

Aus der Medizinischen Klinik  
mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**„Bedeutung von Geschlechtsunterschieden bei der  
Differenzierung von autoreaktiven B-Zellen zu  
verschiedenen B-Zell-Subtypen“**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

Vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Erwin Grubie  
aus Tiraspol

Gutachter:           1. Prof. Dr. med. G. Riemekasten  
                          2. Prof. Dr. med. E. Märker-Hermann  
                          3. Prof. Dr. med. U. Lange

Datum der Promotion:           25.10.2013

# Inhaltsverzeichnis

## 1. Einleitung

1.1 Geschlechtsspezifische Faktoren beim Systemischen Lupus Erythematoses	
1.1.1 Der Systemische Lupus Erythematoses ( <i>SLE</i> )	6
1.1.2 Geschlechterverteilung der Autoimmunerkrankungen	8
1.1.3 Grundlegende geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort	9
1.1.4 Genetische Einflüsse in der Pathogenese	9
1.1.5 Die Rolle der Sexualhormone	14
1.1.6 Mikrochimärismus	16
1.1.7 Umwelteinflüsse	17
1.2. Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese des SLE	19
1.2.1 Entscheidende Autoantigene beim SLE	20
1.2.2 Reifung der B-Lymphozyten	22
1.2.3 Funktioneller Aufbau der Milz	22
1.2.4 Aktivierung der B-Zellen	24
1.2.5 B-Zell Toleranz	26
1.3 Mausmodell	28

## 2. Material & Methoden

2.1 Verwendete Puffer und Medien	29
2.2 Maushaltung	30
2.3 Gewinnung von Zellproben	30
2.4 Aufbereitung der Milz	31
2.5 Zellzählung	31
2.6 Magnetische Zellsortierung ( <i>MACS</i> )	32
2.6.1 Verwendete Materialien	
2.6.2 Prinzip der Magnetischen Zellsortierung	
2.6.3 Durchführung des MACS	

2.7 Isolierung und Analyse der B-Zell-Subtypen mittels Durchflusszytometrie ( <i>FACS</i> )	33
2.7.1 Verwendete Antikörper und Geräte	
2.7.2 Prinzip der durchflusszytometrischen Zellanalyse	
2.7.3 Färbung der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern	
2.8 Messung der Frequenz Autoantikörper produzierender Zellen ( <i>ELISPOT</i> )	35
2.8.1 Verwendete Materialien	
2.8.2 Das Funktionsprinzip des ELISPOT-Assays	
2.8.3 Inkulturnahme und Stimulierung der B-Zellen	
2.8.4 Vorbereitung des Experiments, Plattenbeschichtung (Coating)	
2.8.5 Durchführung des ELISPOT-Assays	
2.9 Vergleich der Antikörpertiter im Serum weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse mittels ELISA ( <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> )	39
2.9.1 Verwendete Materialien	
2.9.2 Entnahme und Aufbereitung der Blutproben	
2.9.3 Funktionsprinzip des ELISA	
2.9.4 Messung der anti-dsDNA- und anti-SmD1 <sub>83-119</sub> -Antikörpertiter im Serum	
2.10 Messung der B-Zell-Proliferation nach TLR-Stimulierung	41
2.10.1 Verwendete Materialien	
2.10.2 CFSE-Proliferationsassay	
2.10.3 <sup>3</sup> [H]-Thymidin-Proliferationsassay	
2.11. Immunhistochemische Darstellung der Milzen	43
2.12 Messung der Protein- und Leukozyturie	43
2.13 Statistische Auswertung	44
<b>Fragestellung</b>	45

<b>3. Ergebnisse</b>	
3.1 Autoantikörpertiter (anti-dsDNA- und anti-SmD1 <sub>(83-119)</sub> -Ak ) und Krankheitsprogression im Geschlechter- und Altersvergleich	46
3.2 Messung der Autoantikörperproduzenten in primären und sekundären lymphatischen Organen weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse	48
3.3 B-Zell-Komposition der Milz in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht	50
3.3.1 Quantitative Analyse der B-Zell-Subpopulationen der Milz	
3.3.2 Immunhistologische Darstellung der Milz	
3.4 Weibliche und männliche NZB/W F1 Mäuse haben gleiche Frequenzen autoreaktiver Fo- und Mz-B-Zellen	54
3.4.1 Austestung der Kulturbedingungen für die B-Zell-Stimulation mit LPS und anti-CD40+IL4	
3.4.2 Messung der anti-dsDNA und anti-SmD1 <sub>83-119</sub> -Autoantikörperproduzenten	
3.5 Vergleich der Aktivierbarkeit und Proliferation weiblicher und männlicher B-Zellen mit dem CFSE- und [ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Proliferationsassay	59
<b>4. Diskussion</b>	
4.1 Antikörpertiter und Krankheitsprogression in weiblichen und männlichen Mäusen	64
4.2 Die Milz ist das Organ mit der höchsten Anzahl an Autoantikörperproduzenten	65
4.3 Vergleich der B-Zell-Subpopulationen in weiblichen und männlichen Milzen	66
4.4 Frequenzen autoreaktiver B-Zellen der Milz im Geschlechtervergleich	67
4.5 Aktivierbarkeit und Proliferation der B-Zellen im Geschlechtervergleich	69
<b>5. Zusammenfassung</b>	71
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	73
<b>7. Anhang</b>	80

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Geschlechtsspezifische Faktoren beim Systemischen Lupus Erythematoses

### 1.1.1 Der Systemische Lupus Erythematoses (SLE)

Der SLE zählt zu den systemischen Autoimmunerkrankungen (AID) unbekannter Ätiologie, die nahezu alle Organsysteme betreffen kann. Die Beschwerden sind sehr heterogen und reichen von allgemeinen Symptomen mit Abgeschlagenheit und Gewichtsabnahme, dem typischen „Schmetterlingserythem“, bis zu hämatologischen Veränderungen und schweren Organschäden. Die Organmanifestation ist sehr variabel und kann Gelenke, Muskulatur, Nieren, Herz, Lunge und das Zentralnervensystem betreffen. Als Erklärung werden in der Literatur Antikörper gegen ubiquitär vorkommende Antigene angegeben. Typisch ist das Auftreten Antinukleärer Autoantikörper, neben anderen insbesondere gegen doppelsträngige DNA (*dsDNA*).

Der SLE ist zwar gut erforscht, allerdings ist der genaue Pathomechanismus bisher nicht bekannt. Für die Ausbildung der Erkrankung werden gleichermaßen genetische Faktoren sowie Umwelteinflüsse verantwortlich gemacht.<sup>1</sup>

Die Sicherung der Diagnose ist aufgrund der stark divergierenden Symptomatik schwierig. Nicht selten findet sich eine oligosymptomatische Frühphase, in der die Diagnose bzw. Klassifikation der Erkrankung zudem erschwert wird. Als Standard zur Klassifizierung und Abgrenzung gegenüber anderen rheumatischen Erkrankungen gelten die von dem American College of Rheumatology aufgestellten Kriterien (modifizierte ACR-Kriterien, Abbildung 1). Das Auftreten von mindestens vier der elf Kriterien sichert die Diagnose.<sup>2</sup>

Die Prävalenz des SLE in den USA liegt zwischen 14,6 und 122 Fällen pro 100.000 Personen. Die Inzidenzrate wird mit 1,8 bis zu 7,6 Fällen pro 100.000 Einwohner angegeben.<sup>2</sup> In Mitteleuropa beträgt die Prävalenz 25 pro 100.000 Einwohner.<sup>3</sup> Hierbei ist eine vielfach höhere Inzidenz bei Frauen, insbesondere in der reproduktiven Lebensperiode gegeben. Das höchste Risiko, an SLE zu erkranken, besteht im Alter zwischen 15 und 40 Jahren.

<b>Modifizierte ACR-Klassifikationskriterien</b>	
1.	Schmetterlingserythem: <i>fixiertes Erythem, flach oder erhaben im Bereich der Wangen, meist unter Aussparung der nasolabialen Falten</i>
2.	Diskoider Lupus: <i>erythematöse Plaques mit fest haftender, in den Haarfollikeln fixierter Schuppung, narbig-atroph abheilend</i>
3.	Photosensitivität: <i>durch UV-Provokation ausgelöste Hautläsion</i>
4.	Orale (und nasopharyngeale) Ulzerationen
5.	Arthritis: <i>nichterosive Arthritis von mindestens zwei Gelenken</i>
6.	Serositis, Pleuritis oder Perikarditis
7.	Renale Funktionsstörung: <i>Proteinurie &gt; 0,5 g/d oder zelluläre Zylinder</i>
8.	ZNS-Beteiligung: Krampfanfälle oder Psychosen ohne andere Ursache
9.	Blutbildveränderungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hämolytische Anämie</li> <li>- Leukopenie &lt; 4000/μl</li> <li>- Lymphopenie &lt; 1500/μl</li> <li>- Thrombozytopenie &lt; 100000/ μl</li> </ul>
10.	Immunologische Veränderungen: <ul style="list-style-type: none"> <li>- anti-dsDNA-Antikörper <i>oder</i></li> <li>- anti-Sm-Antikörper <i>oder</i></li> <li>- Positiver Antiphospholipidantikörper</li> </ul>
11.	Nachweis antinukleärer Antikörper

**Abbildung 1:** ACR Kriterien zur Diagnosestellung von SLE (Dubois` Lupus Erythematosus 6th ed., The Epidemiology of Systemic Lupus Erythematosus. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:65-83.) und “Der Internist” Band 51 Heft 8 August 2010, p. 1013-1028 (Hochberg MC (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus; Arthritis Rheum 40: 1725)

### 1.1.2 Geschlechterverteilung der Autoimmunerkrankungen

Der überwiegende Teil der Autoimmunerkrankungen zeigt einen deutlichen Prävalenzunterschied zwischen Frauen und Männern, mit einer weit höheren Beteiligung des weiblichen Geschlechts. Zu den Autoimmunerkrankungen zählen etwa 80 Krankheiten, an denen in den Industrieländern 5-8% der Bevölkerung leiden<sup>4</sup>. Der Frauenanteil beträgt im Durchschnitt 75-80%. Beim Sjögren-Syndrom, dem Systemischen Lupus Erythematodes (SLE), der Primär biliären Zirrhose (PBC), den autoimmunen Schilddrüsenenerkrankungen und der Sklerodermie liegt der Frauenanteil bei 80%. Bei der Rheumatoiden Arthritis (RA) und Multiplen Sklerose (MS) wird der Frauenanteil etwas niedriger mit 60-75% angegeben.<sup>5,6</sup> Besonders ausgeprägt ist der Unterschied bei der Hashimoto-Thyreoditis, gefolgt vom SLE und Sjögren-Syndrom (Abbildung 3).

Autoimmunerkrankung	Verhältnis Frau : Mann
Hashimoto-Thyreoditis	50:1
SLE	9:1
Sjögren-Syndrom	9:1 - 20:1
Antiphospholipid-Syndrom	9:1
PBC (Primär biliäre Zirrhose )	9:1
Sharp-Syndrom (Mixed connective tissue disease)	8:1
Morbus Basedow (Grave's disease)	7:1
Rheumatoide Arthritis	3:1 – 4:1
Sklerodermie	3:1 – 4:1
Myasthenia gravis	2:1 – 3:1
Multiple Sklerose	2:1
Autoimmune thrombozytopenie Purpura	2:1
Typ I Diabetes mellitus	1:1 – 2:1
Ulzerierende Kolitis	1:1
Autoimmune Myokarditis	1:1,2

**Abbildung 2:** Ratio der Geschlechtsprävalenz ausgewählter Autoimmunerkrankungen. Modifiziert nach Fairweather, Rose und McCarthy, reviewed in “Gender as risk factor for autoimmune diseases” Norbert Gleicher, David H. Barad



Beim SLE variiert die Prävalenzrate bei Frauen zwischen 406 bei Afroamerikanerinnen und 164 pro 100.000 bei Amerikanern mit europäischem Hintergrund. SLE wird in urbanen Gebieten häufiger beobachtet. Bei Kindern beträgt das Geschlechtsverhältnis (Mädchen : Junge) 3:1, bei Erwachsenen liegt das Verhältnis zwischen 7:1 und 15:1. In der älteren Bevölkerung wird die Ratio mit 8:1 angegeben.<sup>7</sup> Das Verhältnis hängt auch wesentlich von der Region ab und reicht von 5,3:11 in Curaçao bis 23:1 in Oman. In den europäischen Ländern werden Erkrankungsgipfel mit 39 Jahren (Norwegen und Griechenland) und 47 Jahren (Schweden) angegeben. Im Vergleich dazu zeigen Studien in asiatischen Ländern ein weitaus niedrigeres mittleres Erkrankungsalter von 24-26 Jahren. Insgesamt zeigt sich für die europäische Bevölkerung neben einem höheren Erkrankungsalter die niedrigste Inzidenzrate.<sup>8</sup>

### **1.1.3 Grundlegende geschlechtsspezifische Unterschiede in der Immunantwort**

Das humane Immunsystem weist einen Dimorphismus in grundlegenden Immunreaktionen zwischen Frauen und Männern auf. Frauen weisen beispielsweise eine höhere Antikörperproduktion und Zell-vermittelte Antwort nach Immunisierung auf.<sup>9</sup> Männer sind häufiger seronegativ für EBV und seropositive Frauen haben höhere Antikörpertiter als seropositive Männer. Ebenso zeigt sich bei Frauen eine stärkere immunologische Antwort auf eine CMV-Infektion.<sup>10, 11</sup> Manche Autoren sind grundlegend der Meinung, dass sowohl virale, bakterielle als auch parasitäre Infektionen bei Männern schwerer und häufiger sind.<sup>12</sup>

### **1.1.4 Genetische Einflüsse in der Pathogenese**

#### ***Allgemeine immunogenetische Grundlagen***

Familiäre Häufung der Erkrankungen, variable Prävalenz in unterschiedlichen ethnischen Gruppen, Assoziation mit dem HLA-Haplotyp und die höhere Konkordanz in eineiigen Zwillingen im Vergleich zu zweieiigen, sprechen deutlich für einen genetischen Einfluss.<sup>6,</sup>  
<sup>13</sup> Bis auf wenige Ausnahmen vermutet man multigenetische Ursachen, die zu einem abnormalen Phänotyp führen. Die Beobachtung, dass verschiedene Autoimmunerkrankungen in einer Familie gehäuft auftreten, legt die

Vermutung nahe, dass gleiche genetische Defekte zur Manifestation verschiedener Autoimmunerkrankungen führen können. Im Rahmen einer internationalen Genomstudie wurden mehrere Genorte identifiziert, die eine Veranlagung zur Rheumatoiden Arthritis mit sich führen, aber auch mit einem erhöhtem Risiko an SLE, IBD (*inflammatory bowel disease*), MS oder ankylosierender Spondylitis zu erkranken.<sup>14</sup>

In Familienstudien wurden in den letzten Jahren mehrere Genloci mit dem SLE in Verbindung gebracht, wie zum Beispiel 1q23, 1q41-2, 2q37, 4p15, 6p11 und 16q12. Insgesamt wurden bisher ca. 115 gefunden (Wakeland et al. 2001 and Gaffney et al. 2002). Die Prädisposition bestimmter HLA-Typen (HLA-DR3 und HLA-DR2) ist seit mehr als 35 Jahren bekannt. Neuere Studien sehen einen Zusammenhang vor allem mit dem HLA-DR2.<sup>15</sup> Die HLA-Abhängigkeit ist hierbei allerdings bei weitem nicht so überzeugend, wie sie zum Beispiel bei Rheumatoider Arthritis (HLA-DR4) oder Typ I Diabetes (HLA-DR3) beobachtet wird.<sup>16</sup> Defekte in den Genloci des Complement-Systems (C1q, C1r/s, C2 und C4) wurden ebenfalls als prädisponierend erkannt.<sup>17, 18</sup> Obwohl mehrere Gendefekte zur Ausbildung des SLE notwendig sind, wird bei einem Defekt im C1q-Lokus in 90% ein krankhafter Phänotyp ausgebildet.<sup>16</sup> Dies betrifft allerdings nur eine Minderheit der Patienten (<5%). Der mit 1/10.000 am häufigsten auftretende Defekt betrifft den C2-Lokus; annähernd ein Drittel dieser Patienten bildet SLE aus. Interessanterweise wird dieser Defekt insbesondere bei Frauen festgestellt.<sup>19</sup>

Ein weiterer, für die Pathogenese des SLE wichtiger Faktor, ist der Fc-Rezeptor. Variationen in FcγR-Genen, mit Reduktion der Bindungsaffinität der IgG-Subklassen und damit u.a. insuffiziente Eliminierung von Immunkomplexen, werden mit dem SLE in Verbindung gebracht.<sup>20</sup> Bisher wurden folgende Klassen von Fcγ-Rezeptoren als prädisponierend erkannt: FcγRIIA, FcγRIIB, FcγRIIC, FcγRIIIA und FcγRIIIB.

In diesem Zusammenhang werden in der Literatur auch Variationen von MBL (*Mannose-binding lectin*), CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*), PD-1 (*Programmed Cell Death-1*) und IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*) beschrieben.<sup>16</sup>

### ***Die Rolle des X-Chromosoms in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen***

Es ist bekannt, dass auf dem X-Chromosom zahlreiche Gene für die Erhaltung der Immunabwehr und -toleranz lokalisiert sind. Vielfache numerische und spezifische X-chromosomale Störungen sind mit Autoimmunerkrankungen assoziiert.

Numerische X-chromosomale Störungen: Die X-chromosomale Aneuploidie ist die häufigste numerische chromosomale Störung. Die X-chromosomale Monosomie (Turner-Syndrom, 45, X) und das Klinefelter-Syndrom (47, XXY) sind zwei Beispiele, die mit Autoimmunerkrankungen assoziiert sind. Neben Thyreoiditis, entzündlichen Darmerkrankungen und Typ I Diabetes mellitus, wurde bei Patienten mit Turner Syndrom auch über eine hohe Prävalenz für juvenile Arthritis berichtet.<sup>21</sup>

Patienten mit Klinefelter-Syndrom haben ein höheres Risiko an Autoimmunerkrankungen zu erkranken, als genotypisch normale Männer. SLE und nicht ganz so häufig Sklerodermie, Polymyositis, ankylosierende Spondylitis und rheumatoide Arthritis werden mit diesem Gendefekt assoziiert.<sup>22,23</sup>

Spezifische X-chromosomale Mutationen:

Spezifische Mutationen auf dem X-Chromosom führen zu Immundefizienz unterschiedlicher Ausprägung. Einige hierfür verantwortliche Defekte werden im Folgenden aufgeführt, eine Zusammenfassung gibt die Tabelle 2 wider.<sup>24</sup>

*IPEX-Syndrom (immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome):* Foxp3 ist ein für die Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen essentielles Protein, dessen Gen auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert ist. Ein mutiertes oder defektes Foxp3-Gen hat eine aggressive, oft letal verlaufende Autoimmunerkrankung, dem IPEX-Syndrom, zur Folge.

*Hyper-IgM-Syndrom Typ 1 (HIGM 1):* Diese Erkrankung wird durch einen Defekt am CD40-Liganden (CD40L) hervorgerufen, der hauptsächlich auf aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird. CD40L ist sowohl für den Klassenwechsel, als auch für die Aktivierung antigenpräsentierender Zellen wichtig. Die Patienten haben einen normalen oder erhöhten IgM- und niedrige IgG-, IgA- und IgE-Spiegel. In Schüben können autoimmunhämolytische Anämie, Hypothyreose und chronisch-entzündliche Darmerkrankungen auftreten.

