

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Lehrstuhl für Humanbiologie

**Funktion von TLR7 für die Aktivierung dendritischer Zellen durch
das Autoantigen U1snRNP
und die Pathogenese des Systemischen Lupus**

Zaira Emina Savarese

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ-Prof. Dr. D. Haller

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. M. Schemann

2. Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid

Die Dissertation wurde am 19.12.2007 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 02.07.2008 angenommen.

Meinen Grosseltern und Frank

“We shall find peace. We shall hear the angels, we shall see sky sparkling with diamonds”

Anton Checkhov

(Im Andenken an Martin Locher und Rayko Ibanez-Molinet)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis	5
Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Immunsystem	9
1.1.1 Angeborene Immunantwort.....	9
1.1.2 Adaptive Immunantwort.....	10
1.1.3 Toleranzmechanismen: Selektion von B- und T- Zellen.....	11
1.2 Systemischer Lupus Erythematodes	12
1.2.1 Genetische und exogene Ursachen für SLE beim Menschen.....	13
1.2.2 SLE-Mausmodelle.....	14
1.2.3 Dendritische Zellen und ihre Relevanz für SLE	17
1.2.4 RNP-Antigen.....	20
1.3 Erkennungsrezeptoren für mikrobielle und endogene Nukleinsäuren	21
1.3.1 Toll-like Rezeptoren	21
1.3.2 Signaltransduktion von Nukleinsäuresensoren.....	22
1.3.3 Mögliche Bedeutung von TRL3/7/8/9 für SLE.....	25
1.4 Ziele der Arbeit	26
2 Material	28
2.1 Zelllinien	28
2.2 Reagenzien	28
2.2.1 Zellkulturreagenzien.....	28
2.2.2 Weitere Reagenzien.....	28
2.2.3 Stimuli	29
2.2.4 Verwendete <i>Kits</i>	29
2.3 Antikörper und Zytokine	30
2.3.1 Antikörper und Sekundärfarbstoffe für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz	30
2.3.2 Antikörper und rec. Zytokine für die Verwendung im ELISA	31
2.4 Molekularbiologische Reagenzien	31
2.4.1 Reagenzien.....	31
2.4.2 Primer für PCR und RT-PCR.....	32
2.5 Zellkulturmedien	33

2.6 Puffer und Lösungen	34
2.6.1 Puffer zur Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Überstand	34
2.6.2 ELISA-Puffer zur Detektion von Zytokinen und Anti-snRNP-AK	34
2.6.3 ELISA Puffer zur Detektion von Anti-dsDNA-Antikörpern	35
2.6.4 ELISA Puffer zur IgG Isotypisierung	35
2.6.5 Sonstige Puffer und Lösungen	36
3 Methoden.....	37
3.1 Tierhaltung und tierexperimentelle Methoden.....	37
3.1.1 Blutentnahme und Euthanasie bei Mäusen	37
3.1.2 Intravenöse Injektionsexperimente <i>in vivo</i>	38
3.1.3 Pristan-induziertes SLE-Modell der Maus.....	38
3.2 Histologische Verfahren	39
3.2.1 Immunfluoreszenzfärbung.....	39
3.2.2 PAS-Färbung	40
3.3 Zellkultur	41
3.3.1 Zellkultur und Kryokonservierung	41
3.3.2 IgG-Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand von Hybridomazellen.....	42
3.3.3 Isolierung von murinen Knochenmarkszellen	43
3.3.4 Generierung von FLDC's.....	44
3.3.5 Isolation von Splenocyten	44
3.3.6 Bestimmung der Zellzahl.....	44
3.3.7 Stimulation <i>in vitro</i>	45
3.3.8 L929 Bioassay für Typ I IFN-Aktivität	46
3.4 Immunologische Methoden	46
3.4.1 ANA-HEp-2 und <i>crithidia lucilliae</i> -Assay.....	46
3.4.2 Prinzip der Durchflusszytometrie	48
3.4.2.1 Oberflächenfärbung	49
3.4.2.2 <i>Sorten</i> von PDC's und cDC's aus Flt3-Kulturen	50
3.4.3 Prinzip des <i>Sandwich</i> -ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay).....	52
3.4.3.1 Zytokin-ELISA	53
3.4.3.2 Quantifizierung der Immunglobuline mittels ELISA	54
3.5 Molekularbiologische Methoden	55
3.5.1 RNA-Isolierung aus Milzen	55
3.5.2 RNA Gelelektrophorese Kontrollgel.....	56
3.5.3 Herstellung der cDNA	56
3.5.3.1 β Actin-PCR	57
3.5.4 Quantitative Real Time PCR	57
3.5.4.1 Prinzip der TaqMan-PCR.....	58
3.5.4.2 Relative Quantifizierung.....	59
3.5.4.3 Praktische Durchführung der qRT-PCR	61
3.6 Statistische Analyse.....	62

4	Ergebnisse	63
4.1	TLR7-abhängige Aktivierung von DC's durch U1snRNP-Komplexe <i>in vitro</i>	63
4.1.1	Internalisierung von U1snRNP mittels DOTAP	63
4.1.2	Stimulierung der FLDC's mit U1snRNP-Immunkomplexen	65
4.1.3	U1snRNP löst eine Aktivierung sowohl TLR7-abhängiger als auch TLR7-unabhängiger Signalwege aus.....	70
4.1.4	Aktivierung der FLDC's mit isolierter U1snRNA.....	71
4.1.5	Verteilung der Zytokinproduktion in murinen FLDC's.....	73
4.1.6	Die Auswirkungen der Vorstimulierung der FLDC mit IFN- β	74
4.2	TLR7 vermittelte Zytokininduktion durch U1snRNP <i>in vivo</i>.....	75
4.3	TLR7-abhängige anti-snRNP-Antikörper-Produktion und Glomerulonephritis im Pristan-induzierten SLE-Modell	77
4.3.1	Bildung von Autoantikörpern im Pristan-induzierten SLE Modell in WT- und TLR7 ^{-/-} -Mäusen.....	77
4.3.2	Renale Antikörper- und Komplement-Ablagerungen und Glomerulonephritis-Aktivität	80
4.3.3	Immunantwort von WT- und TLR7 ^{-/-} -Mäusen im Pristan-induzierten SLE-Modell.....	82
5	Diskussion	86
5.1	TLR7-abhängige Aktivierung durch U1snRNP <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>.....	86
5.2	TLR7-abhängige anti-RNP-Antikörperproduktion und Glomerulonephritis im Pristan-induzierten SLE-Modell.....	89
5.3	TLR7: Ansatzpunkt für neue Therapien	94
6	Zusammenfassung	96
7	Danksagung	98
8	Literaturverzeichnis	100

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Beteiligung der DC an der Entwicklung einer Autoimmunantwort	19
Abbildung 1.2:	U1snRNP und U1snRNA	20
Abbildung 1.3:	TLR abhängige und unabhängige Induktion von Zytokinen.....	23
Abbildung 3.1:	ANA-Färbung	47
Abbildung 3.2:	Prinzip des Zellsortens	51
Abbildung 3.3:	RNA Kontrollgel.....	56
Abbildung 3.4:	TaqMan RT-PCR.....	58
Abbildung 4.1:	U1snRNP/DOTAP induziert IFN- α und IL-6 in FLDC.....	64
Abbildung 4.2:	IFN- α und IL-6 Induktion in FLDC's durch den U1snRNP/Y12-Antikörper-Komplex.....	65
Abbildung 4.3:	Hochregulation von CD86 in FLDC's durch den Auto- Immunkomplex U1snRNP/Y12	66
Abbildung 4.4:	Hochregulation von CD86 - Funktion von Fc γ -Rezeptoren	67
Abbildung 4.5:	RNAse behandelte U1snRNP führt weder mit DOTAP noch als Immun-Komplex zur Aktivierung von FLDC	69
Abbildung 4.6:	Aktivierung der FLDC's durch U1snRNP in Abhängigkeit von TLR7- und TLR3.....	71
Abbildung 4.7:	TLR7-abhängige Zytokinantwort auf U1snRNA und daraus abgeleitete Oligoribonukleotide.....	72
Abbildung 4.8:	Stimulation isolierter PDC's und cDC's aus Flt3 generierten DC (FLDC)-Kulturen	74
Abbildung 4.9:	IFN- α -Produktion und Hochregulation der IRF7- und TLR7-mRNA-Expression in FLDC's nach Inkubation mit IFN- β	75
Abbildung 4.10:	U1snRNP/DOTAP-Injektion <i>in vivo</i>	76
Abbildung 4.11:	ANA-HEp-2-Färbung der Seren von Pristan injizierten WT- und TLR7 ^{-/-} -Mäusen.....	78
Abbildung 4.12:	Konzentrationsbestimmung der Anti-snRNP/Sm- und Anti-dsDNA-Antikörper in Seren von Pristan-injizierten WT-und TLR7 ^{-/-} - Mäusen.....	79
Abbildung 4.13:	IgG und Komplementablagerungen in den Glomeruli von Pristan-behandelten WT- und TLR7 ^{-/-} -Mäusen.....	80
Abbildung 4.14:	Pristan-induzierte Glomerulonephritis in WT- und TLR7 ^{-/-} -Mäusen	81
Abbildung 4.15:	Zellverteilung in den Splenozyten und Zytokinanalyse der Splenozyten.....	83

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	Spontane Mausmodelle für SLE	15
Tabelle 1.2:	Humane und murine Toll-like Rezeptoren, ihre Verteilung und ihre Liganden	21
Tabelle 1.3:	TLR-Expression in den verschiedenen DC-Subtypen von Mensch und Maus ...	25
Tabelle 3.1:	Semiquantitativer Score-Index für Immunglobulin- und Komplementablagerungen in den Glomeruli	40
Tabelle 3.2:	Score-Index für PAS-Färbung	41
Tabelle 3.3:	Endkonzentrationen der angewandten Stimuli im Zellkulturansatz	45
Tabelle 3.4:	Fluoreszenzfarbstoffe und ihre maximalen Absorptions- und Emissionswellenlängen	49
Tabelle 3.5:	Reaktionsansätze zum Nachweis von IFN- α , IL-6 und IL-12p40	53
Tabelle 3.6:	Reaktionsansätze zum Nachweis von Immunglobulinen in Mausseren	54
Tabelle 3.7:	DNase Behandlung	55
Tabelle 3.8:	SuperScriptII™ cDNA-Synthese	56
Tabelle 3.9:	β Actin-Polymerase	57
Tabelle 3.10:	Durchführung der PCR für IL-6, IL-12p35, IL-12p40, GATA3 und Foxp3	61
Tabelle 3.11:	Durchführung der PCR für IRF7, IFI-204, T-bet und BAFF	61
Tabelle 4.1:	Die mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren	84

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
ABTS	<i>2,2-azino-di-[3-ethylbenzthiazoline sulfonate (6)] diammonium salt crystals</i>
ANA	<i>Anti-nuclear Antibody</i>
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC	Allophycocyanin
AK	Antikörper
BCR	<i>B cell receptor</i>
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
C3c	Komplementfaktor 3c
cDC	<i>Conventionell dendritic cell</i>
CO ₂	Kohlendioxid
CpG	Deoxycytidylat-Phosphat-Deoxyguanylat (Cytosin verbunden mit Guanin über eine Phosphatverbindung)
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocytes</i>
DAPI	4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DC	<i>Dendritic cell</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA (cDNA)	<i>(Complementary) desoxyribonucleic acid</i>
ds	doppelsträngig
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FADD	<i>Fas activated death domain</i>
FAM	6-Carboxy-Fluoreszein
FBS	Fötales bovines Serum
FITC	Fluorescein-Isocyanat
Flt3-Ligand	Fms-verwandter Tyrosinkinase-3-Ligand
FLDC	Flt3-Ligand generierte dendritische Zellen
G	Guanin
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i>
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B Kinasekomplex
IL	Interleukin
IPS-1	<i>Interferon-β promotor stimulator</i>
IRAK	Interleukin-Rezeptor assoziierte Kinase
IRF	Interferon regulierender Faktor
JAK/STAT	<i>Janus kinase / signal transducer and activator of transcription</i>
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KO	<i>Knock out</i>
L	Liter
LGP-2	Lysosomal glycoprotein 2
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>Leucine-rich receptor</i>
M	Molar
MALP-2	Mykobakterielles Lipoprotein 2
MAPK	<i>Mitogen-activated-protein-kinase</i>
MAVS	<i>Mitochondrial anti-viral signaling protein</i>
MDA5	<i>Melanoma differentiation associated gene 5</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mRNA	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
MyD88	<i>Myeloid differentiation factor 88</i>
n	Anzahl
neg	negativ
ng	Nanogramm
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa B</i>
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
OD	Optische Dichte
ODN	Oligodesoxyribonukleotid
ORN	Oligoribonukleotid
OspA	<i>Outer surface lipoprotein A</i>
p	<i>Statistische Wahrscheinlichkeitskonstante</i>
PAS	<i>Periodic Acid Schiff</i>
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDC	<i>Plasmacytoid dendritic cell</i>
PE	Phycoerythrin
PFU	<i>Plaque Forming Units</i>
pg	Pikogramm

PI	Propidiumiodid
Poly I:C	Poly-Inosin:Poly-Cytidyl-Säure
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
R-848	Resiquimod
RIG-I	<i>Retinoic acid inducible gene 1</i>
RIP 1	<i>Receptor interacting protein 1</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	<i>Real time polymerase chain reaction</i>
sec	Sekunden
Sm-Antigen	<i>Smith-Antigen</i>
snRNP	<i>Small nuclear Ribonucleoprotein</i>
ss	einzelsträngig
SLE	Systemischer Lupus Erythematoses
T	Thymin
TAK 1	<i>TGFβ activated kinase 1</i>
TBK 1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
TCR	<i>T cell receptor</i>
TE	Tris-EDTA
T _H -Zelle	T-Helfer-Zelle
TIR	Toll/Interleukin-1 Rezeptor-Domäne
TIRAP	<i>TIR domain-containig adapter protein</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TRAF6	TNF-Rezeptor assoziierter Faktor 6
TRAM	<i>Trif-related adapter molecule</i>
TRIF	<i>TIR domain-containing adapter protein</i>
ÜN	Über Nacht
U/mL	Units pro Milliliter
UV	Ultraviolett
VSV	<i>Vesicular Stomatitits Virus</i>
WT	Wildtyp
μ g	Mikrogramm
μ L	Mikroliter
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes biologisches Abwehrsystem, welches aus einem Netzwerk verschiedener Organe, Zelltypen und Molekülen besteht. Die Aufgabe dieses Netzwerkes ist es, Infektionen und die Ausbreitung von Krankheitserregern zu verhindern. Es erkennt im Körper eingedrungene Mikroorganismen und fremde Substanzen auf Zellen, sogenannte Antigene.

Alle höher entwickelten Lebewesen verfügen über ein Immunsystem, welches im Laufe der Stammesgeschichte komplexer wurde. Schon einfache Organismen besitzen Abwehrmechanismen, die als angeborene (natürliche) Immunabwehr bezeichnet werden. Wirbeltiere entwickelten zusätzlich eine erworbene (adaptive) Immunabwehr. Alle Zellen des Immunsystems stammen von pluripotenten Stammzellen aus dem Knochenmark ab und sind hauptsächlich in den lymphatischen Organen lokalisiert. Zum Teil zirkulieren sie aber auch im Blut und gelangen bis auf wenige Ausnahmen (z.B. ZNS) in alle Gewebe einschließlich der Schleimhäute. Das Immunsystem von Wirbeltieren, und damit auch das des Menschen, besteht also aus der angeborenen und der adaptiven Immunabwehr, die über spezifische Zellpopulationen und Mediatoren miteinander verknüpft sind.

1.1.1 Angeborene Immunantwort

An den Eintrittspforten (Epithelgewebe, Epidermis usw.) für Mikroorganismen sind antigenpräsentierende Zellen (APC), wie Makrophagen (Fresszellen), Monozyten und dendritische Zellen (DC) lokalisiert. Diese Zellen erkennen Bakterien, Pilze und Viren und lösen die angeborene Immunantwort aus. Plasmazytoide DC (PDC) gehören als eine Subgruppe der DC's ebenfalls zu den Zellen der unspezifischen Immunabwehr, indem sie nach Kontakt mit Viren große Mengen Typ I Interferon (α und β) freisetzen, welches zum einen direkte antivirale Wirkung und zum anderen eine immunmodulatorische Wirkung auf Zellen des angeborenen und erworbenen Immunsystems hat (Perussia et al. 1985; Fitzgerald-Bocarsly et al. 1993). APC's lösen nach Aufnahme des Erregers oder einer infizierten körpereigenen Zelle eine Entzündungsreaktion aus, indem sie als Zytokine und Chemokine bezeichnete

Signalstoffe abgeben. Diese Proteine rekrutieren und aktivieren weitere Zellen sowohl aus dem angeborenen Immunsystem, wie Granulozyten und Natürliche Killerzellen (NK), als auch aus dem adaptiven Immunsystem, wie B- und T-Lymphozyten. Um die beschriebenen Reaktionen auszulösen, bedarf es Pathogen-erkennender Rezeptoren, welche als *pattern recognition receptors* (PRR) bezeichnet werden und konservierte Strukturen (PAMPS: *pathogen associated molecular patterns*) der verschiedenen Pathogene erkennen. Die Gene dieser PRRs (z.B. der Toll-like Rezeptoren) sind hoch konserviert, und kommen bereits in primitiven Organismen wie *C. elegans* und *Drosophila melanogaster* vor (Janeway et al. 2005).

1.1.2 Adaptive Immunantwort

Gelingt es dem angeborenen Immunsystem nicht, die Ausbreitung eines Erregers zu verhindern, startet das lernfähige adaptive System einen späteren, dafür hochgradig gezielten Angriff gegen den jeweiligen Mikroorganismus (Janeway et al. 2005). Ein Hauptunterschied zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort liegt in den Rezeptoren, die für die Antigenerkennung nötig sind. T- und B-Lymphozyten des adaptiven Immunsystems tragen auf ihrer Oberfläche Antigen-bindende Rezeptoren, die durch den Mechanismus der somatischen Rekombination und Hypermutation variiert sind (Janeway et al. 2005).

Die B-Zell-Rezeptoren (BCR) reagieren direkt mit dem Antigen und stimulieren die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen, die spezifische lösliche Antikörper sezernieren. Diese Abwehrmoleküle erkennen jeweils nur ihr spezifisches Antigen, d.h. die molekulare Struktur eines ganz bestimmten Erregermoleküls. Sie neutralisieren den Erreger oder markieren ihn als zu zerstörendes Ziel (Medzhitov et al. 2002). Hier zum Beispiel kann der klassische Arm der Komplementkaskade angreifen, welcher einen Teil des angeborenen Immunsystems darstellt, und zur Opsonierung von antikörpermarkierten Erregern oder infizierten Zellen führt (Janeway et al. 2005).

Die Antigen-Rezeptoren der T-Zellen wiederum können ihre Antigene nur erkennen, wenn diese in Form von Peptiden an MHC- (Hauphistokompatibilitätskomplex) Klassen I und II gebunden sind und auf der Zelloberfläche von APC's präsentiert werden. Diese können APC's aus dem

angeborenen Immunsystem sein, aber auch B-Zellen. Bei den T-Zellen unterscheidet man zwei Hauptpopulationen, die T-Helfer Zellen (T_H -Zellen; $CD4+CD3+$) und die zytotoxischen T-Zellen (CTL; $CD8+$, $CD3+$). Eine T_H -Zelle erkennt Antigene die auf MHC II präsentiert werden, und kann durch darauffolgende Stimulierung zur Effektorzelle differenzieren. T_H -Zellen sezernieren verschiedenste Zytokine, wie z.B. $IFN-\gamma$ (T_H1 -Zellen), IL-4 (T_H2 -Zellen) und IL-17 (T_H17 -Zellen) und können so andere Immunzellen, insbesondere B-Lymphozyten und CTL, beeinflussen. CTL hingegen erkennen Antigene, die als Peptide im Kontext mit MHC Klasse I auf der Zelloberfläche präsentiert werden, um diese Zellen dann direkt zu eliminieren (Medzhitov et al. 2002).

Die funktionelle Abhängigkeit zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort zeigt sich vor allem bei der Antigenpräsentation. Neben der Präsentation des Antigens auf der Zelloberfläche der APC (=Signal1), kann die Aktivierung und Differenzierung adaptierter Immunzellen nur durch die Expression kostimulatorischer Moleküle (=Signal2) und inflammatorischer Zytokine (=Signal3) bei der initialen angeborenen Immunantwort erreicht werden. Nach der durch den ersten Antigenkontakt ausgelösten Immunreaktion bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen des adaptiven Systems erhalten, um bei erneutem Kontakt mit dem Antigen binnen kurzer Zeit eine schnelle Abwehrreaktion (z.B. gegen Viren) zu ermöglichen.

1.1.3 Toleranzmechanismen: Selektion von B- und T- Zellen

Die Unterscheidung zwischen fremden und körpereigenen Antigenen ist essentiell, da auch pathologisch veränderte Zellen wie Tumorzellen und virusinfizierte Zellen von Immunzellen erkannt und zerstört werden müssen, ohne dass körpereigenes Gewebe als Antigen erkannt wird und es zu Gewebeschäden kommt. Das Immunsystem besitzt zahlreiche Maßnahmen, um Attacken gegen eigene Zellen vorzubeugen und somit Selbsttoleranz zu erreichen. An erster Stelle sei dahingehend die klonale Selektion genannt, welche für T-Zellen im Thymus und für B-Zellen im Knochenmark stattfindet. Erkennen Lymphozyten körpereigene Antigene, erhalten sie kein Überlebenssignal und gehen in den apoptotischen Zelltod über. Dennoch gelangen potentiell autoreaktive B- und T-Zellen in die Peripherie. Dort gibt es zwar weitere Toleranzmechanismen (Anergie, Deletion),

welche allerdings im Verlauf und bei der Initiierung von Autoimmunerkrankungen versagen können.

1.2 Systemischer Lupus Erythematodes

Der Systemische Lupus Erythematodes (SLE) ist der Prototyp einer Autoimmunerkrankung, bei der verschiedene Faktoren zur Entstehung beitragen. Weltweit erkranken zwischen 20 und 50 Personen pro 100.000 Einwohner an SLE. Auch wenn sich SLE in jedem Lebensalter und sogar im Kindesalter manifestieren kann, tritt die Erstmanifestation jedoch meist im Alter von 20-40 Jahren auf (Hochberg et al. 1985; Michet et al. 1985). Dabei sind überwiegend Frauen betroffen. Europäische Studien zeigen einen weiblichen Anteil von 91% (Cervera et al. 1993). Amerikanische Studien konnten ebenfalls eine klare Dominanz der Frauen mit 88% bestätigen (Johnson et al. 1995). Es scheinen auch bestimmte Bevölkerungsgruppen afro-amerikanischer, afro-karibischer und südamerikanischer Herkunft (Siegel 1973, Ginzler et al. 1982, Gudmundson et al. 1990) empfänglicher für Lupus zu sein. Obwohl in den USA der größte Anteil der afroamerikanischen Bevölkerung ursprünglich aus Westafrika stammt, fällt keine besondere Anfälligkeit der Westafrikaner für SLE auf. Dieser Gegensatz zu den Afroamerikanern lässt daher auch auf exogene Faktoren als Auslöser schliessen (Robson et al. 2001). Kennzeichnend bei der Diagnose des SLE ist das Auftreten von Autoantikörpern, welche gegen Zellkernbestandteile gerichtet sind und als antinukleäre Antikörper (ANA) bezeichnet werden. Diese können gegen dsDNA, Chromatin, Histone, Nucleosomen, Ribonukleoproteine (RNP) und Smith (Sm)-Antigene gerichtet sein. Trotz deutlich verbesserter Langzeit-Überlebensrate leiden mehr als die Hälfte der Betroffenen im Verlauf ihres Lebens unter permanenter Einschränkung der Leistungsfähigkeit eines oder mehrerer Organsysteme. Arthritis und Hautmanifestationen, wie das schmetterlingsförmige Gesichtserythem und starke Sonnenempfindlichkeit sind die häufigsten Symptome. Renale (Glomerulonephritis), hämatologische (Anämie, Leukopenie) und neurologische Funktionsstörungen tragen neben Infektionen und vorzeitiger Arteriosklerose zur Chronizität und Mortalität der Erkrankung bei (Fischer-Betz et al. 2005). Das Vorhandensein hoher Konzentrationen an Typ I IFN im Serum von SLE-Patienten

und die Ansammlung von PDC's in den Hautläsionen, lassen auf eine wichtige Rolle dieser Zellen für den Krankheitsverlauf schließen, da PDC's die Hauptproduzenten von Typ I IFN sind und die Schwere der Erkrankung auch mit der Konzentration an IFN- α im Serum korreliert (Colonna et al. 2004, Banchereau et al. 2004).

1.2.1 Genetische und exogene Ursachen für SLE beim Menschen

In Studien mit eineiigen Zwillingen erkrankten in 24% der Fälle beide Geschwister an SLE, während es bei dizygoten Zwillingen nur 2% waren (Deapen et al. 1992). Dieser Umstand zeigt deutlich, dass genetische aber auch exogene Ursachen bei der Entstehung des SLE eine Rolle spielen. Bei SLE-Patienten und in SLE-Mausmodellen (siehe Abschnitt 1.2.2) konnten auch verschiedene genetische Defekte, die zu vermindertem Abbauvermögen von apoptotischem Material führen, nachgewiesen werden (Gaipl et al. 2005). Dabei handelt es sich beispielsweise um Komplementproteine wie C1q, C4 und C1r/C1s (Slingsby et al. 1996). Das Komplementsystem ist für die Beseitigung von apoptotischem Material und Immunkomplexen wichtig, welche beide zentrale Faktoren im Krankheitsverlauf von SLE sind (Taylor et al. 2000). Auch DNaseI und DNaseII, die für das Beseitigen von Chromatin und DNA verantwortlich sind, gehören in diese Kategorie (Stoll et al. 2000, Shin et al. 2005, Matul'skaia et al. 1986). Bei einigen SLE-Patienten lässt die verminderte *Clearance* von apoptotischem Material und das Ausbleiben der damit verbundenen Sezernierung antiinflammatorischer Zytokine, ebenfalls auf einen genetischen Defekt schließen (Fadok et al. 1998; Manfredi et al. 1998). Erwiesene exogene Faktoren, die alleine oder in Kombination mit genetischer Prädisposition zum Ausbruch von SLE führen können sind UV-Licht, Infektionen mit EBV-Virus (Moon et al. 2004; James et al. 2001) und Pharmaka, wie beispielsweise Hydralazin und Procainamid (Pramatarov et al. 1998). Antikörper gegen Tumor-Nekrose-Faktor-(TNF) α werden zur Therapie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt. Dabei wurde gelegentlich die Bildung von Autoantikörpern, sowie lupusartiger Symptome beobachtet. Zur Induktion von Glomerulonephritiden hingegen kam es selten (Haake et al. 2007). Die intraperitoneale Injektion von Mineralölen (zum Beispiel Pristan, Nacionales et al.

2006) in verschiedene Mausstämme führt ebenso zu SLE-ähnlichen Symptomen in Abwesenheit einer genetisch bedingten Prädisposition.

1.2.2 SLE-Mausmodelle

SLE-anfällige Mausstämme

NZB/NZW-F1: Zu den ältesten SLE-Modellen, welche spontan SLE-Symptome entwickeln, gehört der New Zealand Black (NZB) – Mausstamm. Dieser Mausstamm entwickelt zwar selten Glomerulonephritis, zeigt dafür aber viele immunserologische Kennzeichen, wie B-Zell-Hyperreaktivität und eine gesteigerte Immunglobulin-Produktion (Bielschowsky et al. 1959; Many et al. 1979; Reininger et al. 1996; Jongstra-Bilen et al. 1997). Defekte bei der Regulation des Immunsystems (Talal et al. 1974) und der *Clearance* von apoptotischen B-Zellen (Kozono et al. 1996) sind weitere Merkmale. In genetischen Studien und Kreuzungen mit anderen SLE Mausstämmen, welche teilweise zu einer Verstärkung der Symptome führten, wurden die verantwortlichen *Gen-loci* identifiziert. Beispielsweise werden die Gene *Nba1* und *Nba2* mit der Nephritis und *Sle1* und *Lbw7* mit der Produktion von IgG-Autoantikörpern (IgG-AK) assoziiert (Vyse et al. 1996; Kono et al. 1994 und Mohan et al. 1998).

MRL/lpr: Der MRL Mausstamm erhielt 1976 seinen Namen von seinen Entwicklern Murphy und Roths und gehört zu den wichtigsten SLE-Mausmodellen. Die gesunden MRL-Mäuse besitzen zwar Autoantikörper, entwickeln aber spontan keine Autoimmunkrankheit. Durch die *lpr*-Mutation im *Fas*-Gen allerdings entwickeln die MRL^{*lpr/lpr*}-Mäuse ein starkes, dem SLE ähnliches Krankheitsbild, wie z.B. eine starke Lymphozytenproliferation, hohe Auto-Antikörperproduktion gegen nukleäre Antigene (dsDNA, RNP, Sm-Antigen, RNA), Immunkomplexvaskulitis und schließlich eine schwere Glomerulonephritis. Die histologisch sichtbaren Immunglobulin- und Komplementablagerungen treten im Alter von ca. 10-12 Wochen auf. Das Auftreten einer progredienten Glomerulonephritis mit interstitieller Leukozyteninfiltration, Halbmondbildung, interstitieller Fibrose und Nekrose ist im Alter von 12-14 Wochen zu beobachten (Perez de Lema et al. 2004). Die Erklärung dafür liegt in der *lpr*-Mutation des *Fas*-Gens, welches nach der Lymphoproliferation benannt ist. Der Fas-Rezeptor ist für das Auslösen der Apoptose bei Lymphozyten verantwortlich. Da für die

Beseitigung aktivierter Lymphozyten die Apoptose essentiell ist, erklärt sich, warum der *lpr*-Defekt zu einer übermäßigen Lymphozytenproliferation führt (Stoll et al. 2000).

Mausstamm	Lebensdauer Wochen (Durchschnitt)	Klin. Relev. Auto-AK	Organschädigung
NZB	Männchen: 67 Weibchen: 63	Anti-Erythrozyten Anti-ssDNA Anti-dsDNA (niedrig) NTA	Hämolytische Anämie Milde Glomerulonephritis
(NZB x NZW)F1	Männchen: 58 Weibchen: 35	Anti-dsDNA NTA	Schwere Glomerulonephritis
(SWR x NZB)F1	Männchen: 64 Weibchen: 29	Anti-dsDNA Anti-ssDNA	Schwere Glomerulonephritis
MRL+/+	Männchen: 98 Weibchen: 73	Anti-Sm	Altersbedingte Glomerulonephritis
MRL/lpr	Männchen: 22 Weibchen: 20	Anti-dsDNA Anti-Sm Anti-RNP RF	Schwere Glomerulonephritis Lymphadenopathie Gelenkentzündungen Alopezie, Pneumonitis
BXSB/MP	Männchen: 20 Weibchen: 68	Anti-Erythrozyten Anti-dsDNA Anti-ssDNA Anti-RNP	Hämolytische Anämie Schwere Glomerulonephritis Lymphadenopathie

Tabelle 1.1: Spontane Mausmodelle für SLE (Stoll et al. 2000, Subramian et al. 2006, Pisitkun et al, 2006, Christensen et al. 2006, Pawar et al. 2007). NTA: *natural thymotoxic antibody*; RF: *rheumatoid factor*

BSXS/Mp: Interessant an diesem Mausmodell ist, dass Männchen zu einem viel früheren Zeitpunkt erkranken als die Weibchen (Theofilopoulos et al. 1985; Murphy et al. 1979). Das verantwortliche *yaa*-Gen ist zusätzlich auf dem X-Chromosom lokalisiert (Translokation). In einen autoimmunresistenten Stamm (z.B. C57Bl/6) transferiert, richtet die *yaa*-Translokation nichts an. In SLE-empfindlichen Stämmen hingegen wie NZW bewirkt es eine Verstärkung der Lupuserkrankung (Santiago et al. 1998; Stoll et al. 2000). Mittlerweile ist bekannt, dass *yaa*, da zusätzlich im X-Chromosom vorhanden, zu einer erhöhten Expression einer Reihe x-chromosomaler Gene inklusive des Toll-like Rezeptor 7 (PRR des angeborenen Immunsystems) in BSXS/Mp-Männchen führt (Subramian et al. 2006; Pisitkun et al. 2006). Eine Zusammenstellung aller SLE-empfindlichen Mausstämme wird in der Tab. 1.1 gezeigt.

Transgene Mausmodelle

FcγRIIB^{-/-}: Fc-Rezeptoren für IgGs lösen aktivierende Signale beim Andocken eines Antikörper-Immunkomplexes aus. FcγRIIB inhibiert auf B-Zellen die Aktivierung und Weiterleitung der Signale des BCR und die Zelle wird nicht zur Produktion von weiteren Antikörpern stimuliert. Eine weitere Funktion von FcγRIIB ist die Einleitung der Apoptose bei B-Zellen. Daher entwickeln FcγRIIB-defiziente Mäuse hohe Mengen an IgG-Autoantikörpern und es kommt zu einer Auto-Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis (Bolland et al. 2000).

564 IgG: Dieses Modell wurde entwickelt, um die Bedeutung der Autoantikörper-Bildung durch transgene autoreaktive B-Zellen gezielt zu untersuchen. Transferiert man das *564-IgG*-Gen in nicht anfällige C57Bl/6 Mäuse, zeigen diese Mäuse trotz der in diesem Stamm intakten Anergiemechanismen, eine Auto-Immunkomplex-vermittelte Glomerulonephritis. Die Auto-AK richten sich in diesem Modell gegen RNA, ssDNA und Nukleosomen (Berland et al. 2006).

Pristan-induziertes SLE-Modell

Im diesem Modell wird genetisch nicht prädisponierten Mäusen, wie BALB/c und C57Bl/6, einmalig intraperitoneal Pristan (2,6,10,14-tetramethyl-pentadecan) injiziert (Sato et al. 1995). Aufgrund der durch Pristan herbeigeführten Apoptose der Peritonealzellen werden verschiedenste nukleäre Antigene freigesetzt. Gleichzeitig induziert Pristan eine Entzündung im Bauchraum in Form einer chronisch granulomatösen Peritonitis, welche zur Lymphneogenese am Ort der Entzündung führt. Dieses Phänomen der Neuentstehung lymphatischen Gewebes wurde schon bei einigen Autoimmunerkrankungen beobachtet (Nacionales et al. 2006). Wie im menschlichen Lupus auch, entwickeln Pristan-injizierte Mäuse der Reihe nach Antikörper gegen ssDNA, dsDNA, Sm, snRNP und Su, welche sechs Monate nach Injektion zu einer Auto-Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis führen. Obwohl dieses Modell mit dem medikamenteninduzierten Lupus beim Menschen vergleichbar wäre, entwickeln Pristan-injizierte Mäuse ein weiteres Spektrum an Autoantikörpern und irreversible Organschäden (Calvani et al. 2005).

