie die *New Zealand Black/White hybrid* Stämme, der MRLlpr Stamm sowie der BXSB Stamm einen stärkeren Phänotyp entwickeln als B6lpr Mäuse und die Vermutung bestand, dass es in den *Ptx3*^{-/-}-B6lpr Mäusen aufgrund der verschlechterten Clearance apoptotischer Zellen zu einem aggravierten SLE kommt. Überraschenderweise wiesen die Überlebenskurve und das Körpergewicht der B6lpr *Ptx3*^{-/-} und der B6lpr Kontrollmäuse keine Unterschiede auf. Auch entwickelten die B6lpr *Ptx3*^{-/-} Tiere keine Hautauffälligkeiten, welche bei aggraviertem SLE gehäuft auftreten. Allerdings zeigten diese Mäuse eine vermehrte Lymphoproliferation gemessen am Gewicht und der Größe der Lymphknoten sowie der Milz. Der Anteil der apoptotischen und nekrotischen Zellen in der Milz blieb trotz der verschlechterten Clearance apoptotischer Zellen zwischen beiden Genotypen unverändert. Somit scheint die Milzvergrößerung nicht durch diesen Mechanismus erklärbar zu sein. Die Tatsache, dass weiterhin sowohl die Überlebenskurve als auch die Haut keine Auffälligkeiten in den B6lpr *Ptx3*^{-/-} Mäusen zeigte, spricht für einen eher geringen Einfluss von PTX3 auf die systemische Autoimmunität.

Die *lpr*-Mutation induziert Autoimmunität durch eine Verhinderung der Fas-vermittelten Apoptose unreifer und potentiell autoreaktiver T-Lymphozyten [114]. Als Folge hiervon kommt es zu einer Akkumulation von CD4 und CD8 negativen T-Lymphozyten, welche vermehrt über eine sekundäre Nekrose zugrunde gehen. Durch diese sekundäre Nekrose wird die Exposition der Phagozyten und Antigen-präsentierenden Zellen mit potentiellen Lupusautoantigenen erhöht, was pathognomonisch für die Ausbildung einer autoimmunen Erkrankung ist [114, 135]. In deren Folge kommt es durch diese Zellen zu einer vermehrten Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine, die eine durch T-Zellen vermittelte autoreaktive B-Zell-Expansion mit einer Autoantikörperproduktion gegen körpereigene Strukturen wie beispielsweise doppelsträngige DNA bewirken [136, 137].

Die gewonnenen Daten belegen eindeutig, dass das Fehlen von PTX3 mit einer zusätzlichen Expansion der CD4/CD8 negativen T-Lymphozytenpopulation in B6lpr Mäusen einhergeht. Über welche Mechanismen PTX3 Einfluss auf die CD4 und CD8 negative Zellpopulation nimmt ist weniger klar. Wie bereits oben erwähnt ist der Einfluss von PTX3 auf die Kapazität der Phagozytose apoptotischer Zellen durch Makrophagen und dendritischen Zellen bisher in der Literatur widersprüchlich beschrieben [100, 104, 128, 129]. Der durchgeführte in-vivo Phagozytose assay zeigte, dass das Fehlen von PTX3 mit einer verminderten Clearance apoptotischer Zellen einhergeht. Dadurch könnte die rasche Entfernung toten Zellmaterials ein entscheidender Beitrag bei der Vorenthaltung von Autoantigenen gegenüber dendritischen Zellen sein und dadurch eine Aktivierung autoreaktiver T-Zellen vermeiden. Vice versa könnte eine verminderte *Clearance* apoptotischer Zellen durch Makrophagen, bedingt durch das Fehlen von PTX3, eine Erklärung für die Expansion der CD4/8 negativen T-Lymphozyten in dieser Studie sein. Erwähnenswert ist, dass die Anzahl von CD4/8 negativen Zellen oder ihr Verhältnis zu CD4/CD25/FoxP3 regulatorischen T-Zellen als stellvertretender Indikator für autoimmune Prozesse im experimentalen Lupus dienen [138, 139]. Neben der T-Zellpopulation ist für den SLE vor allem die erhöhte Menge typischer Autoantikörper, die die Plasmazellen produzieren, kennzeichnend. Allerdings zeigten die B-Zell-Populationen der Milz keine relevanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen auf. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis war auch das Ausmaß der Hypergammaglobulinämie sowie das Vorliegen der einzelnen Autoantikörpern in den beiden Genotypen vergleichbar. Auch weitere Leukozytenpopulationen wie die neutrophilen Granulozyten, Monozyten und dendritische Zellen zeigten keinen Unterschied zwischen den beiden Mausstämmen auf. Folglich fand in dieser Studie eine isolierte Expansion der CD4/8 doppelnegativen T-Zellen statt ohne die typisch vermehrte Expression von Lupus Autoantikörpern. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, dass PTX3 nur einen geringen Einfluss auf die systemische Autoimmunität hat.

4.3 Die Bedeutung von PTX3 bei der Organ-spezifischen Gewebe-Schädigung

Typisch für Autoimmunerkrankungen wie dem SLE ist ein systemischer Befall von Bindegewebe und Blutgefäßen durch die Ablagerung von Immunkomplexen. Dadurch entwickelt sich eine Entzündung des Gewebes mit den klinischen Entzündungszeichen und langfristig kommt zu einer Zerstörung mit Funktionsverlust [1]. Neben dem Vorliegen unspezifischer Entzündungszeichen und einer Lymphoproliferation kommt es im Rahmen eines SLE auch zu dem typischen Vorliegen verschiedener Autoantikörper, welche durch ihre Ablagerungen den Organismus schädigen. Das Wissen um die Organ-spezifischen Pathomechanismen des systemischen Lupus erythematoses ist bisher limitiert und diese sind nicht ausreichend erforscht.

