

Untersuchung der Rolle von B-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems in der Autoimmunpathologie der Scurfy Maus

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

zur
Erlangung des Doktorgrades Dr. rer. Nat.

vorgelegt von

Susanne Aschermann

aus Lauf

Als Dissertation genehmigt von der
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Friedrich-
Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg

Tag der mündlichen Prüfung: 23.05.2012

Vorsitzender der

Prüfungskommission: Prof. Dr. Rainer Fink

Erstberichterstatter: Prof. Dr. Falk Nimmerjahn

Zweitberichterstatter: Prof. Dr. Hans-Martin Jäck

Inhaltsverzeichnis:

A. Zusammenfassung.....	1
I. Zusammenfassung.....	1
II. Summary.....	2
B. Einleitung.....	3
I. Immunität und Toleranz.....	3
1. Zelluläre und molekulare Mechanismen der immunologischen Toleranz.....	3
1.1 Zentrale Toleranzmechanismen	3
1.2 Periphere Toleranzmechanismen	4
2. Die Regulatorische T-Zelle.....	6
3. Entstehung von Autoimmunität	7
II. Das Scurfy Mausmodell	8
1. Entstehung und phänotypische Merkmale	8
2. Der Transkriptionsfaktor Foxp3.....	10
3. Mechanismen der Autoimmunität in der Scurfy Maus	11
C. Fragestellung.....	15
D. Ergebnisse.....	16
I. Charakterisierung der Scurfy Maus	16
1. Nachweis der <i>foxp3</i> Defizienz.....	16
2. Morphologische, pathologische und zelluläre Veränderungen der Scurfy Maus.....	17
2.1 Auswirkung der <i>foxp3</i> Mutation auf Überleben, Körpergewicht und Milzgewicht..	17
2.2 Beurteilung des Nierenphänotyps.....	18
2.3 Entzündung und zelluläre Infiltrate in der Leber.....	20
2.4 Veränderungen im Anteil von Immunzellen in lymphoiden Organen	23
2.5 Veränderung in der Milzarchitektur	25
2.6 Veränderungen im Zytokinmilieu	27
3. Humorale Toleranz der Scurfy Maus.....	29
3.1 Quantifizierung von Antikörpern im Serum	29
3.2 Charakterisierung der Plasmazellen in immunologischen Organen	30
3.3 Analyse der Antikörper-sezernierenden Zellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark.....	31
3.4 Identifizierung und semiquantitative Bestimmung von Autoantikörpern	32
II. Einfluss von B-Zellen auf die Autoimmunpathologie in der Scurfy Maus.....	34
1. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die im Scurfy Mausmodell auftretende Autoimmunität.....	35

2. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die Thrombozytenzahl	37
3. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die Beeinträchtigung der renalen Funktion.....	38
4. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die Entzündung in der Leber.....	39
5. Interaktion zwischen T-Zellen und professionellen Ag-präsentierenden Zellen in der Leber	42
6. Veränderungen im Anteil von Immunzellen in lymphoiden Organen der B-Zelldefizienten Scurfy Tiere.....	43
7. Adoptiver B-Zelltransfer in B-Zelldefiziente μ MT ^{-/-} Mäuse	46
III. CD20 Therapie als mögliche therapeutische Intervention.....	51
1. Etablierung eines B-Zelldepletions-Modells	51
2. Auswirkung der CD20 Immuntherapie im Scurfy Mausmodell.....	55
IV. Einfluss der Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems auf die Autoimmunpathologie der Scurfy Maus	59
1. Auswirkung der CD11b-Defizienz im Scurfy Mausmodell auf Letalität, Körpergewicht und Milzgewicht	59
2. Auswirkung der CD11b-Defizienz auf die Autoimmunpathologie.....	61
3. Humorale Veränderungen in CD11b-defizienten Scurfy Tieren.....	64
4. Auswirkung der CD11b-Defizienz auf das Zytokinmilieu	66
5. Veränderungen in der Zusammensetzung des T-Zellkompartiments in CD11b-defizienten Scurfy Tieren	67
E. Diskussion	69
1. Die Autoimmunpathologie der Scurfy Maus	69
1.1 Verbesserung der Glomerulonephritis-artigen Symptomatik in B-Zell- und CD11b-defizienten Scurfy Mäusen	72
1.2 Verminderte Entzündung der Leber in B-Zell- und CD11b-defizienten Scurfy Mäusen	73
1.3 Auswirkung der Abwesenheit von B-Zellen oder des CD11b Moleküls auf die ITP in Scurfy Mäusen	74
2. Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze	75
F. Material und Methoden.....	78
I. Material	78
1. Chemikalien, Plastik- und Verbrauchsmittel	78
2. Puffer und Lösungen.....	78
3. Kommerzielle Kits	78
4. Antikörper und Konjugate.....	79
5. Oligonukleotide	80
6. Software	80

II. Methoden	80
1. Versuchstierhaltung	80
2. Kreuzungsexperimente	81
3. Genotypisierung.....	81
3.1. Aufreinigung genomischer DNA	81
3.2. Polymerase-Kettenreaktion	81
4. Tierexperimentelle Techniken	83
4.1 <i>In vivo</i> Applikation des CD20 Antikörpers.....	83
4.2 <i>In vivo</i> Applikation der Clodronat Liposomen.....	84
4.3 Blut- und Serumentnahme.....	84
4.4 Aufreinigung naiver B-Zellen für den adoptiven Zelltransfer	84
4.5 Adoptiver B-Zelltransfer.....	85
4.6. Isolation und Aufreinigung muriner Leukozyten	85
4.7. Bestimmung der Thrombozytenzahl	86
5. Herstellung des murinen anti-CD20 Antikörpers	86
5.1 Herstellung von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> TOP10 Bakterien	86
5.2 Transformation von <i>E.coli</i> TOP10 Bakterien.....	86
5.3 Bakterienkultur	87
5.4 Maxi-Prep und Kontrollverdau	87
5.5 Zellkultur	87
5.5.1 Kryokonservierung der HEK293T Zellen.....	87
5.5.2 Transiente Transfektion von HEK293T Zellen.....	88
5.6 Ammoniumsulfatfällung	88
5.7 Elution	88
5.8 Endotoxin Entfernung.....	89
5.9 Quantitative Proteinbestimmung.....	89
5.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung	89
6. Immunhistologische Analysen.....	90
6.1 Herstellung von Gefrierschnitten	90
6.2. Herstellung von Paraffinschnitten	90
6.3. Immunfluoreszenz	91
6.4 Immunfluoreszenzmikroskopie	91
6.5 Immunhistochemische Sirius Red Färbung	91
6.5.1 Sirius Red Färbung mit Kernfärbung.....	91
6.5.2 Sirius Red Färbung mit immunhistochemischer Antikörperfärbung	92
6.6 Mikroskopische Analyse der immunhistochemischen Färbungen	93
7. Serologische Untersuchungen	93

7.1 Bestimmung der Gesamtkonzentration der einzelnen Immunglobulinklassen.....	93
7.2 Detektion von Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA).....	94
7.3 Detektion von Autoantikörpern gegen Glucose-6-Phosphat-Isomerase (anti-GPI)	94
7.4 Detektion des Rheumafaktors	95
7.5 Detektion von Autoantikörpern gegen nukleäre Bestandteile (ANA)	95
7.6 Detektion von anti-Thrombozyten Antikörpern	95
7.7 BUN (Blood Urea Nitrogen)	96
7.8 Cytometric Bead Array (CBA).....	97
8. Elispot: Bestimmung der Anzahl IgG-sezernierender Zellen	97
9. Durchflusszytometrie	98
10. Zellsortierung	98
11. ADCC Assay zur CD20-vermittelten B-Zelldepletion <i>in vitro</i>	99
12. Statistische Verfahren	99
G. Literaturverzeichnis	100
H. Anhang.....	109
1. Abkürzungsverzeichnis	109
2. Eigene Publikationen	112
I. Danksagung	113

A. Zusammenfassung

I. Zusammenfassung

Bei Autoimmunerkrankungen kommt es zu einer Vielzahl von Fehlregulationen, die letztendlich zur Zerstörung von gesundem Gewebe führen. Regulatorische T-Zellen (T_{Regs}) können diese deregulierten Immunantworten gegen Autoantigene supprimieren und somit zur Erhaltung der Selbsttoleranz beitragen und Autoimmunität verhindern. Sowohl beim Menschen (IPEX-Syndrom, X-chromosomal vererbte Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie) als auch in der Maus (Scurfy-Phänotyp) kommt es zu einer besonders schweren systemischen Autoimmunerkrankung, durch einen genetisch bedingten Verlust der Funktion von T_{Regs} . In der Maus ist die X-chromosomal vererbte Scurfy Autoimmunpathologie durch eine stark verminderte Lebenserwartung, Hypergammaglobulinämie, Inflammationen und zelluläre Infiltrationen in multiplen Organen, eine gestörte B-Zellentwicklung und eine Expansion $CD11b^+$ myeloider Zellen charakterisiert. Ziel der Arbeit war es, mittels genetischer und therapeutischer Ansätze die Beteiligung von B-Zellen und Zellen des angeborenen Immunsystems an der Scurfy Autoimmunpathologie zu untersuchen. Besonderer Fokus lag hierbei auf der Untersuchung der Glomerulonephritisartigen Erkrankung, der Immunthrombozytopenie (ITP) und der Entzündung in der Leber der betroffenen Scurfy Tiere.

Durch genetische Deletion der B-Zellen konnte der Autoimmunphänotyp der Scurfy Maus erheblich verbessert werden. B-Zelldefiziente Scurfy Tiere überlebten signifikant länger. Wurden naive B-Zellen durch adoptiven Transfer in das B-Zelldefiziente Scurfy System zurückgebracht, nahm die Sterblichkeit erneut zu. Die naiven B-Zellen entwickelten sich nach kurzer Zeit zu Autoantikörper-produzierenden Plasmazellen. Da eine Immuntherapie mit einem B-Zelldepletierenden anti-CD20 Antikörper das Überleben der Scurfy Mäuse in analoger Weise verlängerte, wäre eine ähnliche Therapie für die Behandlung von IPEX-Patienten denkbar. Die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems spielt eine wichtige Rolle für Antikörper-vermittelten Entzündungsprozesse. In $CD11b$ -defizienten Scurfy Tieren war diese Rekrutierung von Zellen aus dem Blut in das Gewebe stark eingeschränkt und auch bei diesen Tieren konnte ein milderer Krankheitsverlauf und ein längeres Überleben, trotz erhöhter Autoantikörpertiter beobachtet werden. Somit konnten in dieser Arbeit einige der wichtigen zellulären und molekularen Mechanismen identifiziert werden, die zumindest in Teilen für die schwere Autoimmunpathologie der Scurfy Maus verantwortlich sind.

II. Summary

A multitude of immune dysregulations can result in destruction of healthy tissues and organs during autoimmune diseases. Regulatory T cells (T_{Regs}) can suppress immune reactions against autoantigens, mediate tolerance and prevent autoimmunity. The failure to generate T_{Regs} results in a severe systemic autoimmune disease in humans (IPEX syndrome, immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) and mice (Scurfy phenotype). In mice the X-linked Scurfy autoimmunity is characterized by an early death of affected animals, hypergammaglobulinemia, inflammation and cellular infiltrates in multiple organs as well as an impaired B cell development and an expansion of $CD11b^+$ myeloid cells.

The aim of the project was to investigate the role of B cells and cells of the innate immune system in the onset of autoimmunity in Scurfy mice by using genetic as well as therapeutic interventions. Genetic deletion of B cells considerably ameliorated the Scurfy autoimmune pathology and caused significantly extended survival. Conversely, transfer of naïve B cells into B cell deficient Scurfy mice shortened the lifespan and resulted in the development of these B cells into antibody-secreting plasma cells. Consistently, Scurfy mice treated with a B cell depleting anti-CD20 antibody also had a prolonged lifespan. Recruitment of innate immune cells participates in the antibody-mediated inflammation. In $CD11b$ deficient mice the recruitment of cells into tissues was impaired. Despite increased autoantibody titers $CD11b$ deficient Scurfy animals revealed milder course of disease and a prolonged lifespan. Taken together, the experiments revealed a crucial role of B cells and innate immune effector cells for the severe autoimmune disease in Scurfy mice.

B. Einleitung

I. Immunität und Toleranz

Das Immunsystem im gesunden Organismus besitzt die Fähigkeit zwischen körperfremd und körpereigen zu unterscheiden. Trotz der spezifischen Erkennung jedes beliebigen Pathogens kann es im Rahmen einer Immunantwort zur Erkennung körpereigener Strukturen und zur Auslösung von Autoimmunerkrankungen kommen. Um gewährleisten zu können, dass möglichst alle pathogenen Fremdorganismen abgewehrt werden und gleichzeitig Autoaggression verhindert wird, hat der Organismus verschiedene Mechanismen der immunologischen Toleranz entwickelt.

1. Zelluläre und molekulare Mechanismen der immunologischen Toleranz

Während der Lymphozytenentwicklung kommt es zur Induktion der immunologischen Toleranz. Sowohl für B- als auch für T-Zellen gibt es eine Reihe zentraler und peripherer Kontrollpunkte, die das Auftreten autoreaktiver Zellen verhindern sollen. Kommt es zu Fehlfunktionen in diesen Kontrollpunkten, können autoreaktive B- und T-Zellen aktiviert werden und im schlimmsten Fall zur Entstehung von Autoimmunkrankheiten beitragen.

1.1 Zentrale Toleranzmechanismen

Die Zentrale Toleranz wird während der Lymphozytenreifung in den primären lymphatischen Organen erzeugt und greift direkt in die Entwicklung von B- und T-Zellen ein. Durch Rekombination der einzelnen Gensegmente und durch freie Kombinationsvielfalt von schweren und leichten B-Zellrezeptorketten bzw. α - und β -T-Zellrezeptorketten, wird ein enormes Repertoire an Antigenrezeptoren geschaffen. Während T-Zellvorläufer das Knochenmark verlassen, um Selektionsprozesse im Thymus zu durchlaufen, erfolgt die Selektion der unreifen B-Zellen im Knochenmark. Während der Entwicklung werden B-Zellen negativen und positiven Selektionsprozessen unterworfen, die das periphere Repertoire der Antigen-spezifischen B-Zellen formen. Unreife B-Zellen, die Autoantigene erkennen, werden aus dem Immunrepertoire durch negative Selektion eliminiert. *In vivo* Studien konnten zeigen, dass die B-Zell-Rezeptor (BZR) vermittelte Interaktion zwischen unreifen B-Zellen und endogenen Antigenen zur Induktion der Toleranz führt (1-3). Zudem entscheidet die Affinität des BZR darüber, ob die B-Zelle deletiert wird oder in einen anergen Zustand übergeht (4). Durch einen Prozess, der Rezeptor-*Editing* genannt wird, können unreife, autoreaktive B-Zellen gerettet werden. Hierbei werden die Proteine RAG-1 und RAG-2 verstärkt exprimiert und der autoreaktive BZR wird durch sekundäre Ig-Gen Rearrangements ersetzt (1).

Die Deletion unreifer, autoreaktiver T-Lymphozyten ist der wesentliche Mechanismus der zentralen thymischen T-Zelltoleranz. Da T-Zellen Antigene als Peptide, assoziiert mit einem MHC-Molekül erkennen, müssen sie die Fähigkeit besitzen körpereigene MHC-Moleküle mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR) zu binden. Diese Eigenschaft nennt man Selbst-MHC-Restriktion. Nur Thymozyten, deren Rezeptoren mit Komplexen aus Selbst-MHC-Molekülen und gebundenen, körpereigenen Peptiden auf kortikalen Thymusepithelzellen interagieren können, überleben und reifen heran. Dieser Prozess wird als positive Selektion bezeichnet. Durch negative Selektion werden T-Zellen entfernt, die nach dem Rearrangement ihrer TZR-kodierenden Gene einen TZR mit hoher Affinität gegenüber körpereigenen Peptiden besitzen und somit potentiell autoreaktiv sind. Dieser Prozess findet in der Medulla des Thymus statt und führt zur Deletion von bis zu 95% der unreifen Thymozyten (5-8). Endogene und exogene Autoantigene werden von Antigen-präsentierenden Dendritischen Zellen und Makrophagen präsentiert (9, 10). Aus Untersuchungen in Mausmodellen weiß man, dass auch medulläre Thymusepithelzellen (mTEC) eine Vielzahl von Selbstantigenen exprimieren und präsentieren. mTEC synthetisieren und exprimieren konstitutiv eine Vielzahl peripherer, gewebsspezifischer Antigene (promiskuitive Antigen-Expression) (11-15). In diesem Zusammenhang kommt der Ubiquitin-Ligase AIRE (*Autoimmune Regulator*) eine entscheidende Bedeutung zu. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass es in AIRE defizienten medullären Thymusepithelzellen zu einer spezifischen Reduktion der ektopen Transkription der für periphere Antigene kodierenden Gene kommt (16). Trotz dieser komplexen Selektionsmechanismen entkommen wenige autoreaktive T-Lymphozyten diesen Kontrollen und können in die Peripherie wandern.

1.2 Periphere Toleranzmechanismen

Der Organismus verfügt auch außerhalb des Knochenmarks und des Thymus über Mechanismen entkommene, autoreaktive, reife B- und T-Zellen zu blockieren und die Manifestation einer Autoimmunerkrankung zu verhindern. Reife B-Zellen, die in der Peripherie auf hohe Konzentrationen eigener Antigene stoßen, werden anerg (17) oder deletiert (18). Zudem können während der Keimzentrumsreaktion durch somatische Hypermutation (SHM) autoreaktive B-Zellen neu generiert werden. Ein Keimzentrum bildet sich nach Aktivierung reifer B-Zellen, bei vorhandener T-Zell Hilfe zusammen mit T-Zellen und follikulär dendritischen Zellen (FDZ, *follicular dendritic cell*). Die BZR der Antigen-aktivierten B-Zellen werden durch SHM verändert, um BZR mit verbesserter Affinität zu erhalten und so das Repertoire der verschiedenen B-Zellspezifitäten zu expandieren. Durch das zufällige Einfügen von Mutationen in die Gene der variablen Region des BZR ist es jedoch möglich, dass neue autoreaktive B-Zellen entstehen und die Bindung an das Antigen verloren geht (19-21). Diese neu generierten potentiell autoreaktiven B-Zellen müssen aus dem System entfernt werden. Möglicherweise spielt hierbei der Fc γ RIIB eine wichtige Rolle.

Einleitung

Antigene die im Keimzentrum von FDZ in Form von Immunkomplexen präsentiert werden, können in B-Zellen, deren BZR keine Bindung mehr zeigt, zu einer Kreuzvernetzung der Fc γ RIIB mit sich selbst führen und dadurch ein Apoptosesignal induzieren (22). Die periphere Toleranzinduktion des T-Zell Repertoires teilt sich in passive, intrinsische und aktive, extrinsische Mechanismen auf. Passive Selektionsmechanismen, wie die Ignoranz von naiven T-Lymphozyten werden induziert, sobald Autoantigene in zu geringen Mengen durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APC) präsentiert werden oder wenn einzelne reife T-Zellen eine zu geringe Anzahl an TZR exprimieren (23, 24). Zudem besteht die Möglichkeit einer funktionellen Inaktivierung (Anergie) der T-Zellen nach Erkennung von Autoantigenen (25, 26). Des Weiteren verursachen Signale autoreaktiver T-Zellen, die durch die Interaktion mit dem Oberflächenantigen CD95 (APO-1, Fas) und dessen Liganden CD95L entstehen, meist eine vermehrte Expression proapoptotischer Moleküle und führen schließlich zum *Activation Induced Cell Death* (AICD) (27, 28). Extrinsische, aktive, periphere Toleranzmechanismen werden direkt über andere Zellen des Immunsystems vermittelt. Beispielsweise können Dendritische Zellen (DZ) eine Immunreaktion gegen Pathogene stimulieren, die die Immunantwort gegen körpereigene Antigene unterbinden. Nehmen DZ bei einer Virusinfektion beispielsweise ganze mit Viren infizierte Zellen auf, werden körpereigene Strukturen gleichzeitig mit dem Pathogen prozessiert und präsentiert. Es konnte gezeigt werden, dass DZ während ihrer Reifung, im *steady state*, Autoantigene aufnehmen und präsentieren. Hierbei werden antigenspezifische, autoreaktive T-Zellen inaktiviert. Das Autoantigen erzeugt Immuntoleranz im Organismus (29-32). Darüber hinaus wurde beschrieben, dass eine Subpopulation der T-Zellen, die regulatorischen T-Zellen (T_{Regs}) autoaggressive T-Zellen hemmen können und vor Autoimmunität in der Peripherie schützen (33). Im Detail wird auf die Zellpopulation der T_{Regs} im folgenden Abschnitt eingegangen. Abbildung 1 stellt die komplexen Mechanismen der Toleranzinduktion in B- und T-Lymphozyten dar.

Einleitung

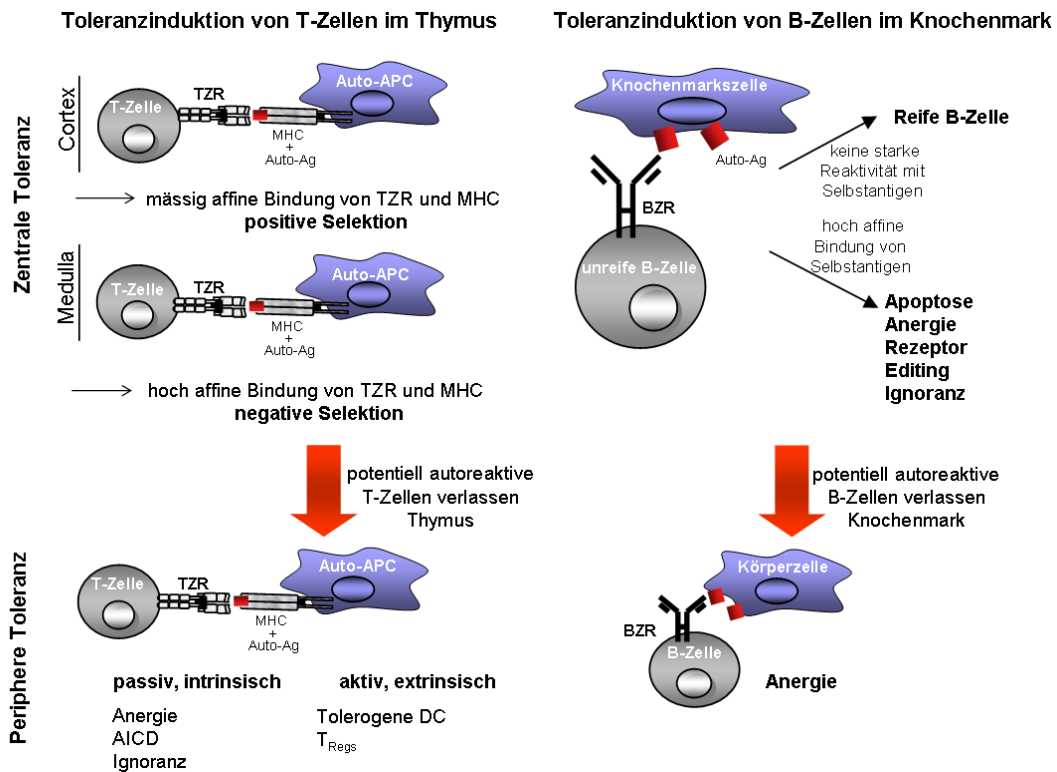


Abbildung 1: Mechanismen der zentralen und peripheren Toleranz.

Der Mechanismus der zentralen Toleranz beschreibt die Deletion/Modifikation autoreaktiver Lymphozyten während ihrer Reifung in den primären lymphatischen Organen. Die periphere Toleranz dagegen unterdrückt eine Immunreaktion durch Deletion, Anergie oder Mechanismen, die direkt über andere Zellen des Immunsystems vermittelt werden.

2. Die Regulatorische T-Zelle

Schon vor vielen Jahren wurde eine T-Zellsubpopulation charakterisiert, die eine entscheidende Rolle bei der Immunsuppression einnimmt. Diese Zellen sollen maßgeblich an der Erhaltung der Selbsttoleranz und an der Limitierung der Immunantwort auf Fremdartigene beteiligt sein. Neben der Suppression von Autoimmunität spielen diese Zellen auch eine Rolle bei der Verhinderung von Allergien und der aggressiven allogenen Abstoßung des Fötus durch die Mutter sowie bei der Transplantatabstoßung (34, 35). Nishizuka und Kollegen konnten schon 1969 zeigen, dass eine operative Entfernung des Thymus Autoimmunreaktionen mit autoaggressiven Zerstörungen verschiedener Organe in neonatalen Mäusen nach sich zieht. Die Rekonstitution der Mäuse mit peripheren CD4⁺ T-Zellen blockierten dagegen die Entwicklung schwerwiegender Autoimmunantworten (36-39). In den folgenden Jahren wurde mit großer Anstrengung nach einem spezifischen Marker dieser CD4⁺ T_{Regs} gesucht. Schließlich konnte gezeigt werden, dass die Koexpression bzw. das Fehlen des Oberflächenmoleküls CD25 (IL-2 Rezeptor α -Kette) die CD4⁺ peripheren T-Zellen in Subpopulationen unterteilt. Die CD25⁺ Zellen, die etwa 5% der peripheren CD4⁺ T-Zellen stellen (40, 41), wurden schließlich als T_{Regs} identifiziert (42). Mit der Charakterisierung des defekten Gens im letalen autoaggressiven Scurfy Mausmodell wurde der Foxp3

Einleitung

Transkriptionsfaktor gefunden, der zumindest in der Maus spezifisch in T_{Regs} exprimiert wird und als Differenzierungsfaktor für deren Entwicklung fungiert (43-45). Im Detail wird auf den Transkriptionsfaktor Foxp3 und das Scurfy Mausmodell in den folgenden Abschnitten eingegangen. Neben hohen Konzentrationen an CD25 exprimieren T_{Regs} konstitutiv spezifische Oberflächenmoleküle, wie CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*), ein negativer Regulator der T-Zellaktivierung und das kostimulatorische Molekül GITR (*Glucocorticoid-inducible TNF Receptor-related Protein*). Mithilfe der Sekretion der anti-inflammatorischen, suppressiven Zytokine IL-10 und TGF- β können T_{Regs} die Immunantwort terminieren und deren Stärke kontrollieren (Abbildung 2). Hierbei wird die Produktion von IL-2, IFN- γ und IL-4 reprimiert (42, 46-49). Neben diesen humoralen Suppressionsmechanismen können T_{Regs} auch über direkte Kontakte die Aktivität von Lymphozyten dämpfen und dadurch Autoimmunerkrankungen abmildern (41, 49). Inzwischen wurden verschiedene T_{Reg} -Populationen beschrieben. Die soeben erwähnten $CD4^+ CD25^+ T_{\text{Regs}}$ werden als natürlich vorkommende regulatorische T-Zellen bezeichnet. Ihre Entwicklung vollzieht sich im Thymus. $Foxp3^+ T_{\text{Regs}}$ der zweiten Subpopulation werden als induzierte T_{Regs} bezeichnet. Bisherige Daten weisen daraufhin, dass sich diese Population aus naiven konventionellen $CD4^+$ T-Zellen durch zellkontaktabhängige Interaktion mit natürlichen T_{Regs} entwickeln (47, 50-53).

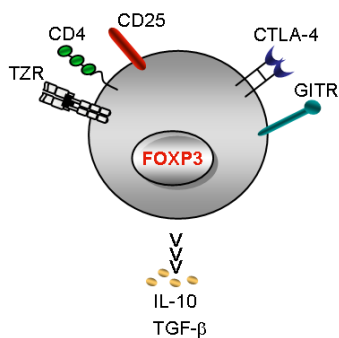


Abbildung 2: Schematische Darstellung der regulatorischen T-Zelle.

Gezeigt sind T_{Reg} charakterisierende Oberflächenmoleküle, der Transkriptionsfaktor Foxp3 und die Sekretion einiger Zytokine.

3. Entstehung von Autoimmunität

Versagen zentrale und periphere Kontrollmechanismen, dann verliert das Immunsystem die Fähigkeit körpereigene Strukturen zu tolerieren und es können sich Autoimmunerkrankungen entwickeln. Autoimmunerkrankungen kommen in den westlichen Industrieländern mit einer Inzidenz von circa 5% vor (54, 55). An der Prädisposition für verschiedenste Autoimmunerkrankungen spielen epidemiologische Faktoren (56) sowie genetische und epigenetische Faktoren eine wichtige Rolle (57-59). Autoimmunität kann durch eine Mutation in einem einzigen Gen, genauso aber auch durch einen multigenen Defekt verursacht werden (60, 61). Genetische Assoziationsstudien haben eine Vielzahl von Risikofaktoren

identifiziert, die mit der Entstehung und dem Schweregrad der Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht werden (62-64). So konnte ein Einzelnukleotid-Polymorphismus (SNP) im kodierenden Gen für den Fc γ RIIB Rezeptor, der zur Änderung einer einzigen Aminosäure (Isoleucin wird zu Threonin, I232T) in der transmembranen Domäne des Rezeptors führt, mit einer erhöhten Suszeptibilität für den systemischen Lupus erythematoses (SLE) oder der Rheumatoiden Arthritis (RA) in Verbindung gebracht werden (65). Durch verschiedene gentechnologisch veränderte Mausmodelle konnten Gene identifiziert werden, die durch Überexpression oder Deletion an Autoimmunkrankheiten beteiligt sein könnten. Diese Gene kodieren für Zytokine, Antigen-Korezeptoren, kostimulatorische Moleküle und Proteine, die bei der Regulation der Apoptose oder Beseitigung von Antigenen und Antigen-Antikörperkomplexen beteiligt sind (66). Autoimmunerkrankungen können in Analogie zu Hypersensitivitätsreaktionen anhand des Mechanismus der Gewebeschädigung klassifiziert werden. Allergien gehören zu Typ I Hypersensitivitätsreaktionen, die vermittelt über IgE allergische Reaktionen auslösen. Bei Typ II Autoimmunerkrankungen kommt es zur Autoantikörperproduktion des IgG Isotyps gegen Zelloberflächen- oder Matrixantigene. Zu nennen wären hier die Immunthrombozytopenie (ITP) und die autoimmune hämolytische Anämie (AIHA), wobei die Autoantikörperproduktion direkt zur Zerstörung bzw. Phagozytose von Thrombozyten und Erythrozyten unter anderem durch Fc-Rezeptor (Fc γ R)-vermittelte Mechanismen führt. Bei Autoimmunerkrankungen des Typ III kommt es zur Ausbildung von IgG Autoantikörpern gegen lösliche Antigene und Herstellung von großen Mengen an Immunkomplexen. Da diese nicht mehr in adäquater Weise von Immunzellen mit Komplement-Rezeptoren und Fc-Rezeptoren beseitigt werden können, resultieren aus der Ablagerung dieser Immunkomplexe Entzündungen des Gewebes und eine damit verbundene Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems. Autoimmunerkrankungen, die in diese Kategorie gehören sind z.B SLE und RA, bei denen es durch Ablagerung von Immunkomplexen in Niere und Gelenken zu Entzündungsreaktionen und Organschädigungen kommt. Ein Verlust der T-Zelltoleranz gehört zum Typ IV der Hypersensitivitätsreaktionen, bei denen Zytotoxische T-Lymphozyten körpereigene Peptide im Kontext von MHC-Molekülen der Klasse I erkennen und zur Zerstörung der erkannten Zelle führen (z. B. insulinabhängiger Diabetes mellitus).

II. Das Scurfy Mausmodell

1. Entstehung und phänotypische Merkmale

Eines der schwerwiegendsten Modelle, das auch für den Menschen relevant ist, zum Studium der Autoimmunität, stellt die Scurfy Maus dar. Von der X-chromosomal vererbten Erkrankung sind nur männliche Individuen betroffen. Heterozygote Weibchen geben als

Einleitung

Träger der Mutation den Defekt rezessiv an ihre Nachkommen weiter (67). Weibliche Nachkommen mit einem *foxp3*-defizienten Genotyp sind nicht lebensfähig, da sich der homozygote Defekt bereits embryonal lethal auswirkt. Zum ersten Mal beobachtet wurde die Scurfy Mausmutante 1949 im Oak Ridge National Laboratory, USA. Die Mutation manifestierte sich spontan in einem Inzuchtstamm, der multiple rezessive, vor allem Fellfarben-Mutationen beinhaltet. Durch Rückkreuzung der heterozygoten *Foxp3^{sf/+}* Weibchen mit C57BL/6 Männchen generierten Means et al. und das Jackson Laboratory die Scurfy Maus auf C57BL/6 Hintergrund (67-69). Analysen der Scurfy Mäuse führten zur Identifizierung des *forkhead Box Protein 3* (*Foxp3*) Transkriptionsfaktors und des kodierenden *foxp3* Gens, das auf dem X-Chromosom an der Stelle Xp11.23 lokalisiert werden konnte (70). Als molekulare Ursache für den autoaggressiven Scurfy Phänotyp wurde eine Leserasterverschiebung im *foxp3* Gen identifiziert (43), die zum Fehlen des funktionellen Proteins führt. Dadurch kommt es zu einer Blockade der Entwicklung von T_{Regs} (43, 44, 71-76).

Schon bei der Geburt der Tiere ist die komplexe Autoimmunpathologie des Scurfy Mausmodells ausgeprägt. Der schwerwiegende lymphoproliferative Autoimmunphänotyp führt innerhalb der ersten 4-6 Lebenswochen zum Tod der betroffenen Individuen. Die ersten klinischen Anzeichen des Scurfy Syndroms (engl.: scurfy=schuppig) sind transiente Schwellungen und Rötungen der Genitalpapille im Alter von 12-14 Tagen. Morphologisch sichtbare Läsionen der Haut deuten auf eine aggressive Immundysfunktion hin. Es kommt zu einer Schuppen- und Schorfbildung an Ohr, Pfoten, Schwanz und am Augenlid. Betroffene Tiere wirken zurückgeblieben, haben eine verkümmerte Haltung und zeigen eine Schwellung des Abdomens. Kennzeichnend sind verdickte, meist gefaltete Ohren. Zudem weisen Scurfy Mäuse eine Splenomegalie, eine Hepatomegalie und vergrößerte Lymphknoten auf (67, 68, 77). Charakteristisch ist zudem ein hoher Autoantikörper-Titer im Serum und zahlreiche Entzündungsherde aus zellulären Infiltraten von Immunzellen wie zum Beispiel T-Zellen, B-Zellen, Neutrophile, Eosinophile und Makrophagen in lymphoiden, wie auch nicht lymphoiden Organen (43, 68, 70, 74, 76, 78, 79). Kennzeichnend für die Erkrankung ist weiterhin eine Hyperproliferation der CD4⁺ CD8⁻ T-Zellen. In den Scurfy Mäusen kommt es zudem zu erhöhten Zytokinkonzentrationen der Interleukine IL-4, IL-6, IL-7 und des Tumornekrosefaktors- α (TNF- α) (80).

Die Forschung an *foxp3*-defizienten Scurfy-Mäusen hat neben der Tatsache, dass sich diese Mäuse als Prototypen zum Studium von T_{Regs} und ihrer Interaktion mit anderen Immunzellen und den daraus resultierenden fatalen Autoimmunerkrankungen (81) besonders gut eignen, noch eine weitere wichtige Bedeutung. Beim Menschen gilt die sehr seltene, fatale X-chromosomal vererbte Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie (IPEX)

(76) als humane äquivalente Erkrankung zur Scurfy Maus. Ursächlich hierfür sind ebenfalls Mutationen im X-chromosomalen *foxp3* Gen und in Nachbarregionen der kodierenden Exons (82). IPEX ist mit einer hohen Mortalität verbunden und so beschränkt sich die Lebenserwartung der betroffenen Jungen auf nur wenige Jahre (83). Bei der Behandlung haben sich nur zwei Strategien als erfolgreich erwiesen. Neben palliativer Behandlung durch Immunsuppression, ist der momentan einzige kurative Behandlungsansatz für IPEX-Patienten eine allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation (84).

2. Der Transkriptionsfaktor Foxp3

Forkhead Proteine bilden eine eigenständige Familie von Transkriptionsfaktoren, charakterisiert durch eine konservierte, 110 Aminosäuren lange, monomere DNA-Bindedomäne. Der Transkriptionsfaktor Foxp3, auch Scurfin genannt, ist essentiell für die normale Immunhomöostase. Das Protein reprimiert die Transkription einer Vielzahl von Genen, die entscheidend für die Bildung von regulatorischen T-Zellen sind und reguliert die T-Zell-Aktivierung (43, 85, 86). Die Regulation erfolgt durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise NFAT (*nuclear factor of activated T cells*) oder NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells*). Durch die Scurfy Mutation und die damit fehlende Repression durch Foxp3 sind diese beiden Transkriptionsfaktoren konstitutiv aktiv (85). Das Foxp3 Protein besteht aus einer Repressordomäne, einer Protein-Protein-Wechselwirkungsdomäne/Dimerisierungsdomäne (*Leucin-zipper*) und einer DNA-Bindedomäne, die als *forkhead* (FKH) Domäne bezeichnet wird. Die Scurfy Mutation resultiert aus einer 2-bp Insertion in Exon 8 (Abbildung 3A). Dadurch kommt es zu einer Leserasterverschiebung. Während der Translation führt diese Leserasterverschiebung zur Bildung eines Stopcodons und damit zum Abbruch der Translation und zur Entstehung eines C-terminal verkürzten Genproduktes. Durch den Verlust der FKH Domäne verliert der Foxp3 Transkriptionsfaktor seine DNA-Binde-Aktivität (43, 86, 87) (Abbildung 3B).

Einleitung

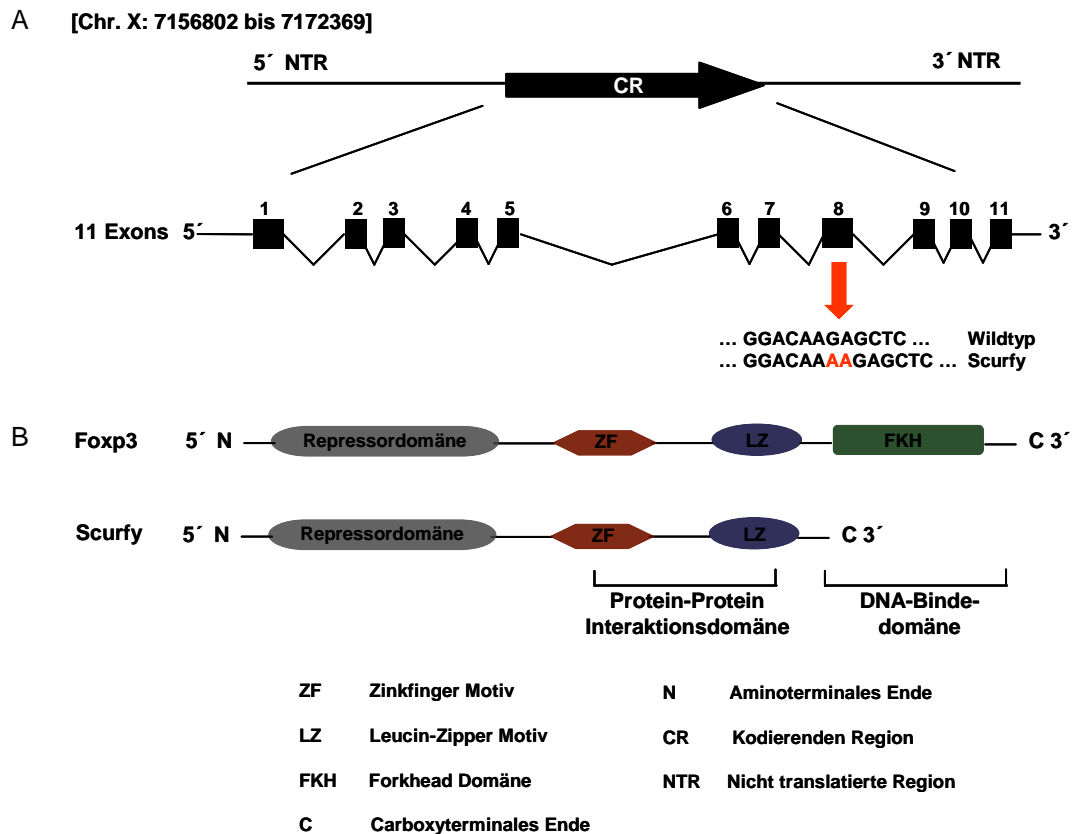


Abbildung 3: Schematische Darstellung des *foxp3* Genlokus und der Mutationsentstehung in der Scurfy Maus.

(A) Struktur des *foxp3* Genlokus auf dem X-Chromosom und Darstellung der Insertion in Exon 8. (B) Schematische Darstellung des Foxp3 Proteins sowie der verkürzten Scurfy Form.

3. Mechanismen der Autoimmunität in der Scurfy Maus

Während sich eine Vielzahl von Studien mit den molekularen und zellulären Mechanismen der T_{Reg} -vermittelten Suppression von autoreaktiven Immunantworten beschäftigen, ist weitgehend unklar, welche Rolle die verschiedenen fehlgeleiteten Effektorwege für den Autoimmunphänotyp spielen und in welchem Maße sie für die stark verkürzte Lebenserwartung verantwortlich sind. Tabelle 1 gibt einen Überblick über bereits bestehende genetische Untersuchungen im Scurfy Mausmodell. Eine entscheidende Beteiligung der $CD4^+$ T-Zellen an der Scurfy Autoimmunpathologie konnte im $CD4^{-/-}$ Scurfy Mausmodell demonstriert werden. Eine Abwesenheit von $CD4^+$ T-Helferzellen zeigt hier eine transiente Protektion der Scurfy Tiere. Der genetische Verlust der $CD4^+$ T-Zellen resultiert sowohl in einem um etwa drei Wochen verlängertem Überleben als auch in einer teilweise verminderten Autoimmunpathologie. Im Gegensatz dazu führt die genetische Deletion von Zytotoxischen T-Zellen nicht zu einem verlängertem Überleben (78). Wurde ein transgener (Tg) TZR, spezifisch für Ovalbumin in das Scurfy System eingebracht, konnten T-Zellen, die diesen exprimieren nicht aktiviert werden und die Scurfy Autoimmunität trat verspätet auf. In

Einleitung

TZR Tg Scurfy Mäusen auf *Rag* (*recombination activation gene*, Rekombinase-aktivierendes Gen) defizientem Hintergrund dagegen konnte die Erkrankung verhindert werden (88, 89). Ein zusätzlicher Defekt in der zentralen Toleranz durch die Deletion von *aire* (*autoimmune regulator*, autoimmune Regulator) verstärkte die Entzündung und die Mortalität (90). Eine Deletion von *Igt α ϵ* (CD103) im Scurfy Mausmodell sollte eine Akkumulation aktivierter CD103⁺ CD4⁺ T-Zellen im Gewebe verhindern. Allerdings zeigte sich nur eine zeitlich verzögerte Inflammation, die über CD103-unabhängige Mechanismen vermittelt wird (91). Durch die Blockade der Fas/FasL Interaktion im Fas^{lpr/lpr} Scurfy Mausmodell kam es zu einer verlängerten Lebensspanne, allerdings konnte die Entzündung nicht verhindert werden. Es existieren somit Fas/FasL alternative Mechanismen, die die Gewebeerstörung im Scurfy Mausmodell vermitteln (92). Der genetische Verlust des Transkriptionsfaktors Stat6 (*signal transducer and activator of transcription 6*), der maßgeblich an der Induktion von Th-2 (T-Helferzellen) Antworten beteiligt ist, führte zwar zu einer Reduktion der Eosinophilie und verminderten IL-4 und IL-5 Konzentrationen, allerdings konnte die Entzündung und die frühe Letalität nicht reduziert werden (93). Durch die Deletion des CD28 Moleküls kam es in Scurfy Mäusen zu einer verlängerten Lebensspanne (94). CD28 interagiert mit der B7-Familie kostimulatorischer Rezeptoren auf DZ, Makrophagen und aktivierten B-Zellen (95). Die CD28-B7 Interaktion ist essentiell für die Aktivierung naiver T-Zellen und deren Differenzierung in Richtung eines Th-2 Phänotyps (95, 96). Durch die Blockade der CD28-B7 Interaktion im CD28^{-/-} Scurfy Mausmodell kam es zu einer Reduktion von Th-2 Zytokinen (z.B. IL-4), wodurch die Produktion von IgE und IgG1 vermindert werden konnte (94). Ähnlich interpretiert werden Ergebnisse mit Scurfy-IL2 *Knockout* Tieren, die auch ein verlängertes Überleben und eine Organ-spezifisch verminderte Entzündung zeigten. Durch IL-2 kann es zu einer Regulation der Th-2 Antworten und der Produktion von IgE kommen (92). Interessanterweise kommt es auch in Abwesenheit von CD4⁺ T-Helferzellen zur Überproduktion von Th-2 Zytokinen (78). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es durch den Verlust der T_{Regs} zu einer fehlgeleiteten Th-2 Immunantwort kommt, die auch unabhängig von einer direkten Immunmodulation über T-Helferzellen, zur Autoimmunpathologie in der Scurfy Maus beitragen könnten. Th-2 Zytokine werden nicht nur von T-Zellen sondern auch von vielen anderen Zelltypen, wie etwa Basophilen und Mastzellen gebildet (97). Ungeklärt bleibt bislang allerdings, ob diese Zelltypen direkt mit T_{Regs} interagieren. Eine Interaktion und Regulation verschiedenster Zelltypen durch T_{Regs} wird aus neueren Studien klar. So wurde gezeigt, dass T_{Regs} die Aktivierung von DZ beeinflussen können (98). Zudem weisen bisherige Daten daraufhin, dass T_{Regs} eine wichtige Funktion für die humorale Toleranz spielen könnten. So kommt es in T_{Reg} defizienten Tieren zur Autoantikörperproduktion und zu einer gestörten B-Zellentwicklung (71, 79, 99). Weiterhin

Einleitung

wurde gezeigt, dass T_{Regs} die Autoantikörperproduktion in B-Zellen unterdrücken bzw. B-Zellen direkt eliminieren könnten (100-103).