*Wiskott-Aldrich-Syndrom:* Gekennzeichnet ist diese Erkrankung durch kongenitale Thrombozytopenie, Ekzeme und Immundefizienz. Ursächlich hierfür ist ein Defekt am WAS-Gen. Annähernd 25% dieser Patienten leiden an multiplen autoimmungetriggerten Erkrankungen wie der AIHA (*Autoimmunhämolytische Anämie*), Vaskulitis, Arthritis,

Purpura Schönlein-Henoch, Chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen, Uveitis und Myositis.

*X-chromosomale Agammaglobulinämie (XLA: X-linked Agammaglobulinaemia):* Die X-chromosomale Agammaglobulinämie ist eine Immunmangelkrankheit. Das verantwortliche *BTK-Gen (Bruton-Tyrosinkinase-Gen)* kodiert ein Enzym, das eine wichtige Rolle in der B-Zell-Differenzierung spielt. Aufgrund niedriger Immunglobulin-Spiegel und insgesamt reduzierter Anzahl zirkulierender B-Zellen, kommt es zu rezidivierenden bakteriellen Infektionen. Diese Erkrankung geht mit einer höheren Inzidenz für juvenile rheumatoide Arthritis, aseptische Polyarthritits und Dermatomyositis einher.

Syndrom	Chromosomregion	Gen	Protein
IPEX	Xp11.23–q13.3	FOXP3	<i>Fork head box P3</i>
XLP	Xq25	SH2D1A	<i>SLAM-associated protein</i>
XSCID	Xq13.1	IL2RG	<i>Gamma-chain common cytokine-receptor</i>
HIGM 1 ( <i>Hyper-IgM syndrome type</i> )	Xq26-27	TNFSF5	<i>CD40-Ligand</i>
Wiskott–Aldrich-Syndrom	Xp11.23-22	WAS	<i>W-A-Syndrom-Protein</i>
XLA ( <i>X-linked Agammaglobulin-aemia</i> )	Xq21.3-22	BTK	<i>Bruton-Tyrosinkinase</i>
XEDA-ID ( <i>X-linked recessive anhydrotic ectodermal dysplasia with immune - deficiency</i> )	Xq28	IKBKG	<i>“Inhibitor of kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in b-cells”</i>

**Abbildung 3:** Mit Autoimmunerkrankungen assoziierten X-chromosomale Defekte. Einteilung nach Gensegment und dem betroffenen Protein (verändert nach Gabriela Hernández-Molina et al., “The role of the X chromosome in immunity and autoimmunity“. *Autoimmunity Reviews* 6 (2007) 218-222)

*X-chromosomale Inaktivierung – „diploid overexpression“ als Modell für den  
Geschlechter-Bias:*

Damit die Genprodukte X-chromosomaler Gene in beiden Geschlechtern in äquivalenter Menge exprimiert werden, muss die unterschiedliche Anzahl der X-Chromosome kompensiert werden. Bei Säugetieren wird das erreicht, indem bei Weibchen ein X-Chromosom während der frühen embryonalen Entwicklung weitgehend inaktiviert wird. Die Inaktivierung betrifft bei Säugetieren normalerweise zufällig das maternale oder paternale X-Chromosom. Hierbei ist also eine 50:50-Verteilung beider Zelllinien zu erwarten. Eine asymmetrische X-Chromosom-Inaktivierung (XCI) wird zwar auch bei 5-10% gesunder Frauen nachgewiesen. Deutlich verschobene XCI zeigt eine Assoziation mit Autoimmunerkrankungen. Bei der Sklerodermie und der Autoimmun-Thyreoditis, nicht jedoch bei der PBC, konnte ein im Verhältnis höherer Anteil asymmetrischer XCI in peripheren Lymphozyten im Vergleich zu Gesunden nachgewiesen werden.<sup>25-27</sup> Damit wird ein weiteres Erklärungsmodell für die Dominanz des weiblichen Geschlechts bei Autoimmunerkrankungen angeboten. Erstmals wurde diese Hypothese beim SLE diskutiert, jedoch in weiteren Arbeiten nicht bestätigt.<sup>28, 29</sup> Einzig die asymmetrische X-Chromosom-Inaktivierung ist als Ursache für die erwähnten Autoimmunerkrankung sicherlich nicht ausreichend, wird allerdings als ein Kofaktor beim Verlust der Immuntoleranz diskutiert.<sup>30</sup>

In diesem Zusammenhang wird die diploide Überexpression („*diploid overexpression*“) X-chromosomaler, potentiell Autoimmunität fördernder Gene als eine Erklärung diskutiert. Die dafür infrage kommenden X-chromosomalen Loci sind vielfältig. Zu den wichtigsten werden Foxp3-, CD40L- und TLR7 gezählt, die auf Immunzellen exprimiert werden und eine Schlüsselrolle im Immunsystem einnehmen (hierzu auch Kapitel 1.2.4). In aktuellen Studien zeigen sich Hinweise darauf, dass die gesteigerte Expression X-chromosomaler Gene durch Reaktivierung des inaktivierten X-Chromosoms, eine mögliche Erklärung für den Geschlechter-Bias darstellt. Als grundlegender Mechanismus wird die Demethylierung des inaktivierten X-Chromosoms bei Frauen vorgeschlagen<sup>31</sup> U.a. konnte im Experiment durch Demethylierung die Expression des CD40L auf weiblichen T-Zellen verdoppelt werden, während bei Männern ein nur minimaler Effekt erzielt wurde.<sup>32, 33</sup> Gesteigerte Expression des TLR-7 wird u.a. mit dem SLE in Verbindung gebracht<sup>34</sup> (siehe hierzu Kap. 1.2.4).

### 1.1.5 Die Rolle der Sexualhormone

Die höhere Prävalenz beim weiblichen Geschlecht zeigt sich vor allem während der reproduktiven Phase, also der Lebensphase, die durch die Produktion von Sexualhormonen charakterisiert ist. Im Alter zwischen 15 und 40 sind in 9 von 10 Fällen Frauen betroffen. Diese Verteilung ist im Kindesalter und im höheren Alter (Late-onset SLE) mit 3-5:1 und 3-4:1 milder ausgeprägt.<sup>35, 36</sup> Bei einigen Patienten wird während der Menses eine Verschlechterung der Symptomatik beobachtet.<sup>37</sup> Früh einsetzende oder irreguläre Menarche stellt in case-control Studien einen Risikofaktor dar. Das Risiko auf einen Erkrankungsschub nimmt während der Schwangerschaft zu.<sup>38, 39</sup>

Messungen der Hormonspiegel in SLE-Patienten zeigten erhöhte Werte der hochpotenten Östrogene und/oder Prolactin.<sup>7, 40</sup> Erkrankte Männer wiesen niedrigere Testosteronspiegel und hohe Östrogenspiegel auf.<sup>41</sup> Zudem hatten erkrankte Frauen neben niedrigen Testosteron-Werten auch reduzierte Spiegel des milden Androgens Dehydroepiandrosteron (DHEA).<sup>42, 43</sup>

Der „krankmachende“ Einfluss der weiblichen Sexualhormone insbesondere von Östrogen auf das Immunsystem hat sich auch in zahlreichen Mausmodellen gezeigt. In frühen Mausversuchen führte die Kastration bei weiblichen NZB/W F1 Mäusen zu einer Lebensverlängerung, während die Männchen nach Kastration früher verstarben. Testektomierte NZB/W F1 Mäuse entwickelten hierbei - wie sonst nur Weibchen - hohe IgG-Auto-Ak-Titer. Die Behandlung mit Androgenen verbesserte den Krankheitsverlauf und die Überlebensdauer, der gegenteilige Effekt trat bei Substitution von Östrogen auf.<sup>44</sup> Durch die Behandlung der Mäuse mit dem Antiöstrogen Nafoxidin konnte die Krankheitsmanifestation, bei reduziertem anti-dsDNA-Ak-Spiegel und geringerer Proteinurie, verzögert werden.<sup>45</sup>

Somit existieren viele Daten, die den pathologischen Effekt von Östrogenen und den protektivem Effekt von Androgenen beim SLE belegen.

#### ***Einfluss von Östrogen, Prolaktin und DHEA auf die B-Zell-Entwicklung***

Östrogen: Die Östrogenwirkung wird klassisch durch intrazelluläre Östrogenrezeptoren (ER) vermittelt, die an Liganden gebunden genetische Motive erkennen und in erster Linie als Transkriptionsfaktoren agieren. Hierbei können sich die beiden bekannten Rezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) in ihrer Wirkung überschneiden und inhibieren. Bestimmte Gensets lassen

sich aber auch nur einem Rezeptor zuordnen.<sup>46-48</sup> Zudem existieren membrangebundene Östrogenrezeptoren, die eine schnelle, nicht-genomische Antwort induzieren und auf T-Zellen und Makrophagen, jedoch bisher nicht auf B-Zellen, nachgewiesen wurden.<sup>49</sup>

In den letzten Jahren erschienen zahlreiche Studien zum Einfluss des Steroidhormons auf die B-Zell-Entwicklung. Die Beobachtung, dass während der Schwangerschaft die Lymphopoese herabgesetzt war, legte die Vermutung nahe, dass Sexualhormone die frühe B-Zell-Reifung regulieren können. Heute geht man davon aus, dass Östradiol nicht nur einen inhibierenden Effekt in der B-Zell-Entwicklung von der pro-B-Zelle zur prä-B-Zelle hat, sondern auch nachfolgende Phasen der B-Zell-Reifung und -Prägung beeinflusst.<sup>50, 51</sup>

#### Prolaktin:

Prolaktin ist ein laktogenes Peptidhormon des Hypophysenvorderlappens und kann, zum Teil ähnlich wie Östrogen aber auch gegensätzlich, als Immunmodulator mit Einfluss auf Apoptose, Aktivierung und Proliferation von Immunzellen wirken.<sup>1</sup> Prolaktin-Rezeptoren sind auf multiplen Zellen u.a. auf B- und T-Zellen vorhanden. Wie zuvor für Östrogen beschrieben, kann im Mausmodell auch durch Prolaktin ein Kollaps der Toleranz induziert werden.<sup>52</sup> Anders als bei Östrogen, wird unter Prolaktineinwirkung vor allem ein proliferativer Effekt auf die T-Zell-abhängigen autoreaktiven folliculären B-Zellen beobachtet.<sup>1</sup> Eine Wirkung auf das Knochenmark ist nicht beschrieben.

Gestörte Expression von Bcl-2, IFN $\gamma$ R2 und Trp63, gesteigerte Aktivität von CD40, CD40L und BAFF scheinen eine Rolle in der Prolaktin-vermittelten Autoimmunität zu spielen. Für manche Schritte der pathologischen Östrogenwirkung auf B-Zellen wird ein notwendiger unterstützender Effekt von Prolaktin diskutiert.<sup>53,54</sup>

#### Dehydroepiandrosterone (DHEA):

DHEA ist das Hauptprodukt der Nebennierenrinde beider Geschlechter und kann sowohl zu Testosteron als auch zu Östradiol verstoffwechselt werden. Der bei SLE-Patienten erniedrigte DHEA-Spiegel wird u.a. durch eine kompromittierte Synthese im zweiten Schritt der P450c17-Reaktion erklärt.<sup>51</sup> Mausstudien zeigen einen protektiven Effekt des DHEA. Durch Substitution von DHEA kann im Mausmodell die Produktion von anti-DNA-Antikörpern vermieden werden, mit einer insgesamt lebensverlängernden Wirkung.<sup>55</sup> In der klinischen Praxis wird DHEA zur Verbesserung von Fatigue, Sexualfunktion und Allgemeinbefinden bei SLE-Patienten verwendet. Die Ergebnisse klinischer Studien zur

Wirksamkeit dieser Therapie in Bezug auf den SLEDAI (*Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index*) sind allerdings widersprüchlich.<sup>56-58</sup>

### 1.1.6 Mikrochimärismus

Unter dem Mikrochimärismus versteht man die Persistenz von Zellen in einem Organismus, die von einem anderen Individuum stammen, also mit dem Wirt nicht genetisch identisch sind. Dieser Zelltransfer kann mit einer Schwangerschaft assoziiert sein oder iatrogen durch Blut-, Stammzell- und Organtransplantation zustande kommen. Der feto-maternale Transfer kann bei Geburt, aber auch Fehlgeburt und Abtreibungen auftreten. Ein Austausch von Zellen, aber auch bloß von DNA, kann bidirektional zwischen der schwangeren Frau und dem Fötus, sowie zwischen Zwillingen auftreten. Ein feto-maternaler Transfer wird allerdings viel häufiger beobachtet.<sup>59-61</sup>

Die erhöhte Erkrankungsrate der Frauen während einer Schwangerschaft und postpartum, wirft die Frage auf, inwieweit die Schwangerschaft, als Auslöser einer sich später manifestierenden Autoimmunerkrankung, für den Geschlechter-Bias verantwortlich gemacht werden kann. Obwohl die fetalen Zellen im mütterlichen Kreislauf normalerweise schnell eliminiert werden, kann es auch zu langjähriger Persistenz kommen.<sup>62</sup>

Unterstützung findet dieses Modell in der Transplantationsmedizin. Die chronische graft-versus-host-Krankheit (*cGvHD = chronic Graft-versus-Host Disease*), die nach allogener Stammzelltransplantation auftreten kann, weist viele Parallelen zu Autoimmunerkrankungen auf.

Mikrochimärismus wurde bereits mit zahlreichen Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht, darunter finden sich u.a. das Sjögren-Syndrom (SS), die Systemische Sklerose (SSc), Morbus Basedow, die Hashimoto Thyreoditis, die Primär biliäre Zirrhose (PBC) und der SLE.<sup>63</sup> Chimäre Zellen wurden in den Nieren von SLE-Patienten mit einer Nephritis und auch in der Haut von Patienten mit Systemischer Sklerose nachgewiesen.<sup>64.</sup>

<sup>65</sup> Allerdings ist die Datenlage für einige Autoimmunerkrankungen noch immer kontrovers.

Die Rolle des Mikrochimärismus wurde in aktuellen Studien zu SSc, entzündlichen Myopathien, SS, PBC und SLE allerdings hinterfragt.<sup>63, 64, 66</sup> Wie Mikrochimäre zu Autoimmunerkrankungen im Wirtsorganismus führen oder diesen insgesamt beeinflussen ist bisher nicht geklärt.



Drei Hypothesen zum Pathomechanismus wurden von Kremer et al. vorgestellt. Die erste Hypothese geht davon aus, dass die chimäre Zelle eine immunkompetente T-Zelle ist, die das von APCs (*antigen-presenting cells*) des Wirts präsentierte Antigen erkennen und durch Stimulierung der Wirts-B-Zellen die Autoantikörperproduktion induzieren. Damit würde die chimäre T-Zelle eine Graft-versus-Host-Reaktion (*GvHR*) auslösen, deren Ähnlichkeit zu Autoimmunprozessen bereits zuvor angesprochen wurde. Folgende Voraussetzungen müssten hierfür erfüllt sein: die „Duldung“ der chimären Zellen im Wirtsorganismus, die chimäre Zelle muss eine immunkompetente T-Zelle sein und zuletzt muss die chimäre Zelle den Wirtsorganismus als Fremd erkennen.<sup>67</sup> Die Präsenz chimärer Zellen im Blutkreislauf und den Nieren von SLE-Patienten, als auch die Immunkompetenz chimärer T-Zellen wurde in Studien an SSc und SLE-Patienten demonstriert. Die zweite Hypothese geht von einer Host-versus-Graft-Reaktion aus. Hierbei trägt die chimäre Zelle das Antigen, wogegen sich die Immunantwort des Wirtsorganismus richtet. Die Autoimmunreaktion manifestiert sich dann als direkte Folge der Immunantwort auf die Fremdzelle oder durch „molecular mimicry“. Wenn die feto-maternale Toleranz, die während der Schwangerschaft die Toleranz gegenüber dem paternalen Antigen wahrt, nach der Geburt des Kindes nicht mehr besteht, kommt es demzufolge zu einer Immunantwort gegen die im Wirtsgewebe angesiedelten chimären Zellen.<sup>68</sup> Gelingt es dem Wirtsorganismus nicht das chimäre Antigen zu eliminieren, stellt sich nach diesem Modell eine persistierende chronische Autoimmunreaktion ein.

Im dritten Vorschlag zum Pathomechanismus werden chimäre Zellen nicht als direkte Pathogene angesehen, sondern vielmehr als ein Reparaturmechanismus. Demnach entwickeln sich die chimären Vorläuferzellen zu Parenchymzellen und ersetzen beschädigte Wirtszellen. Als Beispiel sei hier eine Studie zu NLS-CHB (*Neonatal lupus syndrome-congenital heart block*) genannt, worin maternale chimäre Zellen im Herzen des Fetus nachgewiesen werden konnten.<sup>69</sup>

### **1.1.7 Umwelteinflüsse**

Der deutliche Prävalenzunterschied zwischen den Geschlechtern brachte den Diskurs auch auf Umweltfaktoren, denen Frauen möglicherweise öfter ausgesetzt sind als Männer bzw. die bei Frauen unterschiedliche Immunreaktionen auslösen. Neben den besprochenen endogenen Ursachen, wird hier eine exogen-toxische Wirkung auf das Immunsystem angenommen. Dass Umwelteinflüsse unabhängig vom Geschlecht entschieden Einfluss nehmen, wurde bereits früh in epidemiologischen Studien deutlich. Beispielsweise zeigen

nach Europa oder USA eingewanderte Afrikaner eine höhere Inzidenz für den SLE verglichen mit der europäischen Bevölkerung. Demgegenüber wird die Inzidenz auf dem afrikanischen Kontinent wesentlich niedriger geschätzt.<sup>70</sup>

Zahlreiche potenzielle Noxen wurden in diesem Zusammenhang untersucht.