Daher wurde das Ausmaß der Organ-spezifischen Schädigung der Niere, da die Niere ein typischerweise vom SLE betroffenes Organ ist, und der Lunge, aufgrund der beobachteten zunehmenden PTX3 Proteinexpression in den B6lpr *Ptx3*^{-/-} und B6lpr Mäusen, untersucht. Interstitielle oder alveoläre Lungenerkrankungen sind ein eher seltenes Krankheitsbild bei Menschen. Typischerweise können solche Erkrankungen durch die Inhalation toxischer Noxen (Stäube, Chemikalien), im Rahmen von Systemerkrankungen (Kollagenosen, Vaskulitiden und Sarkoidose) sowie als Rarität bei verschiedenen Krankheitsbildern mit nicht vollständiger geklärter Genese (u.a. Alveolarproteinose, Microlithiasis alveolaris pulmonum) auftreten [140, 141]. Eine Lungenschädigung liegt normalerweise in 6 Monate alten B6lpr Mäusen nicht vor. Bei MRLlpr Mäusen hingegen, welche im Vergleich zu B6lpr Mäusen stärker unter autoimmuner Gewebeschädigung leiden, sind diese Lungenschädigungen im Alter von 6 Monaten typischerweise bereits ausgeprägt und auch bekannt [118]. Nierenerkrankungen bei Mäusen mit Autoimmunerkrankungen und humanen Lupus-Patienten entstehen hauptsächlich durch Immunkomplex-Erkrankungen und sind abhängig von der Komplementaktivierung und Makrophagen-Rekrutierung in den Glomerula [142]. Im Gegensatz hierzu konnten andere Arbeitsgruppen zeigen, dass die Lungenerkrankung in MRLlpr Mäusen vor allem über eine Rekrutierung von CXCR3 positiven T-Zellen, eine Sekretion von CXCL10 [143], der endothelialen Selectinexpression [144], sowie dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) [145], vermittelt ist. Des Weiteren scheint TNF- α , ein entscheidender Mediator in der Lungenschädigung im experimentalen Lupus darzustellen [146, 147]. Weiterhin unterscheidet sich der Pathomechanismus der

autoimmunen Lungen- und Nierenschädigung durch das zuvor erwähnte ICAM-1. Bei ICAM-1 handelt es sich um ein interzelluläres transmembranöses Adhäsionsmolekül, welches auch als CD54 bekannt ist, und auf Endothelzellen als auch auf Leukozyten dauerhaft in geringer Konzentration exprimiert wird. Nach Kontakt mit proinflammatorischen Zytokinen, wie Interleukin-1 oder TNF- α , kommt es zu einer vermehrten Expression von ICAM-1, welches die Migration von Leukozyten aus der Zirkulation ins Gewebe vermittelt. Ein Defizit von ICAM-1, oder das Vorhandensein von TNF- α -Antagonisten schützt MRLlpr Mäuse vor Lungen-, nicht aber vor Nierenschädigung im Rahmen ihrer Lupus-Erkrankung [145, 147]. Ein weiterer Unterschied in der Organ-spezifischen Pathogenese besteht darin, dass Selectin-P nur im Lungengewebe, nicht aber im Nierengewebe, nach Stimulation mit LPS [144] oder, wie durch die hier vorliegenden Ergebnisse gezeigt, durch SLE, induziert wird. Diese letztgenannte Erkenntnis ist von besonderem Interesse, da PTX3 vor kurzem als endogener P-Selectin Inhibitor identifiziert worden ist. Durch die Hemmung des Selectin-P durch PTX3 kommt es zu einer verminderten Leukozyteninfiltration in die Lunge [148]. Daher wurde die Mutmaßung aufgestellt, dass die Organ-spezifische Schädigung, hervorgerufen durch den SLE in *Ptx3*-defizienten B6lpr Mäusen, aufgrund des Wegfalls des hemmenden Einflusses von PTX3 auf die Selectin-P vermittelte Leukozyteninfiltration, stärker ausgeprägt ist.

Überraschenderweise beeinflusste das Fehlen von PTX3 die systemische Autoimmunität in B6lpr Mäusen nur marginal. Vielmehr bestand der Unterschied im Vorhandensein von PTX3 besonders auf Organ-spezifischer Ebene. Der Mangel von PTX3 in *Ptx3*-defizienten Mäusen, zeigte vor allem eine beschleunigte Entstehung der autoimmunen Lungenschädigungen, obgleich nicht in der Niere. Dies deckt sich mit der Vermutung, dass in der Lunge die Gewebeschädigung vor allem durch den Wegfall des hemmenden Einflusses von PTX3 auf die Selectin-P vermittelte Leukozyteninfiltration bedingt ist, während die Nierenschädigung meist durch die, hier nicht vermehrten, Immunkomplexe bedingt ist. Die peribronchialen und perivaskulären Lymphozyteninfiltrate, welche in B6lpr *Ptx3*^{-/-} entdeckt werden konnten, waren vergleichbar mit denen in MRLlpr Mäusen sowie in B6lpr Mäusen mit akzelerierten Lupus [149].

4.4 Schlussfolgerung, Limitationen und Ausblick

Zusammenfassend kann also festhalten werden, dass das lange Pentraxin PTX3 notwendig für die Unterdrückung einer Lungenschädigung im Rahmen einer systemischen Autoimmunität ist. Ursache hierfür ist am ehesten die Hemmung von Selectin-P durch PTX3. Durch die Interaktion zwischen PTX3 und Selectin-P wird dessen Anbindung an P-Selectin-Glykoprotein-1 (PSG-1), welches sich auf der Oberfläche von Leukozyten befindet, verhindert [148]. Hierdurch kommt es unter inflammatorischen Umständen zu einer geringeren Leukozyteninfiltration in der Anwesenheit von PTX3 an den Ort des Geschehens. Somit stellt PTX3 einen negativen Rückkopplungsmechanismus bei Entzündungen dar, da dieses Akut-Phase-Protein vermehrt unter inflammatorischen Umständen produziert wird, aber gleichzeitig eine weitere Inflammation durch die Infiltration von Leukozyten limitiert. Dieser Prozess ist Organ-spezifisch, da das Fehlen von PTX3 keinen Einfluss auf die Ausprägung der Schädigung weiterer Organe, wie der Lupusnephritis, in B6lpr Mäusen hatte. Zudem hatte das Fehlen von PTX3 keinen Einfluss auf das Vorliegen und die Höhe der systemischen Autoantikörper.