Einleitung

Tabelle 1: Überblick über bestehende Zuchtexperimente zur genetischen Untersuchung der fehlgeleiteten Effektormechanismen im Scurfy Mausmodell.
(Tabelle moduliert nach (104)).

Untersuchtes Gen im Scurfy Mausmodell	Veränderungen zum Scurfy Mausmodell	Veränderungen des autoaggressiven Phänotyps	Überleben (Wochen)
<i>cd4^{-/-}</i>	keine CD4 ⁺ T-Zellen	verminderte und verspätete Inflammation	6
<i>β2m^{-/-}</i>	keine CD8 ⁺ T-Zellen	keine Veränderung	4
<i>TCR Tg</i>	Anzahl der T-Zellen reduziert, Expansion der Tg TZR T-Zellen	verspätete Inflammation	7
<i>TCR Tg.rag^{-/-}</i>	nur TZR Tg T-Zellen	keine Entzündung	> 20
<i>aire^{-/-}</i>	fehlende Expression in Stromazellen des Thymus, Defekt in zentraler Toleranz	früheres Einsetzen der Entzündung	2-3
<i>Igtaε^{-/-}</i>	Adhäsionsverhalten der Zellen verändert, Reduktion der Lymphozyten	Colitis, verspätetes Auftreten der Inflammation	6-7
<i>fas^{lpr/lpr}</i>	T-Zell-Homöostase verändert, Rolle bei Gewebeerstörung	Colitis, Entzündung der Haut vermindert, Lunge und Leber unverändert	6-18
<i>stat6^{-/-}</i>	IgE und Th2 Zytokine inhibiert	Eosinophilie inhibiert, Entzündung der Lunge unverändert	5
<i>cd28^{-/-}</i>	T-Zellaktivierung und Zytokinausschüttung inhibiert	keine Entzündung in Leber und Lunge, Haut nicht beschrieben	>20
<i>Il2^{-/-}</i>	Anstieg der Lymphozyten, Regulation der Th2-Antworten	Entzündung reduziert in Haut und Lunge, nicht in Leber	6-10

C. Fragestellung

T_{Regs} spielen eine zentrale Rolle bei der Suppression von Autoimmunität. Fehlen T_{Regs} kommt es sowohl beim Menschen (IPEX-Syndrom) als auch in der Maus (Scurfy-Phänotyp) zu einer systemischen Autoimmunerkrankung, die in den meisten Fällen zum frühen Tod der betroffenen Individuen führt. Bisher weitgehend unklar ist, welche der fehlregulierten Immunantworten in welchem Ausmaß an den typischen pathologischen Veränderungen der Erkrankung beteiligt sind. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher mittels genetischer und therapeutischer Ansätze der Einfluss unterschiedlicher Zelltypen des Immunsystems auf die Schädigung verschiedener Gewebe im Autoimmunmodell der Scurfy Maus detailliert untersucht werden. Hierzu wurden Scurfy Mäuse mit verschiedenen *Knockout* Tieren verpaart. Der Fokus der Untersuchung lag hierbei auf B-Zellen und $CD11b^+$ myeloiden Zellen. Der autoaggressive Immunphänotyp der Mäuse sollte anhand klinischer und morphologischer Parameter bewertet werden. Darauf aufbauend sollten therapeutische Methoden erforscht werden, die ebenfalls zu einem mildereren Krankheitsverlauf und zu einer verlängerten Lebensspanne der Scurfy Tiere beitragen.

D. Ergebnisse

I. Charakterisierung der Scurfy Maus

Fehlen T_{Regs} kommt es sowohl beim Menschen (IPEX-Syndrom) als auch in der Maus (Scurfy-Phänotyp) zu einer systemischen Autoimmunerkrankung die in den meisten Fällen zum frühen Tod der betroffenen Individuen führt (68, 83). Bisher weitgehend unklar ist, welche der fehlregulierten Immunantworten in welchem Ausmaß an den typischen pathologischen Veränderungen der Erkrankung beteiligt sind. Im ersten Teil der Arbeit wurden Merkmale der Scurfy Mäuse untersucht, die über bereits bekannte Charakteristika hinausreichen. Neben morphologischen und klinischen Parametern wurden insbesondere die Zellaktivierung und die humorale Immunantwort der Scurfy Tiere im Detail analysiert.

1. Nachweis der *foxp3* Defizienz

Als molekulare Ursache für die komplexe Autoimmunpathologie des Scurfy Mausmodells wurde eine Leserasterverschiebung im *foxp3* Gen identifiziert (43). Durch die Deletion kommt es zum Verlust von T_{Regs} (42, 71, 72). Neben dem Nachweis der *foxp3* Defizienz auf genomischer Ebene (siehe Methodenteil 3. Genotypisierung), kann der Verlust der T_{Regs} auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. So zeigten immunhistologische Untersuchungen kryokonservierter Lymphknoten von Scurfy Mäusen (XYsf) keine Bindung der fluoreszenzmarkierten spezifischen Antikörper gegen *foxp3* auf $\text{TCR}\beta^+$ T-Zellen (Abbildung 4). In gesunden Kontrollmäusen (XY) gleichen Alters kam es zu einer intrazellulären Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3. Mittels Immunfluoreszenz konnten hier T_{Regs} innerhalb der T-Zell- und B-Zell-Zone, die durch Verwendung von Antikörpern gegen $\text{TCR}\beta$ und B220 identifiziert werden konnten, nachgewiesen werden.

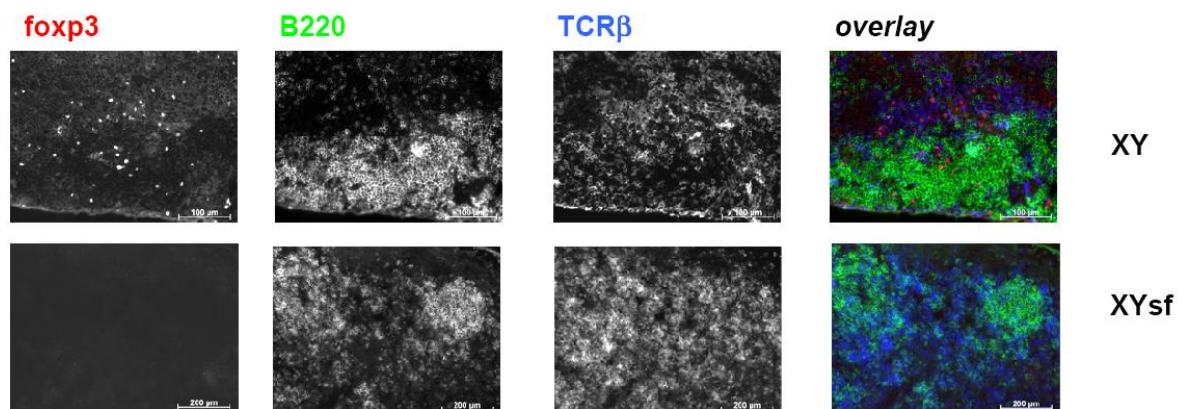


Abbildung 4: Immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von *foxp3*.

Exemplarische Darstellung von *foxp3* positiven T_{Regs} innerhalb der T-Zell-Zone des Lymphknoten vier Wochen alter Scurfy Männchen (XYsf) und männlicher Kontrolltiere (XY). Färbung der Gefrierschnitte

Ergebnisse

mit Antikörpern spezifisch für T_{Regs} (foxp3-PE, rot), B-Zellen (B220-Alexa488, grün) und T-Zellen (TCRβ-APC, blau). Bildaufnahme in 200-facher Vergrößerung.

2. Morphologische, pathologische und zelluläre Veränderungen der Scurfy Maus

Autoimmunphänotypen können stark durch Umwelteinflüsse und unterschiedliche Haltungsbedingungen in verschiedenen Tierställen beeinflusst werden. Daher sollte zunächst untersucht werden, inwieweit in der Literatur beschriebene morphologische und pathologische Veränderungen in Scurfy Tieren unter unseren experimentellen Bedingungen nachvollzogen werden können.

2.1 Auswirkung der *foxp3* Mutation auf Überleben, Körpergewicht und Milzgewicht

Die stark ausgeprägte Autoimmunerkrankung bei Scurfy Mäusen ist durch Krustenbildung an allen Extremitäten, eine kurze Lebensdauer, ein stark vermindertes Körpergewicht sowie eine Milzvergrößerung gekennzeichnet (68). Die in Abbildung 5 dargestellte Überlebenskurve zeigt die Überlebensdauer von 49 Scurfy Mäusen. Im Median lag die Lebensspanne der Scurfy Tiere bei 28 Tagen. Im Vergleich zeigten die gesunden Kontrolltiere keine Verkürzung der Lebensdauer.

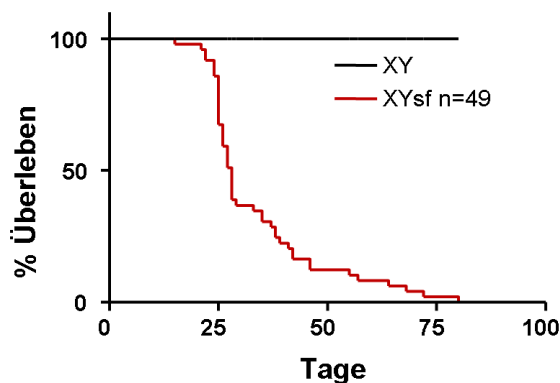


Abbildung 5: Kaplan-Meier Überlebenskurve von Scurfy und Wildtyp Mäusen.

Überlebenskurven von XYsf (rot) und XY (schwarz) Mäusen. Die Lebensdauer der Tiere wurde in Tagen notiert und mit dem Auswerteprogramm *Graph-Pad*® graphisch dargestellt.

Median	XYsf
Tage	28

Neben der Lebensdauer wurde auch das Körper- und Milzgewicht vier Wochen alter Scurfy und Wildtyp Mäuse erfasst und miteinander verglichen. Alle Scurfy Mäuse hatten, verglichen mit Kontrolltieren, ein geringeres Körpergewicht (Abbildung 6A). Bei Scurfy Mäusen (Mittelwert 9,6g) konnte im Vergleich zu Wildtyp Tieren (Mittelwert 16,66g) ein hoch signifikanter Unterschied detektiert werden. Betrachtet man die Gewichtszunahme zum Zeitpunkt zwei und vier Wochen, konnte festgestellt werden, dass Scurfy Tiere in dieser Zeit kaum an Gewicht zunehmen und einzelne Scurfy Individuen sogar Gewicht verlieren

Ergebnisse

(Mittelwert $1,01\text{g} \pm 1,93\text{g}$) (Abbildung 6B). Bei den Kontrollen konnte im Mittel eine Gewichtszunahme von $8,18\text{g} (\pm 1,91\text{g})$ beobachtet werden. Dagegen war in Scurfy Mäusen eine hoch signifikante Zunahme des Milzgewichtes im Vergleich zu gleichaltrigen Kontrollen (Mittelwert XYsf: $0,177\text{g}$, Mittelwert XY: $0,092\text{g}$) zu beobachten (Abbildung 6C und D).

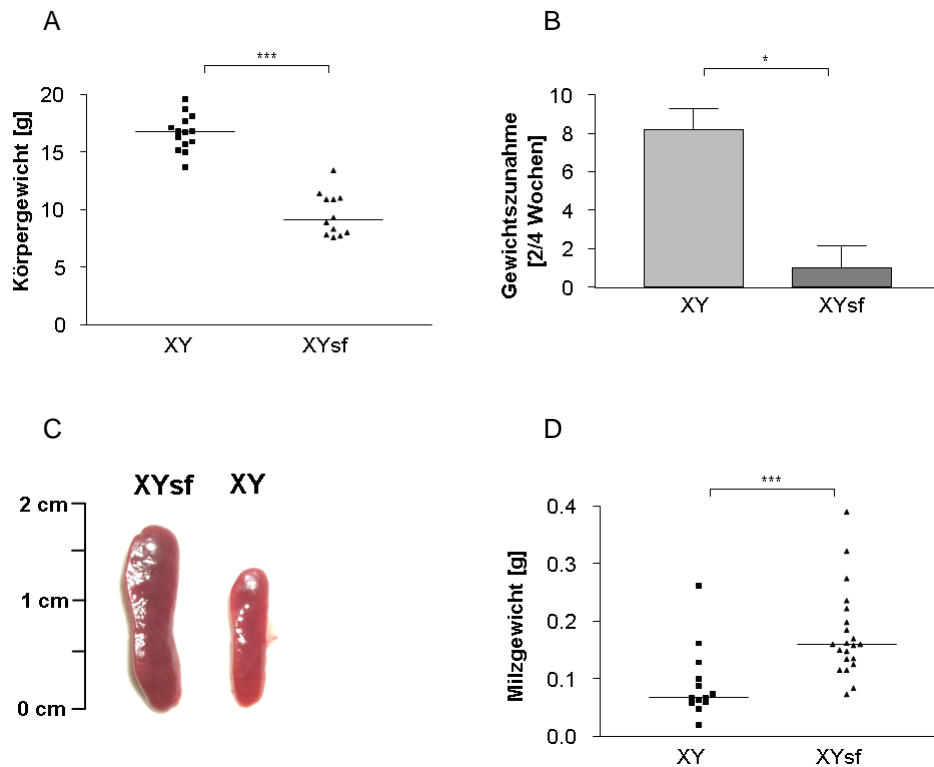


Abbildung 6: Vergleich von Körper- und Milzgewicht zum vier Wochen Zeitpunkt.

Zur Erstellung der Diagramme wurden das Gesamtkörpergewicht der Mäuse im Alter von vier Wochen (A) und die Gewichtszunahme von zwei auf vier Wochen (B) in Gramm ermittelt. (C) Vergleichende Darstellung einer vier Wochen alten XY und XYsf Milz sowie Angabe des Milzgewichts in Gramm (D). Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

2.2 Beurteilung des Nierenphänotyps

Bei vielen Autoimmunerkrankungen kommt es zu Ablagerungen von Immunkomplexen in den Glomeruli der Nieren, wodurch Organschäden hervorgerufen werden können. Die Glomeruli des Nierenrindengewebes stellen die Filtrationseinheiten der Niere dar und sind für die Ultrafiltration des Primärharns verantwortlich. Bei krankhaften Veränderungen der Nierenfunktion, wie beispielsweise im Rahmen einer Glomerulonephritis, kommt es durch abgelagerte Immunkomplexe zu einer Entzündung und Zerstörung der Glomeruli. Unter anderem werden Leukozyten angelockt und das Komplementsystem aktiviert (105, 106). Mikroskopische Untersuchungen kryokonservierter Nierenschnitte von Scurfy Tieren zeigten deutliche granuläre, membranöse und subendotheliale Immunglobulin (Ig)-Ablagerungen in den Glomeruli der Nieren. Abbildung 7 zeigt exemplarisch immunfluoreszenzmikroskopische

Ergebnisse

Aufnahmen eines Scurfy bzw. Kontrolltieres. In den Glomeruli der Nieren der Scurfy Mäuse kam es zu starken Ablagerungen der Komplement-Komponente C3 und Immunkomplexablagerungen der Isotypen IgM, IgG1, IgG2b, IgG3 und IgE. Ablagerungen des Isotyps IgG2a konnten nur in sehr geringem Masse in Scurfy Tieren nachgewiesen werden. Immunkomplexablagerungen des Isotyps IgA wurden dagegen nicht beobachtet.

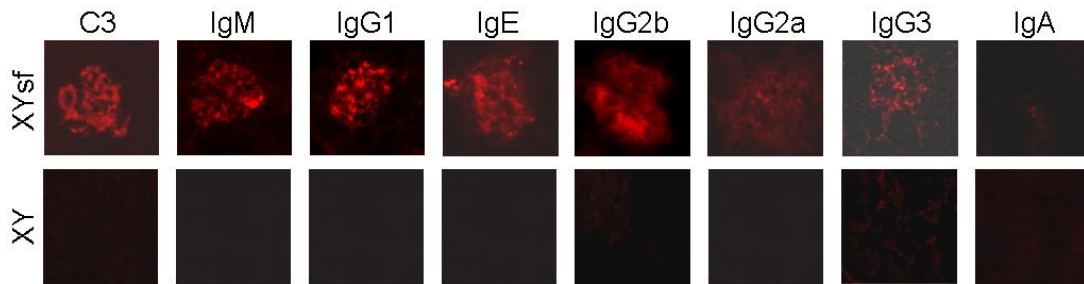


Abbildung 7: Immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von Immunkomplexablagerungen in kryokonservierten Nierenpräparaten von Scurfy und Kontrolltieren im Alter von vier Wochen.

Färbung der Nierenschnitte mit C3 bzw. Immunglobulin-spezifischem, fluoreszenzmarkiertem Antikörper. Für die Darstellung der Immunkomplexablagerungen der Isotypen IgM, IgG1, IgE, IgG2b, IgG2a, IgG3 und IgA wurden PE-markierte Antikörper verwendet. Für die Detektion der C3 Komplement Komponente wurde ein FITC-konjugierter anti-C3 Primäntikörper benutzt, der dann unter Verwendung eines anti-FITC-PE-markierten Sekundäntikörpers nachgewiesen wurde. Exemplarisch ist eine Immunfluoreszenzfärbung aus n=5 dargestellt.

Als Indikator zur Beurteilung der Nierenleistungsfähigkeit dient der Nierenretentionsparameter BUN (*Blood Urea Nitrogen*, Blut Harnstoff) im Serum. Ein zu den Kontrollmäusen erhöhter BUN-Gehalt und vergrößerte Glomeruli sind ein Indiz für eine beeinträchtigte renale Funktion. Abbildung 8A zeigt die stark erhöhte BUN-Konzentration im Serum der Scurfy Mäuse im Vergleich zu den untersuchten Wildtypen. Das arithmetische Mittel des BUN-Gehalts der Scurfy Tiere lag bei 38,91 mg/dl, wohingegen die Wildtyp Tiere bei 21,45 mg/dl liegen. Einzelne Scurfy Mäuse erreichen sogar über 70 mg/dl, weshalb von einer massiven Beeinträchtigung der renalen Funktion ausgegangen werden kann. Zudem wiesen Scurfy Tiere (Mittelwert: 5144 μm^2) im Vergleich zu Wildtyp Tieren (Mittelwert: 3474 μm^2) signifikant größere Glomeruli auf (Abbildung 8B). Weiterhin konnten in Scurfy Tieren pathologische Veränderungen der Nierenstruktur nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den Wildtyp Tieren, waren die Podozyten und glomerulären Kapillaren abgelöst von der umgebenden Bowmanschen Kapsel und deren Basalmembran. In Bereichen der distalen und proximalen Tubuli fanden sich ausgeprägte Entzündungsreaktionen, die mit dem anionischen Farbstoff Sirius Red, der aufgrund seiner Sulfonsäuregruppen die basischen Gruppen im Kollagen-Typ I Molekül anfärbt, nachgewiesen werden konnten (Abbildung 8C) (107). Makroskopisch hatten die Nieren vier Wochen alter Scurfy Mäuse eine eher blasse Farbe, was auf eine gestörte Durchblutung hindeuten könnte (Abbildung 8D). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es in den Scurfy Tieren zu einem

Ergebnisse

ausgeprägten Nieren-Phänotyp kommt. Immunkomplexablagerungen in den Glomeruli, erhöhte Serum-BUN-Werte, vergrößerte Glomeruli und starke Entzündungen in den Nieren charakterisieren die Glomerulonephritis-ähnliche Symptomatik.

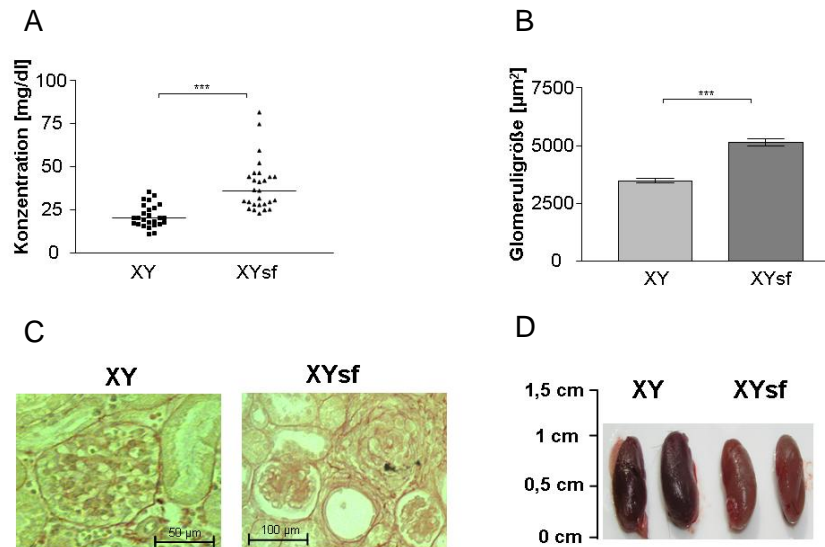


Abbildung 8: Vergleich der Nierenfunktion und histopathologischer Unterschiede in Wildtyp und Scurfy Mäusen.

(A) Vergleich der BUN Werte zum vier Wochen Zeitpunkt. Linien markieren den arithmetischen Mittelwert der untersuchten Mäuse. (B) Graphische Darstellung des arithmetischen Mittels der Größe (\pm Standardabweichung) der Glomeruli. Die Größe der Glomeruli wurde mithilfe der Axiovert® Auswerteprogramms der Firma Zeiss bestimmt. Darstellung des Signifikanzniveaus: *** $p < 0,001$ Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. (C) Exemplarische Darstellung der Entzündungsareale in Sirius Red gefärbten Nierengewebeschnitten. (D) Vergleichende Darstellung vier Wochen alter, frisch entnommener XY und XYsf Nieren.

2.3 Entzündung und zelluläre Infiltrate in der Leber

Starke Gewebsentzündungen in nicht-lymphoiden Organen gehören zu den typischen Merkmalen des autoaggressiven Phänotyps der Scurfy Maus (68). Es entstehen zahlreiche Entzündungsherde rund um die Blutgefäße, die das Lebergewebe durchziehen. Autoreaktive Leukozyten infiltrieren durch das Endothel hindurch das Gewebe und akkumulieren dort (78). Abbildung 9 zeigt mit Sirius Red angefarbte Entzündungsareale mit aktivierten infiltrierenden $CD69^+$ Leukozyten in den Lebern der Scurfy Tiere. In den Infiltraten konnten durch immunhistochemische Färbung B-Zellen ($CD19^+$), Eosinophile Zellen ($SiglecF^+$), T-Zellen ($TCR\beta^+$), DZ ($CD11c^+$), Makrophagen ($F4/80^+$) sowie $CD11b^+$ myeloide Zellen nachgewiesen werden. Das hepatische Gewebe der gesunden, gleichalten Kontrollen wies dagegen keinerlei Entzündung und zelluläre Infiltrate auf.

Ergebnisse

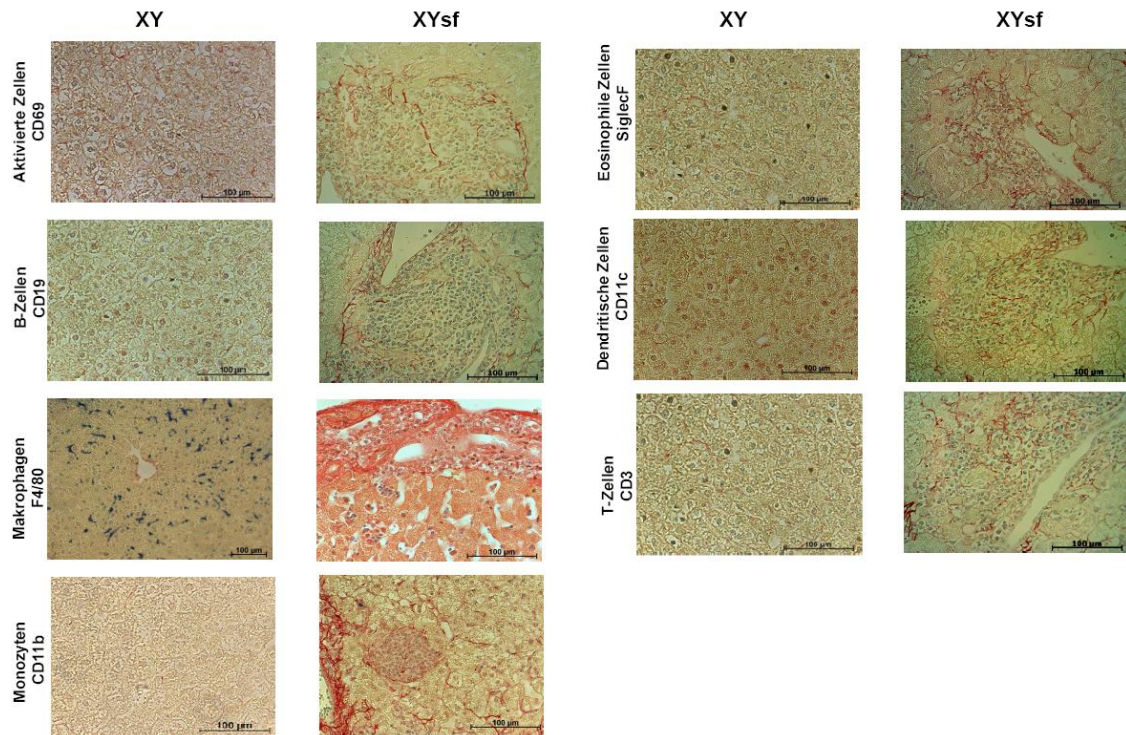


Abbildung 9: Immunhistochemische Darstellung von Zellpopulationen in Sirius Red gefärbten Lebergewebeschnitten.

Identifizierung infiltrierender Zellen in Leber-Paraffinschnitten durch sequentielle Färbung mit biotinylierten Primärantikörper des angegebenen Antigens und sekundärem Streptavidin-AKP Antikörper (blau). Bildaufnahmen in 400-facher Vergrößerung.

Des Weiteren wurden Immunfluoreszenzfärbungen durchgeführt, um einen Einblick in die Morphologie der zellulären Infiltrate zu erhalten. B-Zellen und DZ können Antigene im Verbund mit MHC-II auf ihrer Oberfläche präsentieren. Treffen diese Ag-präsentierenden Zellen (APC) auf $CD4^+$ T-Zellen, die mit ihrem T-Zellrezeptor (TZR) spezifisch an den MHC-II/Peptid-Komplex binden, kommt es zur Aktivierung der B-Zellen und zur Ausbildung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Die DZ-T-Zell-Interaktion bewirkt eine Aktivierung beider Zelltypen sowie die terminale Reifung der DZ. In der Leber der Scurfy Tiere kommt es, wie in Abbildung 10A zu sehen ist, zu einem direkten Kontakt von $CD11c^+$ DZ und $TCR\beta^+$ T-Zellen. In Scurfy Mäusen kommt es zudem zu einem räumlichen Kontakt von $B220^+$ B-Zellen und $TCR\beta^+$ T-Zellen im hepatischen Gewebe und der Ausbildung einer Follikel-ähnlichen Morphologie (Abbildung 10B). Darüberhinaus konnten in der Leber der Scurfy Tiere IgG1, IgM und IgE sekretierende Plasmazellen identifiziert werden (Abbildung 11).

Ergebnisse

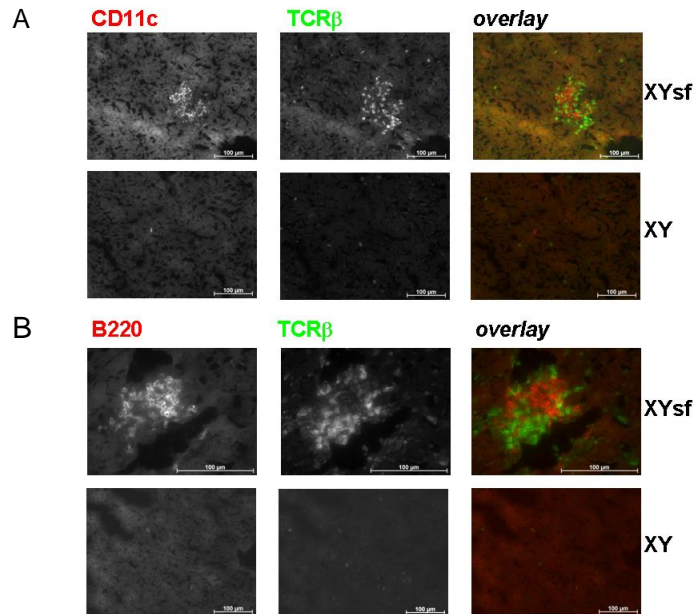


Abbildung 10: Immunhistochemische Detektion der Interaktion von T-Zellen mit APC in Leberpräparaten von Scurfy Tieren.

(A) Identifizierung der DZ und T-Zellen mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper gegen CD11c und TCRβ. (B) B- und T-Zellen wurden mittels der Marker B220 und TCRβ identifiziert. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Ergebnisse

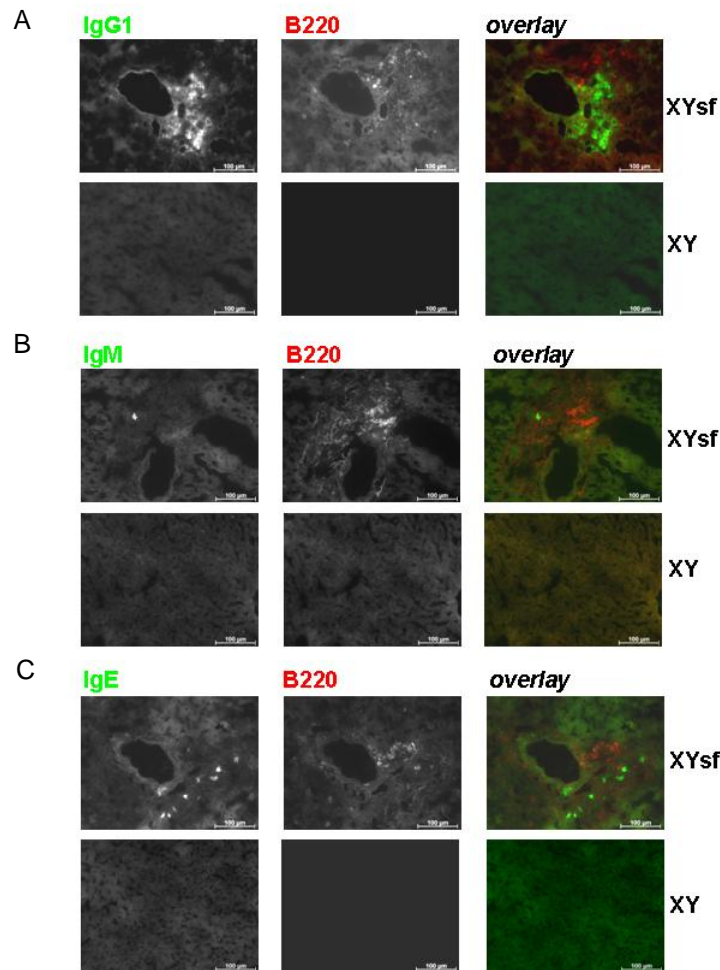


Abbildung 11: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von IgM, IgG1 und IgE sekretierenden Plasmazellen in Leberpräparaten der Scurfy Tiere.

Identifizierung der IgG1 (A), IgM (B) und IgE (C) positiven Plasmazellen mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper sowie B220 positiver B-Zellen. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

2.4 Veränderungen im Anteil von Immunzellen in lymphoiden Organen

Es ist bekannt, dass es im Scurfy Mausmodell zu Veränderungen in der B-Zellentwicklung, zu einer Hyperproliferation der T-Zellen sowie einer Leukozytose der myeloide Zellen kommt (68, 78, 79). Abbildung 12 zeigt B-Zellen, T-Zellen und CD11b⁺ myeloide Zellen anteilig zur Gesamtbesiedelung von Milz, Blut, Knochenmark und Lymphknoten. Milzen der Scurfy Tiere waren im Mittel von 50% T-Zellen besiedelt, CD11b⁺ myeloide Zellen stellten 27% der Gesamtzellen dar und nur 10% machten B-Zellen aus. In den gesunden Kontrollen lag der Anteil der T-Zellen bei 24% und den größten Anteil machten B-Zellen aus (47%). Auch CD11b⁺ myeloide Zellen waren im Vergleich zu den Scurfy Tieren anteilig reduziert (12%) (Abbildung 12A). Im Blut der Kontrolltiere machten B-Zellen mit 59% den Hauptanteil aus. T-Zellen lagen bei 9% und CD11b⁺ Zellen hatten einen Anteil von 19% an der Gesamtheit der Blutzellen (Abbildung 12B). Vergleicht man dabei die Scurfy Tiere, konnte festgestellt werden, dass CD11b⁺ Zellen stark expandiert waren (62%) und B-Zellen nur noch 4% der Gesamtzellen ausmachten. Auch T-Zellen zeigten mit 27% einen erheblichen

Ergebnisse

Anstieg. Die enorme Reduktion der B-Zellen war auch im Knochenmark der Scurfy Tiere detektierbar (3%, im Vergleich: Wildtyp 23%). Eine ähnliche Verteilung in Wildtyp und Scurfy Mäuse zeigten T-Zellen (Wildtyp 4%; Scurfy 3%), und CD11b⁺ myeloide Zellen (Wildtyp 65%; Scurfy 52%). Allerdings konnte ein großer Anteil der Zellen im Knochenmark der Scurfy Tiere nicht mit den verwendeten Markern identifiziert und charakterisiert werden (Abbildung 12C). Die zelluläre Zusammensetzung der Lymphknoten in Scurfy und Wildtyp Tieren war mit der der jeweiligen Milzen vergleichbar. T-Zellen hatten in Kontrolltieren einen Anteil von 23%. Vergleicht man hierzu Scurfy Tiere, lag der Anteil von T-Zellen bei 48%. B-Zellen waren im Lymphknoten der Scurfy Tiere verglichen mit Wildtyp Tieren reduziert (Wildtyp 54%; Scurfy 27%). Ein ähnlicher Anteil von CD11b⁺ myeloiden Zellen konnte in Wildtyp und Scurfy Mäusen beobachtet werden (Wildtyp 5%; Scurfy 9%) (Abbildung 12D). Tabellarisch ist die prozentuale Zusammensetzung der Zellpopulationen mit Standardabweichungen der einzelnen Scurfy und Wildtyp Individuen gezeigt (Tabelle 2). Zusammengefasst konnte festgestellt werden, dass das B-Zell-Kompartiment der Scurfy Individuen in allen immunologisch relevanten Organen reduziert war. T-Zellen und CD11b⁺ Zellen waren im Blut, in der Milz und im Lymphknoten im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren expandiert.

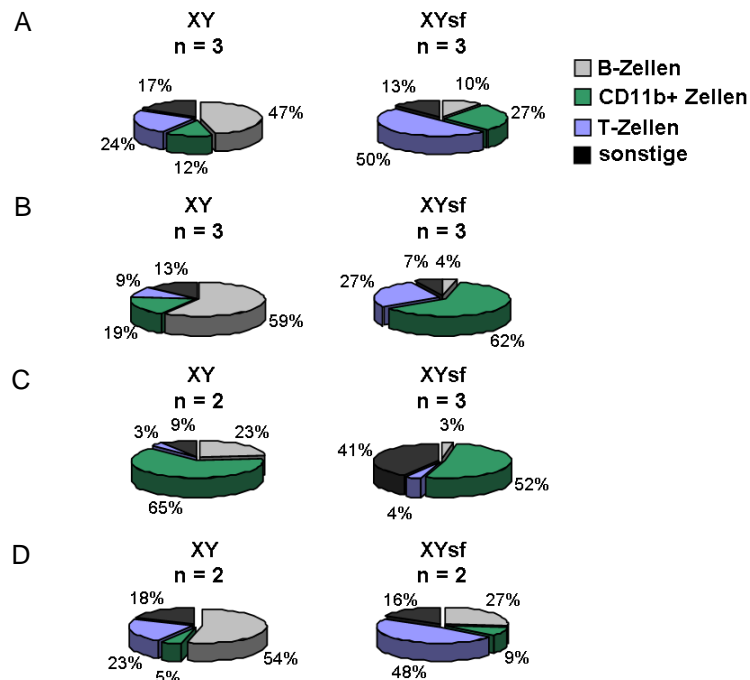


Abbildung 12: Durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung der Zellpopulationen in Scurfy und Wildtyp Tieren.

Darstellung der Zellpopulationen anteilig zur Gesamtbesiedelung in Milz (A), Blut (B), Knochenmark (C) und Lymphknoten (D). B-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für die Antigene B220 und CD19 bestimmt. T-Zellen wurden mit TCR β spezifischen Antikörpern detektiert und CD11b⁺ Zellen konnten mit einem Antikörper der spezifisch das CD11b Molekül bindet nachgewiesen werden.

Ergebnisse

Tabelle 2: Zusammensetzung der Zellpopulationen der einzelnen Scurfy und Kontrolltiere.

	B-Zellen	CD11b ⁺ - Zellen	T-Zellen	sonstige
Milz XYsf n = 3	10 14 6,89	30 22 30,46	43 62,15 43,56	17 1,85 19,09
Standardabweichung	± 3,564	± 4,757	± 10,898	± 9,408
Milz XY n = 3	52 62 24,06	10 10,02 17,03	25 26 21,26	13 1,8 37,65
Standardabweichung	± 19,664	± 4,002	± 2,498	± 18,340
Blut XYsf n = 3	2 3 5,25	82 43,45 62	7 46,84 19	9 4,46 13
Standardabweichung	± 1,625	± 19,300	± 20,048	± 3,936
Blut XY n = 3	63 54,08 58	24 14,04 34	12 6,34 7	1 25,54 1
Standardabweichung	± 4,474	± 9,980	± 3,090	± 9,180
Knochenmark XYsf n = 3	3,7 0,39 3,96	25 82 48,78	5 4 3,6	66,3 13,61 43,7
Standardabweichung	± 1,990	± 28,629	± 0,721	± 26,433
Knochenmark XY n = 2	25,3 20	57 74	1,5 3,7	16,2 2,3
Standardabweichung	± 3,747	± 12,020	± 1,555	± 9,828
Lymphknoten XYsf n = 2	33 21,91	13 4	23 72,5	31 1,59
Standardabweichung	± 7,841	± 6,363	± 35,001	± 20,796
Lymphknoten XY n = 2	54 53,1	5,1 5,3	23 24	17,9 17,6
Standardabweichung	± 0,636	± 0,141	± 0,707	± 0,212

2.5 Veränderung in der Milzarchitektur

Wie bereits in Abbildung 6C und D gezeigt, kam es in den Mutanten zu einer ausgeprägten Splenomegalie. Auch beim Vergleich der Milzarchitektur von Wildtyp und Scurfy Tieren zeigten sich gravierende Unterschiede (Abbildung 13). In Milzschnitten von C57BL/6 Tieren waren geordnete follikuläre Strukturen zu beobachten. Der B-Zellfollikel war hier umrandet von Moma⁺ und Marco⁺ Marginalzonenmakrophagen. Die Milzarchitektur und die follikuläre Struktur einer Scurfy Maus dagegen war, verglichen mit der einer Wildtyp Maus, weitgehend aufgelöst. In Übereinstimmung mit den FACS Daten waren erheblich verkleinerte B-Zellzonen und eine starke Expansion von Moma⁺ metallophilen Makrophagen in der Marginalzone und der roten Pulpa zu beobachten (Abbildung 13B). Die Organisation der Marco⁺ Marginalzonen Makrophagen schien auch nicht auf den Marginalsinus beschränkt zu sein. Vielmehr fanden sich auch Marco⁺ Zellen in der roten Pulpa (Abbildung 13A).

Ergebnisse

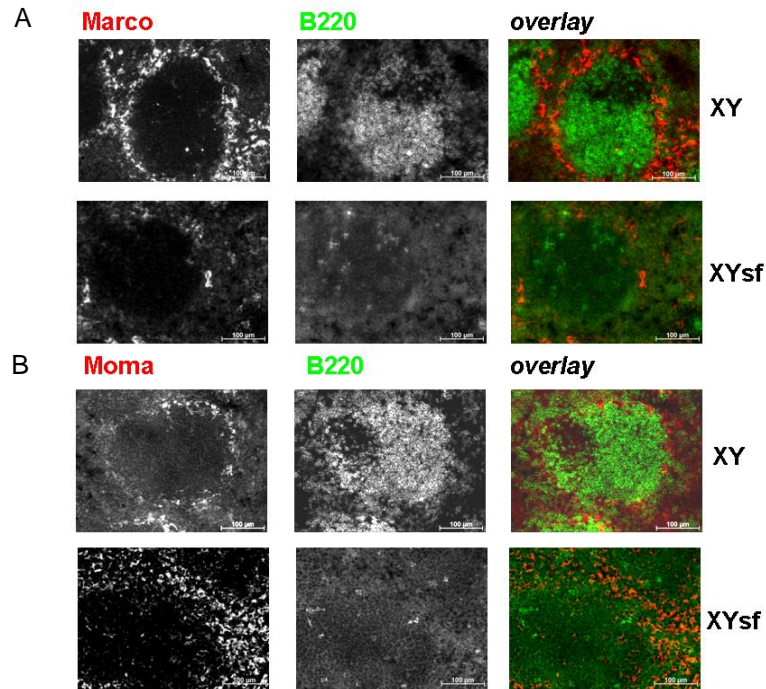


Abbildung 13: Immunhistologischer Vergleich der follikulären Organisation der Milzen von Wildtyp und Scurfy Tieren.

Färbung der kryokonservierten Milzschnitte mit Antikörpern spezifisch für (A und B) B-Zellen (B220-Alexa488, grün) und Marginalzonen Makrophagen-Antigene. Metallophile Makrophagen (A), Marginalzonen Makrophagen (B) und B-Zellen wurden mittels der Marker Moma (rot), Marco (rot) und B220 (grün) identifiziert. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Aktivierte Zellpopulationen in der Milz wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen mit dem Aktivierungsmarker CD69 nachgewiesen. In gesunden Kontrolltieren konnten nur vereinzelt CD69⁺ Zellen in der Milz detektiert werden (Abbildung 14). Dagegen kam es in der Milz der Scurfy Tiere zur Akkumulation von aktivierten Zellen. Bei den aktivierten CD69⁺ Zellen handelte es sich vor allem um CD4⁺ CD3⁺ T-Helfer-Zellen und Dendritische Zellen. Weiterhin war eine Akkumulation von CD11b⁺ Leukozyten und SiglecF⁺ Eosinophilen im Randbereich der CD69⁺ Zellen zu erkennen (Abbildung 14B).

Ergebnisse

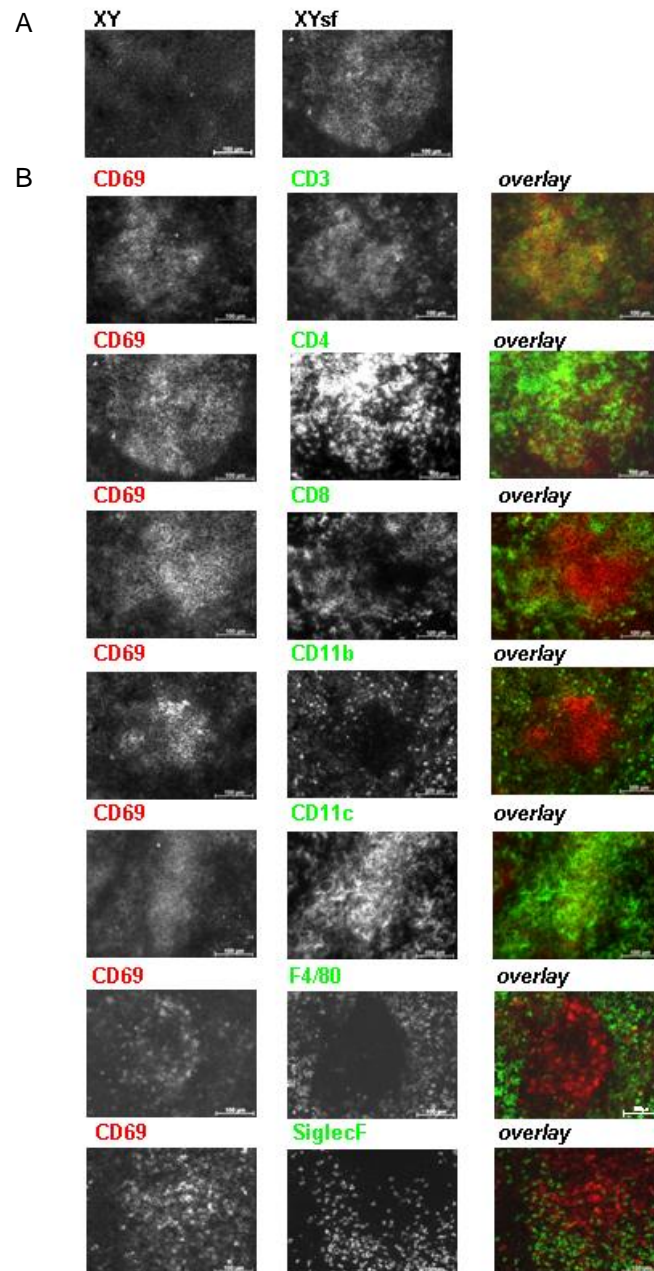


Abbildung 14: Charakterisierung aktivierter Bereiche in der Milz mittels Immunfluoreszenz.

(A) Detektion aktivierter Zellen mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper gegen CD69, in kryokonservierten Milzpräparaten vier Wochen alter XY und XYsf Tiere. (B) Aktivierte Zellen und andere Leukozytenpopulationen wurden mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper gegen CD69, CD3, CD4, CD8, CD11b, CD11c, F4/80 und SiglecF in XYsf Tieren angefärbt. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

2.6 Veränderungen im Zytokinmilieu

Die von Immunzellen sezernierten Zytokine koordinieren Differenzierung, Zellwachstum und übernehmen regulatorische Aufgaben in der Immunabwehr (108). Im Scurfy Mausmodell konnte bereits eine Deregulation verschiedener Zytokine beobachtet werden (70, 80). Neben erhöhten IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10 Konzentrationen, die auf eine verstärkte Th-2 Immunreaktion schließen lassen, konnten auch gesteigerte Th-1 spezifische Zytokine

Ergebnisse

identifiziert werden (Interferon-gamma $\text{IFN-}\gamma$, Tumornekrosefaktor-alpha $\text{TNF-}\alpha$). Dagegen war IL-17 im Scurfy Mausmodell nicht erhöht (109).