In aromatischen Aminen, die in Haarfärbemitteln enthalten sind, wurde in manchen Studien ein toxisches Potential erkannt. Die Datenlage dazu ist allerdings kontrovers. In den 90er Jahren wurde ein Zusammenhang gefunden<sup>71, 72</sup>, jedoch in weiteren Studien nicht bestätigt.<sup>73, 74</sup> Ebenso fand sich dahingehend keine toxische Wirkung von Eosin bei regelmäßigem Gebrauch von Lippenstift.<sup>75, 76</sup> Dagegen wurde die Belastung mit kristallinem Silizium in murinen, als auch humanen Studien als ein Trigger für den SLE postuliert. Die Exposition mit dem häufig verwendeten Material, führt zur Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL1 und TNF.<sup>76</sup>

#### Umwelthormone:

Neben dem bereits besprochenen Einfluss oraler Kontrazeptiva auf die Erkrankung, werden auch synthetische Östrogene wie z.B. Diethylstilbistol (DES) oder Pestizide, die eine östrogene oder antiöstrogene Wirkung haben, als mögliche pathologische Umweltfaktoren diskutiert. Hier wird vor allem die Verwendung von Östrogenen in der Masttierhaltung und die damit verbundene chronische Hormonbelastung über die Nahrungskette als Expositionsquelle genannt.<sup>77</sup> Mit dem insektizid Chlordecon, einem Organochlorin mit östrogenen Wirkkomponente, konnte beispielsweise im Mausmodell eine dem SLE ähnliche Erkrankung induziert werden. Der Gebrauch wurde in den USA 1975, weltweit allerdings erst 2009 (Stockholmer Konvention) verboten.<sup>54</sup>

#### Infektionen als Trigger der Autoimmunreaktion beim SLE:

Gut etablierte exogene Faktoren in der Pathogenese des SLE sind bakterielle und insbesondere virale Infektionen. Am besten untersucht ist hierbei die Assoziation mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Einige der EBV-Proteine, wie das EBNA-1 (*Epstein-Barr-nuclear-antigen*), zeigen Kreuzreaktivität mit SLE-typischen Autoantigenen. Neben dem „molecular mimicry“, wird auch die proliferationsfördernde Wirkung auf infizierte B-Zellen und der Einfluss auf die Apoptose diskutiert. Die Manifestation von SLE nach einer kürzlich vorangegangenen EBV-Infektion, zeigt zumindest in manchen Fällen den engen Zusammenhang mit der Erkrankung.<sup>78, 79</sup>

Autoantikörper gegen EBNA-1 werden in vielen Autoimmunerkrankungen gefunden, aber nur in Sera von SLE-Patienten finden sich antivirale Antikörper, die zum Autoantigen kreuzreaktiv sind.<sup>80</sup> „Molecular mimikry“ scheint insbesondere beim SLE eine wichtige Rolle zu spielen. Eine dem EBNA-1 (Peptid 35-58) homologe Struktur zeigt u.a. das in dieser Arbeit verwendete SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid, das als ein wichtiges Autoantigen beim SLE gilt. (siehe hierzu Kapitel 1.2.1)

Des Weiteren wird in der Literatur auch ein Zusammenhang mit der Infektion mit dem Cytomegalievirus und dem Parvovirus B19 diskutiert.<sup>81</sup>

#### Medikamente:

Als ein wichtiger exogener Faktor werden Medikamentennebenwirkungen genannt. Bei über 80 Wirkstoffen wird vermutet, dass sie für den Medikamenteninduzierten Lupus Erythematodes (*DILE - Drug-induced lupus erythematosus*) verantwortlich sind. Gut belegt ist es für Hydralazin, Procainamid, Isoniazid, Methyldopa, Chlorpromazin, Quinidin und Minocyclin.<sup>77</sup> Bei Hydralazin und Procainamid wird die Inhibierung der DNA-Methylierung dafür verantwortlich gemacht.

## **1.2 Die Rolle der B-Zellen in der Pathogenese des SLE**

Der SLE ist eine komplexe Autoimmunerkrankung mit sehr heterogenem klinischen Bild und einer breiten Palette autoreaktiver Antikörper. Neben zahlreichen beschriebenen Störungen des Immunsystems, wird den B-Lymphozyten eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des SLE zugesprochen. Der B-Zell-Einfluss bei anderen Autoimmunerkrankungen wird in der Literatur verschieden gewichtet. Auf Maus- und Humanstudien basierend, werden B-Zellen beispielsweise beim Pemphigus vulgaris und dem SLE als Initiatoren der Erkrankung gesehen. Während demgegenüber die Systemische Sklerose (SSc), Multiple Sklerose (MS) und der Typ I Diabetes mellitus klassischerweise zu den T-Zell-abhängigen Erkrankungen gerechnet werden.<sup>82</sup>

Für den Großteil der beim SLE beschriebener Autoantikörper wurde keine direkte schädigende Wirkung nachgewiesen. Auch in Gesunden Individuen lassen sich Autoantikörper beispielsweise im Rahmen einer Infektion nachweisen, wenn auch in geringerer Konzentration und bei funktionierenden Regulationsmechanismen zeitlich beschränkt.

Die Voraussetzungen, die zur Autoantikörperproduktion führen und der vorliegende Defekt in der B-Zell-Reifung, der hierfür verantwortlich ist, sind bisher nicht bekannt. Neben der Funktion als Autoantikörperproduzenten, nehmen B-Zellen in ihrer Funktion als Antigen-Präsentierende-Zellen (*APCs - antigen presenting cells*) und Zytokinproduzenten eine entscheidende Rolle im Autoimmunprozess ein.<sup>83,84</sup> Gut dokumentiert ist die mit dem SLE assoziierte Hyperaktivität der B-Zellen. B-Zellen von SLE-Patienten haben im Vergleich zu Gesunden eine gesteigerte intrinsische Aktivität. Zudem wurde eine deutlich höhere Expression kostimulierender Faktoren (u.a. CD40L, CD86, CD80 und B7-Familie) gemessen.<sup>2, 85, 86</sup>

### **1.2.1 Entscheidende Autoantigene beim SLE**

Wie bereits zuvor angesprochen, ist das Vorhandensein von Antikörpern gegen eine breite Palette an Autoantigenen charakteristisch für den SLE. Diese sind gegen nukleäre und zytoplasmische Zellbestandteile, aber auch gegen Membranproteine gerichtet. Wichtige Antigene stellen DNS, Sm, PCNA, Ku, U1RNP, Nukleosome, Histone, Ro/SS-B, ribosomales RNP, Phospholipide, HsP 90 und Proteasome dar. Neben einer Vielzahl (> 100) verschiedener Antigene, die mit SLE in Verbindung gebracht werden, gelten Antikörper gegen dsDNA (*Doppelstrang-DNA*) und das Sm-Antigen (*Smith-Antigen*) als pathognomonisch. Aufgrund ihrer Spezifität, sind sie Teil der vom American College of Rheumatology (ACR) aufgestellten, allgemein gebräuchlichen, Diagnosekriterien.<sup>87</sup> (siehe Kapitel 1.1.1) Zum Teil beobachtet man auch eine Korrelation mit charakteristischen Organmanifestationen. So werden z.B. anti-dsDNA-Antikörper mit der Manifestation einer Glomerulonephritis, anti-Cardiolipin-Antikörper mit Gefäßthrombose und anti-Ro-Antikörper der Mutter mit kongenitalem Herzblock beim Neugeborenen in Verbindung gebracht.<sup>83</sup>

Die beiden in dieser Arbeit verwendeten Autoantigene werden im Folgenden näher erläutert.

dsDNA: Hoch-affine anti-dsDNA-Antikörper sind pathognomonisch für den humanen und murinem SLE. Einige Subgruppen dieser Antikörper sind für die Ausbildung einer Nephritis und Vaskulitis verantwortlich, wobei der anti-dsDNA-Serumtiter nicht immer mit einer Nierenbeteiligung korreliert. Anti-dsDNA-Antikörper werden bei

Diagnosestellung in 30-60% der Patienten nachgewiesen; in 60-83% gelingt der Nachweis im weiteren Krankheitsprozess.

Der genaue Mechanismus, der zur anti-dsDNA-Antikörperproduktion führt, und das hierfür verantwortliche Antigen, sind bisher nicht aufgeklärt. Für die Generierung hochaffiner, beim SLE typischer Autoantikörper gegen DNA (und RNA), wird die Beteiligung der T-Zell-Hilfe als notwendig angesehen. Die Nukleinsäuren sind allerdings nicht oder kaum immunogen. Deshalb ist die Beteiligung eines DNA-bindenden Proteins als ein notwendiger Faktor zur Induktion des Toleranzverlusts gegenüber DNA weitgehend akzeptiert. Diskutiert werden hierfür das „mimicry“ des dsDNA-Epitops durch ein Protein und die immunogene Wirkung eines Proteins nach dem „hapten-carrier“-Modell.<sup>88, 89, 90</sup>

SmD1<sub>83-119</sub>: Anti-Sm-Ak sind seltener (in 5-30% der Fälle) bei Patienten nachzuweisen, gelten allerdings als ausgesprochen spezifisch für den SLE und lassen sich ebenfalls bereits mehrere Jahre vor Diagnosestellung nachweisen.

Das Auftreten dieser Autoantikörper korreliert eng mit der Krankheitsaktivität und der Organmanifestation wie Lungenfibrose, Perikarditis, Nephritis und Beteiligung des zentralen Nervensystems.<sup>91-93</sup> Beim Sm-Antigen handelt es sich um eine Gruppe von Proteinen, die zu den Kernproteinen der snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*) gehören. snRNPs bilden mit weiteren Proteinen das Spleißosom und haben eine Schlüsselfunktion beim Spleißen von prä-RNA, einem post-transkriptionalen Prozess im Nukleus eukaryontischer Zellen.

Unter den insgesamt neun bekannten Antigenen der Sm-Familie, richten sich die Autoantikörper beim SLE hauptsächlich gegen die Proteine B und D.<sup>103</sup> Der Hauptangriffspunkt der anti-SmD-Antikörper stellt das SmD1-Protein dar.

Annähernd 70% der SLE-Patienten weisen Antikörper gegen das SmD1<sub>(83-119)</sub>-Epitop auf, das ebenfalls mit der Krankheitsaktivität korreliert und insbesondere mit der Ausbildung einer Nephritis in Verbindung gebracht werden konnte. (Aufgrund des höheren Prozentsatzes beim SmD1<sub>(83-119)</sub>-Epitop im Vergleich zum gesamten Sm-Antigen, wird vermutet, dass es sich beim SmD1<sub>(83-119)</sub> um ein verborgenes Epitop handelt, das wegen der Molekülkonformation normalerweise nicht zugänglich ist.)<sup>94, 95</sup>

Im Mausmodell konnte durch Applikation des SmD1<sub>(83-119)</sub>- Proteins die Manifestation der Erkrankung beschleunigt werden, einhergehend mit früh beginnender Nephritis und erhöhten anti-dsDNA-Titern.<sup>96</sup>

### 1.2.2 Reifung der B-Lymphozyten

Die B-Zell-Entwicklung kann funktionell in zwei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden, in die zentrale und die periphere B-Zell-Reifung. Die erste Entwicklungsphase beginnt mit der multipotenten Stammzelle im Knochenmark, die sich zu B-Zell-Vorstufen, den Pro-B-Zellen und Prä-B-Zellen, weiterentwickelt. Im Rahmen des Reifungsprozesses finden die DNA-Rearrangements der V-, (D-) und J- Segmente der Immunglobulinketten statt. Durch die somatische Rekombination wird eine hohe Variabilität des Antikörper-Repertoires erreicht. Nach erfolgreicher Expression des membranständigen B-Zell-Rezeptors der IgM-Klasse wird die Zelle als unreife B-Zelle bezeichnet. Der Anteil autoreaktiver unreifer B-Zellen, einschließlich polyreaktiver und antinukleärer Spezifität, wird mit 55 bis 75% angegeben.<sup>97</sup>

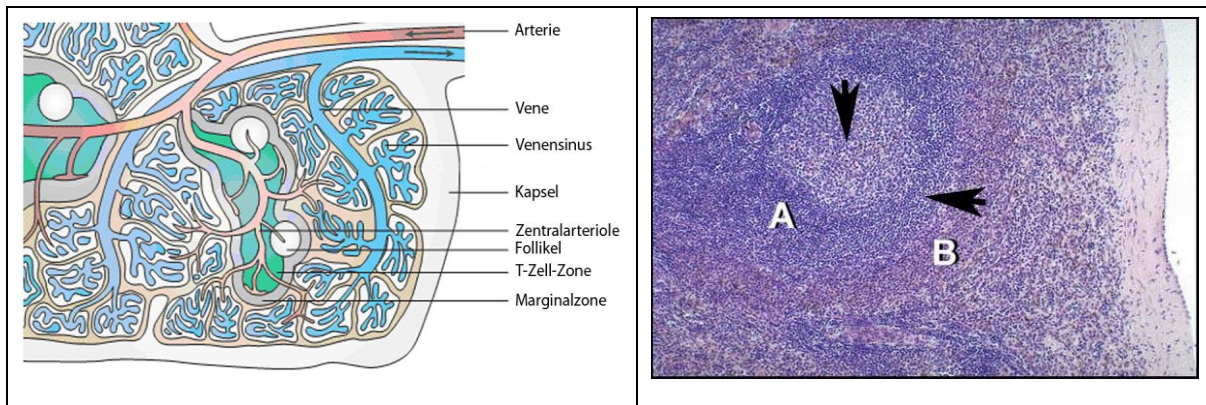
Ein Großteil der autoreaktiven Zellen wird ausselektiert („*clonal deletion*“), können dieser Selektion jedoch durch das Rearrangement der leichten Ketten („*receptor-editing*“), bei Erreichen einer nichtautoreaktiven Spezifität, entkommen. (siehe Kapitel 1.2.5) Neu generierte B-Zellen reifen dann weiter über das transiente Stadium der T1- und T2-B-Zelle zu naiven (antigenunerfahrenen), zirkulierenden B-Zellen aus. Die Ausreifung der T2 B-Zellen vollzieht sich zum Großteil in der Milz. Hier erfolgt die weitere Differenzierung zu Marginalzonen (Mz)- oder Follikelzonen (Fo)-B-Zellen. Im peripheren lymphatischen Gewebe kommt es dann durch Interaktionen mit Stromazellen, T-Helfer-Zellen und Fremdartigen zur Keimzentrumsreaktion und Entwicklung zu Antikörper sezernierenden Plasmazellen und B-Gedächtniszellen.

### 1.2.3 Funktioneller Aufbau der Milz

Das Parenchym der Milz gliedert sich in die weiße und rote Pulpa. Die weiße Pulpa besteht aus um die Zentralarterien dicht gelagerten Lymphozyten. Dabei lassen sich klassischerweise B- und T-Zell-Areale voneinander unterscheiden. Die Follikel sind B-Lymphozyten-Regionen, die eine Ansammlung zirkulierender B-Zellen darstellen. Die T-Lymphozyten sind in der periarterioläre lymphatische Scheide (*PALS*) gruppiert. Die Marginalzone ist eine zellreiche Übergangszone zwischen weißer und roter Pulpa in der viele arterielle Gefäße offen enden. Die Organisation der weißen Pulpa wird durch spezifische Chemokine kontrolliert und aufrechterhalten. In der PALS interagieren T-Zellen mit DCs und B-Zellen, während in den B-Zell-Follikeln die klonale Expansion der aktivierten B-Zellen stattfindet.<sup>98-100</sup>

### Aufbau und Organisation von Keimzentren

Die Keimzentren (GCs, *germinal centers*) wurden erstmalig von Walter Flemming 1884 beschrieben, der eine Struktur mit großen, die Mitose durchlaufenden, Lymphozyten vorfand. GCs werden histologisch in die dunkle und helle Zone eingeteilt. Nach dem klassischen Modell beinhaltet die dunkle Zone Zentroblasten, gekennzeichnet durch schnelle Proliferation und somatische Mutation der variablen Gensegmente. Die helle Zone bewohnen die daraus entstandenen, nicht proliferierenden Zentrozyten die um die Antigenbindung auf den FDC (*follicular dendritic cells*) kompetieren und sich dann T-Zell-abhängig weiterdifferenzieren. Die Funktion der GCs liegt nach heutiger Meinung in der Bereitstellung idealer Bedingungen für die komplexen Prozesse einer effizienten Affinitätsreifung.<sup>101</sup>



**Abbildung 4 links:** Schematische Darstellung der Milz, verändert nach “Structure and Function of the Spleen” Nat Rev Immunol. 2005<sup>98</sup> **rechts:** Histologisches Bild eines Milzfollikels mit Unterscheidung von weißer (A) und roter (B) Pulpa, geändert nach<sup>102</sup> Der senkrechte Pfeil markiert die folliculäre Zone, der waagrechte die Marginalzone. Vergleiche hierzu auch Kapitel 3.2.2

### ***B-Zell-Subpopulationen der Milz***

In der Milz können zwei histologisch, phänotypisch und funktionell unterschiedliche Subpopulationen der B-Zellen unterschieden werden: die *Follikulären B-Zellen* (Fo-B-Zellen) und die *Marginalzonen-B-Zellen* (Mz-B-Zellen). Bei den Fo-B-Zellen handelt es sich um kleine, zirkulierende B-Zellen, die die Follikel der weißen Pulpa bilden. Dagegen werden Mz-B-Zellen als mittelgroße, in der Marginalzone (im Übergang von weißer zur roter Pulpa) residierende Zellen beschrieben. Obwohl in der Marginalzone auch aktivierte B-Zellen gefunden werden, besteht der größte Anteil bei nichtimmunisierten Mäusen aus

„naiven“ Mz-B-Zellen. Diese Zellen bilden einen typischen Phänotyp, mit u.a. hoher Expression des Komplementrezeptors CD21 aus.<sup>103</sup> *Mz-B-Zellen* werden klassischerweise zu der angeborenen Immunantwort gezählt, die insbesondere eine schnelle Abwehr gegen Blutpathogene, vor allem gegen bekapselte Bakterien, darstellen. Mz B-Zellen besitzen die hohe intrinsische Kapazität schnell zu Plasmazellen zu differenzieren. Der Marginalsinus weist in der Milz die höchste Blutzirkulation auf, wodurch ein enger Kontakt mit den Blut-Antigenen ermöglicht wird. Die dem Blutstrom nah positionierten Mz-B-Zellen ermöglichen so eine schnelle Antwort gegen Erreger. Die im Vergleich zu Fo B-Zellen deutlich schnellere Antwort bezüglich der Antikörperproduktion, Proliferation und Hochregulierung kostimulierender Moleküle, wurde beispielsweise für die in-vitro Stimulation mit LSP (*Lipopolysaccharid*) beschrieben.<sup>104, 105</sup> (siehe auch Kapitel 3.3.1)

Die Fo-B-Zellen bewohnen dagegen die Follikel in enger nachbarschaftlicher Beziehung zur periarteriolen T-Zell-Zone. Es handelt sich um Zellen, die via Blutbahn und Lymphe zwischen verschiedenen Station des sekundären lymphatischen Gewebes (Lymphknoten, Peyerschen Plaques und Milz u.a.) rezirkulieren. Naive Fo-B-Zellen besiedeln (klassischerweise) Follikel im sekundärer lymphatischen Gewebe, wo sie aktivierten T-Zellen Antigene präsentieren und sich abhängig von der T-Zell-Hilfe zu Antikörper produzierenden Plasmablasten ausdifferenzieren können.

Die unterschiedliche Funktion der Mz- und Fo-B-Zellen, sowie die Interaktion untereinander, ist nach wie vor nicht vollständig verstanden und Teil aktueller Studien.

Entgegen der bisherigen Meinung sind Mz-B-Zellen nicht nur Teil der T-Zell-unabhängigen Immunantwort. Ebenso zeigten sie sich zur Antigenpräsentation und Stimulierung von CD4+-T-Zellen, sowie Ausbildung von GC (*germinal centers*) und somatischer Mutation befähigt.<sup>106</sup>

#### **1.2.4 Aktivierung der B-Zellen**

Die Stimulierung der B-Zellen zur Proliferation und Ausreifung Antikörperproduzierender Plasmazellen kann T-Zell-abhängig oder –unabhängig erfolgen.