1.2.3 Dendritische Zellen und ihre Relevanz für SLE

Dendritische Zellen (DC's) gehören zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC's), die eine Schlüsselstellung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem einnehmen. In der Peripherie befinden sie sich meist in unreifem Zustand, exprimieren geringe Mengen an kostimulatorischen Molekülen und zeichnen sich durch eine starke Expression von Endozytose-Rezeptoren aus. Daher sind sie für die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen ideal geeignet. Nach Aufnahme der Antigene wandern DC's zu den T-Zell-Bereichen der lymphatischen Gewebe, wie Milz und Lymphknoten. Die prozessierten Antigene werden dann auf den für APC typischen MHC II Molekülen präsentiert. Reife DC's bilden Fortsätze aus und regulieren die Endozytoseaktivität herunter. Im Gegensatz zu den unreifen DC's tragen sie nun kostimulatorische Moleküle (CD86 und CD40) auf der Zelloberfläche, um mit T-Zellen kommunizieren und sie aktivieren zu können (Banherau et al. 2004; Janeway et al. 2005). Beim Menschen wird unterschieden zwischen den myeloiden DC's (CD11b^{pos} und CD11c^{pos}) und den plasmazytoiden DC's (CD11b^{neg} und CD11c^{neg}). Murine DC's hingegen besitzen ausnahmslos CD11c als Oberflächenmarker und werden in lymphoide CD8 α ^{pos} CD11c^{pos} DC's, myeloide CD8 α ^{neg} CD11c^{pos} DC's und plasmazytoide DC's (PDC's) unterschieden (Shortman et al. 2002).

Die PDC's können sowohl lymphoiden als auch myeloiden Ursprungs sein (Karsunky et al. 2005). Die Oberflächenmarker für PDC's beim Menschen sind CD4, CD45RA, CD123, BDCA-2 und BDCA-4. Trotz vieler funktionaler Gemeinsamkeiten unterscheiden sich humane und murine PDC's im Expressionsprofil bestimmter Oberflächenmarkern (CD123, B220 und CD11c). Im Gegensatz zum Menschen exprimieren alle murinen PDC's CD11c. Ein wesentlicher Unterschied liegt auch in der hohen Expression von B220 (eigentlich ein Marker für B-Zellen) auf murinen PDC's. Der klassische humane PDC-Marker CD123 fehlt den murinen DC's gänzlich (Colonna et al. 2004). Zusätzlich wurden zwei spezifische Oberflächenmarker für murine PDC's identifiziert - Siglec und BST2. PDC's haben die Fähigkeit außerordentlich effektiv gegen Viren vorzugehen, da sowohl humane, als auch murine PDC's überwiegend TLR7 und TLR9 (siehe Tab. 1.3) exprimieren, die virale RNA und DNA erkennen (Hornung et al. 2002). Auf einzelsträngige RNA (TLR7-Ligand) und CpG-DNA (TLR9-Ligand)

reagieren PDC's mit einer massiven Typ I IFN Antwort. PDC's können aufgrund ihrer hohen konstitutiven Expression von Interferonregulierendem Faktor 7 (IRF7) bis zu 100 mal mehr Typ I IFN produzieren als andere Zellen (Theophilopoulos et al. 2005). Die Virusbekämpfung ist sehr effektiv und direkt, da durch die Typ I IFN-Bindung an den ubiquitären IFN- α/β - Rezeptor andere nicht befallene Zellen gegen die Infektion geschützt werden. Dies geschieht indem diese Zellen dann in der Lage sind, Enzyme (PKR: RNA-aktivierte Serin-Threonin-Proteinkinase, OAS: Oligoadenylatzyklase und RNaseL) zu exprimieren, welche die virale Genexpression und Replikation hemmen (Akira et al. 2006). Darüber hinaus kommt es über den IFN- α/β -Rezeptor und den Jak/STAT Signaltransduktionsweg zur Bildung des ISGF3 (IFN *stimulated gene factor3*) Komplexes, welcher wiederum die Bildung von IRF7 induziert und dadurch die Typ I IFN-Antwort steigert. Dieser Mechanismus wird in der Literatur als positiver *feedback-loop* bezeichnet. Außer den Interferonen werden auch die proinflammatorischen Zytokine, wie TNF- α , IL-6 und IL-12 hochreguliert (Krug and Hartmann et al. 2001). Es kommt zur Steigerung der zytotoxischen Aktivität der natürlichen Killer-Zellen durch IFN- α/β und IL-12. NK-Zellen können dadurch vermehrt IFN- γ produzieren und Zielzellen abtöten. Es kommt weiterhin durch IL-6 und IFN- α/β zur Antikörperproduktion über die Stimulierung der Differenzierung von reifen B-Zellen zu Plasmazellen. IL-12 ist in der Lage aktivierte T_H-Zellen zu T_H1-Zellen differenzieren zu lassen. Zudem werden durch PDC's eine Vielzahl an Chemokinen produziert, welche aktivierte CD4^{pos} und CD8^{pos} T-Zellen und Makrophagen zum Ort der Entzündung rekrutieren (Kadowaki et al. 2002; Colonna et al. 2004). Aufgrund der Antigen-präsentierenden Eigenschaften der DC's, sowie der Typ I IFN- und Zytokinsekretion der PDC's werden diese Zellen als Vermittler zwischen natürlichem und adaptivem Immunsystem bezeichnet. Hier könnte auch der Ursprung der Autoimmun-Erkrankung SLE liegen. Die oben beschriebenen Entzündungsreaktionen können, wenn sie wie bei SLE üblich chronisch auftreten, zu enormen Gewebeschädigungen bis hin zum Organversagen führen. In Abbildung 1.1 wird dargestellt, wie es durch die verschiedenen Bestandteile des Immunsystems zur Entwicklung und Verschlechterung einer systemischen Autoimmun-Erkrankung kommen kann. Es ist bekannt, dass Auto-Immunkomplexe B-Zellen zur Proliferation veranlassen können. Dies geschieht sowohl über Anti-

DNA-Antikörper als auch über Anti-RNA-Antikörper, die TLR's aktivieren (Lau et al. 2005). Wie oben beschrieben, können insbesondere PDC's die Plasmazelldifferenzierung solcher autoreaktiver B-Zellen unterstützen.

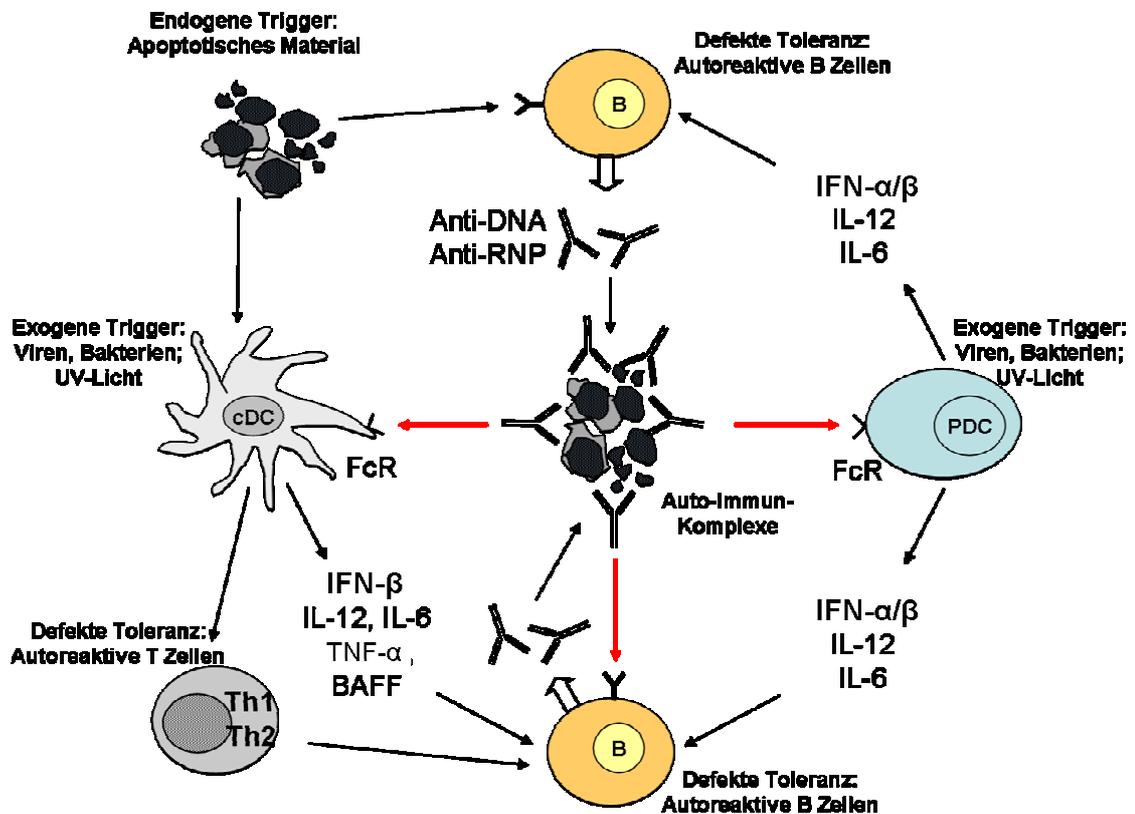


Abbildung 1.1: Beteiligung der DC an der Entwicklung einer Autoimmunantwort. Diese Abbildung zeigt deutlich, dass die Initiation des SLE aus mehreren Richtungen kommen könnte. Ein Defekt in der Beseitigung apoptotischen Materials führt zur vermehrten Aufnahme von Autoantigenen (im Komplex mit endogenen Nukleinsäuren) über APC's wie cDC's und B-Zellen. Im Zusammenhang mit einer Infektion werden DC's beispielsweise zur Produktion von IFN- α , IL-12 und IL-6 aktiviert, welche dazu führt, dass potentiell autoreaktive B-Zellen nach Aufnahme von Autoantigen zur Produktion von Auto-Antikörpern (AK) stimuliert werden. Ausserdem werden so autoreaktive T-Helfer Zellen induziert, die autoreaktive B Zellen positiv stimulieren, anstatt sie zur Deletion zu bringen. IFN- α führt auch zu einer erhöhten Apoptoserate und zur Hochregulation von IRF7. Daher wird die Inflammation durch den positiven *feedback loop* erhalten. Die Auto-AK binden wiederum apoptotisches Material und wirken stimulierend für PDC, cDC's und B-Zellen.

Als Auslöser könnten sowohl endogene Faktoren wie ein gestörte *Clearance* apoptotischer Zellen als auch exogene Trigger wie Viren oder UV-Licht eine Rolle spielen (Abb. 1.1). Insbesondere PDC's nehmen also eine zentrale Stellung bei der Entstehung, Aufrechterhaltung und Verstärkung des SLE ein.

1.2.4 RNP-Antigen

Eines der wichtigsten Kriterien für SLE ist der Nachweis von Autoantikörpern gegen dsDNA, Smith-Protein (Sm-Protein), Phospholipid, und den Ro-Faktor (Hochberg et al. 1997). Als zuverlässigste Marker allerdings gelten dsDNA-Antikörper (70% der Patienten), sowie die für SLE hochspezifischen Sm-Antikörper. Sm-Antikörper werden in maximal 30% der Patienten detektiert und korrelieren mit der Schwere der Krankheit. Das Sm-Antigen besteht aus einer Gruppe von Proteinen (B, B', D1, D2, D3, E, F, G) welche als *Core*-Proteine (Kernbestandteile) der *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP)-Moleküle fungieren (siehe Abbildung 1.2).

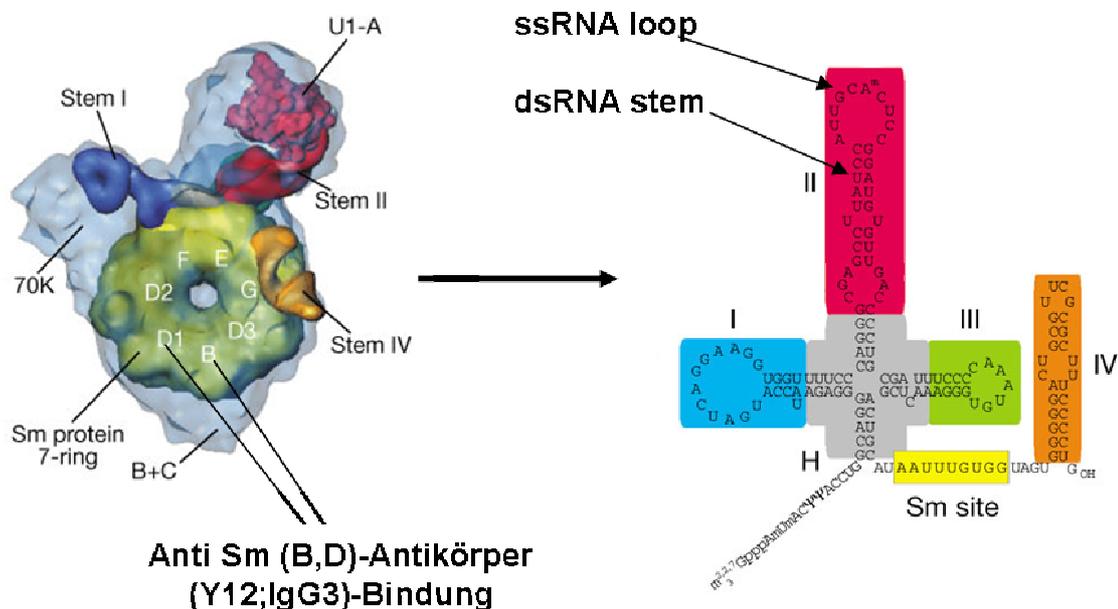


Abbildung 1.2: U1snRNP und U1snRNA (Stark et al. 2001). U1snRNP enthält U1snRNA. Die U1snRNA hat eine charakteristische Sekundär- und Tertiärstruktur mit doppelsträngigen (*stem*) und einzelsträngigen (*loop*) Abschnitten. Das Sm-Antigen besteht aus einer Gruppe von Proteinen (B, B', D1, D2, D3, E, F, G), welche als *Core*-Proteine (Kernbestandteile) der snRNP-Moleküle bezeichnet werden.

Antikörper gegen snRNP findet man zwar in bis zu 47% der SLE Patienten, diese können aber auch andere Autoimmunkrankheiten anzeigen und sind somit weniger spezifisch als Sm-Antigene. *Small nuclear RNP's* bestehen aus Proteinen und U snRNA (U1, 2, 4, 5) und übernehmen zusammen mit anderen Proteinen eine wichtige Rolle beim Spleißvorgang von Prä-mRNA zu mRNA (Migliorini et al.

2005). Nachweisbar sind snRNP's hauptsächlich im Zellkern, werden jedoch auch vereinzelt im Zytosol detektiert (Migliorini et al. 2005). Es ist bekannt, dass Auto-Immunkomplexe, welche Nukleinsäuren in Form von DNA oder RNA enthalten (wie z.B. snRNP), PDC's und autoreaktive B-Zellen zur Synthese von Typ I Interferon und inflammatorischen Zytokinen stimulieren (Lau et al. 2005; Lovgren et al. 2004; Means et al. 2005). U1snRNP ist ein Mitglied aus der RNP-Familie (U1-U8snRNP) und wurde in dieser Arbeit als Adjuvanz oder Ligand verwendet. Die meisten IgG-Antikörper richten sich gegen die Kernproteine D oder B im Sm-Antigen. Der monoklonale Antikörper Y12 (IgG3-Isotyp), der in dieser Arbeit verwendet wurde, richtet sich ebenfalls gegen die D- und B-Coreproteine und stammt aus MRL/Mp^{lpr/lpr}-Hybridomazellen (Bloom et al. 1993; siehe Abb. 1.2).

1.3 Erkennungsrezeptoren für mikrobielle und endogene Nukleinsäuren

1.3.1 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren gehören zu den PRR des angeborenen Immunsystems, den sogenannten Mustererkennungsrezeptoren, welche konservierte, konstitutiv exprimierte Strukturen (PAMPS) von Pathogenen erkennen und eine sofortige Immunantwort auslösen. Eine Vielzahl mikrobieller Agonisten, die in Bakterien, Pilzen oder Viren vorkommen, wurde identifiziert. Exprimiert werden TLR's in Makrophagen, DC's, B-Zellen und auch in Zellen außerhalb des Immunsystems (siehe Tab. 1.2). Die TLR-vermittelte Stimulation von Immunzellen ist wichtig für die sofortige unspezifische Immunantwort und gleichzeitig sind TLR's beteiligt an der Regulation der adaptiven Immunantwort. Durch die rasche Induktion proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, IL-12, Typ I IFN und Chemokine werden Immunzellen des angeborenen und adaptiven Immunsystems aktiviert und rekrutiert. TLR's sind entweder auf der Oberfläche (TLR1,2,4,5,6,10,11) oder endosomal im Inneren der Zelle (TLR3,7,8,9) zu finden. Auch die Signaltransduktion erfolgt über TIR-Domänen-enhaltende Adaptorproteine, wie z.B. MyD88 und TRIF (siehe Abb. 1.3).

TLR	Liganden	Pathogen	Vorkommen
TLR1	OspA	Bakterien und Mykobakterien	Makrophagen, Neutrophile, Mastzellen
TLR2	Lipoproteine Peptidoglykane Zyosan	Bakterien Gram ⁺ -Bakterien Hefen	Makrophagen, Neutrophile, Mastzellen
TLR3	dsRNA	Viren	Makrophagen (Maus), cDC's, Endo/ Epithelzellen
TLR4	LPS GIPL's	Gram ^{neg} -Bakterien Trypanosoma	Makrophagen, cDC's
TLR5	Flagellin	Gram ^{neg} -Bakterien	Monozyten, cDC's, intestinale Epithelzellen
TLR6	MALP2	Mykobakterien	Monozyten, Mastzellen, cDC's, Neutrophile Granulozyten
TLR7	ssRNA Imiquimod Resiquimod (R848) PolyU RNA	RNA-Viren	PDC, Neutrophile und eosinophile Granulozyten
TLR8	ssRNA Resiquimod (R848)	RNA-Viren	PDC, Neutrophile und eosinophile Granulozyten, cDC (CD8 ^{neg})
TLR9	CpG-DNA	DNA-Viren Bakterien	PDC, Neutrophile und eosinophile Granulozyten, NK's, cDC's
TLR10	unbekannt	unbekannt	PDC, B-Zellen
TLR11	Profilin ähnliches Molekül	<i>Toxoplasma gondii</i>	Makrophagen, Epithelzellen

Tabelle 1.2: Humane und murine Toll-like Rezeptoren, ihre Verteilung und ihre Liganden (Lee et al. 2007) cDC: *conventional dendritic cells*; GIPL: *Glycoinositolphospholipids*; LPS: *lipopolysaccharide*; MALP2: *macrophage-activating lipopeptide*; PDC: *plasmacytoid dendritic cells*; TLR: *Toll-like receptors*.

1.3.2 Signaltransduktion von Nukleinsäuresensoren

Neuere Studien belegen, dass nicht nur TLR's als PRR's in der Erkennung von RNA und DNA aus Pathogenen und Autoantigenen eine Rolle spielen, sondern auch die zytosolischen Erkennungsrezeptoren MDA5 und RIG-I, welche dsRNA von Viren erkennen und ebenfalls zur Induktion von Zytokinen führen können (Baccala et al. 2007). Die Signalstrandsduktionswege dieser zytosolischen Nukleinsäuresensoren und der für SLE relevanten TLR's werden in Abbildung 1.3 veranschaulicht. TLR9 erkennt synthetische CpG-Oligonukleotide ebenso, wie nicht methylierte CpG Sequenzen, wie sie in bakterieller oder viraler DNA vorkommen. In seiner Funktion als PRR erkennt TLR7 die ssRNA von Viren z.B VSV (vesicular stomatitis virus), HIV und Influenzavirus. TLR7-Liganden können

auch synthetische ssRNA, wie PolyU oder synthetische Nucleosidanaloga wie Resiquimod und Imiquimod sein. Resiquimod dient beim Menschen auch als Ligand für TLR8, welches nur im Menschen funktionell zu sein scheint (Lee et al. 2007, Naik et al. 2005; Edwards et al. 2003).

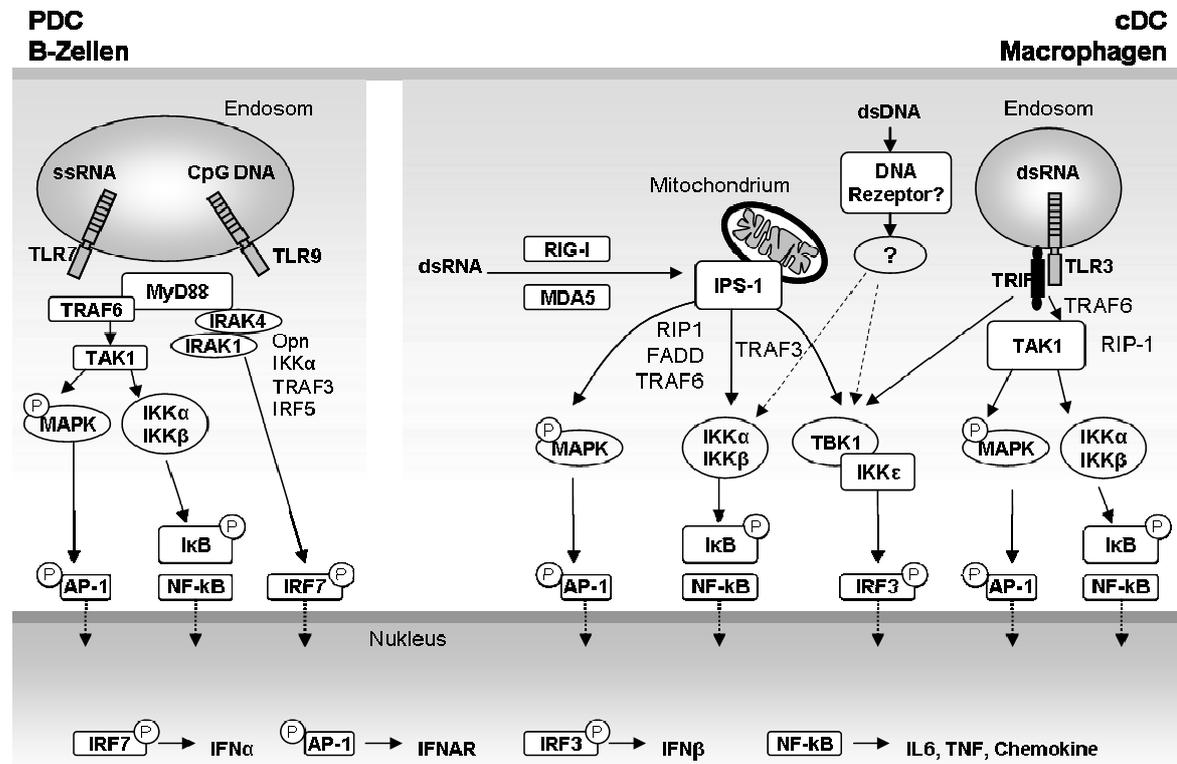


Abbildung 1.3: TLR abhängige und unabhängige Induktion von Zytokinen. Abbildung adaptiert und erweitert (Lee et al. 2007 und Baccala et al. 2007). AP-1: activator protein 1, IKK: IκB kinase, IRAK: IL-1Receptor associated kinase, IRF: interferon regulatory factor, IPS-1: IFN-β promoter signalling protein 1, MDA5: Melanoma differentiation associated protein 5, Caspase recruiting domain (CARD) domain helicases MAPK: mitogen activated protein kinase, NF-κB: nuclear factor κB, RIG-I: Retinoic acid inducible gene 1 protein, caspase recruiting domain (CARD) domain helicases, RIP1: receptor interacting protein 1, TAK1: TGF-β activated kinase 1, TBK1: TANK-binding kinase, TRAF: TNF receptor associated factor 6, TRIF: TIR (Toll/IL-1 Receptor domain)- domain containing adaptor inducing IFN-β

TLR7 und TLR9 werden verstärkt in PDC's exprimiert, welche maßgeblich nach Erkennung viraler oder bakterieller Nucleinsäuren für die Produktion von Typ I IFN verantwortlich sind. Im Gegensatz dazu wird TLR3 nicht in PDC's, jedoch in konventionellen DC's exprimiert (siehe Tab. 1.3) und erkennt dsRNA. Als Transmembranproteine besitzen TLR's einen leucinreichen (LRR's) extrazellulären (bzw. intraendosomalen) Teil und einen zytoplasmatischen Teil, der aufgrund seiner Homologie zur IL-1 Rezeptorfamilie, Toll/IL-1 Rezeptor (TIR)-Domäne

genannt wird. Diese TIR-Domäne rekrutiert Adapterproteine (MyD88, TRIF), welche ebenfalls eine TIR-Domäne besitzen. Durch TIR-TIR-Interaktion werden weitere Signalkaskaden in Gang gesetzt. Beim MyD88-abhängigen Signalweg rekrutiert die TIR-Assoziation von TLR7 oder 9 direkt Moleküle der IRAK-Familie. Die Phosphorylierung von IRAK1 löst die Interaktion mit TRAF6 aus. Schließlich führt der Komplex aus MyD88; IRAK1, IRAK4 und TRAF6 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF7 und möglicherweise IRF5, welche zur Induktion von Typ I Interferonen führen (Baccala et al. 2007). Dieser Komplex (MyD88, IRAK4, IRAK1, TRAF6) führt außerdem über den sogenannten *canonical* Signalweg (TAK1, IKK α + β , I κ B oder MAPK) zur Aktivierung von AP-1 und NF κ B, welches zur Expression proinflammatorischer Zytokine (IL-6, IL-12, TNF- α) führen kann. Die TIR-TIR-Interaktion von TRIF und TLR3 rekrutiert TBK1, welche den Transkriptionsfaktor IRF3 und die Typ I IFN-Expression aktiviert. Der andere Weg von TLR3 aus führt über die Assoziation mit TRAF6 und RIP1 zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF κ B und AP-1 (Abb.1.3; Lee et al. 2007). Da RNA-Viren (z.B. *Sendai Virus*, *Newcastle Disease Virus*) auch direkt ins Zytoplasma eindringen können und sich während der Replikationsphase eines Virus dsRNA im Zytoplasma befindet, reichen endosomale Toll-like Rezeptoren für die Erkennung fremder Nukleinsäuren alleine nicht aus. RIG-I und MDA5 sind in ihrer Funktion als intrazytoplasmatische RNA-Helikasen verantwortlich für die Erkennung von dsRNA solcher Viren (Yoneyama et al. 2004; Meylan et al. 2006). Das Erkennen der dsRNA im Zytoplasma führt zur Assoziierung an das am Mitochondrium gebundene IPS-1 (andere Namen sind: MAVS, VISA oder CARDIF). Diese Interaktion wiederum führt über die oben und in der Abbildung 1.3 beschriebenen Signalwege zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren IRF3 (führt zur Expression von IFN- β), NF κ B und AP-1.

Einer der Hauptunterschiede zwischen TLR's und zytosolischen Nukleinsäure-Sensoren liegt in der Lokalisierung der Expression (Abb.1.3). Beispielsweise sind TLR7 und 9 hauptsächlich in PDC's zu finden, während die RNA-Helikasen (RIG-I, MDA5) in den meisten Zellen, auch in Fibroblasten und konventionellen dendritischen Zellen exprimiert sind (Baccala et al. 2007; Kato et al. 2005).

1.3.3 Mögliche Bedeutung von TLR3/7/8/9 für SLE

Endogene Nukleinsäuren spielen eine Schlüsselrolle bei der Entwicklung der Autoimmunkrankheit SLE. Im Speziellen stehen daher auch TLR's in dendritischen Zellen im Mittelpunkt, da diese als Vermittler zwischen angeborener und adaptiver Immunantwort gelten. Die Verteilung der Nukleinsäure-erkennenden TLR's (3, 7, 8, 9) in den DC-Subgruppen bei Mensch und Maus wird aus Tabelle 1.3 ersichtlich (Naik et al. 2005).

Maus DC	TLR3	TLR7	TLR8	TLR9
Naik et al. 2005				
Milz PDC	neg	+++		+++
Milz cDC CD24 ⁺⁺ CD8α ⁺⁺	++	neg		+
Milz cDC CD11b ⁺⁺ CD8α ^{neg}	neg	+		++
FL-PDC	neg	++		+++
FL-cDC (CD24 ⁺⁺ CD8α ⁺⁺)	+++	neg		++
FL-cDC (CD11b ⁺⁺ CD8α ^{neg})	neg	++		++

Mensch DC	TLR3	TLR7	TLR8	TLR9
Krug et al. 2001				
Blut PDC	neg	+	n. det.	+
Blut cDC	+	+	n. det.	neg
Flacher et al. 2006				
Blut PDC	niedrig	+++	niedrig	+++
Blut cDC	++	++	++	niedrig

Tabelle 1.3: TLR-Expression in den verschiedenen DC-Subtypen von Mensch und Maus FLDC: Kultur aus Knochenmarkszellen mit Flt3-Ligand (*fms-like tyrosine kinase 3 ligand*) erlaubt die *in vitro*-Generation plasmazytoider dendritischer Zellen (PDC) und konventioneller dendritischer Zellen (cDC), welche sich wiederum durch ihre Oberflächenmarker CD8α, CD24 und CD11b in weitere Subgruppen unterteilen lassen.

Es ist bekannt, dass Auto-Immunkomplexe im Serum von SLE-Patienten und von SLE-anfälligen Mausstämmen, PDC und B-Zellen, die ebenso wie PDC's TLR7 und TLR9 exprimieren, zur Induktion von Typ I IFN und inflammatorischen Zytokinen aktivieren. Diese Auto-Immunkomplexe bestehen aus Anti-DNA-, Anti-RNP- und Anti-Chromatin-Antikörpern und werden über Fc-Rezeptoren internalisiert (Lau et al. 2005, Marshak-Rothstein et al. 2006). Wie in unabhängigen Arbeiten belegt wurde, kommt die entscheidende Stimulation von

Anti-Chromatin-Immunkomplexen durch die Wirkung der DNA und nicht so sehr durch die Signaltransduktion über den Fc-Rezeptor zustande. (Banchereau et al. 2004; Lovgren et al. 2004; Ronblonn et al. 2003; Boule et al. 2004). Daher liegt die Vermutung nahe, dass Nukleinsäuren tatsächlich die stimulatorischen Bestandteile in RNP-enhaltenden Immunkomplexen sind. TLR3 und 7 (TLR8 beim Menschen) spielen dabei möglicherweise eine Schlüsselrolle, da die Aktivierung durch Auto-Immunkomplexe einer Internalisierung über Fc-Rezeptoren ins Endosom bedarf. Darüber hinaus weist die therapeutische Wirksamkeit von Chloroquin durch Hemmung der endosomalen Azidifizierung, die für die Aktivierung von TLR7 und TLR9 notwendig ist, bei SLE und rheumatoider Arthritis auf eine essentielle Funktion von TLR9 und TLR7 (Neubauer et al. 2004) hin. Wie oben erwähnt, verstärkt die Überexpression von TLR7 die Krankheits Symptome im SLE-Mausmodell BSXS/Mp (Stoll et al. 2000). Daher könnte TLR7 ein interessantes Ziel für zukünftige Therapien gegen SLE darstellen. Es kommt je nach Zelltyp durch die TLR7-Aktivierung zur Induktion von Typ I IFN, proinflammatorischen Zytokinen (IL-12p40, IL-6) und Chemokinen. Da in einer Autoimmunkrankheit wie dem SLE die Auslöser, wie beispielsweise apoptotisches Material, bestehen bleiben und durch IFN- α noch vermehrt werden können, kommt es durch die permanente chronische Entzündung und die Ablagerung von Immunkomplexen zu Gewebeschädigungen wie Pneumonitis oder Glomerulonephritis.

1.4 Ziele der Arbeit

Wie *in vitro* gezeigt wurde, können Nukleinsäure-enhaltende Immunkomplexe murine B-Zellen und humane plasmazytoide DC's (Hauptproduzenten von Typ I IFN), welche zur Entwicklung einer fortgeschrittenen Krankheitsentwicklung bei Lupus beitragen, aktivieren. Typ I Interferon (IFN- α/β), welches *in vitro* in diesen Versuchen induziert wurde, wird bei den meisten SLE-Patienten in hohen Mengen gefunden (Bave et al. 2000; Lovgren et al. 2004; Leadbetter et al. 2002). Die TLR9-vermittelte Aktivierung von B-Zellen und DC's mit DNA-Immunkomplexen aus SLE-Seren räumt den TLR's eine zentrale Stellung für den Krankheitsverlauf ein (Boule et al. 2004; Yasuda et al. 2005). Die Ronblonn-Gruppe fand außerdem, dass die IFN- α -Induktion durch Auto-Immunkomplexe (erzeugt aus

nekrotischem Zellmaterial und IgG aus SLE-Seren) nach RNase-Behandlung des nekrotischen Materials vermindert war (Lovgren et al. 2004).

Aufgrund der Tatsache, dass snRNP (U1snRNP im Besonderen) neben dsDNA eines der wichtigsten Autoantigene bei SLE darstellt, war ein Ziel dieser Arbeit das stimulatorische Potential von U1snRNP in PDC's und cDC's zu testen. Da dieses Autoantigen RNA enthält, stellte sich die Frage, ob auch in diesem Fall die Stimulation über TLR's verläuft und wenn ja über welche TLR's. Aufgrund der verschiedenen Abschnitte der U1snRNA (*dsRNA/Stem* und *ssRNA/Loop*; siehe 1.2.3) kommen sowohl TLR3 als auch TLR7 als Erkennungsrezeptoren in Frage.

Der SLE-anfällige Mausstamm BSXS/Mp zeigt ebenfalls die wohl zentrale Stellung von TLR7, da das zum X-Chromosom translozierte Y-Chromosom Gen *yaa* in Männchen durch die vermehrte Expression von TLR7 zu starken SLE-Symptomen und zum frühen Tod führt. Die Übertragung dieses *yaa*-Genes in nicht anfällige Mausstämmen führt zu erhöhter Anti-snRNP Antikörper-Produktion (Pisitkun et al. 2006; Subramanian et al. 2006).

Eine weitere Frage, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden sollte, war, inwieweit TLR7 zur Auto-Antikörperproduktion und zur Entstehung SLE-typischer Krankheitssymptome *in vivo* beiträgt. Dabei wurde besonderes Augenmerk darauf gelegt, Ergebnisse unabhängig von der genetisch bedingten Anfälligkeit für SLE zu erzielen. Hierzu eignete sich das Pristan-induzierte SLE-Modell, welches in WT-C57Bl/6 und TLR7-defizienten C57Bl/6 Mäusen angewendet wurde (Calvani et al. 2005).