Weiterhin ist PTX3 essentiell für die rasche und effektive *Clearance* von apoptotischen Zelltrümmern durch Makrophagen. Hierdurch verhindert PTX3 eine Ingestion der Trümmer durch Antigen-präsentierende dendritische Zellen in deren Folge es zu Präsentation von Autoantigenen kommt. Somit hemmt PTX3 die Expansion der CD4 und CD8 doppelnegativen „autoreaktiven“ T-Lymphozyten. Diese Resultate ergänzen vorherige Erkenntnisse, welche bereits Organ-spezifische Pathomechanismen bei der Entstehung und Ausprägung der einzelnen Organmanifestationen beim systemischen Lupus erythematoses dokumentierten.

Ob und wie genau diese Daten von PTX3 im Kontext des SLE auch auf den Menschen übertragbar sind bleibt abzuwarten. Zudem muss berücksichtigt werden, dass es für den systemischen Lupus erythematoses nicht einen einzelnen Gendefekt gibt der in allen Patienten vorliegt und ursächlich für das Krankheitsgeschehen ist. Vielmehr gibt es eine Vielzahl verschiedener möglicher Gendefekte die einen systemischen Lupus in ihrer Kombination bedingen können. In dieser Arbeit wurde mit einem monogenetischen Auslöser für ein Lupusmodell in Mäusen gearbeitet. Auch war die Dauer der Beobachtung der Versuchstiere auf 6 Monate limitiert was weitere Langzeiteffekte eventuell maskieren könnte.

Zusätzlich wäre es nun interessant noch zu untersuchen, ob eine *loss-of-function* Mutation des *Ptx3*-Gens auch ein genetischer Risikofaktor für die pulmonale Beteiligung beim systemischen Lupus erythematoses beim Menschen darstellt. Sollte dies der Fall sein, könnte die Lungenschädigung und -symptomatik in Lupus-Patienten durch eine Gabe von rekombinantem PTX3 oder anderen PTX3-Agonisten vermutlich spezifisch, bei geringen Nebenwirkungen, verbessert werden.

Kapitel 5

Zusammenfassung

5 Zusammenfassung

Der SLE ist eine Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen, in deren Verlauf es durch einen Toleranzverlust zu einer fälschlichen Antwort des Immunsystems auf körpereigene Strukturen kommt. Das lange Pentraxin PTX3 ist ein inflammatorisches Akut-Phase-Protein und hat zahlreiche Funktionen im angeborenen Immunsystem. Um den Einfluss von PTX3 auf den SLE zu untersuchen, wurden B6lpr Mäuse verwendet, welche unter einem mit dem SLE vergleichbaren milden Autoimmunsyndrom leiden. In diese Mäuse wurde eine *Ptx3*-Defizienz eingekreuzt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass PTX3 die systemische Autoimmunität entscheidend beeinflusst: Entweder führt PTX3 zu einer Aggravation der Klinik durch seine proinflammatorische Wirkung oder PTX3 hemmt die Krankheitsintensität über seine Steigerung der Phagozytose sowie die Hemmung der Selectin-P vermittelten Leukozyteninfiltration.

Überraschenderweise beeinflusste das Fehlen von PTX3 die systemische Autoimmunität in B6lpr Mäusen kaum. So waren die Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen sowie die Autoantikörper zwischen beiden Genotypen kaum verändert. Lediglich die Anzahl an „autoreaktiven“ CD4 und CD8 doppelnegativen T-Lymphozyten war in den *Ptx3*-defizienten B6lpr Mäusen signifikant erhöht. Es konnte gezeigt werden, dass PTX3 eine rasche Clearance apoptotischer T-Zellen intraperitoneal fördert und dass dies einen entscheidenden Beitrag für den Verlust der Immuntoleranz darstellen könnte. Umgekehrt könnte der Anstieg der „autoreaktiven“ T-Zellen durch die verschlechterte Clearance apoptotischer Zellen bedingt sein. Der Mangel an PTX3 zeigte auf Organ-spezifischer Ebene eine entscheidende Rolle bei der Ausprägung des SLE. Während die Lupusnephritis in den Mäusen unverändert blieb zeigte sich eine signifikant verstärkte Lungenschädigung in den *Ptx3 knockout*-Tieren. Ursächlich hierfür könnte die Anbindung von PTX3 an Selectin-P sein, durch die eine über dieses Adhäsionsmolekül vermittelte Leukozyteninfiltration an den Ort der Entzündung limitiert wird. Somit stellt PTX3 ein negativer Rückkopplungsmechanismus bei Entzündungen dar, da PTX3 vermehrt bei Inflammation gebildet wird, gleichzeitig aber die Leukozytenrekrutierung limitiert und somit das Ausmaß der entzündlich infiltrativ bedingten Lungenschädigung eindämmt. Defekte des *Ptx3*-Gens könnten ein genetischer Risikofaktor für die SLE bedingte Ausprägung von Lungenschädigungen des Menschen darstellen und so eine Behandlung mit rekombinanten PTX3 oder anderen PTX3-Agonisten eine mögliche spezifische Behandlungsstrategie darstellen.