##### *T-Zell-abhängige Aktivierung der B-Zellen*

Die Interaktion zwischen T- und B-Zellen findet in den Follikeln sekundärer lymphatischer Organe statt. Dabei unterscheidet man zwei Phasen der T-Zell-abhängigen B-Zell-



Aktivierung, die in der äußeren T-Zell-Zone beginnt. In der ersten Phase entwickeln sich die aktivierten B-Zellen entweder zu kurzlebigen Plasmazellen, die sich extrafollikulär ansiedeln, oder sie wandern in die Follikel ein, wo sie GC's bilden. In der zweiten Phase werden in den GCs langlebige hoch-affine Plasmazellen und Gedächtnis-B-Zellen generiert.<sup>107</sup>

Die Erkennung des Antigens durch den T-Zell-Rezeptor (*TCR*) einer  $CD4^+$  T-Helferzelle ( $T_H$ ) ist die Voraussetzung für die Bindung des MHC-II-Antigen-Komplex der B-Zelle und weiterer Korezeptoren. Der erfolgreichen antigenspezifischen Interaktion folgt die beidseitige Stimulation durch Rezeptor-Ligand-Bindung und Zytokinproduktion. Zu den wichtigsten Faktoren der B-Zell-Stimulation zählen CD40L (CD154), IL4 und CD21.<sup>107</sup>

Die in Studien beobachtete Reduktion der Autoantikörpertiter, peripherer B-Zellen (mit GC bzw. post-GC-Phänotyp) und Krankheitsaktivität nach anti-CD40-AK-Gabe, zeigten eine Schlüsselrolle der CD40-Interaktion für die Generierung von Autoantikörpern.<sup>108, 109</sup>

#### Aktivierung der B-Zellen über Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) spielen eine essenzielle Rolle in der angeborenen Immunantwort. Im Gegensatz zu den antigenspezifischen T- und B-Zell-Rezeptoren, deren Spezifität durch das Rearrangement definiert ist, sind TLRs in Struktur und Spezifität genetisch vorgegeben. Bisher wurden 11 humane TLRs beschrieben, die Funktion von TLR 1-9 ist zum Teil charakterisiert. Die an der Zelloberfläche der Trägerzelle befindlichen TLRs (TLR-1,-2,-4,-5 und -6) binden extrazelluläre Pathogene. TLRs (TLR-3, -7, -8 und -9) binden intrazelluläre Strukturen. Bei den erkannten Pathogenen handelt es sich um typische konservierte molekulare Strukturen, die von Erregern (Bakterien, Protozoen, Pilze, Viren) produziert werden, sog. PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns of recognition*). Typische Vertreter sind beispielsweise Lipopolysaccharide (*LPS*), einem Bestandteil der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, die durch TLR-4 erkannt werden.

Insbesondere TLRs, die einfach- und doppelsträngige Nukleinsäure erkennen, werden in den letzten Jahren als wichtige Faktoren in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen diskutiert. Dabei handelt es sich insbesondere um den TLR-9, der CpG-motive von bakterieller und viraler DNA binden kann, und um TLR-7, einem Rezeptor mit der Fähigkeit einsträngige virale DNA zu erkennen.

Marginalzonen-B-Zellen exprimieren mehr Toll-like-Rezeptoren im Vergleich zu folliculären B-Zellen, wodurch zum Teil die intensivere Reaktion der Mz B-Zellen gegenüber TLR-Reizen erklärt wird.<sup>105</sup>

Das Resultat der Aktivierung der B-Zellen über den TLR ist abhängig vom Liganden und der Subpopulation. Die TLR-Stimulation bewirkt im Allgemeinen eine Größenzunahme und Proliferation der Zellen, sowie die Hochregulierung der Zytokinproduktion und vieler Aktivitätsmarker (CD80, CD86, CD25, CD69, MHC II), wodurch wiederum u.a. die Aktivierbarkeit gegenüber einer T-Zell-Kostimulation und die Antigenpräsentation gesteigert wird.

Alle Toll-like-Rezeptoren teilen ihre intrazelluläre Domäne mit der Interleukin-1-Rezeptor-Familie (IL-1R). Mit Ausnahme von TLR-3, folgt nach Stimulation des TLR oder IL-1R eine MyD88-abhängige Signaltransduktion, die nach Rekrutierung von IRAK1, IRAK4 und TRAF6 in der Aktivierung der Transkriptionsfaktor-Familie NF- $\kappa$ B mündet. NF- $\kappa$ B ist ein gut charakterisierter Regulierungsfaktor für die Expression von Entzündungsmediatoren, wie zum Beispiel TNF- $\alpha$ . Über die MyD88-Endstrecke wird aber auch der MAP-Kinase-Weg (*MAPK: mitogen-activated protein kinase*) aktiviert, der wiederum zahlreiche grundlegende zelluläre Aktivitäten wie Genexpression, Mitose, Differenzierung, Proliferation und das Zellüberleben bzw. Apoptose steuert.<sup>110</sup>

### **1.2.5 B-Zell-Toleranz**

Die bereits mehrere Jahre vor dem Auftreten der ersten Symptome nachweisbaren Antinukleären Antikörper (*ANAs*), betonen die Schlüsselrolle der B-Zellen in der Pathogenese. Unklar bleibt, ob es sich hierbei um einen intrinsischen Defekt der Zelle handelt oder der Toleranzverlust sekundär durch andere Immunzellen wie T-Zellen und DCs getriggert ist.

Man geht davon aus, dass bei Menschen 60-70% der produzierten B-Zellen primär autoreaktiv sind und im Rahmen der B-Zell-Entwicklung ausselektiert werden. In Mausmodellen wurden mehrere „Checkpoints“ in der B-Zell-Entwicklung, die die Toleranz gegenüber körpereigenem Gewebe wahren, definiert. Sowohl im Knochenmark, als auch später in der Peripherie, geschieht dies hauptsächlich durch negative Selektion („deletion“, „receptor editing“ oder „anergy“).

Unter „*receptor editing*“ versteht man ein erneutes Rearrangement der BCR-Gene mit dem Resultat eines neuen Rezeptors höherer Spezifität. Als „*anergy*“, bezeichnet man einen nicht responsiven Status einer B- bzw. T-Zelle nach Bindung eines Autoantigens. Diese Zelle kann dann nicht mehr stimuliert werden und ihr autoreaktives Potential einbringen. „*Deletion*“ beschreibt die Induktion der Apoptose in Zellen autoreaktiver Spezifität nach Bindung körpereigener Strukturen. Man nimmt an, dass die meisten B-Zellen im T2-Stadium, wenn B-Zellen die Fähigkeit zur Rezirkulation erhalten haben, CD23 exprimieren und Follikel bewohnen, ausgesiebt werden.<sup>106</sup> Die *Positive Selektion* gründet in der Konkurrenz der B-Zellen um limitierte, die Lebensspanne bestimmende Ressourcen. Selektionierende Interaktionen beinhalten u.a. auch die Erkennung und Bindung von Eigen-Antigenen.<sup>111</sup>

#### *Die Entwicklung zur Fo- oder Mz B-Zelle – ein Prozess der „Positiven Selektion“*

In Mausstudien wurde beobachtet, dass Mutationen signalverstärkender bzw. -abschwächender Faktoren der BCR-Kaskade entschieden die Ausreifung der B-Zellen zur Fo- oder Mz-B-Zelle beeinflussen.

Defekte Signaltransduktion im BCR-BTK (Buton`s tyrosine kinase)-Signalweg, wie es bei Xid-Mäusen (X-linked immunodeficiency) vorkommt, geht mit dem Verlust von Fo-B-Zellen (Typ I) bei erhaltenem Mz-B-Zell-Kompartiment einher.<sup>112</sup> Im Gegensatz dazu werden bei Abwesenheit von Aiolos, einem Zinkfinger-Transkriptionsfaktor, keine Mz-B-Zellen gebildet. Bei Fehlen von Aiolos wird auch eine gesteigerte BCR-Signaltransduktion beobachtet, was zu der Hypothese geführt hat, dass Aiolos und BTK über den BCR-Reiz gegensätzlich Einfluss auf die Weiterentwicklung zur Mz- oder Fo-B-Zelle haben.<sup>98</sup>

Der Verlust von der Tyrosinphosphatase CD45, einem positiven Regulator des BCR-Signals, hat ebenfalls den Verlust von Fo-B-Zellen (Typ I) zur Folge. Bei zusätzlicher Wegnahme des der SHP1 (*SH2 domain-containing protein tyrosin phosphatase*), einem inhibierenden Reiz, konnte die Fo-Subpopulation wiederhergestellt werden. Gleiche Ergebnisse wurden bei Studien an CD22-defizienten Mäusen erhoben, einem BCR-inhibierenden Faktor.<sup>113, 114</sup>

Die Ausdifferenzierung zur folliculären B-Zelle oder zu einer Mz-B-Zelle hängt demnach entschieden von der Stärke des BCR-Signals ab. Ein schwächerer Reiz fördert die Selektion in das Mz-B-Zell-Kompartiment, ein starkes Signal die Weiterentwicklung zur Fo-B-Zelle.

Untersuchungen an transgenen Mäusen zeigten, dass auch autoreaktive B-Zellen abhängig vom BCR-Stimulus in unterschiedlichen B-Zell-Subpopulationen zu finden sind. Demnach also im Laufe der B-Zell-Entwicklung in diese Kompartimente selektiert wurden. Schwach autoreaktive B-Zellen scheinen dabei der negativen Selektion zu entkommen und kolonisieren bevorzugt das Mz-Kompartiment. Dies wurde für DNA-reaktive B-Zellen gezeigt.<sup>115</sup>

Weitere für die Ausreifung zur Fo- bzw. Mz-B-Zellen wichtige Signalwege wurden insbesondere für Notch2 (*Neurogenic locus notch homolog protein 2*), BAFFR (*B cell-activating factor receptor*) und NF- $\kappa$ B (*Canonical Nuclear Factor  $\kappa$ B*) beschrieben.<sup>116,117</sup>

### **1.3 Mausmodell**

In dieser Arbeit wurden Zellen von NZB/W F1 Mäusen verwendet. Die NZB/W F1 Maus ist eine Kreuzung aus New-Zealand-Black (NZB) und New-Zealand-White (NZW)-Mäusen und gilt als das Mausmodell mit der größten Ähnlichkeit zum humanen SLE. Weibliche Mäuse erkranken früher und haben einen schweren Krankheitsverlauf im Vergleich zu Männchen. Hohe Titer von IgG gegen dsDNA, Chromatin, ANA treten bei allen Weibchen auf. Die Mäuse versterben an einer Immunkomplex-Glomerulonephritis im durchschnittlichen Alter von 6 bis 12 Monaten. ANAs lassen sich bei Weibchen im Alter von 2-3 Monaten nachweisen. Dazu zählen Antikörper, die Nukleosome, Chromatin, dsDNA, ssDNA, dsRNA, t-RNA, Polynukleotide und Histone binden. Anti dsDNA-IgM treten im Alter zwischen 3 und 5 Monaten auf, anti dsDNA IgG (hauptsächlich IgG2a und 2b) zwischen 5 und 7 Monaten. Proteinurie lässt sich im Alter zwischen 5 und 7 Monaten nachweisen.<sup>2</sup>

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Puffer und Medien

- PBS (phosphate buffered saline): 1000ml H<sub>2</sub>O bidest.  
8,0g NaCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
0,2g KCl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
1,42g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x2H<sub>2</sub>O (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- PBS/BSA 500ml PBS  
2,5g BSA (Sigma, München, Deutschland)
- PBS/BSA/Azid 500ml PBS  
2,5g BSA (Sigma, München, Deutschland)  
1ml 10% NaN<sub>3</sub> (Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Erylysepuffer 500ml H<sub>2</sub>O bidest.  
0,5g KHCO<sub>3</sub> (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
4,15g NH<sub>4</sub>Cl (Roth, Karlsruhe, Deutschland)  
18,5mg EDTA (Sigma, München, Deutschland)  
Lösung mit HCl einstellen auf pH 7,43
- PBS/3%BSA PBS  
3% BSA (Sigma, München, Deutschland)
- PBS/3%BSA/Tween 1l H<sub>2</sub>O bidest  
7,3 g Trisma Pre-Set Crystals pH 7,8 (Sigma, München, Deutschland)  
0,05% Tween 20 (Merck, München, Deutschland))
- PBS/5%FCS PBS  
5% (v/v) FCS (Sigma, München, Deutschland)
- PBS/5%FCS/Tween PBS/5%FCS  
0,1% (v/v) Tween 20 (Merck, München, Deutschland))
- Carbonatpuffer 75ml 0,1 molare NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (Roth, München, Deutschland)  
25ml 0,1 molare Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (Roth,

- München, Deutschland)
- Zellkulturmedium RPMI 1640 Medium mit 2mM L-Glutamine (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
    - 10% (v/v) FCS (hitzeinaktiviertes fetales bovines Serum) (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
    - 100 Einheiten/ml Penicillin G und 100µg/ml Streptomycin, 50µg/ml Gentamycin (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland)
    - 50 µM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

#### Weitere Materialien:

- Cell Strainer (Zellsieb) 70µmØ (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
- 96-Well Platte mit flachem Wellboden, Polystyrene, hochbindend (Corning, Schipohl-Rijk, Niederlande)
- AutoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)
- Petrischalen (Corning, Schipohl-Rijk, Niederlande)
- 48- und 96-Well Platten (Corning, Schipohl-Rijk, Niederlande)
- Multistix® 8SG zur Analyse der Leukozyt- und Proteinurie der Mäuse (Bayer Diagnostics, München)

### **2.2 Maushaltung**

Die Mäuse wurden vom Bundesinstitut für Risikobewertung in Marienfelde, Berlin, bezogen und im Mausstall des DRFZ Berlin gehalten. Aufzucht und Haltung erfolgte unter SPF-Bedingungen (*SPF: specific pathogen free*) und entsprechend den gesetzlichen Richtlinien. Es wurde mit weiblichen und männlichen NZB/W F1 Mäusen gearbeitet.

(Tötungsanzeige T00016/08)

### **2.3 Gewinnung der Zellproben**

*Milzentnahme:* Die Milzentnahme erfolgte an zuvor durch zervikale Dislokation getöteten NZB/W F1 Mäusen. Das Fell der Mäuse wurde mit einer 70%igen Ethanollösung desinfiziert und anschließend nach einem Hautschnitt von der Körperfaszie getrennt. Nach

Eröffnung der Bauchhöhle konnte die Milz entnommen werden. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Milzen dann in ca. 10 ml gekühlter, steriler PBS/BSA-Lösung aufbewahrt.

*Preparation und Entnahme des Knochenmarks:* Nach der zuvor beschriebenen Eröffnung wurden nach Inzision der Leisten- und Oberschenkelhaut die Femurknochen freipräpariert. Der Knochenschaft wurde mittels einer Schere abgetrennt und in 5ml gekühlter PBS/BSA-Lösung aufbewahrt. Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden beide Schäfte mit einer Spritze mehrmals ausgespült.

## **2.4 Aufbereitung der Milz**

Die für die Versuche notwendigen B-Zellen wurden zum Großteil aus den Milzen weiblicher und männlicher Mäuse isoliert. Alle Schritte erfolgten unter sterilen Verhältnissen an der Clean Bench. Zunächst wurden die Milzen in PBS/BSA-Lösung gereinigt und anschließend durch das 70µmØ Zellsieb (BD Biosciences, Germany) in eine sterile PBS/BSA-Lösung gedrückt. Die so entstandene Zellsuspension wurde in einem 50ml Falcon-Tube 10 min. bei 4°C mit 301g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um auch die Erythrozyten aus der Suspension zu entfernen, wurde das Zellpellet in Erylysepuffer (0,83% NH<sub>4</sub>CL und 0,01M TRIS-HCL bei pH 7,5; 1ml je 5x10<sup>7</sup> Zellen) resuspendiert und 3 min. inkubiert. Die lysierten Erythrozyten wurden durch anschließendes Waschen der Suspension mit PBS/BSA entfernt. Das nun grau-gelbliche Pellet wird je nach gewünschter Zellkonzentration in PBS/BSA suspendiert und bei 4°C unter sterilen Verhältnissen bis zur anschließenden Färbung gelagert. Konnten durch den Lysevorgang nicht alle Erythrozyten entfernt werden, wurde dieser Schritt bei weiterhin bestehenden Rotfärbung des Pellets wiederholt. Die Aufbereitung von Lymphknoten-, Thymus- und Knochenmarkszellen erfolgte nach dem gleichen Schema.

## **2.5 Zellzählung**

Die Einstellung der gewünschten Zellkonzentration für die Färbung und Kultivierung der Zellsuspension erfolgte durch Auszählung in der Neubauer-Zählkammer. Zuvor wurde die zu untersuchende Suspension mit einer Trypanblau-Lösung (SIGMA-ALDRICH Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) inkubiert. 10µl wurden zwischen Kammer und Deckblatt der Neubauer-Zählkammer pipettiert. Vier Quadranten (16 Kästchen) der

Neugebauer-Zählkammer wurden dann unter dem Lichtmikroskop ausgezählt, wobei blau gefärbte tote Zellen ausgeschlossen wurden. Der Mittelwert pro Quadrant entspricht der Anzahl lebender Zellen pro 0,1µl.

## **2.6 Magnetische Zellsortierung – MACS (*magnet-associated cell sorting*)**

Die magnetische Zellsortierung wurde zur Anreicherung von B-Zellen vor der eigentlichen Sortierung der B-Zell-Subpopulationen mittels FACS (Kap. 2.7), sowie zur Isolierung von B-Zellen für die Proliferationsassays (Kap. 2.10) verwendet. Die gleiche Methode wurde je nach Fragestellung auch zur Depletion von Zellpopulationen genutzt.

### **2.6.1 Verwendete Materialien**

*CD45R(B220)-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)*

*CD90-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)*

*CD4-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)*

*CD19-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)*

*autoMACS® Separator (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)*

*autoMACS Rinsing Solution (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland)*

*autoMACS Running Buffer: BSA, EDTA, and 0.09% azide*

### **2.6.2 Prinzip der magnetischen Zellsortierung**

MACS wird zur Trennung von Zellen anhand ihrer Oberflächenantigene verwendet. Bei dieser Methode wird die Zelle mit einem an einen monoklonalen Antikörper gekoppelten supramagnetischen Mikropartikel (*Microbeads*) markiert. Die Auftrennung der Zellsuspension in eine Positiv- und Negativfraktion erfolgt mittels eines Hochgradienten-Magnetfeldes in einer aus Stahlpartikeln bestehenden Säulenmatrix. Die mit Mikropartikeln besetzten Zellen werden beim Durchlaufen der Säule durch das Magnetfeld festgehalten und können so als Positivfraktion aus der Zellsuspension isoliert werden. Die mit dem Magnetfeld nicht interagierenden Zellen werden aus der Säule gespült und werden als Negativfraktion bezeichnet. Nach dem Abstellen des Magnetfeldes wird die Positivfraktion in ein separates Gefäß gespült. Bei Wiederholung dieser Prozesse wird durch erneute Anreicherung eine hohe Reinheit der Zellsuspension erreicht. Bei jedem Durchlauf ist hierbei allerdings ein zum Teil hoher Zellverlust zu beachten. Die Reinheit



der Suspension wurde jeweils mittels FACS geprüft und bei unzureichendem Ergebnis ggf. wiederholt.

### **2.6.3 Durchführung des MACS**

Die gewonnene Zellsuspension aus Milzzellen wurde bei einer maximalen Konzentration von  $1 \times 10^8$  Zellen/ml mit den Antikörperbeads in einem Verhältnis von 10:1 für 10 min. bei 4°C inkubiert, anschließend mit 20ml einer PBS/BSA-Lösung gewaschen und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in einer MACS-Puffer-Lösung resuspendiert (maximale Zellkonzentration  $1 \times 10^8$  Zellen/ml). Zur Markierung von B-Lymphozyten wurden CD45R(B220)-Microbeads, zur Depletion von T-Zellen anti-CD3-Microbeads verwendet.