Durchflusszytometrische Untersuchungen dieser Arbeit zeigten eine starke Expansion myeloider Zellen im Scurfy System (Abbildung 12). Diese Zellen könnten als potentielle Produzenten pro-inflammatorischer Zytokine wirken. Deshalb sollten in dieser Arbeit neben den Leitzytokinen der Th-1 ($\text{IFN-}\gamma$ und $\text{TNF-}\alpha$ sowie IL-1 β) und der Th-2 Immunantwort (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) zusätzlich von Monozyten und Makrophagen sezernierte Zytokine und Chemokine (*Macrophage Inflammatory Protein-1* MIP-1 α , *Monocyte chemotactic Protein alpha* MCP-1) untersucht werden. Die Zytokine und Chemokine wurden in den Seren der vier Wochen alten Wildtyp und Scurfy Tiere mittels *Cytometric Bead Array* (CBA) analysiert (Abbildung 15).

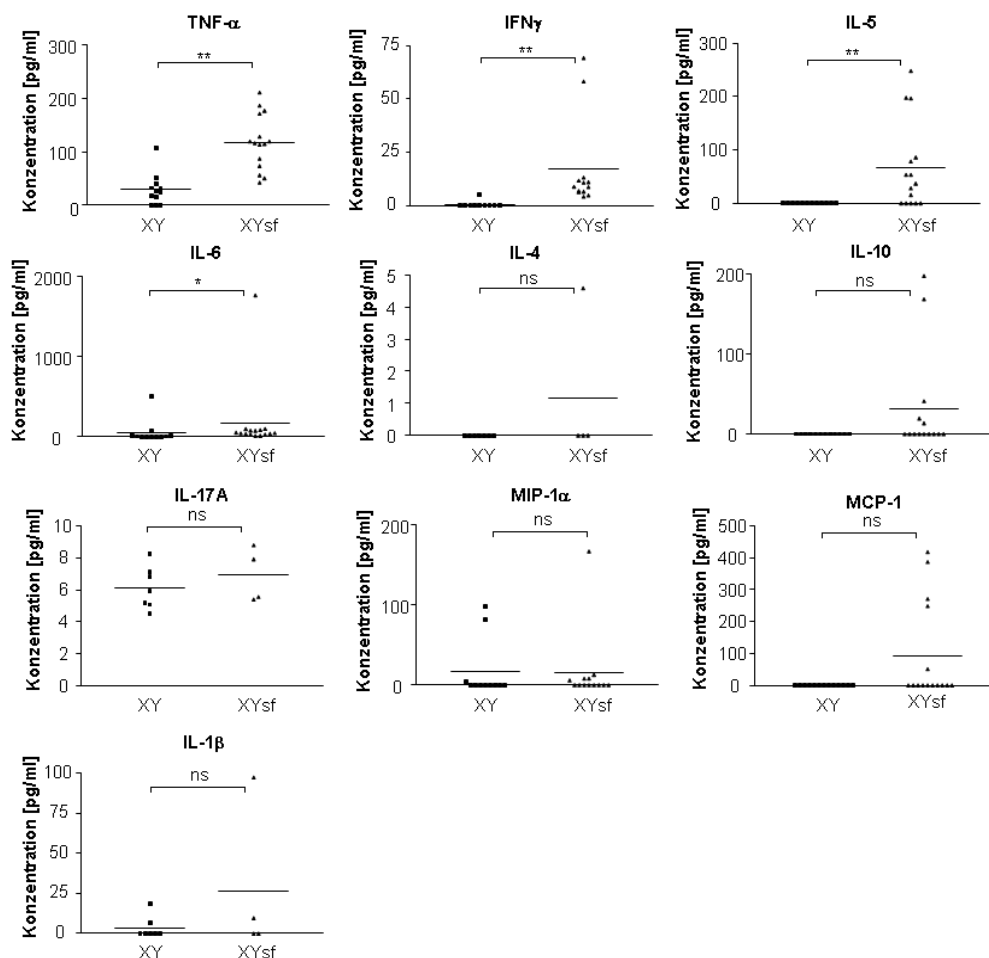


Abbildung 15: Darstellung spezifischer Zytokin-Konzentrationen im Serum vier Wochen alter Wildtyp und Scurfy Mäuse.

Analyse der Konzentration der angegebenen murinen Zytokine mittels *Cytometric Bead Array*. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Ergebnisse

Es konnte ein signifikanter Anstieg der pro-inflammatorischen Th-1 Zytokine TNF- α und IFN- γ in vier Wochen alten Scurfy Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren bestätigt werden. Des Weiteren konnte ein signifikanter Anstieg der charakteristischen Th-2 Zytokine IL-5 und IL-6 in Scurfy Mäusen belegt werden. Diese Zytokine fördern vorwiegend B-Zellproliferation und – differenzierung und tragen zur Vermehrung von Eosinophilen Zellen bei (65, 110, 111). IL-4 spielt eine wichtige Rolle in der Homöostase des Immunsystems. Es differenziert naive CD4⁺ T-Zellen (Th-0) zu Th-2 Zellen, denen generell eine anti-inflammatorische Rolle zugeschrieben wird. Diese sind auch die Hauptquelle der IL-4 Produktion. Außerdem stimuliert es B-Zellen zur Bildung der IgE-Subklasse und fördert die Bildung von Eosinophilen Zellen (112). In den Scurfy Mäusen kam es nur in einer einzelnen Maus zu leicht erhöhten IL-4 Konzentrationen, womit der Anstieg der IL-4 Konzentration, wie aus der Literatur bekannt, nicht bestätigt werden konnte (109). Darüber hinaus konnte keine signifikante Erhöhung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 und des Th-17 Zytokins IL-17 nachgewiesen werden. Ferner konnten erhöhte Konzentrationen der Chemokine MIP-1 α und MCP-1 nur in einzelnen Individuen identifiziert werden. Beiden Chemokinen wird eine Rolle bei der Chemotaxis und somit der Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems an den Ort der Entzündung zugesprochen (113, 114). IL-1 β wird hauptsächlich von Blut-Monozyten produziert und bewirkt die Mobilisierung von Neutrophilen und einen Anstieg von IL-6 (115). Es scheint allerdings im Scurfy Mausmodell keine Rolle zu spielen.

3. Humorale Toleranz der Scurfy Maus

Es gibt zahlreiche Hinweise auf die Rolle der T_{Regs} bei der Modulation der Autoantikörper produzierenden B-Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass T_{Regs} fähig sind *in vitro* B-Zellen direkt zu eliminieren oder die Bildung von Autoantikörpern zu supprimieren (100, 102, 116). Bereits Godfrey und Kollegen konnten die Produktion von Autoantikörpern in der Scurfy Maus nachweisen (68). Für den pathogenen Verlauf des autoaggressiven Phänotyps des Scurfy Mausmodells könnten Autoantikörper verschiedener Spezifitäten eine sehr wichtige Rolle spielen. Daher sollten im Folgenden die Autoantikörper in der Scurfy Maus bestimmt und quantifiziert werden.

3.1 Quantifizierung von Antikörpern im Serum

Im Serum der untersuchten Tiere wurde die Menge an Immunglobulinen quantitativ mittels der ELISA (*Enzyme linked immunoabsorbent assay*) -Technik bestimmt. Abbildung 16 zeigt eine Hypergammaglobulinämie in den Scurfy Mäusen. Die Immunglobulinkonzentration des Isotyps IgM war in Scurfy Mäusen (Mittelwert 1,398 mg/ml) im Vergleich zu den Wildtyp Tieren (Mittelwert 0,088 mg/ml) signifikant erhöht. In den Seren der vier Wochen alten Scurfy Tiere zeigten sich auch signifikante Erhöhungen der Immunglobuline der Isotypen IgG1

Ergebnisse

(Mittelwert Scurfy 4,496 mg/ml; Wildtyp 0,40 mg/ml) und IgE (Mittelwert Scurfy 0,084 mg/ml; Wildtyp 0,003 mg/ml) verglichen mit Wildtyp Tieren. Gesunde Kontrolltiere (Mittelwert 0,382 mg/ml) hatten im Vergleich zu gleichaltrigen Scurfy Tieren (Mittelwert 0,936 mg/ml) außerdem signifikant weniger IgG3 im Serum. Auch die Konzentration von IgA war in den Wildtyp Tieren (Mittelwert 0,144 mg/ml) signifikant reduziert gegenüber Scurfy Individuen (Mittelwert 0,476 mg/ml). Die quantitative Bestimmung der Subklassen IgG2c und IgG2b ergab keine signifikanten Unterschiede in den beiden Mausgruppen (Mittelwert IgG2c: Scurfy 0,057 mg/ml; Wildtyp 0,055 mg/ml; Mittelwert IgG2b: Scurfy 0,231 mg/ml; Wildtyp 0,1588 mg/ml).

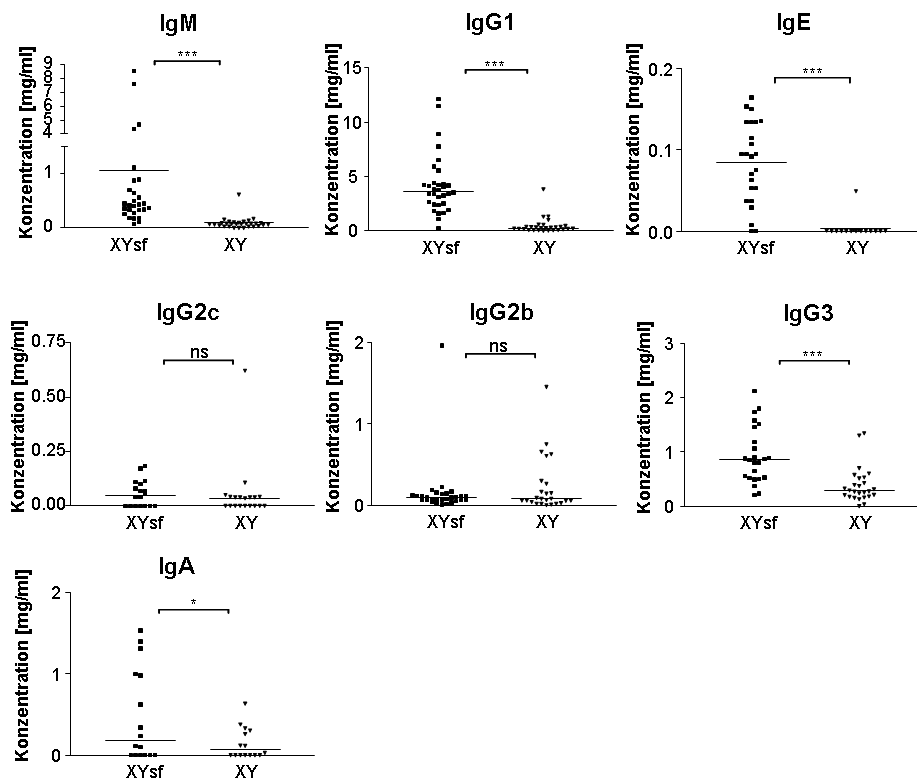


Abbildung 16: Quantifizierung verschiedener Immunglobuline im Serum vier Wochen alter Wildtyp und Scurfy Mäuse.

Analyse der Konzentration der angegebenen murinen Immunglobuline mittels ELISA. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

3.2 Charakterisierung der Plasmazellen in immunologischen Organen

Plasmazellen und Plasmablasten sind für die Herstellung von Antikörpern verantwortlich und lassen sich durch die Expression des Oberflächenmarkers CD138 charakterisieren. Immunhistologische Untersuchungen kryokonservierter Milzen von vier Wochen alten Scurfy und Wildtyp Kontrollmäusen zeigten eine erhöhte Anzahl CD138 positiver Zellen in der Milz (Abbildung 17), deren Isotyp der sekretierten Immunglobuline bestimmt werden konnte. In Übereinstimmung mit den ELISA Daten in Abbildung 16, fanden sich in den Scurfy Tieren große Ansammlungen IgM, IgG1 und IgE produzierender Plasmazellen. In gesunden, gleichaltrigen Kontrollmäusen fanden sich vor allem IgM⁺ Plasmazellen.

Ergebnisse

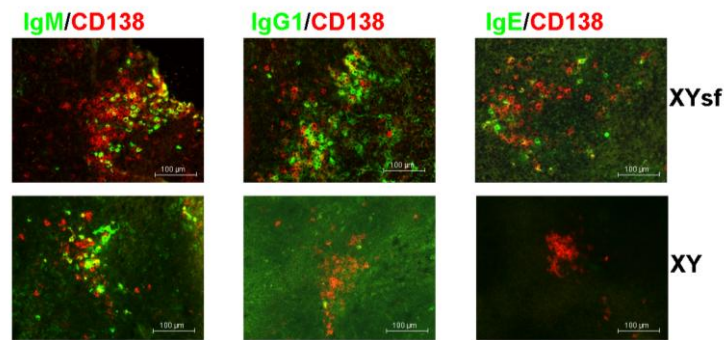


Abbildung 17: Immunhistologische Darstellung der Ig-sekretierenden Plasmazellen in der Milz von Wildtyp und Scurfy Tieren.

Färbung der kryokonservierten Milzschnitte mit Antikörpern spezifisch für Plasmazellen- (CD138-PE, rot) und Immunglobuline der Subklassen IgM, IgG1, IgE (grün). Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

3.3 Analyse der Antikörper-sezernierenden Zellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark

Ein erhöhter Serumantikörper-Titer in Scurfy Mäusen könnte einerseits auf die Stimulation der Antikörpersekretion einzelner Zellen, andererseits auf eine erhöhte Anzahl der Antikörper-sezernierenden Zellen zurückzuführen sein. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der IgM, IgG und IgE sezernierenden Zellen mit Hilfe der ELISPOT-Technik in Milz, Lymphknoten und Knochenmark der Scurfy und Wildtyp Mäuse bestimmt. In Abbildung 18A sind charakteristische Bilder von jeweils einer Vertiefung einer Wildtyp und einer Scurfy Maus in der Milz dargestellt. Die dunklen Punkte (*spots*), die vermehrt in den Scurfy Tieren nachweisbar waren und in Wildtyp Tieren nahezu komplett fehlten, repräsentieren je eine Antikörper-sezernierende Zelle. Die in Abbildung 18B-D zusammengefassten Ergebnisse von Milz, Lymphknoten und Knochenmark belegen einen Anstieg IgM, IgG und IgE sezernierender Zellen in den Organen der Scurfy Mäuse. Nur die Anzahl der IgM produzierenden Plasmazellen im Knochenmark war, verglichen mit Wildtyp Tieren, in Scurfy Mäusen nicht erhöht.

Ergebnisse

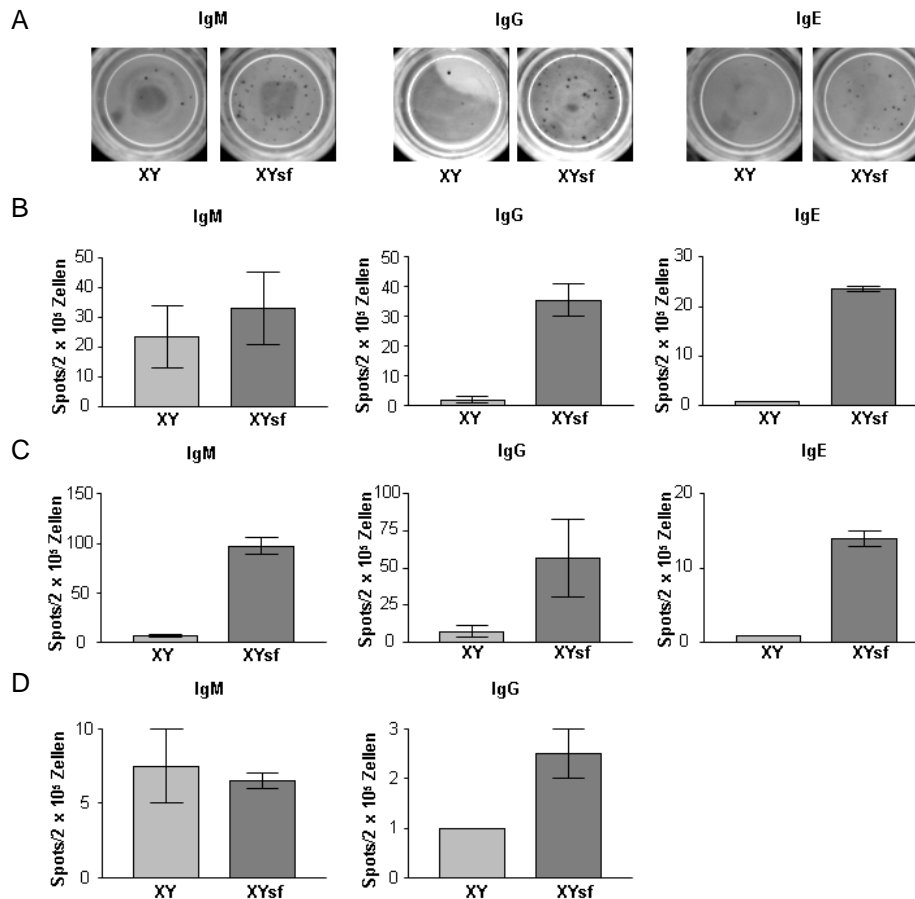


Abbildung 18: Ig-sezernierende Zellen in Milz, Lymphknoten und Knochenmark von Wildtyp und Scurfy Mäusen.

(A) Repräsentative Abbildungen je einer Vertiefung der ELISPOT-Analyse für IgM-, IgG- und IgE-sezernierende Zellen in der Milz. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen der Anzahl IgM-, IgG- und IgE-sezernierender Zellen in Milz (B), Lymphknoten (C) und Knochenmark (D) repräsentativ aus $n=3$ unabhängigen Experimenten.

3.4 Identifizierung und semiquantitative Bestimmung von Autoantikörpern

Nach der Quantifizierung von Antikörpern und Antikörper-produzierenden B-Zellen sollten anschließend Autoantikörper identifiziert und semiquantitativ bestimmt werden. Abbildung 19A zeigt die Bestimmung von Autoantikörpern gegen Glucose-6-Phosphat-Isomerase (anti-GPI) vom Isotyp IgM (oben) und IgG1 (unten) im Serum vier Wochen alter Wildtyp und Scurfy Individuen. Die Scurfy Tiere hatten verglichen mit den Kontrollen signifikant erhöhte Konzentrationen an GPI-spezifischen IgM und IgG1 Immunglobulinen. Auch die Konzentration von Antikörpern gegen körpereigenes IgG, den sogenannten Rheumafaktor (anti-RF) zeigte in Scurfy Mäusen eine signifikante Erhöhung in den Isotypen IgM und IgG1 (Abbildung 19B). Die semiquantitative Analyse von Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA) vom Isotyp IgM und IgG1 (Abbildung 19C) zeigte in den Scurfy Mäusen gegenüber den gesunden Kontrollen ebenfalls einen signifikanten Anstieg.

Ergebnisse

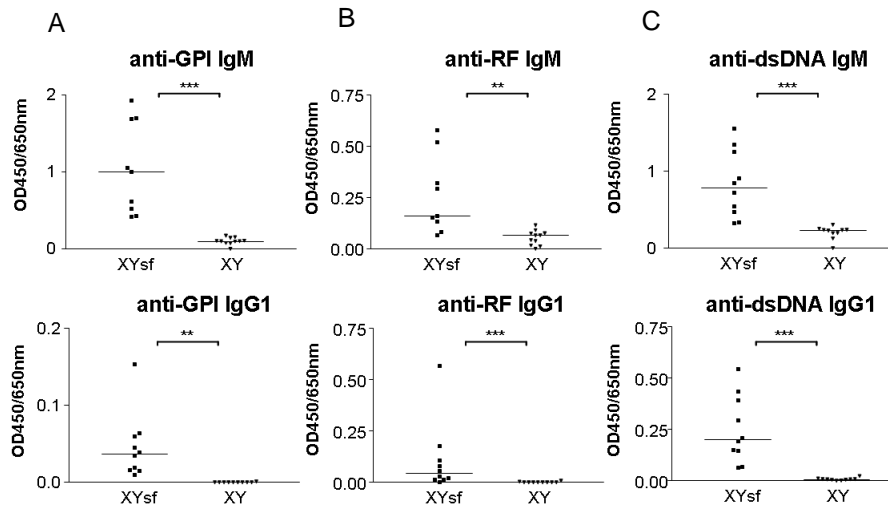


Abbildung 19: Analyse spezifischer Autoantikörper in Seren vier Wochen alter Mäuse.

Identifizierung und semiquantitative Analyse von anti-GPI (A), anti-RF (B) und anti-dsDNA (C) Antikörpern im Serum von XY und XYsf Individuen über ELISA-Technik. Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe nach Abzug des Hintergrundsignals (650nm) bei einer Wellenlänge von 450nm. Linien markieren den Median. Darstellung des Signifikanzniveaus: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Auch mittels Immunfluoreszenz konnten Autoantikörperspezifitäten nachgewiesen werden. Das Autoantikörperrepertoire der Scurfy Tiere war sehr unterschiedlich. Es zeigten sich zytoplasmatische, perinukleäre und nukleäre Färbungen der HEp2-Zellen (Abbildung 20), die mit Serum der Scurfy Tiere inkubiert wurden. Es konnten v.a. Autoantikörper der Isotypen IgM und IgG1 detektiert werden, die sich an zellulären Bestandteilen der HEp2-Zellen ablagerten.

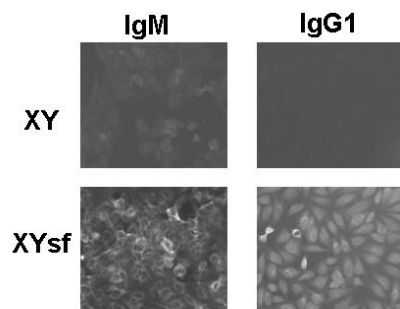


Abbildung 20: Nachweis Anti-Nukleärer Antikörper in Wildtyp und Scurfy Tieren.

Repräsentative Abbildung zur Detektion polyreaktiver Autoantikörper mittels HEp-2-Zellen. Serum der XY und XYsf Tiere wurde auf HEp-2 beschichteten Objektträgern inkubiert. Die Detektion der gebundenen Antikörper erfolgte mittels fluoreszenz-konjugierter Antikörpern gegen IgM und IgG1.

Zudem zeigten Untersuchungen am Hämatozytometer signifikant verminderte Thrombozytenzahlen im Blut der Scurfy Tiere (Mittelwert $540,39 \times 10^3$ pro μl Blut) verglichen mit Kontrolltieren (Mittelwert 1221×10^3 pro μl Blut), zum Zeitpunkt von vier Wochen (Abbildung 21A).

Ergebnisse

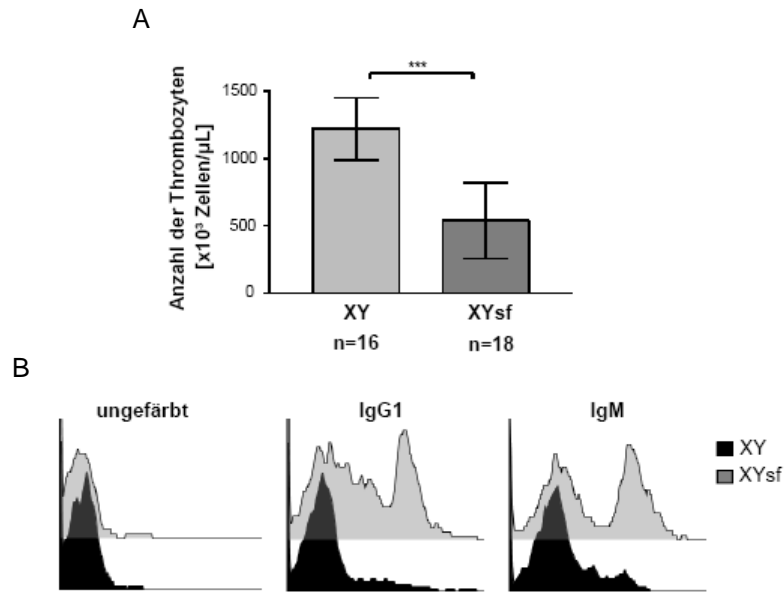


Abbildung 21: Bestimmung der Thrombozytenzahl und Nachweis von anti-Thrombozyten Antikörpern.

(A) Darstellung der Thrombozytenzahl aus dem Vollblut der Mäuse am Hämatozytometer (Advia® Siemens). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. (B) Durchflusszytometrischer Nachweis von anti-Thrombozyten Antikörpern im Serum der XY und XYsf Tiere. Dargestellt ist die Bindung der im Serum enthaltenen Autoantikörper an CD61⁺ Thrombozyten.

Daher wurde untersucht, ob in Scurfy Tieren gegen Thrombozyten gerichtete Autoantikörper gebildet werden. Die in Abbildung 21B dargestellten Histogramme zeigen die Präsenz von anti-Thrombozyten Antikörpern der Isotypen IgM und IgG1 im Serum der Scurfy Tiere. Für den Nachweis wurden zunächst Thrombozyten aus C57BL/6 Vollblut angereichert, diese wurden dann mit Wildtyp bzw. Scurfy Serum versetzt. Die Detektion von anti-Thrombozyten Antikörpern, gebunden an CD61⁺ Thrombozyten erfolgte dann mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern (IgM-/IgG1-FITC) im FACS.

II. Einfluss von B-Zellen auf die Autoimmunpathologie in der Scurfy Maus

Wie in den vorherigen Abschnitten dargestellt, kommt es in Scurfy Mäusen zu einem Verlust der humoralen Toleranz und zum Auftreten verschiedener Autoimmunphänotypen. Um nachzuweisen, welche der unterschiedlichen Erkrankungen tatsächlich durch B-Zellen und von B-Zellen produzierten Antikörpern ausgelöst werden, sollte ein genetischer Ansatz gewählt werden. Hierfür wurden *foxp3* heterozygote Weibchen mit $\mu\text{MT Knockout}$ Männchen verpaart. Die Deletion des μMT -Gens, das für die schwere Kette (μ -Kette) des B-Zellrezeptors (BZR) kodiert, führt zu einem frühzeitigen Abbruch der B-Zellentwicklung bereits im Prä-B-Zellstadium und damit zur Abwesenheit Antikörper produzierender reifer B-Zellstadien (117). Die weiblichen Nachkommen der F1-Generation mit dem $\mu\text{MT}^{\pm}/\text{foxp3}^{\pm}/\text{}$

Ergebnisse

Genotyp wurden anschließend erneut mit μ MT^{-/-} Männchen rückgekreuzt, um für das μ MT Allel homozygote Nachkommen zu erzeugen. Die männlichen Nachkommen dieser F2-Generation, die nach Mendel zu 50% das X-Chromosom mit Mutationsdefekt im *foxp3* Gen (μ MT^{-/-} Scurfy) und zu 50% das gesunde X-Chromosom (μ MT^{-/-}) erben, wurden für die Analysen der Arbeit verwendet.

1. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die im Scurfy Mausmodell auftretende Autoimmunität

Durch die Mutation im μ MT-Gen entwickeln sich keine Antikörper-produzierenden reifen B-Zellstadien (117). Die Abwesenheit von B-Zellen in Scurfy μ MT^{-/-} Tieren wurde über FACS Analysen (Abbildung 22A) und das Fehlen von Antikörpern über ELISA Assays bestätigt (Abbildung 22B). Verglichen mit Scurfy Tieren waren Antikörper im Serum der μ MT^{-/-} Scurfy Mäuse hoch signifikant reduziert. Die Immunglobulinkonzentration des Isotyps IgM war in Scurfy μ MT^{-/-} Mäusen (Mittelwert 0,038 mg/ml) im Vergleich zu den Wildtyp μ MT^{-/-} Tieren (Mittelwert 0,007 mg/ml) nicht signifikant erhöht. Keine signifikante Erhöhung der Konzentration in den Seren der vier Wochen alten Scurfy μ MT^{-/-} Tiere zeigten auch IgG1 (Mittelwert Scurfy μ MT^{-/-} 0,303 mg/ml; Wildtyp μ MT^{-/-} 0,177 mg/ml) und IgE (Mittelwert Scurfy μ MT^{-/-} 0,001 mg/ml; Wildtyp μ MT^{-/-} 0,000 mg/ml) verglichen mit Wildtyp μ MT^{-/-} Tieren.

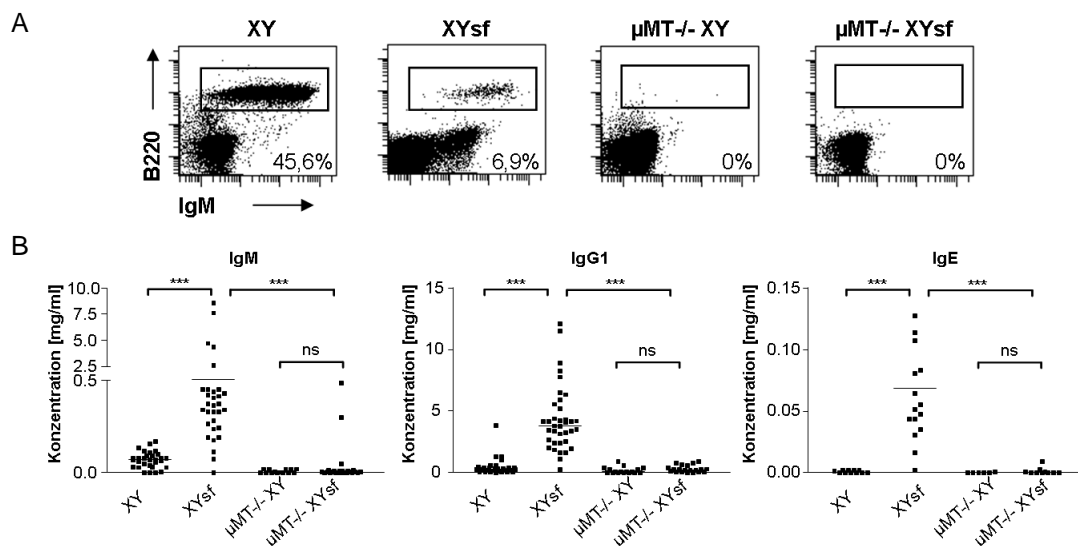


Abbildung 22: B-Zellen und Serum Antikörper in Scurfy μ MT^{-/-} Mäusen.

(A) Durchflusszytometrische Analyse der reifen IgM⁺ B220⁺ B-Zellstadien im Blut vier Wochen alter Wildtyp und Scurfy Mäuse sowie B-Zelldefizienter Tiere. (B) Bestimmung der Gesamtkonzentration der Immunglobuline im Serum vier Wochen alter Wildtyp und Scurfy Mäuse sowie B-Zelldefizienter Tiere. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: *** p<0,001, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Ergebnisse

Die in Abbildung 23A dargestellte Überlebenskurve zeigt eindrücklich, dass es in Abwesenheit von B-Zellen zu einem signifikant verlängerten Überleben der Tiere kommt. Bei den Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tieren stieg die Lebensspanne im Median auf 77,5 Tage an. Bereits die heterozygoten Scurfy $\mu\text{MT}^{+/-}$ Tiere (Median 52 Tage) zeigten, gegenüber den Scurfy Tieren (Median 28 Tage) eine signifikant verlängerte Lebensdauer. Neben dem verlängerten Überleben konnte eine signifikante Erhöhung des Körpergewichtes der Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tiere (Mittelwert 12,05g) im Vergleich zu den Scurfy Tieren (Mittelwert 9,6g) festgestellt werden (Abbildung 23B). Allerdings war in den Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tieren noch immer eine signifikante Reduktion gegenüber dem $\mu\text{MT}^{-/-}$ Genotyp (Mittelwert 17,93g) detektierbar. Die ausgeprägte Splenomegalie in den Scurfy Individuen war in den Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tieren (Mittelwert Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$: 0,106g; Mittelwert Scurfy: 0,177g) nicht mehr nachweisbar (Abbildung 23C und D). Zusammenfassend wurde aus diesen Daten ersichtlich, dass die körperliche Entwicklung der Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tiere verglichen mit Scurfy Individuen Verbesserungen hinsichtlich der Lebenserwartung, des Körpergewichtes und der Splenomegalie zeigten.

Ergebnisse

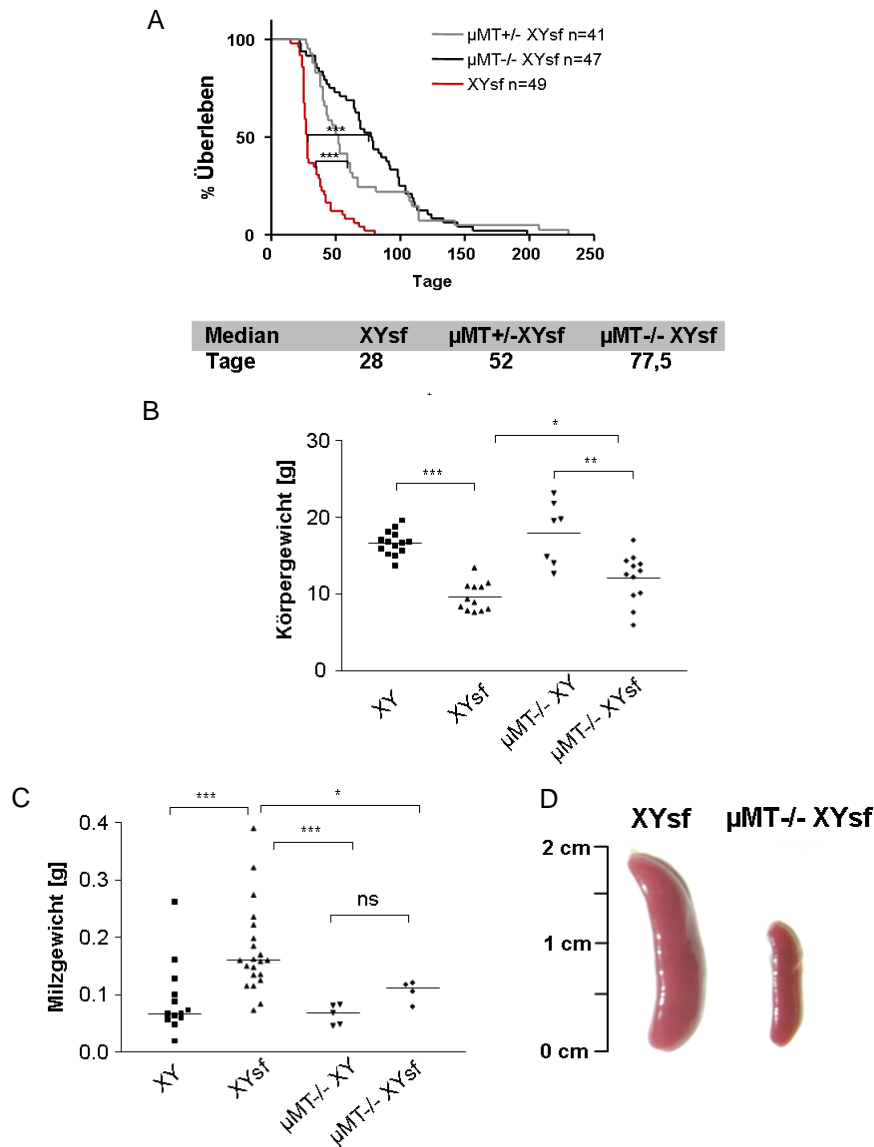


Abbildung 23: Einfluss von B-Zellen auf die Letalität und auf phänotypische Merkmale der Scurfy Mäuse.

(A) Darstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven. Zur Übersicht sind die Genotypen $\mu\text{MT}^{+/-}$ XYsf (grau), $\mu\text{MT}^{-/-}$ XYsf (schwarz) und XYsf (rot) dargestellt. Die Lebensdauer der Tiere wurde in Tagen notiert und mit dem Auswerteprogramm *Graph-Pad*® graphisch dargestellt. Unter der graphischen Darstellung ist das Überleben der Genotypen im Median notiert. (B und C) Vergleich von Körper- und Milzgewicht zum vier Wochen Zeitpunkt. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. (D) Repräsentative Darstellung frisch entnommener Milzen von XYsf und $\mu\text{MT}^{-/-}$ XYsf zum vier Wochen Zeitpunkt.

2. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die Thrombozytenzahl

Wie in Abbildung 21 gezeigt, kam es in Scurfy Mäusen zu einer verminderten Thrombozytenzahl und zum Auftreten von Anti-Thrombozyten Antikörpern. Um nachzuweisen, ob diese Autoantikörper tatsächlich die Ursache für die reduzierte Thrombozytenzahl sind, wurden die Blutplättchenwerte von Scurfy und B-Zelldefizienten Scurfy Tieren mittels eines Hämatocytometers bestimmt. Es zeigte sich, dass es in Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ im Vergleich zu den gesunden Kontrolltieren ($\mu\text{MT}^{-/-}$ und C57BL/6), nicht mehr zu

Ergebnisse

einer verminderten Thrombozytenzahl kam (Mittelwert: Scurfy μ MT^{-/-} 918×10^3 pro μ l Blut; μ MT^{-/-} 1000×10^3 pro μ l Blut; C57BL/6 1221×10^3 pro μ l Blut) (Abbildung 24). Der Anstieg der Thrombozytenzahl in den Scurfy μ MT^{-/-} verglichen mit den Scurfy Tieren (Mittelwert: $540,38 \times 10^3$ pro μ l Blut) des gleichen Alters konnte als statistisch signifikant berechnet werden.

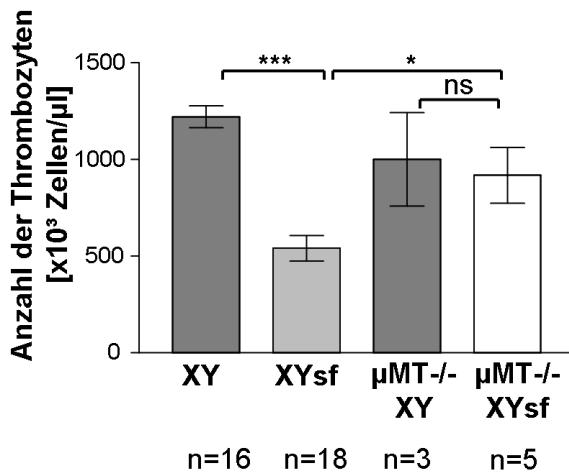


Abbildung 24: Vergleichende Darstellung der Thrombozytenzahl.

Analyse der Thrombozytenzahl aus dem Vollblut der Mäuse am Hämatozytometer (Advia® Siemens). Untersucht wurden vier Wochen alte Mäuse der angegebenen Genotypen. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichungen. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

3. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die Beeinträchtigung der renalen Funktion

Wie im Ergebnisteil unter 2.2 bereits erwähnt, kommt es bei Scurfy Mäusen zu krankhaften Veränderungen der Nierenfunktion. Um nachzuweisen, inwiefern die Ablagerung von Immunkomplexen, der verschiedenen Isotypen, in den Glomeruli der Scurfy Tiere die renale Funktion beeinträchtigt, sollte in Abwesenheit der Antikörper in B-Zelldefizienten Scurfy Mäusen die Konzentration des BUN bestimmt werden. Die Scurfy μ MT^{-/-} Tiere zeigten zum Zeitpunkt von vier Wochen eine signifikante Reduktion des BUN-Gehaltes im Serum verglichen mit den Scurfy Individuen (Abbildung 25A). Das arithmetische Mittel des BUN-Levels in Scurfy μ MT^{-/-} Tieren lag bei $28,56 \text{ mg/dl}$, wohingegen bei Scurfy im Mittel ein Wert von $38,91 \text{ mg/dl}$ beobachtet wurde. Im Vergleich zu den μ MT^{-/-} Kontrolltieren waren die BUN-Werte in den Scurfy μ MT^{-/-} Tieren nicht signifikant erhöht (Mittelwert μ MT^{-/-} $21,85 \text{ mg/dl}$). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte die starke Entzündung, wie sie in den Scurfy Tieren auftrat, in den Scurfy μ MT^{-/-} Mäusen noch nicht beobachtet werden (Abbildung 25B). Die Reduktion des BUN-Serumgehaltes und die verminderte Entzündung in den B-Zelldefizienten Scurfy Tieren sprechen für eine wichtige Rolle von Autoantikörpern bei der Nierenentzündung in Scurfy Mäusen.

Ergebnisse

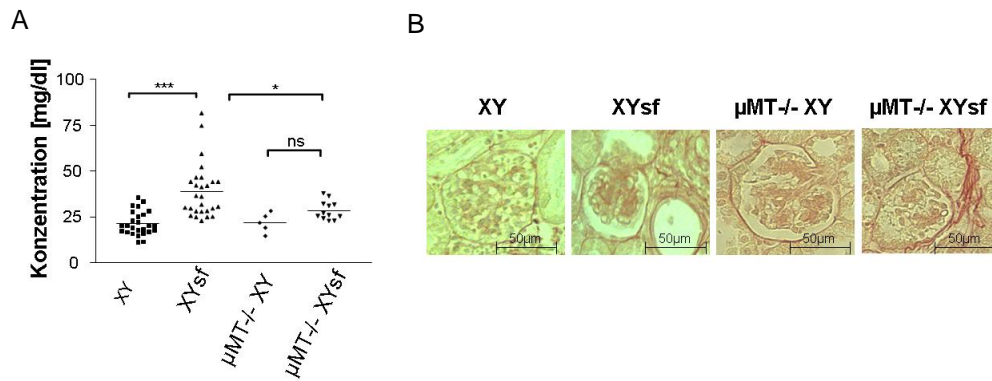


Abbildung 25: Darstellung der Nierenfunktion und -struktur vier Wochen alter Scurfy und Scurfy μ MT $^{-/-}$ Tiere sowie der Kontrollen.

(A) Vergleich der BUN-Werte zum vier Wochen Zeitpunkt. Linien markieren den arithmetischen Mittelwert der untersuchten Mäuse. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. (B) Exemplarische Darstellung der Entzündungsareale in Sirius Red gefärbten Nierengewebeschnitten.

4. Auswirkung der B-Zelldefizienz auf die Entzündung in der Leber

In weiteren Experimenten sollte geklärt werden, welche Auswirkungen das Fehlen von B-Zellen und den von B-Zellen gebildeten Autoantikörpern auf die Zusammensetzung und Größe der inflammatorischen Organinfiltrate hat. Um dies festzustellen wurden Sirius Red gefärbte Leberschnitte mikroskopisch untersucht und der prozentuale Anteil der Entzündung zur Gesamtfläche ermittelt. In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass die entzündlichen Leukozyteninfiltrate im hepatischen Gewebe im Alter von vier Wochen in den Scurfy μ MT $^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu den Scurfy Tieren um etwa 50% sanken. Waren in den Scurfy Tieren im Mittel 5,78% ($\pm 0,55$) der Gesamtleberfläche betroffen, reduzierte sich der prozentuale Anteil der Leberinfiltrate in den untersuchten Scurfy μ MT $^{-/-}$ Tieren auf 2,95% ($\pm 0,24$).

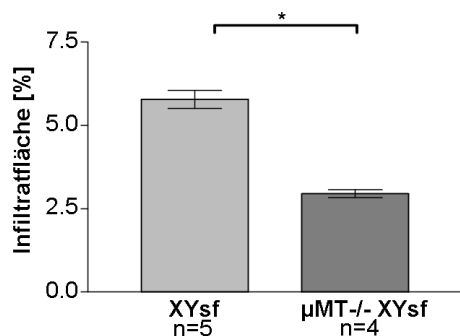


Abbildung 26: Mikroskopische Bestimmung der prozentualen Leberinfiltratgrößen.

Darstellung der Infiltratgrößen prozentual zur Gesamtfläche der Lebergewebeschnitte vier Wochen alter XYsf und μ MT $^{-/-}$ XYsf Mäuse. Vermessen wurden die Infiltrat- sowie die Gesamtfläche mithilfe der AxioVision Rel. 4.8 Software. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Um zu untersuchen, ob es in Abwesenheit von B-Zellen zu einer Veränderung in der zellulären Zusammensetzung und des Aktivierungsstatus der eingewanderten Zellen in der Leber kommt, wurden Gewebeschnitte vier Wochen alter Mäuse mit Sirius Red und immunhistochemischer Antikörperfärbung angefärbt und mikroskopisch analysiert. Wie in

Ergebnisse

Abbildung 27A zu sehen ist, war in den Wildtyp Tieren, im Gegensatz zu den Scurfy und Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Mäusen keine Entzündung des hepatischen Gewebes detektierbar. Bei den Genotypen Scurfy und Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ konnte eine Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche der infiltrierenden Leukozyten nachgewiesen werden, wobei es in den Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tiere zu einer reduzierten Präsenz CD69⁺ Zellen kam (Abbildung 27B). In kryokonservierten Leberpräparaten konnten die eingewanderten, aktivierten (CD69⁺) Zellen sowohl in Scurfy als auch in B-Zelldefizienten Scurfy Tieren als T-Zellen (TCR β ⁺) mittels Immunfluoreszenzfärbungen identifiziert werden (Abbildung 27C). B220⁺ B-Zellen waren in den Infiltraten der Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ im Gegensatz zu den Scurfy Tieren, wie erwartet nicht zu finden. Unabhängig von der Abwesenheit von B-Zellen konnten CD11b⁺ myeloide Zellen nachgewiesen werden. Auch konnten in beiden Gruppen Eosinophile SiglecF⁺ Zellen sowie CD11c⁺ DZ detektiert werden (Abbildung 27D).