Kapitel 6
Literaturverzeichnis

6 Literaturverzeichnis

1. Rahman, A. and D.A. Isenberg, *Systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2008. **358**(9): p. 929-39.
2. Johnson, A.E., et al., *The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth*. Arthritis Rheum, 1995. **38**(4): p. 551-8.
3. Herold, *Innere Medizin*. 2009: Gerd Herold.
4. Cervera, R., et al., *Morbidity and mortality in systemic lupus erythematosus during a 10-year period: a comparison of early and late manifestations in a cohort of 1,000 patients*. Medicine (Baltimore), 2003. **82**(5): p. 299-308.
5. Manderson, A.P., M. Botto, and M.J. Walport, *The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus*. Annu Rev Immunol, 2004. **22**: p. 431-56.
6. Walport, M.J., *Complement and systemic lupus erythematosus*. Arthritis Res, 2002. **4 Suppl 3**: p. S279-93.
7. Bickerstaff, M.C., et al., *Serum amyloid P component controls chromatin degradation and prevents antinuclear autoimmunity*. Nat Med, 1999. **5**(6): p. 694-7.
8. Russell, A.I., et al., *Polymorphism at the C-reactive protein locus influences gene expression and predisposes to systemic lupus erythematosus*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(1): p. 137-47.
9. Goldberg, M.A., et al., *Histocompatibility antigens in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1976. **19**(2): p. 129-32.
10. Graham, R.R., et al., *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. **15**(8): p. 823-30.
11. Hom, G., et al., *Association of systemic lupus erythematosus with C8orf13-BLK and ITGAM-ITGAX*. N Engl J Med, 2008. **358**(9): p. 900-9.
12. Remmers, E.F., et al., *STAT4 and the risk of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2007. **357**(10): p. 977-86.
13. Sigurdsson, S., et al., *Polymorphisms in the tyrosine kinase 2 and interferon regulatory factor 5 genes are associated with systemic lupus erythematosus*. Am J Hum Genet, 2005. **76**(3): p. 528-37.
14. Banchereau, J. and V. Pascual, *Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases*. Immunity, 2006. **25**(3): p. 383-92.
15. Mason, *The pathogenesis of systemic lupus erythematosus*, in *Oxford textbook of clinical nephrology*, C. Davidson, Grunfeld, Editor. 2005, Oxford University Press. p. 809-29.
16. James, J.A., et al., *An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus*. J Clin Invest, 1997. **100**(12): p. 3019-26.
17. Gladman, D., *Prognosis, mortality and morbidity in systemic lupus erythematosus*, in *Dubois' lupus erythematosus*. , H.B. Wallace DJ, Editor. 2007, Lippincott Williams&Wilkins.
18. Grimaldi, C.M., et al., *Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection*. Mol Immunol, 2005. **42**(7): p. 811-20.
19. Buyon, J.P., et al., *The effect of combined estrogen and progesterone hormone replacement therapy on disease activity in systemic lupus erythematosus: a randomized trial*. Ann Intern Med, 2005. **142**(12 Pt 1): p. 953-62.

20. Petri, M., et al., *Combined oral contraceptives in women with systemic lupus erythematosus*. N Engl J Med, 2005. **353**(24): p. 2550-8.
21. Stevens, A.M., et al., *Maternal HLA class II compatibility in men with systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(9): p. 2768-73.
22. Fauci, A.S.K., Dennis L.; Longo, Dan L.; Braunwald, Eugene; Hauser, Stephen L.; Jameson, J. Larry; Loscalzo, Joseph, *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 2008, McGraw-Hill.
23. Wallace, D., *The clinical presentation of SLE*, in *Dubois`lupus erythematosus*. , H.B. Wallace DJ, Editor. 2007, Lippincott Williams&Wilkins.
24. Kim, J., et al., *Combined expression of miR-122a, miR-1, and miR-200b can differentiate degraded RNA samples from liver, pancreas, and stomach*. Pathol Int, 2011. **61**(2): p. 67-72.
25. Voss, A., et al., *Serum amyloid P component-DNA complexes are decreased in systemic lupus erythematosus. inverse association with anti-dsDNA antibodies*. J Rheumatol, 2008. **35**(4): p. 625-30.
26. Becker, G.J., et al., *Value of serum C-reactive protein measurement in the investigation of fever in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis, 1980. **39**(1): p. 50-2.
27. Shoenfeld, Y., et al., *Autoantibodies against protective molecules--CIq, C-reactive protein, serum amyloid P, mannose-binding lectin, and apolipoprotein A1: prevalence in systemic lupus erythematosus*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1108**: p. 227-39.
28. Enocsson, H., et al., *Interferon-alpha mediates suppression of C-reactive protein: explanation for muted C-reactive protein response in lupus flares?* Arthritis Rheum, 2009. **60**(12): p. 3755-60.
29. Luchetti, M.M., et al., *Expression and production of the long pentraxin PTX3 in rheumatoid arthritis (RA)*. Clin Exp Immunol, 2000. **119**(1): p. 196-202.
30. Bevelacqua, V., et al., *Long pentraxin 3: a marker of inflammation in untreated psoriatic patients*. Int J Mol Med, 2006. **18**(3): p. 415-23.
31. Fazzini, F., et al., *PTX3 in small-vessel vasculitides: an independent indicator of disease activity produced at sites of inflammation*. Arthritis Rheum, 2001. **44**(12): p. 2841-50.
32. Shimada, Y., et al., *Pentraxin 3 is associated with disease activity but not atherosclerosis in patients with systemic lupus erythematosus*. Mod Rheumatol, 2013.
33. Bassi, N., et al., *IgG anti-pentraxin 3 antibodies in systemic lupus erythematosus*. Ann Rheum Dis. **69**(9): p. 1704-10.
34. Tan, E.M., et al., *The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1982. **25**(11): p. 1271-7.
35. Hochberg, M.C., *Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 1997. **40**(9): p. 1725.
36. Braunwald, E.F., Athony; Hauser, Kenneth; Jameson, J.; Kasper, Dennis; Longo, Dan, *Harrison's Manual of Medicine*. 2001, McGraw-Hill.
37. Kulkarni, O., et al., *Anti-Ccl2 Spiegelmer permits 75% dose reduction of cyclophosphamide to control diffuse proliferative lupus nephritis and pneumonitis in MRL-Fas(lpr) mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **328**(2): p. 371-7.
38. Chambers, S.A. and D. Isenberg, *Anti-B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases*. Lupus, 2005. **14**(3): p. 210-4.
39. Leandro, M.J., et al., *An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus*. Arthritis Rheum, 2002. **46**(10): p. 2673-7.
40. Weidenbusch, M., et al., *Beyond the LUNAR trial. Efficacy of rituximab in refractory lupus nephritis*. Nephrol Dial Transplant, 2013. **28**(1): p. 106-11.