Die markierten Zellen wurden dann mit Hilfe des autoMACS® nach dem obigen Prinzip automatisch in eine Positiv- und Negativfraktion aufgetrennt. Das Gerät wurde so eingestellt, dass die markierte Zellsuspension zweimal über die Säule gegeben wurde. So konnte eine hohe Anreicherung erreicht werden. Die Reinheit der Suspension wurde anschließend durchflusszytometrisch mit CD19-FITC (clone 1D3, DRFZ Berlin) kontrolliert.

## **2.7 Isolierung und Analyse der B-Zell-Subtypen in weiblichen und männlichen Milzen mittels Durchflusszytometrie ( FACS )**

### **2.7.1 Verwendete Antikörper und Geräte**

*Anti-Fcy-Antokörper Klon 2.4G2 (DRFZ, Berlin), Verdünnung: 1:100*

*Anti-CD23-PE Klon B3/B4 (DRFZ, Berlin), Verdünnung: 1:200*

*Anti-CD21-Cy5 Klon 7G6 (DRFZ, Berlin), Verdünnung: 1:100*

*Anti-CD19-FITC Klon 1D3 (DRFZ, Berlin), Verdünnung: 1:200*

*Anti-CD45RB-FITC 16A (hergestellt im DRFZ), Verdünnung : 1:250*

*Propidium-Jodid (PJ) (Sigma, München, Deutschland)*

*Analyse der Zellen: FACS Calibur (BD Pharmingen, Germany)*

*Isolierung der Zellen: FACSDiva oder FACS Aria (BD Pharmingen, Germany)*

### **2.7.2 Prinzip der durchflusszytometrischen Zellanalyse**

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Grundlage einer lasergestützten Messung einer Einzelzellsuspension. Die verschiedenen optischen Parameter (Streu- und Fluoreszenzlicht) einer Zelle werden separat detektiert. Die einzelnen Zellen passieren monochromatisches Licht, das von einem Laser erzeugt wird. Die Streuung dieses Lichts gibt bereits Auskunft über bestimmte Zelleigenschaften. Das Vorwärtstreulicht (*forward scatter* - *FSC*) korreliert mit der Zellgröße. Das rechtwinklig reflektierte Licht (Seitwärtstreulicht, *sideward scatter* - *SSC*) dient als Maß für die Granularität der Zellen. Durch Markierung der untersuchten Zellen mit Fluorochrom-gebundenen monoklonalen Antikörpern, können die Zellen zudem anhand ihrer Oberflächenstrukturen (*CD – cluster of differentiation*) selektiert werden. Das Fluorochrom emittiert Licht einer bestimmten Wellenlänge, die durch Lichtsensoren detektiert werden. Die Fluoreszenzintensität der einzelnen Zellen korreliert mit der Dichte der gebundenen Oberflächenstrukturen. Durch zellspezifische Färbemethoden in Kombination mit der Position im Vorwärts- und Seitwärtsscater können einzelne Zellpopulationen charakterisiert und selektiert werden.

### **2.7.3 Färbung der Zellen mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten monoklonalen Antikörpern die Analyse von Oberflächenstrukturen auf verschiedensten Zellen. Dabei lassen sich unterschiedliche Lymphozytenpopulationen anhand ihrer charakteristischer Oberflächenmoleküle (*CD = cluster of differentiation*) analysieren und in unterschiedliche Populationen auftrennen. Hierbei wurden die in Kap. 1.7.1 aufgeführten Fluorochrom-gekoppelten monoklonalen Antikörper eingesetzt.

Zunächst wurde eine PBS/BSA Lösung mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten vorbereitet, die in der vom Hersteller vorgeschlagener Konzentration (siehe obige Tabelle) eingesetzt wurden. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindungen wurden zur Aufsättigung der Fc-Bindungsstellen vor jeder Färbung zusätzlich anti-Fc $\gamma$ -Antikörper verwendet. Nach Zentrifugation der markierten Milzzellsuspension (380 g, 10 min., 4°C), konnte der Überstand vorsichtig, ohne das Pellet zu lösen, abgesaugt werden. Anschließend wurde das Pellet in der vorbereiteten Lösung mit Antikörper-Fluorochrom-Konjugaten so gelöst, dass eine Zellkonzentration von ca.  $2 \times 10^7$  vorlag. Die Inkubation erfolgte dann lichtgeschützt bei 4°C. Nach 15-20 min. Anschließend wurden die Proben mit 1000 $\mu$ l PBS/BSA aufgefüllt, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei

Verwendung biotinierter Antikörper, erforderte es einen zweiten Färbeschritt nach gleichem Schema mit einem Streptavidin-konjugierten Fluorochromfarbstoff.

Die nun gefärbten Zellen wurden in 200-300µl PBS/BSA resuspendiert und bis zum FACS-Sort kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die Durchflusszytometrie wurde zur Messung der Frequenz von Fo- und Mz-B-Zellen in weiblichen und männlichen Milzen verwendet. Durch die Markierung der Zellen mit Fluorochromantikörpern gegen CD19, CD21 und CD23 lassen sich beide Subpopulationen darstellen. Follikuläre B-Zellen werden als  $CD19^+CD21^{int}CD23^{high}$ , Marginalzonen-B-Zellen als  $CD19^+CD21^{high}CD23^{low}$  abgebildet. Durch das Setzen von Gates konnten die Populationen getrennt und analysiert werden. Die Reinheit der selektierten Populationen beträgt 95-99%.

## **2.8 Messung der Frequenz Autoantikörper produzierender Zellen mittels ELISPOT**

### **2.8.1 Verwendete Materialien**

*Development-Puffer (BCIP)* 80% (v/v) AMP-Puffer mit 0,1% BCIP (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat) (Sigma, München, D)  
• 20% (v/v) H<sub>2</sub>O mit 3% Agarose Typ I: Low EEO (Sigma, München, Deutschland)

*Agarose (Sigma-Aldrich, Deutschland)*

#### Stimulantien:

*LPS (Lipopolysaccharid)* Konz. 10µg/ml (Sigma-Aldrich, Deutschland)  
*Anti-mouse CD40 IgG Klon FGK-45,* Konz.: 10µg/ml (R&D, Deutschland)  
*IL4* Konz.: 20ng/ml (R&D, Deutschland)

#### Antikörper:

*Goat anti mouse Ig-biotin (Southern Biotech, USA)*  
*Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Streptavidin-AP) (Roche, Deutschland)*  
*µ-chain spezifischer goat anti-mouse IgM-biotin (Southern Biotech, USA)*

*γ-chain specific goat anti-mouse IgG-biotin (Southern Biotech, USA)*

*96-Well Platten, flach, hochbindend ( Corning, USA)*

Methyliertes BSA (Sigma-Aldrich, D, )     *eingesetzte Konz.: 10µg/ml*

*DNA aus Kalbsthymus (zur Plattenbeschichtung) (Sigma-Aldrich, Deutschland)*

*SmD1<sub>(83-119)</sub> Peptid (VEPKVKSKKREAVAGRGRGRGRGRGRGRGRGRGGPRR)*

*(Dr.Henklein, Biochemie der HU-Berlin; Deutschland)*

*Lichtmikroskop (Leitz, Germany) (inverted microscope)*

## **2.8.2 Das Funktionsprinzip des ELISPOT-Assays**

Beim ELISPOT (*Enzyme-linked immunospot assay*) handelt es sich im Allgemeinen um eine Variante des Sandwich-ELISA-Tests, der sich zum Nachweis Antikörper-sezernierender B-Zellen bewährt hat. Dabei binden die Antikörper das an die Festphase gebundene Antigen und können dann mit einem enzymgekoppelten Antikörper durch eine Farbreaktion detektiert werden. Durch die Enzymreaktion, in diesem Fall die Umsetzung des BCIP durch das AP (*Alkalische Phosphatase*), kommt es zu einem punktförmigen blauem Spot, der quantifiziert werden kann und jeweils einer Antikörper produzierenden B-Zelle der gesuchten Spezifität entspricht.

## **2.8.3 Inkulturnahme und Stimulierung der B-Zellen**

Die zuvor aufgetrennten Fo- und Mz-B-Zellen beider Geschlechter wurden jeweils zentrifugiert (380g, 10min. 4), der Überstand verworfen und das Pellet mit Kulturmedium so gelöst, dass eine Zellkonzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml vorlag. Je  $0,5 \times 10^6$  Fo- bzw. Mz-B-Zellen wurden in 500µl Kulturmedium auf eine 48-Well-Platte geben. Zellen von Weibchen und Männchen gleichen Alters wurden stets auf einer Platte verglichen, um gleiche Kulturbedingungen zu garantieren. Die Stimulantien LPS bzw. anti-CD40+IL4 wurden entsprechend der gewünschten Zielkonzentration dazugegeben.

Die Platten wurden 3 Tage im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Vor der Öffnung und Weiterverwendung der Zellen wurde makro- und mikroskopisch die Population beurteilt und mögliche Verunreinigungen ausgeschlossen.

#### **2.8.4 Vorbereitung des Experiments, Plattenbeschichtung (Coating)**

Vor dem Gebrauch der ELISPOT-Platten wurden 96-Well-Platten je nach gesuchter Antikörperspezifität mit einem Antigen beschichtet.

Plattenbeschichtung mit DNA: Vor dem Auftragen des Antigens wurden 96-Well-Platten (high binding) mit einer BSA(methyliert)/PBS-Lösung (Konz. 1g/ml) für 2h bei RT, dann 24h im Kühlschrank inkubiert. Durch diesen Schritt wird die Bindung der DNA am Boden der Platte ermöglicht. Die Platten wurden dann abgekippt und dreimal mit 100µl/Well einer PBS/Tween-Lösung gespült. 100µl der DNA-Lösung (1mg DNA aus Kalbsthymus /ml PBS) wurden pro Well auf die Platten gegeben, zunächst 2h bei RT, anschließend 24h im Kühlschrank inkubiert. Abschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit der PBS/Tween-Lösung. Die so beschichteten Platten wurden gleich verwendet oder bei -20°C für spätere Nutzung tiefgefroren.

Plattenbeschichtung mit SmD1<sub>83-119</sub>: Bei der Beschichtung der hoch bindenden 96-Well-Platten mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Protein ist der Zwischenschritt der Vorbehandlung mit methyliertem BSA/PBS-Lösung nicht notwendig. Die Wells der Platten wurden je mit 50µl der SmD1<sub>83-119</sub>-Carbonpuffer-Lösung (1mg/ml) gefüllt. Die Inkubation erfolgte 8h bei RT, danach 12h im Kühlschrank bei 4°C. Nach anschließendem dreimaligem spülen mit 100µl PBS/Well wurden die Platten ebenso bei -20°C gelagert.

#### Plattenbeschichtung mit Antikörpern

Je 50µl der Antikörperlösung wurden pro Well auf die hochbindende 96-Well-Platte mit Flachboden aufgetragen und 1h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte ausgeschlagen, mit einer 3%igen PBS/BSA-Lösung gewaschen und gleich verwendet oder für den späteren Gebrauch bei -20 °C gelagert.

#### **2.8.5 Durchführung des ELISPOT-Assays**

Die beschichteten 96-Well-Platten wurden vor dem Gebrauch aufgetaut und mit 200µl Kulturmedium pro Well für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Mit diesem Schritt werden unspezifische Bindungsstellen der Beschichtung gesättigt. Währenddessen wurden die Kulturproben nach mehrtägiger Stimulation mit LPS bzw. CD40L+IL4 in Eppendorf-Röhrchen überführt und die Zellen bei 1200U/min abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 1ml-Pipette abgenommen und die Zellpellets in Kulturmedium resuspendiert.

Vor dem Auftragen der Zellsuspension wurden die verwendeten Platten (beschichtet mit dsDNA-, SmD1<sub>83-119</sub>- oder Ig) ausgekippt und anschließend auf einem Tuch ausgeschlagen. Von jeder Kulturprobe wurden auf jede Platte drei Wells mit je 100µl der Probe gefüllt, also Triplikate angelegt. Zur besseren Auszählbarkeit der Spots wurden zuvor eine Verdünnungsreihen mit  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  usw. der Ausgangskonzentration angelegt und je nach erwarteter Anzahl der Spots verwendet. Um gleiche Versuchsbedingungen zu garantieren, wurden Zellen von Weibchen und Männchen stets auf eine Platte gegeben. Die anschließende Inkubation der Platten erfolgte über Nacht (10-14h) bei 37°C im Brutschrank. Am nächsten Tag wurden die Platten ausgeschlagen, es folgten drei Waschschrte, in denen die Wells mit je 150µl PBS/3%BSA/Tween-Lösung mit einer Multikanalpipette ausgewaschen wurden.

Die sezernierten Antikörper, die das Zielantigen der verwendeten Platte gebunden haben, wurden im nächsten Schritt durch Zugabe von je 100µl des biotinylierten Nachweisantikörpers (goat anti-mouse Ig-biotin, Southern Biotech, USA) markiert und nach einem Waschschrte an Streptavidin-AP gebunden. Nicht bindende Komplexe wurden durch erneutes Waschen entfernt. Die eigentliche Färbung der markierten Antikörper erfolgte dann durch die Hinzugabe eines Entwicklungspuffers (100 µl/ Well, BCIP und 0,6% Agarose). Der zuvor im Wasserbad erhitzte, flüssige Entwicklungspuffer verfestigt sich nach einer 10-minütigen Aufbewahrung der Platten im Kühlschrank (4 °C). Die Entwicklung der ELISPOT-Platten erfolgte 2h im Brutschrank bei 37°C.

Die markierten Antikörper werden durch das Umsetzen des BCIP durch die AP als blauer Spott sichtbar gemacht. Bei jedem Spott handelt es sich um eine Antikörperproduzierende B-Zelle (*AFCs*, *antibody-forming cells*) der gesuchten Spezifität.

## 2.9 Vergleich der Antikörpertiter im Serum weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse mittels ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

### 2.9.1 Verwendete Materialien

<i>PBS/5%FCS</i>	PBS, 5% (v/v) FCS (Sigma, München, Deutschland)
<i>PBS/5%FCS/Tween</i>	0,1% (v/v) Tween 20 (Merck, München, Deutschland)
<i>PBS/Tween mit 1%Trockenmilch</i>	PBS, 0,1% (v/v) Tween 20 (Merck) 1% (v/v) Trockenmilch (BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland)
<i>Substratlösung</i>	1 Tablette TMB (3,3',5',5'-Tetramethylbenzidine Dihydrochloride, Sigma: T3405 ) in 10ml Citrat-Puffer gelöst + 2µl 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>Stopplösung</i>	100ml 1-molare H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (Roth, München, Deutschland); 0,63g Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> x7 H <sub>2</sub> O (Roth, München, Deutschland); 0,315g Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> (Roth, München, Deutschland)
<i>Carbonatpuffer</i>	75ml 0,1 molare NaHCO <sub>3</sub> -Lösung (Roth, München, D); 25ml 0,1 molare Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> -Lösung (Roth, München, Deutschland)
	Anti-Murines-IgG-Alkalische Phosphatase (polyklonal) (Caltag, Burlingame, USA)
	Anti-Murines-IgM-Alkalische Phosphatase (polyklonal) (Caltag, Burlingame, USA)
	Streptavidin-Alkalische Phosphatase (Sigma, München, Deutschland)

### 2.9.2 Entnahme und Aufbereitung der Blutproben

Die Blutentnahmen erfolgten in vierwöchigen Abständen an je 5 weiblichen und 5 männlichen NZB/W F1 Mäusen. Pro Maus wurden für die spätere Auswertung insgesamt neun Proben im Alter zwischen 6 und 34 Wochen gesammelt. Die Entnahme erfolgte aus der Schwanzvene. Zuvor wurden die Mäuse um eine bessere Durchblutung der Schwanzvene zu erreichen UV-Licht ausgesetzt. Bei jeder Entnahme wurden 6-8 Tropfen gewonnen.

Die Proben wurden dann abzentrifugiert und das Blutserum für spätere Bestimmung der Autoantikörpertiter bei -20°C tiefgefroren.

### **2.9.3 Prinzip des ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*)**

Der Enzymimmunoassay ist eine quantitative analytische Methode, bei der ein Reaktionspartner enzymatisch markiert ist. Dieser kann entweder das Antigen oder der Antikörper sein. Im vorliegenden Fall wurde die Trägersubstanz (Mikrotiterplatte) mit dem Antigen der gesuchten Antikörperspezifität beschichtet. Die sezernierten Antikörper können so entsprechend das Antigen binden und im nächsten Reaktionsschritt durch einen enzymgekoppelten Antikörper markiert werden. Nach anschließender Hinzugabe einer Substratlösung kommt es abhängig von der Antikörperkonzentration zur enzymatisch katalysierten Farbreaktion. Die am Photometer gemessene Extinktion korreliert mit der Antikörperkonzentration der Probe.

### **2.9.4 Messung der anti-dsDNA- und anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörpertiter im Serum**

Vor dem Gebrauch wurden je zwei DNA- und SmD1<sub>83-119</sub> - beschichtete 96-Well-Platten aufgetaut. Um unspezifische Bindungsstellen zu sättigen (Blockierung) wurden die dsDNA-Mikrotiterplatten mit 100 µl/Well PBS gewaschen und anschließend 1h mit dem gleichen Volumen PBS/5%FCS bei RT inkubiert. Die Blockierung der SmD1<sub>83-119</sub>-Platten erfolgte unter gleichen Bedingungen mit 100 µl/Well PBS/0,1%Tween/1%Trockenmilch. Die Platten wurden anschließend abgekippt.

Die Serumproben wurden, je nach erwartetem Antikörper-Konzentration 1:100-1:1000 für anti-IgG- und 1:250 – 1:2500 für anti-IgM-Bestimmung in PBS/5%FCS/0,1%-Tween verdünnt und je 50µl der Probe pro Well auf die Mikrotiterplatten übertragen. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnugreihe (1:2) über 7 Wells mit eine Anfangskonzentration von 1:100 angelegt. Jede Verdünnungsstufe wurde zur Minimierung von Pipetierfehlern doppelt angelegt. Als Leerwert (blanc) wurde PBS/5%FCS 0,1%Tween verwendet. Die Inkubation erfolgte 2h bei Raumtemperatur.

Danach wurden die Platten mit PBS/0,1%Tween gewaschen und ausgeschlagen. Im nächsten Schritt wurden 50µl Peroxidase-gekoppelter anti-muriner Nachweisantikörper (1:1000 in PBS/0,1 Tween) pro Well gegeben und 2h bei RT inkubiert, anschließend mit PBS/0,1%Tween gewaschen. Für die Farbreaktion wurden dann je 50µl/Well der frisch angesetzten Substratlösung (TMB in Citratpuffer, siehe obige Tabelle) in die Wells gegeben. Bei einem Sichtbaren Umschlag der Substratlösung (Blaufärbung nach ca. 2-5



min.) wurde die Farbreaktion durch Zugabe von 150µl Stopplösung (12% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) pro Well beendet, wobei sich ein stabiler gelber Farbkomplex bildet. Die Auswertung der Proben erfolgte anschließend am Photometer.

## **2.10 Messung der B-Zell-Proliferation nach TLR-Stimulierung**

In diesem Experiment wurde die Proliferation der aus Weibchen und Männchen isolierten B-Zell-Subpopulationen nach Stimulierung mit LPS, Imiquimod oder CpG verglichen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet: CFSE- und [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Proliferationsassay.