Ergebnisse

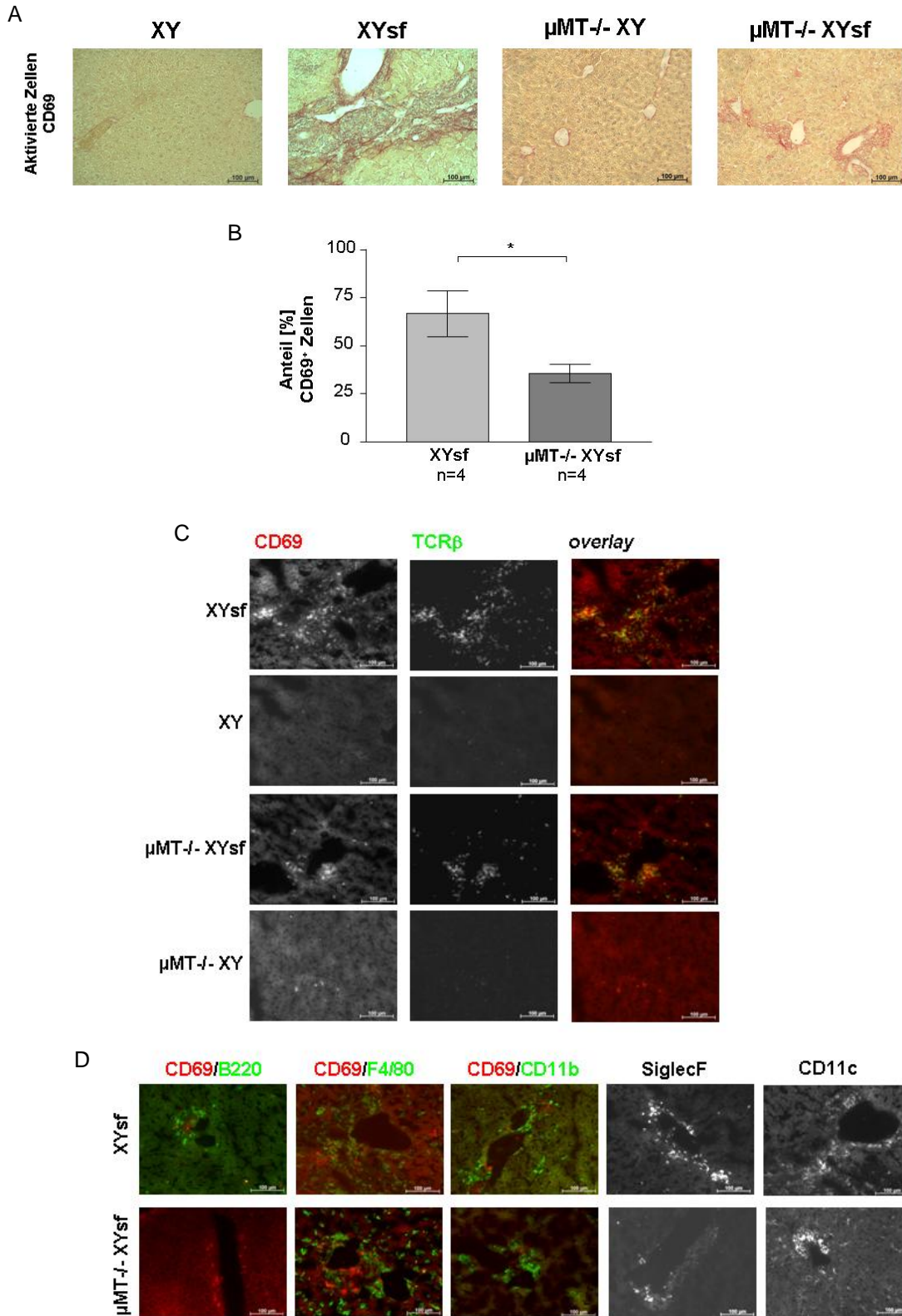


Abbildung 27: Immunhistochemische Detektion verschiedener Zellpopulationen in Leberpräparaten.

(A) Identifizierung infiltrierender Zellen in Sirius Red gefärbten Leber-Paraffinschnitten durch sequentielle Färbung mit biotinylierten Primärantikörper des angegebenen Antigens und sekundärem Streptavidin-AKP Antikörper (blau). (B) Quantifizierung der CD69⁺ Zellen anteilig zur Gesamtzellzahl. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. (C und D) Aktivierte Zellen und andere Leukozytenpopulationen

Ergebnisse

wurden mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper gegen CD69, TCR β , B220, F4/80, CD11b, SiglecF und CD11c angefärbt. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Folglich bekräftigen diese Ergebnisse die These, dass B-Zellen und den von B-Zellen gebildeten Autoantikörpern eine wichtige Rolle in der Autoimmunpathologie des Scurfy Maus zugesprochen werden kann.

5. Interaktion zwischen T-Zellen und professionellen Ag-präsentierenden Zellen in der Leber

Immunfluoreszenzfärbungen zeigten bereits im Scurfy Modell, dass es in der Leber zu einem räumlichen Kontakt von APC und T-Zellen und der Ausbildung einer Follikel-ähnlichen Morphologie (Abbildung 10) kommt. Antikörper-sekretierende Plasmazellen konnten im hepatischen Gewebe lokalisiert werden (Abbildung 11).

Auch in der Leber der B-Zelldefizienten Scurfy Tiere stehen CD11c⁺ DZ und TCR β ⁺ T-Zellen in direktem Kontakt (Abbildung 28). Im B-Zelldefizienten μ MT^{-/-} Scurfy Modell konnten, wie zu erwarten war keine Antikörper-sekretierenden Zellen gefunden werden (Abbildung 29).

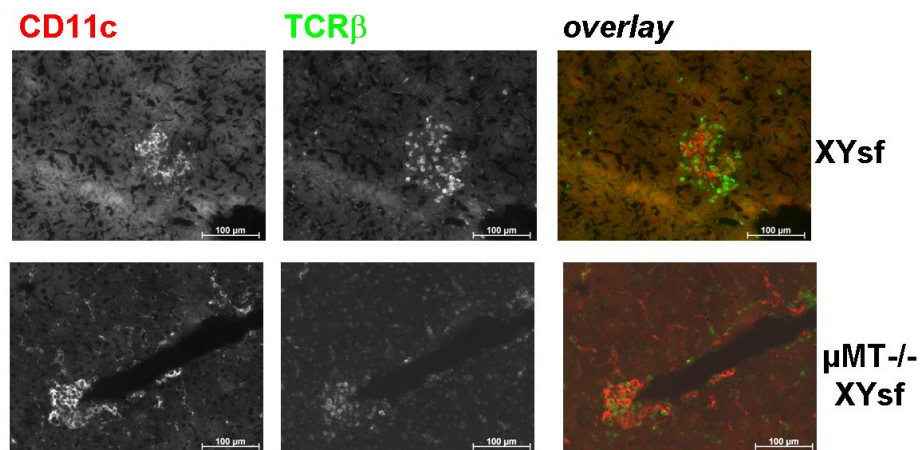


Abbildung 28: Immunhistochemische Detektion der Interaktion von T-Zellen mit APC in Leberpräparaten von Scurfy und B-Zelldefizienten Scurfy Tieren.

Identifizierung von DZ und T-Zellen der Leukozytenpopulationen mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper gegen CD11c und TCR β . Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Ergebnisse

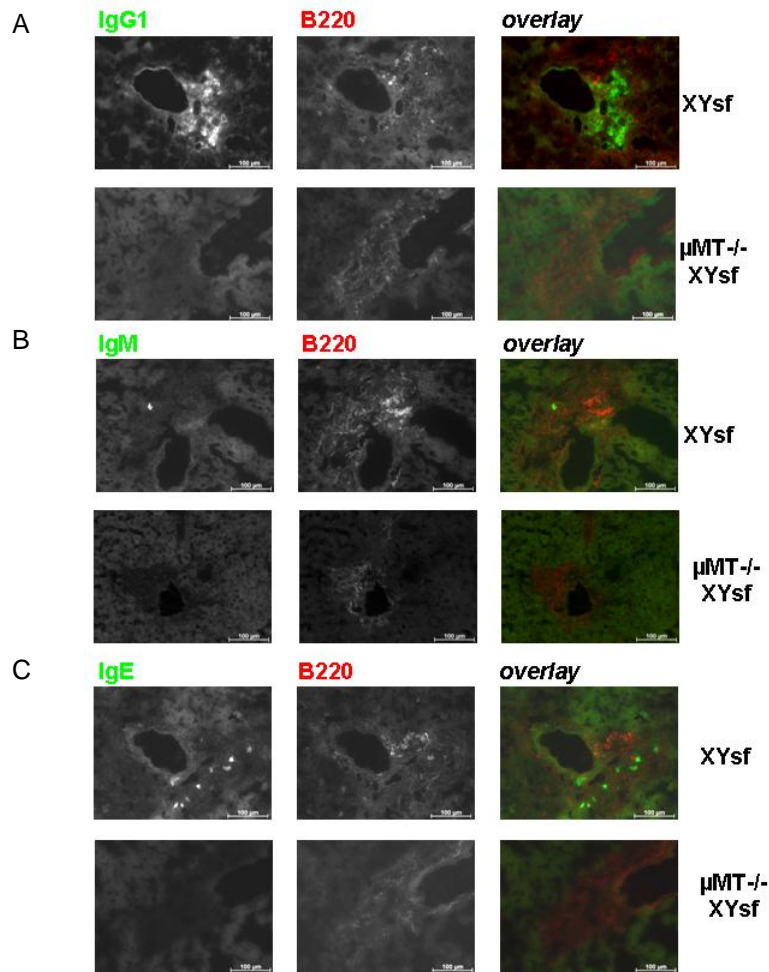


Abbildung 29: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von IgM, IgG1 und IgE sekretierenden Plasmazellen in Leberpräparaten von Scurfy und B-Zelldefizienten Scurfy Tieren.

Identifizierung der IgG1 (A), IgM (B) und IgE (C) positiven Plasmazellen mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper sowie B220 positiver B-Zellen. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

6. Veränderungen im Anteil von Immunzellen in lymphoiden Organen der B-Zelldefizienten Scurfy Tiere

Wie in Abbildung 12 bereits gezeigt, kam es in Scurfy Mäusen zu einer Reduktion des B-Zellkompartiments in immunologischen Organen. CD11b⁺ Zellen und T-Zellen waren stark expandiert. Inwieweit sich der Anteil der T-Zellen und CD11b⁺ Zellen in B-Zelldefizienten Scurfy Tieren ändert, sollte durchflusszytometrisch analysiert und mit Scurfy Tieren verglichen werden. Milzen der Scurfy μMT^{-/-} Tiere waren im Mittel von 29% T-Zellen besiedelt, CD11b⁺ Zellen machten 38% der Gesamtzellen aus. In den μMT^{-/-} Kontrolltieren lag der Anteil der T-Zellen bei 30% und CD11b⁺ Zellen waren im Vergleich zu den Scurfy μMT^{-/-} Tieren expandiert (52%) (Abbildung 30A). Im Blut der Kontrolltiere machten T-Zellen mit 68% den Hauptanteil aus. CD11b⁺ Zellen hatten einen Anteil von 30% an der Gesamtheit der Blutzellen (Abbildung 30B). Vergleicht man hierzu die Scurfy μMT^{-/-} Tiere konnte festgestellt werden, dass der Anteil der CD11b⁺ Zellen auf 42% anstieg und T-Zellen 53%

Ergebnisse

der Gesamtzellen ausmachten. Die zelluläre Zusammensetzung des Knochenmarks der untersuchten Tiere zeigte keine Unterschiede zwischen Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ und $\mu\text{MT}^{-/-}$ Kontrollen (Abbildung 30C). Ein ähnlicher Anteil in Wildtyp $\mu\text{MT}^{-/-}$ und Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ von T-Zellen konnte im Lymphknoten beobachtet werden (Wildtyp $\mu\text{MT}^{-/-}$ 71%; Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ 79%) (Abbildung 30D). CD11b^+ Zellen zeigten in Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ im Vergleich zu $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tieren eine Reduktion (Wildtyp $\mu\text{MT}^{-/-}$ 26%; Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ 8%). Tabellarisch sind die Werte der Zellpopulationen mit Standardabweichung der einzelnen Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ und Wildtyp $\mu\text{MT}^{-/-}$ Individuen gezeigt (Tabelle 3). Im Vergleich zu Scurfy Tieren konnte in B-Zelldefizienten Scurfy Mäusen eine ausgeprägte Expansion des CD11b^+ Zellkompartiments nicht beobachtet werden. Ein leichter Anstieg der CD11b^+ Zellen zeigte sich nur im Blut.

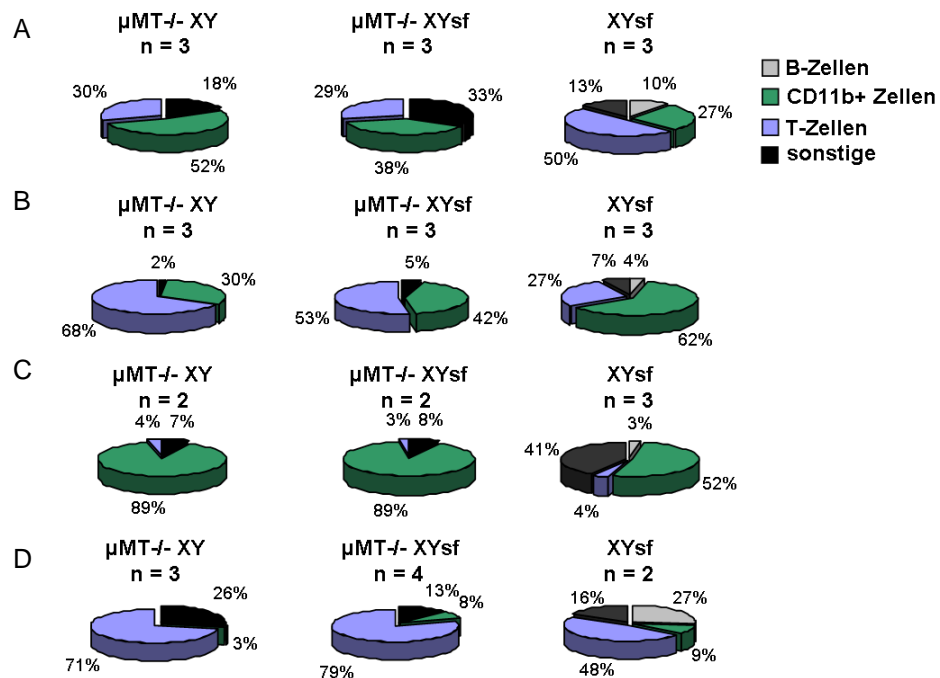


Abbildung 30: Durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung der Zellpopulationen in B-Zelldefizienten Scurfy und Wildtyp Tieren.

Darstellung der Zellpopulationen anteilig zur Gesamtbesiedelung in Milz (A), Blut (B), Knochenmark (C) und Lymphknoten (D). T-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für das Antigen $\text{TCR}\beta$ bestimmt. CD11b^+ Zellen konnten mit einem Antikörper der spezifisch das CD11b Molekül bindet nachgewiesen werden und B-Zellen wurden über die Expression der Antigenen CD19 und B220 detektiert.

Ergebnisse

Tabelle 3: Zusammensetzung der Zellpopulationen der einzelnen B-Zelldefizienten Scurfy und Kontrolltiere.

	CD11b ⁺ - Zellen	T-Zellen	sonstige
Milz μ MT ^{-/-} XYsf n = 3	35,1 41,8 36,4	31,6 27 28,8	33,3 31,2 34,8
Standardabweichung	\pm 3,553	\pm 2,318	\pm 1,808
Milz μ MT ^{-/-} XY n = 3	49,2 45 64	33,8 39 16,3	17 16 19,7
Standardabweichung	\pm 9,981	\pm 11,892	\pm 1,914
Blut μ MT ^{-/-} XYsf n = 3	44,8 39,5 42	51 54,5 53	4,2 6 5
Standardabweichung	\pm 2,695	\pm 1,802	\pm 0,9018
Blut μ MT ^{-/-} XY n = 3	28,8 32 30,4	66,4 67,2 67,8	4,8 0,8 2,5
Standardabweichung	\pm 1,6	\pm 1,4	\pm 2,00
Knochenmark μ MT ^{-/-} XYsf n = 3	93 87 90	1 4 3	6 9 7
Standardabweichung	\pm 4,242	\pm 2,121	\pm 2,121
Knochenmark μ MT ^{-/-} XY n = 2	90 89	4 3	6 8
Standardabweichung	\pm 0,707	\pm 0,707	\pm 1,414
Lymphknoten μ MT ^{-/-} XYsf n = 4	9 9,9 6,1 5	89 81 93,2 49,6	2 9,1 0,7 45,5
Standardabweichung	\pm 2,469	\pm 20,723	\pm 22,250
Lymphknoten μ MT ^{-/-} XY n = 3	3,1 1,5 3,6	79,2 97 38,5	17,7 1,5 57,9
Standardabweichung	\pm 1,097	\pm 29,988	\pm 29,038

Weiterhin wurde untersucht, inwieweit sich der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in B-Zelldefizienten Scurfy Tieren ändert. Abbildung 31 stellt den prozentualen Anteil der CD4⁺ T-Helferzellen und der CD8⁺ Zytotoxischen T-Zellen dar. Im Wildtyp betrug der Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Mittel 53,45%, CD8⁺ T-Zellen machten 46,55% der T-Zellen aus. Im Blut der vier Wochen alten Scurfy Tiere dagegen waren prozentual mehr CD8⁺ T-Zellen (Mittelwert 64,46%) als CD4⁺ T-Zellen (Mittelwert 35,53%) zu finden. Ein Anstieg der CD8⁺ T-Zellen wurde in Scurfy μ MT^{-/-} nicht beobachtet. Hier stellten CD4⁺ T-Zellen im Mittel 59,1% und CD8⁺ T-Zellen 40,9%. Tendenziell waren CD4⁺ T-Zellen anteilig in B-Zelldefizienten Scurfy Tieren erhöht verglichen mit μ MT^{-/-} Kontrolltieren (Mittelwert: CD4⁺ T-Zellen 55,46%; CD8⁺ T-Zellen 44,53%).

Ergebnisse

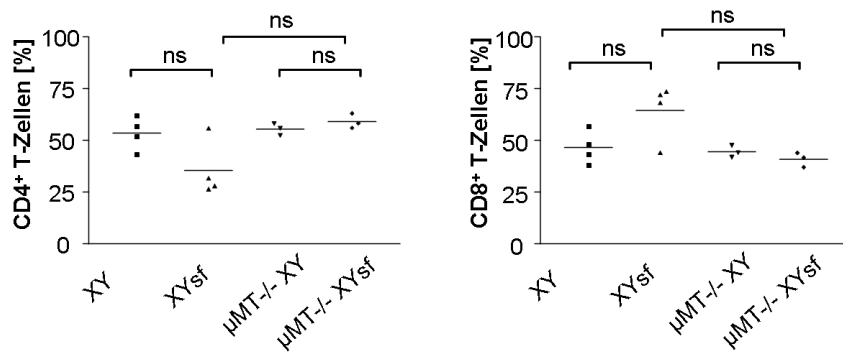


Abbildung 31: Durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung des T-Zellkompartiments in B-Zelldefizienten Scurfy und Wildtyp Tieren.

Darstellung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut. T-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für das Antigen TCR β bestimmt. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

7. Adoptiver B-Zelltransfer in B-Zelldefiziente μ MT^{-/-} Mäuse

Um zu zeigen, dass B-Zellen für eine Verlängerung der Lebensspanne verantwortlich sind, sollten adoptive B-Zelltransferexperimente (BZT-Experimente) von naiven B-Zellen in Scurfy μ MT^{-/-} Mäuse bzw. als Kontrolle in μ MT^{-/-} Mäuse durchgeführt werden. Für den adoptiven BZT wurden Milzzellen aus B6.SJL-Ptprc^aPepc^b/BoyJ Donormäusen isoliert. Dieser Mausstamm ist charakterisiert durch die Expression des *leukocyte common antigens* CD45.1 auf allen hämatopoetischen Zellen außer den Erythrozyten. Da die Rezipientenstämme μ MT^{-/-} und Scurfy μ MT^{-/-} den Allotyp CD45.2 auf allen Leukozyten exprimieren, konnte dadurch zwischen transferierten und nicht-transferierten Zellen unterschieden werden. Die zu transferierenden Zellen wurden mittels MACS® Separation isoliert und anschließend die Reinheit der naiven Milz B-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt (Abbildung 32). 97,3% der Zellen waren B220/CD45.1⁺ B-Zellen. Es kam zu einer Verunreinigung von 0,4% mit CD11c⁺ DZ, 0,5% der Gesamtpopulation machten NK1.1⁺ Natürliche Killerzellen (NK) aus und etwa 0,8% waren CD8/TCR β ⁺ T-Zellen.

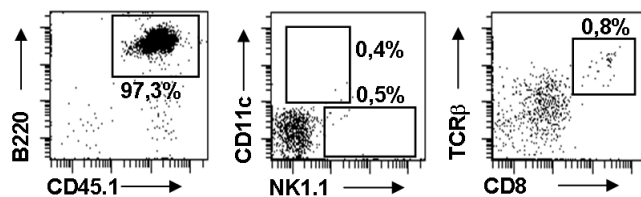


Abbildung 32: Adoptiver Transfer naiver CD45.1⁺ B-Zellen in μ MT^{-/-} XY/XYsf Tiere.

Repräsentative Darstellung einer durchflusszytometrischen Analyse der Reinheit der injizierten Zellen unter Verwendung der angegebenen Antigene.

Ergebnisse

Zwei Wochen nach Transfer von 10×10^6 naiven B-Zellen wurde die Ansiedlung und die Differenzierung der $CD45.1^+$ naiven B-Zellen immunfluoreszenzmikroskopisch untersucht. Aus Abbildung 33 wird ersichtlich, dass naive $CD45.1^+$ adoptiv transferierte B-Zellen in lymphatisches Gewebe einwanderten und sich dort in B-Zellfollikel reorganisierten. Diese setzen sich sowohl in der Milz als auch im Lymphknoten aus $B220^+$ B-Zellzonen und $TCR\beta^+$ T-Zellzonen zusammen (Abbildung 33A). Durch Färbung der Expression des Endothelzellmarkers CD31 konnten die follikulären Strukturen abgegrenzt werden. Vor allem in den lymphatischen Organen der Scurfy $\mu MT^{-/-}$ Maus kam es zu einer vermehrten Plasmazell-Bildung ($CD138^+$) (Abbildung 33B). Die $CD138^+$ $B220^-$ Zellen konnten außerhalb des B-Zellfollikels lokalisiert werden.

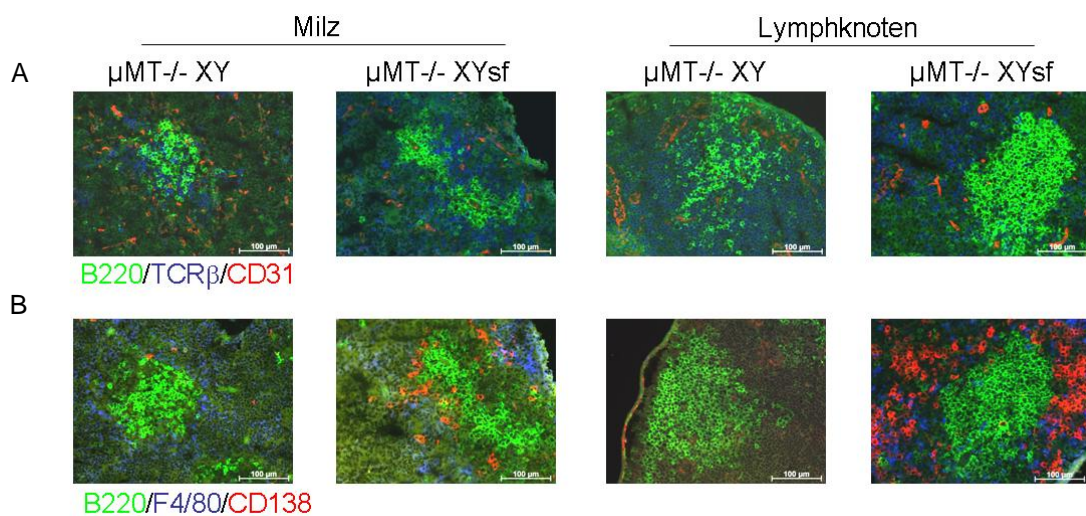


Abbildung 33: Immunhistologische Untersuchung der Rekonstitution follikulärer Strukturen in lymphatischem Gewebe.

(A) Färbung der kryokonservierten Milz- und Lymphknotenschnitte mit Antikörpern spezifisch für B-Zellen (B220-Alexa488, grün), T-Zellen (TCR β -APC, blau) und Endothelzellen (CD31-PE, rot). (B) Färbung mit Antikörpern spezifisch für Antigene auf B-Zellen (B220-Alexa488, grün), Plasmazellen (CD138-PE, rot) und Makrophagen (F4/80-Alexa647, blau). Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Eine Quantifizierung der Immunglobuline IgM, IgG1 und IgE im Serum der Tiere zwei Wochen nach B-Zelltransfer ergab, dass es sowohl in den BZT $\mu MT^{-/-}$ als auch in den BZT Scurfy $\mu MT^{-/-}$ Tieren zu einem signifikanten Anstieg der untersuchten Isotypen im Vergleich zu unbehandelten Scurfy $\mu MT^{-/-}$ Tieren kam. Während BZT Scurfy $\mu MT^{-/-}$ Tiere verglichen mit $\mu MT^{-/-}$ Mäusen keine Erhöhung der Immunglobuline IgM und IgG1 zeigten, konnte eine verstärkte Produktion von IgE beobachtet werden (Abbildung 34).

Ergebnisse

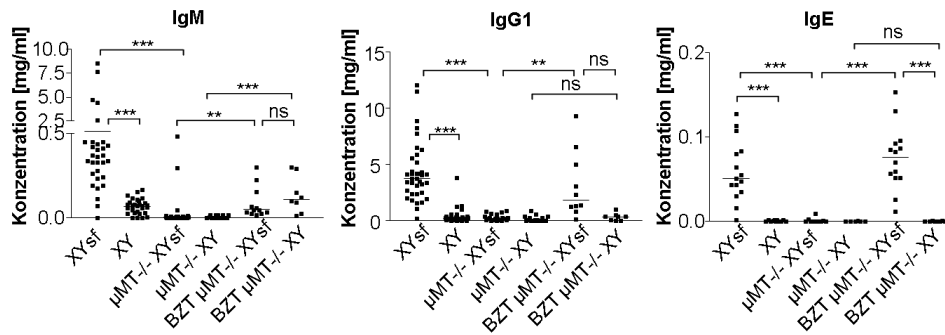


Abbildung 34: Vergleich der Konzentration der Immunglobuline im Serum nach adoptiven B-Zelltransfer.

Quantifizierung der angegebenen murinen Immunglobuline mittels ELISA. Angegeben sind die Konzentrationen in vier Wochen alten XY/XYsf Tieren im Vergleich zu vier Wochen alten μMT-/- XY/XYsf Tieren mit bzw. ohne BZT (zwei Wochen nach BZT). Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Zudem wurde untersucht, ob es in den Scurfy μMT-/- Mäuse nach B-Zelltransfer zur Bildung von Autoantikörpern kommt. Wie in Abbildung 35A gezeigt, konnten anti-dsDNA Antikörper des IgM (links) und IgG1 (rechts) Isotyps detektiert werden. Diese waren im Vergleich zu den nicht B-Zell-transferierten Scurfy μMT-/- Tieren statistisch signifikant erhöht. Außerdem konnte für anti-GPI Antikörper ein signifikanter Anstieg des Isotyps IgM in BZT Scurfy μMT-/- Individuen beobachtet werden. Bei der Subklasse der IgG1 anti-GPI Antikörper konnte kein signifikanter Anstieg in den BZT Scurfy μMT-/- Tieren verzeichnet werden, dennoch ist eine Erhöhung detektiert (Abbildung 35B). Trotz klarem Trend zu erhöhter Autoantikörperproduktion in Scurfy μMT-/- Mäusen im Vergleich zu μMT-/- Tieren nach BZT war dieser Unterschied nicht signifikant.

Ergebnisse

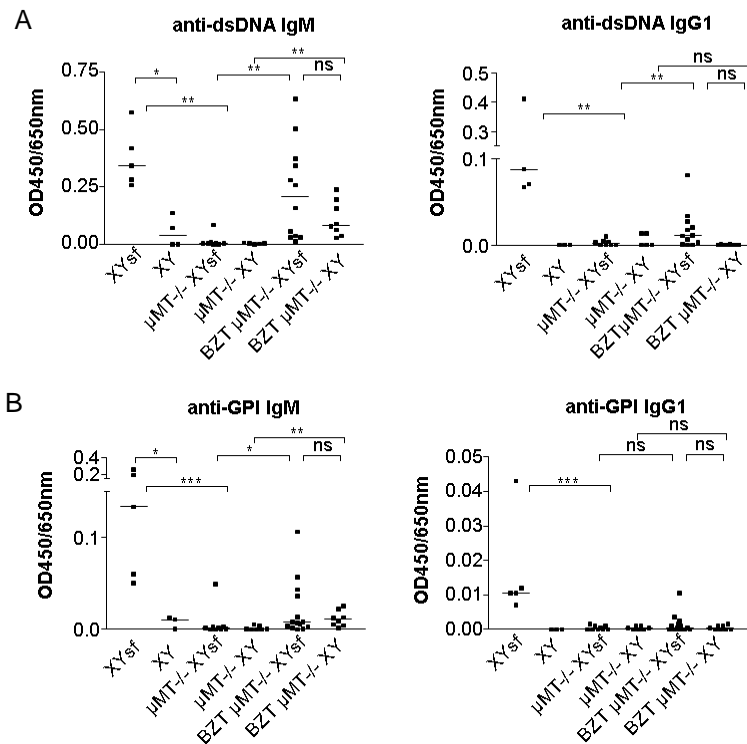


Abbildung 35: Analyse spezifischer Autoantikörper im Serum nach B-Zelltransfer.

Identifizierung und semiquantitative Analyse von anti-dsDNA (A) und anti-GPI (B) Antikörpern über ELISA-Technik. Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe nach Abzug des Hintergrundsignals (650nm) bei einer Wellenlänge von 450nm. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Neben dem Nachweis von Autoantikörpern im Serum sollte untersucht werden, ob es in den BZT Tieren zu einer Ablagerung von Immunkomplexen in der Niere kommt. Mikroskopische Untersuchungen kryokonservierter Nierenschnitte zeigten deutliche Ig-Ablagerungen der Subklassen IgM, IgG1 und IgE in den BZT Scurfy μ MT^{-/-} Tieren zwei Wochen nach Transfer (Abbildung 36).

Ergebnisse

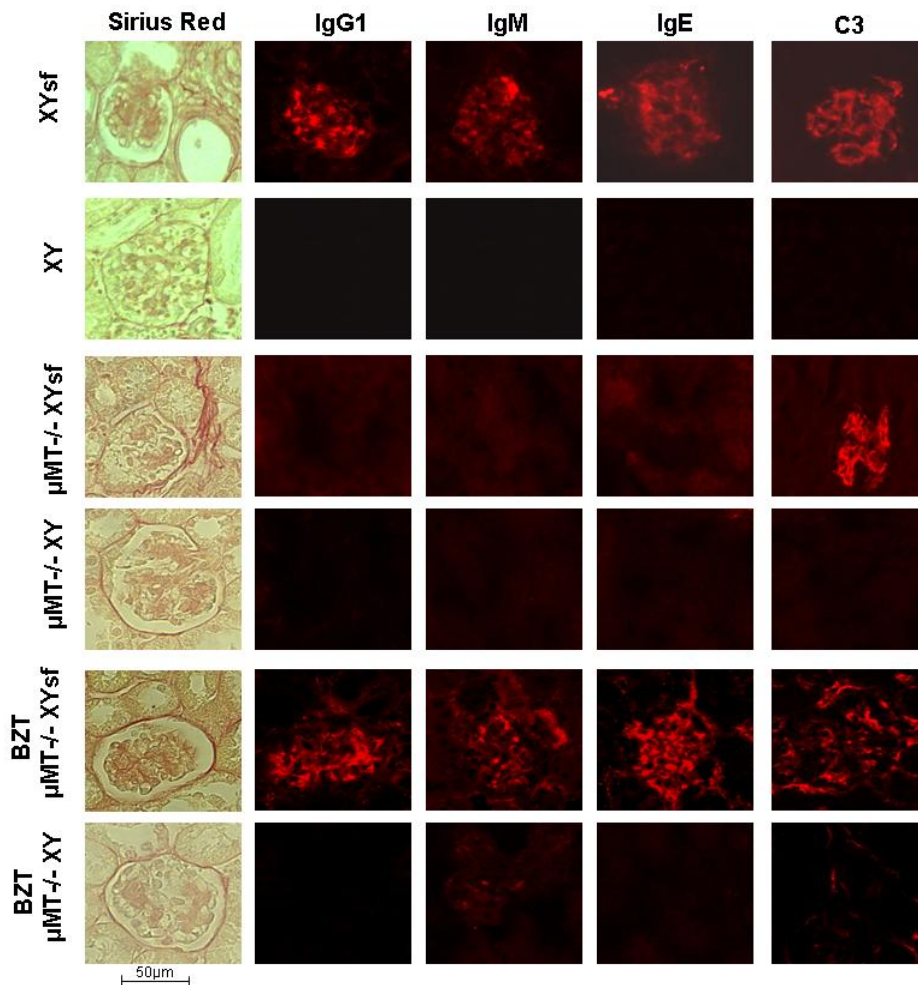


Abbildung 36: Darstellung histopathologischer Veränderungen in Nierenpräparaten.

Exemplarische Darstellung der Entzündungsareale in Sirius Red gefärbten Nierengewebeschnitten. Außerdem erfolgte eine Färbung der Nierenschnitte mit C3 bzw. Immunglobulin-spezifischen, fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IgM, IgG1 und IgE. Exemplarisch ist eine Immunfluoreszenzfärbung dargestellt.

In den Glomeruli der BZT Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ kam es nur zu einer geringfügigen Ablagerung von IgM. Die Abbildung 36 verdeutlicht außerdem, dass es aufgrund der B-Zelldefizienz in den $\mu\text{MT}^{-/-}$ und Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tiere nicht zu einer Ablagerung von Immunglobulinkomplexen kam. Allerdings konnten C3-Ablagerungen in den Glomeruli der Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tiere beobachtet werden. Betrachtet man die Sirius Red gefärbten Nierenpräparate der untersuchten Mausgruppen, fielen in den Scurfy Tieren pathologische Veränderungen der Nierenstruktur auf, die bereits im Ergebnisteil unter 2.2 beschrieben wurden. In den Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Individuen kam es in Bereichen der distalen und proximalen Tubuli zu leichten Entzündungsreaktionen und Kollagenablagerungen, die mit Sirius Red sichtbar gemacht werden konnten. Phänotypische Unterschiede in den BZT Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ im Vergleich zu unbehandelten Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Mäusen ergaben sich nicht. Die gesunden Kontrollen (C57BL/6; $\mu\text{MT}^{-/-}$, BZT $\mu\text{MT}^{-/-}$) zeigten keinerlei pathologische Auffälligkeiten. Eine Analyse der Überlebenskurve (Abbildung 37) zwischen Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ und BZT Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Mäusen zeigte zudem ein verkürztes Überleben der BZT Tiere (Median BZT Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$: 56,66

Ergebnisse

Tage, Median Scurfy μ MT-/- 77,5 Tage). Dies unterstützt zusätzlich die These, dass B-Zellen und die von B-Zellen produzierten Autoantikörper maßgeblich an der Autoimmunpathologie und am verkürzten Überleben der Scurfy Tiere beteiligt sind. Allerdings bestanden zwischen BZT Scurfy μ MT-/- Versuchstieren und Scurfy Tieren noch immer signifikante Unterschiede der Lebensspanne (Median Scurfy: 28 Tage).

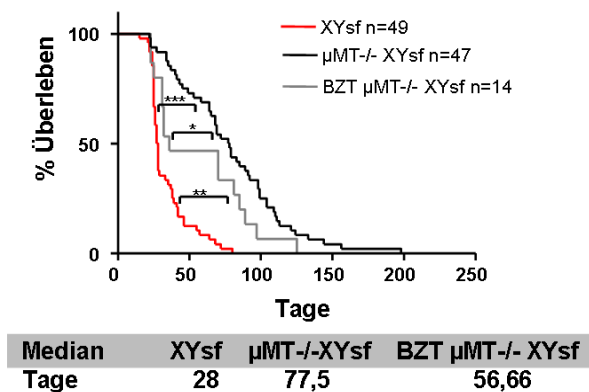


Abbildung 37: Darstellung der Letalität in B-Zelltransferierten μ MT-/- XYsf Mäusen.

Darstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven. Zur Übersicht sind die Genotypen BZT μ MT-/- XYsf (grau), μ MT-/- XYsf (schwarz) und XYsf (rot) dargestellt. Die Lebensdauer der Tiere wurde in Tagen notiert und mit dem Auswerteprogramm *Graph-Pad®* graphisch dargestellt. Unter der graphischen Darstellung ist das Überleben der Genotypen im Median notiert.

III. CD20 Therapie als mögliche therapeutische Intervention

1. Etablierung eines B-Zelldepletions-Modells

Da unsere bisherigen Ergebnisse belegen, dass B-Zellen offensichtlich einen erheblichen Beitrag zur Autoimmunpathologie in der Scurfy Maus leisten, sollte ein auf diesen Daten aufbauender therapeutischer Ansatz etabliert werden. Ähnlich wie beim Menschen sollte ein B-Zell depletierender Antikörper zur Entfernung Autoantikörper-produzierender B-Zellen zum Einsatz kommen. Hierfür wurde ein am Lehrstuhl für Genetik von Professor Winkler zur Verfügung gestellter Maus CD20-spezifischer Antikörper des Isotyps IgG2a verwendet. CD20 wird auf der Oberfläche von reifen und unreifen sowie malignen B-Zellen exprimiert (118, 119). Bereits während der frühen Prä-B-Zellentwicklung kommt es zur Expression von CD20 (120), die jedoch vor der Differenzierung von B-Zellen in Plasmazellen vollkommen verschwindet (118, 119). Die Integrität und Reinheit der anti-CD20 Antikörper wurde mittels reduzierender Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese nachgewiesen. Wie in Abbildung 38A zu sehen ist, zeigten sich nach Auftrennung von 10 μ g Protein und Färbung mit Coomassie Blau die Fragmente der schweren (55kDa) bzw. leichten Kette (25kDa) in den erwarteten Größen.

Ergebnisse

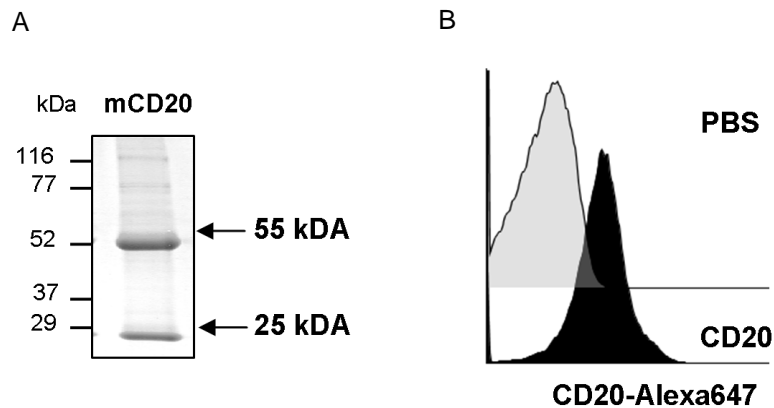


Abbildung 38: Überprüfung der Integrität und Bindung des Maus anti-CD20 Antikörpers.

(A) Gelelektrophoretische Auftrennung des anti-CD20 Antikörpers unter reduzierenden Bedingungen. Die Proteine wurden durch Anfärben mit Coomassie Blau sichtbar gemacht. Zur Größenbestimmung der Banden wurde ein Protein-Größenstandard mitgeführt. (B) Nachweis der Bindung des Alexa-647 markierten CD20 Antikörpers an dessen Antigen auf peripheren Blut-B-Zellen *in vivo*.

Neben der Integrität der produzierten anti-CD20 Antikörper ist die Bindung an das entsprechende Antigen essentiell für die Effektorfunktionen und somit für die Depletion der Zielzellen. Die Bindung des Antikörpers wurde *in vivo* in peripherem Blut überprüft. Hierzu werden 100µg eines Alexa647 konjugierten anti-CD20 Antikörpers bzw. PBS intravenös in C57BL/6 Mäuse injiziert. Fünf Minuten nach Injektion wurde den Mäusen aus dem retroorbitalen Plexus Blut entnommen und die Bindung des anti-CD20 Antikörpers auf IgM⁺ B220⁺ B-Zellen im Durchflußzytometer detektiert (Abbildung 38B). Um zu untersuchen, ob der selbst hergestellte anti-CD20 Antikörper im *in vivo* Modell effektiv B-Zellen depletieren kann, wurden C57BL/6 und Fcγ^{-/-} Kontrollmäusen 100µg des Antikörpers injiziert und die Anzahl der B-Zellen über die Zeit analysiert. Abbildung 39 zeigt exemplarisch die durchflußzytometrischen Analysen eines CD20 Depletionsexperiments. Wie in der Abbildung 39 zu sehen ist, nehmen IgM⁺ B220⁺ B-Zellen im Blut einer C57BL/6 Maus von 42,8% vor Injektion auf 0,6% nach 72 Stunden ab. In der Fcγ^{-/-} Maus ist die B-Zelldepletion blockiert. Anteilig ließen sich vor Injektion und 72 Stunden danach ähnliche Prozentsätze an reifen IgM⁺ B220⁺ B-Zellen nachweisen (0 Stunden: 46,1%; 72 Stunden: 53%).

In den lymphatischen Organen wie Milz, Lymphknoten und Knochenmark kam es in der C57BL/6 Maus ebenfalls zu einer Reduktion der reifen B-Zellen. In der Milz der C57BL/6 Maus fanden sich 6,3% IgM⁺ B220⁺ B-Zellen, im Lymphknoten 3,6% und im Knochenmark 1,1%. Die B-Zelldepletion in der Fcγ^{-/-} Maus war hingegen blockiert. 39,3% der Gesamtzellen der Milz waren hier IgM⁺ B220⁺ B-Zellen, im Lymphknoten fanden sich 21,7% IgM⁺ B220⁺ B-Zellen und im Knochenmark 4,5%.

Ergebnisse

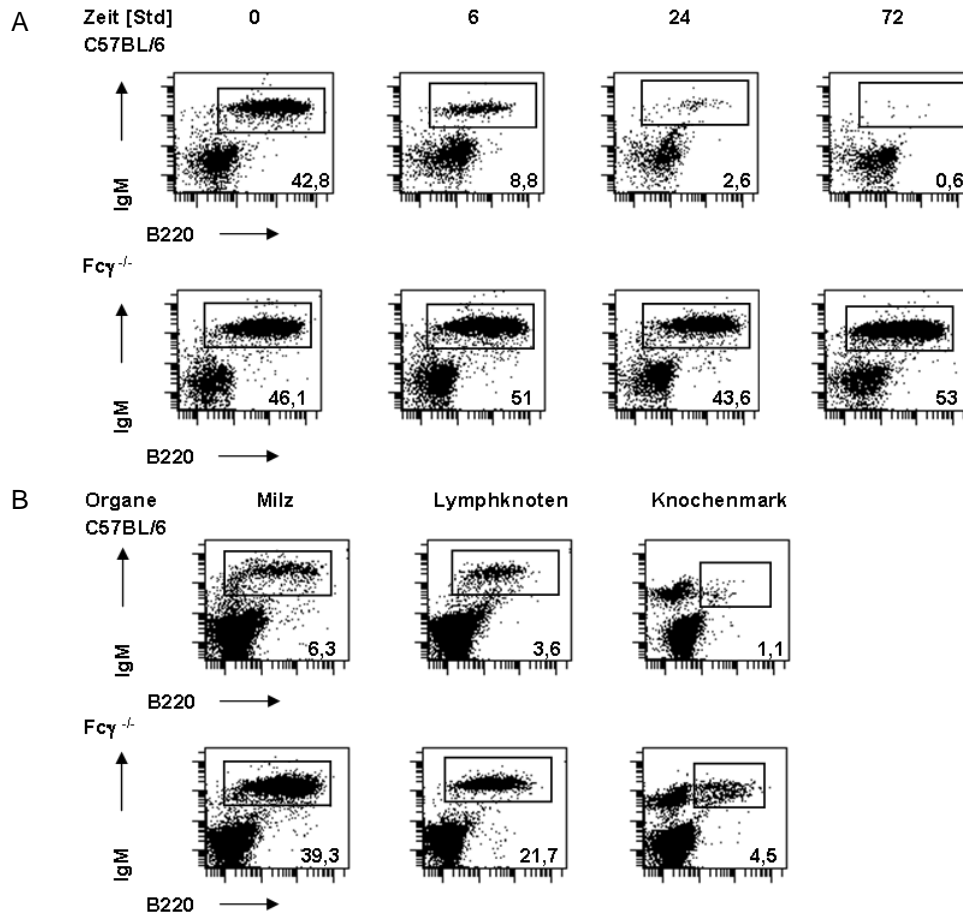


Abbildung 39: Darstellung der B-Zelldepletions-effizienz in C57BL/6 und Fc γ ^{-/-} Tieren.

Durchflusszytometrische Analyse des prozentualen Anteils an IgM⁺ B220⁺ B-Zellen im peripheren Blut im Zeitverlauf (A) und in den Organen (B) zum 72 Stunden Zeitpunkt.

Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die CD20-vermittelte B-Zelldepletion einem Fc γ -abhängigen Mechanismus folgt (121). Abbildung 40B zeigte eine Blockade der B-Zelldepletion in Fc γ -defizienten Tieren im Vergleich zu einer fast vollständigen Depletion peripherer B-Zellen 24 Stunden nach Antikörper Applikation in Wildtyp Kontrolltieren (Abbildung 40B). Durch die Verwendung eines Fc γ R1^{-/-} Fc γ R4^{-/-} Mausmodells konnte gezeigt werden, dass diese Rezeptoren essentiell für die CD20 (IgG2a) vermittelte B-Zelldepletion sind (Abbildung 40C). Diese Fc γ R Kombination findet sich ausschließlich auf der Ly6C^{lo} Monozytensubpopulation. Ly6C^{lo} Monozyten können durch die Gabe von 10 μ l Clodronat Liposomen selektiv aus dem System entfernt werden. Wie Abbildung 40D zeigt, konnte nach Clodronat Injektion die B-Zelldepletion blockiert werden.