41. Rovin, B.H., et al., *Efficacy and safety of rituximab in patients with active proliferative lupus nephritis: the Lupus Nephritis Assessment with Rituximab study*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(4): p. 1215-26.
42. Merrill, J.T., et al., *Efficacy and safety of rituximab in moderately-to-severely active systemic lupus erythematosus: the randomized, double-blind, phase II/III systemic lupus erythematosus evaluation of rituximab trial*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(1): p. 222-33.
43. Merrell, M. and L.E. Shulman, *Determination of prognosis in chronic disease, illustrated by systemic lupus erythematosus*. J Chronic Dis, 1955. **1**(1): p. 12-32.
44. Abu-Shakra, M., et al., *Mortality studies in systemic lupus erythematosus. Results from a single center. II. Predictor variables for mortality*. J Rheumatol, 1995. **22**(7): p. 1265-70.
45. Murphy, K., Travers, P., Walport, M., *Janeway Immunologie*. 7th ed. 2009: Spektrum.
46. Akira, S., K. Takeda, and T. Kaisho, *Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity*. Nat Immunol, 2001. **2**(8): p. 675-80.
47. Kawai, T. and S. Akira, *The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition*. Int Immunol, 2009. **21**(4): p. 317-37.
48. Chamaillard, M., et al., *An essential role for NOD1 in host recognition of bacterial peptidoglycan containing diaminopimelic acid*. Nat Immunol, 2003. **4**(7): p. 702-7.
49. Yoneyama, M. and T. Fujita, *Structural mechanism of RNA recognition by the RIG-I-like receptors*. Immunity, 2008. **29**(2): p. 178-81.
50. Anders, H.J., B. Banas, and D. Schlondorff, *Signaling danger: toll-like receptors and their potential roles in kidney disease*. J Am Soc Nephrol, 2004. **15**(4): p. 854-67.
51. Tillett, W.S. and T. Francis, *Serological Reactions in Pneumonia with a Non-Protein Somatic Fraction of Pneumococcus*. J Exp Med, 1930. **52**(4): p. 561-71.
52. Garlanda, C., et al., *Pentraxins at the crossroads between innate immunity, inflammation, matrix deposition, and female fertility*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 337-66.
53. Mantovani, A., et al., *Pentraxins in innate immunity: from C-reactive protein to the long pentraxin PTX3*. J Clin Immunol, 2008. **28**(1): p. 1-13.
54. Pepys, M.B. and G.M. Hirschfield, *C-reactive protein: a critical update*. J Clin Invest, 2003. **111**(12): p. 1805-12.
55. Szalai, A.J., et al., *C-reactive protein: structural biology and host defense function*. Clin Chem Lab Med, 1999. **37**(3): p. 265-70.
56. Gewurz, H., X.H. Zhang, and T.F. Lint, *Structure and function of the pentraxins*. Curr Opin Immunol, 1995. **7**(1): p. 54-64.
57. Rubio, N., et al., *Structure, expression, and evolution of guinea pig serum amyloid P component and C-reactive protein*. J Biochem, 1993. **113**(3): p. 277-84.
58. Hutchinson, W.L., E. Hohenester, and M.B. Pepys, *Human serum amyloid P component is a single uncomplexed pentamer in whole serum*. Mol Med, 2000. **6**(6): p. 482-93.
59. Hind, C.R., et al., *Human serum amyloid P component, a circulating lectin with specificity for the cyclic 4,6-pyruvate acetal of galactose. Interactions with various bacteria*. Biochem J, 1985. **225**(1): p. 107-11.
60. Noursadeghi, M., et al., *Role of serum amyloid P component in bacterial infection: protection of the host or protection of the pathogen*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(26): p. 14584-9.
61. Andersen, O., et al., *Serum amyloid P component binds to influenza A virus haemagglutinin and inhibits the virus infection in vitro*. Scand J Immunol, 1997. **46**(4): p. 331-7.

62. Tennent, G.A., L.B. Lovat, and M.B. Pepys, *Serum amyloid P component prevents proteolysis of the amyloid fibrils of Alzheimer disease and systemic amyloidosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(10): p. 4299-303.
63. Loveless, R.W., et al., *Human serum amyloid P is a multispecific adhesive protein whose ligands include 6-phosphorylated mannose and the 3-sulphated saccharides galactose, N-acetylgalactosamine and glucuronic acid*. EMBO J, 1992. **11**(3): p. 813-9.
64. Pepys, M.B. and P.J. Butler, *Serum amyloid P component is the major calcium-dependent specific DNA binding protein of the serum*. Biochem Biophys Res Commun, 1987. **148**(1): p. 308-13.
65. Nauta, A.J., et al., *Recognition and clearance of apoptotic cells: a role for complement and pentraxins*. Trends Immunol, 2003. **24**(3): p. 148-54.
66. Ying, S.C., et al., *Human serum amyloid P component oligomers bind and activate the classical complement pathway via residues 14-26 and 76-92 of the A chain collagen-like region of C1q*. J Immunol, 1993. **150**(1): p. 169-76.
67. Gershov, D., et al., *C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity*. J Exp Med, 2000. **192**(9): p. 1353-64.
68. Familian, A., et al., *Chromatin-independent binding of serum amyloid P component to apoptotic cells*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 647-54.
69. Gillmore, J.D., et al., *Autoimmunity and glomerulonephritis in mice with targeted deletion of the serum amyloid P component gene: SAP deficiency or strain combination?* Immunology, 2004. **112**(2): p. 255-64.
70. Goodman, A.R., et al., *Long pentraxins: an emerging group of proteins with diverse functions*. Cytokine Growth Factor Rev, 1996. **7**(2): p. 191-202.
71. Reid, M.S. and C.P. Blobel, *Apexin, an acrosomal pentaxin*. J Biol Chem, 1994. **269**(51): p. 32615-20.
72. Kirkpatrick, L.L., et al., *Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2*. J Biol Chem, 2000. **275**(23): p. 17786-92.
73. Park, J.K., et al., *The Role of Quantitative NPTX2 Hypermethylation as a Novel Serum Diagnostic Marker in Pancreatic Cancer*. Pancreas, 2011.
74. Yin, G.N., et al., *Neuronal pentraxin receptor in cerebrospinal fluid as a potential biomarker for neurodegenerative diseases*. Brain Res, 2009. **1265**: p. 158-70.
75. Russell, J.C., et al., *Neuronal pentraxin 1 induction in hypoxic-ischemic neuronal death is regulated via a glycogen synthase kinase-3alpha/beta dependent mechanism*. Cell Signal, 2011. **23**(4): p. 673-82.
76. Schlimgen, A.K., et al., *Neuronal pentraxin, a secreted protein with homology to acute phase proteins of the immune system*. Neuron, 1995. **14**(3): p. 519-26.
77. Alles, V.V., et al., *Inducible expression of PTX3, a new member of the pentraxin family, in human mononuclear phagocytes*. Blood, 1994. **84**(10): p. 3483-93.
78. Doni, A., et al., *Production of the soluble pattern recognition receptor PTX3 by myeloid, but not plasmacytoid, dendritic cells*. European Journal of Immunology, 2003. **33**(10): p. 2886-93.
79. Deban, L., et al., *Pentaxins: multifunctional proteins at the interface of innate immunity and inflammation*. Biofactors, 2009. **35**(2): p. 138-45.
80. Han, B., et al., *TNFalpha-induced long pentraxin PTX3 expression in human lung epithelial cells via JNK*. J Immunol, 2005. **175**(12): p. 8303-11.
81. Goodman, A.R., et al., *Differential regulation of TSG-14 expression in murine fibroblasts and peritoneal macrophages*. J Leukoc Biol, 2000. **67**(3): p. 387-95.