2 Material

2.1 Zelllinien

Bezeichnung	Organismus	Morphologie
Y12	<i>Mus musculus (Maus)</i>	Hybridomazellen
7.13	<i>Mus musculus (Maus)</i>	Hybridomazellen
L-929	<i>Mus musculus (Maus)</i>	Fibroblasten

2.2 Reagenzien

2.2.1 Zellkulturreagenzien

Bezeichnung	Herkunft
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
EDTA	Fluka, Seelze (D)
FBS low IgG	Biochrom, Berlin (D)
Flt3-Ligand	R&D Systems, Wiesbaden (D)
Glutamax 100x (200 mM)	Gibco, Karlsruhe (D)
H ₂ O Ultra Pure	Biochrom, Berlin (D)
HEPES	Gibco, Karlsruhe (D)
Kristall-Violett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
β-Mercaptoethanol (14,3 M)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Natriumpyruvat 100mM	PAA, Cölbe (D)
Non-essential Amino Acids (100x)	PAA, Cölbe (D)
PBS	PAA, Cölbe (D)
Penicillin-Streptomycin	PAA, Cölbe (D)
PolyI:C (2 mg/mL in 0,09 %NaCl-Lsg.)	Amersham, Piscataway (USA)
Red Cell Lysis Buffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
RPMI 1640	PAA, Cölbe (D)
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Cölbe (D)

2.2.2 Weitere Reagenzien

Bezeichnung	Herkunft
ABTS (ELISA-Substrat)	Roche, Basel (CH)
BSA (Fraktion V pH = 7,0)	Serva, Heidelberg (D)

Chloroform	Roth, Karlsruhe (D)
DAPI	Linaris GmbH, Wertheim-Bettingen (D)
DOTAP	Roth, Karlsruhe (D)
H ₂ SO ₄ 2 N	Roth, Karlsruhe (D)
HCl 1 N und HCl 6 N	Merck, Darmstadt (D)
Histofix (4% Formalin)	Roth, Karlsruhe (D)
Natriumhydroxid (5 M)	Merck, Darmstadt (D)
OCT	Tissue Tec, Sakura, Zoeterwoude (NL)
Pristan (2,6,10,14-tetramethylpentadecane)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
RNaseA	Sigma, Deisenhofen (D)
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Natriumchlorid	Fluka, Seelze (D)
Sodium dodecyl sulphate (SDS)	Fluka, Seelze (D)
TMB-Substrat-Lsg (A+B)	BD Biosciences, Franklin Lakes (USA)
Tris	Roth, Karlsruhe (D)
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen (D)
Zitronensäure	Roth, Karlsruhe (D)

2.2.3 Stimuli

Bezeichnung	Herkunft
CpG 1668 (50 µM)	MWG-Biotech, Ebersberg (D)
CpG 2216 (50 µM)	MWG-Biotech, Ebersberg (D)
IFN-β recombinant murin	PBL, Piscataway (USA)
LPS	Amersham, Piscataway (USA)
PolyU	Amersham, Piscataway (USA)
PolyI:C	Amersham, Piscataway (USA)
U1snRNA	Aufgereinigt aus U1snRNP und zur Verfügung gestellt von Prof. B. Kastner, Göttingen (D)
U1snRNP	AROTEC, Wellington (NZ)
U1snRNA-ODNs	Curevac, Tübingen (D)
R-848	InvivoGen, Toulouse (FR)

2.2.4 Verwendete Kits

Bezeichnung	Herkunft
ANA-HEp-2-Kit	Biosystems S.A., Barcelona (ES)
mIFN-α-ELISA-Kit	PBL, Piscataway (USA)
Mouse IgG (IgG1-IgG3) Quantitation Kits	BETHYL Laboratories Inc. (USA)

2.3 Antikörper und Zytokine

2.3.1 Antikörper und Sekundärfarbstoffe für Durchflusszytometrie und Immunfluoreszenz

Name	Fluoreszenz	Herkunft
Anti-B220	PE /APC	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD11c	FITC/PE/APC	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD11b	FITC/PE/APC	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD86	PE	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD3ε	PE/FITC	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD4	FITC/PE	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD8	PE	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-BST2	FITC	120G8-Hybridomazellen (Asselin-Paturel et al. 2003)
Anti-Siglec	Biotin	440c-Hybridomazellen (Blasius et al. 2004)
Anti-CD69	PE	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD44	PE	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD19	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-CD25	FITC	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Streptavidin-APC	APC	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
Anti-Maus IgG	FITC	J. ImmunoResearch Lab., Baltimore (USA)
Anti-Maus C3c	FITC	Nordic Imm. Lab., Tilburg (NL)

Anti-SiglecH- und Anti-BST2-Antikörper wurden aus 440c- respektive 120G8-Hybridomaüberständen gewonnen. Bis auf wenige Ausnahmen wurden die FACS-Antikörper in einer Endkonzentration von 1-5µg/mL eingesetzt. In abweichender Endkonzentration wurden eingesetzt: Anti-CD11b-PE (500ng/mL), Anti-BST2-FITC (1:400) und Anti-SiglecH-Biotin (100ng/mL).

2.3.2 Antikörper und rec. Zytokine für die Verwendung im ELISA

Antikörper und Zytokine	Spezies	Herkunft
IFNα		
Anti-Maus IFN α (Primär-AK)- RMMA-1	Ratte	PBL, Piscataway (USA)
Anti-Maus IFN α (Sekundär-AK)-polyklonal	Kaninchen	PBL, Piscataway (USA)
IFN α rekombinant, murin		Hycult, Uden, PBL
IL-6		
Anti Maus IL-6 (Primär-AK)	Ratte	Alles von:
Anti Maus IL-6 (Detektions-AK)-Biotin	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
IL-6 rekombinant, murin		
IL-12p40		
Anti Maus IL-12p40/p70 (Primär-AK)	Ratte	Alles von:
Anti Maus IL-12p40/p70 (Detektions-AK)-Biotin	Ratte	BD Pharmingen, Heidelberg (D)
IL-12p40 rekombinant, murin		
Donkey Anti-Rabbit HRP	Esel	JacksonImmuneResearch Cambridgeshire (GB)
Streptavidin-HRP		Amersham, Piscataway (USA)

2.4 Molekularbiologische Reagenzien

2.4.1 Reagenzien

Bezeichnung	Herkunft
1 kb DNA ladder	NEB, Frankfurt (D)
100 bp DNA ladder	NEB, Frankfurt (D)
10x DNase I Puffer	Ambion, Darmstadt (D)
10x PCR Puffer	Invitrogen, Karlsruhe (D)
10x Puffer EcoRI	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
5x FS Puffer	Gibco, Karlsruhe (D)
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe (D)
Chloroform	Merck, Darmstadt (D)
DNase I (2U/ μ L)	Ambion, Darmstadt (D)
dNTPs	Promega, Mannheim (D)
DTT 0,1 M	Gibco, Karlsruhe (D)
EcoRI (10 U/ μ L)	Fermentas, St. Leon-Rot (D)

EDTA (0.5 M)	Gibco, Karlsruhe (D)
Ethanol (100 %)	Merck, Darmstadt (D)
Ethidiumbromid (10 mg/mL)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
GlycoBlue (15mg/mL)	Ambion, Darmstadt (D)
H ₂ O ultra pure DNase + RNase frei	Gibco, Karlsruhe (D)
Isopropanol	Merck, Darmstadt (D)
MgCl ₂ (50 mM)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
Oligo (dT) ₁₅	Promega, Mannheim (D)
Orange G 6x	Fermentas, St. Leon-Rot (D)
RNase OUT® (40 U/μL)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
SuperScript II reverse Transcriptase™ (200 U/μL)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
Taqman Universal Mastermix, No Ung	Applied Biosystems, Darmstadt (D)
Taq DNA Polymerase (5U/μL)	Inivitrogen, Karlsruhe (D)
TRIZOL Reagent	Inivitrogen, Karlsruhe (D)

2.4.2 Primer für PCR und RT-PCR

PCR Primer	Sequenz
βActin +	5'-GGA GAA GAG CTA TGA GCT GCC T-3'
βActin -	5'-GTG GTA CCA CCA GAC AAC ACT-3'

RT-PCR Primer	Sequenz
βActin +	5'-CGT GAA AAG ATG ACC CAG ATC-3'
βActin -	5'-CAC AGC CTG GAT GGC TAC GT -3'
βActin- <i>probe</i>	6-FAM 5'-TTT GAG ACC TTC AAC ACC CCA GCC A -3'-TAMRA
IL-6 +	5'-ACA AGT CGG AGG CTT AAT TAC ACA T-3'
IL-6 -	5'-TTG CCA TTG CAC AAC TCT TTT C-3'
IL-6- <i>probe</i>	6-FAM 5'-TTC TCT GGG AAA TCG TGG AAA CCA-3'-TAMRA
IL-12p40+	5'-CTA CAG CAC CAG CTT CTT CAT CA-3'
IL-12p40 -	5'-TCA AAG GCT TCA TCT GCA AGT TC-3'
IL-12p40- <i>probe</i>	6-FAM- 5'-CAT CAT CAA ACC AGA CCC GCC CA-3'-TAMRA
IL-12p35+	5'-ACT AGA GAG ACT TCT TCC ACA ACA AGA G-3'
IL-12p35 -	5'- GCA CAG GGT CAT CAA AGAG C-3'
IL-12p35- <i>probe</i>	6-FAM 5'- -AGC TGC CTG CCC CCA CAG AAG A-3'-TAMRA
GATA3+	5'-AAG GCA TCC AGA CCC GAA A -3'
GATA3-	5'-AGC GCG TCA TGC ACC TTT-3'
GATA3- <i>probe</i>	6-FAM 5'-CGG AAG ATG TCT AGC AAA TCG AAA AAG TGC-3'-TAMRA
Foxp3+	5'-TTC GAG GAG CCA GAA GAG TTT C -3'
Foxp3-	5'-GGG CCT TGC CTT TCT CAT C-3'
Foxp3- <i>probe</i>	6-FAM 5'-CAA GCA CTG CCA AGC AGA TCA TCT TCT CCT-3'-TAMRA

Alle in der Tabelle aufgeführten Primer wurden von MWG-Biotech AG (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Mit freundlicher Unterstützung von Dr. Roland Rad wurden Primer für die quantitative RT-PCR zur Verfügung gestellt. Für Genexpressionsstudien von IFI-204, T-bet und BAFF wurden Primer in Form eines fertigen RT-PCR Ansatzes von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) eingesetzt. Im *Taqman Gene Expression Assay* wurden neben den beiden Primern auch sequenzspezifische Proben, die mit einem Reporterfarbstoff und einem Quencher konjugiert sind, verwendet. Normalisiert wurde mit HPRT (für IFI-204, T-bet und BAFF), β Actin (für IL-6, IL-12p35, IL-12p40, GATA3 und Foxp3) und Cyclophilin-A (zur Messung der IRF7- und TLR7-mRNA in FLDC's nach Stimulation mit IFN- β).

2.5 Zellkulturmedien

DC-Vollmedium	RPMI 1640 10% (v/v) FBS 100 U Penicillin G 200 μ g/mL Streptomycin 2mM L-Glutamin 1mM Natriumpyruvat 1% (v/v) NEAA 0,5% mM β -Mercaptoethanol
L929-Medium	RPMI 1640 10% (v/v) FBS 100 U Penicillin G 200 μ g/mL Streptomycin 2mM L-Glutamin 1mM Natriumpyruvat 1% (v/v) NEAA
Hybridoma Medium	RPMI 1640 3% (v/v) FBS <i>low IgG</i> 100 U Penicillin G 200 μ g/mL Streptomycin 2mM L-Glutamin 1mM Natriumpyruvat 1% (v/v) NEAA 0,5% mM β -Mercaptoethanol

Einfríermedium	75% (v/v) FBS 10% (v/v) DMSO 15% (v/v) Zellspez. Kulturmedium
Spúlmedium	RPMI 1640 5% (v/v) FBS
Trypsin EDTA	Gebrauchsfertig von PAA: 0,5mg/mL Trypsin 0,22mg/mL EDTA PBS ohne Ca ²⁺ - und Mg ²⁺ -Ionen
Erythrozytenlyse	8,3g/L NH ₄ Cl und 0,01M Tris-HCl

2.6 Puffer und Lösungen

Es wurde wenn nicht anders angegeben, Ca²⁺- und Mg²⁺- freies PBS und destilliertes Wasser verwendet, welches über die Apotheke des Klinikums Rechts der Isar bezogen wurde.

2.6.1 Puffer zur Aufreinigung von IgG aus Hybridoma-Überstand

Bindepuffer	PBS (steril) pH = 7,4
Elutionspuffer	0,1M Zitronensäure pH = 3,5
Waschpuffer	0,1M Zitronensäure pH = 2,1
Neutralisationspuffer	1M Tris pH = 9,0

2.6.2 ELISA-Puffer zur Detektion von Zytokinen und Anti-snRNP-AK

Beschichtungspuffer	0,1M Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ ph = 9 Oder PBS
Blockpuffer	PBS 10% (v/v) FBS

Verdünnungspuffer	PBS 10% (v/v) FBS 0,05% (v/v) Tween 20
ELISA- Waschpuffer	PBS 0,05% (v/v) Tween 20
ELISA ABTS-Substrat	0,1M Zitronensäure pH = 4 0,02% (v/v) ABTS (50mg/mL) 0,03% H ₂ O ₂
Stopplösung	1% SDS

2.6.3 ELISA Puffer zur Detektion von Anti-dsDNA-Antikörpern

Beschichtungspuffer für dsDNA	PBS (steril)
Blockpuffer	PBS 0,5% (v/v) BSA 0,05% Tween 20
Waschpuffer	PBS (steril)
Verdünnungspuffer	PBS (steril) 0,5% (v/v) BSA 0,05% Tween 20
ABTS-Substrat	0,1M Zitronensäure pH = 4 0,02% (v/v) ABTS (50mg/mL) 0,03% H ₂ O ₂
Stopplösung	1% SDS

2.6.4 ELISA Puffer zur IgG Isotypisierung

Beschichtungspuffer	0,05M Carbonat-Bicarbonat pH = 9,6
Waschpuffer	50mM Tris 0,14M NaCl 0,05% Tween 20 pH = 8

Blockpuffer	50mM Tris 0,14M NaCl 1% BSA pH = 8
Verdünnungspuffer	50mM Tris 0,14M NaCl 1% BSA, 0,05% Tween 20 pH = 8
TMB (A+B)	1(A):1(B)
Stoplösung	2M H ₂ SO ₄

2.6.5 Sonstige Puffer und Lösungen

FACS-Puffer	PBS 2% (v/v) FBS 0,01% (v/v) NaN ₃
Histofix	4% Formalin
50x TAE-Puffer	2M Tris 100mM EDTA 5,71% (v/v) Essigsäure (100%) pH 8,5
Kristall Violettlösung	0,5% (w/v) Kristall Violett 0,8% (w/v) NaCl 5% (v/v) Formaldehyd 50% (v/v) Ethanol (100%)
Propidiumiodidlösung	200µg/mL in PBS

3 Methoden

3.1 Tierhaltung und tierexperimentelle Methoden

WT C57BL/6-Mäuse wurden entweder von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) und Harlan Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen und vor Versuchsbeginn sieben Tage zur Gewöhnung im konventionellen oder nach SPF-Standard gestalteten Tierstall gehalten. TLR7^{-/-}- und TLR3^{-/-}-Mäuse mit C57BL/6-Hintergrund stammen ursprünglich vom *Research Institute for Microbial Diseases* (Osaka, Japan). Mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Shizuo Akira konnten TLR7^{-/-}-Mäuse in unseren Tierställen weitergezüchtet werden. Die Haltung der Mäuse und die Tierversuche erfolgten entsprechend der geltenden Tierversuchs-Bestimmungen. Knochenmark von FcγR^{-/-}- und FcγRII/III^{-/-}-Mäusen wurde mit freundlicher Unterstützung von Prof. Dr. J. S. Verbeek (*Medical Center, Department of Human Genetics, Leiden University, Niederlande*) zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Blutentnahme und Euthanasie bei Mäusen

Die Blutentnahme an lebenden Mäusen erfolgte gemäß den tierschutzrechtlichen Bestimmungen. Zunächst wurde die Maus mit der Hand fixiert. Daraufhin wurde das Hinterbein rasiert und anschließend mit Vaseline eingecremt, um ein Verlaufen des Blutes in das umliegende Fell zu verhindern. Anschließend wurde die *vena saphena lateralis* punktiert und das Blut aufgefangen. Dies geschah zur Zellanalyse in ein mit Heparin benetztes Eppendorfgefäß. Zur Gewinnung von Serum wurde das Blut in Serumröhrchen gesammelt und nach der Gerinnung zentrifugiert. Der Serumüberstand wurde bis zur Analyse bei -20°C aufbewahrt. Postmortal wurde das Blut nach Durchtrennung der *vena cava inferior* aus dem Thorax entnommen. Die Mäuse wurden zur Gewinnung von primären Zellen, Geweben oder am Ende eines Versuchs mit CO₂ oder durch zervikale Dislokation getötet.

3.1.2 Intravenöse Injektionsexperimente *in vivo*

Vor Injektion wurden die Mäuse zur Erhöhung ihrer Körpertemperatur Infrarotlicht ausgesetzt. So konnte die *ventrale* Schwanzvene leichter gesehen und die Kanüle besser eingeführt werden. Injiziert wurden U1snRNP/DOTAP, DOTAP, U1snRNP/Y12 (anti-Sm-Antikörper), der TLR7-Ligand PolyU, der TLR9-Ligand CpG und U1snRNA-Oligonukleotide in verschiedenen Konzentrationen. Das Injektionsvolumen betrug gemäß den Tierschutzrichtlinien für eine 35g schwere Maus maximal 200µL. In diesen Kurzzeitexperimenten wurden der Maus, durch Punktion der *vena saphena lateralis* zu verschiedenen Analysezeitpunkten, 3 x 50µL Blut innerhalb von 6 Stunden entnommen. Meistens wurden der Maus nach spätestens der zweiten Blutentnahme 300µL PBS intraperitoneal zum Flüssigkeitsausgleich gespritzt. Postmortal wurde aus dem Thorax letztmalig Blut entnommen. Die Seren aus allen Proben wurden auf Zytokine (ELISA) oder Typ I IFN (ELISA, Bioassay) untersucht.

3.1.3 Pristan-induziertes SLE-Modell der Maus

12 Wochen alten WT C57BL/6 (n=14 Weibchen)- und TLR7^{-/-} (n=14; 4 Männchen, 10 Weibchen)-Mäusen wurde Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadecan) intraperitoneal injiziert. Anschließend wurden die Mäuse alle 2 Wochen gewogen und ihr Gesundheitszustand überprüft. Zur Gewinnung von Serum wurde ihnen alle 4-8 Wochen Blut (50-150µL) entnommen. Nach 7 Monaten wurde das Experiment für weitere Untersuchungen abgebrochen. Zur Antikörper-, Zytokin- und Typ I IFN-Analyse (ELISA, L929-Bioassay) wurde postmortal Blut entnommen und das Serum durch Gerinnung und Zentrifugation gewonnen. Zur Bestimmung der Zytokine und Typ I Interferone wurden zunächst ELISA-Experimente durchgeführt. Da mit dieser Methode im Blut kein Typ I IFN nachweisbar war, wurde der sensitivere L929-Bioassay herangezogen. Hierbei wurden die Seren aller sieben Analysezeitpunkte mit einer Ausgangsverdünnung von 1:10 oder 1:20 untersucht. Um die Zellverteilung im intraperitonealen Raum, also am Ort der Injektion und der Entzündung ermitteln zu können, wurde bei jeder Maus *post mortem* eine Peritoneallavage durchgeführt. Hierzu wurde die tote Maus zunächst am Brust sowie Bauchraum vom Fell befreit und fixiert. Anschließend wurden 5mL 0,5mM EDTA/PBS in einer Spritze aufgezogen und eine 20G Kanüle (BD

Microlance, Madrid, Spanien) aufgesetzt. Hiermit wurde dann der Bauchraum 2-4 Minuten lang gespült, der Inhalt aufgezogen und bis zur FACS-Analyse auf Eis aufbewahrt. Ein Teil der Milz wurde für Genexpressionsstudien trocken in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Der andere Teil der Milz wurde mittels durchflusszytometrischer Zellanalyse untersucht. Jede Niere wurde längs in zwei Hälften geteilt. Eine Hälfte wurde für immunhistologische Färbungen in OCT-*Compound* (Tissue Tec, Sakura, Zoeterwoude, Niederlande) gebettet und anschliessend in flüssigem Stickstoff langsam zum Gefrieren gebracht. Diese gefrorenen Nierenhälften wurden für die immunhistologischen Färbungen bei minus 80°C gelagert und eine Stunde vor dem Färbeprozess in den auf -20°C temperierten Kryotom überführt. Als Vorbereitung für die histochemische PAS (*Periodic-Acid-Schiff*) - Färbung wurde die jeweils andere Hälfte der Niere zunächst in eine Histo-Kassette überführt und über Nacht in eine 4% Formalinlösung (Roti-Histofix, ROTH, Karlsruhe, Deutschland) gegeben. Danach wurden die fixierten Nierenhälften mit PBS ausgewaschen, mit Paraffin durchtränkt und darin eingebettet. Diese Paraffinblöcke wurden bei +4°C gelagert.

3.2 Histologische Verfahren

Histologische Verfahren wurden mit Hilfe der Arbeitsgruppe von Dr. Hans-Joachim Anders an der Medizinischen Poliklinik der Ludwig Maximilian Universität München durchgeführt.

3.2.1 Immunfluoreszenzfärbung

Die bei -80°C in OCT gelagerten Nierenhälften wurden im Kryotom auf -20°C gebracht. Es wurden 4µm dicke Konsekutivschnitte hergestellt und auf saubere fettfreie Objektträger aufgezogen. Daraufhin wurden die Schnitte fixiert indem sie mit 10 Minuten eisgekühlten Aceton behandelt wurden und dann 5 Minuten an der Luft bei RT trockneten. Sie wurden anschließend direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Die Immunfluoreszenzmethode wird angewandt, um ein Protein mit Hilfe der Antigen-Antikörper-Reaktion zu lokalisieren. Dabei werden in der direkten Methode wie bei der Durchflusszytometrie Antikörper verwendet, die direkt mit einem Fluorochrom oder einem Markerenzym konjugiert sind. Bei der

indirekten Nachweismethode bindet ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen, gefolgt von einem konjugierten Sekundärantikörper, der gegen den Primärantikörper gerichtet ist.

Im vorliegenden Fall wurde die direkte Methode an den Kryostatschnitten angewandt. Zur Bestimmung der IgG-Ablagerung in den Glomeruli wurde der Ziege-Anti-Maus IgG-FITC-Antikörper (1:100) verwendet. Die Komplementablagerungen wurden mit dem Ziege-Anti-Maus C3c-Antikörper (1:200) nachgewiesen. Die semiquantitative Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop mit einem Score von 0-3 entsprach dem von Lenert et al. 2006 publizierten Verfahren (Tab. 3.1). Die Auswertung erfolgte ohne Wissen der WT- und TLR7^{-/-}-Gruppenverteilung.

Score	Semiquantitative Bewertung
0	keine Fluoreszenz sichtbar
1	schwache Fluoreszenz sichtbar
2	mittelstarke Fluoreszenz sichtbar
3	starke Fluoreszenz sichtbar

Tabelle 3.1: Semiquantitativer Score-Index für Immunglobulin- und Komplementablagerungen in den Glomeruli. Auswertung der Immunfluoreszenz erfolgte unter 40-facher Objektiv-Vergrößerung am *Leica DC300-FX*-Mikroskop (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Deutschland).

3.2.2 PAS-Färbung

Aus den Paraffinblöcken wurden 3µm dicke Paraffinschnitte angefertigt und auf den Objektträger aufgebracht. Bei der PAS-Färbung kommt es zu einer deutlichen Anfärbung der extrazellulären Matrix, was eine quantitative Einschätzung ermöglicht. Da die Farbstoffe wasserlöslich sind, müssen die Gewebeschnitte zum Färben vom Paraffin befreit werden. Dazu wurden die Objektträger zunächst zwei mal 5 Minuten in Xylol 100% (Merck, Darmstadt, Deutschland) gebracht und anschließend jeweils kurz durch eine absteigende Alkoholreihe (Ethanol 96%, 80%, 50%, Aqua dest. und Aqua dest.) gezogen. Die so entparaffinierten Schnitte wurden nun für 10 Minuten in 1%iger Perjodsäure (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert und anschließend 5 Minuten mit Leitungswasser gespült.

Dann wurden die Schnitte für 20 Minuten in Schiffs-Reagenz-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland) gestellt und abermals 7 Minuten mit lauwarmem Leitungswasser gewaschen. Anschließend erfolgte die Gegenfärbung mit Hematoxylin-Lösung (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Daraufhin wurden die Schnitte erneut 5 Minuten mit Leitungswasser ausgewaschen. Die so gefärbten Schnitte wurden durch eine aufsteigende Alkoholreihe (50% Ethanol, 80%, 96%, 96%, 100%, 100% und 100%) entwässert und drei mal in Xylol (100%) getaucht. Der Grad der Nierenschädigung wurde nach einem festgelegten Index für die Aktivität und Chronizität einer durch Lupus verursachten Nephritis (siehe Tab. 3.2, Austin et al. 1984) ausgewertet.

Glomerulonephritis-Aktivität	Glomerulonephritis-Chronizität
Proliferationsrate der Mesangium-Zellen	Sklerose intrarenaler Gefäße
Tubuläre interstitielle Leukozyteninfiltration	Fibrotische Nekrose (Halbmondbildung in der Baumann'schen Kapsel)
Nekrose (Areale ohne Zellkerne)	Atrophie der Glomeruli
Extracapillare Proliferation	Fortgeschrittene interstitielle Fibrose
Hyaline Ablagerungen	-
Interstitielle Fibrose	-
Möglicher max.	
Wert	18
	12

Tabelle 3.2: Score-Index für PAS-Färbung. Jeder Parameter wird mit einem ein *Score*-Wert von 0-3 bewertet. 0=keine Ausprägung, 1=schwache Ausprägung, 2=mittelstarke Ausprägung, 3=starke Ausprägung. Auswertung erfolgte unter 20facher (Objektiv) Vergrößerung am *Leica DC300-FX*-Mikroskop (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Deutschland).

3.3 Zellkultur

3.3.1 Zellkultur und Kryokonservierung

Primärzellen, sowie alle Zelllinien wurden bei 37°C und 90% Luftfeuchtigkeit bei einem Anteil von 5% CO₂ in der Atmosphäre generiert. Adhärente L929-Fibroblasten wurden zum Ablösen bei einer Konfluenz von 80-90% 1-3 Minuten mit

1x Trypsin-EDTA Stammlösung versetzt, um die Zellen vom Boden zu lösen. Danach wurden sie in frischem Medium aufgenommen und zentrifugiert (1500rpm, 5min, 4°C). Das Pellet wurde in Medium resuspendiert und nach Bedarf 1:10 oder 1:20 in Medium verdünnt. Frühe *Passagen* der entsprechenden Zelllinien wurden in flüssigem Stickstoff eingelagert. Hierzu wurden möglichst dichte, aber gesunde Zellkulturen abzentrifugiert und in Gefriermedium (2-3mL) aufgenommen, zunächst bei -80°C in einer Styroporbox graduell abgekühlt und dann in flüssigen Stickstoff gelagert.

3.3.2 IgG-Aufreinigung aus dem Zellkulturüberstand von Hybridomazellen

Zur Isolierung der Anti-Sm Antikörper (Maus IgG_{3κ}) – Klone Y12 (Anti-Sm; B/D) und 7.13 (Anti-Sm; D) wurden Hybridomasuspensionszellen (Bloom et al. 1993) expandiert, welche Antikörper in den Zellkulturüberstand sezernieren. Zunächst wurden die gefrorenen Zellen (1-2mL) aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, um sie dann in 15mL eiskaltem PBS vom enthaltenem zytotoxischen DMSO im Gefriermedium zu befreien. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Zellen zunächst in maximal 12mL Vollmedium resuspendiert, in eine 75cm² Zellkulturflasche überführt und bei 37°C (5% CO₂) kultiviert. Die Zellen wurden schrittweise an ein Medium mit 3% FBS (*low IgG*) gewöhnt, welches Rinderserum mit geringem Immunglobulingehalt enthält. So kann gewährleistet werden, dass wirklich nur die von den Hybridomazellen sezernierten IgGs aufgereinigt werden. Wenn die Zellen an das Medium gewöhnt waren, wurden sie in Rollerflaschen 1:2 expandiert und bis zu einem Volumen von 2L weiter kultiviert. Bei Erreichen eines Kulturvolumens von 2L wurden die Zellen solange im Inkubator belassen, bis das Medium aufgebraucht war (Gelbfärbung), um die maximale Zelldichte zu erreichen. Anschließend wurde der Zellüberstand durch Zentrifugation (5000-6000rpm, 20min, 4°C) der Zellen und des Debris gewonnen. Die Aufreinigung der IgG-Antikörper aus dem Zellkulturüberstand erfolgte über Affinitätschromatographie, wobei Protein A an die Säulenmatrix gebunden war. Protein A ist ein Zelloberflächenprotein aus Streptokokken der A-Klasse und hat eine hohe pH-abhängige Affinität zu murinen IgG₃-Antikörpern. Durch Absenken des pH-Wertes

nimmt die Affinität ab und an Protein A gebundene Antikörper können eluiert werden.

Die Antikörper wurden nach Anleitung der Firma Amersham Biosciences (Piscataway, USA) über eine HiTrap Protein A^{HP}-Affinitätssäule aufgereinigt. Der Überstand wurde zwei mal über die Säule passiert. Hierzu musste die Säule nach dem ersten Durchgang mit Elutionsmittel von sehr niedrigem pH-Wert gereinigt werden (siehe Medien und Puffer), um die Säule anschließend mit PBS (pH 7) wieder bindungsfähig machen zu können. Der Antikörper wurde in 1mL-Fractionen eluiert und in Neutralisierungspuffer aufgefangen, um eine Präzipitation des Antikörpers zu verhindern. Das richtige Verhältnis von Neutralisierungspuffer zu Elutionspuffer wurde vor der Reinigung des Proteins getestet, mit dem Ziel einen neutralen pH-Wert zu erhalten. Nach Messung der Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen ($OD_{280} = 1$ entspricht einer IgG- Proteinkonzentration von 0,67mg/mL), erfolgte das Umpuffern in PBS mit Hilfe von PD-10 Säulen (Amersham Biosciences, Piscataway, USA). Alle für die Aufreinigung verwendeten Puffer wurden steril filtriert.

3.3.3 Isolierung von murinen Knochenmarkszellen

Pluripotente Stammzellen aus dem Knochenmark können durch Kultur mit bestimmten Wachstumsfaktoren zu verschiedenen hematopoetischen Zellen differenziert werden. Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden bei der toten Maus *Femur* und *Tibia* der Hinterbeine entnommen. Die Knochen wurden von Fell, Fleisch und Sehnen befreit. Nach diesem Schritt wurde das gesäuberte Bein in frisches RPMI gelegt und des weiteren unter sterilen Bedingungen bearbeitet. Das Knochenmark aus *Femur* und *Tibia* wurde mit Hilfe von Spülmedium (5% FBS/RPMI), einer 27G-Kanüle (BD Microlance, Madrid, Spanien) und einer 10mL Spritze in eine Petrischale ausgespült. Nach Zentrifugation (1500rpm, 5min, 4°Celsius) dieser Zellsuspension erfolgte 3 Minuten lang eine Erythrozytenlyse des resuspendierten Pellets mit Ammoniumchlorid-Lösung. Nach Zugabe von RPMI 1640 und erneuter Zentrifugation wurden die Zellen nun in Vollmedium überführt.

3.3.4 Generierung von FLDC's

Zunächst wurden die frisch isolierten Knochenmarkszellen mit RPMI-Vollmedium auf eine Konzentration von $1,5 \times 10^6$ Zellen eingestellt, woraufhin 20ng/mL humaner rekombinanter Flt3-Ligand (R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland) zugegeben wurde. Die Zellen wurden auf 6-Loch-Flachbodenplatten verteilt, wobei maximal 3mL/Loch der Zellsuspension zugegeben wurde. Die Kultivierung der Zellsuspension erfolgte 7 Tage im CO₂-Inkubator bei 5% CO₂ und 37°C ohne Zugabe von frischem Medium. Die FLDC's lagen als Suspensionszellen vor und wurden nach mehrmaligem Spülen mit RPMI-Vollmedium aus der Flachbodenplatte pipettiert und gezählt. Mittels Durchflusszytometrie konnte der Phänotyp der so generierten FLDC's bestimmt werden. FLDC's sind eine Mischkultur aus konventionellen DC's (cDC's) und PDC's.

3.3.5 Isolation von Splenocyten

Aus der steril präparierten Milz wurden die Zellen mittels eines Zellsiebes (Durchmesser: 70µm) aus dem Verband gelöst und durch wiederholtes Spülen mit RPMI (5% FBS in RPMI) wurden alle Splenozyten gesammelt. Nach Zentrifugation (1500rpm, 5min, 4°C) dieser Zellsuspension erfolgte eine 3-minütige Erythrozytenlyse mit 3mL Ammoniumchlorid-Lösung. Nach Verdünnung mit RPMI und nochmaliger Zentrifugation, wurden die Zellen in Vollmedium aufgenommen.

3.3.6 Bestimmung der Zellzahl

Zunächst wurden die isolierten Zellen in einem definierten Volumen resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden ca. 10µL entnommen und in die Neubauer Zählkammer pipettiert. Die Auszählung erfolgte unter dem Lichtmikroskop mit einem 40er Objektiv. Ausgezählt wurden die 4 Eckquadrate (= 1 Grossquadrat) der Kammer. Indem anschließend durch 4 geteilt wurde erhielt man den Mittelwert eines Eckquadrates. Berechnung der Zellkonzentration:

$$\text{Zellen/mL} = (\text{Zellen im Großquadrat}/4) \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.3.7 Stimulation *in vitro*

FLDC's und Splenozyten wurden zunächst im Vollmedium auf eine maximale Zellkonzentration (respektive) von 4×10^6 Zellen/mL und 5×10^6 Zellen/mL gebracht, auf 96-Loch-Rundbodenplatten verteilt ($100 \mu\text{L}/\text{Loch} = 4 \times 10^5$ Zellen/Loch) und mit dem jeweiligen Stimulus ($100 \mu\text{L}/\text{Loch}$) versetzt. Die Stimulation der FLDC's erfolgte für 24-40 Stunden und bei den Splenozyten über Nacht (37°C , 5% CO_2). Anschließend wurde der Überstand auf Zytokine (ELISA) getestet und die stimulierten Zellen wurden verwendet, um die Expression von Oberflächenmarkern im Durchflusszytometer zu untersuchen. Soweit nicht anders beschrieben wurden die Stimuli mit den in Tab. 3.3 aufgeführten Konzentrationen eingesetzt. PolyU, PolyI:C und U1snRNP wurden mit $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ DOTAP (kationischem Liposom in PBS gepuffert) für 15 Minuten bei RT komplexiert und anschließend wurde das selbe Volumen des Inkubationsansatzes an 2x Vollmedium dazugegeben ($=25 \mu\text{g}/\text{mL}$ DOTAP). In der Zellsuspension betrug die Endkonzentration an DOTAP dann $12,5 \mu\text{g}/\text{mL}$. Die Endkonzentration an Y12-AntiSm-Antikörper betrug $50\text{-}100 \mu\text{g}/\text{mL}$. Auch hier wurde die Inkubation mit U1snRNP zunächst mit $200\text{-}400 \mu\text{g}/\text{mL}$ Y12 in PBS durchgeführt. Dabei wurde der Ansatz zunächst 10min auf Eis und dann 5min bei 37°C gehalten.

Stimuli	Endkonzentration
CpG-DNA 2216	$0,5 \mu\text{M}$
LPS	$1 \mu\text{g}/\text{mL}$
PolyU (ssRNA)	$20 \mu\text{g}/\text{mL}$
PolyI:C (dsRNA)	$20 \mu\text{g}/\text{mL}$
U1snRNP	$20 \mu\text{g}/\text{mL}$
U1snRNA	$10 \mu\text{g}/\text{mL}$
U1snRNA-Oligonukleotide	$2 \mu\text{M}$
R-848 (ssRNA)	$3 \mu\text{M}$
IFN- β	$1000 \text{U}/\text{mL}$

Tabelle 3.3: Endkonzentrationen der angewandten Stimuli im Zellkulturansatz

Anschließend wurde auch hier mit gleichem Volumen 2x Vollmedium auf 100-200µg/mL aufgefüllt, bevor dieser Ansatz dann zu den Zellen gegeben wurde. Um eine höhere IFN- α -Produktion zu erhalten, wurden die Zellen 18h vorher mit IFN- β voraktiviert. Die aus U1snRNP isolierte U1snRNA wurde von Prof. Berthold Kastner (Max-Planck-Institut für Biophysikale Chemie, Göttingen) mit freundlicher Unterstützung zur Verfügung gestellt. Dabei wurde U1snRNA aus U1snRNP über Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol isoliert, über Ethanol präzipitiert und mittels Elektrophorese auf Reinheit überprüft.