Ergebnisse

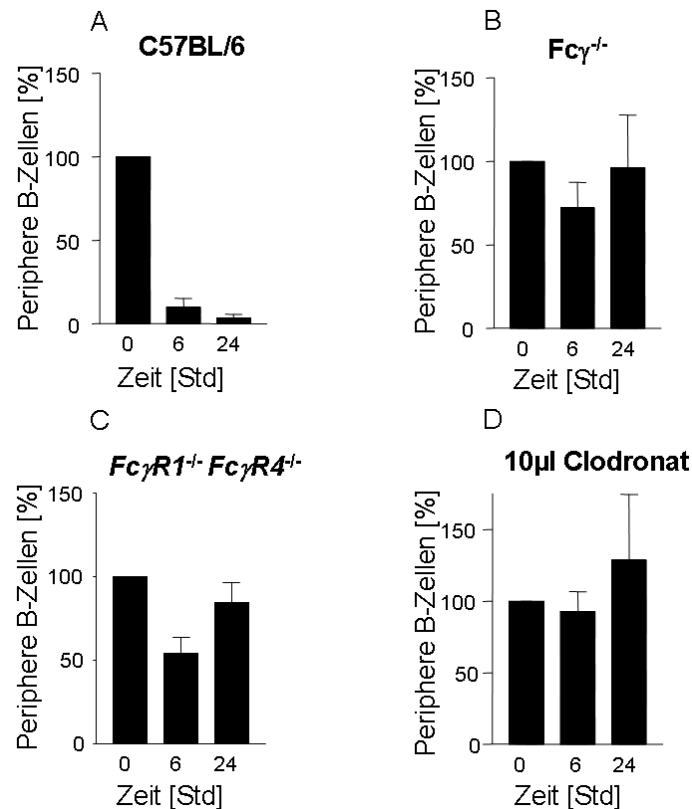


Abbildung 40: Mechanismus der B-Zelldepletion durch den CD20-IgG2a Antikörper.

Darstellung des prozentualen Anteils peripherer B-Zellen im Blut 6 und 24 Stunden nach Injektion von 100µg des CD20-spezifischen IgG2a Antikörpers in (A) C57BL/6, (B) Fcγ^{-/-}, (C) FcγR1^{-/-} FcγR4^{-/-} sowie (D) C57BL/6 Mäuse die mit 10µl Clodronat vorbehandelt wurden. In allen Experimenten wurden 4-5 Mäuse pro Gruppe analysiert (Abbildung adaptiert aus (122)).

Der direkte Nachweis, dass Ly6C^{lo} Monozyten und nicht die Population der Neutrophilen und der Ly6C^{hi} Monozyten die Effektorzellen der CD20-vermittelte B-Zelldepletion sind, ist in Abbildung 41 dargestellt. Hierzu wurden die drei Effektorzellpopulationen aus dem peripheren Blut von Cx3cr1^{GFP/GFP} Mäusen mittels Zellsortierung am FACS Aria III isoliert. Naive B-Zellen konnten mittels MACS® Separation aus der Milz von C57BL/6 Tieren gewonnen werden. Effektor (E)- und Zielzellen (T) wurden dann im angegebenen (E/T)-Verhältnis 16-20 Stunden unter Zugabe des CD20 Antikörpers bzw. einer Isotyp Kontrolle (TA99-IgG2a) inkubiert. Abbildung 41 verdeutlicht, dass eine Antikörper-vermittelte-zelluläre Zytotoxizität (ADCC) nur von Ly6C^{lo} Monozyten ausgeht.

Ergebnisse

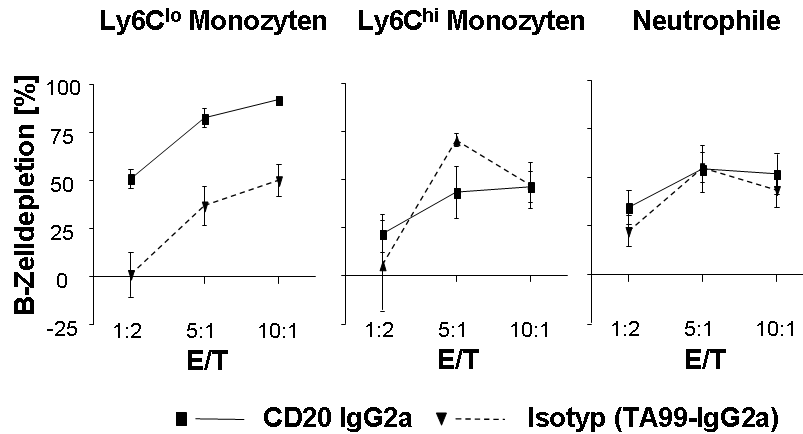


Abbildung 41: *In vitro* Analyse der Effektorzellen der B-Zelldepletion.

Darstellung der Kapazität von Ly6C^{lo} Monozyten, Ly6C^{hi} Monozyten und Neutrophiler Zellen B-Zellen zu depletieren. Angegeben ist das E/T-Verhältnis in Anwesenheit des CD20-IgG2a Antikörpers bzw. der Isotyp Kontrolle (TA99-IgG2a) repräsentativ aus n=3 unabhängigen Experimenten (Abbildung adaptiert aus (122)).

2. Auswirkung der CD20 Immuntherapie im Scurfy Mausmodell

Da der Autoimmunphänotyp in Scurfy Mäusen sehr früh nach der Geburt auftritt, wurden bereits die trächtigen Muttertiere mit dem anti-CD20 Antikörper intravenös injiziert. Es war so möglich mit dem plazentagängigen anti-CD20 Antikörper vom IgG2a Isotyp B-Zellen bereits in den ungeborenen Mäusen zu depletieren. Nach der Geburt erfolgte eine wöchentliche Injektion der Jungtiere. Um zu untersuchen, ob der immuntherapeutische Ansatz eine Auswirkung auf das Überleben der Versuchstiere hatte, wurde deren Lebensdauer notiert, in Überlebenskurven dargestellt und mit unbehandelten Scurfy Tieren verglichen. Durch die CD20 Therapie erreichten Scurfy Tiere signifikant verringerte Mortalitäten. Im Median überlebten die behandelten Tiere 75,5 Tage verglichen mit unbehandelten Scurfy Kontrolltieren, die im Median nach 28 Tagen verstarben (Abbildung 42).

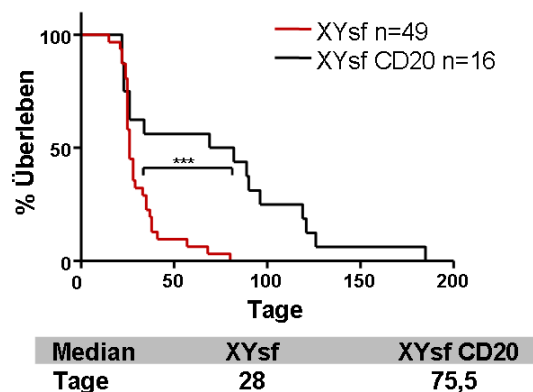


Abbildung 42: Einfluss der CD20 Therapie auf die Letalität der Scurfy Maus.

Darstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven der Versuchstiere im Zeitverlauf. Zur Übersicht sind unbehandelte XYsf (rot) und CD20 behandelte XYsf (schwarz) Tiere dargestellt. Die Lebensdauer der

Ergebnisse

Tiere wurde in Tagen notiert und mit dem Auswerteprogramm *Graph-Pad®* graphisch dargestellt. Unter der graphischen Darstellung ist das Überleben der Genotypen im Median notiert.

Bei Betrachtung des humoralen Immunsystems konnte eine signifikant reduzierte Konzentration der Immunglobuline IgM, IgG1 und IgE nachgewiesen werden (Abbildung 43). Im arithmetischen Mittel betrug die Serum-Konzentration von IgM in CD20 behandelten Mäusen 0,095 mg/ml verglichen mit einer mittleren Konzentration von 1,11 mg/ml in unbehandelten Scurfy Tieren. Die Quantifizierung von IgG1 ergab im Mittel 0,441 mg/ml in den CD20 behandelten Scurfy Tieren und 3,838 mg/ml in den unbehandelten Kontrollen. Das arithmetische Mittel der IgE Konzentration reduzierte sich von 0,088 mg/ml in normalen Scurfy Individuen auf 0,025 mg/ml in CD20 therapierten Scurfy Tieren.

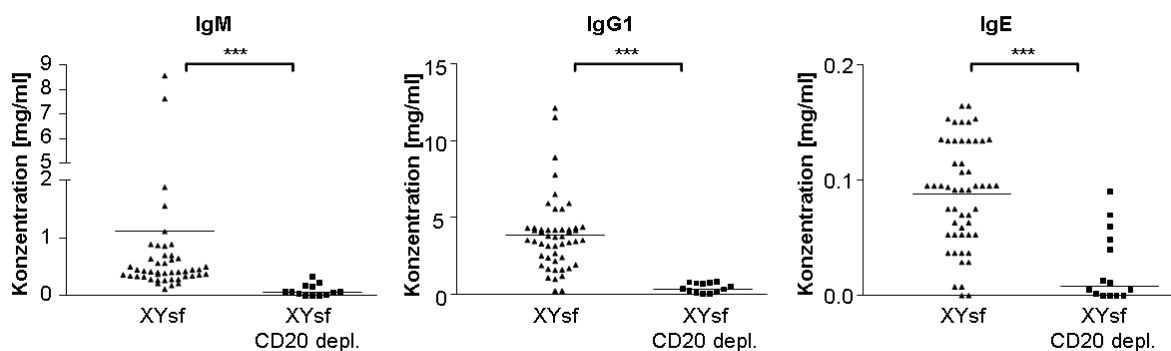


Abbildung 43: Vergleich der Konzentration der Immunglobuline im Serum CD20 therapierter und nicht-therapierter Scurfy Tiere.

Quantifizierung der angegebenen murinen Immunglobuline mittels ELISA. Angegeben sind die Konzentrationen in vier Wochen alten unbehandelten XYsf Tieren im Vergleich zu vier bis zehn Wochen alten CD20 therapierten XYsf Tieren. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: *** $p < 0,001$. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Mittels mikroskopischer Analysen kryokonservierter Milzpräparate konnte bestätigt werden, dass es in den Scurfy und C57BL/6 CD20 therapierten Tieren zur Depletion von B220⁺ B-Zellen kam. Wie in Abbildung 44A zu sehen ist, fanden sich in den folliculären Strukturen nur TCRβ⁺ T-Zellen. Abbildung 44B verdeutlicht, dass sich in den behandelten Mäusen keine Antikörper-produzierenden Plasmazellen (CD138⁺) entwickelten.

Ergebnisse

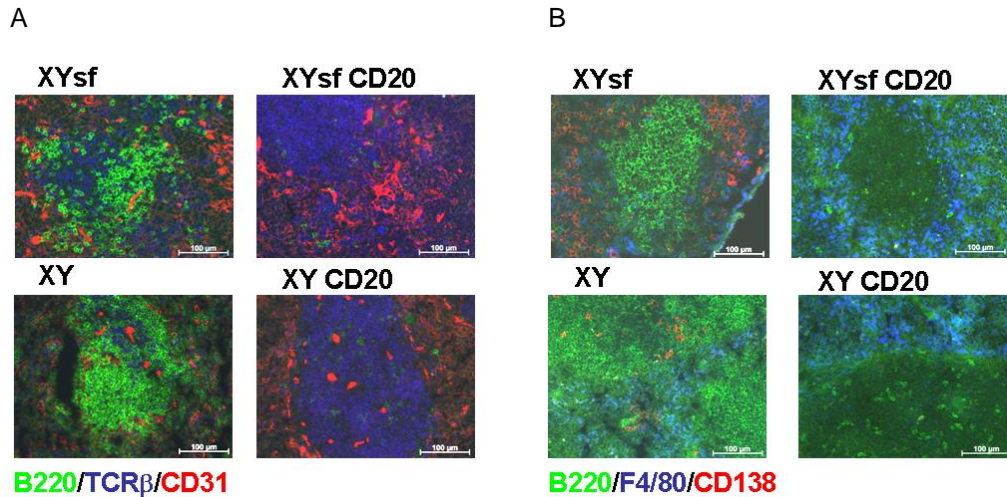


Abbildung 44: Immunhistologische Untersuchung der CD20-vermittelten B-Zelldepletion in der Milz.

(A) Färbung der kryokonservierten Milzschnitte mit Antikörpern spezifisch für B-Zellen (B220-Alexa488, grün), T-Zellen (TCR β -APC, blau) und Endothelzellen (CD31-PE, rot). (B) Färbung mit Antikörpern spezifisch für Antigene auf B-Zellen (B220-Alexa488, grün), Plasmazellen (CD138-PE, rot) und Makrophagen (F4/80-Alexa647, blau). Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob es in den behandelten Scurfy Tieren zu zellschädigenden und entzündungsauslösenden Ablagerungen von Antigen-Antikörper-Komplexen in den Glomeruli der Nieren kommt. Aufgrund der fehlenden B-Zellen kam es in den CD20 behandelten Scurfy Tieren nicht zu einer Ablagerung von Immunkomplexen der Isotypen IgM, IgG1 und IgE (Abbildung 45). Exemplarisch sind hier Nierenpräparate einer acht Wochen alten CD20 behandelten Scurfy Maus gezeigt. Der Makrophagenmarker F4/80 leistete Hilfestellung bei der Lokalisation der Glomeruli, da sich F4/80⁺ Zellen um den Glomerulus herum anlagern.

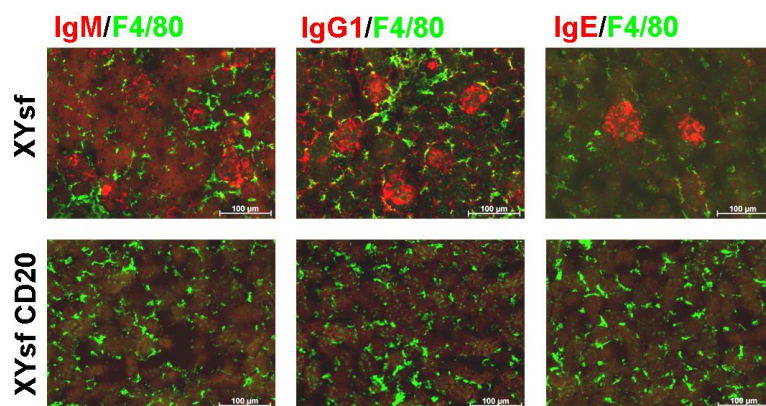


Abbildung 45: Immunfluoreszenzmikroskopische Detektion von Immunkomplexablagerungen in kryokonservierten Nierenpräparaten CD20 behandelter und unbehandelter Scurfy Tiere.

Färbung der Nierenschnitte mit Immunglobulin-spezifischem, fluoreszenzmarkiertem Antikörper sowie mit dem Makrophagenmarker F4/80. Exemplarisch ist eine Immunfluoreszenzfärbung dargestellt. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Ergebnisse

Außerdem konnte in den CD20 behandelten Scurfy Tieren ein signifikanter Anstieg der Thrombozyten gegenüber den unbehandelten Scurfy Tieren beobachtet werden. Im Mittel lag die Anzahl der Thrombozyten bei den CD20 behandelten Tieren bei 1146×10^3 pro μl Blut, wohingegen die nicht behandelten Mäuse im Mittel nur $540,38 \times 10^3$ Blutplättchen pro μl Blut aufwiesen (Abbildung 46).

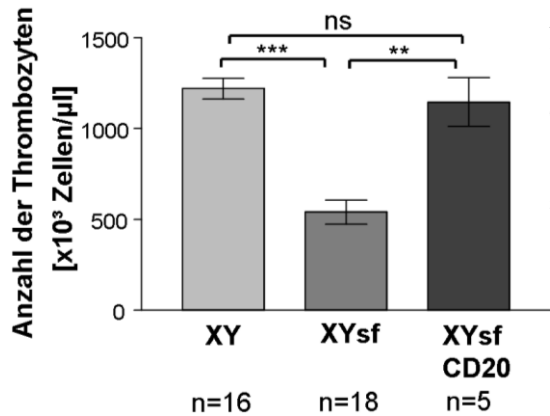


Abbildung 46: Anstieg der Thrombozytenzahl in CD20 behandelten Scurfy Tieren.

Darstellung der Thrombozytenzahl aus dem Vollblut der Mäuse, gemessen am Hämatozytometer (Advia® Siemens). Darstellung des Signifikanzniveaus: ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Allerdings konnte keine Reduktion der Größe der Infiltrate im hepatischen Gewebe beobachtet werden (Abbildung 47).

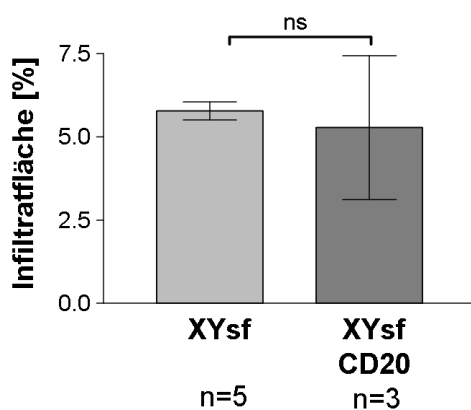


Abbildung 47: Vergleich der mikroskopisch bestimmten prozentualen Anteile der Leberinfiltrate.

Darstellung der Infiltratgrößen prozentual zur Gesamtfläche der Lebergewebeschnitte vier Wochen alter XYsf und CD20 behandelter XYsf Mäuse. Vermessen wurden die Infiltrat- sowie die Gesamtfläche mithilfe der AxioVision Rel. 4.8 Software. Darstellung des Signifikanzniveaus: ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der immuntherapeutische Ansatz der anti-CD20 Antikörpergabe im Scurfy Mausmodell positive Effekte auf das Überleben und die Pathogenese der behandelten Tiere hatte. Diese Effekte waren weniger effizient als die genetische Deletion von B-Zellen. Zwar kam es nicht zur Ablagerung von Ig-Immunkomplexen und zur Antikörpervermittelten Zerstörung von Blutplättchen, aber entzündliche Leberinfiltrate konnten durch die CD20 Therapie nicht reduziert werden.

IV. Einfluss der Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems auf die Autoimmunpathologie der Scurfy Maus

CD11b⁺ myeloide Zellen sind im Scurfy Mausmodell stark expandiert. Diese Zellen werden über das Mac-1 (Makrophagen Antigen-1) Molekül, einem Heterodimer aus der α -Untereinheit CD11b (ITGAM) und dem Oberflächenmolekül CD18, zu Infektionsherden rekrutiert (123). Es sollte geklärt werden, inwiefern eine Aktivierung dieser Zellen an der Autoimmunpathologie beteiligt sein könnte. Um dies zu untersuchen, wurden Scurfy Mäuse mit CD11b-defizienten (CD11b^{-/-}) Tieren verpaart, in denen die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems aus dem Blut in das Gewebe stark eingeschränkt ist.

1. Auswirkung der CD11b-Defizienz im Scurfy Mausmodell auf Letalität, Körpergewicht und Milzgewicht

Wie in Abbildung 48A gezeigt war sowohl in den CD11b^{-/-} als auch in den CD11b^{-/-} Scurfy Tieren das CD11b-Molekül abwesend. Im Vergleich zu Scurfy Tieren ergab die Analyse der zellulären Zusammensetzung des Blutes in CD11b-defizienten Scurfy Mäusen eine weniger ausgeprägte Reduktion des B-Zellkompartiments. T-Zellen zeigten in allen untersuchten Individuen einen ähnlichen prozentualen Anteil. Geht man davon aus, dass die restlichen Zellen im Blut der CD11b^{-/-} Scurfy Tiere, die nicht mit B- und T-Zellmarkern gefärbt werden können myeloide Zellen sind, dann kommt es auch hier zu einer Expansion dieser Zellen (Abbildung 48).

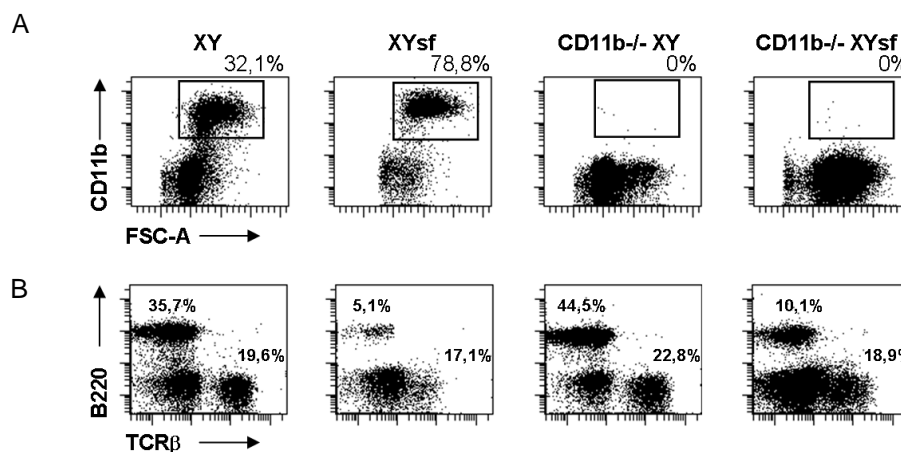


Abbildung 48: Darstellung der CD11b-Defizienz in CD11b^{-/-} Mäusen.

(A) Durchflusszytometrische Darstellung der CD11b exprimierenden Zellen im Blut vier Wochen alter Wildtyp und Scurfy Mäuse sowie CD11b-defizienter Tiere. (B) Durchflusszytometrische Analyse der B220⁺ B-Zellen und TCRβ⁺ T-Zellen.

Ein wichtiger Hinweis für eine Rolle von CD11b bei der Autoimmunpathologie wäre ein verlängertes Überleben der CD11b-defizienten Scurfy Tiere. Wie in Abbildung 49A dargestellt zeigten die Scurfy CD11b^{-/-} Mäuse im Vergleich zu den Scurfy Tieren tatsächlich ein signifikant verlängertes Überleben. Bei den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren stieg die

Ergebnisse

Lebensspanne im Median auf 83 Tage an, wobei bereits die heterozygoten Scurfy CD11b^{+/-} Tiere mit einem Median von 80 Tagen ähnlich lange wie die *Knockout* Tiere lebten. Zudem wurde das Körpergewicht vier Wochen alter Scurfy CD11b^{-/-} und CD11b^{-/-} Mäuse erfasst und mit dem der Scurfy Tiere verglichen. Abbildung 49B zeigt die signifikante Erhöhung des Körpergewichtes der Scurfy CD11b^{-/-} Tiere (12,28g Mittelwert) im Vergleich zu den Scurfy Tieren (Mittelwert 9,6g). Allerdings war in den CD11b-defizienten Scurfy Tieren noch immer eine hochsignifikante Reduktion gegenüber den CD11b^{-/-} Kontrollen (Mittelwert 20,05g) detektierbar. Tendenziell verminderte sich das Milzgewicht der Scurfy CD11b^{-/-} Tiere im Vergleich zu Scurfy Tieren (Abbildung 49C).

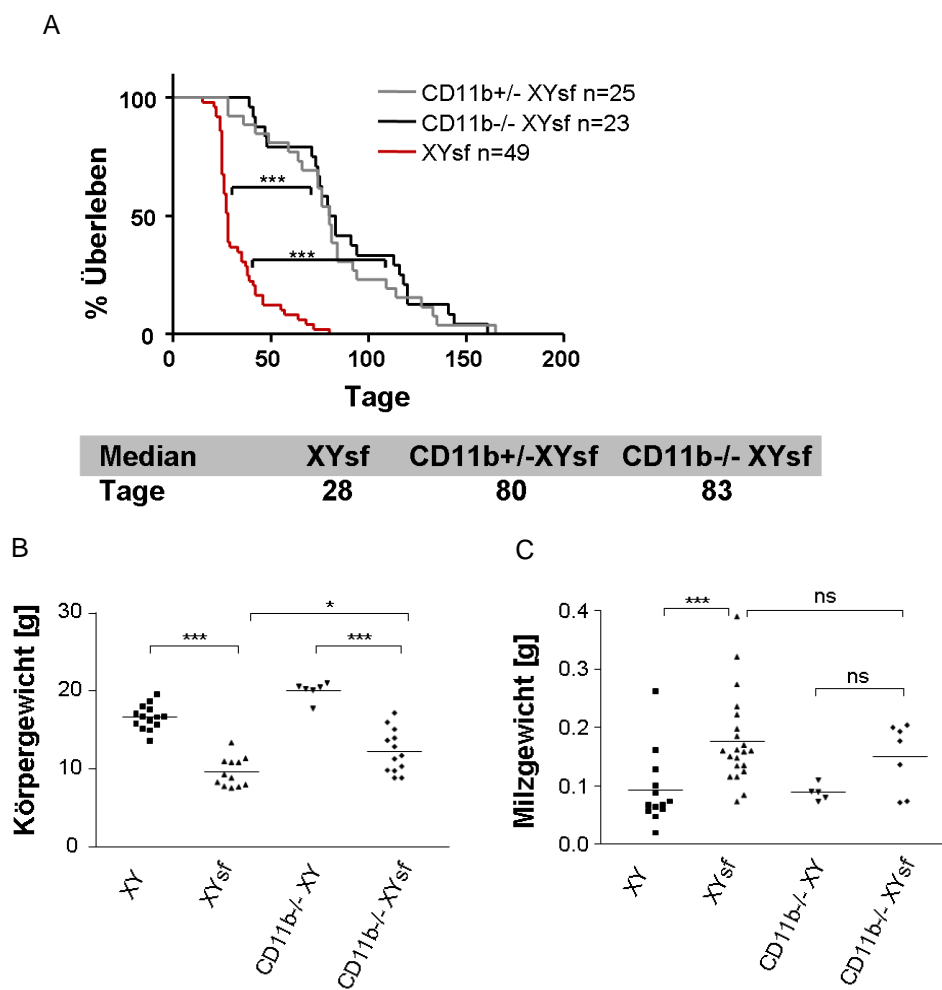


Abbildung 49: Einfluss der Rekrutierung von CD11b⁺ Zellen auf die Letalität, Körpergewicht und Milzgewicht der Scurfy Maus.

(A) Darstellung der Kaplan-Meier Überlebenskurven der Versuchstiere im Zeitverlauf. Zur Übersicht sind die Genotypen CD11b^{+/+}-XYsf (grau), CD11b^{-/-}-XYsf (schwarz) und XYsf (rot) dargestellt. Die Lebensdauer der Tiere wurde in Tagen notiert und mit dem Auswerteprogramm *Graph-Pad*® graphisch dargestellt. Unter der graphischen Darstellung ist das Überleben der Genotypen im Median notiert. Vergleich von Körper- (B) und Milzgewicht (C) zum vier Wochen Zeitpunkt. Zur Erstellung der Diagramme wurde das Gewicht in ermittelt. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * p<0,05, *** p<0,001, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

2. Auswirkung der CD11b-Defizienz auf die Autoimmunpathologie

Ob es in den Scurfy CD11b^{-/-} ähnlich wie in Scurfy Tieren zu einer Autoantikörpervermittelten Thrombozytendepletion kommt, sollte im Folgenden untersucht werden. Die Blutplättchenwerte von Scurfy und Scurfy CD11b^{-/-} Tieren wurden mittels eines Hämatozytometers bestimmt. Die Thrombozytenzahlen in Abbildung 50 zeigten in den Scurfy CD11b^{-/-} Individuen ähnlich reduzierte Werte wie in den Scurfy Tieren. Eine signifikante Reduktion verglichen mit den CD11b^{-/-} Wildtyp Mäusen konnte beobachtet werden (Mittelwert: Scurfy 540,38 x10³ pro µl Blut, Scurfy CD11b^{-/-} 634 x10³ pro µl Blut, CD11b^{-/-} 1336,87 x10³ pro µl Blut).

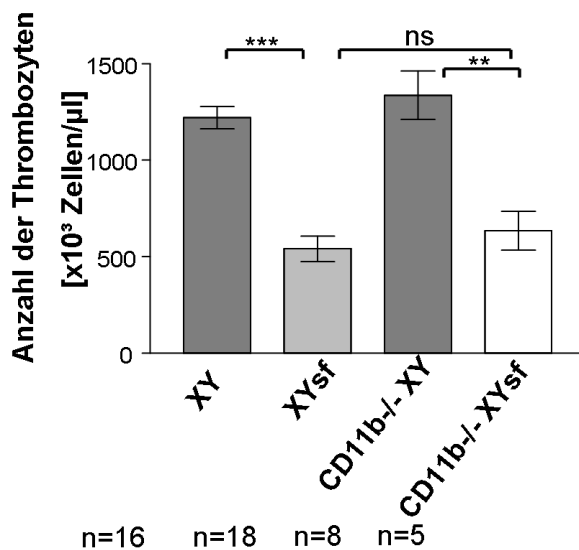


Abbildung 50: Bestimmung der Thrombozytenzahl in CD11b^{-/-} XYsf Mäusen.

Analyse der Thrombozytenzahl aus Vollblut, am Hämatozytometer (Advia® Siemens). Untersucht wurden vier Wochen alte Mäuse der angegebenen Genotypen. Darstellung des Signifikanzniveaus: ** p<0,01, *** p<0,001, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Weiterhin kommt es bei den Scurfy Tieren, wie im Ergebnisteil unter 2.2 dargestellt, zu krankhaften Veränderungen der Nierenfunktion und damit zu einem erhöhten BUN-Wert. Die Scurfy CD11b^{-/-} Tiere zeigten zum Zeitpunkt von vier Wochen eine signifikante Reduktion des BUN-Gehaltes im Serum verglichen mit den Scurfy Individuen (Abbildung 51A). Das arithmetische Mittel der BUN-Konzentration in Scurfy CD11b^{-/-} Tieren lag bei 28,20 mg/dl, wohingegen Scurfy im Mittel einen Wert von 38,91 mg/dl aufweisen. Allerdings konnte ein signifikanter Anstieg in Scurfy CD11b^{-/-} im Vergleich zu CD11b^{-/-} Kontrolltieren (Mittelwert 22,19 mg/dl) detektiert werden. Zelluläre Veränderungen in den Nieren wurden histologisch beurteilt. Abbildung 51B zeigt repräsentativ einen Sirius Red gefärbten Paraffingewebeschnitt des Scurfy und Scurfy CD11b^{-/-} Genotyps. Im Alter von vier Wochen konnte die starke Entzündung, wie sie in den Scurfy Tieren auftrat, in den Scurfy CD11b^{-/-} Mäusen noch nicht beobachtet werden. Eine Reduktion des BUN-Serumgehaltes spricht für eine verbesserte Nierenleistungsfähigkeit und für ein vermindertes Auftreten pathologischer Veränderungen in den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren.

Ergebnisse

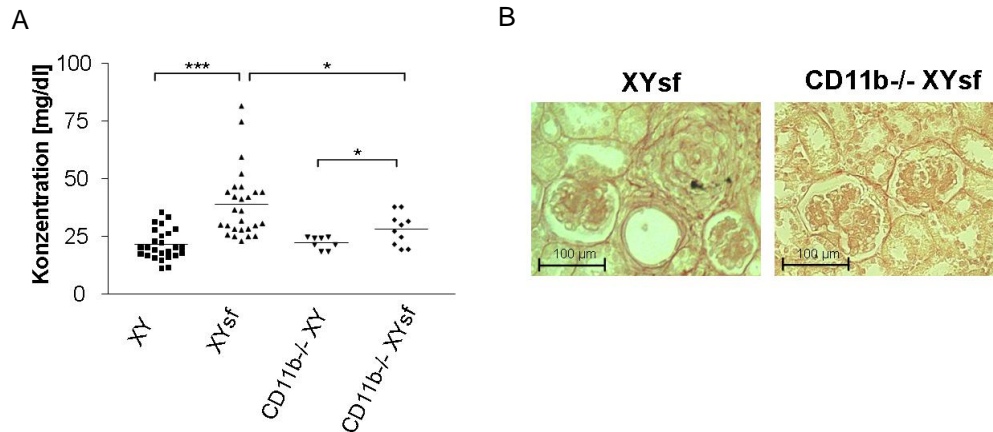


Abbildung 51: Nierenfunktion und -struktur vier Wochen alter Scurfy und Scurfy CD11b^{-/-} Tiere. (A) Vergleich der BUN-Werte zum vier Wochen Zeitpunkt. Linien markieren den arithmetischen Mittelwert der untersuchten Mäuse. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. (B) Exemplarische Darstellung der Entzündungsareale in Sirius Red gefärbten Nierengewebeschnitten.

Weiterhin sollte geklärt werden, welche Auswirkungen das beeinträchtigte Rekrutierungsverhalten der Zellen des angeborenen Immunsystems auf die Zusammensetzung und Größe der inflammatorischen Organinfiltrate hat. Hierzu wurden Sirius Red gefärbte Leberschnitte mikroskopisch untersucht und der prozentuale Anteil der Entzündung zur Gesamtfläche ermittelt. Abbildung 52B zeigt, dass in den vier Wochen alten Scurfy Tieren im Mittel 5,78% ($\pm 0,55$) der Gesamtleberfläche betroffen waren, hingegen sank der prozentuale Anteil der Leberinfiltrate in den untersuchten Scurfy CD11b^{-/-} Tieren auf 3,08% ($\pm 1,62$). Zu einem späteren Zeitpunkt, nach acht bis zehn Wochen, kam es in den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Leberinfiltrate im Vergleich zu den vier Wochen alten Scurfy CD11b^{-/-} Tieren. Diese Daten zeigten, dass sich der Leberphänotyp der Scurfy CD11b^{-/-} Mäuse im Zeitverlauf verschlechterte und die Infiltratfläche ähnlich groß war, wie in den vier Wochen alten Scurfy Tieren.

Um zu untersuchen, ob es in Abwesenheit des CD11b-Moleküls zu einer Veränderung in der zellulären Zusammensetzung und des Aktivierungsstatus der eingewanderten Zellen in der Leber kommt, wurden Gewebeschnitte vier Wochen alter Mäuse mit Sirius Red und immunhistologischer Antikörperfärbung angefärbt und mikroskopisch analysiert. Wie in Abbildung 52A zu sehen ist, war in den Kontrolltieren, im Gegensatz zu den Scurfy und Scurfy CD11b^{-/-} Mäusen keine Entzündung des hepatischen Gewebes detektierbar. Bei den Scurfy und Scurfy CD11b^{-/-} konnte eine Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf der Oberfläche der infiltrierenden Leukozyten nachgewiesen werden, wobei in den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren eine Verminderung der CD69⁺ Zellen beobachtet wurde (Abbildung 52C). Sowohl in den Leberinfiltraten der Scurfy, als auch in den Infiltraten der CD11b-defizienten Scurfy Tiere fanden sich CD19⁺ B-Zellen. Auch konnten in beiden Gruppen Eosinophile SiglecF⁺ Zellen, CD11c⁺ DZ sowie CD3⁺ T-Zellen detektiert werden (Abbildung 52D).

Ergebnisse

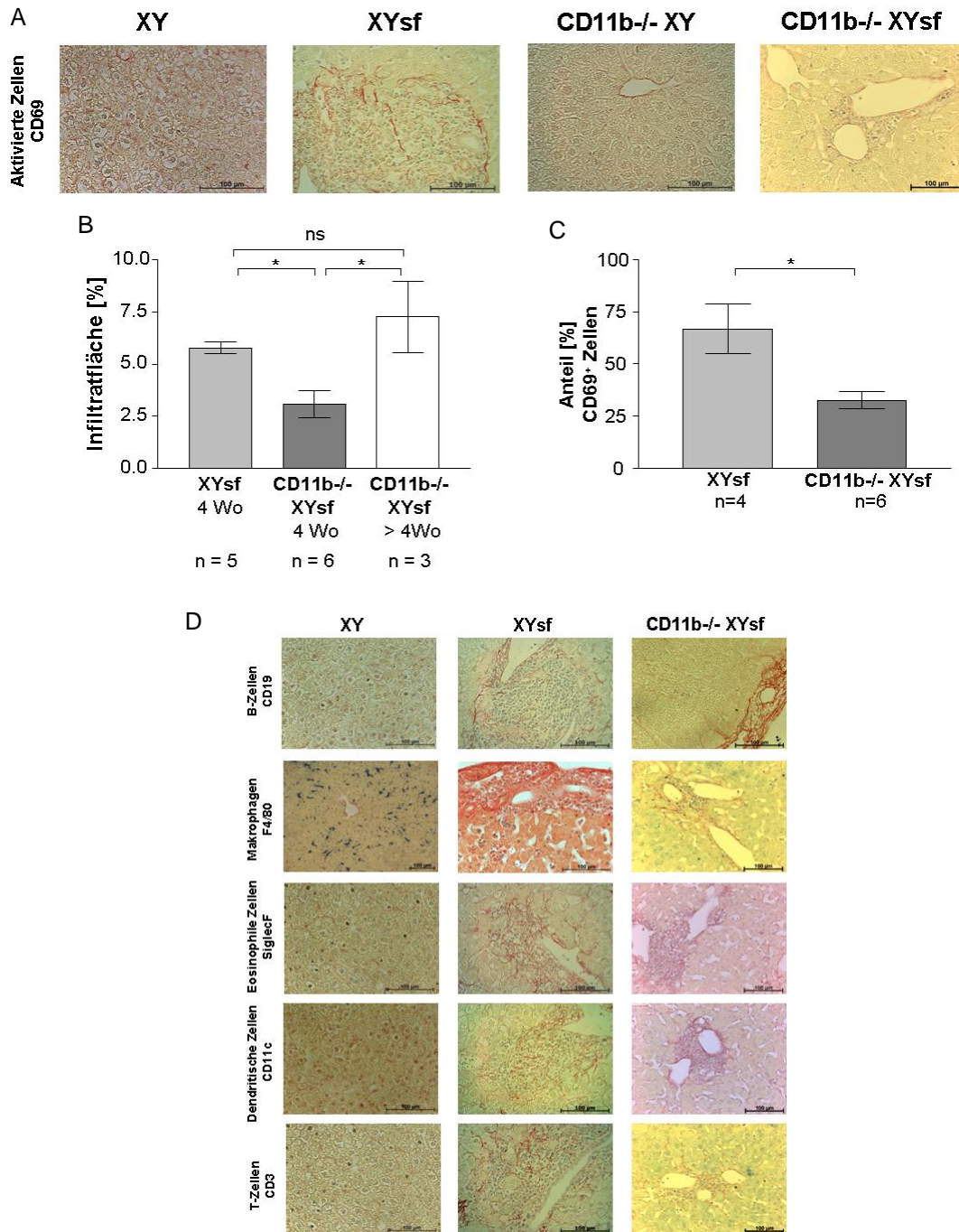


Abbildung 52: Immunhistochemische Detektion verschiedener Zellpopulationen in Leberpräparaten.

(A) Identifizierung CD69⁺ aktivierter Zellen in Sirius Red gefärbten Leber-Paraffinschnitten durch sequentielle Färbung mit biotinylierten Primärantikörper des angegebenen Antigens und sekundärem Streptavidin-AKP Antikörper (blau). (B) Darstellung der Infiltratgrößen prozentual zur Gesamtfläche der Lebergewebeschnitte vier Wochen alter XYsf und CD11b^{-/-} XYsf Mäuse. Vermessen wurden die Infiltrat- sowie die Gesamtfläche mithilfe der AxioVision Rel. 4.8 Software. (C) Quantifizierung der CD69⁺ Zellen anteilig zur Gesamtzellzahl. Darstellung des Signifikanzniveaus: * p<0,05, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test. (D) Identifizierung spezifischer, infiltrierender Zellen in Leber-Paraffinschnitten durch sequentielle Färbung mit biotinylierten Primärantikörper des angegebenen Antigens und sekundärem Streptavidin-AKP Antikörper (blau). Bildaufnahmen in 400-facher Vergrößerung.

Ergebnisse

Des Weiteren konnten in den kleineren Infiltraten, eine im Vergleich zu Scurfy Tieren verminderte Anzahl IgG1, IgM und IgE sekretierender Plasmazellen im hepatischen Gewebe der CD11b^{-/-} Scurfy Tiere nachgewiesen werden (Abbildung 53).

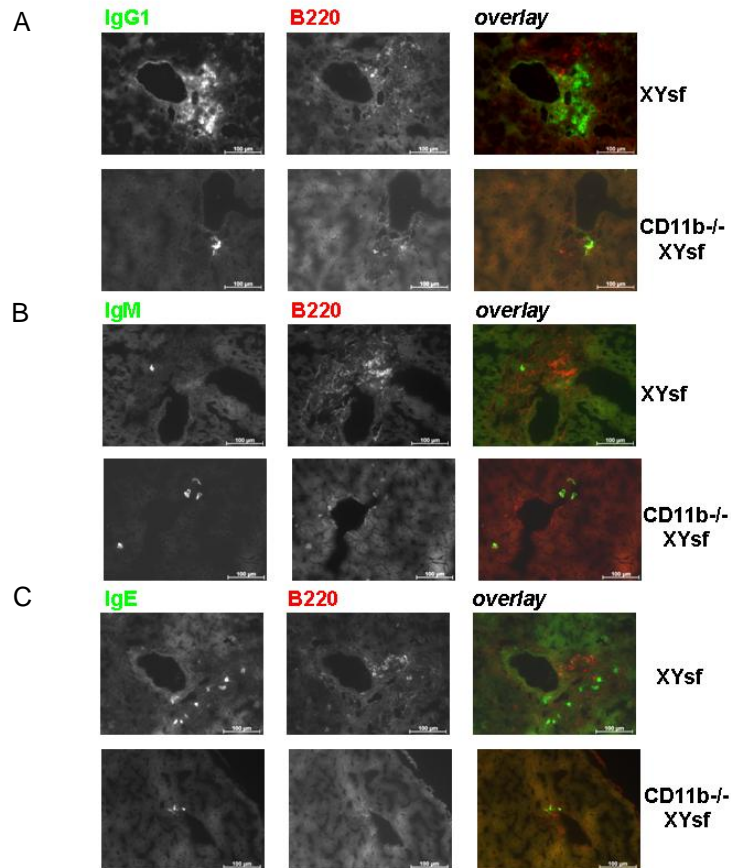


Abbildung 53: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung von IgM, IgG1 und IgE sekretierenden Plasmazellen in Leberpräparaten von Scurfy und CD11b-defizienten Scurfy Tieren.

Identifizierung der IgG1 (A), IgM (B) und IgE (C) positiven Plasmazellen mithilfe fluoreszenzmarkierter spezifischer Antikörper, sowie B220 positiver B-Zellen. Bildaufnahmen in 200-facher Vergrößerung.

Folglich bekräftigen diese Ergebnisse die These, dass der Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems eine wichtige Rolle in der Autoimmunpathologie der Scurfy Maus zugesprochen werden kann.

3. Humorale Veränderungen in CD11b-defizienten Scurfy Tieren

Wie in Abbildung 16 gezeigt, kam es in Scurfy Tieren zu erhöhten Antikörpertitern und dem Auftreten von autoreaktiven Antikörpern. In den Scurfy CD11b^{-/-} Individuen konnte eine signifikante Reduktion des Isotyps IgM (arithmetischer Mittelwert 1,032 mg/ml) gegenüber den Scurfy Tieren (arithmetischer Mittelwert 1,398 mg/ml) (Abbildung 54) beobachtet werden. Dennoch ist die IgM-Serumkonzentration in den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren im

Ergebnisse

Vergleich zu den CD11b^{-/-} Tieren (arithmetischer Mittelwert 0,096 mg/ml) signifikant erhöht. Die quantitative Bestimmung der Subklasse IgG1 ergab eine nicht signifikante Reduktion in den Scurfy CD11b^{-/-} Individuen (Mittelwert: 3,054 mg/ml; Scurfy Mittelwert: 4,496 mg/ml). Auch hier kam es in den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren im Vergleich zu den CD11b^{-/-} Individuen zu einem signifikanten Anstieg (arithmetischer Mittelwert: 0,196 mg/ml). Im Gegensatz dazu war die IgE Serumkonzentration in Scurfy CD11b^{-/-} Tieren signifikant erhöht, verglichen mit Scurfy Tieren (Mittelwert Scurfy CD11b^{-/-} 0,113 mg/ml und Scurfy 0,084 mg/ml). In den CD11b^{-/-} Kontrolltieren konnte kein IgE detektiert werden.

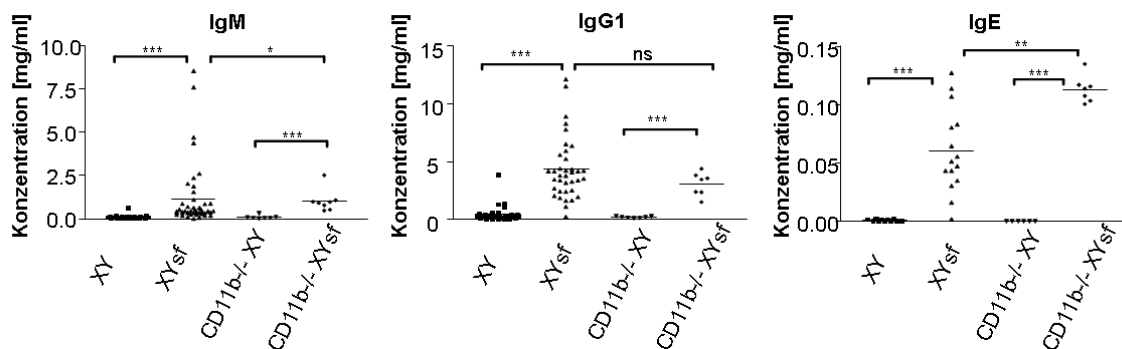


Abbildung 54: Quantifizierung der Immunglobuline im Serum vier Wochen alter XY, XYsf, CD11b^{-/-} XY und CD11b^{-/-} XYsf Mäuse.