### **2.10.1 Verwendete Materialien**

*CFSE (carboxy-fluorescein-diacetate-succinimidyl ester ) (Molecular Probes, leiden, NL)*

*LPS (Sigma-Aldrich, Deutschland)*

*Imiquomid (Invivogen, USA)*

*CpG (5' - tcc atg acg ttc ctg acg tt -3') (Invivogen, USA)*

*anti-CD40-IgG FGK-45 (10µg/ml)*

*IL-4 (20ng/ml)*

*<sup>3</sup>[H]-Thymidin*

### **2.10.2 CFSE-Proliferationsassay**

#### **Funktionsprinzip**

Beim CFDA-SE (Carboxyfluoresceindiazetat-Succinidylester) handelt es sich um eine membrangängige Substanz, die intrazellulär durch Abspaltung der Diazetatgruppe ihre Permeabilität verliert. Der dabei entstandene CFSE (Carboxyfluorescein-Succinidylester) ist fluoreszierend und bindet über Estergruppen an zytoplasmatische Proteine. Die so markierten Zellen können mittels der Durchflusszytometrie dargestellt werden. Nach jeder Zellteilung wird die CFSE-Konzentration in der Tochtergeneration halbiert. Durchflusszytometrisch lassen sich die Generationen proliferierender Zellen darstellen und deren Anteil an der Gesamtpopulation berechnen.

### Druchführung des CFSE-Proliferationsassays

*Markierung von B-Lymphozyten mit CFSE:* Die zuvor gesorteten Fo- und Mz- B-Zellen beider Geschlechter wurden zweimal mit PBS gewaschen, unter dem Mikroskop gezählt und in PBS mit maximaler Zellkonzentration von  $1 \times 10^7$  pro ml aufgenommen. Die Färbung der Subpopulationen erfolgte mit CFDA-SE (Endkonzentration:  $0,5 \mu\text{M}$ ) für 3,5 min. bei Raumtemperatur in abgedunkelter Umgebung. Um eine gleichmäßige Färbung der Zellen zu gewährleisten, wurde auf eine gute Verteilung in der Zellsuspension geachtet. Die Färbung wurde dann durch zweimaliges Waschen mit PBS/BSA gestoppt und für anschließende Zellkultur in Medium (RPMI/10%FCS) aufgenommen.

*Inkulturnahme und Stimulation der Zellen:* Je  $1 \times 10^5$  der gefärbten Fo- bzw. Mz-B-Zellen beider Geschlechter wurden in  $200 \mu\text{l}$  Kulturmedium pro Well auf eine 48-Loch-Mikrotiterplatte gegeben. Die zuvor vorbereitete Stocklösung wurde so dazugegeben das die folgenden Endkonzentrationen der Stimulantien vorlagen: LPS (Konz.  $1 \mu\text{g/ml}$ ), CpG ( $1 \text{pg/ml}$ ) oder Imiquimod ( $1 \mu\text{g/ml}$ ). Die Negativprobe bestand in der entsprechenden Zellsuspension gleicher Zellkonzentration, die auf die gleiche Platte aufgetragen wurde. Die Mikrotiterplatten wurden im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  über vier Tage inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen abzentrifugiert, in PBS/BSA aufgenommen und anschließend mittels FACS analysiert.

### **2.10.3 $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassay**

#### Funktionsprinzip

Mit dieser Methode lässt sich die Proliferationsfähigkeit von Zellkulturen mit und ohne Stimulus zuverlässig vergleichen. Während der Replikation der DNS in der Synthesephase des Zellzyklus werden Nukleoside (Adenosin, Guanosin, Cytidin und Thymidin) eingebaut. Stellt man den Zellen in der Kulturlösung das radioaktiv markierte  $^3\text{H}$ -Thymidin zur Verfügung, wird es bei jeder Zellteilung in die DNA eingebaut. Je öfter sich die Zellen teilen, desto mehr  $^3\text{H}$ -Thymidin nehmen sie auf. Durch das anschließende Waschen der Zellen mit bidestilliertem Wasser wird die DNA freigesetzt und die Suspension durch einen mikrofiber-Filter mit hoher Bindungskapazität für Nukleinsäuren gespült. Die Analyse der ausgefilterten Nukleinsäure erfolgt mit einem  $\beta$ -Zähler. Die Intensität der

$\beta$ -Strahlung wird pro Minute (*counts per minute*, cpm) registriert. Die DNA-Syntheserate dient als Maß für die Proliferation der Lymphozyten.

#### Druchführung des $^3\text{H}$ -Thymidin-Proliferationsassays

Fo- und Mz-B-Zellen wurden wie in Kapitel 2.10.2 beschrieben mit den Stimulantien im Kulturmedium inkubiert. Nach zwei Tagen wurde  $1\mu\text{Ci}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin hinzugegeben.

16 Stunden später wurden die Zellen mittels eines FilterMate cell harvesters geerntet und auf eine 96-Well Platte (filter-bottom UniFilter-96 GF/B-Platte) gegeben.

Die  $\beta$ -Strahlung wurde mit einem Szintillationsmessgerät (TopCount NXT) in counts per minute (cpm) gemessen.

### **2.11 Immunhistochemische Darstellung der Milzen**

Die Milzen weibliche und männlicher NZB/W F1 Mäuse wurden in einer Tissue-Tek OCT Verbindung (Sakura, Staufen) eingefroren und bei  $-80$  Grad gelagert. Das gefrorene Gewebe wurde in  $7\mu\text{m}$  dünne Scheiben geschnitten und danach luftgetrocknet. Zur Vermeidung unspezifischer Antikörperbindung wurden die Schnitte mit PBS/BSA 3% vorbehandelt. Die Färbung erfolgte mit anti-mouse IgD-FITC (Klon 11-26c.2a, BD Pharmingen, Germany) und dem Biotin gekoppelten anti-mouse IgM ( $\mu$ -chain spezifisch, Southern biotech, USA). Streptavidin-Rhodamin (Southern biotech, USA) wurde im zweiten Schritt zur Bindung des Biotins verwendet.

Die Gegenfärbung erfolgte mit DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidindihydrochlorid, Sigma, Germany).

### **2.12 Messung der Proteinurie und Leukozyturie**

Die Proteinurie und Leukozyturie wurde anhand von Teststreifen (Multistix® 8 SG, Bayer Diagnostics, München, Germany) bestimmt. Die Messung erfolgte in vierwöchigen Abständen an 5 weiblichen und 5 männlichen NZB/W F1 Mäusen im Alter zwischen 6 und 34 Wochen.

### **2.13 Statistische Auswertung**

Mittelwert, Standardabweichung, Mann-Whitney-Test, Wilcoxon-Test und Student-t-Test wurde mit Graphpad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) berechnet. Die Bestimmung des p-Wertes erfolgte, falls an entsprechender Stelle nicht anders angegeben, mit dem Mann-Whitney-Test. Bei einem  $p \leq 0,05$  galt das Ergebnis als signifikant. Um unterschiedliche Experimente (z.B. ELISPOT-Assays) miteinander vergleichen zu können, wurde u.a. die Ratio nach der folgenden Formel berechnet:  $\text{Ratio} = \text{Messwert} / \text{Mean}$  (Wert bei Weibchen + Wert bei Männchen). Der Wert 1,0 markiert identische Werte bei männlichen und weiblichen Mäusen.

## **Fragestellung:**

Gegenüber einer Vielzahl an Forschungsarbeiten zu zellulären Anomalien beim SLE, haben nur wenige Studien den ausgeprägten Geschlechter-Bias berücksichtigt. Die hohe Prävalenz bei Frauen, ist eine Konstante, die sich in unterschiedlicher Ausprägung durch verschiedene Ethnien zieht. Bisher wurde der Geschlechter-Bias mit dem geschlechtsspezifischen hormonellen Milieu erklärt und insbesondere in Mausstudien und in-vitro-Versuchen untersucht. Aktuelle Studien zeigen eine direkte hormonelle Wirkung auf die B-Zell-Reifung und Ausbildung von Autoimmunität.

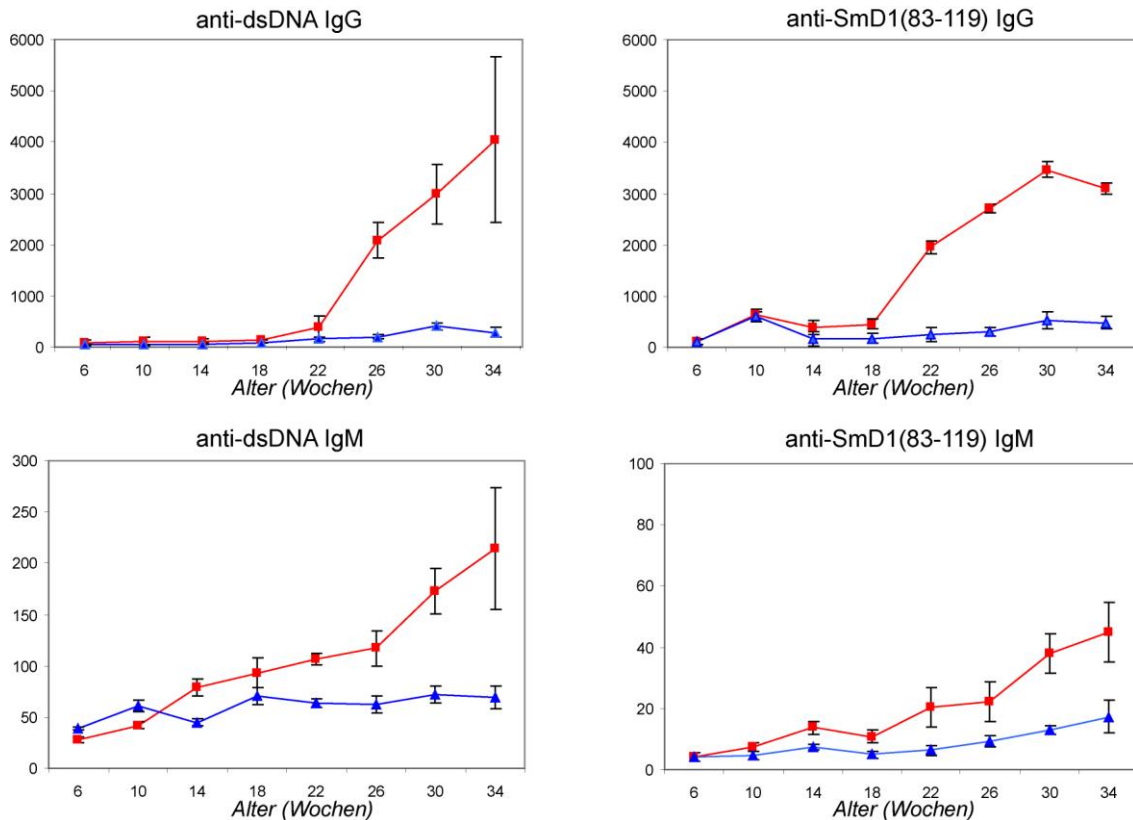
Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist auf dieser Grundlage der Frage nachzugehen, inwiefern sich die B-Zell-Subpopulationen in weiblichen und männlichen Lupus-Mäusen hinsichtlich ihrer Komposition, Autoreaktivität und Aktivierbarkeit unterscheiden.

Die in dieser Arbeit untersuchten Kernfragen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Haben weibliche und männliche NZB/W F1 Mäuse die gleichen Voraussetzungen bezüglich der primären B-Zell-Subpopulationen der Milz? Wie ändert sich das Verhältnis im Alter und bei Krankheitsmanifestation?
2. In welcher B-Zell-Subpopulation der Milz finden sich autoreaktive Zellen gegen spezifische Autoantigene und wie unterscheiden sich die Frequenzen in beiden Geschlechtern abhängig von Alter und Krankheitsprogression? Lässt sich die in Vorarbeiten beschriebene Selektion autoreaktiver B-Zellen im Mz-Kompartiment messen und besteht dabei ein geschlechtsspezifischer Unterschied?
3. Ist der Geschlechter-Bias in der unterschiedlichen Reaktivität der B-Zellen begründet?

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Autoantikörpertiter (anti- dsDNA , anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>) und Krankheitsprogression im Geschlechter-und Altersvergleich



**Abbildung 1:** Antikörpertiter gegen dsDNA und SmD1<sub>(83-119)</sub> im Serum weiblicher (■) und männlicher (▲) NZB/W F1 Mäuse im Alter zwischen 6 und 34 Wochen.

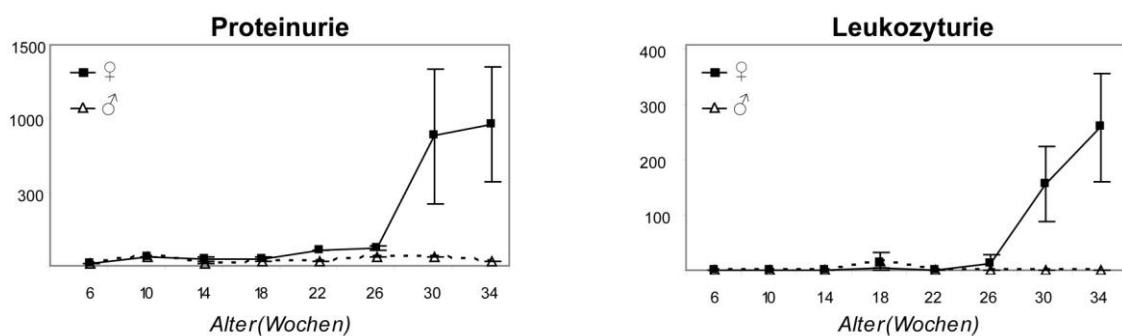
Gleichaltrige weibliche und männliche NZB/W F1 Mäuse im Alter von 6 Wochen wurden über einen Zeitraum von 28 Wochen klinisch und serologisch beobachtet. Die Blutentnahmen zur Bestimmung der Serumantikörper erfolgten alle 4 Wochen, parallel dazu wurde die Protein- und Leukozyturie als Marker für die Krankheitsprogression erhoben. Gemessen wurden Serumantikörpertiter (IgG und IgM) gegen zwei SLE-spezifische Antigene, dsDNA und SmD1<sub>(83-119)</sub>. In Abbildung 1 sind die Titer beider Geschlechter im Alter zwischen 6 und 34 Wochen gegeneinander aufgetragen.

Wie erwartet traten dsDNA- und SmD1<sub>(83-119)</sub>-Autoantikörper bei Weibchen früher auf und erreichten weit höhere Titer als bei männlichen Mäusen. Es zeigte sich bei Weibchen ein

kontinuierlicher Anstieg der IgM-Antikörper gegen beide Autoantigene, bei insgesamt höheren anti-dsDNA-Titern. Dagegen stiegen die IgG-Titer im Alter zwischen 22 und 26 Wochen sprunghaft an. Der Anstieg des anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG wurde im Alter von 22 Wochen, der der anti-dsDNA-IgG vier Wochen später in der 26. Woche gemessen.

In männlichen Mäusen fand sich im Vergleich während der gesamten Messdauer kein wesentlicher anti-dsDNA-IgG- oder anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG-Anstieg. Die zum Ausgangswert in den letzten Lebenswochen marginal erhöhten anti-dsDNA-IgG- und anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG-Titer bei Männchen sind im direkten Vergleich zu den weiblichen Geschwistern vernachlässigbar. Ab der 22. Woche konnte bei Männchen ein leichter Anstieg der anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgM-Titer beobachtet werden. Der anti-dsDNA-IgM-Titer blieb über die gesamte Beobachtungszeit unverändert zum Ausgangswert.

Einhergehend mit dem anti-dsDNA- und anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG-Anstieg manifestierte sich bei Weibchen eine Nephritis, die durch eine deutliche Protein- und Leukozyturie im Alter zwischen 26 und 30 Wochen registriert wurde. In männlichen Tieren wurden in dem Beobachtungszeitraum keine relevanten pathologischen Urinwerte erhoben. (Abbildung 2,  $p=0,0003$  bezüglich der 26 Woche, t-test)



**Abbildung 2:** Proteinurie und Leukozyturie in weiblichen und männlichen NZB/W F1 Mäusen im Alter zwischen 6 und 34 Wochen. (n=5, error bar=SEM)

### **3.2 Messung der Autoantikörperproduzenten in primären und sekundären lymphatischen Organen weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse**

Im Alter von 34 Wochen wurden je 5 weibliche und männliche Mäuse getötet und die lymphatischen Organe (Milz, Knochenmark, Thymus, Lymphknoten) entnommen. Nach entsprechender Aufarbeitung (Kap. 2.3 und 2.4) wurde die Anzahl autoreaktiver Zellen pro Organ (ex-vivo) miteinander verglichen. (Abbildung 3) Die Messung der anti-dsDNA- und anti-Smd1<sub>83-119</sub>-Produzenten erfolgte mittels ELISPOT durch Auszählung der AFC's (*antibody forming cells*).

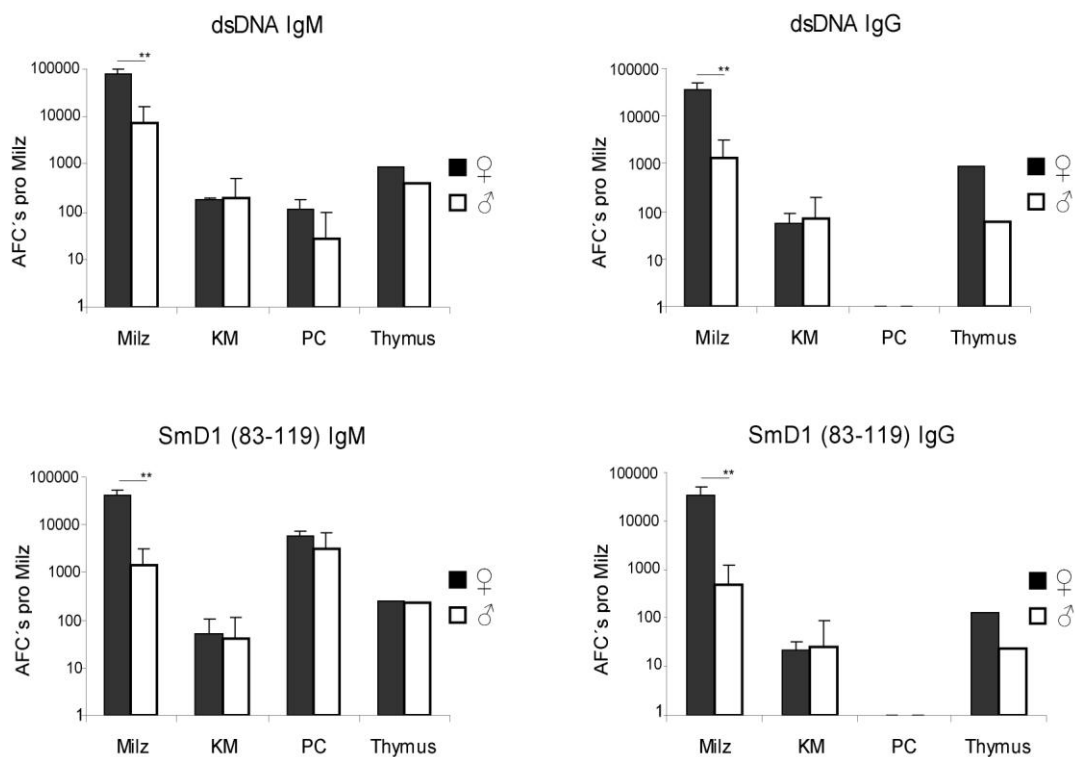
Bei Weibchen wurden pro Milz durchschnittlich  $21,16 \pm 13,97 \times 10^6$  IgM-Produzenten registriert, im Vergleich hierzu bei Männchen mit  $11,81 \pm 3,64 \times 10^6$  weniger, allerdings nicht signifikant ( $p=0,22$ ). Es fanden sich bei Weibchen pro Milz signifikant höhere IgG-Produzenten im Vergleich zu Männchen ( $3,31 \pm 1,95 \times 10^6$  und  $0,12 \pm 0,05 \times 10^6$ ,  $p=0,0079$ ). Gleichzeitig war die Anzahl der anti-dsDNA- und anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG- und IgM-Produzenten in weiblichen Milzen um ein vielfaches höher (10fach,  $p<0,01$ ).