3.3.8 L929 Bioassay für Typ I IFN-Aktivität

Die antivirale Aktivität von Typ I IFN-Serum wurde in einem Bioassay mit L929-Fibroblasten bestimmt. Dazu wurden L929-Fibroblasten (10^5 Zellen/mL) in 96-Loch-Flachbodenplatten (100µL/Loch= 10^4 Zellen/Loch) ausgesät und bei 37°C (5% CO₂) kultiviert. Am darauffolgenden Tag waren die Zellen zu 70-80% konfluent. Der Überstand wurde abgenommen und 100µL/Loch der seriell (1:2) in Medium verdünnten Seren (Ausgangsverdünnungen 1:10 – 1:40), IFN- α -Standards (125U/mL – 0,06 U/mL) und Kontrollen hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 24 Stunden wurden die Überstände abgenommen und 100µL/Vertiefung einer VSV-Suspension (VSV: rekombinantes vesikuläres *stomatitis virus*) mit einer Konzentration von 10^4 -PFU/mL zu den Zellen gegeben, und weitere 40h inkubiert. Daraufhin wurde zunächst der zytopathische Effekt mikroskopisch kontrolliert, der Überstand von den Zellen genommen und diese mit 200µL/Vertiefung einer Formaldehyd-haltigen Kristallviolett-Lösung gefärbt. Bei protektivem antiviralem Effekt ließ sich ein intakter Zellrasen homogen anfärben. Die Konzentration an Typ I IFN wurde über die IFN- α -Standardreihe abgeschätzt.

3.4 Immunologische Methoden

3.4.1 ANA-HEp-2 und *crithidia luciliae*-Assay

ANA-HEp-2 ist ein Reagenziensatz (Anleitung und Reagenzien siehe in CE-ANA HEp-2 von Biosystems S.A., Costa Brava, Spanien) zur qualitativen und

semiquantitativen Bestimmung von Antikörpern gegen Antigene im Zellkern und im Zytoplasma von HEp-2-Zellen in humanem Serum von Patienten mit systemisch rheumatisch entzündlichen Erkrankungen wie z.B. Systemischer Lupus Erythematosus (SLE). Der Immunfluoreszenztest auf HEp-2-Zellen ist ein sensitiver Screeningtest zur Bestimmung von Antinukleären Antikörpern (ANA), der über die Erkennung von Fluoreszenzmustern eine Aussage auf bestimmte zugrundeliegende Antigene und assoziierte Erkrankungen zulässt (Moore et al. 1955; Weller et al. 1955). ANA-HEp-2 ist ein indirekter Immunfluoreszenztest. Die Antikörper in den verdünnten Seren der Pristan-injizierten Mäuse (7 Monate nach Injektion) sollten mit den Antigenen der auf dem Objektträger fixierten HEp-2-Zellen reagieren. Nicht gebundene Komponenten wurden nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur durch einen Waschschrift entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden im zweiten Schritt mit FITC-konjugierten Anti-Maus-Antikörpern (IgG-Isotyp, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) markiert.

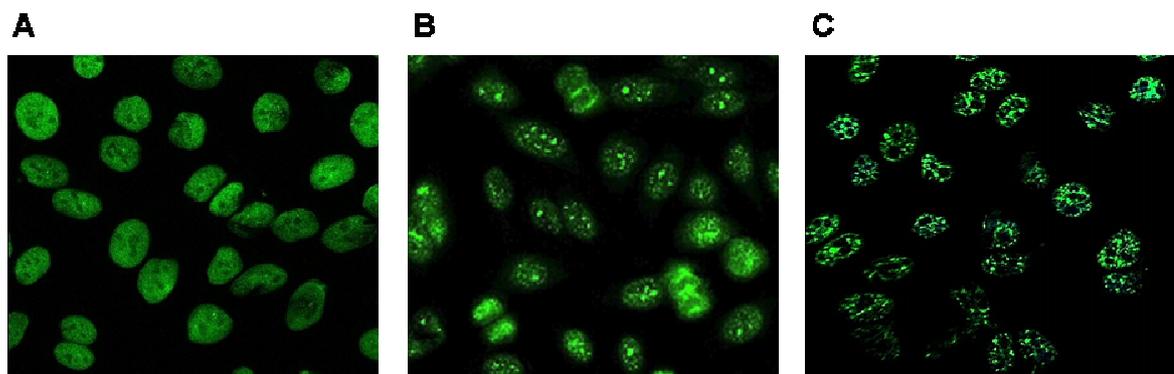


Abbildung 3.1: ANA-Färbung A zeigt das Serum einer MRL/Mp^{lpr/lpr}-Maus, welche im ELISA nur positiv auf Anti-dsDNA (20 Wochen alt, weiblich) getestet wurde. B zeigt das Serum einer MRL/Mp^{lpr/lpr}-Maus (20 Wochen alt, weiblich), welche im ELISA positiv auf Anti-SnRNP/Sm- und Anti-dsDNA getestet wurde. In C wurde der Y12-Antikörper auf die HEp-2-Zellen gegeben und seine Bindung getestet (Anti-Sm-Antikörper, 20µg/mL in PBS). Auswertung erfolgte unter 40facher (Objektiv-) Vergrößerung am *Leica DC300-FX*-Mikroskop (*Leica Microsystems*, Wetzlar, Deutschland)

Überschüssige Konjugatmoleküle wurden nach 30 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur von den an der festen Phase gebundenen Immunkomplexen durch einen weiteren Waschschrift getrennt. Nach dem Eindecken mit DAPI (4', 6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid, Proteinfixierungsmittel), wurden die Objektträger unter einem Fluoreszenzmikroskop (Anregungswellenlänge 490nm,

Emissionswellenlänge 520nm) beurteilt. Entsprechend der Anordnung der Antigene in der HEP-2-Zelle ergeben sich spezifische Fluoreszenzmuster. Als Negativkontrolle wurde Serum von 6-10 Wochen alten C56BL/6-WT-Mäusen verwendet. Hier war keine Fluoreszenzfärbung zu sehen. Die Positivkontrolle stammte von 20 Wochen alten MRL/Mp^{lpr/lpr}-Mäusen (Abb. 3.1 A,B). Es wurden nur die Anfärbungsmuster beschrieben die hinsichtlich der Relevanz für SLE wichtig sind und in diesen Experimenten beobachtet wurden. Die Antigene bei einer homogenen (diffusen) Anfärbung des Zellkerns sind DNA und Histone (Abb. 3.1. A). Die Chromosomenregion z.B. von Mitosezellen zeigte eine starke positive Fluoreszenz. Histonantikörper in hoher Titration sind sehr stark assoziiert mit medikamenten-induziertem Lupus (Nakamura et al. 1984). Fluoreszierende grobe Sprengel über den gesamten Zellkern und Aussparung der Chromosomenregion der Mitosezellen weisen auf Sm- und RNP-Antikörper hin (Abb. 3.1 C; Molden et al. 1985). Sm-Antikörper mehr noch als RNP Antikörper sind hochspezifische Marker für SLE. Feingranuläre Fluoreszenz im gesamten Zytoplasma, oft begleitet von einem nukleolären Muster, deuten auf Anti-ribosomale-RNP-Antikörper hin. Diese Antikörpersprengelung ist charakteristisch für einige Fälle bei SLE (Bianchi et al. 1974).

Als weiteres Testverfahren zur Bestimmung der dsDNA-Antikörper wurde der *Crithidia luciliae*-Test (Bio-Rad Laboratories, Redmond, USA) angewendet. Das Färbeprotokoll entsprach der HEP-2-Färbung. Kriethidien sind Flagellaten (Geißeltierchen), welche Kinetoplasten (Mitochondrien) mit reiner dsDNA enthalten. Der Nachweis von Anti-dsDNA-AK im Serum der Pristan-Mäuse erfolgte semiquantitativ durch Bewertung der *Crithidia luciliae*-Färbung bei einem Score von 0-4 (100fache Objektiv-Vergrößerung, *Leica Microsystems*, Wetzlar, Deutschland).

3.4.2 Prinzip der Durchflusszytometrie

Aufgrund der Expression von Oberflächenmolekülen können Zellen mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS: *Fluorescence activated cell sorting*) unterschieden werden. Zur Markierung der Zellen werden Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte monoklonale Antikörper eingesetzt, welche verschiedene Oberflächenmoleküle oder Zytokine (intrazelluläre Färbung) binden können. Die Zellen passieren im

Gerät einen fokussierten Laserstrahl. Hierbei wird unterschieden zwischen dem Vorwärtsstreulicht (FSC = *forward scatter*), das von den Zellen in Richtung des Laserstrahls gestreut wird und das Seitenstreulicht (SSC = *side scatter*), welches das hinter dem Strahl gemessene Licht darstellt. Zusätzlich zu FSC und SSC, welche die Grösse und Granularität der Zellen anzeigen, detektiert das Durchflusszytometer das emittierte Fluoreszenzlicht der fluoreszenzgekoppelten Antikörper. In den vorliegenden Versuchen wurde mit vier Fluoreszenzintensitäten (FL1-4) gearbeitet. Die durchflusszytometrischen Analysen wurden am FACS Calibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA) durchgeführt.

Fluoreszenz	Fluoreszenzfarbstoff	Absorption	Emission
FL1	FITC: Fluorescein Isothiocyanat	494nm	518nm
FL2	PE: R-Phycoerythrin)	565nm	575nm
FL3	PI: Propidiumiodid	642nm	661nm
FL4	APC: Allophycocyanin	650nm	660nm

Tabelle 3.4 :Fluoreszenzfarbstoffe und ihre maximalen Absorptions- und Emissionswellenlängen. Die Anregung von FITC, PE und PI erfolgte mit 488nm. APC wurde mit 647nm angeregt.

3.4.2.1 Oberflächenfärbung

Alle Vorarbeiten und Färbungen wurden auf Eis und mit FACS-Puffer (siehe Material) durchgeführt. Hierzu wurden zwischen 2×10^5 und 5×10^5 Zellen pro Färbung in 96-Loch-Rundbodenplatten überführt. Anschließend wurden die Kammern mit 200µL FACS-Puffer aufgefüllt und zentrifugiert (4°C, 1500rpm, 5min). Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und der Überstand dekantiert. Das verbleibende Volumen um die Zellpellets betrug etwa 20µL. Um eine unspezifische Bindung von Antikörpern an Fc-Rezeptoren zu vermeiden, wurden 20µL/Kammer Färbelösung, bestehend aus Fc-Block-Hybridomaüberstand (Anti-CD16/CD32) und fluoreszenzmarkiertem monoklonalen Antikörper, eingesetzt. Die Inkubationszeit auf Eis und in Dunkelheit betrug 10min. Anschließend folgten drei Waschschriffe. Beim Einsatz biotinylierter monoklonaler Antikörper folgte eine weitere 10-minütige Inkubation mit streptavidinkonjugiertem Farbstoff (1:200). Nach drei weiteren Waschriffen werden die Zellen in 100-200µL FACS-Puffer

aufgenommen. Zur Abgrenzung toter Zellen wurden 5µL Propidiumiodidlösung (PI, 200µg/mL) kurz vor der Messung zugegeben. PI dringt durch die beschädigte Membran toter Zellen ein und bindet an die DNA. Die Auswertung erfolgte mit CellQuest Pro Software (BD, Heidelberg). Zunächst wurde auf die intakten Zellen aufgrund ihrer Grösse (FSC) und ihrer Granularität (SSC) ein erstes Gate (R1) gesetzt. Zusätzlich wurde in der FSC/PI(FL3)-Darstellung ein Gate (R2) auf die lebenden Zellen gesetzt. R1 und R2 wurden dann in die folgenden beliebigen Zweiparameterdarstellungen (FL1/FL2, FL1/FL4, FL2/FL4) übertragen, um den Prozentsatz der PDC's (B220^{high}/CD11b^{low}/CD11c^{pos}) bzw. cDC's (B220^{low}/CD11b^{high}/CD11c^{pos}) zu ermitteln oder deren Aktivität aufgrund Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 zu bestimmen.

3.4.2.2 *Sorten* von PDC's und cDC's aus Flt3-Kulturen

Die Abbildung 3.2 erläutert die *Gating*-Strategie zur Ermittlung der PDC's und konventionellen DC's aus den mit Flt3-Ligand kultivierten Knochenmarkszellen (FLDC's).

Hauptziel nach dem Trennen (engl: *sorten*) der FLDC's in PDC's und cDC's war es weitere *in vitro* Experimente durchzuführen, weswegen hier die Zellen nicht mit Propidiumiodid versetzt wurden. Die durchflusszytometrisch ermittelte Reinheit nach der isolierten PDC's und cDC's betrug 97%. Das *Sorten* der FLDC-Kultur wurde mit freundlicher Unterstützung von Matthias Schiemann in der Abteilung Mikrobiologie von Prof. Dr Hermann Wagner an der Technischen Universität München durchgeführt.

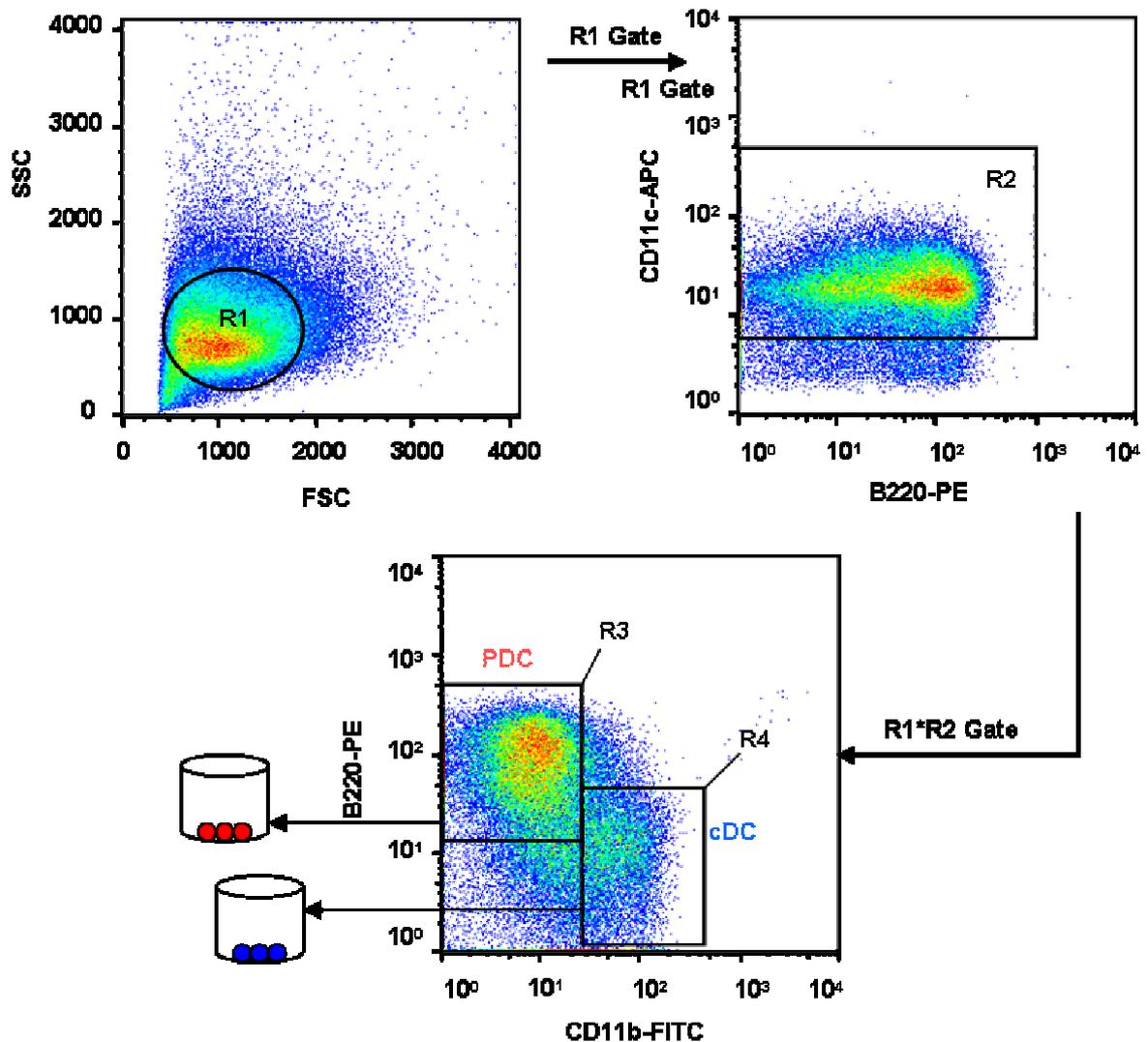


Abbildung 3.2: Prinzip des Zellsortens: R1= Separierung der DC's aufgrund der höchsten Dichte (orange/grüner Bereich) an Zellen, da die Knochenmarkszellkultur mit Flt3 generiert wurde besteht diese Kultur hauptsächlich aus DC's. R2= Alle CD11c^{pos}-Zellen, da CD11c Marker für alle DC's ist. R3= PDC (B220^{high}/CD11b^{low}/CD11c^{pos}). R4= cDC (B220^{low}/CD11b^{high}/CD11c^{pos}). Das durchflusszytometrische Sorten wurde am MoFlowCytometer (Dako, Glostrup, Dänemark) durchgeführt.

3.4.3 Prinzip des *Sandwich*-ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbant Assay)

Zur Quantifizierung von Antigenen und Antikörpern wird die ELISA-Technik angewandt. Diese Methode ermöglichte die Bestimmung von Immunglobulin- und Zytokinkonzentrationen im Mausserum oder in den Zellkulturüberständen. Zunächst wird eine 96-Loch-Rundbodenplatte mit dem spezifischen Antikörper (Primärantikörper) für das zu bestimmende Antigen beschichtet. Nach dreimaligem Auswaschen des Anteils an nicht gebundenen Antikörpern wurden durch den Blockpuffer unspezifische Bindungen gesättigt. Danach wurden die zu untersuchenden Proben und Standards zugegeben. Die gebundenen Primärantikörper konnten nun ihre spezifischen Antigene binden und mit diesen Immunkomplexe bilden. Nach der Inkubation wurden nichtgebundene Antigene durch Waschen aus der Platte entfernt. Im nächsten Schritt bedarf es eines sekundären Antikörpers (Detektionsantikörper) welcher an einem anderen Epitop das gesuchte Antigen erkennt. Der sekundäre Antikörper ist mit Biotin oder direkt mit Meerrettich Peroxidase konjugiert. Biotin hat eine hohe Affinität zu Streptavidin, welches an eine Meerrettich Peroxidase gekoppelt ist. Diese Peroxidase katalysiert die Reaktion von H_2O_2 (siehe Material: Puffer) zu H_2O und O_2 in Gegenwart des Elektronendonors ABTS. Dieser wird oxidiert, was durch einen Farbumschlag sichtbar wird. Die photometrisch gemessene Farbintensität ist proportional zur Konzentration des gebundenen Antigens. Standardreihen mit Antigen ermöglichen die Bestimmung der Quantität und Qualität der gemessenen Proben.

ELISAS für IFN- α , IL-6 und IL-12-p40 wurden alle nach eigenem Protokoll durchgeführt (siehe Tab. 3.5). Eine Ausnahme stellt die IFN- α Auswertung in Abbildung 4.8 A dar, in der ein ELISA-Kit von PBL benutzt wurde. Die Auswertung und photometrische Messung der OD (405-490nm) wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (MWG, Bielefeld, Deutschland) durchgeführt.

3.4.3.1 Zytokin-ELISA

IFN-α	Konz./ Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
Primärantikörper	1:500	Beschichtungspuffer	3h RT	50 μ L
Block	10 % FBS	FBS in PBS	1 – 1,5 RT	200 μ L
Serum	1:2	Verdünnungspuffer	ÜN +4 °C	50 μ L
Zellkulturüberstand	1:1	Verdünnungspuffer	ÜN +4 °C	50 μ L
Höchstandard	1000 U/mL	Verdünnungspuffer	ÜN +4 °C	50 μ L
Sekundärantikörper	1:400	Verdünnungspuffer	2h RT	50 μ L
Donkey-HRP	1:2000	Verdünnungspuffer	1h RT	50 μ L
Substrat: ABTS	1:50	ABTS-Substrat-Lsg.	-	100 μ L
Stop-Lösung	1%	SDS-Lösung	-	100 μ L

IL-6	Konz./ Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
Capture-Antikörper	1:250	Beschichtungspuffer	3h RT	50 μ L
Block	10% FBS	1FBS in PBS	1 – 1,5 RT	200 μ L
Serum	1:10-1:20	Verdünnungspuffer	ÜN, 4 °C	50 μ L
Zellkulturüberstand	1:20	Verdünnungspuffer	ÜN, 4 °C	50 μ L
Höchststandard	4000 pg/mL	Verdünnungspuffer	ÜN,4 °C	50 μ L
Sekundärantikörper	1:250	Verdünnungspuffer	2h RT	50 μ L
SA-HRP ¹	1:2000	Verdünnungspuffer	1/2h RT	50 μ L
Substrat: ABTS	1 mg/mL	ABTS-Substrat-Lsg.	-	100 μ L
Stop-Lösung	1%	SDS-Lösung	-	100 μ L

IL-12p40	Konz./ Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
Capture-Antikörper	1:1000	Beschichtungspuffer	3h RT	50 μ L
Block	10% FBS	1FBS in PBS	1 – 1,5 RT	200 μ L
Serum	1:10-1:20	Verdünnungspuffer	ÜN, 4 °C	50 μ L
Zellkultur-Überstand	1:20	Verdünnungspuffer	ÜN, 4 °C	50 μ L
Höchststandard	4000 pg/mL	Verdünnungspuffer	ÜN,4 °C	50 μ L
Sekundärantikörper	1:1500	Verdünnungspuffer	2h RT	50 μ L
SA-HRP ¹	1:2000	Verdünnungspuffer	1/2h RT	50 μ L
Substrat: ABTS	1 mg/mL	ABTS-Substrat-Lsg.	-	100 μ L
Stop-Lösung	1%	SDS-Lösung	-	100 μ L

Tabelle 3.5: Reaktionsansätze zum Nachweis von IFN- α , IL-6 und IL-12p40

3.4.3.2 Quantifizierung der Immunglobuline mittels ELISA

U1snRNP- AK	Konz./ Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
U1snRNP	5µg/mL	PBS	3h RT	50µL
Blocken mit FBS	10 %	FBS in PBS	0,5-1h RT	200µL
Serum	1:100-1:12400	Verdünnungspuffer	ÜN, 4 °C	50µL
Höchststandard (Y12)	2,5-10µg/mL	Verdünnungspuffer	ÜN, 4 °C	50µL
Detektions-AK: Ziege Anti-Maus IgG-HRP	1:500	Verdünnungspuffer	1h RT	50µL
Substrat: ABTS	1mg/mL	ABTS-Substrat-Lsg.	-	100µL
Stop-Lösung	1%	SDS-Lösung	-	100µL

dsDNA- AK	Konz./ Verdünnung	Lösung	Inkubation	Volumen
Kalbsthymus dsDNA	3µg/mL	PBS	ÜN, 4°C	100µL
Blocken	0,5%, 0,05%	BSA, Tween 20	1,5h RT	100µL
Serum	1:150-1:19200	Verdünnungspuffer	ÜN, 4°C	100µL
Höchststandard (PI-3)	167µg/mL	Verdünnungspuffer	ÜN, 4°C	100µL
Detektions-AK: Ziege Anti-Maus IgG-HRP	1:500	Verdünnungspuffer	1/2h RT	100µL
Substrat: ABTS	1mg/mL	ABTS-Substrat-Lsg.	-	100µL
Stoplösung	1%	SDS-Lösung	-	100µL

Tabelle 3.6: Reaktionsansätze zum Nachweis von Immunglobulinen in Mausseren

Die Bestimmung der IgG-Isotypen (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c und IgG3) aus dem Serum verlief nach dem *Sandwich*-Prinzip und wurde nach dem Protokoll eines ELISA-KITS (Bethyl Labs, Montgomery, TX, USA) durchgeführt. Die Quantifizierung der Antikörper gegen U1snRNP und dsDNA wurde nach eigenem Protokoll durchgeführt. Hierzu wurde allerdings kein Primärantikörper benutzt sondern direkt mit dem gesuchten Antigen beschichtet. Da U1snRNP das Smith-Antigen (Sm) enthält werden mit diesem ELISA auch Anti-Sm-Antikörper detektiert. Für den Nachweis von Anti-RNP/Sm-Antikörpern wurden 96-Loch-Rundbodenplatten direkt (also ohne Primärantikörper) mit U1snRNP in PBS (Über Nacht, 4°C) beschichtet und dann wie beim Sandwich ELISA verfahren. Im Falle

der dsDNA wurde genauso verfahren wie für U1snRNP. Allerdings wurden 96-Loch-Rundbodenplatten zunächst mit 0,01% Poly-L-Lysine (Trevigen, Gaithersburg, USA) beschichtet, damit die im nächsten Schritt zugegebene, negativ geladene Kalbsthymus DNA (3µg/mL) in PBS (Über Nacht, 4°C) auf der nun positiven Plastikoberfläche binden konnte. Außerdem waren, um eine Kontamination mit DNase zu verhindern, alle Puffer steril und alle Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-Isolierung aus Milzen

Unmittelbar nach Eintreten des Todes wurde den Pristan gespritzten WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen die Milz entnommen und 1/3 davon wurde sofort für weitere Genexpressionsstudien in flüssigem Stickstoff eingefroren, um die weitere Degradation der RNA zu verhindern. Anschließend wurde die Milz mit Trizol-Reagenz versetzt und auf Eis mit Hilfe eines *Silent Crusher* (Heidolph, Schwabach, Deutschland) homogenisiert. Die Isolation erfolgte gemäß dem Trizol-Protokoll (Invitrogen). Abweichend von diesem Protokoll wurde den Proben zur Stabilisierung der RNA vor der Präzipitation 10µg GlycoBlue entsprechend den Herstellerangaben zugegeben. Die isolierte RNA wurde anschließend in 90µL DNase- und RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei 55°C für 10min gelöst. Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch gemessen. Um DNA-freie RNA zu erhalten wurde ein DNA-Verdauansatz (40µL) mit Hilfe von DNase I durchgeführt. Hierzu wurden 4µg RNA in einem 40µL Ansatz (siehe Tab. 3.7) eingesetzt.

Reagenz	Endkonzentration
DNase I	8U
10x DNase I Puffer	1x
Gesamt RNA	4µg
H ₂ O	anteilig

Tabelle 3.7: DNase Behandlung. 40µL Gesamtansatz. Der DNA-Verdau erfolgte für 20min bei 37°C. Die Zugabe von 3,3µL 25mM EDTA und das anschließende Erhitzen auf 65°C (15min) führt zur Deaktivierung von DNase I.

3.5.2 RNA Gelelektrophorese Kontrollgel

Um eine Degradation der RNA zu verhindern wurde in allen Schritten mit RNase-freiem H₂O gearbeitet. Nach dem DNA-Verdau wurde, um die Degradation bis zu diesem Schritt auszuschließen, die RNA mittels Gelelektrophorese untersucht (1,5% Agarosegel). Dazu wurden zu 20µL aus jedem Ansatz 4µL OrangeG (6fach) zugegeben, in das Gel aufgetragen und bei 90mV elektrophoretisch aufgetrennt.

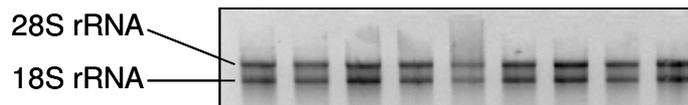


Abbildung 3.3: RNA Kontrollgel. Hier werden die 18S- und 28S-Bande einer intakten, nicht degradierten ribosomale (rRNA) gezeigt.

Auf diese Weise konnte die 18S- und 28S-Bande der intakten ribosomale (rRNA) nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.3).

3.5.3 Herstellung der cDNA

Die cDNA-Synthese ausgehend von DNase I behandelte RNA erfolgte nach dem Protokoll für die reverse Transkriptase SuperScriptII™ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland).

Reagenz	Endkonzentration
Oligo (dT) ₁₅	500µg/mL
dNTP Mix	0,5mM
5x FS Puffer	1x
0,1 M DTT	0,1mM
Rnase OUT	40U
SuperScriptII™	200 U

Tabelle 3.8: SuperScriptII™ cDNA-Synthese. Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 21µL.

Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug 21µL. Im ersten Schritt wurden 11µL DNase I behandelte RNA zusammen mit einem Oligo (dT)₁₅ Primer und dNTPs für 5 Minuten bei 65°C inkubiert. Im zweiten Reaktionsschritt wurden alle übrigen Reagenzien bis auf die Reverse Transkriptase hinzugegeben und für 2

Minuten bei 42°C inkubiert. Erst dann wurde die Reverse Transkriptase SuperScriptII hinzugegeben und der Reaktionsansatz für 50 Minuten bei 42°C inkubiert. Durch anschließende Erhitzung auf 70°C für 15 Minuten wurde die reverse Transkriptase inaktiviert. Die cDNA wurde 1:5 in nukleasefreiem H₂O verdünnt und bei -80°C gelagert.

3.5.3.1 βActin-PCR

Zur Überprüfung der cDNA-Synthese und Ausschluß einer Kontamination durch genomische DNA wurde eine βActin-PCR der cDNA-Proben und der DNase I behandelten RNA durchgeführt. Im ersteren Fall sollte eine βActin-Bande zu sehen sein, wobei die genomische DNA zu einem größerem PCR-Produkt führen würde. Bei der DNase I behandelten RNA in entsprechender Verdünnung sollte keine βActinbande zu sehen sein. Das Endvolumen betrug im PCR-Ansatz 25µL, bestehend aus 5µL cDNA und 20µL Reagentien:

Reagenz	Endkonzentration	PCR-Bedingungen	
H ₂ O	anteilig	1. Anfangsdenaturierung	94°C: 3min
10x PCR-Puffer	1x	2. Denaturierung	94°C: 30sec
MgCl ₂	3mM	3. Anlagerung	60°C: 30sec
dNTPs	200µM	4. Extension	72°C: 30sec
βActin forward primer	500nM	Schritte 2–4 35x wiederholen	
βActin reverse primer	500nM	5. Abschlußextension	72°C: 7min
Taq DNA-Polymerase	2,5U		
cDNA	5µL		

Tabelle 3.9: βActin-Polymerase. Endvolumen im PCR-Ansatz 25µL: 5µL cDNA und 20µL Reagenzien. Dieser Ansatz wurde im *MasterCycler* (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland) im durchgeführt.

3.5.4 Quantitative Real Time PCR

Mit Hilfe der quantitativen RT-PCR wurde in der Milz der WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen 7 Monate nach der Pristan-Injektion die mRNA Expression von inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-12p40, IL-12p35), Interferon induzierten Genen (IRF7, IFI204), dem Transkriptionsfaktor und Treg-Marker Foxp3 und darüber hinaus von BAFF, T-bet und GATA3 gemessen. Im Taqman Gene Expression Assay wurden neben

den beiden *Primern* auch sequenzspezifische *Proben*, die mit einem Reporterfarbstoff und einem *Quencher* konjugiert sind, verwendet. Normalisiert wurde mit HPRT (für IRF7, IFI204, T-bet und BAFF) oder β Actin (für IL-6, IL-12p35, IL-12p40, GATA3 und Foxp3).

Bei einer konventionellen PCR wird mit Hilfe der elektrophoretischen Separation die Kopienmenge erst am Ende einer bestimmten Anzahl von Amplifikationszyklen ermittelt. Hingegen wird bei der *real time* PCR (RT-PCR) die Menge des entstehenden PCR-Produktes fortlaufend während der Reaktion durch ein Fluoreszenzsignal ermittelt. Die zu jedem Zeitpunkt ermittelte Fluoreszenz korreliert mit der Menge des amplifizierten Produktes (Walker, 2007).

3.5.4.1 Prinzip der TaqMan-PCR

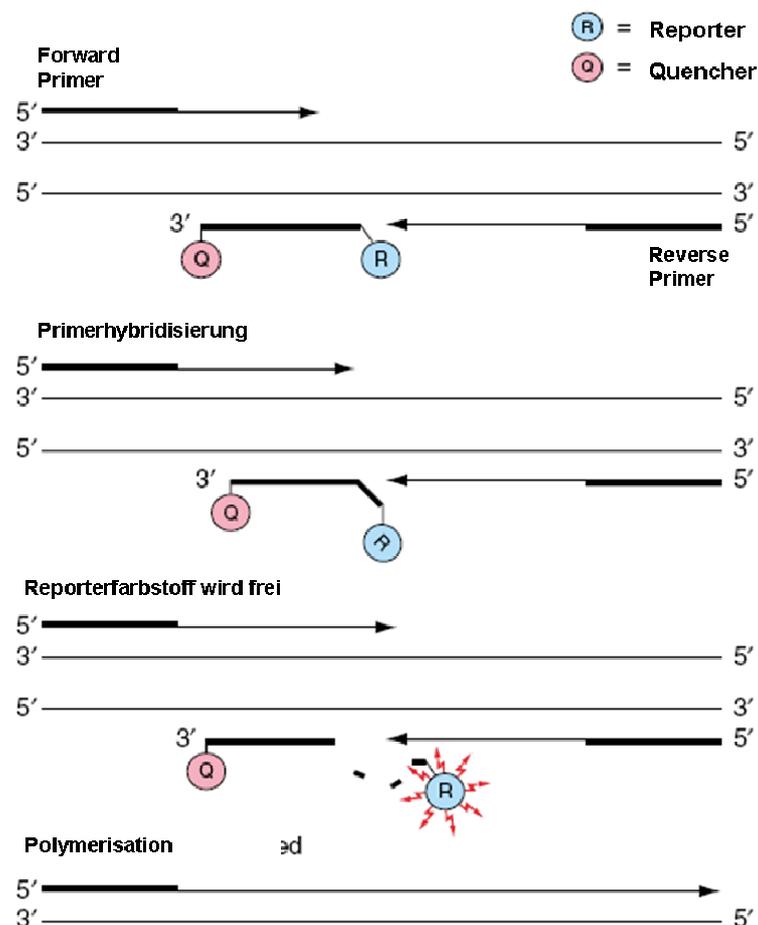


Abbildung 3.4: TaqMan RT-PCR. Adaptiert und erweitert aus der Anleitung des TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

Eine teure, jedoch sehr spezifische Methode der Fluoreszenzmarkierung des Produktes ist die TaqMan PCR mit fluoreszenzmarkierter Sonde (=Probe). Die in dieser Arbeit eingesetzten sequenzspezifischen *Probes* (*Probe*: Oligonukleotid, an den ein *Reporter*-Farbstoff am 5'-Ende und ein *Quencher*-Farbstoff am 3'-Ende gekoppelt ist, siehe Material). Die Fluoreszenz des *Reporter*-Farbstoffes wird solange vom *Quencher*-Farbstoff blockiert (*quenching*), wie eine räumliche Nähe zwischen *Quencher*- und *Reporter*-Farbstoff besteht. Während der RT-PCR wird aufgrund der Exonukleaseaktivität der Polymerase die *Probe* gespalten und somit Reporter-Farbstoff und Quencher-Farbstoff räumlich separiert. Dies führt zu einer kontinuierlichen Zunahme der *Reporter*-Fluoreszenz, welche direkt proportional zur Menge des Amplifikats ist (siehe Abb. 3.4).