Analyse der Konzentration der angegebenen murinen Immunglobuline mittels ELISA. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

Nach der Analyse und Quantifizierung der Konzentration der Immunglobuline im Serum sollten die spezifischen Autoantikörper wie anti-GPI und anti-dsDNA Antikörper semiquantitativ bestimmt und mit Scurfy Tieren verglichen werden. Abbildung 55A zeigt den Nachweis von anti-GPI Autoantikörpern vom Isotyp IgM (oben) und IgG1 (unten) im Serum vier Wochen alter Wildtyp, Scurfy, CD11b^{-/-} und Scurfy CD11b^{-/-} Individuen. Ein signifikanter Anstieg der anti-GPI Antikörper vom IgM Isotyp war in den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren im Vergleich zu den Scurfy Individuen nachweisbar. Dagegen kam es zu keinen signifikanten Differenzen im Auftreten von anti-GPI Antikörpern der Subklasse IgG1. Signifikante Unterschiede zeigten sowohl IgM als auch IgG1 anti-dsDNA Antikörper (Abbildung 55B). Diese waren in den Scurfy CD11b^{-/-} Tieren verglichen mit den Scurfy Tieren erhöht. Zusammenfassend traten durch den CD11b *Knockout* keine Verminderungen der Immunglobuline im Serum auf. Spezifische Autoantikörper waren zum Teil, im Vergleich zu Scurfy Versuchstieren in Scurfy CD11b^{-/-} Tieren sogar erhöht.

Ergebnisse

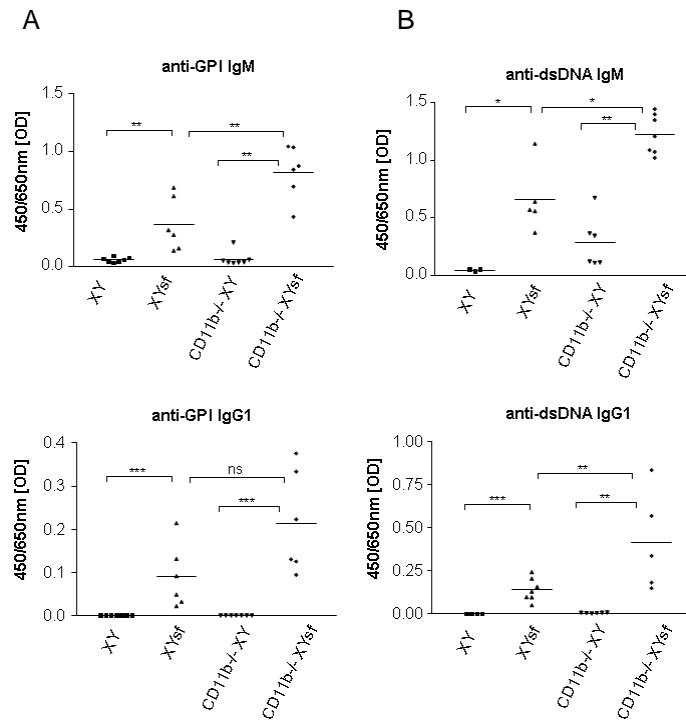


Abbildung 55: Analyse von anti-GPI und anti-dsDNA Antikörpern in Seren vier Wochen alter Mäuse.

Identifizierung und semiquantitative Analyse von anti-GPI (A) und anti-dsDNA (B) Antikörpern im Serum von XY, XYsf, CD11b^{-/-} XY sowie CD11b^{-/-} XYsf Individuen über ELISA-Technik. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

4. Auswirkung der CD11b-Defizienz auf das Zytokinmilieu

Im Weiteren sollte untersucht werden, inwiefern es im CD11b-defizienten Scurfy Mausmodell zu Veränderungen im Zytokinmuster kommt, oder ob ähnliche Zytokine wie in den Scurfy Individuen dereguliert sind. Die Zytokine und Chemokine wurden in den Seren der vier Wochen alten Tiere der verschiedenen Gruppen mittels *Cytometric Bead Array* (CBA) analysiert (Abbildung 56). Die pro-inflammatorischen Th-1 Zytokine TNF- α und IFN- γ waren im Serum der vier Wochen alten Scurfy CD11b^{-/-} Tiere verglichen mit den Werten in den Scurfy Tieren tendenziell vermindert (Mittelwert Scurfy CD11b^{-/-} TNF- α : 61,87 pg/ml; IFN- γ : 8,633pg/ml; Mittelwert Scurfy TNF- α : 118,118 pg/ml; IFN- γ : 16,905 pg/ml). Dagegen kam es zu einer drastischen Verminderung von IL-5, welches nur in einer der neun untersuchten Scurfy CD11b^{-/-} Mäuse überhaupt detektierbar war. Eine ähnlich starke Reduktion trat für das Chemokin MCP-1 auf. Keine signifikanten Unterschiede zeigte IL-6 (Mittelwert Scurfy CD11b^{-/-} 75,967 pg/ml; Mittelwert Scurfy 167,134 pg/ml). Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 konnte nur im Serum einer der neun untersuchten Scurfy CD11b^{-/-} Versuchstiere nachgewiesen werden, wohingegen fünf der 14 getesteten Scurfy Tiere detektierbare IL-10

Ergebnisse

Level aufwiesen. MIP-1 α war nur in einzelnen Scurfy CD11b^{-/-} und Scurfy Tieren nachweisbar und zeigte aufgrund der großen Streuung keine signifikanten Unterschiede.

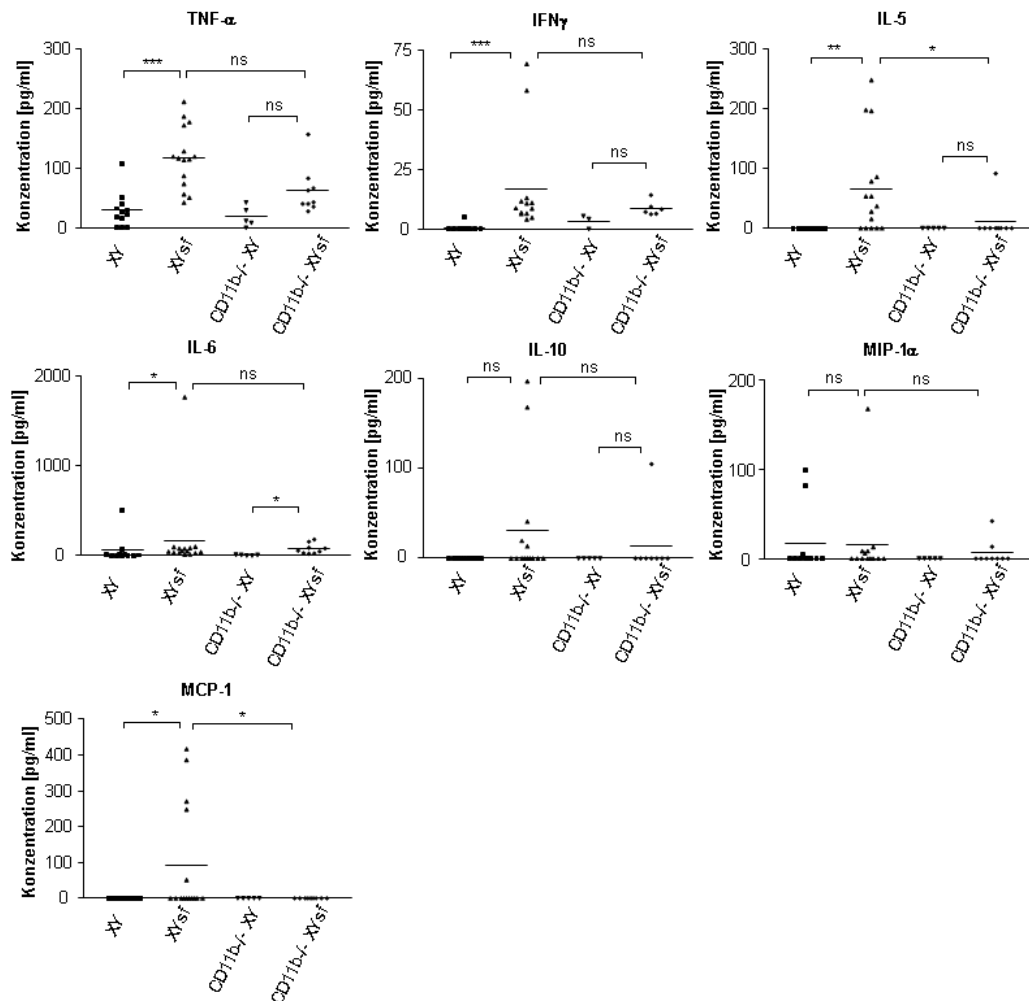


Abbildung 56: Darstellung der Zytokin-Konzentrationen im Serum vier Wochen alter XY, XYsf sowie CD11b^{-/-} XY und CD11b^{-/-} XYsf.

Analyse der Konzentration der angegebenen murinen Zytokine mittels *Cytometric Bead Array*. Linien markieren den Mittelwert. Darstellung des Signifikanzniveaus: * p < 0,05, ** p < 0,01, *** p < 0,001, ns nicht signifikant. Berechnet wurde das Signifikanzniveau mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test.

5. Veränderungen in der Zusammensetzung des T-Zellkompartiments in CD11b-defizienten Scurfy Tieren

Wie in Abbildung 31 bereits gezeigt, konnte im Blut der vier Wochen alten Scurfy Tiere eine tendenzielle Reduktion der CD4⁺ T-Zellen beobachtet werden. Inwieweit sich der Anteil der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen in CD11b-defizienten Scurfy Tieren ändert, sollte durchflusszytometrisch analysiert und mit Scurfy Tieren verglichen werden. Abbildung 57 stellt den prozentualen Anteil der CD4⁺ T-Helferzellen und der CD8⁺ Zytotoxischen T-Zellen dar. Im Vergleich zu den Scurfy Tieren kam es in den Scurfy CD11b^{-/-} Individuen nicht zu

Ergebnisse

einem Anstieg der CD8⁺ T-Zellen (arithmetischer Mittelwert: CD8⁺ T-Zellen 48,86%; CD4⁺ T-Zellen 51,1%). In CD11b^{-/-} Kontrolltieren betrug der Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Mittel 60,7%, CD8⁺ T-Zellen machten 39,3% der T-Zellen aus.

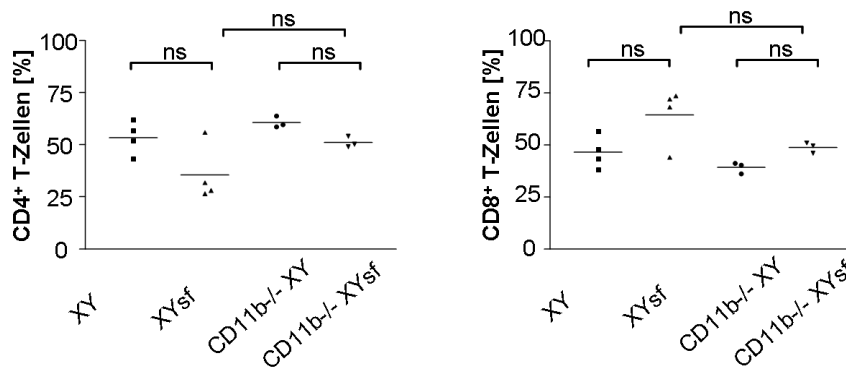


Abbildung 57: Durchflusszytometrische Analyse der Zusammensetzung des T-Zellkompartiments in CD11b-defizienten Scurfy und Wildtyp Tieren.

Darstellung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im Blut. T-Zellen wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern spezifisch für das Antigen TCR β bestimmt. Linien markieren den Mittelwert.

Zusammen mit den Ergebnissen der vorherigen Abschnitte bekräftigen diese Ergebnisse die These, dass die Rekrutierung der CD11b⁺ Zellen eine wichtige Rolle in der Autoimmunpathologie des Scurfy Maus spielt. Die Scurfy CD11b^{-/-} Tiere zeigten trotz erhöhter Antikörpertiter eine verminderte Mortalität im Vergleich zu den Scurfy Tieren. Der Nierenretentionsparameter BUN war reduziert und anhand der Sirius Red gefärbten Nierenpräparate konnte eine Verbesserung des autoaggressiven Scurfy Nierenphänotyps beobachtet werden. Entzündliche Leberinfiltrate waren im Alter von vier Wochen reduziert, nahmen dann im Zeitverlauf zu.

E. Diskussion

Ein Defekt im X-chromosomal gelegenen *foxp3*-Gen führt sowohl beim Menschen (IPEX-Syndrom) als auch in der Maus (Scurfy-Phänotyp) zu einer systemischen Autoimmunerkrankung und in den meisten Fällen zum frühen Tod der betroffenen Individuen. Das Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der eine Rolle in der Entwicklung der regulatorischen T-Zellen (T_{Regs}) spielt. Fehlt diese Zellpopulation, kann die Toleranz des Immunsystems gegenüber körpereigenen Antigenen nicht aufrechterhalten werden. Die Funktion von T_{Regs} und die Interaktion mit anderen Immunzellen ist ein kritischer Punkt auf dem Weg zum Verständnis der Scurfy Autoimmunität. Es ist bisher weitgehend unklar, welche der fehlregulierten Immunantworten in welchem Ausmaß zu der hohen Letalität beitragen. Im Detail sollte die Beteiligung von B-Zellen und die von B-Zellen produzierten Antikörpern sowie die Notwendigkeit der Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems in periphere Gewebe, an den unterschiedlichen pathologischen Veränderungen der Scurfy Maus geklärt werden.

1. Die Autoimmunpathologie der Scurfy Maus

Wie aus der Literatur bekannt, zeigte sich auch in dieser Arbeit bei den Scurfy Tieren eine starke Beeinträchtigung der körperlichen Entwicklung. Meist verstarben die Scurfy Individuen vor der 4. Lebenswoche (68). Neben erhöhten Serumkonzentrationen von IgG1, IgG3 und IgM kommt es in Scurfy Mäusen vor allem zu stark erhöhten IgE Spiegeln (vgl. Abbildung 16). Die Identität der Antigene, die die starke IgE Immunantwort vorantreiben, konnte bislang noch nicht identifiziert werden. Im IPEX Patienten konnte durch Nahrungsmittelallergien eine Beteiligung exogener Antigene an der IgE Antwort nachgewiesen werden (93). Inwieweit Nahrungs-Antigene und die mikrobielle Flora in der Pathogenese der Scurfy Tiere eine Rolle spielen, ist derzeit Gegenstand der Forschung (93). Eine Assoziation der hohen IgE Serumkonzentrationen und der im Scurfy Mausmodell auftretenden Dermatitis wäre denkbar. Deshalb soll in weiterführenden Forschungsvorhaben der Fokus auf der Untersuchung des Hautphänotyps der Scurfy Maus liegen. Es wäre vorstellbar, dass eine Autoimmunerkrankung ursächlich für die Dermatitis im Scurfy Mausmodell ist und Antigene der IgE Antwort innerhalb der Hautstruktur identifiziert werden könnten. Die Blasenbildung im induzierten Mausmodell des Bullous pemphigoid (BP) ähnelt phänotypisch stark dem Hautphänotyp der Scurfy Maus. Bei der BP kommt es zu subepidermaler Blasenbildung verursacht durch Autoantikörper gegen Kollagen-Typ 17-Moleküle. Ob es im Scurfy Mausmodell zu Ig-Ablagerungen auf der *Lamina Lucida*, der Basalmembran die Dermis und Epidermis voneinander trennt kommt, gilt es immunhistologisch zu klären. Der Nachweis

zirkulierender anti-Kollagen-Typ 17 Antikörper im Serum könnte mittels ELISA erfolgen. Auch im humanen System ist ein Fallbeispiel bekannt, in dem IPEX mit der Pemphigous Nodularis Erkrankung assoziiert ist. In Hautbiopsien des Patienten konnten C3 und IgG Ablagerungen auf der Basalmembran sowie Antikörper gegen das BP Antigen nachgewiesen werden (124). Neben Autoantikörpern spielen CD4⁺ T-Zellen eine wichtige Rolle für die in der Scurfy Maus auftretende Autoimmunität (78, 80, 99, 125). So kann durch den adoptiven Transfer der CD4⁺ CD8⁻ T-Zellen aus *foxp3*-defizienten Scurfy Tieren ein Scurfy-ähnlicher Phänotyp in Nacktmäusen induziert werden (78, 126). Des Weiteren führt die Antikörper-vermittelte Depletion der CD4⁺ T-Zellen sowohl zu einem um etwa drei Wochen verlängerten Überleben, als auch zu einer teilweise verminderten Autoimmunpathologie. Die Deletion der CD8⁺ T-Zellen hatte dagegen keinen Einfluss auf das Überleben der Scurfy Tiere (78).

In gesunden C57BL/6 Kontrolltieren sind prozentual ähnlich viele CD4⁺ wie CD8⁺ T-Zellen im peripheren Blut nachweisbar. In den Scurfy Tieren dagegen zeigte sich eine tendenzielle Reduktion der CD4⁺ T-Zellen. Denkbar wäre, dass aktivierte CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut in Organe wie Milz, Lymphknoten und Leber auswandern und somit der Anteil der CD4⁺ T-Zellen im Blut absinkt. Für diese These sprechen Ergebnisse die zeigten, dass CD4⁺ T-Zellen vermehrt im Milzgewebe der Scurfy Tiere zu finden sind (vgl. Abbildung 14). Ein zu gesunden Kontrolltieren ähnliches CD4/CD8 T-Zellverhältnis, eine abgemilderte Autoimmunität und weniger infiltrierende, aktivierte Zellen in der Leber der B-Zell- und CD11b-defizienten Tiere könnten darüber hinaus mit einer verminderten Auswanderung der CD4⁺ T-Zellen aus dem Blut in Verbindung gebracht werden (vgl. Abbildung 31 und Abbildung 27 sowie Abbildung 57 und Abbildung 52). Eine durchflusszytometrische Quantifizierung der CD4/CD8 T-Zellverhältnisse in den Organen aller Scurfy Mausvarianten würde letztendlich Aufschluss geben.

Zudem konnten in dieser Dissertation pathologische Veränderungen der Scurfy Maus, wie eine Glomerulonephritis-artige Erkrankung (vgl. Abbildung 8), eine Immunthrombozytopenie (ITP) (vgl. Abbildung 21) sowie eine starke Entzündungen der Leber (vgl. Abbildung 9) nachgewiesen werden.

Welche Rolle B-Zellen und die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems an den unterschiedlichen Erkrankungen der Scurfy Maus spielen, sollte im eigens hierfür generierten B-Zelldefizienten und CD11b-defizienten Scurfy Modell analysiert werden.

Die genetische Deletion des *μMT*-Gens führt zu einem Block in der B-Zellentwicklung im Stadium der Prä-B-Zellen und damit zur Abwesenheit reifer B-Zellpopulationen (117). B-Zellen spielen eine zentrale Rolle in der humoralen Immunität, regulieren CD4⁺ T-Zellantworten auf Fremd- und Selbst-Antigene (127, 128), fungieren als Antigen-präsentierende Zellen (APC) (129), produzieren Zytokine (130), geben kostimulatorische Signale (131) und begünstigen die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen in Richtung Th-

1 oder Th-2 Phänotypen (130). Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es vorstellbar, dass B-Zellen und deren Autoantikörper an der Entwicklung von Erkrankungen im Scurfy Autoimmunmodell beteiligt sein könnten. Tatsächlich zeigten B-Zelldefiziente Scurfy Tiere bereits im heterozygoten Zustand ($\mu\text{MT}^{+/-}$ Scurfy) eine, im Vergleich zu Scurfy Tieren, verbesserte körperliche Entwicklung und ein signifikant verlängertes Überleben (vgl. Abbildung 23). Sobald naive Milz-B-Zellen, die in den Donormäusen die normale zentrale Toleranz durchlaufen haben, durch adoptiven Zelltransfer in das B-Zelldefiziente System der Scurfy Tiere zurückgebracht werden, migrieren diese in primäre lymphatische Organe und bilden B-Zellfollikel aus (vgl. Abbildung 33). Zudem entwickeln sich diese naiven B-Zellen zu Autoantikörper-sekretierenden Plasmazellen, was auf ein Fehlen eines peripheren humoralen Toleranzkontrollpunktes schließen lässt (vgl. Abbildung 33). Eine Erklärung hierfür könnte die direkte und indirekte Interaktion von T_{Regs} und B-Zellen liefern. Aus der wissenschaftlichen Literatur ist bekannt, dass T_{Regs} die Autoantikörperproduktion der B-Zellen unterdrücken bzw. B-Zellen direkt eliminieren können (100-103, 132). Indirekten Einfluss auf B-Zellen nehmen T_{Regs} durch eine defekte Suppression von T-Helferzellen, was zu einer verstärkten Produktion von Autoantikörpern im Lupusmodell führt (133). Der Anstieg der Mortalität in den B-Zelltransferierten Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tieren (vgl. Abbildung 37) könnte mit der Sekretion von gewebszerstörenden Antikörpern in Verbindung gebracht werden. Allerdings ist es auch vorstellbar, dass B-Zellen im Scurfy System neben der Produktion von gewebszerstörenden Antikörpern auch als APC fungieren und im Verbund mit MHC-II Molekülen Autoantigene an CD4^{+} T-Zellen präsentieren. Die Funktion der B-Zellen als APC (129) könnte durch den Transfer MHC-II-defizienter B-Zellen in Scurfy $\mu\text{MT}^{-/-}$ Tieren analysiert werden. In diesen Experimenten wäre von großem Interesse, ob die transferierten B-Zellen, ähnlich wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zu Plasmazellen ausdifferenzieren.

In den inflammatorischen Infiltraten, die in Scurfy Mäusen in verschiedenen Organen nachgewiesen werden konnten, fanden sich eine Vielzahl von Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Für die Rekrutierung dieser Zellen in Organe ist eine Auswanderung aus dem Blut mittels verschiedener Adhäsionsmoleküle notwendig (134, 135). Eine wichtige Rolle spielt vor allem die Proteinfamilie der β_2 -Intergrine (134). Durch nicht-kovalente Bindung der β -Untereinheit (CD18) und der jeweiligen α -Untereinheit (CD11a, b, c) bilden sich die heterodimeren Glykoproteine LFA-1 (CD11a/CD18) auf Leukozyten, Mac-1 (CD11b/CD18) und p150/95 (CD11c/CD18) auf Monozyten, Makrophagen, polymorphkernige Leukozyten (PMLs) und NK-Zellen aus (123, 135-137). Neben der Adhäsion übernimmt Mac-1 Aufgaben bei der Vermittlung der Phagozytose und der Superoxid-Produktion (123). Es gilt auch als Komplement-Rezeptor Typ 3 und bindet das Komplement-Protein C3bi, das sich auf der Oberfläche opsonisierter Fremdzellen befindet (138, 139). Eine Expression von Mac-1 konnte auch auf aktivierten CD8^{+} T-Zellen und einer

Subpopulation der B1-Zellen der Bauchhöhle nachgewiesen werden (140, 141). In CD11b-defizienten Tieren zeigte sich eine stark eingeschränkte Rekrutierung myeloider Zellen aus dem Blut in das Gewebe, was der Grund für die Wahl dieser Tiere für den Versuchsansatz war (142). Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren ein breites Repertoire an aktivierenden Fc γ -Rezeptoren und können daher nach Kontakt mit, im Gewebe abgelagerten Immunkomplexen pro-inflammatorische Mediatoren, wie etwa Sauerstoffradikale freisetzen und so zur Gewebeschädigung beitragen (121, 143-146).

Im Vergleich zu Scurfy Tieren zeigten die CD11b-defizienten Scurfy Mäuse ein bereits im heterozygoten Zustand signifikant verlängertes Überleben und einen stark abgemilderten Autoimmunphänotyp (vgl. Abbildung 49). Im Folgenden soll auf Veränderungen im Autoimmunphänotyp in den verschiedenen Scurfy Mausvarianten im Detail eingegangen werden.

1.1 Verbesserung der Glomerulonephritis-artigen Symptomatik in B-Zell- und CD11b-defizienten Scurfy Mäusen

Im Bezug auf den Nierenphänotyp sind bislang nur makroskopisch sichtbare Veränderungen der renalen Struktur wie blasse, schlecht durchblutete Nieren im Scurfy Mausmodell beschrieben (68, 99). In dieser Arbeit konnten in Scurfy Tieren mikroskopisch sichtbare pathologische Veränderungen der Nierenstruktur nachgewiesen werden, die eine Glomerulonephritis-ähnliche Symptomatik belegen. Verursacht durch eine Vielzahl an Faktoren, kann eine Glomerulonephritis auch ein Symptom einer Reihe von Autoimmunerkrankungen sein und durch eine starke Ablagerung von Immunkomplexen und der damit einhergehenden Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems hervorgerufen werden (105, 106, 147). Tatsächlich konnte in den Scurfy Versuchstieren eine Entzündung und Zerstörung der Glomeruli (vgl. Abbildung 8) und eine Abgelagerung von Immunkomplexen nachgewiesen werden. Einer Verdickung der extrazellulären Matrix sowie eine massive Infiltration kernhaltiger Zellen in die Glomeruli konnte beobachtet werden (vgl. Abbildung 8). In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen kam es durch renale Dysfunktion zu einem Anstieg des BUN-Gehaltes im Serum (vgl. Abbildung 8).

Der Verlust der B-Zellen und der von diesen Zellen hergestellten Autoantikörper bedingt einen abgemilderten Autoimmunphänotyp und vermindert die Letalität. Durch fehlende Antikörperablagerungen in den Glomeruli kam es nicht mehr zu mikroskopisch sichtbaren pathologischen Veränderungen der Nierenstruktur (vgl. Abbildung 25). In Anbetracht eines reduzierten BUN-Gehaltes im Serum kann auf eine verbesserte renale Leistungsfähigkeit geschlossen werden (vgl. Abbildung 25).

In CD11b-defizienten Scurfy Mäusen finden sich in Nierengewebeschnitten noch Antikörperablagerungen, dennoch ließen sich mikroskopisch keine Entzündungen mehr nachweisen, was sich in einer Reduktion des BUN-Gehaltes widerspiegelte (vgl. Abbildung

51). Diese Befunde bestätigen die Hypothese, dass die Rekrutierung von myeloiden Effektorzellen, mittels des Adhäsionsmoleküls CD11b, am komplexen Autoimmunphänotyp der Scurfy Maus beteiligt ist und eine Einwanderung der Zellen in das Nierengewebe pathologische Veränderungen verursacht. Fasst man die Daten aus dem B-Zelldefizienten und CD11b-defizienten Scurfy Mausmodell zusammen, so scheint die Glomerulonephritis-artige Erkrankung in der Scurfy Maus durch gewebserstörende Antikörper, aber auch durch die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems ausgelöst zu werden. Bisher noch nicht im Detail untersucht wurde, ob es sich im Scurfy Mausmodell um Immunkomplexablagerungen oder um spezifische, gegen Komponenten der Glomeruli gerichtete Antikörper handelt. Generell liegt die Vermutung nahe, dass es durch die Ablagerung von Immunkomplexen zu Komplementaktivierung bzw. Vernetzung von aktivierenden Fc γ R auf Zellen des angeborenen Immunsystems kommt, wodurch es zu diesen pathologischen Veränderungen der Niere kommen kann. Aufschluss hierüber können in Zukunft nur die Kreuzung der Scurfy Tiere zu beispielsweise Fc γ R- oder C3-defizienten Tieren bringen.

1.2 Verminderte Entzündung der Leber in B-Zell- und CD11b-defizienten Scurfy Mäusen

Starke Entzündungen in nicht-lymphoiden Organen und das Gewebe infiltrierende Leukozyten sind ein weiteres, aus der Literatur bekanntes Symptom der autoaggressiven Erkrankung der Scurfy Maus (43, 68, 74, 76, 79). Ansammlungen von aktivierten Immunzellen konnten in den Entzündungsarealen der Scurfy Tiere nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 14). Zudem bildete sich extrafollikuläres Gewebe in der Leber (vgl. Abbildung 14). Es konnte gezeigt werden, dass sich T-Zellen, B-Zellen sowie Dendritische Zellen in engem Kontakt befinden, was auf eine Aktivierung dieser Zellpopulationen auch außerhalb der lymphoiden Organe hindeutet.

Tatsächlich fanden sich in den zellulären Infiltraten der Leber IgG1, IgM und IgE sekretierende Plasmazellen. Autoantikörper werden somit direkt in der Leber produziert und könnten dort schädigend wirken. Bestärkt wird diese These durch einen abgemilderten Leberphänotyp und kleinere entzündliche Infiltrate in B-Zelldefizienten Scurfy Tieren (vgl. Abbildung 26).

Zu einer verminderten Entzündung der Leber kam es auch in CD11b-defizienten Scurfy Tieren (vgl. Abbildung 52). Allerdings konnten in den reduzierten Leberinfiltraten Ig-sekretierende Plasmazellen detektiert werden (vgl. Abbildung 53). Unsere Ergebnisse zeigten eine zeitliche Verzögerung der Rekrutierung der Leukozyten in die Leber. In Anbetracht dessen wäre es vorstellbar, dass in CD11b-defizienten Scurfy Tieren auch die Auswanderung der Plasmazellen in die Leber beeinträchtigt ist und sich somit zum vier Wochenzeitpunkt weniger gewebserstörende Antikörper in der Leber befinden. Dies könnte

den erhöhten Autoantikörper-Titer im Serum der CD11b-defizienten Tiere im Vergleich zu den Scurfy Tieren erklären (vgl. Abbildung 54 und Abbildung 55). Fasst man die Daten aus dem B-Zelldefizienten und CD11b-defizienten Scurfy Mausmodell zusammen, so scheinen wiederum sowohl B-Zellen (bzw. die von Plasmazellen produzierten Autoantikörper) als auch die Rekrutierung von Zellen des angeborenen Immunsystems für die Leberentzündung verantwortlich zu sein. Allerdings stehen funktionelle Studien noch aus. Denkbar hierbei wäre die Messung der Aktivität der Transaminasen ALT/AST im Serum der betroffenen Scurfy Tiere. Die von Hepatozyten produzierten Enzyme Alanin-Aminotransferase (ALT) und Aspartat-Aminotransferase (AST) liegen in gesunden Hepatozyten zytoplasmatisch vor, gelangen aber bei Schädigung der Leber und Zerstörung der Leberzellen in den Blutkreislauf (148, 149). Aufgrund unserer histologischen Befunde wäre eine Reduktion dieser Werte im Vergleich zu Scurfy Tieren zu erwarten. Auch hier wäre eine Kreuzung von Scurfy Mäusen zu Fc γ R-defizienten Mäusen von großem Interesse, um die direkte Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems durch von B-Zellen produzierte Autoantikörper nachzuweisen.

1.3 Auswirkung der Abwesenheit von B-Zellen oder des CD11b Moleküls auf die ITP in Scurfy Mäusen

Die Blutgerinnung wird über Thrombozyten vermittelt. Diese Zellen werden von Megakaryozyten sezerniert, adhärieren an die beschädigte Blutgefäßwand und aggregieren durch fibrinvermittelte Bindung mit anderen Thrombozyten (150). Im Rahmen von Autoimmunerkrankungen können Blutplättchen-spezifische Autoantikörper auftreten, die durch die Quervernetzung von Fc γ -Rezeptoren auf Phagozyten zu einer Entfernung der Thrombozyten aus dem Blut und damit zu einer Immunthrombozytopenie (ITP) führen (122). Wie von Bernard et al. beschrieben, konnte auch in dieser Arbeit eine ausgeprägte ITP in Scurfy Tieren nachgewiesen werden. Als möglicher Grund für die verminderte Plättchenzahl im Scurfy Mausmodell und in IPEX-Patienten wurde eine Rolle des Transkriptionsfaktors Foxp3 für die Megakaryopoese sowie für die Thrombozyten Funktion genannt. So konnte in Scurfy Mäusen eine defekte Megakaryopoese beobachtet werden, charakterisiert durch eine verminderte Anzahl reifer Megakaryozyten im Knochenmark. Allerdings wurde kein Nachweis geführt, der eine Autoantikörper-vermittelte ITP ausschließt (151).

In dieser Dissertation konnten eindeutig Blutplättchen-spezifische Autoantikörper vom IgM und IgG1 Isotyp nachgewiesen werden. Eine maßgebliche Funktion dieser Autoantikörper wird durch die Abwesenheit der ITP in B-Zelldefizienten Scurfy Mäusen belegt (vgl. Abbildung 24). Da es zu einer kompletten Normalisierung der Plättchenzahl kommt, kann auf einen nur geringen Beitrag der veränderten Megakaryopoese geschlossen werden.

In den CD11b-defizienten Scurfy Tieren dagegen kommt es weiterhin zu einer Reduktion der Thrombozyten (vgl. Abbildung 50). Über welche Effektormechanismen die Anti-Thrombozyten-Antikörper der Isotypen IgG1 und IgM zur Depletion der Thrombozyten

führen, gilt es noch zu klären. Antikörper vom IgG1 Isotyp sind nicht in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren und vermitteln ihre Effektorfunktionen über Fc γ -Rezeptor III (146). Dagegen sind IgM Antikörper effiziente Aktivatoren des Komplementsystems, wodurch es zu einer Opsonisierung und Komplementrezeptor-vermittelten Phagozytose von Blutplättchen kommen kann (152, 153). Vorstellbar wäre auch ein Fc γ -Rezeptor und Komplement-unabhängiger Mechanismus. Bei dem durch die Bindung der IgG1 und IgM Antikörper Blutplättchen aktiviert werden. Durch die Aktivierung käme es zu morphologischen Veränderungen der Thrombozyten und schließlich zur Aggregation nach ADP-abhängiger Aktivierung des Glykoprotein (GP) IIb/IIIa-Rezeptors durch fibrinogenvermittelte Vernetzung der Blutplättchen (154). Die Kreuzung der Scurfy Tiere zu Fc γ R- oder C3-defizienten Tieren könnte in diesem Zusammenhang Aufschluss über die Rolle des Komplementsystems und der Fc γ -Rezeptor bei der ITP im Scurfy Mausmodell geben. Dass der Verlust von CD11b keinen Einfluss auf die Phagozytose von Blutplättchen hat, stimmt mit Daten unserer Arbeitsgruppe aus dem passiven Autoimmunmodellen überein, in denen gezeigt werden konnte, dass eine Monozyten Subpopulation im Blut maßgeblich an der Plättchendepletion beteiligt ist (122).

2. Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze

Neben genetischen Ansätzen war ein wichtiges Ziel dieser Dissertation neue therapeutische Ansätze im Scurfy Mausmodell zu entwickeln. Aufgrund unserer vielversprechenden Daten in B-Zelldefizienten Scurfy Tieren boten sich B-Zellen als therapeutisches Ziel an. Hierfür wurde zunächst die Aktivität eines am Lehrstuhl von Professor Winkler neu etablierten Antikörpers, der gegen Maus CD20 gerichtet ist, charakterisiert. Nach Injektion dieses Antikörpers kommt es zu einer effizienten B-Zelldepletion, die durch Ly6C^{lo}Fc γ RIV⁺ Monozyten vermittelt wird und abhängig von den aktivierenden Fc γ RI und Fc γ RIV ist (Abbildung 40) (122).

Im Hinblick auf die Frage ob die anti-CD20 Therapie als Äquivalent zum B-Zelldefizienten Scurfy Mausmodell therapeutische Anwendung finden kann, wurden Scurfy Mäuse regelmäßig mit dem Antikörper therapiert und dessen Wirkung auf den Autoimmunphänotyp mit der des Scurfy μ MT^{-/-} Modells verglichen. Die therapierten Mäuse zeigten eine signifikante Verlängerung der Lebensspanne gegenüber unbehandelten Scurfy Tieren (Abbildung 42). Der Verlust von B-Zellen, sowohl durch genetische Deletion als auch durch die therapeutische Depletion hatte eine positive Wirkung auf das Überleben der betroffenen Scurfy Tiere.

Bei der Behandlung von Leukämie und Entzündungskrankheiten ist die Depletion von B-Zellen ein vielfach angewendetes therapeutisches Verfahren, bei dem entartete bzw. pathogene Antikörper-produzierende B-Zellen zerstört werden. Ein klassisches Beispiel

hierfür ist die Behandlung von Non-Hodgkin Lymphomen und der Rheumatoiden Arthritis mit dem therapeutischen Antikörper Rituximab, der gegen das B-Zell-spezifische Oberflächenantigen CD20 gerichtet ist. Dieser führt nach Applikation über verschiedene Fc-abhängige und unabhängige Mechanismen zu einer Reduktion der B-Zellen (155, 156). Die anti-CD20 Therapie gilt als medizinisch etabliert, was den langwierigen Prozess klinischer Studien bis hin zur therapeutischen Zulassung verkürzen würde. Für betroffene IPEX Patienten würde das einen zeitnahen Einsatz von anti-CD20 Antikörpern bei der Behandlung bedeuten. Als kurative Therapie im IPEX Patienten ist bislang nur eine allogene Knochenmarkstransplantation möglich (84, 157). Die anti-CD20 Therapie könnte den aggressiven Krankheitsverlauf zumindest bis zu einer Knochenmarkstransplantation abmildern. Aus der wissenschaftlichen Literatur ist bisher ein Fallbeispiel bekannt, bei dem Rituximab bei einem IPEX Patienten mit zusätzlicher Pemphigus Nodularis Erkrankung Anwendung fand. Erfolgreich konnte die Blasenbildung der Haut nach Rituximab Therapie reduziert werden, allerdings ist über den weiteren Krankheitsverlauf des Patienten nichts bekannt (124).

Zukünftige Forschungsvorhaben könnten therapeutische Ansatzpunkte beinhalten, die die Autoantikörper-induzierte Gewebeerstörung durch IgG-Antikörper verhindern. Im *in vivo* Modell konnte bereits gezeigt werden, dass eine effiziente Hydrolyse der Zuckerseitenkette aller IgG Subklassen durch die Endoglykosidase S (EndoS) als potentes therapeutisches Werkzeug genutzt werden kann, Autoantikörper-induzierter Gewebeerstörung entgegen zu wirken (143). EndoS entfernt durch enzymatische Deglykosylierung die funktionell wichtige Zuckerseitenkette am Asparagin-Rest 297 in der konstanten Domäne des Antikörpers, was den Verlust der pro-inflammatorischen Aktivität zur Folge hat (158-162). Die regelmäßige Injektion der Scurfy Tiere mit EndoS könnte einen positiven Einfluss auf die Autoimmunpathologie der Scurfy Tiere haben. Auf lange Sicht könnte hier allerdings ein auftreten neutralisierender EndoS spezifischer Antikörper problematisch sein.

Auch eine Behandlung mit dem Protease Inhibitor Bortezomib, der zur Depletion von Plasmazellen führt (163), könnte im Scurfy Mausmodell zur Linderung der autoaggressiven Erkrankungen führen. Ein weiterer therapeutischer Angriffspunkt könnte die durch Kreuzvernetzung aktivierender Fc γ -Rezeptoren induzierte Signalkaskade sein. Die Protein Kinase Syk (*spleen tyrosine kinase*) nimmt hier eine zentrale Stellung ein und wird als Zielprotein zur Inhibition Fc γ -Rezeptor-abhängiger Effektormechanismen bei Rheumatoider Arthritis und bei Lymphomen verwendet (164, 165). Die Behandlung mit dem Syk-Inhibitor R406 zeigte vielversprechende Verbesserungen der Thrombozytopenie in Patienten mit ITP (166, 167). Im Scurfy Mausmodell wäre eine Behandlung der ITP durch die Inhibition von Syk und eine damit verbundene Blockade der Fc γ -abhängigen Phagozytose der Blutplättchen vorstellbar.

Des Weiteren könnten im therapeutischen Modell $Fc\gamma$ -vermittelte Effektormechanismen durch die Blockade der $Fc\gamma$ -Rezeptoren inhibiert werden. Hierzu wäre die regelmässige Applikation von Antikörpern, die spezifisch die aktivierenden $Fc\gamma$ -Rezeptoren blockieren (anti- $Fc\gamma$ RIV, anti- $Fc\gamma$ RIII, anti- $Fc\gamma$ RI) denkbar.

Neben erhöhten Serumkonzentrationen von IgG1, IgM und IgG3 wurde in Scurfy Mäusen vor allem stark erhöhte IgE Spiegel beobachtet (vgl. Abbildung 16). IgE kann über Bindung an den hochaffinen $Fc\epsilon$ RI, der auf Basophilen, Eosinophilen und Mastzellen exprimiert ist, diese Zellen nach Erkennung des Zielantigens aktivieren. Insbesondere Eosinophile Zellen sind in der humanen Autoimmunerkrankung IPEX stark expandiert (168). Eosinophile können Peroxidasen, lysosomale, hydrolytische Enzyme freisetzen und starke Gewebszerstörungen verursachen (169). Da auch Scurfy Mäuse an einer Eosinophilie leiden (93), könnte die Akkumulation und Infiltration dieser Zellen in der Leber und auch in der Milz (vgl. Abbildung 14 und Abbildung 9) IgE-abhängig an der Scurfy Autoimmunität beteiligt sein. Weiterführende Studien in einem genetischen Eosinophilen Scurfy *Knockout* Modell könnten die Beteiligung der Eosinophilen Zellen an der Gewebszerstörung belegen. Hierzu müssten GATA-1 defiziente Tiere, denen Eosinophile Zellen fehlen mit *foxp3* heterozygoten weiblichen Tieren verpaart werden. Allerdings sind bislang nur GATA-1 Mäuse auf Balb/c-Hintergrund verfügbar. Umfangreiche Rückkreuzungen mit C57BL/6 Tieren wären nötig, um diese Mäuse mit *foxp3* heterozygoten Weibchen verpaaren zu können. Deshalb würde sich eher der therapeutische Einsatz des Anti-Maus SiglecF Antikörpers und die spezifische Depletion der Eosinophilen Zellen im Scurfy Modell eignen, Erkenntnisse über die Beteiligung dieser Zellen an der Schädigung verschiedener Gewebe zu liefern (170).

Im CD11b-defizienten Scurfy Mausmodell zeigte sich, dass durch die beeinträchtigte Rekrutierung myeloider Zellen die Autoimmunpathologie der Scurfy Tiere verbessert wurde. Zukünftige Forschungsvorhaben könnten sich mit der detaillierten Analyse der CD11b exprimierenden Zellpopulationen beschäftigen, die gewebeszerstörende Effekte vermitteln. Hierbei wäre die Depletion der Neutrophilen Zellen mit Hilfe des 1A8 Antikörpers zu nennen (171), oder die spezifische Depletion der $Ly6C^{\text{lo}}Fc\gamma$ RIV⁺ Monozyten, die wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, eine übergeordnete Rolle bei der ADCC von B-Zellen einnehmen (vgl. Abbildung 41) (122).

F. Material und Methoden

I. Material

1. Chemikalien, Plastik- und Verbrauchsmittel

Alle in dieser Arbeit verwendeten Reagenzien, Chemikalien, Plastik- und Verbrauchsmaterialien stammen, soweit nicht anders angegeben von den Firmen Greiner-Bio-One (Frickenhausen), Sarstedt (Nümbrecht), Nunc (Wiesbaden), Millipore (Schwalbach), VWR (Ismaning), Roth (Karlsruhe), Roche (Mannheim), Eppendorf (Hamburg), J. Peske (Aidling-Arnhofen), Miltenyi Biotech (Bergisch-Gladbach), Sigma (Steinheim), ThermoFisher Scientific (Rockford, USA), Invitrogen (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt), Stanbio (Boerne, USA), Vector (Burlingame, USA), Biozol (Eching), Corning (Wiesbaden), Becton Dickinson (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Sakura (Staufen), Lonza (Basel, Schweiz).

2. Puffer und Lösungen

Alle Puffer, Lösungen und Verdünnungen wurden wie im Methodenteil beschrieben mit Reinstwasser (bidest) hergestellt. Fötales Kälberserum (FCS) wurde vor Gebrauch bei 56°C für 30 min hitzeinaktiviert.

3. Kommerzielle Kits

Kit	Firma, Herkunft
AKP Substrat-Kit	Vector, Burlingame, USA
Avidin/Biotin Blocking	Biozol, Eching
BUN (Blood Urea Nitrogen)	Stanbio, Boerne, USA
DAB Kit	Vector, Burlingame, USA
Alexa Fluor 647 Monoclonal Antibody Labeling Kit	Molecular Probes, Leiden, NL
DSB-XTM Biotin Protein Labeling Kit	Invitrogen, Darmstadt
PureLink HiPure Maxiprep Kit	Invitrogen, Darmstadt
Bethyl Mouse IgM ELISA Quantification Kit	Biomol GmbH, Hamburg
Bethyl Mouse IgG1 ELISA Quantification Kit	Biomol GmbH, Hamburg
Bethyl Mouse IgG2b ELISA Quantification Kit	Biomol GmbH, Hamburg
Bethyl Mouse IgG2c ELISA Quantification Kit	Biomol GmbH, Hamburg
Bethyl Mouse IgG3 ELISA Quantification Kit	Biomol GmbH, Hamburg
Bethyl Mouse IgA ELISA Quantification Kit	Biomol GmbH, Hamburg
Bethyl Mouse IgE ELISA Quantification Kit	Biomol GmbH, Hamburg

4. Antikörper und Konjugate

Die verwendeten Antikörper sind in nachfolgender Tabelle zusammengefasst.