82. Abderrahim-Ferkoune, A., et al., *Characterization of the long pentraxin PTX3 as a TNFalpha-induced secreted protein of adipose cells*. J Lipid Res, 2003. **44**(5): p. 994-1000.
83. Klouche, M., et al., *Modified atherogenic lipoproteins induce expression of pentraxin-3 by human vascular smooth muscle cells*. Atherosclerosis, 2004. **175**(2): p. 221-8.
84. Jaillon, S., et al., *The humoral pattern recognition receptor PTX3 is stored in neutrophil granules and localizes in extracellular traps*. J Exp Med, 2007. **204**(4): p. 793-804.
85. Brinkmann, V., et al., *Neutrophil extracellular traps kill bacteria*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1532-5.
86. Daigo, K. and T. Hamakubo, *Host-protective effect of circulating pentraxin 3 (PTX3) and complex formation with neutrophil extracellular traps*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 378.
87. Breviario, F., et al., *Interleukin-1-inducible genes in endothelial cells. Cloning of a new gene related to C-reactive protein and serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1992. **267**(31): p. 22190-7.
88. Lee, T.H., et al., *Isolation and characterization of eight tumor necrosis factor-induced gene sequences from human fibroblasts*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 1982-8.
89. Inforzato, A., et al., *The long pentraxin PTX3 at the crossroads between innate immunity and tissue remodelling*. Tissue Antigens, 2011. **77**(4): p. 271-82.
90. Inforzato, A., et al., *Structural characterization of PTX3 disulfide bond network and its multimeric status in cumulus matrix organization*. J Biol Chem, 2008. **283**(15): p. 10147-61.
91. Spiro, R.G., *Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds*. Glycobiology, 2002. **12**(4): p. 43R-56R.
92. Rudd, P.M., et al., *Glycosylation and the immune system*. Science, 2001. **291**(5512): p. 2370-6.
93. Heegaard, P.M., *Changes in serum glycoprotein glycosylation during experimental inflammation in mice are general, unrelated to protein type, and opposite changes in man and rat: studies on mouse serum alpha 1-acid glycoprotein, alpha 1-esterase, and alpha 1-protease inhibitor*. Inflammation, 1992. **16**(6): p. 631-44.
94. Bottazzi, B., et al., *Multimer formation and ligand recognition by the long pentraxin PTX3. Similarities and differences with the short pentraxins C-reactive protein and serum amyloid P component*. J Biol Chem, 1997. **272**(52): p. 32817-23.
95. Inforzato, A., et al., *Structure and function of the long pentraxin PTX3 glycosidic moiety: fine-tuning of the interaction with C1q and complement activation*. Biochemistry, 2006. **45**(38): p. 11540-51.
96. Mantovani, A., et al., *The long pentraxin PTX3: a paradigm for humoral pattern recognition molecules*. Ann N Y Acad Sci, 2013. **1285**: p. 1-14.
97. Nauta, A.J., et al., *Biochemical and functional characterization of the interaction between pentraxin 3 and C1q*. European Journal of Immunology, 2003. **33**(2): p. 465-473.
98. Roumenina, L.T., et al., *Interaction of C1q with IgG1, C-reactive protein and pentraxin 3: mutational studies using recombinant globular head modules of human C1q A, B, and C chains*. Biochemistry, 2006. **45**(13): p. 4093-104.
99. Hicks, P.S., et al., *Serum amyloid P component binds to histones and activates the classical complement pathway*. J Immunol, 1992. **149**(11): p. 3689-94.
100. Jaillon, S., et al., *Endogenous PTX3 translocates at the membrane of late apoptotic human neutrophils and is involved in their engulfment by macrophages*. Cell Death Differ, 2009. **16**(3): p. 465-74.
101. Braunschweig, A. and M. Jozsi, *Human pentraxin 3 binds to the complement regulator c4b-binding protein*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23991.

102. Jarva, H., et al., *Regulation of complement activation by C-reactive protein: targeting the complement inhibitory activity of factor H by an interaction with short consensus repeat domains 7 and 8-11*. J Immunol, 1999. **163**(7): p. 3957-62.
103. Deban, L., et al., *Binding of the long pentraxin PTX3 to factor H: interacting domains and function in the regulation of complement activation*. J Immunol, 2008. **181**(12): p. 8433-40.
104. Rovere, P., et al., *The long pentraxin PTX3 binds to apoptotic cells and regulates their clearance by antigen-presenting dendritic cells*. Blood, 2000. **96**(13): p. 4300-6.
105. Camozzi, M., et al., *Identification of an antiangiogenic FGF2-binding site in the N terminus of the soluble pattern recognition receptor PTX3*. J Biol Chem, 2006. **281**(32): p. 22605-13.
106. Presta, M., et al., *Role of the soluble pattern recognition receptor PTX3 in vascular biology*. J Cell Mol Med, 2007. **11**(4): p. 723-38.
107. Rusnati, M., et al., *Selective recognition of fibroblast growth factor-2 by the long pentraxin PTX3 inhibits angiogenesis*. Blood, 2004. **104**(1): p. 92-9.
108. Salustri, A., et al., *PTX3 plays a key role in the organization of the cumulus oophorus extracellular matrix and in in vivo fertilization*. Development, 2004. **131**(7): p. 1577-86.
109. McEver, R.P., *Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 581-6.
110. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
111. Springer, T.A., *Traffic signals on endothelium for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration*. Annu Rev Physiol, 1995. **57**: p. 827-72.
112. Deban, L., et al., *Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3*. Nat Immunol, 2010. **11**(4): p. 328-34.
113. Watanabe, D., et al., *Constitutive activation of the Fas ligand gene in mouse lymphoproliferative disorders*. EMBO J, 1995. **14**(1): p. 12-8.
114. Cohen, P.L. and R.A. Eisenberg, *Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease*. Annu Rev Immunol, 1991. **9**: p. 243-69.
115. Cohen, P.L., et al., *Antigen nonspecific effect of major histocompatibility complex haplotype on autoantibody levels in systemic lupus erythematosus-prone lpr mice*. J Clin Invest, 1993. **91**(6): p. 2761-8.
116. Garlanda, C., et al., *Non-redundant role of the long pentraxin PTX3 in anti-fungal innate immune response*. Nature, 2002. **420**(6912): p. 182-6.
117. Austin, H.A., 3rd, et al., *Diffuse proliferative lupus nephritis: identification of specific pathologic features affecting renal outcome*. Kidney International, 1984. **25**(4): p. 689-95.
118. Sunderrajan, E.V., et al., *Pulmonary inflammation in autoimmune MRL/Mp-lpr/lpr mice. Histopathology and bronchoalveolar lavage evaluation*. Am J Pathol, 1986. **124**(2): p. 353-62.
119. Bustin, S.A., et al., *The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments*. Clin Chem, 2009. **55**(4): p. 611-22.
120. Zeilinger M, H.W. *Durchflusszytometrie - eine Einführung* http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflusszytometrie/lbef_durchflusszytometrie.htm.
121. Herzer, P., G. Greif, and E.M. Lemmel, *The Crithidia-Luciliae Immunofluorescence Test for Detection of Antibodies to Double-Stranded DNA*. Klinische Wochenschrift, 1982. **60**(3): p. 143-151.

122. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
123. Vermes, I., et al., *A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V*. J Immunol Methods, 1995. **184**(1): p. 39-51.
124. Munoz, L.E., et al., *The role of defective clearance of apoptotic cells in systemic autoimmunity*. Nat Rev Rheumatol, 2010. **6**(5): p. 280-9.
125. Hanayama, R., et al., *Autoimmune disease and impaired uptake of apoptotic cells in MFG-E8-deficient mice*. Science, 2004. **304**(5674): p. 1147-50.
126. Napirei, M., et al., *Features of systemic lupus erythematosus in Dnase1-deficient mice*. Nat Genet, 2000. **25**(2): p. 177-81.
127. Bottazzi, B., et al., *An Integrated View of Humoral Innate Immunity: Pentraxins as a Paradigm*. Annu Rev Immunol, 2009.
128. Baruah, P., et al., *The tissue pentraxin PTX3 limits C1q-mediated complement activation and phagocytosis of apoptotic cells by dendritic cells*. J Leukoc Biol, 2006. **80**(1): p. 87-95.
129. van Rossum, A.P., et al., *The prototypic tissue pentraxin PTX3, in contrast to the short pentraxin serum amyloid P, inhibits phagocytosis of late apoptotic neutrophils by macrophages*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(8): p. 2667-74.
130. Krieser, R.J., et al., *Deoxyribonuclease IIalpha is required during the phagocytic phase of apoptosis and its loss causes perinatal lethality*. Cell Death Differ, 2002. **9**(9): p. 956-62.
131. Yoshida, H., et al., *Lethal anemia caused by interferon-beta produced in mouse embryos carrying undigested DNA*. Nat Immunol, 2005. **6**(1): p. 49-56.
132. Martin, D.E., KB., *Apoptosis*, in *Dubois`lupus erythematosus*. , H.B. Wallace DJ, Editor. 2007, Lippincott Williams&Wilkins.
133. Plerhoples, T.A., et al., *Colloid carcinoma of the pancreas*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(5): p. 1295-8.
134. Park, J., et al., *Risk factors associated with the postoperative recurrence of intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas*. Pancreas, 2011. **40**(1): p. 46-51.
135. Kakkanaiah, V.N., et al., *Evidence for major alterations in the thymocyte subpopulations in murine models of autoimmune diseases*. J Autoimmun, 1990. **3**(3): p. 271-88.
136. Kotzin, B.L., *Systemic lupus erythematosus*. Cell, 1996. **85**(3): p. 303-6.
137. Kason, I., *The pathogenesis of systemic lupus erythematosus*, in *Oxford textbook of clinical nephrology*, C. Davidson, Grunfeld, Editor. 2005, Oxford University Press. p. 809-29.
138. Gutierrez-Ramos, J.C., et al., *Recovery from autoimmunity of MRL/lpr mice after infection with an interleukin-2/vaccinia recombinant virus*. Nature, 1990. **346**(6281): p. 271-4.
139. Singer, P.A. and A.N. Theofilopoulos, *Novel origin of lpr and gld cells and possible implications in autoimmunity*. J Autoimmun, 1990. **3**(2): p. 123-35.
140. Pschyrembel, W., *Klinisches Wörterbuch*. Vol. 258. 1997: de Gruyter.
141. Baenkler, A., Bieber, *Duale Reihe Innere Medizin*. 2009, Thieme. p. 371-397.
142. Kulkarni, O. and H.J. Anders, *Chemokines in lupus nephritis*. Front Biosci, 2008. **13**: p. 3312-20.
143. Shiozawa, F., et al., *Enhanced expression of interferon-inducible protein 10 associated with Th1 profiles of chemokine receptor in autoimmune pulmonary inflammation of MRL/lpr mice*. Arthritis Res Ther, 2004. **6**(1): p. R78-R86.
144. Harari, O.A., et al., *Limited endothelial E- and P-selectin expression in MRL/lpr lupus-prone mice*. Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(8): p. 889-95.

145. Lloyd, C.M., et al., *Intercellular adhesion molecule-1 deficiency prolongs survival and protects against the development of pulmonary inflammation during murine lupus*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 963-71.
146. Deguchi, Y. and S. Kishimoto, *Tumour necrosis factor/cachectin plays a key role in autoimmune pulmonary inflammation in lupus-prone mice*. Clin Exp Immunol, 1991. **85**(3): p. 392-5.
147. Kim, N., et al., *TNFalpha inhibition in MRL/lpr mice ameliorates pulmonary but not renal disease*. J Autoimmun, 2002. **19**(4): p. 215-22.
148. Deban, L., et al., *Regulation of leukocyte recruitment by the long pentraxin PTX3*. Nat Immunol. **11**(4): p. 328-34.
149. Lech, M., et al., *Tir8/Sigirr prevents murine lupus by suppressing the immunostimulatory effects of lupus autoantigens*. J Exp Med, 2008. **205**(8): p. 1879-88.