3.5.4.2 Relative Quantifizierung

In der ersten Phase der Amplifikation einer PCR ist die Templatemenge begrenzt und die Wahrscheinlichkeit, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen, suboptimal. Weiterhin kommt hinzu, dass die Änderungen der Reporter-Farbstoff-Fluoreszenz unter dem Detektionslimit sind, d.h. ein exponentieller Anstieg des PCR-Produktes ist zwar vorhanden, kann aber noch nicht gemessen werden. Während in späteren Phasen der Amplifikation die Menge der Produkte (DNA, Pyrophosphat, Monophosphatnucleotide) derart ansteigt, dass die Reaktion durch diese gehemmt wird, häufige Produktfragmente miteinander hybridisieren, die Substrate langsam verbraucht werden und letztlich die Polymerase und Nukleotide durch die Hitze langsam zerstört werden. Ein exponentieller Anstieg findet nur in der mittleren Amplifizierungsphase statt. Für die genaue Quantifizierung ist der so genannte *Threshold* (Schwellenlinie) Zyklus massgebend (C_T). Es ist der Zyklus gemeint, bei der sich zum ersten Mal die gemessene Fluoreszenz deutlich vom Hintergrund unterscheidet. Dies bedeutet also, dass bei einer hohen Konzentration an Substrat weniger Zyklen notwendig sind, um eine signifikante Fluoreszenzmessung zu erhalten (Bustin, 2000). Für die Berechnung der mRNA-Menge wird also der Schnittpunkt der Fluoreszenzintensität jeder eingesetzten cDNA-Probe, die sogenannte Zykluszahl (C_T), mit Hilfe der

Schwellenlinie, welche im exponentiellen Bereich der Fluoreszenzdetektion liegen muss, ermittelt. In dieser Arbeit wurde die relative Quantifizierung zur Bestimmung der mRNA-Menge angewandt. Hierfür werden interne Kontrollen verwendet, um die Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA auszugleichen. Diese Kontrolle sollte leicht zu detektieren und ihre Expression sollte nicht während des Zellzyklus, zwischen Zelltypen oder aufgrund experimenteller Behandlung variieren. Für die Versuche dieser Arbeit erfolgte die Normalisierung entweder auf die HPRT- oder die β Actin- Expression.

Die relative Expression des Zielgens wird wie folgt berechnet:

$$\Delta C_T = C_T (\text{Zielgen}) - C_T (\beta\text{Actin oder HPRT})$$

$$F (\text{relative Expression}) = 2^{-\Delta C_T}$$

Anschließend wird die unterschiedliche Expression als n-fache Expression mit Hilfe des $\Delta\Delta C_T$ -Wertes angegeben. Wichtig bei diesem Verfahren ist eine gleiche Effizienz der beiden beteiligten PCR-Reaktionen. Die C_T -Werte werden hierbei einfach voneinander abgezogen (ΔC_T), die beiden ΔC_T - Werte der einzelnen Gruppen (A: Pristan-behandelte C57BL/6-Mäuse von B: Pristan-unbehandelten C57Bl/6-Mäusen) voneinander abgezogen ($\Delta\Delta C_T$) und in die Gleichung n-Fache Expression (Gruppe A zu Gruppe B) = $2^{-\Delta\Delta C_T}$ eingesetzt.

3.5.4.3 Praktische Durchführung der qRT-PCR

Reagenz	Volumen	PCR-Bedingungen	
H ₂ O	6µL	1. Zyklus	
Universal Mastermix (ABgene): MgCl ₂ , dNTPs Taq DNA- Polymerase, AmpEraseUNG, 10x TaqManBuffer	12,5µL	AmpErase Verdau	50°C: 2min
		Denaturierung	95°C: 15min
		Anlagerung	60°C: 1min
		Extension	70°C: 3min
		2-40. Zyklus	
Forward Primer (25µM)	0,5µL	Denaturierung	95°C: 15sec
Reverse Primer (25µM)	0,5µL	Anlagerung	60°C: 1min
<i>Probe</i> (4µM)	0,5µL	Extension	70°C: 30sec
cDNA	5µL		
Gesamtvolumen	25µL		

Tabelle 3.10: Durchführung der PCR für IL-6, IL-12p35, IL-12p40, GATA3 und Foxp3. Normalisiert wurde mit βAktin. Die Reaktionsansätze wurden über den Primus Thermo-Cycler 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) amplifiziert. Die *Probes* wurden jeweils mit dem *Reporter*-Farbstoff FAM und dem *Quencher*-Farbstoff TAMRA konjugiert.

Reagenz	Volumen	PCR-Bedingungen	
H ₂ O	6,25µL	1. Zyklus	
TaqMan Universal Mastermix–No UNG (Appl. BioSys.):	12,5µL	Denaturierung	95°C: 15min
		Anlagerung	60°C: 1min
		Extension	70°C: 3min
		2-50. Zyklus	
MgCl ₂ , dNTPs Taq DNA- Polymerase	1,25µL	Denaturierung	95°C: 15sec
TaqMan Geneexpression Assay (Appl. BioSys.):		Anlagerung	60°C: 1min
forward primer, reverse primer, <i>Probe</i>		Extension	70°C: 30sec
cDNA	5µL		
Gesamtvolumen	25µL		

Tabelle 3.11: Durchführung der PCR für IRF7, IFI-204, T-bet und BAFF. Normalisiert wurde mit HPRT. Die Reaktionsansätze wurden über den Primus Thermo-Cycler 9600 (MWG Biotech, Ebersberg) amplifiziert. Die *Probes* wurden jeweils mit dem *Reporter*-Farbstoff FAM und dem *Quencher*-Farbstoff TAMRA konjugiert.

3.6 Statistische Analyse

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel und Standardfehler des Mittels angegeben. Die Darstellung eines Versuchsansatzes mehrerer unabhängiger Experimente wird explizit in der Beschreibung des Bildes erwähnt. Um einen Gruppenvergleich durchführen zu können wurden mit Hilfe des Programmes *Prism 4.03* (Graph Pad, San Diego, USA) verschiedene Tests (*Student t-test*, *Mann Whitney-Test (U-Test)* und der *Fisher's exact test*) angewandt. Lag der Wert für die asymptotische Signifikanz unter $p < 0,05$, wurde ein Gruppenunterschied als signifikant bewertet und mit einem * angezeigt.

4 Ergebnisse

4.1 TLR7-abhängige Aktivierung von DC's durch U1snRNP-Komplexe *in vitro*

4.1.1 Internalisierung von U1snRNP mittels DOTAP

Wie in der Einleitung schon erwähnt besitzen 40% der SLE-Patienten im Serum Anti-snRNP-Antikörper (größtenteils gegen U1snRNP gerichtet), die mit snRNP Immunkomplexe bilden. Daher wurde die Hypothese untersucht, ob diese Auto-Immunkomplexe über Fc-Rezeptoren in DC's aufgenommen werden und so intrazelluläre Toll-like Rezeptoren aktivieren. Um U1snRNP in die Zelle zu transportieren und festzustellen, ob der Antikörper selbst an der Stimulation beteiligt ist, wurden U1snRNP und andere Stimuli zunächst (Abb. 4.1) mit dem kationischen Liposom DOTAP komplexiert und den aus dem Knochenmark mit Flt3L-generierten FLDC's zugegeben (siehe Material und Methoden). Die dsRNA PolyI:C komplexiert mit DOTAP (Ligand für TLR3 oder andere dsRNA erkennende Rezeptoren), die ssRNA PolyU komplexiert mit DOTAP (Ligand für TLR7) und CpG2216 (Ligand für TLR9) wurden als Positivkontrollen eingesetzt. Wie schon in Material und Methoden beschrieben sind die aus Knochenmark kultivierten FLDC's eine Mischkultur aus PDC's (TLR3 negativ, aber TLR7 und TLR9 positiv) und konventionellen DC's (TLR3, TLR7 and TLR9 positiv). Nach einer 40-stündigen Inkubation der FLDC's mit den oben beschriebenen Stimuli, wurde die Expression von CD86 im Durchflusszytometer bestimmt. Die Konzentration der Zytokine IL-12p40, IL-6 IFN- α und IFN- β wurde mittels ELISA im Überstand gemessen. In Abbildung 4.1 A ist die Expression von CD11b und CD86 in CD11c^{POS} Zellen dargestellt. Die CD11b^{POS} cDC exprimierten mehr CD86 auf der Zelloberfläche als die CD11b^{LOW} PDC nach Kultur mit Medium oder DOTAP alleine. Die Inkubation mit U1snRNP/DOTAP Komplexen führte zur Hochregulation der CD86-Expression in beiden Zellpopulationen. U1snRNP und DOTAP alleine hatten keinen Effekt auf die Zytokinexpression. Die Expression von CD86 in FLDC's hingegen stieg leicht an mit DOTAP alleine im Vergleich zur Kultur mit Medium ohne DOTAP.

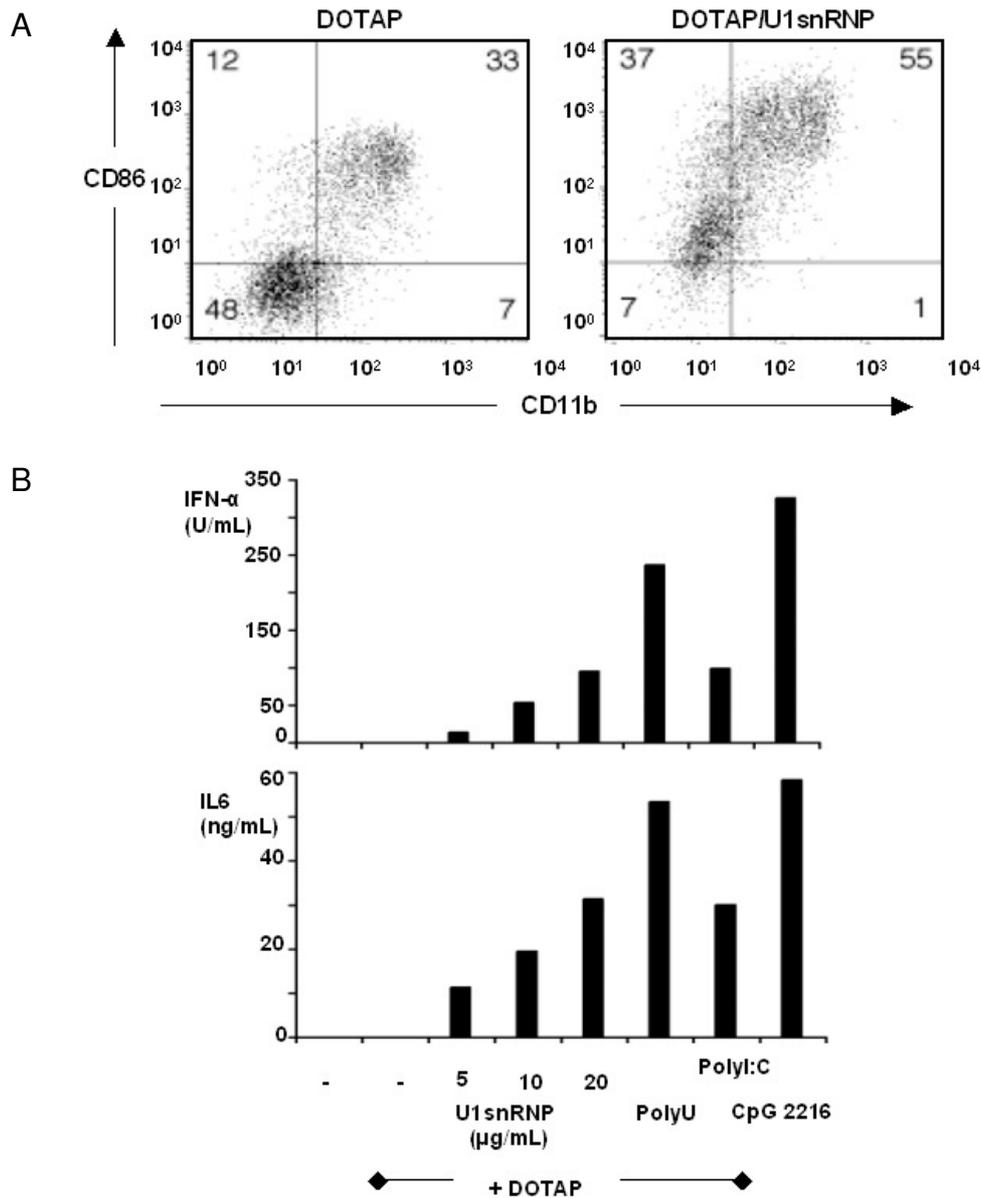


Abbildung 4.1: U1snRNP/DOTAP induziert IFN- α und IL-6 in FLDC. FLDC's wurden mit U1snRNP/DOTAP (5,10 und 20 μ g/mL U1snRNP und 12,5 μ g/mL DOTAP) oder mit den Kontrollstimuli (DOTAP/PolyU 20 μ g/mL, DOTAP/Poly:C 20 μ g/mL, CpG 2216 (0,5 μ M) inkubiert. A: Bestimmung der Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD86 (Aktivierungsmarker für DC's) CD11c^{pos} Zellen mittels Durchflusszytometrie. B: IFN- α und IL-6 wurden mittels ELISA in zellfreien Überständen gemessen. Die Abbildung zeigt eines von drei unabhängigen Experimenten.

IL-6 und IFN- α wurden durch U1snRNP im Komplex mit DOTAP (aber nicht durch U1snRNP alleine) dosisabhängig induziert (Abb. 4.1 B). Somit wird die Hypothese gestützt, dass eine Internalisierung von U1snRNP, unter Umgehung der Fc-Rezeptor-Bindung, notwendig und ausreichend ist, um eine Stimulation auszulösen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass der AK der in den Seren

detektierten Auto-Immunkomplexe nur der Internalisierung dient und für den stimulierenden Effekt der U1snRNP-Immunkomplexe keine Fc-vermittelte Koaktivierung notwendig ist.

4.1.2 Stimulierung der FLDC's mit U1snRNP-Immunkomplexen

Da im Serum von SLE-Patienten U1snRNP in Form von Auto-Immunkomplexen vorliegt, wurde versucht mit dem monoklonalen anti-Sm-Antikörper, welcher an das Smith-Protein von U1snRNP binden kann eine ähnliche Situation *in vitro* nachzustellen (Migliorini et al. 2005). Hierzu wurde U1snRNP vor Zugabe zu den FLDC's mit dem monoklonalen Anti-Sm-Antikörper Y12 inkubiert, um den Auto-Immunkomplex U1snRNP/Y12-AK zu erhalten.

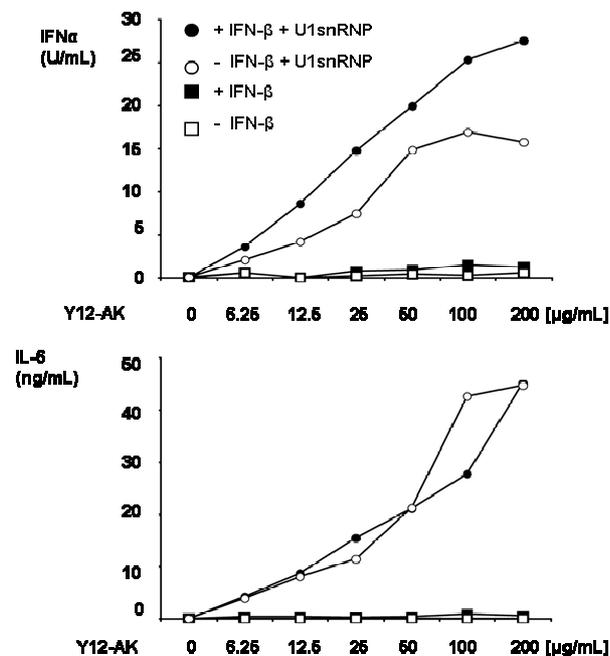


Abbildung 4.2: IFN-α und IL-6 Induktion in FLDC's durch den U1snRNP/Y12-Antikörper-Komplex. FLDC's (ein Teil der Zellen wurde 18 Stunden mit IFN-β vorinkubiert) wurden mit Immunkomplexen aus U1snRNP (20 µg/mL) und dem Anti-Sm Antikörper Y12 (6.25-200µg/mL) stimuliert. Y12 alleine wurde als Kontrolle ebenso getestet. Nach 36 Stunden Inkubation wurden ELISA's durchgeführt um IFN-α und IL-6 im Überstand zu messen. Dieses Ergebnis stammt aus einem von drei unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Ergebnissen.

Um die Induktion von IFN-α zu steigern, wurde ein Teil der FLDC's 18 Stunden vor Zugabe des U1snRNP/Y12-AK-Komplexes mit IFN-β inkubiert. Anhand der ELISA-Ergebnisse aus Abb. 4.2 ist deutlich zu beobachten, dass die Inkubation mit

steigender Y12-AK-Konzentration zusammen mit U1snRNP (20µg/mL) zu einem Anstieg der Sekretion von IL-6 und IFN-α führt (Abb. 4.2). Eine gesteigerte Produktion aufgrund der IFN-β-Zugabe konnte allerdings nur für IFN-α beobachtet werden.

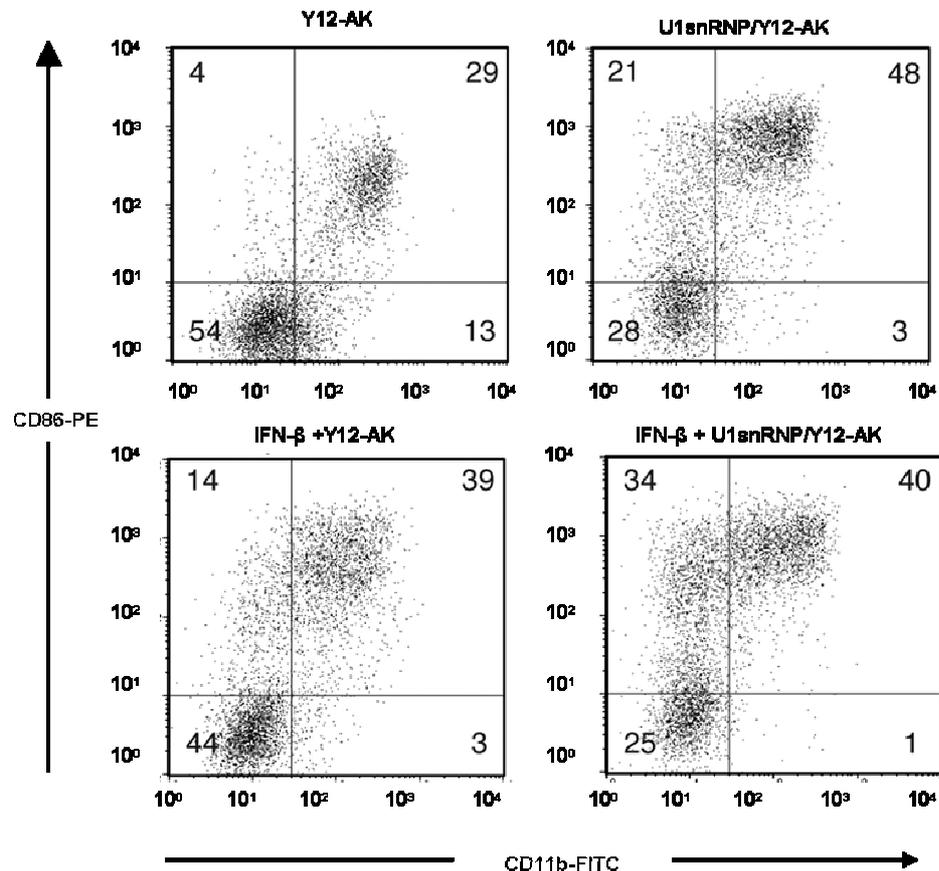


Abbildung 4.3: Hochregulation von CD86 in FLDC's durch den Auto-Immunkomplex U1snRNP/Y12. Den FLDC's (mit oder ohne IFN-β-Vorbehandlung) wurden der Y12-AK (50µg/mL) allein oder mit U1snRNP (20µg/mL) komplexiert zugegeben. Die Inkubationszeit betrug 40 Stunden. Die Expression der Oberflächenmarker CD11b und CD86 (Aktivierungsmarker für DC's) wurde mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Dieses Ergebnis stammt aus einem von vier unabhängigen Experimenten mit ähnlichem Ergebnis.

U1snRNP und der Y12-AK alleine wiesen hingegen auch in hohen Konzentrationen keine stimulierende Wirkung auf. Die bisher ermittelten Ergebnisse konnten auch hinsichtlich der Hochregulation des kostimulatorischen Moleküls CD86 bestätigt werden. Auch wenn bereits durch IFN-β-Zugabe der Prozentsatz der Zellen mit erhöhter CD86-Expression anstieg, war insbesondere bei den PDC's (CD11b^{low}/B220^{high}) eine Hochregulation von CD86 nach Inkubation mit U1snRNP/Y12-Immunkomplex sowohl in IFN-β-vorstimulierten als auch in

nicht-vorstimulierten Zellen zu beobachten. Ähnliche Resultate konnten mit U1snRNP im Komplex mit dem 7.13-Antikörper erzielt werden. Dieser Antikörper ist ebenfalls ein monoklonaler Anti-Sm-Antikörpern, bindet allerdings nur das D-*Coreprotein* (Y12 bindet B und D) aus dem Smith-Antigen und gehört wie Y12 zu den IgG3 Antikörpern. Mit U1snRNP/7.13-Immunkomplexen konnte in zwei unabhängigen Experimenten eine IL-6 und IFN- α -Induktion in den FLDC's nachgewiesen werden.

Um die Funktion von Fc-Rezeptoren für die stimulatorische Wirkung von U1snRNP/Y12-Immunkomplexen zu untersuchen, wurden FLDC's aus Knochenmarkzellen von Fc γ R- und Fc γ RII/III-defizienten Mäusen (C57Bl/6 Hintergrund) generiert und mit U1snRNP/Y12-Immunkomplex sowie CpG als Kontrollstimulus inkubiert.

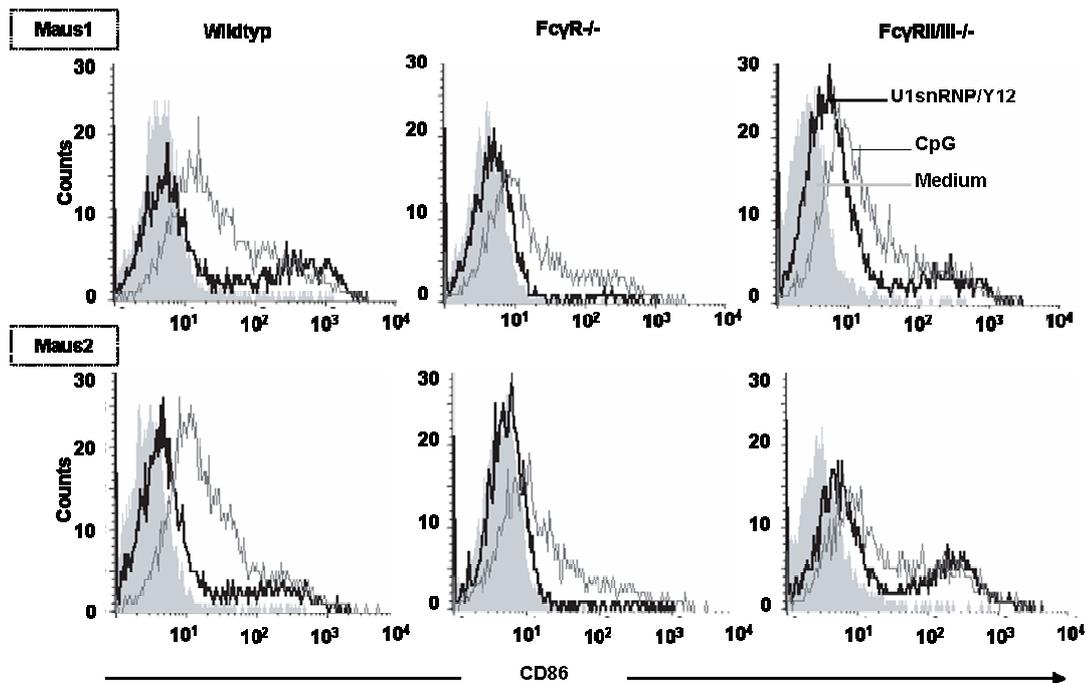


Abbildung 4.4: Hochregulation von CD86 - Funktion von Fc γ -Rezeptoren. PDC's (CD11b^{low}, CD11c^{pos}) von WT-, Fc γ R^{-/-} und Fc γ RII/III^{-/-}-defizienten Mäusen wurden mit U1snRNP (20 μ g/mL)-Y12 (100 μ g/mL)-Immunkomplexen (dicke schwarze Linie), CpG2216 (0,5 μ M, dünne schwarze Linie) stimuliert. Als Negativkontrolle wurde den FLDC's nur Medium zugegeben (grau schattiert). Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 wurde mittels Durchflusszytometrie bestimmt.

Die Analyse der CD86 Expression in CD11b^{low} PDC's nach 40-stündiger Inkubation bestätigte die Notwendigkeit der Expression von Fc-Rezeptoren für die

Aktivierung der PDC's durch U1snRNP/Y12-Immunkomplexe, da U1snRNP/Y12-Immunkomplexe in FcγR^{-/-}-PDC's nicht zur Hochregulation von CD86 führten, im Gegensatz zu WT-PDC's (Abb. 4.4). PDC's von FcγRII/III-defizienten Mäusen dagegen reagierten auf die Stimulierung mit U1snRNP/Y12-Immunkomplexen ähnlich wie WT-PDC's mit einer Steigerung der Expression von CD86 (Abb. 4.4). Die Aktivierung der PDC's durch CpG war in Abwesenheit von FcγR oder spezifisch FcRγII/III nicht beeinträchtigt. Die Ergebnisse legen die Schlussfolgerung nahe, dass ein anderer Fcγ-Rezeptor als FcγRII oder FcγRIII für die Internalisierung und Aktivierung der PDC's durch U1snRNP/Y12-Immunkomplexe entscheidend ist. Hierfür käme am ehesten FcγRI in Frage, für den die spezifische Bindung von IgG3-Immunkomplexen gezeigt wurde (Gavin et al. 1998). Um zu untersuchen, ob die RNA- oder die Proteinkomponente von U1snRNP ausschlaggebend für die intrazelluläre Stimulierung ist, wurde RNaseA zur Verdauung der U1snRNA aus U1snRNP verwendet. Zur Kontrolle der RNaseA-Aktivität wurde PolyU-RNA (TLR7-Ligand) der gleichen Prozedur unterzogen. Daraufhin wurden nach Vorinkubation des U1snRNP mit DOTAP oder Y12, die Stimuli zu den WT-FLDC's zur 36-stündigen Inkubation gegeben. Eindeutig ist zu erkennen, dass nach RNaseA-Abbau der U1snRNA bzw. PolyU-RNA die Induktion von CD86, IFN-α und IL-6 durch U1snRNP/DOTAP, U1snRNP/Y12-Immunkomplexe und PolyU-RNA deutlich abnimmt. Allerdings kann man, im Gegensatz zu verdautem PolyU, eine höhere Restaktivität für RNaseA verdautes U1snRNP beobachten. Dies könnte man auf die geschützte Lage der U1snRNA im U1snRNP-Proteinkomplex zurückführen. Die Internalisierung der U1snRNP-Auto-Immunkomplexe führte zur Hochregulation des Kostimulators CD86, die durch RNase-Vorbehandlung des U1snRNP nur teilweise reduziert wurde (Abb. 4.5). Vermutlich spielt die direkte Aktivierung der FLDC's durch U1snRNP/Y12-Immunkomplexe über Fc-Rezeptoren bei der CD86-Induktion eine größere Rolle als bei der Zytokininduktion. Die deutliche Reduktion der IFN-α- und IL-6-Induktion durch RNase-behandeltes U1snRNP legt den Schluss nahe, dass die U1snRNA innerhalb des U1snRNP durch einen intrazellulären RNA-Rezeptor erkannt wird.

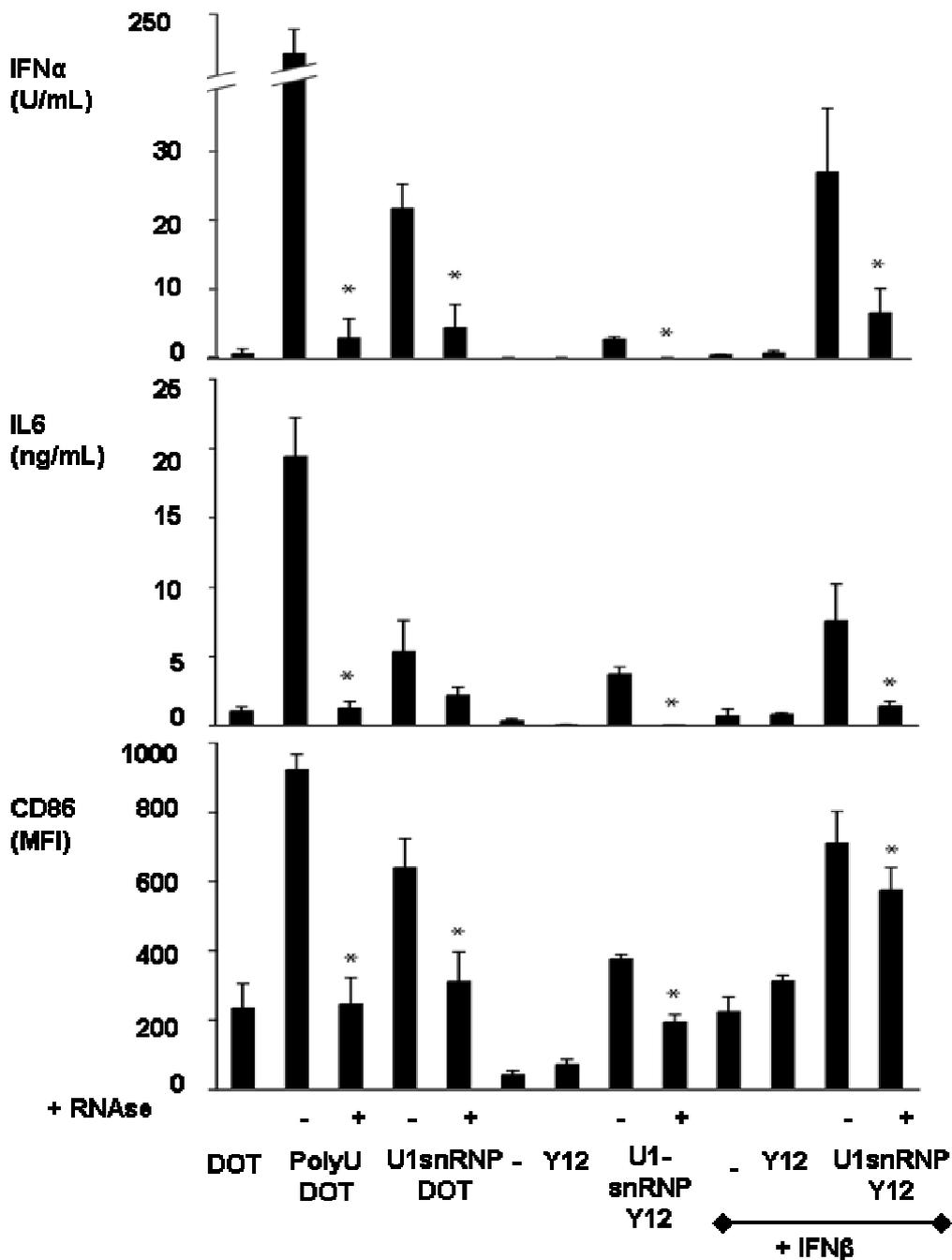


Abbildung 4.5: RNase behandelte U1snRNP führt weder mit DOTAP noch als Immunkomplex zur Aktivierung von FLDC. RNaseA behandeltes oder RNaseA unbehandeltes PolyU und U1snRNP (20µg/mL) wurde mit DOTAP bzw. U1snRNP mit Y12 (50µg/mL) komplexiert. FLDC (mit oder ohne IFN-β-Vorbehandlung) wurden mit diesen Stimuli aktiviert. Zytokinproduktion wurde mittels ELISA und die CD86-Expression mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen. Sterne markieren signifikante Unterschiede nach RNaseA Behandlung der Stimuli. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der Experimente (n=3).

4.1.3 U1snRNP löst eine Aktivierung sowohl TLR7-abhängiger als auch TLR7-unabhängiger Signalwege aus

Wie in der Einleitung bereits beschrieben (Abb. 1.2) besteht U1snRNA aus dsRNA- und ssRNA-Abschnitten. Daher kamen sowohl TLR3 (dsRNA als Ligand) als auch TLR7 (ssRNA als Ligand) als endosomale RNA-Erkennungsrezeptoren in Frage. Aus diesem Grund wurden FLDC's aus Knochenmarkszellen von TLR3^{-/-}- und TLR7^{-/-}-Mäusen hergestellt und mit U1snRNP im Komplex mit DOTAP oder als Immunkomplex mit Y12-AK stimuliert. TLR3^{-/-}-FLDC's zeigten keinen Defekt in der IFN- α und IL-6 Produktion, sowie in der Hochregulation von CD86 nach Inkubation mit U1snRNP/Y12-Immunkomplexen, PolyU-RNA/DOTAP und CpG2216, während die Antwort auf den TLR3-Ligand PolyI:C deutlich reduziert war (Abb. 4.6 A/B). Dagegen nahm die Produktion von IFN- α und IL-6, sowie die CD86-Expression in den FLDC nach Stimulation mit U1snRNP/Y12-Immunkomplexen in Abwesenheit von TLR7 signifikant ab (Abb. 4.6 A/B). Dies war auch beim TLR7 Liganden PolyU zu beobachten und führte zu der Annahme, dass hauptsächlich die TLR7-Erkennung der U1snRNA innerhalb des U1snRNP-Proteinkomplexes für die Induktion von IFN- α und IL-6 durch U1snRNP/DOTAP und U1snRNP/Y12-Immunkomplexe verantwortlich ist. In TLR7^{-/-}-FLDC's war jedoch nach U1snRNP/DOTAP-Stimulierung eine Restinduktion für IFN- α , IL-6 und insbesondere für CD86 zu beobachten (Abb. 4.6). Auch die Antwort auf PolyU zeigte im Gegensatz zum synthetischen TLR7-Liganden Imidazoquinolin/R848 keine vollständige Abhängigkeit von TLR7 (Abb. 4.6).

Dies führt zu der Annahme, dass es noch andere Erkennungsmechanismen für ssRNA gibt. Die im Vergleich zu U1snRNP/Y12 höhere Restaktivität von U1snRNP/DOTAP in TLR7^{-/-}-FLDC könnte vielleicht daher rühren, dass der Immunkomplex über Y12 direkt ins Endosom gelangt, während DOTAP die Stimuli auch in andere Zellkompartimente, wie z. B. das Zytosol transportieren kann, wo andere zytosolische RNA-Erkennungsrezeptoren (RIG-I, Mda5) aktiviert werden können.