Gegen murine Antigene gerichtete Antikörper:

Antigen	Konjugat	Klon	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
B220	APC	RA3-6B2	FACS	1:400	BD Pharmingen
B220	APC	RA3-6B2	IF	1:50	BD Pharmingen
B220	Alexa488	RA3-6B2	IF	1:200	BD Pharmingen
B220	PE	RA3-6B2	IF	1:100	BD Pharmingen
B220	PerCP	RA3-6B2	FACS	1:100	BD Pharmingen
CD11b	biotin	M1/70	IF	1:50	BD Pharmingen
CD11b	PerCP	M1/70	FACS	1:600	BD Pharmingen
CD11c	APC	N418	FACS	1:400	BD Pharmingen
CD11c	biotin	N418	IF	1:50	AbD Serotec
CD138	PE	Syndecan-1 (281-2)	FACS	1:300	BD Pharmingen
CD138	PE	Syndecan-1 (281-2)	IF	1:100	BD Pharmingen
CD19	biotin	1D3	IF	1:50	BD Pharmingen
CD19	PE	1D3	FACS	1:500	BD Pharmingen
CD3	FITC	145-2C11	IF	1:100	Biolegend
CD3	biotin	145-2C11	IF	1:50	BD Pharmingen
CD31	PE	390	IF	1:100	Biolegend
CD4	APC	GK1.5	IF	1:50	BD Pharmingen
CD45.1	PECy7	A20	FACS	1:1000	BD Pharmingen
CD49b	APC	DX-5	FACS	1:200	BD Pharmingen
CD61	PE	2C9.G2	FACS	1:300	Biolegend
CD69	biotin	H1.2F3	IF	1:50	Biolegend
CD69	PE	H1.2F3	IF	1:100	Biolegend
CD8	APC	53-6.7	IF	1:50	BD Pharmingen
Complement Component C3	FITC	CL7503F	IF	1:250	Cedarlane
F4/80	biotin	Cl:A3-1	IF	1:50	Biolegend
F4/80	Alexa647	MCA497	IF	1:50	AbD Serotec
GR1	PE	RB6-8C5	FACS	1:500	BD Pharmingen
IgE	PE	R35-72	IF	1:100	BD Pharmingen
IgG1	PE	A85-1	IF	1:100	BD Pharmingen
IgG2a	PE	X5563	IF	1:100	Caltag
IgG2a	PE	X5563	FACS	1:500	Caltag
IgMb	FITC	AF6-78	FACS	1:80	Biolegend
IgMb	PE	AF6-78	IF	1:100	Biolegend
MARCO	PE	ED31	IF	1:100	AbD Serotec
Moma	FITC	MOMA-2	IF	1:100	AbD Serotec
Moma	PE	MOMA-2	IF	1:100	AbD Serotec
NK1.1	FITC	PK136	FACS	1:300	BD Pharmingen
SiglecF	biotin	E50-2440	IF	1:50	BD Pharmingen
SiglecF	PE	E50-2440	IF	1:100	Biolegend
TCR β	APC	H57-597	FACS	1:400	BD Pharmingen
TCR β	APC	H57-597	IF	1:50	BD Pharmingen

Verwendete Sekundärantikörper:

Antigen	Konjugat	Klon	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
Biotin	AKP	Streptavidin	IF/IH	1:100	BD Pharmingen
FITC	PE	nicht bekannt	IF	1:300	nicht bekannt

5. Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma Biomers.net, Ulm.

6. Software

Software	Firma, Herkunft	Verwendung
FACSDiva	Becton Dickinson, USA	Durchflusszytometrie
EasyWin32	Herolab, Wiesloch	Geldokumentation
Flowjo	Tree Star, USA	Durchflusszytometrie
GraphPad Prism 3.03	GraphPad Software Inc., USA	Graphische Darstellung und Statistik
SPSS	SPSS Inc.	Statistik
Softmax Pro	Molecular Devices, USA	ELISA
AxioVision Rel. 4.8	Carl Zeiss, Jena	Mikroskopie
AID EliSpot Version 2.0	AID GmbH, Trassberg	ELISPOT
FCAP Array Software	Becton Dickinson, USA	Auswertung der Zytokin Analysen

II. Methoden

1. Versuchstierhaltung

Alle verwendeten Versuchstiere wurden in der zentralen Tierversuchshaltung der Medizinischen und Naturwissenschaftlichen Fakultäten der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, d.h. zunächst im Franz-Penzold-Zentrum (FPZ) und später im Biologisch Technischen Entwicklungsgebäude (BTE) gehalten. Die Haltung erfolgte in *isolated ventilated cages* (IVC) und unter *specific pathogen free* (SPF)-Bedingungen. Alle Mausstämme lagen im genetischen C57BL/6-Hintergrund vor.

Verwendete Mausstämme mit Stammname, wie teilweise bei *The Jackson Laboratory* benannt:

C57BL/6

B6.Cg-Foxp3^{sf}/J (männliche Tiere in der Arbeit bezeichnet als Scurfy)

B6.129S4-Ilgam^{tm1Myd}/J (in der Arbeit bezeichnet als CD11b-/-)

B6.129S2-Igh-6^{tm1Cgn}/J (in der Arbeit bezeichnet als μMT-/-)

B6.129P2-Fc γ 1g^{tm1Rav}/J (in der Arbeit bezeichnet als Fc γ ^{-/-})

Fc γ R1^{-/-} Fc γ R4^{-/-}

B6.SJL-Ptprc^aPepc^b/BoyJ

B6.129P-Cx3cr1^{tm1Litt}/J (in der Arbeit bezeichnet als Cx3cr1^{GFP/GFP})

2. Kreuzungsexperimente

Um unterschiedliche genetische Eigenschaften im Scurfy Mausmodell untersuchen zu können, wurden Scurfy Mäuse mit anderen *Knockout* Mausstämmen verpaart.

Es wurden B-Zelldefiziente B6.129S2-Igh-6^{tm1Cgn}/J und CD11b-defiziente B6.129S4-Ilgam^{tmMyd}/J Scurfy Mäuse generiert. Da für alle durchgeführten Versuche nur männliche Nachkommen verwendet wurden, beschreibt XY ein Wildtyp-Männchen und XYsf ein Scurfy-Männchen mit Gendefekt im *foxp3* Gen.

3. Genotypisierung

Um den jeweiligen Genotyp der neu generierten Mäuse bestimmen zu können, musste die genomische DNA aus Schwanz- bzw. Ohrbiopsien gewonnen und ein Genotyp-spezifisches DNA Fragment mittels definierter Primer amplifiziert werden.

3.1. Aufreinigung genomischer DNA

Hierfür wurden Schwanzbiopsien zunächst über Nacht in DNA-Lysepuffer und 50 μ g Proteinase K (Invitrogen, Darmstadt) bei 56°C im Thermoschüttler unter ständigem Schütteln lysiert. Zur Beseitigung von nicht lysierten Bestandteilen wurden die Lysate 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand im gleichen Volumen Isopropanol aufgenommen und gemischt. Durch 30 minütige Zentrifugation bei 13000 rpm, bei 4°C konnte die DNA pelletiert werden, der Überstand konnte verworfen werden und das DNA-Pellet wurde anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Das DNA-Pellet wurde in 1xTE bzw. H₂O bidest resuspendiert.

3.2. Polymerase-Kettenreaktion

In der Polymerase-Kettenreaktion können definierte Bereiche der genomischen DNA mithilfe sequenzspezifischer Primer und einer hitzebeständigen DNA-Polymerase amplifiziert werden. Die Analyse erfolgte durch elektrophoretische Auftrennung in einem 1,5%igen Agarosegel.

Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Abschnittes und die zur Genotypisierung der einzelnen Mausstämmen verwendeten sequenzspezifischen Primer sind im folgenden Abschnitt dargestellt.

Material und Methoden

Genotypisierungs PCR Foxp3:

Verwendete Primer:

Sequenzspezifische Primer	Orientierung	Sequenz (5'→3')
Foxp3 Mutante	sense	ctcaggcctcaatggacaaaaga
Foxp3 Mutante	antisense	ctggagggtggggacggaagag

Erwartetes PCR Produkt:

400 bp

Reaktionsansatz:

2,0µl	Template-DNA
1,0µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
2,5µl	10x Taq Standard Puffer
1,5µl	MgCl ₂ (25mM)
1,0µl	DNTPs (10mM)
1,0µl	Primer (20µM)
1,0µl	Primer (20µM)
15,0µl	ddH ₂ O
Σ 25µl	

Zyklen:

Initialisierung	4min	95°C	} 35x
Denaturierung	1min	95°C	
Annealing	1min	55°C	
Elongation	1min	72°C	
End-Elongation	5min	72°C	
Abkühlung	∞	4°C	

Genotypisierungs PCR µMT:

Verwendete Primer:

Sequenzspezifische Primer	Orientierung	Sequenz (5'→3')
µMT	sense	ccgtctagcttgagctattagg
µMT Mutante	antisense	ttgtgccagtcatagccgaat
µMT Wildtyp	antisense	gaagaggacgatgaaggtgg

Erwartete PCR Produkte:

Mutante: 451 bp

Wildtyp: 210 bp

Reaktionsansatz:

2,0µl	Template-DNA
1,0µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
2,5µl	10x Taq Standard Puffer
1,5µl	MgCl ₂ (25mM)
1,0µl	DNTPs (10mM)
1,0µl	Primer (20µM)
1,0µl	Primer (20µM)
1,0µl	Primer (20µM)
14,0µl	ddH ₂ O
Σ 25µl	

Material und Methoden

Zyklen:

Initialisierung	3min	94°C	} 35x
Denaturierung	30sec	94°C	
Annealing	1min	66°C	
Elongation	1min	72°C	
End-Elongation	2min	72°C	
Abkühlung	∞	10°C	

Genotypisierungs PCR CD11b:

Verwendete Primer:

Sequenzspezifische Primer	Orientierung	Sequenz (5'→3')
CD11b	antisense	taggctatccagaggtagac
CD11b Mutante	sense	atcgccttcttgacgagtc
CD11b Wildtyp	sense	catacctgtgaccagaagagc

Erwartete PCR Produkte:

Mutante: 700 bp

Wildtyp: 325 bp

Reaktionsansatz:

2,0µl	Template-DNA
1,0µl	Taq-Polymerase (5U/µl)
2,5µl	10x Taq Standard Puffer
1,0µl	MgCl ₂ (25mM)
1,0µl	DNTPs (10mM)
1,0µl	Primer (20µM)
1,0µl	Primer (20µM)
1,0µl	Primer (20µM)
14,5µl	ddH ₂ O
Σ 25µl	

Zyklen:

Initialisierung	3min	94°C	} 35x
Denaturierung	30sec	94°C	
Annealing	1min	58°C	
Elongation	1min	72°C	
End-Elongation	2min	72°C	
Abkühlung	∞	10°C	

4. Tierexperimentelle Techniken

4.1 *In vivo* Applikation des CD20 Antikörpers

Um die Wirkung des verwendeten murinen CD20 Antikörpers auf die Pathologie der Versuchstiere untersuchen zu können, musste der Antikörper regelmäßig injiziert werden. Zu Beginn wurden die schwangeren Zuchtweibchen der B6.Cg-Foxp3^{sf}/J Zuchten unter sterilen

IVC-Bedingungen intravenös injiziert. Postnatal wurden die männlichen Nachkommen ab einem Alter von 10 Tagen wöchentlich intravenös injiziert.

Für die Analyse des CD20-vermittelten Depletionsmechanismus wurde den Versuchstieren einmalig 100µg des Antikörpers intravenös injiziert.

4.2 In vivo Applikation der Clodronat Liposomen

Die Depletion der Ly6C^{lo}FcγRIV⁺ Effektorzellen erfolgte durch die intravenöse Injektion von 10µl Clodronat Liposomen zwei Stunden vor anti-CD20 (IgG2a) Gabe.

4.3 Blut- und Serumentnahme

Vollblutproben der Mäuse dienten der Bestimmung der Thrombozytenzahl am Hämatozytometer (Advia®, Siemens), der Gewinnung von Thrombozyten bei der Detektion von anti-Thrombozyten-Antikörpern und der Identifizierung und Quantifizierung unterschiedlicher Zellpopulationen mittels Durchflusszytometrie. Um Agglutination zu vermeiden, wurde das aus dem retroorbitalen Venenplexus entnommene Blut über Hämatokrit-Kapillaren (Brand, Wertheim) in spezielle EDTA-haltige Gefäße gebracht.

Für experimentelle Ansätze in denen Serum zur Analyse verschiedener Parameter benutzt wurde, musste aus dem gewonnenen Blut Serum isoliert werden. Hierfür wurden spezielle Serumröhrchen verwendet. Nach Blutentnahme wurden die Röhrchen 20 min bei Raumtemperatur belassen und anschließend bei 5000 rpm 2 min in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Das Serum wurde dann bei -20°C bzw. -80°C bis zur Analyse gelagert.

4.4 Aufreinigung naiver B-Zellen für den adoptiven Zelltransfer

Naive B-Zellen wurden wie folgt aus Splenozyten von B6.SJL-Ptprc^aPepc^b/BoyJ Mäusen isoliert: Nach dem Töten der Mäuse durch cervikale Dislokation wurde die Milz entfernt. Die weiteren Schritte erfolgten unter der sterilen Werkbank. Die Milz wurde durch ein 70µm Sieb passiert um eine Einzelzellsuspension herzustellen. Die Zellen wurden dann 5 min bei 1400 rpm bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5ml Erythrozyten-lysierendem ACK-Puffer (150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM Na₂EDTA, pH 7.2-7.4) gelöst, 5 min inkubiert und 5ml 1xPBS zugegeben. Das Zellsuspensat wurde anschließend erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit MACS-Puffer (1xPBS, 2% FCS) gewaschen. Nichtzelluläre Bestandteile konnten durch die Filtration mit einem 40µm Zellsieb entfernt werden.

Anschließend wurde die Zellzahl der enthaltenen Zellen mittels Neubauer Zählkammer ermittelt und es erfolgte die Depletion der CD43 und CD11c positiven Zellen durch Zugabe von magnetischen anti-CD43 und anti-CD11c *Micro Beads* (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) in einer Konzentration von 150µl pro 1x10⁸ Zellen. Der Mix wurde 30 min auf Eis inkubiert. Die an die magnetischen Partikel gebundenen Zellen wurden dann mit MACS®

Separation Column (Größe LS, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) separiert und in 1xPBS aufgenommen. Die separierten B-Zellen zum adoptiven Transfer, die charakterisiert sind durch das Fehlen von CD43 und CD11c auf der Zelloberfläche, sind im Durchfluß der Säulen enthalten. Die Reinheit der CD43/CD11c negativen und CD43/CD11c positiven Fraktion wurde anschließend durchflusszytometrisch am FACS Canto II (BD, USA) überprüft.

4.5 Adoptiver B-Zelltransfer

Der adoptive B-Zelltransfer erfolgte immer in einem Volumen von 150µl 1xPBS und einer definierten Zellzahl von 10×10^6 naiven B-Zellen (Abbildung 58). Die Zellen wurden intravenös in 2 Wochen alte Mäuse injiziert. In männliche Individuen des µMT^{-/-} XY/XYsf Maustammes wurden naiven B-Zellen aus den nebenstehenden Stämmen adoptiv transferiert:

Rezipientenstamm	Donorstamm
µMT ^{-/-} XY/XYsf	B6.SJL-Ptprc ^a Pepc ^b /BoyJ

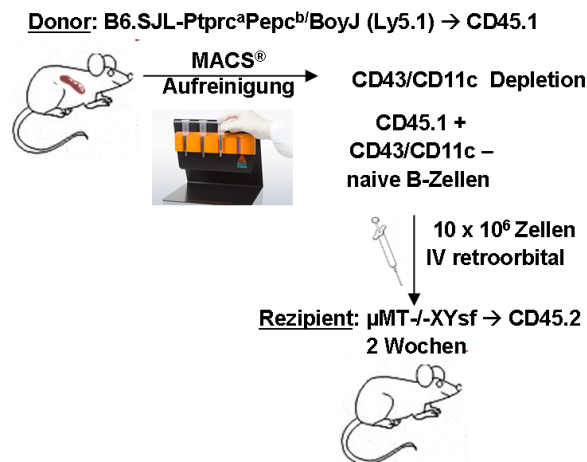


Abbildung 58: Versuchsaufbau des adoptiven B-Zelltransfers in µMT^{-/-} XY/XYsf Mäuse.

Naive B-Zellen werden aus Splenozyten der Donormäuse mittels MACS[®] Aufreinigung isoliert und zu einer Zellzahl von 10×10^6 Zellen in µMT^{-/-} XY/XYsf Empfängermäuse injiziert.

4.6. Isolation und Aufreinigung muriner Leukozyten

Alle Versuchstiere wurden durch cervikale Dislokation getötet. Milz, Lymphknoten und Zellen des Knochenmarks wurden entnommen und eine Einzelzellsuspension hergestellt. Milz und Lymphknoten wurden mechanisch zerkleinert und mithilfe eines Stempels einer 2ml Spritze durch ein Zellsieb passiert. Zur Gewinnung der Leukozyten aus dem Knochenmark wurden zunächst ein oder beide Hinterbeine abgeschnitten und von Haut und Muskeln befreit. Ober- und Unterschenkel wurden getrennt, jeweils die Knochenenden abgeschnitten und das Knochenmark mit einer 20G Kanüle aus dem Oberschenkelknochen gespült. Zur Filtration wurden Zellsiebe mit einer Maschenweite von 70µm und 40µm verwendet (BD, USA). Die Einzelzellsuspension wurde für 5 min bei 1400 rpm bei 4°C zentrifugiert, das Pellet in 5ml Erythrozyten-Lysepuffer (ACK-Puffer; 150mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0,1mM Na₂EDTA, pH 7.2-7.4) resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion

mit dem gleichen Volumen 1xPBS abgestoppt, die Zellen erneut gefiltert und das Pellet nach Zentrifugation mit 1xPBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend in definiertem Volumen FACS-Puffer (1xPBS, 2%FCS, 0,02% Na-Azid) aufgenommen. Peripheres Blut wurde aus dem retroorbitalen Venenplexus der Maus mithilfe von Hämatokritkapillaren (Brand, Wertheim) abgenommen und in EDTA-haltige Röhrchen gesammelt. 150µl Vollblut wurde mit 800µl ACK-Lysepuffer für 3 min bei RT inkubiert. Die Lyse wurde mit 500µl 1xPBS abgestoppt und die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei RT und 600g pelletiert. Der Vorgang der Erythrozytenlyse wurde wiederholt, das Pellet anschließend zweimal mit 1xPBS gewaschen und in FACS-Puffer resuspendiert. Die exakte Zellzahl wurde mithilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

4.7. Bestimmung der Thrombozytenzahl

Die Analyse der Anzahl der Thrombozyten im Vollblut der Tiere erfolgte am Hämatozytometer (Advia®, Siemens). Die Vollblutproben wurden hierfür 1:2 bis 1:10 mit 5% BSA/PBS verdünnt.

5. Herstellung des murinen anti-CD20 Antikörpers

5.1 Herstellung von chemisch kompetenten *E.coli* TOP10 Bakterien

Chemisch kompetente *E.coli* TOP10 Bakterien wurden im Labor erzeugt. Eine Übernachtskultur der Bakterien wurde hierfür in LB-Medium (Luria/Miller) ohne Antibiotika-Zugabe bei 37°C und etwa 230 rpm inkubiert. 2ml dieser Kultur wurden in 400ml frisches LB-Medium überführt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,3 bei einer Wellenlänge von 600nm weiter kultiviert. Anschließend wurden die Bakterien für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert, in 100ml 100mM MgCl₂ resuspendiert und 5min auf Eis inkubiert. Die Bakterien wurden dann für 5 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert und das Pellet in 100ml 100mM CaCl₂ aufgenommen, gefolgt von einer 20-minütigen Inkubation auf Eis. Nach erneutem Zentrifugieren wurden die Bakterien in 10ml 100mM CaCl₂ mit 10% Glycerol resuspendiert, in vorgekühlte 1,5ml Reaktionsgefäße aliquotiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der chemisch kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

5.2 Transformation von *E.coli* TOP10 Bakterien

Der Ligationsansatz wurde für 30 min mit 100µl der chemisch kompetenten Top10 *E.coli* auf Eis inkubiert und anschließend für 45 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt. Nach Zugabe von 500µl vorgewärmtem LB-Medium ohne Antibiotika-Zusätze wurden die Bakterien für 30 min bei 37°C und 300 rpm kultiviert. Die transformierten Bakterien wurden dann auf LB-Agar-Platten (50ng/ml Carbenicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C kultiviert.

5.3 Bakterienkultur

Kultiviert wurden kompetente *E.coli* TOP10 Bakterien, deren Plasmide die genetische Information für die leichte Kette, die schwere Kette bzw. die eines Helferplasmids tragen. Aus den bei -80°C gelagerten Glycerolstocks wurden die Bakterien in Übernachtskulturen aus 500ml LB-Medium mit 1:1000 eingesetztem Carbenicillin überführt und bei 37°C und 190 rpm über Nacht geschüttelt.

5.4 Maxi-Prep und Kontrollverdau

Aus der angewachsenen Bakterienkultur konnte mithilfe des *PureLink™ HiPure Plasmid DNA Purification Kits* (Invitrogen, Darmstadt) die bakterielle Plasmid-DNA aufbereitet werden.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA wurde photometrisch durchgeführt. Zur Kontrolle der aufgereinigten Plasmide wurden sie mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und das Produkt mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet. Hierfür wurde ein 1%iges Agarose-Gel mit $4\mu\text{l}$ Ethidiumbromid (10 mg/ml) verwendet, zur Größenbestimmung wurde ein 1kbp Standard mitgeführt. Für den Genabschnitt der *Light chain* wurde eine 750bp Bande erwartet, die *Heavy chain* wird bei einer Länge von 1.500bp detektiert.

Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt und 1h bei 37°C inkubiert:

$2\mu\text{l}$ 10xBSA

$2\mu\text{l}$ NEB-Puffer (*Light chain*: NEB-Puffer 4; *Heavy chain*: NEB-Puffer 1)

je $1\mu\text{l}$ Enzym (*Light chain*: XhoI, NcoI; *Heavy chain*: EcoRI, KpnI)

$0,5\mu\text{l}$ DNA

$13,5\mu\text{l}$ ddH₂O

Σ $20\mu\text{l}$

5.5 Zellkultur

Im Rahmen dieser Arbeit wurden HEK293T (*human embryonal kidney*) Zellen verwendet. Diese adhärenente Zelllinie wurde unter Standardbedingungen (37°C , 5% CO₂, feuchte Atmosphäre) in DMEM, 5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Die Zellen wurden alle 2-3 Tage unter Verwendung von 0,25% Trypsin/EDTA passagiert.

5.5.1 Kryokonservierung der HEK293T Zellen

Zur langfristigen Aufbewahrung der Zellen wurden die Zellen einer 14cm Zellkulturschale abzentrifugiert und in 2ml eiskaltem FCS + 10% DMSO (Einfriermedium) resuspendiert. Die Zellen wurden in spezielle Einfriereröhrchen überführt und in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierbehälter bei -80°C eingefroren. Nach einigen Tagen wurden die Zellen zur endgültigen Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt.

5.5.2 Transiente Transfektion von HEK293T Zellen

HEK293T Zellen wurden für die Antikörperproduktion transient mithilfe der Kalziumphosphatmethode transfiziert. Hierzu wurden die HEK293T Zellen in 14cm Zellkulturschalen bis zu einer Konfluenz von mindestens 70% kultiviert. Vor der Transfektion wurde ein Mediumwechsel mit 24ml frischem Transfektionsmedium (DMEM 5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) durchgeführt. Zu 18ml Aliquots von 2xHBS wurde 18ml eines steril filtrierten DNA-Mixes zugetropft und auf sechs Zellkulturschalen verteilt. Der DNA-Mix setzte sich pro Zellkulturschale wie folgt zusammen:

2,65ml ddH₂O

je 30µg Plasmid (*Light und Heavy chain*)

6µg Helferplasmid

300µl CaCl₂ (2,5M)

100µl Chloroquine (100mM)

Nach sieben bis neun Stunden Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel mit je 30ml proteinfreiem Produktionsmedium (DMEM 1% Nutridoma-SP, 1%Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin). Die Zellen wurden für 1 Woche im Brutschrank bei 37°C und 5%CO₂ inkubiert.

5.6 Ammoniumsulfatfällung

Da die Zellen den produzierten Antikörper sezernieren, wurde nach einer Woche Inkubation der Zellkulturüberstand abgenommen und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde steril filtriert und gewogen, um 60% des Gewichtes in Ammoniumsulfat zuzugeben. Diese Menge wurde geviertelt und im Abstand von ca. 1h unter Rühren bei 4 °C zugegeben.

Der über Nacht gefällte Zellkulturüberstand wurde bei 4°C und 4000 rpm für mindestens 90 min zentrifugiert und das Pellet in 1xDPBS resuspendiert. Das Pellet aus 11 Zellkulturüberstand wurde jeweils in 10ml PBS aufgenommen. Die resuspendierte Lösung wurde anschließend in einen Dialyseschlauch eingefüllt und über Nacht bei 4°C gegen 1xPBS dialysiert.

Da es sich bei dem murinen CD20 Antikörper um einen IgG2a-Isotyp handelt, wurden in einem nächsten Schritt Protein-G-Sepharose zugegeben, das spezifisch an die konstanten Fc-Regionen der IgG-Moleküle bindet. Zu 40ml der dialysierten Lösung wurde ca. 500µl Protein-G-Sepharose gegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert.

5.7 Elution

Die Antikörperlösung wurde nun zunächst bei 4°C und 1200 rpm für 5 min zentrifugiert, um die Protein-G-Sepharose Beads und den daran gebundenen Antikörper zu pelletieren. Das Pellet wurde in 5ml 1xDPBS resuspendiert und jeweils auf zwei Elutionssäulen aufgeteilt. Die

Antikörper-Bead-Lösung wurde noch weitere zwei Mal mit 1xDPBS gespült und auf die Säulen geladen. Anschließend wurde der Antikörper durch saures Glycin (pH 2,5) von der Protein-G-Sepharose eluiert und in vorgelegtem basischen Tris/HCl (pH 9,5) wieder neutralisiert. Pro Säule wurden 6 Mal 600µl Glycin und 600µl Tris/HCl verwendet. Das Eluat wurde nun in einer Dialysekassette über Nacht bei 4°C gegen 1xPBS dialysiert.

5.8 Endotoxin Entfernung

Um das Dialysat frei von Endotoxin (bakterielles Lipopolysaccharid, LPS) zu machen, wurden 10% des Volumens an Triton X 114 zugegeben. Die Lösung wurde 30 sec gemischt, mindestens 15 min auf Eis inkubiert, weitere 30 sec gemischt und für 10 min bei 42 C im Wasserbad erwärmt. Die nun trübe Lösung wurde bei RT und 3200 rpm für 5 min zentrifugiert und die obere Phase von der unteren Triton-Phase abgenommen. Mit der oberen Phase wurde die Endotoxin-Entfernung ein weiteres Mal durchgeführt. Anschließend wurde die Antikörperlösung in Vivaspin-Röhrchen bei 4°C und 1800 – 2500 rpm zentrifugiert, um das Volumen einzukonzentrieren.

5.9 Quantitative Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von Lösungen wurde mithilfe einer BSA-Standardkurve bestimmt. Hierfür wurden 8µl BSA (10µg/µl) zu 192µl 1xDPBS pipettiert, was einer Konzentration von 8µg in 20µl entspricht. Die Lösung wurde mehrmals 1:2 verdünnt um noch Standardlösungen von 4µg, 2µg, 1µg, 0,5µg, 0,25µg und 0,125µg pro 20µl zu erhalten. Der zu testende Antikörper wurde 1:10, 1:4 und 1:2 verdünnt in jeweils einem Volumen von 20µl eingesetzt. Jede Probe wurde mit 980µl Bradford-Reagenz (200µl Bradford, 800µl ddH₂O) vereinigt, gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 595nm im Photometer bestimmt und die Werte in einer Standardkurve aufgetragen. Die Proteinkonzentration des Antikörpers konnte als Mittelwert der drei eingesetzten Verdünnungswerte berechnet werden.

5.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung

Der Nachweis des selbst produzierten murinen CD20 Antikörpers erfolgte mittels denaturierender SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Zusätzlich zum Antikörper wurden Fraktionen aller Aufreinigungsschritte gesammelt und bei 100V gelelektrophoretisch in einem 10% Gel aufgetrennt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit SDS-Ladepuffer (5x) 1:5 verdünnt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

Das Gel wurde anschließend in Coomassie (*brillant*) *blue* C-250 gefärbt. Ein Molekularmarker zur Einschätzung der Größe wurde mitgeführt.

6. Immunhistologische Analysen

6.1 Herstellung von Gefrierschnitten

Organe der zu untersuchenden Versuchstiere wurden hierfür eingebettet und daraus anschließend Gewebeschnitte hergestellt. Hierbei wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, die sich grundlegend in der Art der Einbettung und Fixierung der Organe unterscheiden.

Bei der Gefrierschnitt-Methode wurden die Organe in *TissueTek*® O.C.T Medium (Sakura) in Kryomold-Gefäße eingebettet, auf Trockeneis eingefroren und bei -80°C gelagert.

Mittels eines Kryotoms wurden 3-5µm dünne Gewebeschnitte angefertigt. Diese wurden dann auf Objektträger geheftet und über Nacht getrocknet. Die Fixierung der Schnitte erfolgte 2,5 min in -20°C kaltem Aceton. Erneut wurden die Schnitte über Nacht getrocknet und bei -20°C gelagert.

6.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die entnommenen Organe zunächst in Einbettkassetten überführt und über Nacht in 4% Formalin bei RT fixiert. Anschließend wurden die Einbettkassetten in 70% Ethanol bei 4°C, bis zu ihrer Weiterverarbeitung im Einbettautomaten, aufbewahrt. Ein Einbettautomat ermöglicht das automatisierte Überführen des Gewebes von der Entwässerung über ein Intermedium, wie Xylol in Paraffin.

Die automatisierte Einbettung beschreibt das folgende Protokoll:

Reagenz	Einwirkdauer
80% Ethanol	1h
90% Ethanol	1h
96% Ethanol	1h
100% Isopropanol	1h
100% Isopropanol	2h
Xylol	1h
Xylol	2h 20 min
Paraffin (60°C)	3h
Paraffin (60°C)	2h

Die präparierten Organe wurden dann in 60°C heißem, flüssigem Paraffin in spezielle Metallgefäße eingebettet und zum Erkalten und Erhärten auf eine Kühlplatte gelegt. Die von Paraffin ummantelten Organe konnten anschließend mit einem Rotations-Microtom in 2-5µm dünne Scheiben geschnitten, in einem Wasserbad gestreckt und auf Objektträger geheftet werden. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei Raumtemperatur.

6.3. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz-mikroskopische Analyse wurden die Gefrierschnitte verwendet. Die Gewebeschnitte auf dem Objektträger wurden mit einem Fettstift (*ImmuEdge Pen*) umfahren, um so den zu färbenden Bereich zu verkleinern. Die Schnitte wurden in 1xPBS rehydriert und 30 min mit 5% Ziegen Serum in 1xPBS inkubiert, um unspezifische Proteinbindungen zu blockieren. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1h. Die Gewebeschnitte wurden dann sorgfältig mit 1xPBS gewaschen. Sofern der Primärantikörper nicht direkt fluoreszenzmarkiert war, wurde noch ein Sekundärantikörper für 1h inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Gewebeschnitte mit Fluoromount® Eindeckmedium und einem Deckglas eingedeckelt. Alle Inkubationsschritte wurden unter Ausschluss von Licht in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Analyse der Gewebeschnitte erfolgte zeitnah am Fluoreszenzmikroskop.

6.4 Immunfluoreszenzmikroskopie

Analysen und Fotodokumentationen wurden am AxioVert Fluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit der Software AxioVision Rel.4.8 durchgeführt. Hierbei wurden alle Einzelkanäle der jeweiligen Doppel- und Dreifachfärbung aufgenommen, in Falschfarben dargestellt und übereinandergelagert.

6.5 Immunhistochemische Sirius Red Färbung

Für Sirius Red und immunhistochemische Färbungen wurden Paraffinschnitte verwendet. Die Sirius Red Färbungen wurden entweder mit einer Hämalaun Kernfärbung oder einer immunhistochemischen Antikörperfärbung mittels Alkalischer Phosphatase kombiniert. Der anionische Direct Red® Farbstoff der Sirius Red Färbelösung färbt basische Gruppen in Kollagenmolekülen, das sich postinflammatorisch in Geweben ablagert, rot an. Hämalaun färbt DNA oder das Endoplasmatische Reticulum blau an, so dass der gesamte Zellkern blau-violett gefärbt erscheint. Mittels einer spezifischen immunhistochemischen Antikörperfärbung konnten definierte Zellen im Gewebe blau angefärbt werden.

6.5.1 Sirius Red Färbung mit Kernfärbung

Zunächst wurden die Gewebeschnitte über Eintauchen in Xylol und eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und entparaffiniert.

2x 5 min	Xylol
1 min	Isopropanol
1 min	90% Ethanol
1 min	80% Ethanol
1 min	70% Ethanol
2x 5 min	1xPBS

Anschließend folgt für 3 min eine Kernfärbung in Mayer's Hämalaun (1:5 verdünnt). Durch fließendes Leitungswasser wurde die Kernfärbung für 10min fixiert. Danach wurde für 1-2h Sirius Red Lösung A (Pikrinsäure, 0,05% Direct Red®) auf die Schnitte gegeben. Fixiert wurde die Sirius Red Färbung für 2x 7 min in Sirius Red Lösung B (0,5% Eisessig in ddH₂O). Die Gewebeschnitte wurden für 3x 2 min in 99% Ethanol und für 5 min in Xylol dehydriert und mit Xylolhaltigem Eindeckmedium (Roti Histokitt®) und Deckglas eingedeckelt. Nach Trocknung der Objektträger erfolgte eine mikroskopische Analyse.

6.5.2 Sirius Red Färbung mit immunhistochemischer Antikörperfärbung

Die Sirius Red Kollagenfärbung wurde mit einer Antikörperfärbung mit biotinylierten Antikörpern und Streptavidin-gekoppelter alkalischer Phosphatase kombiniert, um im Gewebe vorkommende Zellen spezifisch zu färben. Zunächst wurden die Gewebeschnitte über Eintauchen in Xylol und eine absteigende Alkoholreihe rehydriert und entparaffiniert.

2x 5min	Xylol
1 min	Isopropanol
1 min	90% Ethanol
1 min	80% Ethanol
1 min	70% Ethanol
2x 5 min	1xPBS

Um das endogene Biotin im Gewebe zu blocken, wurde Avidinlösung eines Biotinblocks (Biotinblock-Kit, Biozol) auf die Schnitte gegeben, für 10 min in einer dunklen, feuchten Kammer inkubiert und durch Eintauchen in 1xPBS gewaschen. Anschließend wurde eine Biotinlösung (Biotinblock-Kit, Biozol) auf die Schnitte gegeben und weitere 10 min inkubiert, gefolgt von einem Waschschrift. Unspezifische Antikörperbindungen wurden für 1h mit 5% Ziegenserum in 1xPBS blockiert. Danach kam es zur Zugabe des biotinylierten Primärantikörpers für 1h und anschließendem sorgfältigen Waschen mit 1xPBS. Der Streptavidin-konjugierte Sekundärantikörper mit gekoppelter Alkalischer Phosphatase wurde 1h auf dem Gewebeschnitt inkubiert und dann mit 1xPBS gewaschen. Um die immunhistochemische Färbung sichtbar zu machen, erfolgte ein Substratnachweis und eine Stabilisierung und Fixierung der Alkalischen Phosphatase-Färbung mittels *Alkaline Phosphatase Substrate Kit III* (Vector, Burlingame, USA). Das Gemisch wurde 20 min auf den Gewebeschnitten belassen und wie folgt angesetzt:

- 2,5ml Tris/HCl pH 8.2
- 1 Tropfen Levamisol
- 1 Tropfen Reagenz 1
- 1 Tropfen Reagenz 2
- 1 Tropfen Reagenz 3

Alle Komponenten wurden gut miteinander vermischt.

Die Gewebenschnitte wurden 2x 5 min in Tris/HCl (pH 8.2) gewaschen und mit Leitungswasser abgespült. Danach wurde für 1-2h Sirius Red Lösung A (Pikrinsäure, 0,05% Direct Red®) auf die Schnitte gegeben. Fixiert wurde die Sirius Red Färbung für 2x 7 min in Sirius Red Lösung B (0,5% Eisessig in ddH₂O). Die Gewebeschnitte wurden für 3x 2 min in 99% Ethanol und für 5 min in Xylol dehydriert und mit Xylolhaltigem Eindeckmedium (Roti Histokitt®) und Deckglas eingedeckelt. Nach Trocknung der Objektträger erfolgte eine mikroskopische Analyse.

6.6 Mikroskopische Analyse der immunhistochemischen Färbungen

Analysen und Fotodokumentationen wurden am AxioVert Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) mit der Software AxioVision Rel. 4.8 durchgeführt.

7. Serologische Untersuchungen

Ein wichtiger Parameter für die Einstufung der Autoimmunantwort im Scurfy Mausmodell ist die Quantifizierung und Spezifität von Autoantikörpern im Serum der Versuchstiere.

Die Menge an Immunglobulinen verschiedener Isotypen konnte mithilfe der *Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Technik quantifiziert werden. Ebenso konnte mit diesem Verfahren die Spezifität der Autoantikörper identifiziert werden.

7.1 Bestimmung der Gesamtkonzentration der einzelnen Immunglobulinklassen

Die Quantifizierung der Immunglobuline der Isotypen IgM, IgG1, IgE, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA konnte mithilfe Isotyp-spezifischer Quantifizierungs-Sets der Firma Bethyl (USA) durchgeführt werden.

Bei der experimentellen Vorgehensweise hielt man sich an das dem Quantifizierungs ELISA beiliegenden Reaktionsprotokoll. Die Seren wurden für die Quantifizierung der verschiedenen Ig-Subklassen wie folgt in *Sample-Diluent*-Lösung verdünnt:

1:1000 IgG2a, IgE, IgA

1:5000 IgG3, IgG2b

1:10000 IgM

1:20000 IgG1

Die Detektion erfolgte durch Zugabe des HRP-konjugierten Isotyp-spezifischen Detektionsantikörpers in einer 1:20000 Verdünnung. Die Meerrettich-Peroxidase verursachte nach Zugabe von 50µl TMB Substrat eine Farbreaktion, die durch 50µl 6% Orthophosphorsäure abgestoppt wurde. Der *Sandwich*-ELISA wurde bei einer Wellenlänge von 450/650nm am *VersaMax tunable microplate reader* (Molecular Devices, Ismaning) analysiert.

7.2 Detektion von Autoantikörpern gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA)

Bei Autoimmunität können zirkulierende Antikörper gegen bestimmte intrazelluläre Strukturen wie Doppelstrang DNA (dsDNA) nachgewiesen werden. Der dsDNA ELISA ist zur semiquantitativen Detektion von anti-dsDNA Antikörpern bestimmt und trägt somit zur Diagnostik von Autoimmunität bei.

In einem ersten Arbeitsschritt wurden Mikrotiterplatten mit dsDNA beschichtet. Zwischen allen Inkubationsschritten wurde die Platte gründlich mit 1xPBS gewaschen. Für die Beschichtung wurden 100µl/Loch methyliertes BSA in 1xPBS zugegeben (Konzentration 5µg/ml), für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend gründlich mit 1xPBS gewaschen und die Platte mit 100µl Kalbsthymus DNA in 1xPBS (Konzentration 50µg/ml) über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte für 2 Stunden mit 200µl/Loch DNA-Block (1xPBS, 3% BSA, 0,2% EDTA (Stock 0,5M), 1% Gelatine) behandelt. Schließlich konnten 100µl der Serumproben (1:100 verdünnt in DNA-Block) für eine Stunde inkubiert werden. Es folgte die Inkubation des HRP-konjugierten Detektionsantikörpers (Bethyl, USA) in einer 1:20000 Verdünnung. Die Meerettich-Peroxidase verursachte nach Zugabe von 50µl TMB Substrat eine Farbreaktion, die durch 50µl 6% Orthophosphorsäure abgestoppt wurde. Der *Sandwich*-ELISA wurde bei einer Wellenlänge von 450/650nm am *VersaMax tunable microplate reader* (Molecular Devices, Ismaning) analysiert.

7.3 Detektion von Autoantikörpern gegen Glucose-6-Phosphat-Isomerase (anti-GPI)

Bei der Glucose-6-Phosphat-Isomerase handelt es sich um ein Enzym der Glykolyse, das die Umwandlung von Glukose-6-Phosphat in Fruktose-6-Phosphat katalysiert. Bei Autoimmunität kann es zur Sekretion von gegen GPI gerichteten Antikörpern kommen. Mittels der *Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Technik können zirkulierende anti-GPI Antikörper semiquantitativ im Serum der Versuchstiere nachgewiesen werden.

Hierfür wurde in einem ersten Arbeitsschritt die Mikrotiterplatte mit GPI Substrat über Nacht, bei 4°C beschichtet (100µl/Loch, 1ng/ml in 1xPBS). Alle weiteren Inkubationen wurden bei Raumtemperatur, eine Stunde durchgeführt. Zwischen jedem der einzelnen Inkubationsschritte wurde die Platte gründlich mit 1xPBS gewaschen. In einem nächsten Schritt wurden freie Proteinbindestellen mit einer 3% BSA/1xPBS-Lösung abgeblockt, um die Hintergrundaktivität auf ein Minimum zu reduzieren. Anschließend wurde die zu analysierende Mausserumprobe (1:100 verdünnt in 1% BSA/1xPBS) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Detektionsantikörper (Bethyl, USA) in einer 1:10000 Verdünnung in 1% BSA/1xPBS. Die Meerettich-Peroxidase verursachte nach Zugabe von 50µl TMB Substrat eine Farbreaktion, die durch 50µl 6% Orthophosphorsäure abgestoppt wurde. Der *Sandwich*-ELISA wurde bei einer Wellenlänge von 450/650nm am *VersaMax tunable microplate reader* (Molecular Devices, Ismaning) analysiert.

7.4 Detektion des Rheumafaktors

Bei dem Rheumafaktor handelt es sich um Autoantikörper, die sich gegen das Fc-Fragment der körpereigenen Immunglobuline der Klasse G richten (anti-RF). Mittels der *Sandwich-Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) Technik können zirkulierende anti-RF Antikörper semiquantitativ im Serum der Versuchstiere nachgewiesen werden.

Hierfür wurde in einem ersten Arbeitsschritt die Mikrotiterplatte mit Maus IgG2a Antikörper (6A6-IgG2a) über Nacht, bei 4°C beschichtet (100µl/Loch, 1ng/ml in 1xPBS). Alle weiteren Inkubationen wurden bei Raumtemperatur, eine Stunde durchgeführt. Zwischen jedem der einzelnen Inkubationsschritte wurde die Platte gründlich mit 1xPBS gewaschen. In einem nächsten Schritt wurden freie Proteinbindestellen mit einer 3% BSA/1xPBS-Lösung abgeblockt, um die Hintergrundaktivität auf ein Minimum zu reduzieren. Anschließend wurde die zu analysierende Mausserumprobe (1:100 verdünnt in 1% BSA/1xPBS) inkubiert. Es folgte die Inkubation mit dem HRP-konjugierten Detektionsantikörper (Bethyl, USA) in einer 1:10000 Verdünnung in 1% BSA/1xPBS. Die Meerrettich-Peroxidase verursachte nach Zugabe von 50µl TMB Substrat eine Farbreaktion, die durch 50µl 6% Orthophosphorsäure abgestoppt wurde. Der *Sandwich-ELISA* wurde bei einer Wellenlänge von 450/650nm am *VersaMax tunable microplate reader* (Molecular Devices, Ismaning) analysiert.

7.5 Detektion von Autoantikörpern gegen nukleäre Bestandteile (ANA)

Anti nukleäre Antikörper (ANA) stehen für die Gesamtheit aller Autoantikörper gegen Antigene im Zellkern. Das semiquantitative ANA-Screening wird mittels Immunfluoreszenztest an Objektträger fixierten Zellkulturen (HEp2-Zellen, humane Epithelzellen) durchgeführt. Lokalisation und Muster der Fluoreszenz deuten auf die Spezifität der vorliegenden Antikörper hin.

Serum der zu untersuchenden Mäuse wurde in verschiedenen Verdünnungen auf den mit HEp2-Zellen beschichteten Objektträger aufgebracht und in einer feuchten Kammer eine Stunde inkubiert. Die HEp2-Zellen dienten hierbei als Antigen-Substrat. Die im Serum eventuell enthaltenen ANA-Antikörper bilden mit dem HEp2-Antigen-Substrat Antigen-Antikörper-Komplexe. Diese konnten dann mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern detektiert werden. Bei dieser Arbeit wurden HEp2-Objektträger der Firma Viro Immun (Oberursel) verwendet.

7.6 Detektion von anti-Thrombozyten Antikörpern

Mittels Durchflusszytometrie konnten anti-Thrombozyten Antikörper im Serum der Versuchstiere detektiert werden.

Hierfür wurden zunächst Thrombozyten aus dem Blut von C57BL/6 Mäusen aufgereinigt und mit einem 5 minütigen Zentrifugationsschritt bei 300g angereichert. Der Überstand wurde in frische Reaktionsgefäße überführt, 1ml 1xPBS zugegeben und weitere 15 min bei 1500g

zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3x mit 1ml 1xPBS 15 min bei 1500g gewaschen. Durch eine Zentrifugation bei 100g für 10 min konnten die Erythrozyten entfernt werden. Die angereicherten Thrombozyten befanden sich jetzt im Überstand. Diese Thrombozyten dienten schließlich als Antigen-Substrat für anti-Thrombozyten Antikörper in den Serumproben und wurden in 96-Loch *V-Shape* Platten überführt und bei 1200 rpm, 5 min zentrifugiert. Die zu untersuchenden Seren wurden 1:10 in FACS-Puffer (1xPBS, 2% FCS, 0,02% Na-Azid) verdünnt und 15 min auf Eis mit den Thrombozyten inkubiert. Als Positivkontrolle wurde der anti-Maus 6A6 IgG2a (5µg) mitgeführt, dieser bindet an Thrombozyten. Es folgte ein Waschschriff mit 100-150µl 1xPBS. Der Nachweis der stabilen Antigen-Antikörperkomplexe erfolgte anschließend mittels fluoreszenzmarkierten Detektionsantikörpern in der Durchflusszytometrie. Hierzu wurden zum Nachweis der verschiedenen Isotypen der anti-Thrombozyten Antikörper folgende verdünnte Antikörper für 15 min auf Eis inkubiert:

- Anti-Thrombozyten Antikörper des IgM Isotyps: anti-CD61-PE und anti-IgM-FITC
- Anti-Thrombozyten Antikörper des IgG1 Isotyps: anti-CD61-PE und anti-IgG1-FITC
- Positivkontrolle (6A6-IgG2a): anti-CD61-PE und anti-IgG2a

Der Ansatz wurde dann bei 1200 rpm, 5 min zentrifugiert, mit 1xPBS gewaschen und in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen zur Analyse am FACS Canto II (BD, USA) überführt.

7.7 BUN (Blood Urea Nitrogen)

Mithilfe des Nierenretentionsparameters BUN (*Blood Urea Nitrogen*) kann die Nieren-Leistungsfähigkeit beurteilt werden. Der Test bestimmt die Menge an im Harnstoff (Urea) enthaltene Stickstoffe (Nitrogen) im Serum. Harnstoff, ein Endprodukt des Stoffwechsels wird von der Leber in den Blutkreislauf sekretiert, von den Nieren aus dem Blut aufgenommen und gelangt nach Ultrafiltration in den Urin. Bei verminderter Nierenfunktion wird die Aufnahme von Harnstoff aus dem Blut inhibiert, wodurch der Spiegel im Blut ansteigt und als BUN-Level nachgewiesen werden kann.