Des Weiteren fand sich in weiblichen Milzen eine signifikant höhere Frequenz von Autoantikörperproduzenten vom IgM-Typ (anti-dsDNA-IgM AFC's: Weibchen  $0,51 \pm 0,26\%$ , Männchen  $0,06 \pm 0,02\%$ ,  $p<0,01$ ; anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgM AFC's: Weibchen  $0,5 \pm 0,14\%$ , Männchen  $0,01 \pm 0,01\%$ ,  $p<0,01$ ). Es zeigte kein signifikanter Unterschied bei den Auto-IgG-Produzenten (anti-dsDNA-IgG AFC's: Weibchen  $1,30 \pm 0,34\%$ , Männchen  $1,3 \pm 0,76\%$ ,  $p=1,0$ ), bei einem Trend zu höheren Frequenzen von SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG – Produzenten bei Weibchen. (anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG AFC's: Weibchen  $1,2 \pm 0,26\%$ , Männchen  $0,51 \pm 0,45\%$ ,  $p=0,0952$ ).

Die nächst größere Nische der Auto-Ak-Produzenten fand sich im Knochenmark (Femur) der Mäuse. Hier zeigte sich allerdings bezüglich der Anzahl der Gesamt-IgG- und IgM-Produzenten (IgM: Weibchen  $164,1 \pm 36,1 \times 10^3$ , Männchen  $163,7 \pm 112,6 \times 10^3$ ,  $p=0,4206$ ; IgG: Weibchen  $13,0 \pm 9,4 \times 10^3$ , Männchen  $14,7 \pm 6,6 \times 10^3$ ,  $p=0,8413$ ) und der Auto-Ak-Produzenten vom IgG oder IgM-Typ kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern.

Vergleicht man beide Organe, stellt die Milz mit einer vielfach höheren Frequenz Auto-Ak sezernierender Zellen die größte Quelle autoreaktiver B-Zellen dar. (anti-dsDNA-IgM  $0,1 \pm 0,05\%$ , anti-dsDNA-IgG  $0,46 \pm 0,06\%$ ; anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgM  $0,03 \pm 0,04\%$ , anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG  $0,18 \pm 0,12\%$ ,  $p<0,01$  für dsDNA-IgM, SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgM und dsDNA-IgM,  $p<0,05$  for IgG SmD1<sub>(83-119)</sub>).





**Abbildung 3:** Gegenüberstellung der Anzahl anti-ds-DNA- und anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-IgG und IgM produzierender Zellen in unterschiedlichen lymphatischen Organen (Milz, Knochenmark (KM), Bauchhöhle (PC, *peritoneal cavity*) und Thymus). Die Messung erfolgte mittels ELISPOT ex-vivo ohne vorausgehende Stimulierung der Zellen. Es wurden AFC's (*antibody forming cells*) pro Organ aus je 5 weiblichen und männlichen Mäusen ausgezählt.

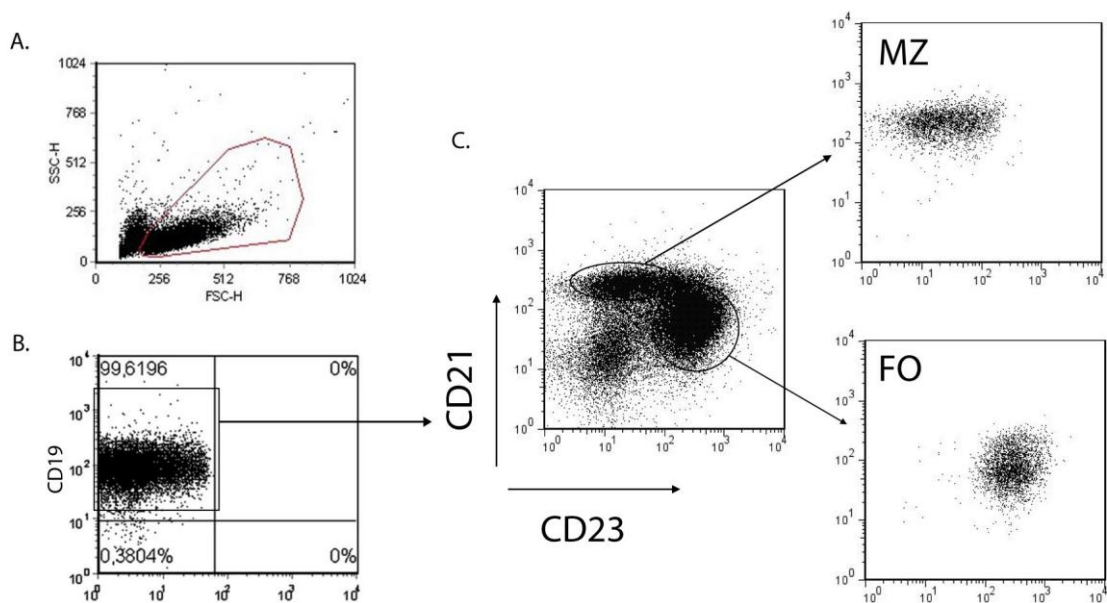
Des Weiteren fanden sich sowohl in den Nieren ( $42.2 \times 10^3$  IgM AFCs and 300 IgG AFCs in Weibchen Nieren im Vergleich zu  $7.8 \times 10^3$  IgM AFCs and 2 IgG AFCs, gepoolt aus je 5 Mäusen), als auch im Thymus ( $187 \times 10^3$  IgM AFCs und  $297 \times 10^3$  IgG AFCs bei Weibchen;  $110 \times 10^3$  IgM AFCs und  $115 \times 10^3$  IgG AFCs bei Männchen, gepoolt aus je 5 Mäusen) mehr spontan Immunglobulin produzierende Zellen bei weiblichen Mäusen.

Unter den aus der Bauchhöhle (PC – *peritoneal cavity*) isolierten Zellen fanden sich bei Weibchen mehr anti-dsDNA-IgM-Produzenten im Vergleich zu den männlichen Mäusen. ( $p < 0,05$ )

### 3.3 B-Zell-Komposition der Milz in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht

#### 3.3.1 *Quantitative Analyse der B-Zell-Subpopulationen der Milz*

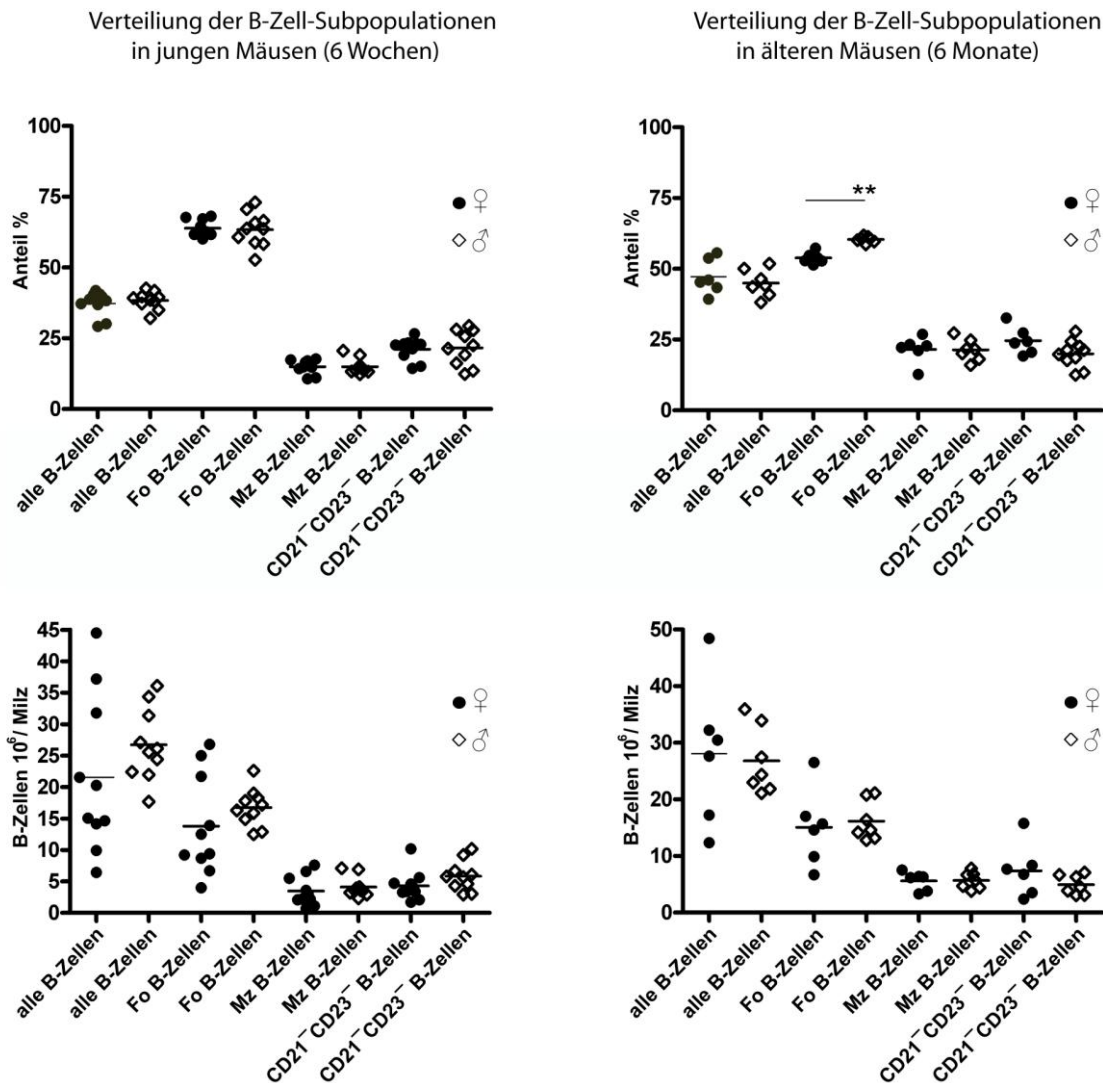
Milzen weiblicher und männlicher Mäuse verschiedener Altersgruppen (6 Wochen und 30 Wochen) wurden hinsichtlich der Organisation des B-Zell-Kompartiments untersucht. Im Fokus standen die Fo- und Mz-B-Zellen, die anhand ihrer charakteristischer Oberflächenmarker (Fo-B-Zellen:  $CD19^+CD21^{low}CD23^{high}$  und Mz-B-Zellen:  $CD19^+CD21^{high}CD23^{low}$ ) durchflusszytometrisch selektiert und analysiert wurden.



**Abbildung 4:** Auftrennung der Milzzellen mittels FACS nach SSC/FSC (Lymphozyten-Gate in A. dargestellt) und der Oberflächenmarker CD19, CD 21 und CD 23. Fo-B-Zellen:  $CD19^+CD21^{low}CD23^{high}$ , Mz B-Zellen:  $CD19^+CD21^{high}CD23^{low}$

In jungen, 6 Wochen alten, Mäusen fand sich im Geschlechtervergleich kein Unterschied in der Größe des gesamten B-Zell-Pools der Milz oder in der Komposition der Fo- und Mz-Kompartimente. Ebenfalls zeigte sich in der  $CD21^-CD23^-$  B-Zell-Population kein Unterschied in Gesamtanzahl und Frequenz. (Abbildung 4 und 5)

Mit zunehmendem Alter beobachteten wir einen signifikanten Rückgang der Fo-B-Zell-Population bei Weibchen im Vergleich zu den männlichen Geschwistern.



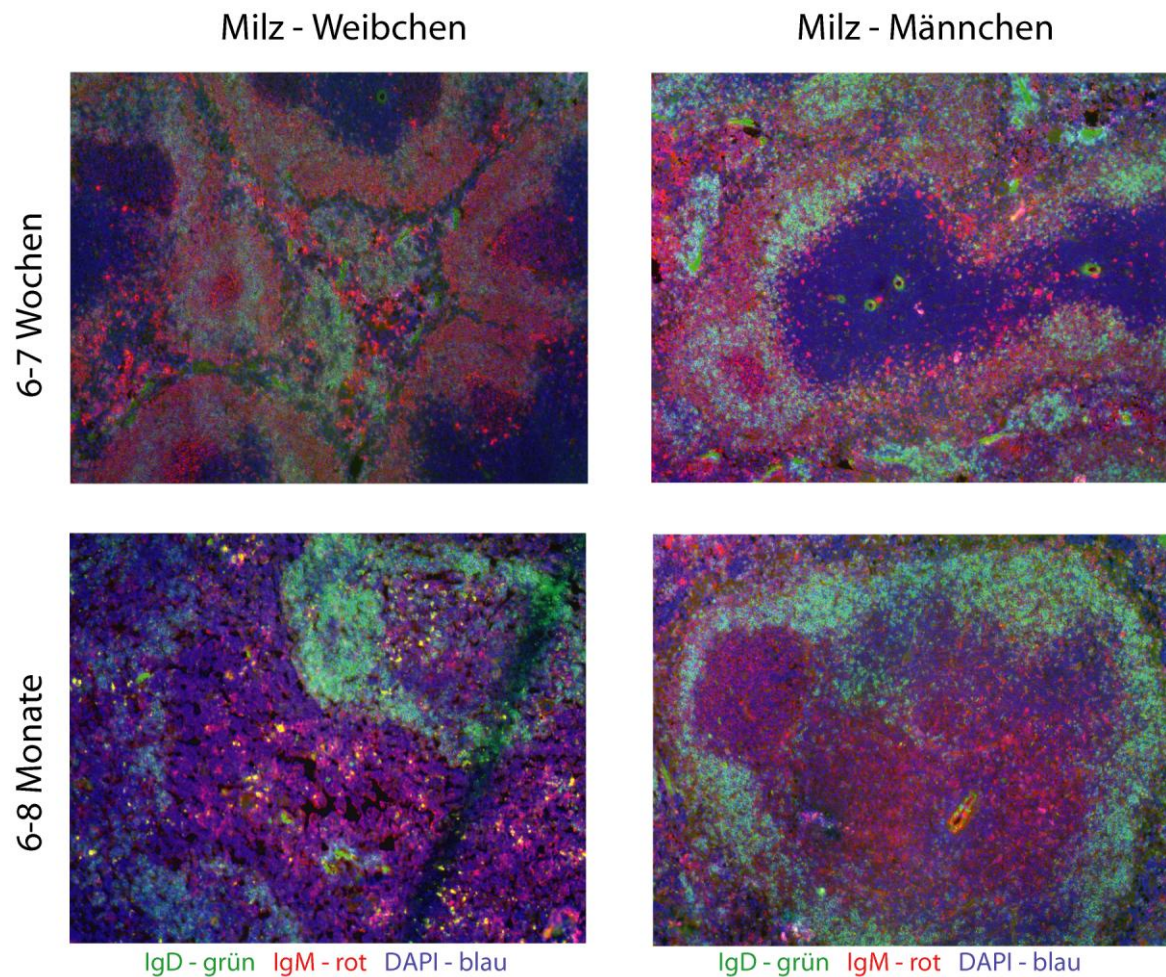
**Abbildung 5:** Gegenüberstellung der B-Zell-Populationen der Milzen weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse im Alter von 6 Wochen und 6 Monaten. Gegenübergestellt sind Fo-B-Zellen ( $CD19^+CD21^{low}CD23^{high}$ ), Mz-B-Zellen ( $CD19^+CD21^{high}CD23^{low}$ ) und restliche B-Zellen, die keiner definierten Population angehören ( $CD19^+CD21^-CD23^-$ ).

Im Alter von 12-14 Wochen waren bei Weibchen  $63,9 \pm 2,8\%$  und bei Männchen  $63,4 \pm 6,0\%$  aller Milzzellen Fo-B-Zellen. ( $p=0,8534$ ;  $n= 6$  weibliche und 10 männliche Mäuse). Der Anteil reduzierte sich bei Weibchen im Alter von 6 Monaten auf  $53,5 \pm 2,0\%$ , während bei Männchen weiterhin  $60,4 \pm 1,1\%$  der Milzzellen als Fo-B-Zellen charakterisiert wurden. ( $p=0,0012$ ;  $n= 6$  weibliche und 7 männliche Mäuse). Dagegen konnte im Mz-Kompartiment keine Änderung der Frequenz beobachtet werden. (Abbildung 5)

Somit besteht, bis auf die Altersdynamik des folliculären Kompartiments in weiblichen Mäusen, kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Komposition der B-Zell-Subpopulationen der Milz.

### 3.3.2 Immunhistologische Darstellung der Milz

Ergänzend zu den FACS-Analysen wurde der Frage nach morphologischen Veränderungen der Milz nachgegangen. Es wurden histologische Schnitte der Milzen von jungen (6-7 Wochen) und alten (6-8 Monate) weiblichen und männlichen Mäusen angefertigt und wie in Kapitel 2.11 geschildert angefärbt. Zur Darstellung kommen beide B-Zell-Kompartimente der Milz, die folliculäre Zone und die Marginalzone. (Abbildung 6)



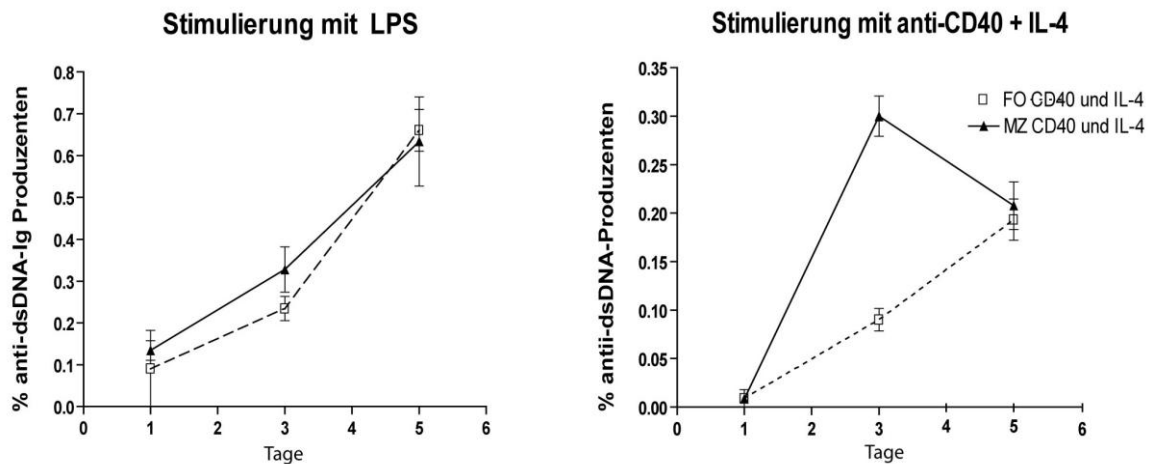
**Abbildung 6:** Immunhistologische Schnitte der Milz von weiblichen und männlichen NZB/W F1 Mäusen im Alter von 6-7 Wochen und 6-8 Monaten. Färbung: anti-IgD (grün), anti-IgM (rot) und DAPI (blau) (Vergrößerung: 100fach). Dargestellt sind Fo-B-

Zellen (IgD<sup>high</sup>, grün) und Mz B-Zellen (IgM<sup>high</sup>, rot). Während bei Männchen die Anordnung der Marginal-B-Zellen (waagrechter Pfeil) und folliculären B-Zellen (senkrechter Pfeil) erhalten bleibt, lässt sich die milztypische Morphologie in der pathologisch veränderten Milz alter Weibchen nicht mehr erkennen. (Im Vergleich hierzu Abbildung 4, Kap. 1.2.3 )

Bei jungen Mäusen beider Geschlechter kommt die milztypische Anordnung der Fo und Mz-Kompartimente zur Darstellung, die bei älteren Männchen auch im fortgeschrittenen Alter von 6-8 Monaten erhalten bleibt. Hingegen zeigte sich in der weiblichen Maus ein deutlicher Umbau der Milz. Die typische Lokalisation der Mz- und Fo-B-Zellen lässt sich hier nicht mehr nachvollziehen. Mit dem Progress der Erkrankung geht ein Umbau der Milz einher, in dem die typische Follikelstruktur nicht mehr erkennbar ist. Wie in Abbild 6 bei 6-8 Monate alten Weibchen gezeigt, sind die Mz-B-Zellen nicht mehr um den Follikel angeordnet und finden sich in der interfollikulären Zone und im Follikel wieder. Dagegen sind die Fo-B-Zellen weiterhin am Rand des Follikels zu finden. Auffällig ist hier die scheinbare Migration der Mz-B-Zellen bei alten weiblichen Mäusen.