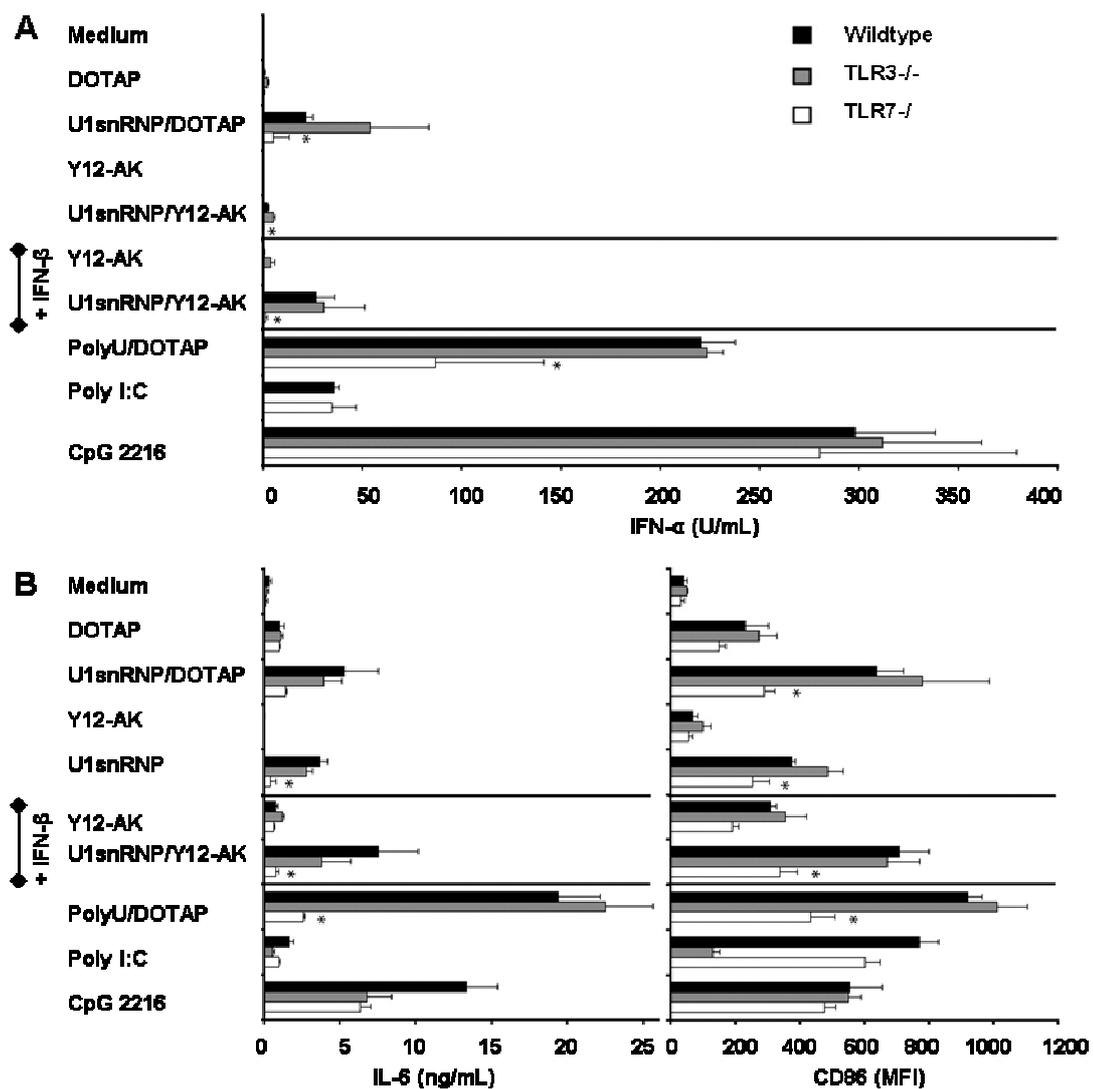
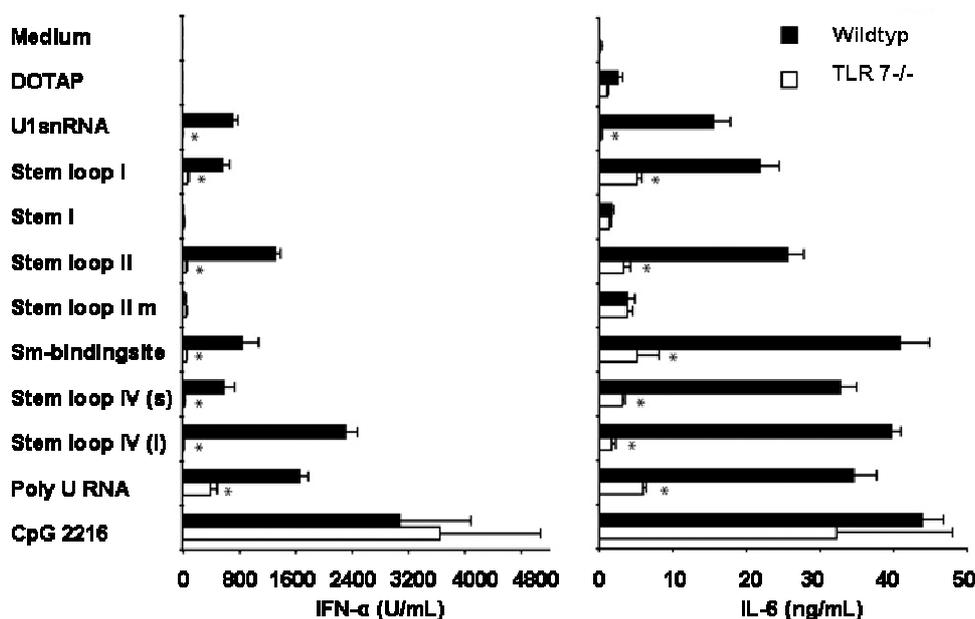


Abbildung 4.6: Aktivierung der FLDC's durch U1snRNP in Abhängigkeit von TLR7- und TLR3. FLDC's wurden aus dem Knochenmark von WT-, TLR3^{-/-}- und TLR7^{-/-}-Mäusen (C57BL/6-Hintergrund) gewonnen und mit den angezeigten Stimuli (10µg/mL U1snRNP und PolyU mit 12,5µg/mL DOTAP; 20µg/mL U1snRNP mit 50µg/mL Y12-AK; 0,1µM CpG2216, 20µg/mL PolyI:C) für 36 Stunden inkubiert. Ein Teil der FLDC's wurde mit IFN-β (1000U/mL) für 18 Stunden vorbehandelt. IFN-α (A) und IL-6 (B) wurden im Überstand mittels ELISA gemessen. Die Hochregulation von CD86 wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 wird mit der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) angezeigt. Die Ergebnisse zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung der Experimente (n=3). Die Sterne zeigen signifikante Unterschiede zwischen TLR7^{-/-}- und WT- Zellen an (p<0,05, Student t-test).

4.1.4 Aktivierung der FLDC's mit isolierter U1snRNA

Die bisherigen Ergebnisse legen die Interpretation nahe, dass U1snRNA aus dem U1snRNP verantwortlich für die Stimulierung der FLDC's über TLR7 ist. Um diese

Hypothese zu testen, wurde intakte U1snRNA aus dem U1snRNP-Proteinkomplex aufgereinigt.



Stem loop I	ACCAUGAUCACGAAGGUGGU	4U
Stem I	GCAGGGGAGAUACCA	1U
Stem loop II	UAUCCAUUGCACUCCGGAUG	6U
Stem loop II (m)	UAUCCAUUGCAmCUCGGAUG	6U
Sm-binding site	AUAAUUUGUGGUAGU	7U
Stem Loop IV (s)	CUGCGUUCGCGCUU	5U
Stem Loop IV (l)	GGGGACUGCGUUCGCGCUUCCCU	7U

Abbildung 4.7: TLR7-abhängige Zytokinanantwort auf U1snRNA und daraus abgeleitete Oligoribonukleotide. Die isolierte U1snRNA und die U1snRNA-Oligoribonukleotide (10 µg/mL bzw. 0,2 µM) aus verschiedenen Abschnitten der U1snRNA-Sequenz und 10µg/mL PolyU-RNA wurden im Komplex mit DOTAP (12,5 µg/mL) zu den WT- und TLR7^{-/-}-FLDC's zur 36-stündigen Inkubation gegeben. 12,5 µg/mL DOTAP alleine und 0,5 µM CpG 2216 dienten als Kontrollen. IFN-α und IL-6 wurden im Überstand mittels ELISA gemessen. In dieser Abbildung werden Mittelwerte und ihre Standardabweichung dargestellt. Die Sterne markieren signifikante Unterschiede zwischen TLR7^{-/-}- und WT-Zellen (p<0,05, Student t-test).

Zur Ermittlung, welche Abschnitte der U1snRNA besonders stimulierend wirken, wurden verschiedene Abschnitte aus *Stem Loop I, II* (nativ mit 2'O-Methylierung oder ohne Methylierung), *IV* (kürzerer (s) und längerer (l) Abschnitt) und der Sm-

Bindungsstelle ausgesucht und synthetisch hergestellt (Abb. 4.7; Curevac, Tübingen, Deutschland). Isolierte U1snRNA und U1snRNA-Oligoribonukleotide (ORN) wurden mit DOTAP komplexiert und den WT- bzw. TLR7^{-/-}-FLDC's zugegeben. IFN- α und IL-6 wurden nach 36 Stunden im Überstand gemessen. Die vollständige native U1snRNA zeigte eine starke TLR7-abhängige IFN- α - und IL-6-Induktion. U1snRNA-Oligoribonukleotide zeigten ebenfalls eine größtenteils TLR7-vermittelte IFN- α - und IL-6-Induktion, vergleichbar mit PolyU-RNA (Abb. 4.7). Dabei fiel auf, dass das *Stem I*-ORN, das nur ein Uridin besitzt keine Stimulation auslöste. Das Einfügen der in der U1snRNA natürlich vorkommenden 2'-O-Methylierung des Adenosins im *Stem loop II (m)* führte zum Verlust der oben beschriebenen Induktion von IFN- α und IL-6. Diese 2'-O-Methylierung des Adenosins ist die Einzige im gesamten U1snRNA außerhalb des überwiegend methylierten 5'-Endes. Sie bewirkt im Oligoribonukleotid *Stem loop II (m)*, aber nicht in der kompletten U1snRNA, den Verlust der Stimulation (Abb 4.7). Dies führte zu der Annahme, dass die Methylierung innerhalb der U1snRNA zwar zur Reduzierung, aber nicht zu einer vollständigen Inhibierung der Stimulation führt. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die immunstimulatorische Wirkung der U1snRNP-Immunkomplexe in FLDC's auf die direkte Aktivierung von TLR7 durch U1snRNA zurückgeführt werden kann. U1snRNA stellt daher einen neu definierten endogenen Liganden für TLR7 dar.

4.1.5 Verteilung der Zytokinproduktion in murinen FLDC's

Alle bisher beschriebenen Experimente wurden mit FLDC's durchgeführt. Diese aus murinen Knochenmarkzellen durch Kultur mit Flt3L generierten DC's bestehen aus PDC's (CD11b^{low}/B220^{high}) und cDC's (CD11b^{high}/B220^{low}). Um festzustellen welche der Subtypen in den zuvor gezeigten Ergebnissen für die Produktion von IFN- α oder IL-6 verantwortlich sind, wurden FLDC's mittels durchflusszytometrischer Sortierung getrennt (Abb. 4.8 B) und mit U1snRNP-Immunkomplexen stimuliert (Abb. 4.8 A).

Wie in Abb. 4.8 A gezeigt, beschränkt sich die Produktion von IFN- α nach Stimulation mit U1snRNP/Y12-Immunkomplexen auf die PDC-Population, während IL-6 sowohl von PDC als auch von cDC produziert wird. Die IL-6-Antwort war in cDC's sogar höher als in PDC.

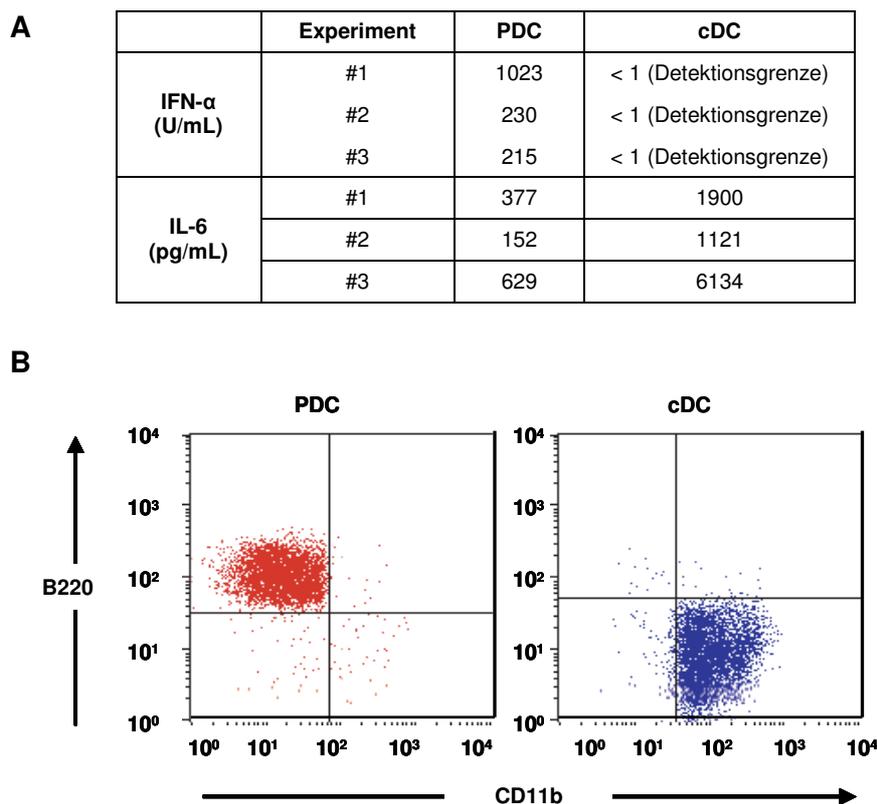


Abbildung 4.8: Stimulation isolierter PDC's und cDC's aus Flt3 generierten DC (FLDC)-Kulturen. Mit einer Reinheit von über 95% wurden FLDC's in PDC's und konventionelle DC's (siehe Methoden) getrennt (B). Die getrennten Zellpopulationen wurden mit dem Immunkomplex U1snRNP (20 μ g/mL)/Anti-Sm-Antikörper Y12 (100 μ g/mL) 36 Stunden stimuliert. IFN- α wurde über ein ELISA-Kit (PBL Laboratories, Piscataway, USA) bestimmt. IL-6 wurde mittels ELISA bestimmt. Gezeigt werden die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten (A).

4.1.6 Die Auswirkungen der Vorstimulierung der FLDC mit IFN- β

Wie schon in den vorherigen Versuchen beobachtet, erhält man durch die Vorinkubation der FLDC's mit IFN- β eine Steigerung der IFN- α -Produktion nach Stimulierung mit U1snRNP/Y12 Komplexen (Abb. 4.9, links). Daher wurden FLDC's hinsichtlich der Expression des Interferonregulierenden Faktors 7 (IRF7) und auch TLR7 auf mRNA-Ebene mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Wie in Abbildung 4.9 deutlich zu sehen ist, stieg in den FLDC's wie erwartet die mRNA-Expression von IRF7, aber auch von TLR7 nach Inkubation mit IFN- β an.

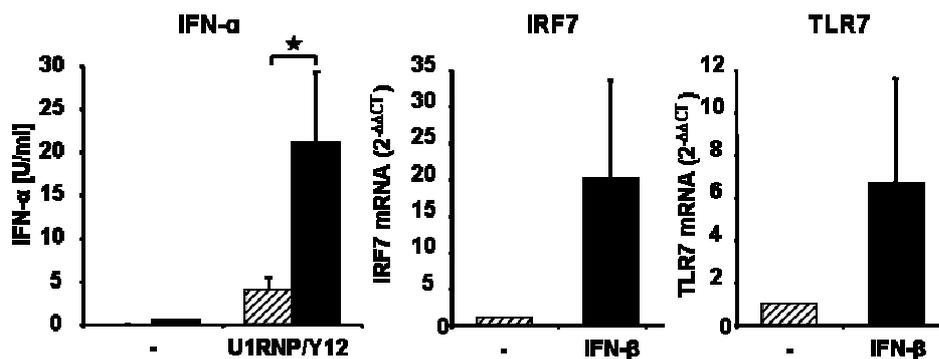


Abbildung 4.9: IFN- α -Produktion und Hochregulation der IRF7- und TLR7-mRNA-Expression in FLDC's nach Inkubation mit IFN- β . FLDC's wurden 18 Stunden mit IFN- β inkubiert und dann mit dem Immunkomplex U1snRNP (20 μ g/mL)/Anti-Sm-Antikörper Y12 (100 μ g/mL) 36 Stunden lang stimuliert. IFN- α wurde im Überstand mittels ELISA bestimmt (links). Die relative mRNA-Expression von IRF7 und TLR7 wurde mit quantitative RT-PCR bestimmt (mitte, rechts). In dieser Abbildung werden Mittelwerte und ihre Standardabweichung dargestellt. Die Sterne weisen auf signifikante Unterschiede zwischen TLR7^{-/-}- und WT-Zellen hin ($p < 0,05$, Student t-test).

4.2 TLR7 vermittelte Zytokininduktion durch U1snRNP *in vivo*

vivo

Die bisherigen *in vitro* Versuche zeigten, dass U1snRNP als Immunkomplex oder mit DOTAP komplexiert FLDC in Abhängigkeit von TLR7 stimulieren kann. Es stellte sich daher die Frage, welche Auswirkungen U1snRNP-Immunkomplexe im lebenden Organismus haben und ob sich die *in vitro* Ergebnisse *in vivo* bestätigen lassen. Daher wurde U1snRNP (50 μ g/Injektion) komplexiert mit DOTAP (30 μ L/Injektion) oder U1snRNP alleine, sowie PolyU-RNA (35 μ g/Injektion) komplexiert mit DOTAP und in WT- bzw. TLR7^{-/-}-Mäuse intravenös (200 μ L Gesamtvolumen) injiziert. Nach Injektion wurden jeweils 50 μ L Blut zur Serumgewinnung nach 1h, 2h, 3h und 6h entnommen. Mittels ELISA wurden die Zytokine IL-6 und IL-12p40 gemessen. Typ I IFN wurde mittels einem Bioassay ermittelt. Abbildung 4.10 zeigt, dass eine Injektion mit U1snRNP/DOTAP zu einer TLR7-vermittelten Induktion von Typ I IFN (Abb. 4.10 A) und den inflammatorischen Zytokine IL-6 und IL-12p40 führte (Abb. 4.10 B/C). Die Injektion von U1snRNP alleine zeigte keine Wirkung. Ebenso zu sehen ist ein Maximum bei 3 Stunden und ein Abfallen des Signals schon 6 Stunden nach Injektion. Allerdings scheint Typ I Interferon im Serum der WT-Mäuse nicht so schnell abzusinken wie

die Zytokine IL-6 und IL-12p40 (Abb. 4.10 A-C). Auch DOTAP/PolyU führte in den TLR7^{-/-}-Mäusen nicht zur Zytokininduktion.

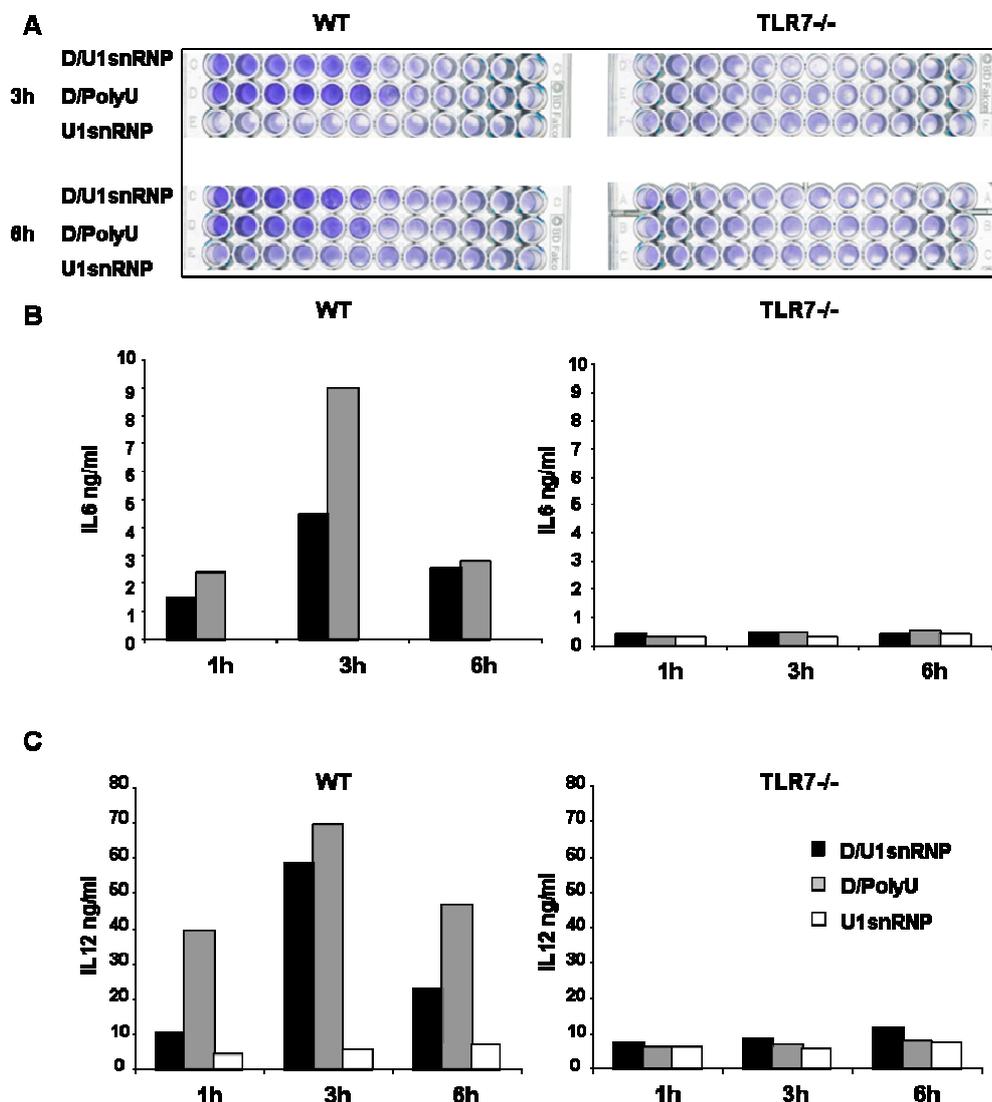


Abbildung 4.10: U1snRNP/DOTAP-Injektion *in vivo*. WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen wurde 200µL PBS mit U1snRNP (50µg/Injektion) DOTAP (30µL/Injektion) in die Schwanzvene injiziert. Das zu verschiedenen Analysezeitpunkten gewonnene Serum wurde auf Typ I Interferon mittels Bioassay (A; siehe Material und Methoden) getestet. IL-6 und IL-12p40 wurden mit Hilfe eines ELISA's ermittelt (B, C). Ergebnisse eines repräsentativen Experiments sind dargestellt.

U1snRNP löst somit ähnlich wie der bereits bekannte TLR7-Ligand PolyU-RNA eine TLR7-vermittelte Immunantwort *in vivo* aus. Dies setzt die Komplexbildung mit kationischem Lipid voraus. Im Gegensatz zu den *in vitro*-Ergebnissen konnte keine signifikante TLR7-unabhängige Induktion von IFN-α, IL-6 und IL-12p40 beobachtet werden.

4.3 TLR7-abhängige anti-snRNP-Antikörper-Produktion und Glomerulonephritis im Pristan-induzierten SLE- Modell

4.3.1 Bildung von Autoantikörpern im Pristan-induzierten SLE Modell in WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen

WT- und TLR7^{-/-}-Mäuse wurden einmalig mit Pristan intraperitoneal injiziert, um die Bedeutung von TLR7 für die Entstehung des SLE *in vivo* zu untersuchen. In den folgenden Monaten wurden die Mäuse gewogen, der Gesundheitszustand beobachtet und nach 2, 4, 5, 6 und 7 Monaten wurde ihnen Blut abgenommen. Die Mäuse zeigten keine signifikante Gewichtsabnahme, das äußere Erscheinungsbild war normal und es ließ sich keine tastbare Vergrößerung der Lymphknoten feststellen. 7 Monate nach Injektion mit Pristan wurden alle Mäuse getötet um weitere Analysen hinsichtlich der Immunzellen, Zytokine, Antikörper und Histopathologie durchführen zu können. Mit dem Ziel Autoantikörper im Serum zu analysieren, wurde zunächst ein Screening mittels indirekter Immunfluoreszenz auf HEp-2-Zellen durchgeführt. Erste Hinweise auf Antigene der Autoantikörper können aus dem Muster der Fluoreszenz (siehe Material und Methoden) erhalten werden. Mit Hilfe der ANA-HEp-2-Färbung wurden die Seren (Analysezeitpunkt: 7 Monate, Abb. 4.11 A und B) in 20-facher Verdünnung auf das Vorkommen und die Verteilung von Anti-nukleären Antikörpern geprüft. Abb. 4.11 A ist stellvertretend für das Gesamtergebnis. Alle WT-Seren zeigten deutlich grobe Sprengel im Zellkern, welche ein Hinweis für Antikörper gegen snRNPs und Sm-Proteine sind. Im Gegensatz dazu zeigten nur vier der TLR7^{-/-}-Seren dieses Muster, und nur in schwacher Intensität mit wenig Sprengel (Abb. 4.11 A/B). Es war daher anzunehmen, dass in Pristan-behandelten TLR7^{-/-}-Mäusen weitaus geringere Mengen an Anti-snRNP und Anti-Sm-Antikörpern zu finden sind. Die homogene Anfärbung des gesamten Zellkerns, die durch anti-dsDNA-AK zustandekommt, wurde gleichermaßen mit den Seren der WT- und TLR7^{-/-}-Mäuse beobachtet. Die

homogene Färbung war bei den WT-Seren durch die nukleäre Sprengelung überlagert und daher nicht genau zu quantifizieren.

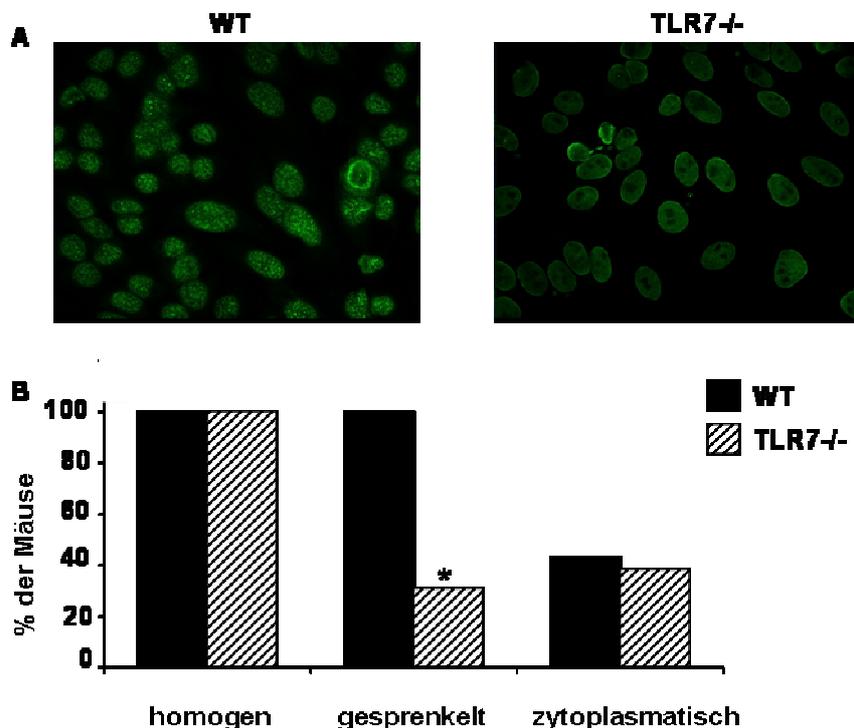


Abbildung 4.11: ANA-HEp-2-Färbung der Seren von Pristan injizierten WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen. Nachweis antinukleärer Antikörper in den Seren von WT (n = 14)- und TLR7^{-/-} (n = 13)-Mäusen 7 Monate nach Injektion von Pristan mittels Immunofluoreszenzfärbung von HEp-2-Zellen. Abbildung A links zeigt eine eindeutig gesprenkelte Färbung, die die homogene Färbung im ganzen Nukleus überlagert. Die Abbildung A rechts zeigt hingegen nur eine homogene Färbung des Zellkerns mit einzelnen Aussparungen. Die HEp-2-Zellfärbung wurde in drei verschiedene Muster eingestuft B: homogene Färbung des Zellkerns (Antigene: DNA und Histone), gesprenkelter Nukleus (Antigene: Sm und snRNP), Färbung des Zytoplasmas (Antigene: ribosomole RNA und Protein). * p<0,05, Fisher's Exact Test

Etwa 40% der WT- und TLR7^{-/-}-Seren zeigten in der HEp-2-Zellfärbung eine zytoplasmatische Fluoreszenz. Abbildung 4.11 zeigt beispielhaft eine typische HEp-2-Zellfärbung durch WT- und TLR7^{-/-}-Seren (Abb 4.11 A) sowie die Klassifizierung der Färbemuster, die bei einzelnen Seren der WT- und TLR7^{-/-}-Mäuse zu beobachten waren (Abb 4.11 B).

Um zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Pristan-Injektion die Autoantikörperkonzentration im Serum zu ermitteln, wurden spezifische ELISA's (siehe Material und Methoden) verwendet. In 50% der WT-Mäuse wurden Anti-snRNP/Sm-Antikörper in Konzentrationen über 100µg/mL nachgewiesen (die ersten ab dem

vierten Monat nach Injektion), während in den TLR7^{-/-}-Mäusen zu keinem Zeitpunkt eine höhere Konzentration als 25µg/mL gemessen wurde (Abb. 4.12 A). Weiterhin wurden in fünf der 14 WT-Mäuse hohe Anti-snRNP/Sm-Antikörper-Konzentrationen über 1000µg/mL nachgewiesen.

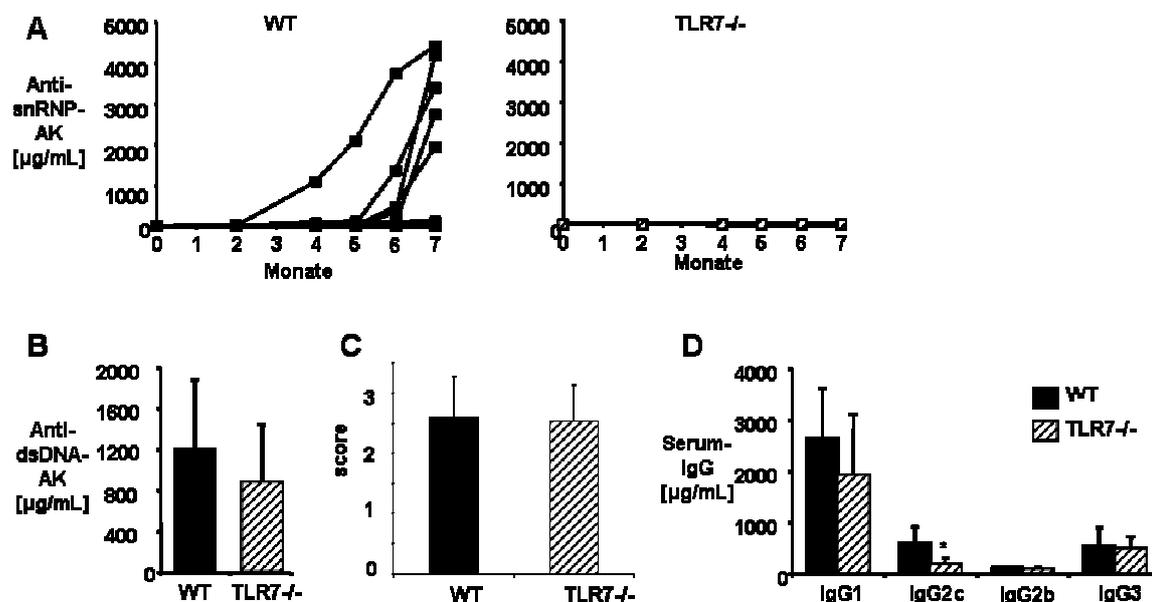


Abbildung 4.12: Konzentrationsbestimmung der Anti-snRNP/Sm- und Anti-dsDNA-Antikörper in Seren von Pristan-injizierten WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen. Die Anti-snRNP-Antikörper-Konzentration der Seren von Pristan-injizierten WT (n=14)- und TLR7^{-/-} (n=13)-Mäusen wurden mittels ELISA gemessen (A). Auch über ELISA wurde die Anti-dsDNA-AK-Konzentration (B) ermittelt. Ein weiterer Nachweis der dsDNA-Antikörper wurde mittels dem *crithidia luciliae*-assay (Bio-Rad Laboratories, Redmond, USA) durchgeführt (C). Die Differenzierung der verschiedenen IgG-Isotypen im Serum wurde mit einem ELISA-Kit (BETHYL Laboratories Inc., TX, USA) durchgeführt (D). *p-Wert < 0,05 Student unpaired t-test.

Die Anti-dsDNA-AK-Konzentration zeigte im Gegensatz hierzu keinen signifikanten Unterschied zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen bei der Bestimmung im ELISA (Abb. 4.12. B). Auch der *crithidia luciliae*-Immunfluoreszenztest zum Nachweis von dsDNA-Antikörpern ergab keinen Unterschied zwischen WT- und TLR7-defizienten Mäusen (Abb. 4.12 C). Zusätzlich wurden zum Zeitpunkt sieben Monate nach Pristan-Injektion die Konzentration der verschiedenen Isotypen der Gesamt-IgG-Antikörper im ELISA gemessen (Abb. 4.12 D). Es wurde nur für IgG2c ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen festgestellt. Bei allen anderen Isotypen konnte kein Unterschied detektiert werden.

4.3.2 Renale Antikörper- und Komplement-Ablagerungen und Glomerulonephritis-Aktivität

Beim SLE lagern sich zirkulierende Immunkomplexe an den Gefäßwänden verschiedener Organe, insbesondere in glomerulären Kapillaren der Niere, ab und lösen dadurch eine Entzündungsreaktion einerseits durch Auto-Immunkomplex-aktivierte Komplementkaskaden und andererseits durch Fc-Rezeptor- und Chemokinvermittelte Leukozyteninfiltration aus.