Zum Nachweis eines erhöhten BUN-Levels wurde in dieser Arbeit der BUN Test der Firma Stanbio® (USA) verwendet. Bei der Durchführung hielt man sich an das dem Test beiliegende Protokoll.

Die Serumproben wurden in 96-Loch Platten (*Microplate F-bottom*) 1:100 in BUN Substrat-Lösung (Endvolumen 100µl) gemischt, 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, 100µl der Enzymreagenz-Lösung zugegeben und für weitere 10 min inkubiert. Die Analyse erfolgte am *VersaMax tunable microplate reader* (Molecular Devices, Ismaning) bei 600nm.

7.8 Cytometric Bead Array (CBA)

Der BD™ Cytometric Bead Array (CBA) ist eine durchflusszytometrische Anwendung, die die simultane Quantifizierung multipler Proteine erlaubt. Unter Verwendung des CBA können pro- und anti-inflammatorische Zytokine im Serum der Versuchstiere detektiert und quantifiziert werden. Die genaue experimentelle Vorgehensweise wurde dem Protokoll von BD™ entnommen. Alle Ansatzmengen wurden halbiert, sodass jeweils 25µl Standard, *Capture Beads* und Detektions Reagenz anstelle der im Protokoll empfohlenen 50µl verwendet wurden. Die Analyse des Assays erfolgte am FACS Canto II (BD, USA). Ausgewertet wurde der *Cytometric Bead Array* mit der FCAP Array Software von BD™.

8. Elispot: Bestimmung der Anzahl IgG-sezernierender Zellen

Mit Hilfe der *Enzyme Linked Immuno Spot-* (ELISPOT) Technik wurden IgM, IgG und IgE Antikörper-sezernierende Zellen in Milz, Knochenmark und Lymphknoten auf Einzelzellniveau identifiziert und quantifiziert.

Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf dem Nachweis spezifischer Zellen aufgrund ihrer Sekretionsprodukte, die von dem immobilisierten Antigen oder Antikörper gebunden werden. Für den Nachweis von IgM/G/E-Antikörper-sezernierenden Zellen wird immobilisiertes IgM/G/E als Antigen verwendet. Die Bindung von IgM/G/E-Antikörpern an ihr Antigen erfolgt in unmittelbarer Nachbarschaft der sekretierenden Plasmazelle. Nach dem Entfernen der Zellen erfolgt der Nachweis des Sekretionsprodukts und damit der sezernierenden Zellen mit Hilfe eines enzymgekoppelten Zweitantikörpers, der spezifisch gegen den ersten gebundenen Antikörper gerichtet ist. Das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym katalysiert nach Substratzugabe die mit einem Farbumschlag verbundene Reaktion, so dass die Bindung der IgM/G/E-Antikörper und damit die Lage der spezifischen Plasmazelle durch einen farbigen Punkt (*spot*) sichtbar wird. Die Nitrozellulosemembran einer *MultiScreen-IP* 96-Loch-Platte (Millipore, Schwalbach) wurde für eine Minute mit 70 % Methanol benetzt und anschließend mit PBS gewaschen.

Um die Bindung von IgM/G/E an die Membran zu ermöglichen, wurde zunächst die Platte mit 2µg/ml Ziege anti-Maus IgM/G/E (H+L) (Jackson Immuno Research, Suffolk, UK) in TE-Puffer über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor dem Transferieren der Zellen wurde die Platte mit 1xPBS gewaschen und anschließend zum Blockieren unspezifischer Bindungsstellen mit 2% FCS in 1xPBS für 2h bei RT und anschließend 1h bei 37°C, 5% CO₂, feuchte Atmosphäre inkubiert. Um bereits sezernierte Antikörper aus dem Medium zu entfernen, wurden die isolierten Milz-, Lymphknoten- und Knochenmarkszellen sechsmal mit 4°C kaltem 1xPBS gewaschen. Für den Nachweis der IgM/G/E sezernierenden Zellen wurden 2x10⁵ Zellen/Loch in 100µl RPMI 5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin Medium ausgesät und 2h bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Pro Tier wurden 4

Replikate mit der angegebenen Zellzahl angefertigt. Die Anzahl der aufgetragenen Zellen wurde in Voruntersuchungen bestimmt, um eine Überlagerung der Zellen zu vermeiden. Nach der Inkubation wurde die Platte mit PBS gewaschen und anschließend 0,8 µg/ml Peroxidase-konjugiertes anti-Maus IgM/G/E (aus Bethyl Mouse IgM/GFc/E *Quantification Kit*, Biomol, Hamburg) zugegeben. Nach einstündiger Inkubation bei RT und erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Zugabe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin-Peroxidasesubstrat (KPL, Wedel). Die Farbreaktion wurde mit Wasser abgestoppt, die Platte über Nacht getrocknet und mit dem AID EliSpot-Reader-System ELR04 (AutoimmunDiagnostics GmbH, Strassberg) ausgelesen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der AID Elispot Version 2.0 (Autoimmun Diagnostika GmbH, Strassberg).

9. Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen von murinen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC), Splenozyten, Zellen des Lymphknotens und des Knochenmarks erfolgte am FACS Canto II (BD, USA).

Die FACS-Färbung der isolierten Leukozyten wurde in 96-Loch-Platten (*V-Shape*) durchgeführt. Gefärbt wurde jeweils in einem Volumen von 50µl für 15 min auf Eis. Die Verdünnung der verwendeten Antikörper ist im Materialteil unter 4. Antikörper und Konjugate angegeben. Mit Ausnahme der durchflusszytometrischen Untersuchung der Fc γ -Rezeptor-Expression auf murinen Leukozyten, wurden die Zellen vor der FACS-Färbung mit dem monoklonalen Antikörper 2.4G2 inkubiert. Dieser Fc-Block blockiert die Interaktion von mFc γ RIIB und mFc γ RIII mit den Fc-Regionen der verwendeten Antikörper und soll unspezifische Bindung und daraus resultierende falschpositive Signale verhindern. Um in der Analyse eine lebend-tot-Diskriminierung durchführen zu können, wurden die Zellen nach Antikörper-Inkubation 5 min auf Eis mit DAPI (1:5000 in FACS-Puffer, 1xPBS, 2%FCS, 0,02% Na-Azid) gefärbt. Zur Analyse am FACS Canto II (BD, USA) wurden die Zellen in 300µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen (BD, USA) überführt.

10. Zellsortierung

Ly6C^{lo}Fc γ RIV⁺ Monozyten, Ly6C^{hi}Fc γ RIV⁻ Monozyten, sowie Neutrophile Zellen wurden aus dem peripheren Blut von Cx3cr1^{GFP/GFP} Mäusen isoliert. Diese Mäuse exprimieren EGFP (*Enhanced Green Fluorescence Protein*) auf der Oberfläche von Monozyten, DZ, NK-Zellen und Mikroglia Zellen des ZNS.

Nach Aufreinigung und Erythrozytenlyse wurden die Zellen gefiltert und auf eine Dichte von $0,5 \times 10^7$ Zellen pro ml FACS-Puffer eingestellt. Nach der Blockade der Fc-Rezeptoren wurden die Oberflächenmoleküle GR1 und CD49b der Zellen angefärbt, gewaschen und am

FACS Aria III (BD) sortiert. Die gewünschten Zellpopulationen konnten dann, wie folgt unterschieden werden:

Ly6C ^{lo} FcγRIV ⁺ Monozyten	GFP ⁺ , GR1 ⁻ , CD49b ⁻
Ly6C ^{hi} FcγRIV ⁻ Monozyten	GFP ⁺ , GR1 ⁺ , CD49b ⁻
Neutrophile	GFP ⁻ , GR1 ⁺ , CD49b ⁻
NK	GFP ⁺ , Gr1 ⁻ , CD49b ⁺

Als Parameter dienten Größe (FSC), Granularität (SSC) und ein Dublettenausschluss. Die Innenwandungen der Auffanggefäße wurden zuvor mit FCS benetzt. Die einzelnen Zellpopulationen wurden in RPMI-Medium (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) aufgefangen, reanalysiert, gezählt und für weitere Experimente verwendet.

11. ADCC Assay zur CD20-vermittelten B-Zelledepletion *in vitro*

Als Effektorzellen (E) wurden Ly6C^{lo}FcγRIV⁺, Ly6C^{hi}FcγRIV⁻ Monozyten und Neutrophile Zellen verwendet, die wie im Methodenteil unter 10. beschrieben, gewonnen wurden. Als Zielzellen (*Target*-Zellen: T) wurden naive Milz-B-Zellen aus C57BL/6 Mäusen verwendet. Diese Zellen wurden, wie im Methodenteil unter 4.4 beschrieben, isoliert und anschließend in den unten stehenden Verhältnissen in einer 96-Loch Platte (*V-shape*) in 200µl RPMI-Medium (5% FCS, 1% Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin) gemischt. Dem Ansatz wurden 10µg des anti-Maus CD20 Antikörpers bzw. 10µg der Isotyp-Kontrolle (TA99-IgG2a, gegen das Tumorantigen gp75) zugegeben. Die 96-Loch Platte wurde dann 16-20 Stunden bei 37°C inkubiert, anschließend zur Analyse der ADCC die Gesamtzellzahl (Effektor- und Target-Zellen) bestimmt und durchflusszytometrisch die Anzahl der B-Zellen quantifiziert.

E/T-Verhältnis:	E	T
1:2	10.000	20.000
5:1	10.000	2000
10:1	10.000	1000

12. Statistische Verfahren

Die statistische Berechnung wurde mit SPSS bzw. GraphPad Prism durchgeführt. Überlebenskurven wurden nach der Kaplan-Meier-Methode dargestellt und mit dem Log-Rank-Test verglichen. Das Signifikanzniveau lag bei 5%.

Alle anderen Daten sind im Punktediagramm mit Mittelwert bzw. als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Die Datensätze wurden mit einem nicht-parametrischen Mann-Whitney-Test statistisch analysiert, da sie z.T. Abweichungen von der Normalverteilung aufwiesen. Darstellung des Signifikanzniveaus: * p<0,05, ** p<0,01, *** p<0,001, ns nicht signifikant.

G. Literaturverzeichnis

1. Gay D, Saunders T, Camper S, Weigert M. Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance. *The Journal of Experimental Medicine*. 1993. 177: 999-1008. *J Immunol*. 1993 Feb 1;186(3):1303-12.
2. Goodnow CC, Crosbie J, Adelstein S, Lavoie TB, Smith-Gill SJ, Brink RA, et al. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature*. 1988 Aug 25;334(6184):676-82.
3. Nemazee DA, Burki K. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*. 1989 Feb 9;337(6207):562-6.
4. Hartley SB, Crosbie J, Brink R, Kantor AB, Basten A, Goodnow CC. Elimination from peripheral lymphoid tissues of self-reactive B lymphocytes recognizing membrane-bound antigens. *Nature*. 1991 Oct 24;353(6346):765-9.
5. Hoffmann MW, Allison J, Miller JF. Tolerance induction by thymic medullary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 1;89(7):2526-30.
6. Kappler JW, Roehm N, Marrack P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*. 1987 Apr 24;49(2):273-80.
7. Marrack P, Lo D, Brinster R, Palmiter R, Burkly L, Flavell RH, et al. The effect of thymus environment on T cell development and tolerance. *Cell*. 1988 May 20;53(4):627-34.
8. Palmer E. Negative selection--clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*. 2003 May;3(5):383-91.
9. Mellman I, Steinman RM. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):255-8.
10. Zoller M. Intrathymic presentation by dendritic cells and macrophages: their role in selecting T cells with specificity for internal and external nominal antigen. *Immunology*. 1991 Nov;74(3):407-13.
11. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol*. 2001 Nov;2(11):1032-9.
12. Hanahan D. Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity. *Curr Opin Immunol*. 1998 Dec;10(6):656-62.
13. Klein L, Kyewski B. Self-antigen presentation by thymic stromal cells: a subtle division of labor. *Curr Opin Immunol*. 2000 Apr;12(2):179-86.
14. Kyewski B, Derbinski J, Gotter J, Klein L. Promiscuous gene expression and central T-cell tolerance: more than meets the eye. *Trends Immunol*. 2002 Jul;23(7):364-71.
15. Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Dominguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol*. 1998 Dec 1;161(11):5918-29.
16. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*. 2002 Nov 15;298(5597):1395-401.
17. Goodnow CC, Crosbie J, Jorgensen H, Brink RA, Basten A. Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes. *Nature*. 1989 Nov 23;342(6248):385-91.
18. Russell DM, Dembic Z, Morahan G, Miller JF, Burki K, Nemazee D. Peripheral deletion of self-reactive B cells. *Nature*. 1991 Nov 28;354(6351):308-11.
19. Diamond B, Scharff MD. Somatic mutation of the T15 heavy chain gives rise to an antibody with autoantibody specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984 Sep;81(18):5841-4.
20. Guo W, Smith D, Aviszus K, Detanico T, Heiser RA, Wysocki LJ. Somatic hypermutation as a generator of antinuclear antibodies in a murine model of systemic autoimmunity. *J Exp Med*. 2010 Sep 27;207(10):2225-37.

21. Shlomchik M, Masetti M, Shan H, Radic MZ, Pisetsky D, Marshak-Rothstein A, et al. Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med*. 1990 Jan 1;171(1):265-92.
22. Pearse RN, Kawabe T, Bolland S, Guinamard R, Kurosaki T, Ravetch JV. SHIP recruitment attenuates Fc gamma R1B-induced B cell apoptosis. *Immunity*. 1999 Jun;10(6):753-60.
23. Kurts C, Heath WR, Kosaka H, Miller JF, Carbone FR. The peripheral deletion of autoreactive CD8+ T cells induced by cross-presentation of self-antigens involves signaling through CD95 (Fas, Apo-1). *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):415-20.
24. Kurts C, Miller JF, Subramaniam RM, Carbone FR, Heath WR. Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp Med*. 1998 Jul 20;188(2):409-14.
25. Jenkins MK, Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med*. 1987 Feb 1;165(2):302-19.
26. Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:305-34.
27. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993 Dec 17;75(6):1169-78.
28. Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*. 1992 Mar 26;356(6367):314-7.
29. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance. *J Exp Med*. 2002 Dec 16;196(12):1627-38.
30. Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 2001 Aug 10;106(3):263-6.
31. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:685-711.
32. Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jan 8;99(1):351-8.
33. Fehervari Z, Sakaguchi S. A paragon of self-tolerance: CD25+CD4+ regulatory T cells and the control of immune responses. *Arthritis Res Ther*. 2004;6(1):19-25.
34. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol*. 2004 Mar;5(3):266-71.
35. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:531-62.
36. Fowell D, Mason D. Evidence that the T cell repertoire of normal rats contains cells with the potential to cause diabetes. Characterization of the CD4+ T cell subset that inhibits this autoimmune potential. *J Exp Med*. 1993 Mar 1;177(3):627-36.
37. Gershon RK, Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 May;18(5):723-37.
38. Nishizuka Y, Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of the gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 1969 Nov 7;166(906):753-5.
39. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med*. 1982 Dec 1;156(6):1577-86.
40. Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*. 2003 Dec 15;171(12):6323-7.
41. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells:

- induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 1998 Dec;10(12):1969-80.
42. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.
 43. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 2001 Jan;27(1):68-73.
 44. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003 Apr;4(4):330-6.
 45. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005 Mar;22(3):329-41.
 46. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 2002 Aug;3(8):756-63.
 47. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1875-86.
 48. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol.* 2007 Apr 1;178(7):4022-6.
 49. Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med.* 1998 Jul 20;188(2):287-96.
 50. Akbar AN, Taams LS, Salmon M, Vukmanovic-Stejic M. The peripheral generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Immunology.* 2003 Jul;109(3):319-25.
 51. Jonuleit H, Schmitt E, Kakirman H, Stassen M, Knop J, Enk AH. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J Exp Med.* 2002 Jul 15;196(2):255-60.
 52. Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Jul 6;107(27):12204-9.
 53. Stassen M, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation.* 2004 Jan 15;77(1 Suppl):S23-5.
 54. Jacobson DL, Gange SJ, Rose NR, Graham NM. Epidemiology and estimated population burden of selected autoimmune diseases in the United States. *Clin Immunol Immunopathol.* 1997 Sep;84(3):223-43.
 55. Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science.* 1990 Jun 15;248(4961):1380-8.
 56. Gabriel SE, Michaud K. Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther.* 2009;11(3):229.
 57. Kukreja A, Maclaren NK. Autoimmunity and diabetes. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Dec;84(12):4371-8.
 58. Maier LM, Hafler DA. Autoimmunity risk alleles in costimulation pathways. *Immunol Rev.* 2009 May;229(1):322-36.
 59. Ortonne JP. Recent developments in the understanding of the pathogenesis of psoriasis. *Br J Dermatol.* 1999 Apr;140 Suppl 54:1-7.
 60. Becker KG. Comparative genetics of type 1 diabetes and autoimmune disease: common loci, common pathways? *Diabetes.* 1999 Jul;48(7):1353-8.
 61. Encinas JA, Kuchroo VK. Mapping and identification of autoimmunity genes. *Curr Opin Immunol.* 2000 Dec;12(6):691-7.
 62. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv Immunol.* 2007;96:179-204.

63. Sue D, Fink D, Wiedmann M, Boor KJ. sigmaB-dependent gene induction and expression in *Listeria monocytogenes* during osmotic and acid stress conditions simulating the intestinal environment. *Microbiology*. 2004 Nov;150(Pt 11):3843-55.
64. Takai T. Roles of Fc receptors in autoimmunity. *Nat Rev Immunol*. 2002 Aug;2(8):580-92.
65. Kyogoku C, Dijstelbloem HM, Tsuchiya N, Hatta Y, Kato H, Yamaguchi A, et al. Fc gamma receptor gene polymorphisms in Japanese patients with systemic lupus erythematosus: contribution of FCGR2B to genetic susceptibility. *Arthritis Rheum*. 2002 May;46(5):1242-54.
66. Davidson A, Diamond B. Autoimmune diseases. *N Engl J Med*. 2001 Aug 2;345(5):340-50.
67. Russell WL, Russell LB, Gower JS. Exceptional Inheritance of a Sex-Linked Gene in the Mouse Explained on the Basis That the X/O Sex-Chromosome Constitution Is Female. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1959 Apr;45(4):554-60.
68. Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol*. 1991 Jun;138(6):1379-87.
69. Means GD, Toy DY, Baum PR, Derry JM. A transcript map of a 2-Mb BAC contig in the proximal portion of the mouse X chromosome and regional mapping of the scurfy mutation. *Genomics*. 2000 May 1;65(3):213-23.
70. Blair PJ, Carpenter DA, Godfrey VL, Russell LB, Wilkinson JE, Rinchik EM. The mouse scurfy (sf) mutation is tightly linked to Gata1 and Tfe3 on the proximal X chromosome. *Mamm Genome*. 1994 Oct;5(10):652-4.
71. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):20-1.
72. Bennett CL, Ochs HD. IPEX is a unique X-linked syndrome characterized by immune dysfunction, polyendocrinopathy, enteropathy, and a variety of autoimmune phenomena. *Curr Opin Pediatr*. 2001 Dec;13(6):533-8.
73. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*. 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.
74. Lahl K, Loddenkemper C, Drouin C, Freyer J, Arnason J, Eberl G, et al. Selective depletion of Foxp3+ regulatory T cells induces a scurfy-like disease. *J Exp Med*. 2007 Jan 22;204(1):57-63.
75. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010 Jul;10(7):490-500.
76. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):18-20.
77. Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Lee KP, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in Ctla-4. *Science*. 1995 Nov 10;270(5238):985-8.
78. Blair PJ, Bultman SJ, Haas JC, Rouse BT, Wilkinson JE, Godfrey VL. CD4+CD8- T cells are the effector cells in disease pathogenesis in the scurfy (sf) mouse. *J Immunol*. 1994 Oct 15;153(8):3764-74.
79. Leonardo SM, Josephson JA, Hartog NL, Gauld SB. Altered B cell development and anergy in the absence of Foxp3. *J Immunol*. 2010 Aug 15;185(4):2147-56.
80. Kanangat S, Blair P, Reddy R, Daheshia M, Godfrey V, Rouse BT, et al. Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol*. 1996 Jan;26(1):161-5.
81. Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol*. 2006;24:209-26.
82. van der Vliet HJ, Nieuwenhuis EE. IPEX as a result of mutations in FOXP3. *Clin Dev Immunol*. 2007;2007:89017.
83. Powell BR, Buist NR, Stenzel P. An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy. *J Pediatr*. 1982 May;100(5):731-7.
84. Baud O, Goulet O, Canioni D, Le Deist F, Radford I, Rieu D, et al. Treatment of the immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX)

- by allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 2001 Jun 7;344(23):1758-62.
85. Bettelli E, Dastrange M, Oukka M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Apr 5;102(14):5138-43.
 86. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem.* 2001 Oct 5;276(40):37672-9.
 87. Kaufmann E, Knochel W. Five years on the wings of fork head. *Mech Dev.* 1996 Jun;57(1):3-20.
 88. Sharma R, Ju AC, Kung JT, Fu SM, Ju ST. Rapid and selective expansion of nonclonotypic T cells in regulatory T cell-deficient, foreign antigen-specific TCR-transgenic scurfy mice: antigen-dependent expansion and TCR analysis. *J Immunol.* 2008 Nov 15;181(10):6934-41.
 89. Zahorsky-Reeves JL, Wilkinson JE. The murine mutation scurfy (sf) results in an antigen-dependent lymphoproliferative disease with altered T cell sensitivity. *Eur J Immunol.* 2001 Jan;31(1):196-204.
 90. Chen Z, Benoist C, Mathis D. How defects in central tolerance impinge on a deficiency in regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005 Oct 11;102(41):14735-40.
 91. Sharma R, Sung SS, Abaya CE, Ju AC, Fu SM, Ju ST. IL-2 regulates CD103 expression on CD4+ T cells in Scurfy mice that display both CD103-dependent and independent inflammation. *J Immunol.* 2009 Jul 15;183(2):1065-73.
 92. Zheng L, Sharma R, Gaskin F, Fu SM, Ju ST. A novel role of IL-2 in organ-specific autoimmune inflammation beyond regulatory T cell checkpoint: both IL-2 knockout and Fas mutation prolong lifespan of Scurfy mice but by different mechanisms. *J Immunol.* 2007 Dec 15;179(12):8035-41.
 93. Lin W, Truong N, Grossman WJ, Haribhai D, Williams CB, Wang J, et al. Allergic dysregulation and hyperimmunoglobulinemia E in Foxp3 mutant mice. *J Allergy Clin Immunol.* 2005 Nov;116(5):1106-15.
 94. Singh N, Chandler PR, Seki Y, Baban B, Takezaki M, Kahler DJ, et al. Role of CD28 in fatal autoimmune disorder in scurfy mice. *Blood.* 2007 Aug 15;110(4):1199-206.
 95. McAdam AJ, Schweitzer AN, Sharpe AH. The role of B7 co-stimulation in activation and differentiation of CD4+ and CD8+ T cells. *Immunol Rev.* 1998 Oct;165:231-47.
 96. Van Gool SW, Vandenberghe P, de Boer M, Ceuppens JL. CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model. *Immunol Rev.* 1996 Oct;153:47-83.
 97. Strait R, Morrissett SC, Finkelman FD. Cytokine enhancement of anaphylaxis. *Novartis Found Symp.* 2004;257:80-91; discussion -100, 276-85.
 98. Wing K, Sakaguchi S. Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol.* 2010 Jan;11(1):7-13.
 99. Lyon MF, Peters J, Glenister PH, Ball S, Wright E. The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Apr;87(7):2433-7.
 100. Hsu WT, Suen JL, Chiang BL. The role of CD4CD25 T cells in autoantibody production in murine lupus. *Clin Exp Immunol.* 2006 Sep;145(3):513-9.
 101. Iikuni N, Lourenco EV, Hahn BH, La Cava A. Cutting edge: Regulatory T cells directly suppress B cells in systemic lupus erythematosus. *J Immunol.* 2009 Aug 1;183(3):1518-22.
 102. Ludwig-Portugall I, Hamilton-Williams EE, Gotot J, Kurts C. CD25+ T(reg) specifically suppress auto-Ab generation against pancreatic tissue autoantigens. *Eur J Immunol.* 2009 Jan;39(1):225-33.
 103. Seo SJ, Fields ML, Buckler JL, Reed AJ, Mandik-Nayak L, Nish SA, et al. The impact of T helper and T regulatory cells on the regulation of anti-double-stranded DNA B cells. *Immunity.* 2002 Apr;16(4):535-46.

104. Sharma R, Ju ST. Genetic control of the inflammatory T-cell response in regulatory T-cell deficient scurfy mice. *Clin Immunol*. 2010 Aug;136(2):162-9.
105. Lefkowitz JB, Gilkeson GS. Nephritogenic autoantibodies in lupus: current concepts and continuing controversies. *Arthritis Rheum*. 1996 Jun;39(6):894-903.
106. Putterman C. New approaches to the renal pathogenicity of anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*. 2004 Feb;3(2):7-11.
107. Junqueira LC, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by Sirius Red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn*. 1978 Jun;41(3):267-74.
108. Schroder K, Hertzog PJ, Ravasi T, Hume DA. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J Leukoc Biol*. 2004 Feb;75(2):163-89.
109. Sharma R, Sharma PR, Kim YC, Leitingner N, Lee JK, Fu SM, et al. IL-2-controlled expression of multiple T cell trafficking genes and Th2 cytokines in the regulatory T cell-deficient scurfy mice: implication to multiorgan inflammation and control of skin and lung inflammation. *J Immunol*. 2011 Jan 15;186(2):1268-78.
110. Dubucquoi S, Desreumaux P, Janin A, Klein O, Goldman M, Tavernier J, et al. Interleukin 5 synthesis by eosinophils: association with granules and immunoglobulin-dependent secretion. *J Exp Med*. 1994 Feb 1;179(2):703-8.
111. Takatsu K, Kouro T, Nagai Y. Interleukin 5 in the link between the innate and acquired immune response. *Adv Immunol*. 2009;101:191-236.
112. Holter W, Majdic O, Kalthoff FS, Knapp W. Regulation of interleukin-4 production in human mononuclear cells. *Eur J Immunol*. 1992 Oct;22(10):2765-7.
113. Harigai M, Hara M, Yoshimura T, Leonard EJ, Inoue K, Kashiwazaki S. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in inflammatory joint diseases and its involvement in the cytokine network of rheumatoid synovium. *Clin Immunol Immunopathol*. 1993 Oct;69(1):83-91.
114. Lord BI, Heyworth CM, Woolford LB. Macrophage inflammatory protein: its characteristics, biological properties and role in the regulation of haemopoiesis. *Int J Hematol*. 1993 Jun;57(3):197-206.
115. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*. 2005 May 2;201(9):1355-9.
116. Zhao WB, Li Y, Liu X, Zhang LY, Wang X. Involvement of CD4+CD25+ regulatory T cells in the pathogenesis of polycythaemia vera. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Sep 20;121(18):1781-6.
117. Kitamura D, Roes J, Kuhn R, Rajewsky K. A B cell-deficient mouse by targeted disruption of the membrane exon of the immunoglobulin mu chain gene. *Nature*. 1991 Apr 4;350(6317):423-6.
118. Nadler LM, Ritz J, Hardy R, Pesando JM, Schlossman SF, Stashenko P. A unique cell surface antigen identifying lymphoid malignancies of B cell origin. *J Clin Invest*. 1981 Jan;67(1):134-40.
119. Stashenko P, Nadler LM, Hardy R, Schlossman SF. Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen. *J Immunol*. 1980 Oct;125(4):1678-85.
120. Valentine MA, Meier KE, Rossie S, Clark EA. Phosphorylation of the CD20 phosphoprotein in resting B lymphocytes. Regulation by protein kinase C. *J Biol Chem*. 1989 Jul 5;264(19):11282-7.
121. Hamaguchi Y, Xiu Y, Komura K, Nimmerjahn F, Tedder TF. Antibody isotype-specific engagement of Fc gamma receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):743-53.
122. Biburger M, Aschermann S, Schwab I, Lux A, Albert H, Danzer H, et al. Monocyte subsets responsible for immunoglobulin g-dependent effector functions in vivo. *Immunity*. 2011 Dec 23;35(6):932-44.
123. Arnaout MA. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. *Blood*. 1990 Mar 1;75(5):1037-50.
124. McGinness JL, Bivens MM, Greer KE, Patterson JW, Saulsbury FT. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX)

- associated with pemphigoid nodularis: a case report and review of the literature. *J Am Acad Dermatol.* 2006 Jul;55(1):143-8.
125. Clark LB, Appleby MW, Brunkow ME, Wilkinson JE, Ziegler SF, Ramsdell F. Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol.* 1999 Mar 1;162(5):2546-54.
 126. Godfrey VL, Rouse BT, Wilkinson JE. Transplantation of T cell-mediated, lymphoreticular disease from the scurfy (sf) mouse. *Am J Pathol.* 1994 Aug;145(2):281-6.
 127. Bouaziz JD, Yanaba K, Venturi GM, Wang Y, Tisch RM, Poe JC, et al. Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 Dec 26;104(52):20878-83.
 128. Xiu Y, Wong CP, Bouaziz JD, Hamaguchi Y, Wang Y, Pop SM, et al. B lymphocyte depletion by CD20 monoclonal antibody prevents diabetes in nonobese diabetic mice despite isotype-specific differences in Fc gamma R effector functions. *J Immunol.* 2008 Mar 1;180(5):2863-75.
 129. Constant S, Schweitzer N, West J, Ranney P, Bottomly K. B lymphocytes can be competent antigen-presenting cells for priming CD4+ T cells to protein antigens in vivo. *J Immunol.* 1995 Oct 15;155(8):3734-41.
 130. Harris DP, Haynes L, Sayles PC, Duso DK, Eaton SM, Lepak NM, et al. Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol.* 2000 Dec;1(6):475-82.
 131. Linton PJ, Bautista B, Biederman E, Bradley ES, Harbertson J, Kondrack RM, et al. Costimulation via OX40L expressed by B cells is sufficient to determine the extent of primary CD4 cell expansion and Th2 cytokine secretion in vivo. *J Exp Med.* 2003 Apr 7;197(7):875-83.
 132. Lim HW, Hillsamer P, Banham AH, Kim CH. Cutting edge: direct suppression of B cells by CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4180-3.
 133. Hondowicz BD, Fields ML, Nish SA, Larkin J, Caton AJ, Erikson J. Autoantibody production in lpr/lpr gld/gld mice reflects accumulation of CD4+ effector cells that are resistant to regulatory T cell activity. *J Autoimmun.* 2008 Sep;31(2):98-109.
 134. Carlos TM, Harlan JM. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood.* 1994 Oct 1;84(7):2068-101.
 135. Hickstein DD, Ozols J, Williams SA, Baenziger JU, Locksley RM, Roth GJ. Isolation and characterization of the receptor on human neutrophils that mediates cellular adherence. *J Biol Chem.* 1987 Apr 25;262(12):5576-80.
 136. Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med.* 1983 Dec 1;158(6):1785-803.
 137. Trowbridge IS, Omary MB. Molecular complexity of leukocyte surface glycoproteins related to the macrophage differentiation antigen Mac-1. *J Exp Med.* 1981 Nov 1;154(5):1517-24.
 138. Beller DI, Springer TA, Schreiber RD. Anti-Mac-1 selectively inhibits the mouse and human type three complement receptor. *J Exp Med.* 1982 Oct 1;156(4):1000-9.
 139. Tang T, Rosenkranz A, Assmann KJ, Goodman MJ, Gutierrez-Ramos JC, Carroll MC, et al. A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc gamma receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *J Exp Med.* 1997 Dec 1;186(11):1853-63.
 140. Ghosn EE, Yang Y, Tung J, Herzenberg LA, Herzenberg LA. CD11b expression distinguishes sequential stages of peritoneal B-1 development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Apr 1;105(13):5195-200.
 141. McFarland HI, Nahill SR, Maciaszek JW, Welsh RM. CD11b (Mac-1): a marker for CD8+ cytotoxic T cell activation and memory in virus infection. *J Immunol.* 1992 Aug 15;149(4):1326-33.

142. Coxon A, Rieu P, Barkalow FJ, Askari S, Sharpe AH, von Andrian UH, et al. A novel role for the beta 2 integrin CD11b/CD18 in neutrophil apoptosis: a homeostatic mechanism in inflammation. *Immunity*. 1996 Dec;5(6):653-66.
143. Albert H, Collin M, Dudziak D, Ravetch JV, Nimmerjahn F. In vivo enzymatic modulation of IgG glycosylation inhibits autoimmune disease in an IgG subclass-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 30;105(39):15005-9.
144. Baudino L, Nimmerjahn F, Azeredo da Silveira S, Martinez-Soria E, Saito T, Carroll M, et al. Differential contribution of three activating IgG Fc receptors (FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV) to IgG2a- and IgG2b-induced autoimmune hemolytic anemia in mice. *J Immunol*. 2008 Feb 1;180(3):1948-53.
145. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Analyzing antibody-Fc-receptor interactions. *Methods Mol Biol*. 2008;415:151-62.
146. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*. 2005 Dec 2;310(5753):1510-2.
147. Foster MH. Novel targets for immunotherapy in glomerulonephritis. *Biologics*. 2008 Sep;2(3):531-45.
148. Nyblom H, Bjornsson E, Simren M, Aldenborg F, Almer S, Olsson R. The AST/ALT ratio as an indicator of cirrhosis in patients with PBC. *Liver Int*. 2006 Sep;26(7):840-5.
149. Panteghini M. Aspartate aminotransferase isoenzymes. *Clin Biochem*. 1990 Aug;23(4):311-9.
150. Jurk K, Kehrel BE. Platelets: physiology and biochemistry. *Semin Thromb Hemost*. 2005;31(4):381-92.
151. Bernard JJ, Seweryniak KE, Koniski AD, Spinelli SL, Blumberg N, Francis CW, et al. Foxp3 regulates megakaryopoiesis and platelet function. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009 Nov;29(11):1874-82.
152. Bindon CI, Hale G, Bruggemann M, Waldmann H. Human monoclonal IgG isotypes differ in complement activating function at the level of C4 as well as C1q. *J Exp Med*. 1988 Jul 1;168(1):127-42.
153. Collins C, Tsui FW, Shulman MJ. Differential activation of human and guinea pig complement by pentameric and hexameric IgM. *Eur J Immunol*. 2002 Jun;32(6):1802-10.
154. Brass LF. Thrombin and platelet activation. *Chest*. 2003 Sep;124(3 Suppl):18S-25S.
155. Cragg MS, Walshe CA, Ivanov AO, Glennie MJ. The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy. *Curr Dir Autoimmun*. 2005;8:140-74.
156. Renaudineau Y, Devauchelle-Pensec V, Hanrotel C, Pers JO, Saraux A, Youinou P. Monoclonal anti-CD20 antibodies: mechanisms of action and monitoring of biological effects. *Joint Bone Spine*. 2009 Oct;76(5):458-63.
157. Zhan H, Sinclair J, Adams S, Cale CM, Murch S, Perroni L, et al. Immune reconstitution and recovery of FOXP3 (forkhead box P3)-expressing T cells after transplantation for IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndrome. *Pediatrics*. 2008 Apr;121(4):e998-1002.
158. Allhorn M, Collin M. Sugar-free antibodies--the bacterial solution to autoimmunity? *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Sep;1173:664-9.
159. Allhorn M, Olin AI, Nimmerjahn F, Collin M. Human IgG/Fc gamma R interactions are modulated by streptococcal IgG glycan hydrolysis. *PLoS One*. 2008;3(1):e1413.
160. Allhorn M, Olsen A, Collin M. EndoS from *Streptococcus pyogenes* is hydrolyzed by the cysteine proteinase SpeB and requires glutamic acid 235 and tryptophans for IgG glycan-hydrolyzing activity. *BMC Microbiol*. 2008;8:3.
161. Arnold JN, Wormald MR, Sim RB, Rudd PM, Dwek RA. The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:21-50.
162. Collin M, Olsen A. EndoS, a novel secreted protein from *Streptococcus pyogenes* with endoglycosidase activity on human IgG. *Embo J*. 2001 Jun 15;20(12):3046-55.
163. Neubert K, Meister S, Moser K, Weisel F, Maseda D, Amann K, et al. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med*. 2008 Jul;14(7):748-55.

Literaturverzeichnis

164. Chen L, Monti S, Juszczynski P, Daley J, Chen W, Witzig TE, et al. SYK-dependent tonic B-cell receptor signaling is a rational treatment target in diffuse large B-cell lymphoma. *Blood*. 2008 Feb 15;111(4):2230-7.
165. Kyttaris VC, Tsokos GC. Syk kinase as a treatment target for therapy in autoimmune diseases. *Clin Immunol*. 2007 Sep;124(3):235-7.
166. Podolanczuk A, Lazarus AH, Crow AR, Grossbard E, Bussel JB. Of mice and men: an open-label pilot study for treatment of immune thrombocytopenic purpura by an inhibitor of Syk. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3154-60.
167. Weinblatt ME, Kavanaugh A, Genovese MC, Musser TK, Grossbard EB, Magilavy DB. An oral spleen tyrosine kinase (Syk) inhibitor for rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*. 2010 Sep 30;363(14):1303-12.
168. Gambineri E, Perroni L, Passerini L, Bianchi L, Doglioni C, Meschi F, et al. Clinical and molecular profile of a new series of patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome: inconsistent correlation between forkhead box protein 3 expression and disease severity. *J Allergy Clin Immunol*. 2008 Dec;122(6):1105-12 e1.
169. Klion A. Hypereosinophilic syndrome: current approach to diagnosis and treatment. *Annu Rev Med*. 2009;60:293-306.
170. Zimmermann N, McBride ML, Yamada Y, Hudson SA, Jones C, Cromie KD, et al. Siglec-F antibody administration to mice selectively reduces blood and tissue eosinophils. *Allergy*. 2008 Sep;63(9):1156-63.
171. Daley JM, Thomay AA, Connolly MD, Reichner JS, Albina JE. Use of Ly6G-specific monoclonal antibody to deplete neutrophils in mice. *J Leukoc Biol*. 2008 Jan;83(1):64-70.

H. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µm	Mikrometer
ADCC	engl. Antibody dependent cellular cytotoxicity, Antikörper-induzierte Zell-vermittelte Zytotoxizität
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	engl. Activation-Induced Cell Death
AIHA	Autoimmun hämolytischen Anämie
aire	engl. autoimmune regulator, autoimmun Regulator
AKP	Alkalischephosphatase
ALT	Alanin-Aminotransferase
ANA	Anti nukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
APC	engl. Antigen presenting cell, Antigen-präsentierende Zelle
AST	Aspartat-Aminotransferase
bp	Basenpaar
BP	Bullous pemphigoid
BSA	engl. Bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
BUN	engl. Blood Urea Nitrogen, Blut-Harnstoff
BZR	B-Zellrezeptor
BZT	B-Zelltransfer
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CBA	engl. Cytometric Bead Array
CD	engl. Cluster of differentiation
cDNA	engl. Complementary DNA, komplementäre DNA
CH	konstante Domäne der schweren Kette
CL	konstante Domäne der leichten Kette
CTLA-4	engl. Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4
DNA	engl. Desoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DZ	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
dl	Deziliter
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelsträngige DNA
ELISA	engl. Enzyme linked immunoabsorbent assay
EndoS	Endoglykosidase S
engl.	englisch
EtBr	Ethidiumbromid
FACS	engl. Fluorescence activated cell sorting, Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FC	engl. Fragment cristallyzable
Fc _γ R	Fc _γ Rezeptor
FcR	Fc Rezeptor
FCS	engl. Fetal calf serum, Fötales Kälberserum
FDZ	follikulär dendritische Zelle
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKH	engl. Forkhead
Foxp3	engl. Forkhead Box 3
FSC	engl. forward scattered light
g	engl. gravitational force

Anhang

GFP	engl. Green Fluorescent Protein
GITR	engl. Glucocorticoid-inducible TNF Receptor-related Protein
GM-CSF	engl. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
GP	Glykoprotein
GPI	Glukose-6-Phosphat Isomerase
h	Stunde
HEK	engl. Human embryonal kidney
HEp-2-Zellen	Humane Epithelzellen
HRP	engl. Horseraddish peroxidase
IF	Immunfluoreszenz
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
IPEX	X-chromosomal vererbte Immundysregulation, Polyendokrinopathie und Enteropathie
ITGAM	Integrin alpha M
ITP	Immunthrombozytopenie
kDa	Kilodalton
KM	Knochenmark
lat.	lateinisch
LK	Lymphknoten
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
Mac-1	engl. macrophage-1 antigen, Makrophagen Antigen 1
MACS	engl. Magnetic assisted cell sorting, Magnetische Zellsortierung
MCP-1	engl. monocyte chemotactic protein-1
mg	Miligramm
MHC	engl. Major Histocompatibility Complex, Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MIP-1 α	engl. macrophage inflammatory protein-1 alpha
ml	Mililiter
mM	Nanomolar
MPSV	myeloproliferatives Sarkomavirus
mTEC	medulläre Thymusepithelzelle
NFAT	engl. nuclear factor of activated T cells
NF- κ B	engl. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
ng	Nanogramm
NK-Zelle	Natürliche Killer-Zelle
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBMC	engl. Peripheral blood mononuclear cells
PBS	engl. Phosphate-buffered saline, Phosphat.gepufferte Saline
PCR	engl. Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridininchlorophyll
pg	pikogramm
pH	lat. Pondus Hydrogenii, "Stärke des Wasserstoffs"
PML	polymorphkernige Leukozyten
RA	Rheumatoide Arthritis
Rag	engl. Recombinase activating gene, Rekombinase-aktivierendes Gen
RF	Rheumafaktor
RNA	engl. Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	engl. Rotations per minute
RT	Raumtemperatur

Anhang

SDS	engl. Sodiumdodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
sf	Scurfy
SHM	somatische Hypermutation
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
SNP	engl. Single nucleotide polymorphism, Einzelnukleotid-Polymorphismus
sog.	sogenannte
SSC	engl. sideward scattered light
Stat6	engl. signal transducer and activator of transcription 6, Signal Transducer und Aktivator der Transkription 6
Syk	engl. spleen tyrosine kinase, Protein Tyrosin Kinase Syk
Tab.	Tabelle
Taq	Termus aquaticus
TE	Tris/EDTA
Tg	Transgen
Th-Zelle	T-Helferzelle
TNF- α	Tumornekrose Faktor
T _{Reg}	regulatorische T-Zelle
TZR	T-Zellrezeptor
ÜN	über Nacht
z.B.	zum Beispiel

2. Eigene Publikationen

Aschermann S, Lux A, Baerenwaldt A, Biburger M, Nimmerjahn F. The other side of immunoglobulin G: suppressor of inflammation. Clin Exp Immunol. 2009 May;160(2):161-7.

Lux A, Aschermann S, Biburger M, Nimmerjahn F. The pro and anti-inflammatory activities of immunoglobulin G. Ann Rheum Dis. 2010 Jan;69 Suppl 1:i92-6.

Biburger M, Aschermann S, Lux A, Nimmerjahn F. The role of Fcγ receptors in murine autoimmune thrombocytopenia. Ann Hematol. 2010, 89: 25-30

Biburger M, Aschermann S, Schwab I, Lux A, Albert H, Danzer H, et al. Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo. Immunity. 2011 Dec 23;35(6):932-44.

Uderhardt S, Herrmann M, Oskolkova O, Aschermann S, Bicker W, Ipseiz N, Sarter K, Frey B, Rothe T, Voll R, Nimmerjahn F, Bochkov V, Schett G, Krönke G. 12/15-Lipoxygenase orchestrates the clearance of apoptotic cells and maintains immunologic tolerance. Immunity. 2012 May 25;36:1-13

I. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof Dr. Falk Nimmerjahn, der es mir ermöglicht hat, mich selbstständig mit vielen Aspekten der Immunologie zu befassen. Ihr offenes Ohr und Ihre Diskussionsbereitschaft waren ein gutes Fundament für das Gelingen dieser Arbeit. Vielen Dank für die wirklich ausgezeichnete Betreuung während der letzten Jahre. Ihre Ratschläge waren sehr wertvoll für mich. Ich durfte viel von Ihnen lernen. Auf die Frage „Haben sie kurz Zeit?“ entgegneten Sie stets ein freundliches „Ja, klar!“. Danke für die gute Zeit!

Prof. Dr. Hans-Martin Jäck danke ich sehr für die freundliche Übernahme des Zweitgutachtens.

Ich danke dem Direktor der Medizinischen Klinik 3, Prof. Dr. Georg Schett für das große Interesse an meiner Arbeit und seine Vorschläge und Anregungen bei meinen Seminarvorträgen.

Ich danke dem ganzen Lehrstuhl für Genetik für die hilfsbereite Arbeitsatmosphäre in den letzten Jahren. Besonderer Dank geht hier an die Arbeitsgruppenleiter Prof. Dr. Lars Nitschke, Prof. Dr. Thomas Winkler und Prof. Dr. Robert Slany für die zahlreichen Anregungen.

All meinen jetzigen und ehemaligen Kollegen im Labor danke ich ganz herzlich für ihre unkompliziert Art, die das Arbeiten in absolut entspannter und lustiger Atmosphäre ermöglicht hat. Der wissenschaftliche Austausch war stets hervorragend und es gab jederzeit Hilfestellung. Ihr tragt einen riesengroßen Teil dazu bei, dass ich jeden Tag aufs Neue sehr gerne ins Labor komme. Die letzten Jahre bleiben unvergessen und tief in meinem Herzen verankert.

Vielen lieben Dank sage ich auch Anja Lux, Birgit Lehmann, Sybille Böhm und Inessa Schwab für das Korrekturlesen der Arbeit oder die wertvollen Tipps und Tricks im Umgang mit Word!

Meiner Familie bin ich für ihre immerwährende Unterstützung aus tiefstem Herzen dankbar.

Meinem lieben Lebensgefährten Marko danke ich, dass er immer für mich da ist.