Kapitel 7

Abkürzungsverzeichnis

7 Abkürzungsverzeichnis

ACR	American College of Rheumatology
Abb	Abbildung
AGAMP	Apoptotic cell-associated molecular patterns
AK	Antikörper
ANA	<i>Anti-nuclear antibody</i>
Anti-dsDNA	Antikörper gegen doppelsträngige DNA
Anti-Sm	Anti-Smith-Antikörper
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> , Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
Asn	Aspargin
B6	Wildtypmaus in folgendem genetischen Hintergrund: C57Bl/6
B6lpr	C57Bl/6lpr/lpr
B6lpr <i>Ptx3</i> ^{-/-}	C57Bl/6lpr/lpr <i>Ptx3</i> ^{-/-}
Bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CAB	Capture antibody
CAM	<i>Cell adhesion molecule</i> , Zelladhäsionsmolekül
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary-Desoxyribonukleinsäure</i>
CpG-DNA	<i>CpG oligodeoxynucleotides</i>
CRP	C-reaktives Protein
CXCR	Chemokine receptor
CXCL	Chemokine ligand
Da	Dalton
DAB	Detection antibody
DCs	<i>Dendritic cells</i> , dendritische Zellen
ddH ₂ O	Zweifach-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA, DNS	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure,

dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECL	<i>Enzymatic Chemiluminescence</i> , enzymatische Chemilumineszenzreaktion
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	<i>Fibroblast-growth-factor</i> , Fibroblastenwachstumsfaktor
FoxP3	<i>Forkhead box P3</i>
HLA	Humaner Leukozytenantikörper
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> , interzelluläres Adhäsionsmolekül
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
Imi	Imiquimod
I.p.	Intraperitoneal
IP10, CXCL2	Interferon gamma induced protein 10, C-X-C motif chemokine
IRF5	<i>Interferon-response-factor 5</i>
KpOmpA	OmpA von <i>Klebsiella pneumoniae</i>
LPS	Lipopolysaccharid
lpr	lymphoproliferativ
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MBL	Mannose-bindende Lektin
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
NET	<i>Neutrophil extracellular trap</i>
NF- κ B	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NG	<i>Neutrophile Granulozyten</i>
NLR	<i>NOD-like receptor</i>
NP, NPTX1	<i>Neuronal pentraxin</i>
NP2, NPTX2	Narp
NPR, NPTXR	<i>Neuronal pentraxin receptor</i>
NSAR	Nichtsteroidales Antirheumatikum
OmpA	<i>Outer membrane protein A</i>

P3C	Pam3Cys, palmitoyl-3-Cys-ser-(Lys) ₄
PAMP	<i>Pathogen-associated-molecular-pattern</i> , Musterstruktur
PAS	Periodic Acid Schiff staining
PC	<i>Phosphocholine</i> , Phosphatidylcholin, Lecithin
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phosphatidylethanolamin
PI	<i>Propidium iodide</i> , Propidiumjodid
pI:C-RNA	Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C), synthetische doppelstrang-RNA
PPAR α	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- α
PRR	<i>Pattern-recognition-receptor</i> , Mustererkennungsmolekül
P/S	Penicillin / Streptomycin
PS	<i>Phosphatidylserine</i> , Phosphatidylserin
PSG-1	P-Selectin Glykoprotein-1
PTX3	Pentraxin-3, <i>TNF-inducible gene 14 protein</i>
RF	Rheumafaktor
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene I</i>
Rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real-time PCR</i>
RTq-PCR	<i>Real-time quantitative PCR</i>
SAP	Serum Amyloid Protein
SEM	<i>Standard error of the mean</i> , Standardfehler
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
SPRR	<i>Soluble pattern-recognition-receptors</i> , lösliches Mustererkennungsmolekül
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMB	Tetramethylbenzidin
TLR	<i>Toll-like Receptor</i> , Toll-ähnliche Rezeptoren
TNF- α	Tumornekrosefaktor
TSG	<i>TNF-stimulated gene</i> , <i>TNF-inducible gene</i>
TSG-14	<i>TNF-inducible gene 14 protein</i> , Pentraxin-3
VZV	Varizella-Zoster-Virus
ZMV	Zytomegalievirus
ZNS	Zentrales Nervensystem

Kapitel 8

Danksagung

8 Danksagung

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Hans-Joachim Anders für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit und die exzellente Betreuung. Er ermöglichte mir einen tieferen Einblick in die wissenschaftliche Tätigkeit und verstand es mich stets zu motivieren.

Zudem möchte ich mich bei dem Graduiertenkolleg 1202 unter der Leitung von Prof. Dr. med. Endres für die fachliche und die finanzielle Unterstützung bedanken.

Ein besonderer Dank gebührt Herrn PD Dr. rer. biol. hum. Maciej Lech, der mir vor allem beim experimentellen Teil als exzellenter Betreuer Tag und Nacht zur Verfügung stand und in dem ich einen Freund gefunden habe.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle bei den Herren Dr. hum. biol. Onkar Kulkarni, Dr. hum. biol. Ramanjaneyulu Allam, Shrikant Ramesh Mulay, Narayana Murthy Darisipudi und Frau Mi Ryu für die fachliche Hilfe und die gute gemeinsame Zeit bedanken.

Herrn Dan Draganovici und Frau Janina Mandelbaum möchte ich für die Anfertigung der histologischen Schnitte sowie der Hilfe mit dem Mikroskop recht herzlich danken.

Zuletzt möchte ich mich noch den „zwei guten Seelen“ des Labors danken. Frau Heni Eka Susanti für ihre Hilfe, die gute Stimmung und die Geduld sich meine Ausführungen anzuhören. Frau Ewa Radomska möchte ich besonders für ihre Organisation danken.

Allen nicht namentlich genannten Mitarbeiter der AG Anders, sowie meine zahlreichen medizinischen Mitdoktoranden möchte ich für die tolle Zeit und gute Atmosphäre danken und ihnen einen weiteren erfolgreichen Werdegang wünschen.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin und Familie bedanken, die mich stets antrieben und mir bei der Ausarbeitung dieser Arbeit immer zur Seite standen.