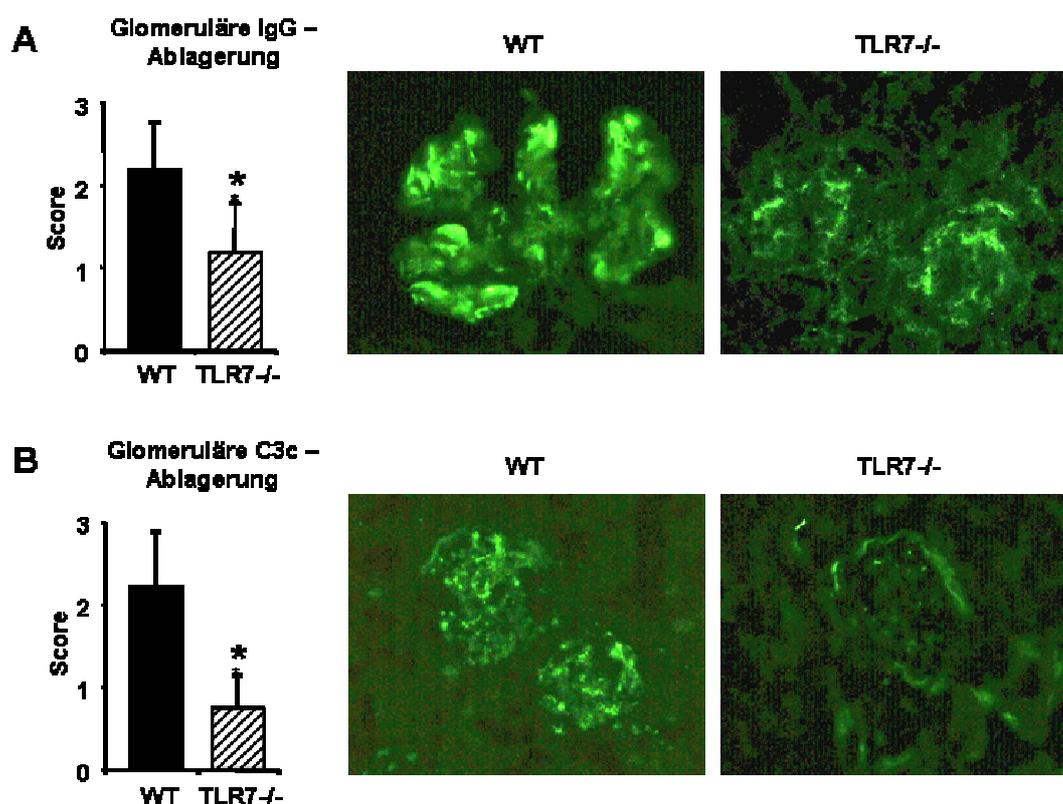


Abbildung 4.13: IgG und Komplementablagerungen in den Glomeruli von Pristan-behandelten WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen. Sieben Monate nach Injektion von Pristan wurden Ablagerungen von IgG und C3c in den Gefrierschnitten von WT(n=14)- und TLR7^{-/-} (n=13)-Mäusen mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Gezeigt werden repräsentative Immunfluoreszenzfärbungen mit einer 400fachen Vergrößerung (A/B). Für die semiquantitativen Auswertungen der Ablagerungen von IgG und Komplementprotein C3c wurde eine Skala von 0-3 verwendet (A und B; Diagramme links). *p<0,05, *Mann Whitney Test*

Zentrale Bedeutung für den Verlauf der Erkrankung hat die renale Schädigung (Stoll et al. 2000). Diese Vorgänge finden im Pristan-induzierten SLE-Mausmodell ebenfalls statt und geben einen Hinweis darauf, inwiefern das Fehlen von TLR7 auf den Krankheitsverlauf Einfluss nimmt. IgG- und C3c-Komplement-Ablagerungen in den Glomeruli wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen an

Gefrierschnitten der Nieren sieben Monate nach Pristan-Injektion detektiert (Abb. 4.13). Die semiquantitative Bewertung (=score) wurde auf einer Skala von 0-3 vorgenommen und blind (ohne Wissen der Gruppierungen) durchgeführt. Ein signifikanter Unterschied zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen ist für die IgG-Ablagerung (Abb. 4.13 A), aber noch deutlicher für die Komplementablagerung (Abb. 4.13 B) erkennbar. Die Fluoreszenzbilder in Abbildung 4.13 stehen stellvertretend für das Gesamtergebnis.

Die histologischen Veränderungen einer Glomerulonephritis in den Pristan-behandelten Mäusen wurden mit Hilfe der PAS-Färbung und nach einem in der Literatur (Austin et al. 1984) vorgegebenen Index (*engl: Score: 0-18*) quantitativ bewertet.

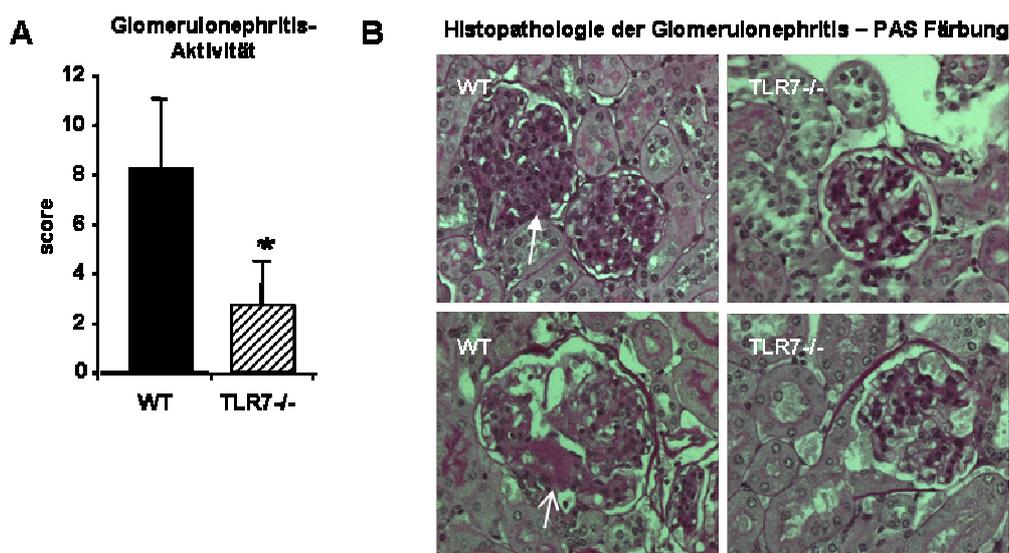


Abbildung 4.14: Pristan-induzierte Glomerulonephritis in WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen. Sieben Monate nach Injektion von Pristan wurde die Glomerulonephritisaktivität in WT(n=14)- und TLR7^{-/-} (n=13)-Mäusen mittels einer PAS-Färbung an Paraffinschnitten der Nieren nachgewiesen. A: Wie in den Methoden beschrieben wurde mit Hilfe eines Bewertungsindex von 1-18 die Nephritisaktivität (*engl: scoring system*) ausgewertet. *p<0,05, *Mann Whitney Test*. Gezeigt werden repräsentative Darstellungen (200fache Vergrößerung). Der weiße Pfeil oben links deutet auf eine extrakapillare Hyperproliferation der Mesangiumzellen und unten links eine Nekrose im Glomerulum.

Hierbei sei angemerkt, dass keine der Mäuse einen so hohen Aktivitätsindex erreichte, wie das bei MRL/Mp^{lpr/lpr}-Mäusen der Fall ist, welche ab der 12. Woche histologische Veränderungen, im Sinne einer progredienten Glomerulonephritis

entwickeln. Allerdings konnten sieben Monate nach Pristan-Injektion bei den WT-Mäusen das charakteristische Bild einer mesangioproliferativen Glomerulonephritis, sowie vereinzelte segmentale Nekrosen in den Glomeruli beobachtet werden. In TLR7^{-/-}-Mäusen hingegen wurde nur eine milde Form der Glomerulonephritis beobachtet. (Abb. 4.14).

4.3.3 Immunantwort von WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen im Pristan-induzierten SLE-Modell

Es zeigte sich kein wesentlicher Unterschied im Gewicht der Milzen und der Lymphknoten zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen. Die FACS-Studien der nach sieben Monaten getöteten Mäuse zeigten ebenfalls keine relevanten Unterschiede in der Verteilung der verschiedenen Zelltypen der Milz. Die einzigen signifikanten Unterschiede zeigten sich beim Anteil der CD4⁺-T-Zellen und deren Aktivität. WT-Mäuse zeigten einen höheren Prozentsatz von CD4⁺-T-Zellen, wobei diese mehr CD69 exprimierten als CD4⁺-T-Zellen in TLR7^{-/-}-Mäusen. Der Prozentsatz der CD11c⁺cDC's in TLR7^{-/-}-Milzzellen war geringfügig vermindert (Abb. 4.15 C). Im Gegensatz dazu war ein leichter Anstieg des Prozentsatzes der B Zellen in Abwesenheit von TLR7 zu verzeichnen (Abb. 4.15 B). Allerdings ging dieser nicht mit einer höheren Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 einher (Abb. 4.15 F).

Eine leichte Erhöhung des Anteils der CD4⁺- und CD25⁺-T-Zellen in den TLR7^{-/-}-Milzzellen ließ darauf schließen, dass in TLR7-defizienten Mäusen der Anteil an regulatorischen T-Zellen höher sein könnte als bei den WT-Mäusen (Abb. 4.15 D). Genexpressions-Studien der Milz hinsichtlich Foxp3, einem Marker für regulatorische T-Zellen, bestätigten diese geringe, jedoch nicht statistisch signifikante Erhöhung. Die Zusammensetzung der Zellen aus der *Peritoneal Lavage* zeigte keine Unterschiede zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen auf. Ähnliche Ergebnisse für die Zellverteilung in Milz und Intraperitonealzellen wurden auch 6 Wochen nach Pristan-Injektion (n=6) erzielt.

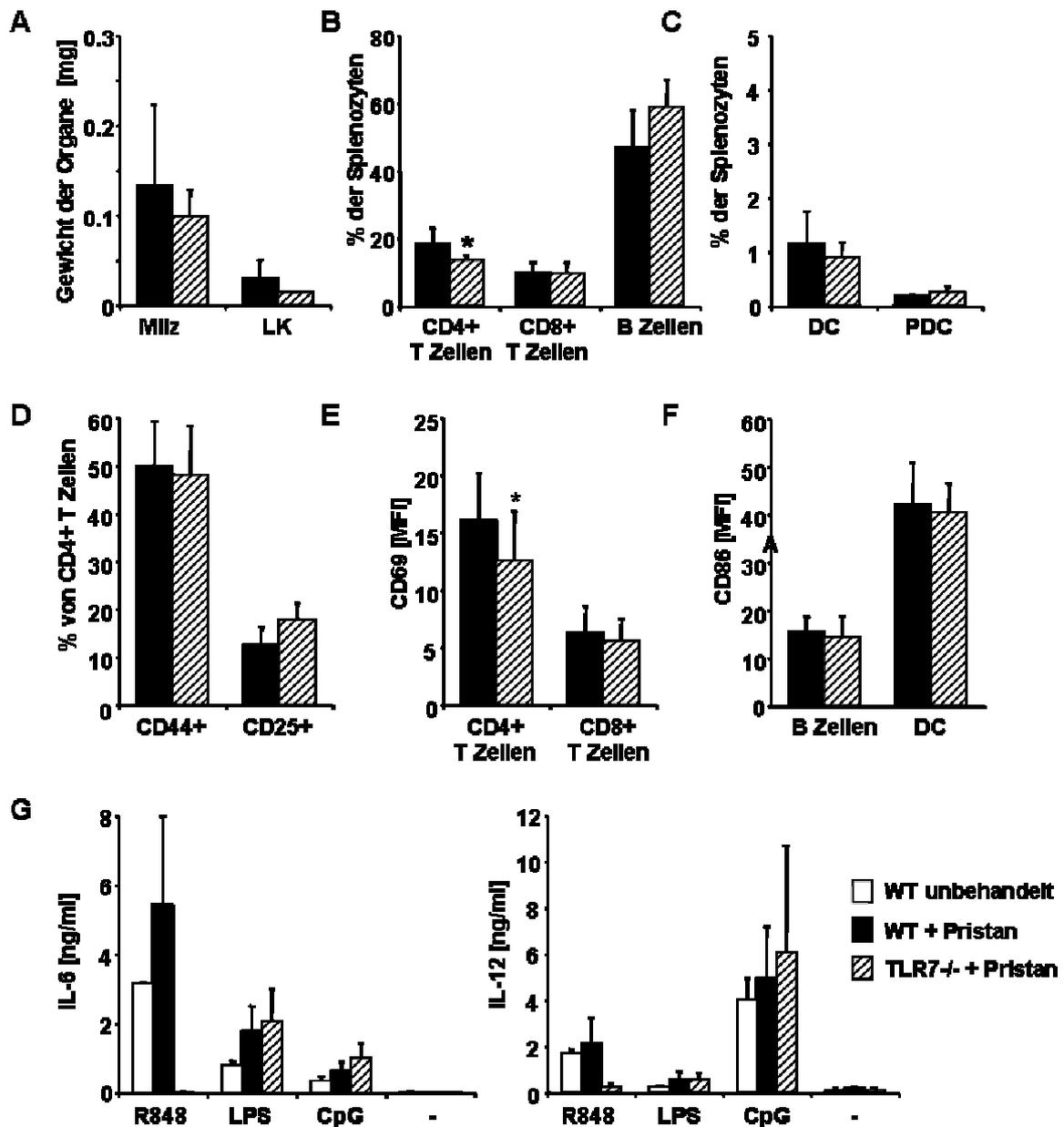


Abbildung 4.15: Zellverteilung in den Splenozyten und Zytokinanalyse der Splenozyten. Sieben Monate nach der Induktion von SLE-ähnlicher Autoimmunität durch Pristan, wurden die Mäuse getötet und das Gewicht der Milzen und mesenterialen Lymphknoten (LK) gemessen (A). Splenozyten wurden für die Durchflusszytometrie mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern von zellspezifischen Oberflächenmarkern gefärbt und der Prozentsatz der immunologischen Zellen ermittelt: CD4+T-Zellen, CD8+T-Zellen, CD19+/B220+ B-Zellen (B), CD11c+ DC, Siglec H+/BTS2+ PDC (C), CD44+/CD4+T-Zellen und CD25+/CD4+ (meist) regulatorische T-Zellen (D). Die Expression der CD69 Aktivitätsmarker auf T-Zellen wird durch die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) angezeigt (E,F). In Zellkulturüberständen (24h nach Inkubation) der mit TLR-Liganden stimulierten Splenozyten wurde die Konzentration von IL-6- und IL-12 mittels ELISA ermittelt (G). * $p < 0,05$, Student *t*-Test

Die Fähigkeit der Splenozyten, die sieben Monate nach Pristan-Injektion WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen isoliert wurden, nach Stimulation mit LPS, CpG2216 und R848, Zytokine zu produzieren wurde ebenfalls untersucht. In beiden Gruppen wurde gleich viel IL-6 und IL-12p40 sezerniert (Abb. 4.15 G), einzig die Stimulation mit TLR7^{-/-}-Ligand R848 führte wie erwartet in TLR7^{-/-}-Zellen nicht zur Zytokinproduktion.

Um die Zytokinproduktion in WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen im Pristan-Versuch zu ermitteln, wurden die Seren der einzelnen Mäuse 2, 4, 5, 6 und 7 Monate nach Pristan-Injektion auf IL-6, IL-12p40 und IFN- α mittels ELISA getestet. IL-6 und IFN- α konnten zu keinem der Zeitpunkte nachgewiesen werden. Da der Bioassay eine sensitivere Methode zum Nachweis von Typ I Interferon darstellt wurde auch hiermit das Serum untersucht. Wie im ELISA konnte eine Erhöhung der Typ I Interferon-Produktion zu den Analysezeitpunkten jedoch nicht festgestellt werden. IL-12p40 stieg bis zum vierten Monat stetig an, und blieb in den folgenden 3 Monaten bis zum Versuchs-Abbruch auf diesem Niveau. Es zeigte sich hier ein Trend zu höherer IL-12p40-Produktion in WT-Mäusen.

Hinsichtlich der mRNA Expression verschiedener inflammatorischer Zytokine, Interferone und anderer Faktoren konnte kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen festgestellt werden.

	WT		TLR7 ^{-/-}	
	2 ^{-$\Delta\Delta$CT}	St.-Abw.	2 ^{-$\Delta\Delta$CT}	St.-Abw.
IFI 204	0,14	± 0,06	0,16	± 0,06
IRF7	1,36	± 0,78	1,13	± 0,78
BAFF	0,63	± 0,31	0,43	± 0,30
IL-6	4,30	± 2,61	3,30	± 3,10
T-bet	1,38	± 0,92	1,04	± 0,18
IL-12p40	2,77	± 1,79	3,52	± 2,64
GATA3	1,30	± 1,09	0,87	± 0,36
IL-12p35	1,20	± 0,12	1,98	± 0,78
Foxp3	1,43	± 0,57	1,49	± 0,72

Tabelle 4.1: Die mRNA-Expression verschiedener Zytokine und Transkriptionsfaktoren in der Milz von Pristan-behandelten WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen

Dies galt sowohl für den Abbruch des Versuchs nach sechs Wochen als auch sieben Monate nach Pristan-Injektion. Untersucht wurde in der Milz die mRNA Expression von inflammatorischen Zytokinen (IL-6, IL-12p40, IL-12p35), Interferon induzierten Genen (IRF7, IFI204), dem Transkriptionsfaktor und Treg-Marker Foxp3 und darüber hinaus von BAFF, T-bet und GATA3. Bei allen Faktoren konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen beobachtet werden (Tab. 4.1).

5 Diskussion

5.1 TLR7-abhängige Aktivierung durch U1snRNP *in vitro* und *in vivo*

Der erste Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der stimulatorischen Wirkung von U1snRNP auf PDC's und konventionelle DC's. Die beim SLE vorkommenden U1snRNP-Immunkomplexe wurden durch Inkubation monoklonaler Anti-Sm-Antikörper (Y12; Isotyp: IgG3) mit U1snRNP nachgeahmt. U1snRNP alleine oder im Komplex mit einem nicht U1snRNP-bindenden Kontroll-AK des gleichen Isotyps zeigte keine stimulatorische Wirkung auf die murinen FLDC's. Die U1snRNP/Y12 Immunkomplexe hingegen induzierten in Abhängigkeit von der Anti-Sm-AK (Y12)-Konzentration die IFN- α - und IL-6-Produktion, sowie die Hochregulation der Expression kostimulatorischer Moleküle (CD86) in FLDC's. Für die Produktion von IFN- α waren ausschließlich PDC's, und für IL-6 sowohl cDC's als auch PDC's verantwortlich. Die Induktion von IL-6 und IFN- α in FLDC durch U1snRNP erforderte die Anwesenheit intakter U1snRNA und war im Wesentlichen abhängig von TLR7 und unabhängig von TLR3. Isolierte U1snRNA oder davon abgeleitete synthetische RNA-Oligonukleotide lösten direkt die TLR7-abhängige Induktion von IFN- α und IL-6 aus, wenn diese vorher über das kationische Liposom DOTAP in FLDC's eingeschleust wurden. Die Wirkung von U1snRNA als endogener Liganden für TLR7 konnte dadurch bestätigt werden. Wie auch für humane DNA-Immunkomplexe gezeigt wurde (Means, et al. 2005; Bave et al. 2003), war U1snRNP nicht alleine, sondern nur im Komplex mit einem Autoantikörper aktiv, welcher an Fc-Rezeptoren bindet und so die Internalisierung des Immunkomplexes in das endosomale Kompartiment ermöglicht. Die Notwendigkeit einer Immunkomplexbildung konnte durch die Bildung von U1snRNP-DOTAP-Komplexen umgangen werden. Das führt zu der Schlussfolgerung, dass der Antikörper in diesem Auto-Immunkomplex der Internalisierung dient und nicht die Fc-Rezeptor-vermittelte Koaktivierung im Vordergrund steht. Die Aufnahme von Autoantigenen und die darauffolgende Stimulierung allerdings hängen vermutlich vom Zelltyp und/oder der Beschaffenheit des Autoantigens ab. Beispielweise

konnte in einer Studie die Proliferation von Splenozyten direkt durch isolierte U1snRNA (Hoffman et al. 2004) unabhängig vom Fc-Rezeptor induziert werden. In einer anderen Studie wurden myeloide DC's durch Nukleosomen über MyD88-unabhängige Signalwege stimuliert (Decker et al. 2005). Eine Stimulierung über eine Kontamination der Reagenzien z.B. durch Endotoxin ist unwahrscheinlich, da U1snRNP oder Y12 alleine keine Induktion der Zytokine oder der CD86 Expression veranlassten.

Die Vorbehandlung der FLDC's mit IFN- β führte zwar, ähnlich wie bei Studien in humanen PDC mit SLE-Immunkomplexen aus SLE-IgGs und apoptotischen Zellen (Bave et al. 2001), zu einer Erhöhung der Induktion von IFN- α , jedoch nur zu einer geringfügigen Steigerung der Expression von IL-6 und CD86. Dieser Effekt korreliert mit einer Hochregulation der IRF7- und TLR7-Expression in PDC's durch IFN- β -Stimulation. Wie schon in der Einleitung erwähnt, wird die Typ I IFN-Produktion in PDC's zwar durch die konstitutive Expression von IRF7 in den PDC's initiiert, es kommt aber in PDC's durch die autokrine und parakrine Wirkung von Typ I IFN zur Hochregulation von IRF7 und dadurch zur Steigerung der Typ I IFN-Produktion. In B-Zellen wurde bereits eine Steigerung der Wirkung von TLR7-Liganden durch Hochregulation der TLR7-Expression nach Stimulation mit Typ I IFN gezeigt, ähnlich wie sie in dieser Arbeit in PDC's beobachtet wurde (Berekdjian-Ding et al. 2005, Brummel et al. 2006, Marshak-Rothstein und Rifkin 2007). Die IFN- β -vermittelte Steigerung der Expression von Typ I IFN und geringerem Maße von IL-6 und CD86 nach Stimulation durch U1snRNP/Y12-Immunkomplexe kommt daher mit grosser Wahrscheinlichkeit durch die Induktion von IRF7, jedoch zusätzlich auch durch die Hochregulation der TLR7-Expression zustande.

Obwohl TLR7 in FLDC's die maßgebliche Rolle für das Auslösen der IFN- α - und IL-6-Antwort durch U1snRNP spielt, konnte in TLR7^{-/-}-FLDC's eine geringe verbleibende Expression dieser Zytokine festgestellt werden. Die CD86-Hochregulation war nur teilweise von TLR7 abhängig. Weiterhin fiel auf, dass diese TLR7-unabhängige Aktivierung höher in DOTAP/U1snRNP-stimulierten als in U1snRNP/Y12-Immunkomplex-stimulierten FLDC's war. Dies könnte eventuell

dadurch erklärt werden, dass DOTAP U1snRNP nicht nur ins Endosom sondern auch ins Zytosol transferiert werden kann und daher die in der Einleitung erwähnten zytosolischen Nukleinsäuresensoren RIG-I und MDA5 an der verbleibenden TLR7-unabhängigen Zytokininduktion beteiligt sein könnten. Insgesamt konnten in FLDC's, im Gegensatz zu den mit Splenozyten und U1snRNA gewonnenen Daten (Hoffmann et al. 2004), keine TLR3-vermittelte Zytokininduktion beobachtet werden. Eine Aktivierung zytosolischer dsRNA-bindender CARD-Helikasen wie RIG-I und MDA5 durch endogene Liganden (wie z.B. U1snRNA) ist bisher nicht gezeigt worden.

Die TLR7-unabhängige Komponente der FLDC-Stimulierung durch ssRNA, wie sie bei U1snRNA-Oligoribonukleotiden oder PolyU beobachtet wurde, ist bislang nicht geklärt. Eine mögliche Beteiligung von TLR8, für das bisher eine Stimulation muriner Zellen nur durch synthetische Liganden gezeigt wurde, wird diskutiert (Bauer et al. 2007). Interessanterweise wird die Stimulierung der FLDC's durch eine einzelne an dieser Stelle der U1snRNA natürlich vorkommende 2'-O-Methylierung im synthetischen *stem-loopII* Oligoribonukleotid aufgehoben. Das intrazelluläre Einschleusen der kompletten U1snRNA führt jedoch trotz inhibitorischer Elemente wie der oben beschriebenen Modifikation und weiterer Modifikationen, wie z. B. 5'-Pseudo-Uridin-Derivate der U1snRNA-Sequenz (Kariko et al. 2005), zu einer effizienten Produktion von IL-6 und IFN- α in FLDC's. Daten und Ergebnisse dieser Arbeit zeigen daher auf, dass trotz protektiver Maßnahmen die körpereigene U1snRNA innerhalb eines Immunkomplexes als endogener Ligand für Nukleinsäurerezeptoren fungieren kann, dadurch von Immunzellen als gefährliches Signal erkannt wird und so die Autoimmunreaktion fördern kann. In diesem Zusammenhang spielt die Internalisierung von Auto-Immunkomplexen und ihre Erkennung über Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) eine wichtige Rolle. Die Internalisierung von U1snRNP/Y12 erfolgt weiterhin über Fc γ -Rezeptoren, allerdings konnte im Rahmen der vorliegenden Versuche mit Fc γ R-defizienten Mäusen nicht abschließend geklärt werden, welcher Rezeptor für die Internalisierung von U1snRNP/Y12 verantwortlich ist, da die Aktivierung der FLDC's durch U1snRNP/Y12-Immunkomplexe in Abwesenheit von Fc γ RII und Fc γ RIII nicht gestört und Fc γ RI^{-/-}-Zellen nicht zur Verfügung standen. Die

Internalisierung von SLE-Immunkomplexen über FcγRIIIa in humanen PDC's wurde bereits gezeigt (Means et al. 2005; Bave et al. 2003). Im Gegensatz zu Menschen besitzen Mäuse keinen FcγRIIIa und eine Studie konnte zeigen, dass die Aktivierung mit Chromatin-Immunkomplexen einer Internalisierung über FcγRIII in murinen myeloiden DC's bedarf (Boule et al. 2004). In den in dieser Arbeit gezeigten Experimenten ist mit großer Wahrscheinlichkeit der FcγRI für die Aufnahme des U1snRNP/Y12-Immunkomplexes zuständig, da Y12 zu den IgG3-Isotypen gehört und bereits für die Bindung von IgG3-Immunkomplexen in murinen DC's verantwortlich gemacht wurde (Gavin et al. 1998). In einer anderen Studie mit murinen Makrophagen erfolgte die Aufnahme von IgG3-Immunkomplexen ebenfalls in Abhängigkeit von FcγRI (Barnes et al. 2002).

In vivo war eine TLR7-abhängige Induktion von IFN-α, IL-6 und auch von IL-12 über die Injektion von U1snRNP und U1snRNA-Oligoribonukleotiden zu beobachten. Allerdings wurde eine Stimulation in WT-Mäusen nur dann erreicht wenn U1snRNP mit dem kationischen Liposom DOTAP komplexiert und intravenös gespritzt wurde. Die intravenöse Injektion mit U1snRNP/Y12 führte nicht zur Zytokinproduktion. Interessanterweise bewirkte die Injektion von U1snRNP/DOTAP und PolyU/DOTAP *in vivo*, im Gegensatz zu den *in vitro*-Experimenten eine nahezu vollständig TLR7-abhängige Zytokininduktion.

5.2 TLR7-abhängige anti-RNP-Antikörperproduktion und Glomerulonephritis im Pristan-induzierten SLE-Modell

Im Pristan-induzierten Mausmodell für SLE konnte gezeigt werden, dass es nach Induktion der Autoimmunreaktion unabhängig von prädisponierenden genetischen Faktoren, zu einer TLR7-abhängigen Produktion von Autoantikörpern und Entwicklung einer Lupusnephritis kommt. Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten verdeutlichen, dass die Aktivierung von TLR7 über endogene Liganden, wie z.B. U1snRNA, essentiell für die Produktion von pathogenen Anti-snRNP/Sm Antikörpern ist und mit der Entstehung einer Autoantikörper-vermittelten Lupusnephritis assoziiert ist (Savarese et al. 2006, Christensen et al. 2006, Pawar

et al. 2007). In dem hier vorgestellten induzierbaren SLE-Modell waren zu den gewählten Analysezeitpunkten bei WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen keine relevanten Unterschiede bezüglich der Aktivierung von T-Zellen, B-Zellen, und DC's der Milz oder der Bauchhöhle festzustellen. Ebenso wurden *ex vivo* keine Unterschiede bei WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen in der Expression von inflammatorischen Zytokinen, Transkriptionsfaktoren oder IFN-stimulierten Genen (ISGs) beobachtet. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte im peripheren Blut von Pristan-behandelten WT-Mäusen (129Sv/Ev-Hintergrund), eine Erhöhung der mRNA-Expression von ISGs, wie IRF7 und MX1 im Vergleich zu Pristan-behandelten IFNAR^{-/-}-Mäusen beobachtet werden, die ebenfalls mit einer höheren Krankheitsaktivität einherging (Nacionales et al. 2007).

Im Pristan-induzierten SLE-Modell war die Produktion von Anti-snRNP/Sm-Antikörpern vollständig von der TLR7-Expression abhängig. Ebenso war in Abwesenheit von TLR7 die Produktion von Anti-snRNP/Sm-Antikörpern im MRL/Mp^{lpr/lpr}-Modell deutlich reduziert (Christensen et al. 2006). In der Studie von Berland mit dem 564-Immunglobulin-Transgenmausmodell war die Produktion der spezifischen Antikörper (Anti-RNA, Anti-DNA und Anti-Nukleosome) zwar reduziert, jedoch in Abwesenheit von TLR7 nicht vollständig aufgehoben (Berland et al. 2006). Im Pristan-induzierten SLE-Modell dieser Arbeit konnte auch zu frühen Zeitpunkten keine Anti-snRNP/Sm-Antikörper detektiert werden. Daher scheint TLR7 nicht nur für die Produktion und Amplifikation der Anti-snRNP/Sm-Antikörperproduktion verantwortlich zu sein, sondern auch an der Initiierung der Anti-snRNP/Sm-Antikörper-Bildung beteiligt zusein.

Wie auch im MRL/Mp^{lpr/lpr}-Modell gezeigt wurde, bestanden keine Unterschiede bei der Entwicklung von anti-dsDNA-Antikörpern zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen. Die Quantifizierung der Anti-dsDNA-Antikörper im ELISA wurde durch die Immunfluoreszenzfärbung des dsDNA-enthaltenden Kinetoplasten der *crithidia luciliae*-Flagellaten bestätigt. Bislang ist noch nicht klar welche Immunzellen in der Entstehung des SLE zuerst von TLR7 Liganden aktiviert werden. Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass B-Lymphozyten, die durch endogene TLR7-Liganden aktiviert werden an der Initiierung der Autoantikörperbildung unmittelbar beteiligt sind, während TLR-aktivierte DC's und PDC's vermutlich für die

Amplifikation der Autoimmunkrankheit verantwortlich sind, da die Aktivierung der DC's über endosomale TLR's das Vorhandensein von Autoantikörpern und Immunkomplexen voraussetzt. Die Fähigkeit von B-Zellen, Autoantigenen im apoptotischen Material direkt über den BCR binden zu können, und es endosomal zu TLR7 in die Zelle transportieren können, könnte durch die doppelte Aktivierung spezifischer autoreaktiver (z. B. snRNP-reaktiver) B-Zellen über BCR und TLR7, zum Einbruch der peripheren Toleranz der autoreaktiven B-Zellen führen (Lau et al. 2005; Leadbetter et al. 2002; Viglianti 2003). Da, wie im ersten Teil dieser Arbeit bereits gezeigt, die TLR7-Aktivierung über U1snRNA in PDC's und cDC's eines Transports in die Zelle bedarf (Savarese et al. 2006, Vollmer et al. 2005) und dies unter physiologischen Bedingungen nur durch Aufnahme von Immunkomplexen über Fc-Rezeptoren erreicht werden kann (Means et al. 2005, Savarese et al. 2006, Vollmer et al. 2005, Bave et al. 2005), muss vor der Aktivierung der DC's bereits eine Produktion von Autoantikörpern über die Aktivierung von B-Zellen stattgefunden haben. Daher dienen wahrscheinlich PDC's und cDC's hauptsächlich der Amplifizierung der Autoimmunreaktionen, zum Beispiel über die Steigerung der Autoantikörperproduktion durch IL-6 (produziert von cDC's und PDC's) oder von Typ I Interferon (produziert von PDC's; Savarese et al. 2006, Christensen und Slomchik 2007). Die Ergebnisse dieser Arbeit und der anderer Gruppen zeigen, dass das hauptsächlich von PDC's produzierte Typ I IFN zur Verstärkung der TLR7-spezifischen Antwort von B-Zellen und DC's über die Hochregulation von TLR7 selbst führt (Lau et al. 2005, Savarese et al. 2006, Berekdjian-Ding et al. 2005). Im spontan entstehenden Lupusmodell des MRL/Mp^{lpr/lpr}-Mausstamms zeigte sich ähnlich wie im Pristan-induzierten SLE-Modell eine Verbesserung der Symptome in den TLR7-defizienten Mäusen. Dagegen wurde in diesem Modell eine Verschlechterung der Erkrankung in den TLR9-defizienten Mäusen beobachtet. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedliche Wirkung von TLR7 und TLR9 könnte darin liegen, dass nur TLR7, nicht jedoch TLR9 durch Typ I IFN hochreguliert wird. Dieser Amplifikationsschritt greift daher nur bei TLR7-abhängigen Immunreaktionen. Dagegen könnte TLR9 eine protektive Funktion durch Regulation einer übermäßigen Aktivierung über endogene und exogene Nukleinsäuren ausüben (Marshak-Rothstein und Rifkin

2007, Brummel et al. 2006, Marshak-Rothstein 2006). Diese Funktion von TLR9 wurde jedoch bisher nicht genauer untersucht.

Wir konnten nur geringe, nicht signifikante Unterschiede, zwischen den WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen in Bezug auf die Expansion und Aktivierung von isolierten Immunzellen aus Milz oder dem Peritonealraum zeigen. Im MRL/Mp^{lpr/lpr}-Modell hingegen wurden in Abwesenheit von TLR7 geringere Milz- und Lymphknotengewichte, eine reduzierte Anzahl von doppelt negativen T-Lymphozyten und Gedächtnis-CD4⁺-T-Zellen beobachtet. Darüber hinaus kam es in den TLR7-defizienten Mäusen zur Abnahme der unspezifischen Aktivierung der B-Zellen, sowie der Produktion von IgG3-Immunglobulinen und der MHCII-Expression (Christensen et al. 2006). Wie in der Einleitung beschrieben, zeichnet sich dieses MRL/Mp^{lpr/lpr}-Modell durch eine starke Symptomatik, wie die massive Lymphoproliferation, eine irreversible schwere Glomerulonephritis und eine hohe Autoantikörper-Konzentration, aus. Diese stark ausgeprägte Autoimmunkrankheit im MRL/Mp^{lpr/lpr}-SLE-Modell ist wahrscheinlich der Grund dafür, dass hier Unterschiede in der Immunzell-Zusammensetzung und -Aktivierung zwischen WT- und TLR7^{-/-}-Mäusen eher sichtbar sind. Im Pristan-Modell hingegen scheint die Initiierung und die Amplifizierung der Autoimmunreaktion in der unmittelbaren Umgebung der Pristan-Injektion stattzufinden, wie zum Beispiel im neu gebildeten tertiären lymphoiden Gewebe innerhalb der sogenannten Lipogranulome, welche durch die Pristan-Injektion in der intraperitonealen Bauchhöhle induziert werden. Ähnliche Vorgänge der lymphoiden Neogenese wurden auch bei Autoimmunerkrankungen des Menschen, z.B. in entzündeten Gelenken bei rheumatoider Arthritis beobachtet (Nacionales et al. 2006, Nacionales et al. 2007).

Im Rahmen der hier vorgestellten Arbeit konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die fehlende bzw. geringere Produktion von Anti-snRNP/Sm-Antikörpern in TLR7-defizienten Mäusen mit einer geringeren IgG- und Komplementablagerung in den Glomeruli sowie mit einer schwächeren Glomerulonephritis im Pristan-induzierten SLE-Modell korreliert. Obwohl diese Wechselbeziehung auch im MRL/Mp^{lpr/lpr}-Modell von Christensen beobachtet werden konnte, so ist der schützende Effekt des Fehlens von TLR7 dort nicht so deutlich zu sehen wie in der vorliegenden

Arbeit (Christensen et al. 2006). Die Erklärung hierfür liegt sicherlich teilweise im höheren Prozentsatz der Anti-snRNP/Sm-Antikörper-produzierenden WT-Mäuse im Pristan-Modell im Vergleich mit dem MRL/Mp^{lpr/lpr}-Modell. Auch in der Immunglobulin-transgenen 564 Mauslinie (C57Bl/6-Hintergrund) konnte gezeigt werden, dass die Produktion RNA-reaktiver Antikörper ausreichend ist, um eine Lupusnephritis zu entwickeln (Berland et al. 2006). Daher ist anzunehmen, dass eine begründete Beziehung zwischen RNA-reaktiven Autoantikörper-Immunkomplexen und einer Niereninsuffizienz besteht. Ähnlich wie in SLE-Patienten korreliert im MRL/Mp^{lpr/lpr}-Modell die Präsenz von Anti-snRNP/Sm-Antikörpern mit einer höheren Konzentration an IFN- α im Serum und einer höheren Krankheitsaktivität (Christensen und Shlomchik 2007). Allerdings konnte im zweiten Teil dieser Arbeit zu keinem Analysezeitpunkt ein erhöhter Typ I IFN-Spiegel im Serum gemessen werden. In der Arbeit von Nacionales et al. wurde allerdings auch im Pristan-Modell eine herausragende Rolle von Typ I IFN für die Entwicklung einer Lupusnephritis und die Expression inflammatorischer Zytokine und Chemokine beschrieben. Im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit wurden die Experimente von Nacionales et al. mit WT- und IFNAR^{-/-}-Mäusen auf dem 129Sv/Ev-Stammhintergrund durchgeführt, der bekanntermaßen einen höheren Prozentsatz an PDC's besitzt und eine höhere IFN- α -Produktion aufweist (Nacionales, et al. 2007).

Wie erwartet wiesen die Anti-snRNP/Sm-AK-produzierenden WT-Mäuse im Pristan-Modell eine hohe Glomerulonephritis-Aktivität auf. Einige WT-Mäuse, deren Seren keine signifikante Konzentrationen an Anti-snRNP-AK aufwiesen, zeigten jedoch ebenfalls eine hohe Glomerulonephritisaktivität. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass zusätzlich nicht detektierte Autoantikörper gegen Antigene, die entweder TLR7-stimulierende RNA-Sequenzen enthalten oder mit diesen RNA-Sequenzen assoziiert sind, existieren und eventuell ebenso zur TLR7-abhängigen Krankheitsentwicklung beitragen (Vollmer et al. 2005, Martin et al. 2005).

Es gibt verschiedene Erklärungsmöglichkeiten für die Beteiligung von RNA-reaktiven Autoantikörpern in der Lupusnephritis. Bisherige Studien konnten zeigen, dass es zunächst aufgrund von glomerulären Ablagerungen pathogener

antinukleärer Antikörperkomplexe zur Aktivierung des Komplementsystems, der im Nierengewebe enthaltenen Makrophagen und DC's kommt. Diese Aktivierung kommt beispielsweise über den Fc γ RIV in diesen Makrophagen und DC's nachgewiesen zustande (Ehlers et al. 2006). Die Entzündung wird also lokal in der Niere erzeugt und kann durch dabei freigesetzte Zytokine und Chemokine weitere Immunzellen wie DC's, Makrophagen und aktivierte T-Lymphozyten an den Ort der Entzündung rekrutieren und diese aktivieren. Dieser Vorgang wird Leukozyteninfiltration genannt und ist ein Kriterium zur Bestimmung der Glomerulonephritisaktivität. Es kommt zum direkten T-Zell/Makrophagen-Kontakt und zur Ausschüttung von TNF- α und IFN- γ durch T-Zellen. Stimulierte Makrophagen schädigen Nierenzellen direkt durch Opsonierung und Freisetzung Proteasen. Zusätzlich kommt es zur Induktion der Zellproliferation und Matrixakkumulation in den Glomeruli. Dieser Vorgang wird als Glomerulonephritis bezeichnet (Kuroiwa et al. 1998). Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die direkte Aufnahme solcher Auto-Immunkomplexe in nicht hematopoetische Zellen des entzündeten Nierengewebes zu einer TLR7-vermittelten Steigerung der Entzündungsreaktion führt. Die Mesangialzellen der Niere scheiden allerdings für eine TLR7-abhängige Aktivierung aus, da diese TLR7 nicht exprimieren (Patal et al. 2006).

5.3 TLR7: Ansatzpunkt für neue Therapien

Auch in Abwesenheit von spezifischen prädisponierenden genetischen Faktoren, konnte im Pristan-induzierten *in vivo* Modell für SLE die Bedeutung von TLR7 für die Produktion von Anti-snRNP/Sm-Antikörpern und die Pathogenese der Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis gezeigt werden.

Daher sind TLR7 (und wahrscheinlich TLR8 im Menschen), sowie unterhalb der Rezeptorebene im Signaltransduktionsweg wirksame Moleküle wie z.B. IRAK, interessante Ziele für die Entwicklung neuer Medikamente oder die Anwendung bereits bestehender Therapeutika. Schon seit geraumer Zeit werden das Antimalariamittel Chloroquin und Hydrochloroquin bei Lupuspatienten eingesetzt. Diese verhindern unter anderem die Ansäuerung der Endosomen (Grundmann et al. 1972) und inhibieren so die Stimulierung der endosomalen TLR7, 8 (beim

Menschen), 3 und 9 durch endogene und/oder exogene Nukleinsäuren. Die Wirksamkeit dieser Medikamente gibt einen weiteren Hinweis auf die wichtige Rolle endosomaler TLR's für die Pathogenese des SLE. Wie bereits beschrieben, trägt das inflammatorische Zytokin IL-6 maßgeblich zur Verschlechterung des humanen SLE bei. Ein möglicher Therapieansatz umfasst das Therapeutikum MRA. MRA ist ein monoklonaler Antikörper, der an den IL-6-Rezeptor bindet und so die Bioaktivität von IL-6 hemmt (Perniok und Rubbert-Roth 2003). Therapeutische Substanzen, welche TLR7/8 oder deren Signalweg beeinträchtigen, könnten dementsprechend auch den Ausbruch oder das Voranschreiten bereits vorhandener SLE-Symptome bei einer Subgruppe von SLE-Patienten verhindern. Wie bereits erwähnt, trägt TLR7 nicht nur zur Entstehung von Anti-snRNP/Sm-Antikörpern, sondern auch zur Amplifizierung durch die Aktivierung von DC's und PDC's über diese Auto-Immunkomplexe bei (Savarese et al. 2006, Lau et al. 2005). Angesichts der Möglichkeit, antinukleäre Antikörper Jahre vor der Manifestation von SLE zu detektieren, könnten Antagonisten von TLR7 als Therapie zur Verlängerung des krankheitsfreien Intervalls genutzt werden. Im MRL/Mp^{lpr/lpr}-Mausmodell des SLE wurde dieses Prinzip erfolgreich angewandt und der Nachweis erbracht, dass TLR7-Antagonisten (inhibitorische Oligonukleotide) in der Lage sind, auch nach Ausbruch der Krankheit die serologischen und histologischen Manifestationen des SLE zu mildern (Pawar et al. 2007). Derartige neue Behandlungsansätze hinsichtlich TLR7 (und TLR8 im Menschen) könnten also in Kombination mit bereits angewandten Medikamenten zur Verbesserung und Verlängerung der Lebensqualität von SLE-Patienten beitragen.

6 Zusammenfassung

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC) tragen als Hauptproduzenten von Typ I Interferon entscheidend zur Entstehung und zum Verlauf der systemischen Autoimmunkrankheit Lupus Erythematoses (SLE) bei. Eine der immunstimulatorischen Komponenten beim SLE sind DNA-Autoantikörper, welche über TLR9 in PDC's erkannt werden. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit den gleichermaßen pathogenen RNA-haltigen Auto-Immunkomplexen, die konventionelle (cDC) und plasmazytoide DC's über TLR7 aktivieren. Antikörper gegen *small nuclear ribonucleoproteins* (snRNP) werden in 30-40% der SLE Patienten gefunden. Mit definierten U1snRNP/Anti-Sm-Immunkomplexen stimulierte PDC's und cDC's zeigten eine TLR7-abhängige Expression von IFN- α , inflammatorischen Zytokinen, wie IL-6 und dem kostimulatorischen Molekül CD86. Verantwortlich für diese Stimulierung ist die im U1snRNP-Komplex enthaltene U1snRNA. Die Induktion dieser Reaktion ist hauptsächlich TLR7-abhängig und gänzlich unabhängig von TLR3. Die Internalisierung von Oligoribonukleotiden, die Abschnitte der U1snRNA enthalten, führte zur effizienten TLR7-abhängigen Induktion von IFN- α und IL-6 in murinen Flt3L-DC (PDC und cDC). Die U1snRNA's innerhalb der U1snRNP-Immunkomplexe, die bei SLE-Patienten vorkommen, wirken als endogene Liganden für TLR7 und lösen die Produktion von IFN- α und IL-6 in PDC's aus.

Im Pristan-induzierten SLE-Mausmodell konnte *in vivo* die wichtige Funktion von TLR7 für die Entstehung des SLE gezeigt werden. In dieser Arbeit wurde der Beitrag von TLR7 zur Bildung von Anti-snRNP-Antikörpern und zur Entwicklung der Glomerulonephritis in einem SLE-Mausmodell, welches nicht spontan aufgrund genetischer prädisponierender Faktoren entsteht, untersucht. In diesem exogen, durch Injektion von Pristan ausgelösten SLE-Modell war die Produktion von Anti-snRNP-Antikörpern von TLR7 abhängig, während die Produktion von Anti-dsDNA-Antikörpern in Abwesenheit von TLR7 nicht beeinträchtigt war. Die drastisch reduzierte snRNP-Autoantikörper-Produktion ging mit einer deutlich geringeren Immunkomplexablagerung in den Glomeruli und einer signifikant reduzierten Glomerulonephritis-Aktivität bei TLR7-defizienten Mäusen einher. TLR7 ist also insbesondere für die Produktion von RNA-reaktiven Autoantikörpern

verantwortlich, die für die Entstehung der Glomerulonephritis in diesem SLE-Mausmodell eine wichtige Rolle spielen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass TLR7 und nachgeordnete spezifische Signaltransduktionsmoleküle attraktive Ziele für neue Therapieansätze bei SLE sind.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Michael Schemann danke ich für die freundliche Bereitschaft die externe Betreuung der Dissertation von Seiten der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt zu übernehmen.

Herrn Prof. Dr. Roland Schmid danke ich für die Aufnahme in seine Abteilung der Gastroenterologie am Klinikum Rechts der Isar an der Technischen Universität München und die Überlassung eines hervorragend ausgestatteten Arbeitsplatzes.

Mein besonderer und herzlicher Dank gilt Frau Dr. Anne Krug für die Vergabe der interessanten und spannenden Projekte, die sehr gute Betreuung, das fortwährende Interesse und die Möglichkeit mit anderen Gruppen aus meinem Themengebiet zu arbeiten. Ihre hilfreichen Anregungen und Diskussionen haben mich stets begeistert.

Bei Dr. Hans-Joachim Anders an der Medizinischen Poliklinik der Ludwig Maximilian Universität München und seiner Arbeitsgruppe möchte ich mich herzlich für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die freundschaftliche Atmosphäre innerhalb und außerhalb des Labors bedanken. Hier sei besonders Rahul Pawar erwähnt, welcher mir stets eine große Unterstützung im Laboralltag war.

Der Arbeitsgruppe Gastroenterologie am Klinikum rechts der Isar möchte ich für die Unterstützung während der Arbeitszeit und die vielen gemeinsamen Stunden außerhalb des Labors danken. Mein besonderer Dank gilt Melanie Scheibl, Christiane Hank, Annegret Schmidt, Moritz Benecke, Dr. Florian Greten, Sandra Baumann, Dr. Roland Rad, Christian Steinberg, Bernadette Grohs und Dr. Wolfgang Reindl.

Meinen ehemaligen Kollegen und Freunden aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Robert Huber am Max-Planck-Institut möchte ich Danke sagen, für die liebevolle Hilfe und Aufmunterung während der ganzen Zeit der Doktorarbeit, die tollen Feste

und für die vielen Korrekturen zum Schluss: Sandra Lepthien, José Pfitzer, Irena Bonin, Dr. Uwe Jacob, Dr. Sofia Macieira, Milko Velarde, Mekdes Debela, Rasso Willkomm, Vesna Radosavljevic und Renate Rüller. Prof. Dr. Albrecht Messerschmidt möchte ich für seine freundliche Unterstützung während der Schreibzeit danken.

Für die Hilfsbereitschaft zu Fragen der elektronischen Datenverarbeitung möchte ich André Huber und Martin Hoffmann aus dem Rechenzentrum des Max-Planck-Instituts für Biochemie herzlich danken.

Meinen Freunden Constance de Calheiros-Veloso, Marie Ridé, Claudia Kumutat, Olivier da Rocha, Amaury Fernandez, Maria Lopez, Sofia Chacon, Mireia Comellas, Roland Jesseit, Dirk Spannaus und Petra Zimmermann möchte ich danken, dass sie fester Bestandteil meines Lebens geworden sind.

Meiner kubanischen Mama Orquidea und dem Rest der Familie möchte ich für ihre vielen Pakete aus Übersee in den letzten drei Jahren und ihre täglichen Erkundigungen nach meinem Befinden danken.

Mein größter Dank geht an meinen Mann Frank Möller, der in den vergangenen neun Jahren stets an meiner Seite stand und mich in jeglicher Hinsicht unterstützt hat. Seinen Eltern Eleonore und Rolf Möller danke ich für die vielen schönen Feiertage und Familienfeste.

Meinen Grosseltern danke ich für ihre Liebe und Wärme.

8 Literaturverzeichnis

Alarcón-Riquelme ME

The genetics of systemic lupus erythematosus
J Autoimmun 2005, Supp: 46

Alarcón GS, McGwin G, Jr., Roseman JM, Uribe A, Fessler B, Bastian HM

Systemic lupus erythematosus in three ethnic groups. XIX: The natural history of the accrual of the American College of Rheumatology Criteria prior to the occurrence of criteria diagnosis.

Arthritis Rheum (Arthritis Care Res). 2004;51:609-15

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O

Pathogen recognition and innate immunity
Cell 2006 (124): 783-801

Asselin-Paturel, C., G. Brizard, J. J. Pin, F. Briere, G. Trinchieri. 2003.

Mouse strain differences in plasmacytoid dendritic cell frequency and function revealed by a novel monoclonal antibody.

J. Immunol. 171: 6466-6477

Austin HA, Muenz RM, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE

Diffuse proliferative lupus nephritis: Identification of specific pathologic features affecting renal outcome.

Kidney International, 1984, Vol. 25, pp. 689-695

Baccala R, Hoebe K, Kono DH, Beutler B, Theofilopoulos AN

TLR-dependent and TLR independent pathways of type I interferon induction in systemic autoimmunity.

Nature Medicine 2007 (13): 543-551

Bancherau J, Pasual V, Palucka AK

Autoimmunity through cytokine-induced dendritic cell activation
Immunity 2004; 20:539-550

Barnes N, Gavin AL, Tan PS, Mottram P, Koentgen F, Hogarth P

FcyRI-deficient mice show multiple alterations to inflammatory and immune responses.

Immunity 2000 (16);

Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, Chan JH, Uematsu S, Akira S, Chang B, Duramad O, Coffman RL

Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like

- receptors and may promote systemic lupus erythematosus
J Exp Med 2005; 202: 1131-39
- Bauer S, Hangel D, Yu P
Immunobiology of toll-like receptors in allergic disease
Immunobiology 2007; 212: 521-533
- Bave U, Alm GV, Ronnblom L.
The combination of apoptotic U937 cells and lupus IgG is a potent IFN- α inducer.
J Immunol. 2000;165: 3519-3526
- Bave U, Vallin H, Alm GV, Ronnblom L. Activation of natural interferon- α producing cells
by apoptotic U937 cells combined with lupus IgG and its regulation by cytokines.
J Autoimmun. 2001;17: 71-80
- Bave U, Magnusson M, Eloranta ML, Perers A, Alm GV, Ronnblom L.
Fc gamma RIIa is expressed on natural IFN-alpha-producing cells (plasmacytoid
dendritic cells) and is required for the IFN-alpha production induced by apoptotic
cells combined with lupus IgG. J Immunol. 2003;171:3296-3302
- Berland R, Fernandez L, Kari E, Han JH, Lomakin I, Akira S, Wortis HH, Kearney JF, Ucci
AA, Imanishi-Kari T
Toll-like receptor 7 dependent loss of B cell tolerance in pathogenic autoantibody
knockin mice
Immunity 2006; 25: 429-440
- Berkeredjian-Ding IB, Wagner M, Hornung V, et al.
Plasmacytoid dendritic cells control Tlr7 sensitivity of naive B cells via type I IFN.
J Immunol. 2005;174: 4043-4050
- Bianchi FB, Rizzetto M, Penfold P, Swana GT, Doniach .
Ultrastructural localization and characterization of a ribosomal antibody detected by
immunofluorescence in systemic lupus erythematosus.
Clin Exp Immunol. 1974 Aug;17(4):629-36.
- Bielschowsky M
Spontaneous anemia in mice of NZB strain.
Proc Univ Otago Med Sch 1959; 37:9-11
- Blasius A, Vermi W, Krug A, Facchetti F, Cella M, Colonna M.
A cell-surface molecule selectively expressed on murine natural interferon-producing
cells that blocks secretion of interferon-alpha.
Blood 2004;103: 4201-4206.
- Bloom DB, Davignon JL, Retter MW, Shlomchick MJ, Pisetsky DS, Cohen PL, Eisenberg
RA and Clarke SH

- V Region Gene Analysis of Anti-Sm Hybridomas from MRL/Mp^{lpr/lpr} Mice
The Journal of Immunology 1993 february Vol. 150, 1591-1610
- Bolland S, Ravetch J
Spontaneous autoimmune disease in FcγIIb deficient mice results from strain specific epistasis
Immunity 2000; 13:277-285
- Boule MW, Broughton C, Mackay F, Akira S, Marshak-Rothstein A, Rifkin IR
Toll-like receptor 9 dependent and independent dendritic cell activation by chromatin immunoglobulin G complexes
J Exp Med 2004, 199 (12); 1631-40
- Brummel R, Roberts TL, Stacey KJ, Lenert P
Higher-order CpG-DNA stimulation reveals distinct activation requirements for marginal zone and follicular B cells in lupus mice.
Eur J Immunol 2006; 36 (7): 1951-62
- Bustin SA
Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays.
Journal of Molecular Endocrinology 2000; 25:169-193
- Calvani N, Caricchio R, Tucci M
Induction of apoptosis by the hydrocarbon oil pristane: implications for pristane-induced lupus.
J Immunol. 2005;175:4777-4782.
- Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M
Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon
Nature Medicine 1999, 5; 919-923
- Cervera R, Khmashta MA, Font J, Sebastiani GD, Gil A, Lavilla P, Domenech I, Aydinoglu AO, Jedryka-Goral A, de Ramon E, Gallezi M, Haga HJ, Mathieu A, Houssiau F Ingelmo M, Hughes GRV and the European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus
Systemic Lupus Erythematosus: Clinical and immunological patterns of disease in a cohort of 1000 patients.
Medicine 1993 (72): 113-124
- Colonna M, Krug A, Cell M

- Interferon producing cells: on the front line in immune response against pathogens.
Curr Opin Immunol 2002; 14:373-79
- Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ
Plasmacytoid dendritic cells in immunity
Nat Immunol 2004 (5): 1219-1226
- Christensen SR, Shupe J, Nickerson K, Kashgarian M, Flavell RA, Shlomchik MJ.
Toll-like Receptor 7 and TLR9 Dictate Autoantibody Specificity and Have Opposing
Inflammatory and Regulatory Roles in a Murine Model of Lupus.
Immunity 2006;25:417-428.
- Deapen D, Escalante A, Weinrib L
A revised estimate of twin concordance in systemic lupus
Erythematosus
Arthritis Rheum 1997; 40:1725
- Decker P, Singh-Jasuja H, Haager S, Kotter I, Rammensee HG. Nucleosome, the main
autoantigen in systemic lupus erythematosus, induces direct dendritic cell activation
via a MyD88-independent pathway: consequences on inflammation.
J Immunol. 2005;174: 3326-3334.
- Edwards AD, Diebold SS, Slack EM
Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of Tlr7
expression by CD8 α^+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines.
Eur J Immunol. 2003 (33): 827-833
- Ehlers M, Fukuyama H, McGaha TL, Aderem A, Ravetch JV.
TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b
autoantibodies in SLE.
J Exp Med. 2006;203:553-561
- Ehrenstein MR, Katz DR, Griffiths MH, Papadaki L, Winkler T,
Kalden JR, Isenberg DA
Human IgG anti-DNA antibodies deposit in kidneys and induce proteinuria in SCID
mice . In: Kidney Int. (1995), Nr. 48, S. 705-711
- Fadok VA, Bratton DL, Konowal A, Freed PW, Westcott JY, Henson PM
Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit
proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms
involving TGF-beta, PGE2 and PAF
J Clin Invest 1998; 101; 890-898
- Fischer-Betz R, Herzer P, Schneider M,

- Systemischer Lupus Erythematoses
Dtsch. Med. Wochenschr. 2005; 130:2451-2458
- Fitzgeralds-Bocarsly P
Human natural interferon alpha producing cells
Pharmacol Ther 1993 Oct;60(1):39-62
- Gaipl US, Voll RE, Sheriff A, Franz S, Kalden JR, Herrmann M
Impaired clearance of dying cells in systemic lupus erythematosus
Autoimm Rev 2005 4:189
- Gavin AL, Barnes N, Dijstelbloem HM, Hogarth PM.
Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. J Immunol. 1998;160: 20-23
- Ginzler EM, Diamond HS, Weiner M, Schlesinger M, Fries JF, Wasner C, Medsger TA, Zigler G, Barnett EV
A multicenter study of outcomes in systemic lupus erythematosus. I. Entry variables as predictors of prognosis
Arthritis Rheum 1982 (25): 601-611
- Grundmann M, Mikulikova I, Vrublovsky P
Tissue distribution of chloroquine rats in the course of long term application
Arch Int Pharmacodyn 1972; 197: 45-5
- Gudmundsson S, She JX,
Systemic lupus erythematosus in Iceland 1975 through 1984. A nationwide epidemiological study in an unselected population.
J Rheumatol 1990;17:1162-7
- Haake H, Köneke J, Amann K, Dahl J, Jannsen U,
Entwicklung eines systemischen Lupus erythematoses mit fokaler proliferativer Lupusnephritis unter einer Anti-TNF α -Therapie bei der Psoriasisarthritis
Medizinische Klinik 2007; (102): 852-57
- Hochberg MC
Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus
Arthritis Rheum 1997; 40:1725
- Hoffman RW, Gazitt T, Foeking MF, et al.
U1 RNA induces innate immunity signaling.
Arthritis Rheum. 2004;50: 2891-2896
- Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S

- Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human PBMC and sensitivity to CpG ODN.
J Immunol 2002 168:4531–4537
- James JA, Kaufmann KM, Farris AD, Taylor-Albert E, Lehmann TJ; Harley JB
An increased prevalence of Epstein-Barr virus infection in young patients suggests a possible etiology for systemic lupus erythematosus
J Clin Invest 1997; 100: 3019-3026
- James JA, Neas BR, Moser KL
Systemic lupus erythematosus in adults is associated with previous Epstein-Barr virus exposure
Arthritis Rheum 2001; 44: 1122-1126
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick MJ
Immuno Biology; The immune system in health and disease
Garland Science; 6th edition (2005)
- Jongstra-Bilen J, Vukusic B, Boras K, Wither JE.
Resting B cells from autoimmune lupus prone New Zealand Black and (New Zealand Black x New Zealand White) F1 mice are hyperresponsive to T cell derived stimuli
J Immunol 1997; 159: 5810-20
- Johnson AE, Gordon C, Palmer RG, Bacon PA
The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England.
Arthritis Rheum 1995 (38): 551-558
- Kadowaki N, Antonenko S, Liu YJ:
Distinct CpG DNA and polyinosinic-polycytidylic acid double-stranded RNA, respectively, stimulate CD11c(-) type 2 dendritic cell precursors and CD11c(+) dendritic cells to produce type I IFN.
J Immunol 2001 166:2291–2295
- Kadowaki N, Liu YJ
Natural type I Interferon-producing cells as a link between innate and adaptive Immunity
Hum Immunol 2002 (63): 1126-1132
- Kariko K, Buckstein M, Ni H, Weissman D.
Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: the impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA.
Immunity 2005;23: 165-175
- Karsunky H, Merad M, Mende I, Manz MG, Engleman EG, Weissman IL

- Developmental origin of interferon-alpha-producing dendritic cells from hematopoietic precursors
Exp Hematol 2005
- Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S
Cell type specific involvement of RIG-I in antiviral response
Immunity 2005 (1): 19-28
- Kono DH, Burlingame RW, Owens DG
Lupus susceptibility loci in New Zealand mice
Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91:10168-72
- Kozono Y, Kotzin BL, Holers VM
Resting B cells from New Zealand Black mice demonstrate a defect in apoptotic induction following surface IgM ligation
J Immuno: 156:4498-503
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V
Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α/β in plasmacytoid dendritic cells.
Eur J Immunol 2001 31:2154–2163,
- Krug A, Towarowski A, Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G
Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12.
Eur J Immunol 2001 31:3026–3037
- Kuroiwa T, Lee E
Cellular interactions in the pathogenesis of lupus nephritis: The role of T cells and macrophages in the amplification of the inflammatory process in the kidney
Lupus (7): 597-603
- Lau CM, Broughton C, Tabor AS, Akira S, Flavell RA, Mamula MJ, Christensen SR, Shlomchick SR, Shlomchick MJ, Viglianti GA, Rifkin IA, Marshak-Rothstein A
RNA-associated autoantigens activate B cell by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement
JEM 2005 (202); 1171-1177
- Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchick MJ, Marshak-Rothstein A.
Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like

- receptors.
Nature 2002 (416): 603-607
- Lee SL, Kim YJ
Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their crosstalk
Annu Rev Biochem 2007 (76): 447-80
- Lenert PS
Targeting toll-like receptor signalling in plasmacytoid dendritic cells and autoreactive B cells as a therapy for lupus
Arthritis Res. Ther. 2006; 8(1): 203
- Lenert PS, Goeken AJ, Ashman RF
Extended sequence preferences for oligodeoxyribonucleide activity
Immunology 2006 April; 117(4): 474-481
- Lovgren T, Eloranta ML, Bave U, Alm GV, Rönnblom
Induction of interferon alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG
Arthritis Rheum 2004; 50: 186-72
- Manfredi AA, Rovere P, Galati G
Apoptotic cell clearance in systemic lupus erythematosus
Arthritis Rheum 1998; 41:205-214
- Many N, Datta SK, Schwartz RS
Synthesis of IgM by cells of NZB and SWR mice and their crosses
J Immunol 1979;122:1220-7
- Marshak-Rothstein A and Rifkin IR
Immunologically active autoantigens: The role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease
Annu. Rev. Immunol. 2007; 25: 419-41
- Marshak-Rothstein A
Toll-like receptors in systemic autoimmune disease
Nature Immunology 2006 (6); 823-835
- Martin DA, Elkon KB.
Autoantibodies make a U-turn: the toll hypothesis for autoantibody specificity.
J Exp Med. 2005;202:1465-1469
- Matul'skaia LI, Klimov VI, Riazentseva TA, Pleskovskaia GN
DNase II from phagocytes in the study of the pathogenesis of systemic lupus

- erythematosus
Vopr Med Khim 1986; 32 (1):32-34
- Means TK, Latz E, Hayashi F, Murali MR, Golenbock DT, Luster AD
Human lupus autoantibody DNA complexes activate DC's through cooperation of CD32 and TLR9
J Clin Invest 2005: 1-11
- Medzhitov R, Janeway CA
Innate immune recognition
Annu Rev Immunol 2002; 20:197-216
- Meylan E, Tschopp J
Toll-Like receptors and RNA helicases. Two parallel ways to trigger antiviral responses
Molecular Cell 2006 (22): 561-569
- Michet CJ, McKenna CH, Elveback LR, Kaslow RA, Kurland LT
Epidemiology of systemic lupus erythematosus and other connective tissue diseases in Rochester, Minnesota, 1950 through 1979
Mayo Clin Proc 1985 (60): 105-113
- Migliorini P, Baldini C, Rocchi V, Bombardieri S
Anti-Sm and anti-RNP antibodies.
Autoimmunity 2005 Vol 38:47-54
- Mohan C, Alas E, Morel L, Yang P, Wakeland
Genetic dissection of SLE Pathogenesis. Sle1 on murine chromosome 1 leads to a selective loss of tolerance to H2A/H2B/DNA subnucleosomes
J Clin Invest 1998; 101:1362-72
- Moon UY, Park SJ, Oh ST, Kim WU, Park SH, Lee SH, Cho CS, Kim HY, Lee WK, Lee SK
Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein-Barr virus load in blood
Arthritis Res Ther 2004;6(4):R295-302
- Molden DP, Suzuki H, Nakamura RM
Assays for Sm and RNP antibodies pitfalls and technical considerations.
Diagn Immunol. 1985;3(1):24-8.
- Moore AE, Sabachewki L, Toolan HW,
Culture characteristics of four permanent lines of human cancer cells.

- Cancer Res. 1955 Oct;15(9):598-602. No abstract available.
- Murphy ED, Roths JB.
A Y chromosome associated factor in strain BXSB producing accelerated autoimmunity and lymphoproliferation.
Arthritis Rheum 1979;22: 1188–94
- Nacionales DC, Kelly KM, Lee PY
Type I interferon production by tertiary lymphoid tissue developing in response to 2,6,10,14-tetramethyl-pentadecane (pristane).
Am J Pathol 2006; 168:1227-1240.
- Nacionales DC, Kelly-Scumpia KM, Lee PY, Weinstein JS, Lyons R, Sobel E, Satoh M, Reeves WH
Deficiency of the type I interferon receptor protects mice from experimental Lupus Arthr & Rheum 2007; 56: 3770-3783
- Nakamura RM, Molden DP, Tan EM
Standardization of the immunofluorescence test for autoantibody to nuclear antigens (ANA): use of reference sera of defined antibody specificity.
Am. J. Clin. Path. 1984 Jul;82(1):57-66.
- Neubauer AS, Stiefelmeyer S, Berninger T, Arden GB, Rudolph G
The multifocal pattern electroretinogram in chloroquine retinopathy
Ophthalmic Res 2004 (2):106-13
- Patole PS, Pawar RD, Lech M, et al.
Expression and regulation of Toll-like receptors in lupus-like immune complex glomerulonephritis of MRL-Fas(lpr) mice.
Nephrol Dial Transplant 2006; 21:3062-3073.
- Pawar RD, Ramanjaneyulu A, Kulkarni OP, Lech M, Segerer S, Anders HJ
Inhibition of TLR7 or TLR7 plus TLR9 attenuates glomerulonephritis and lung injury in experimental lupus
J Am Soc Nephrol 2007; (18):1721-31
- Pramatarov KD
Drug induced lupus erythematosus
Clin Dermatol 1998; 16: 367-377
- Perez de Lema G, Lucio-Cazana FJ, Molina A, Luckow B, Schmid H, Wit C, Moreno-Manzano V, Banas B, Mamposo F, Schlöndorff D
Retinoic acid Treatment protects MRL/lpr lupus mice from the development of glomerular disease
Kidney Int 2004; 66(3)

Perniok A und Rubbert-Roth

Neue Therapieansätze bei rheumatoider Arthritis durch Inhibition von kostimulatorischen Molekülen (CTLA4Ig) und Blockade der Interleukin-6-Rezeptorinteraktion (MRA)

Zeitschrift der Rheumatologie 2003 (62), 433-38

Perussia B, Fanning V, Trinchieri G

A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses

Nat Immun Cell Growth Regul 1985;4(3):120-37

Pisitkun P, Deane JA, Difilippantonio MJ, Tarasenko T, Satterthwaite AB, Bolland S

Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication.

Science 2006; 312: 1669-1672

Reininger L, Winkler T; Kalberer CP, Jourdan M, Melchers F, Rolink AG Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZBxNZW)F1 mice

Journal exp. Med. 1996;184, S. 853-861

Robson MG, Walport MJ

Pathogenesis of systemic lupus erythematosus

Clin Exp Allergy 2001 (31): 678-685

Ronnblom L, Eloranta ML, Alm GV

Role of natural interferon alpha producing cells (plasmacytoid dendritic cells) in autoimmunity

Autoimmunity 2003; 36: 436-72

Santiago ML, Mary C, Parzy D

Linkage of a major quantitative trait locus to Yaa gene-induced lupus-like nephritis in (NZWxC57BL/6)F₁ mice.

Eur J Immunol 1998;28:4257-67

Satoh M, Kumar A, Kanwar YS, Reeves WH

Anti-nuclear antibody production and immune complex glomerulonephritis in BALB/c mice treated with pristane

Proc Natl Acad Sci USA 1995; 92:10934-8

Shin HD, Park BL, Cheong HS, Lee HS, Jun JB, Bae SC

DNase II polymorphism associated with risk of renal disorder among systemic lupus

- erythematosus patients
J Hum Genet 2005; 50 (3): 107-11
- Shortman K, Liu YJ
Mouse and human dendritic cell subsets
Nat Rev Immunol 2002 (2): 151-161
- Siegel M, Lee SL
The epidemiology of systemic lupus erythematosus
Semin Arthritis Rheum 1973 (3): 1-54
- Slingsby JH, Norsworthy P, Pearce G
Homozygous hereditary C1q deficiency and systemic lupus erythematosus. A new family and the molecular basis of C1q deficiency in three families.
Arthritis Rheum 1996;39:663-70
- Subramanian S, Tus K, Li QZ, Wang A, Tian XH, Zhou J, Liang C, Bartov G, McDaniel LD, Zhou XJ, Schultz RA, Wakeland EK
A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine Lupus
Proc Natl Acad Sci USA 2006; 103(26): 9970-9975
- Stoll ML, Gavalchin J
Systemic Lupus Erythematosus – messages from experimental models
Rheumatology 2000; 39:18-27
- Talal N, Steinberg AD
The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand Black mice
Current Top Microbiol Immunol 1974; 64:79-103
- Tan EM, Cohen AS, Fries JF
The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus
Arthritis Rheum 1982;25: 1271-1277
- Taylor PR, Carugati A, Fadok VA
A hierarchical role for classical pathway complement proteins in the clearance of apoptotic cells in vivo
J Exp Med 2000; 192: 359-366
- Theofilopoulos AN, Dixon FJ.
Murine models of systemic lupus erythematosus.
Adv Immunol 1985;37: 269–390
- Theofilopoulos AN, Baccala R, Beutler B, Kono DH
Type I interferons (alpha/beta) in immunity and autoimmunity
Annu Rev Immunol 2005 (23): 307-36

- Vollmer J, Tluk S, Schmitz C, Hamm S, Jurk M, Forsbach A, Akira S, Kelly KM, Reeves WH, Bauer S, Krieg AM
Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8
J Exp Med. 2005; 202: 1575-1585
- Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A.
Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA.
Immunity 2003;19:837-847
- Vyse TJ, Drake CG, Rozzo SJ, Ropper E, Izui S, Kotzin BL
Genetic linkage of IgG autoantibody production in relation to lupus nephritis in New Zealand hybrid mice
J Clin Invest 1996; 98:1762-72
- Walker N
Real Time and Quantitative PCR
<http://dir.niehs.gov/pcr/home.htm>
- Weller TH, Coons AH
Fluorescent antibody studies with agents of varicella and herpes zoster propagated in vitro.
Proc Soc Exp Biol Med. 1954 Aug-Sep;86(4):789-94.
- Yasuda K, Yu P, Kirschning CJ
Endosomal translocation of vertebrate DNA activates dendritic cells via Tlr9-dependent and -independent pathways.
J Immunol. 2005 (174): 6129-6136
- Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T
The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA induced innate antiviral responses
Nat Immunol 2004 (7): 730-7