### 3.4 Weibliche und männliche NZB/W F1 Mäuse haben gleiche Frequenzen autoreaktiver Fo- und Mz-B-Zellen

#### *3.4.1 Austestung der Kulturbedingungen für die B-Zell-Stimulation mit LPS und anti-CD40+IL4*

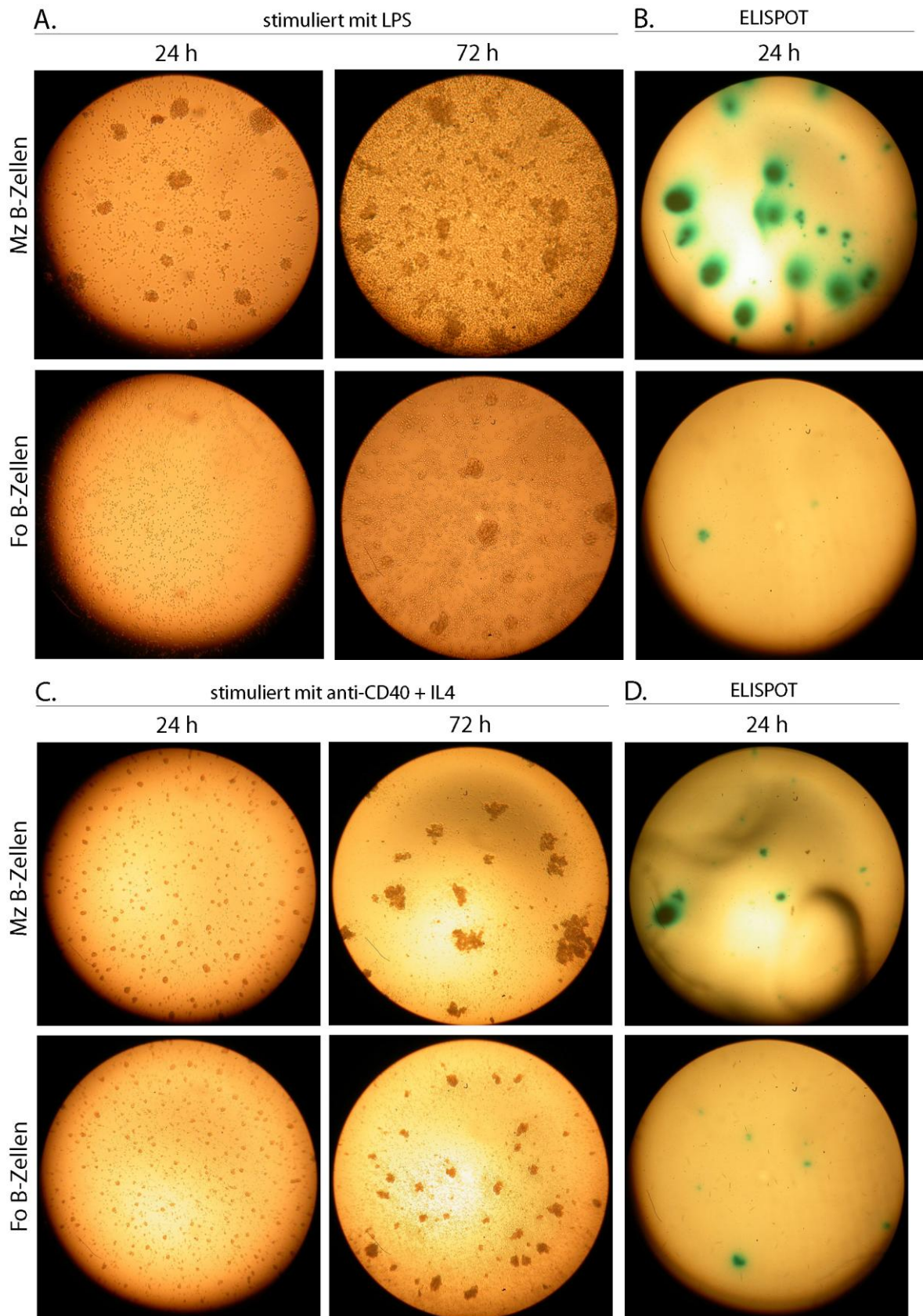


**Abbildung 6:** Bestimmung der idealen Dauer der B-Zell-Stimulation für die Darstellung autoreaktiver B-Zellen im ELISPOT.

Vor der Messung der Autoantikörperproduzenten der Milz im ELISPOT, wurden für Fo- und Mz-B-Zellen die hierfür idealen Kulturbedingungen ausgetestet. Anti-dsDNA-Produzenten wurden am Tag 1, 3 und 5 der Stimulation mit LPS bzw. einer Kombination aus anti-CD40 und IL4 bestimmt. Bei der Stimulation mit LPS stieg der Anteil der dsDNA-Ak-Produzenten unter Fo- und Mz-B-Zellen bis zum 5. Tag an. Im Gegensatz dazu fanden sich bei anti-CD40+IL4 am dritten Tag die meisten Autoantikörperproduzenten. Unter den Mz-B-Zellen sank der Anteil zum 5. Tag hin ab. (Abbildung 6). Für die Stimulation der B-Zellen wurde ein Zeitraum von drei Tagen gewählt.

Gleichzeitig wurde die Proliferation der B-Zellen makro- und mikroskopisch im Verlauf beobachtet. Wie in Abbildung 7 dargestellt proliferieren Mz-B-Zellen nach Stimulation mit LPS schneller im Vergleich zu Fo B-Zellen und sezernieren deutlich früher und pro Zelle mehr Antikörper.





**Abbildung 7:** Beispielfotos von Fo- bzw. Mz-B-Zellen nach Stimulation mit A. LPS (*Lipopolysaccharid*) oder C. anti-CD40+IL4 über 24 h und 72 h. (Dargestellt ist je ein

Well, 48-Well-Platte). B./D. Anti-dsDNA-Produzenten nach 24-Stündiger Stimulation mit LPS oder anti-CD40+IL4. (AFC's im ELISPOT pro  $2 \times 10^5$  Fo bzw. Mz B-Zellen).

### ***3.4.2 Messung der anti-dsDNA und anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Autoantikörperproduzenten***

Wie in vorangegangenen Messungen gezeigt, sind autoreaktive B-Zellen überwiegend in der Milz der Mäuse zu finden. Im quantitativen Vergleich der wichtigsten Subpopulationen fand sich kein Unterschied zwischen beiden Geschlechtern. Somit lässt sich der unterschiedliche Krankheitsverlauf nicht durch ein verändertes Verhältnis der B-Zell-Subpopulationen oder der Akkumulation eines B-Zell-Subtyps der Milz erklären.

In dem folgenden Experiment wurde der Frage nachgegangen, welches B-Zell-Kompartiment bevorzugt von dsDNA- und SmD1<sub>83-119</sub>-spezifischen B-Zellen kolonisiert wird und inwieweit hierbei geschlechtsspezifische Unterschiede zu finden sind.

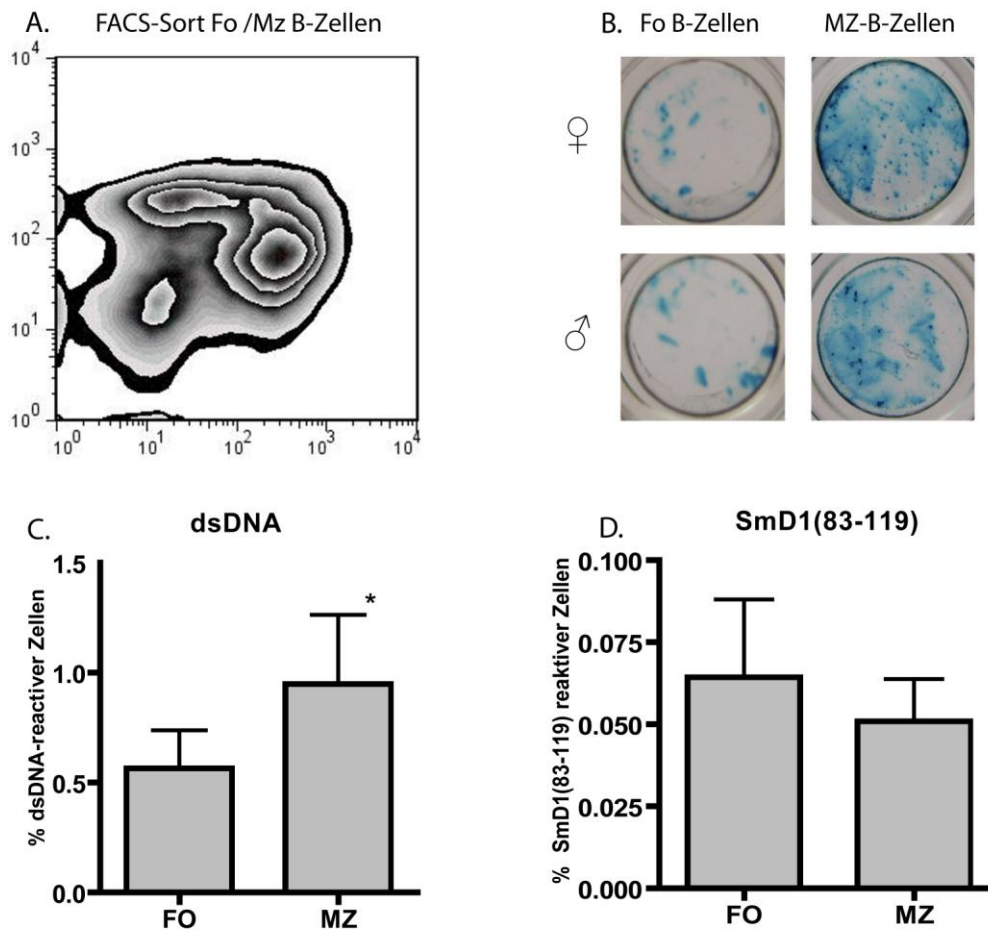
Hierfür wurden Milzen von gesunden weiblichen und männlichen NZB/W F1 Mäusen im Alter zwischen 8 und 14 Wochen (n= 6 weibliche und männliche Mäuse) wie in Kap. 2.4 beschrieben aufgearbeitet, mittels FACS in hoher Reinheit in Fo- und Mz-B-Zellen aufgetrennt und mit LPS oder anti-CD40+IL4 stimuliert. Pro Well wurden  $2 \times 10^5$  Fo- oder Mz-B-Zellen gemeinsam mit LPS oder anti-CD40+IL4 über 3 Tage inkubiert und anschließend der Anteil der Autoantikörperproduzenten im ELISPOT bestimmt. (siehe auch Kap. 2.8)

#### *dsDNA-reaktive B-Zellen finden sich hauptsächlich in der Marginalzone*

Nach Auszählung des ELISPOT-Assays wurde der Anteil anti-dsDNA- und anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-Ak-sezernierender B-Zellen bezüglich Geschlecht und Subpopulation gegenübergestellt.

Nach polyklonaler Stimulierung der B-Zellen mit LPS fand sich der höchste Anteil dsDNA-reaktiver B-Zellen unter den Mz-B-Zellen (mean 0,95% aller AFC's). Im Vergleich wiesen Fo-B-Zellen im Durchschnitt signifikant niedrigere Frequenzen auf (mean 0,56% aller AFC's,  $p < 0,05$  Wilcoxon matched pairs test). (Abbildung 8C)



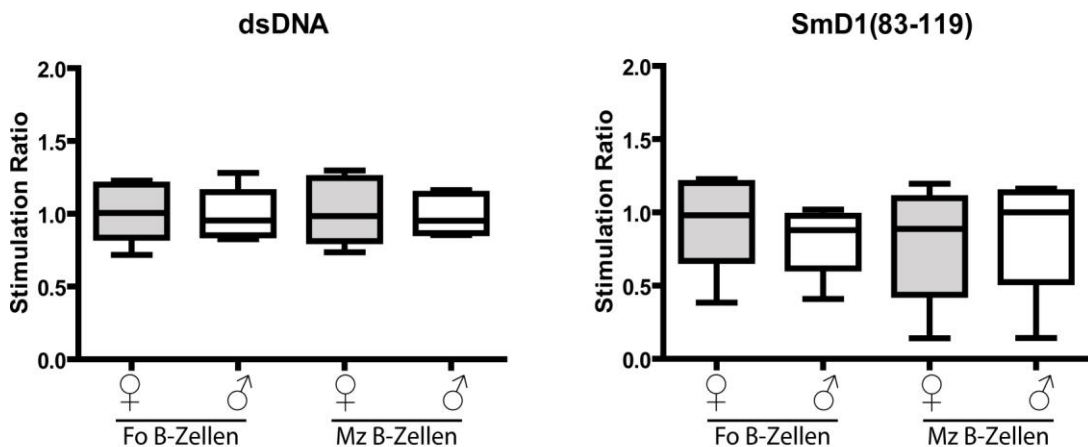


**Abbildung 8:** **A.** FACS-plot mit Differenzierung von drei Populationen:  $CD21^{low}CD23^{high}$  Fo-B-Zellen,  $CD21^{high}CD23^{low}$  Mz-B-Zellen und  $CD21^{-}CD23^{low}$  B-Zellen (nach Vorselektion von  $PI^{neg} CD19^{pos}$  Lymphozyten). **B.** Beispiel eines ELISPOTS mit farblich markierten anti-dsDNA-Produzenten nach Stimulation mit LPS über drei Tage. Mehr AFCs unter den Mz-B-Zellen, kein Unterschied bezüglich des Geschlechts. **C.** Höherer Anteil dsDNA-Ak-Produzenten im Mz-Kompartiment ( $p < 0.05$ ). **D.** Kein signifikanter Unterschied zwischen dem Fo- und Mz-Kompartiment bezüglich  $SmD1_{(83-119)}$ -Ak-Produzenten.

In der Frequenz  $SmD1_{(83-119)}$ -reaktiver B-Zellen fand sich dagegen zwischen dem Fo- und Mz-Kompartiment kein signifikanter Unterschied, bei insgesamt deutlich niedrigeren Frequenzen im Vergleich zu dsDNA-Ak-Produzenten. (mean 0.05% aller Mz AFC's, 0.06% aller Fo AFC's,  $p=0.8$ ) (Abbildung 8D)

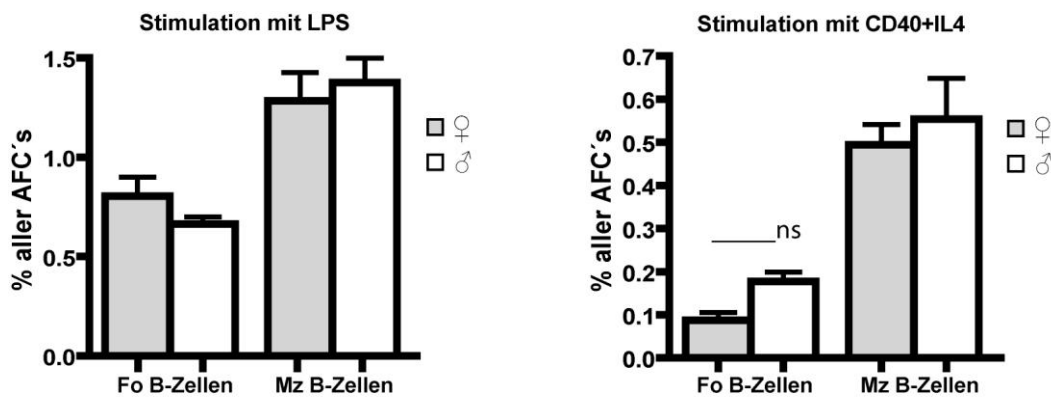
Somit finden sich anti-dsDNA-reaktive B-Zellen in dem untersuchten Mausstamm hauptsächlich unter den Mz-B-Zellen.

Kein Unterschied in der Frequenz dsDNA- und SmD1<sub>(83-119)</sub>-reaktiver B-Zellen aus weiblichen und männlichen Milzen



**Abbildung 9:** Frequenzen dsDNA- und SmD1<sub>(83-119)</sub>-reaktiver Fo und Mz B-Zellen im Geschlechtervergleich. Stimations- Ratio: 1,0 markiert identische Frequenzen autoreaktiver B-Zellen in männlichen und weiblichen Mäusen

Um die Daten zu Frequenzen dsDNA- und SmD1<sub>(83-119)</sub>-reaktiver Fo- und Mz-B-Zellen aus unterschiedlichen Experimenten miteinander vergleichen zu können, wurde die Stimations-Ratio berechnet. (siehe Kap. 1.13) Der Wert 1,0 markiert identische Frequenzen autoreaktiver B-Zellen in männlichen und weiblichen Mäusen (Abbildung 9). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen Weibchen und Männchen in der Frequenz dsDNA- oder SmD1<sub>(83-119)</sub>-reaktiver B-Zellen beider Subpopulationen. Für weibliche Mz-B-Zellen zeigte sich im Falle der anti-dsDNA-Ak-Produzenten eine Ratio von  $1,015 \pm 0,181$ , im Vergleich dazu  $0,985 \pm 0,160$  bei Männchen. ( $p=0,75$ ). Für Fo-B-Zellen war die Ratio  $1,014 \pm 0,204$  gegenüber  $0,986 \pm 0,128$  ( $p=0,59$ ). (Abbild 9, links). Ebenso zeigte sich auch hinsichtlich der Frequenz SmD1<sub>(83-119)</sub>-reaktiver B-Zellen kein Unterschied zwischen beiden Geschlechtern. (Abbild 9, rechts) Gleiche Ergebnisse wurden nach Stimulierung der Zellen mit anti-CD40L+IL4 erhoben. (Abbildung 10, rechts).



**Abbildung 10:** AFCs im dsDNA-EILISPOT nach Stimulierung von Fo- und Mz-B-Zellen aus weiblichen und männlichen Spendern. Weder nach LPS- noch nach CD40+IL4-Stimulation konnte ein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Frequenz der Autoantikörperproduzenten gemessen werden. (ns - nicht signifikant)

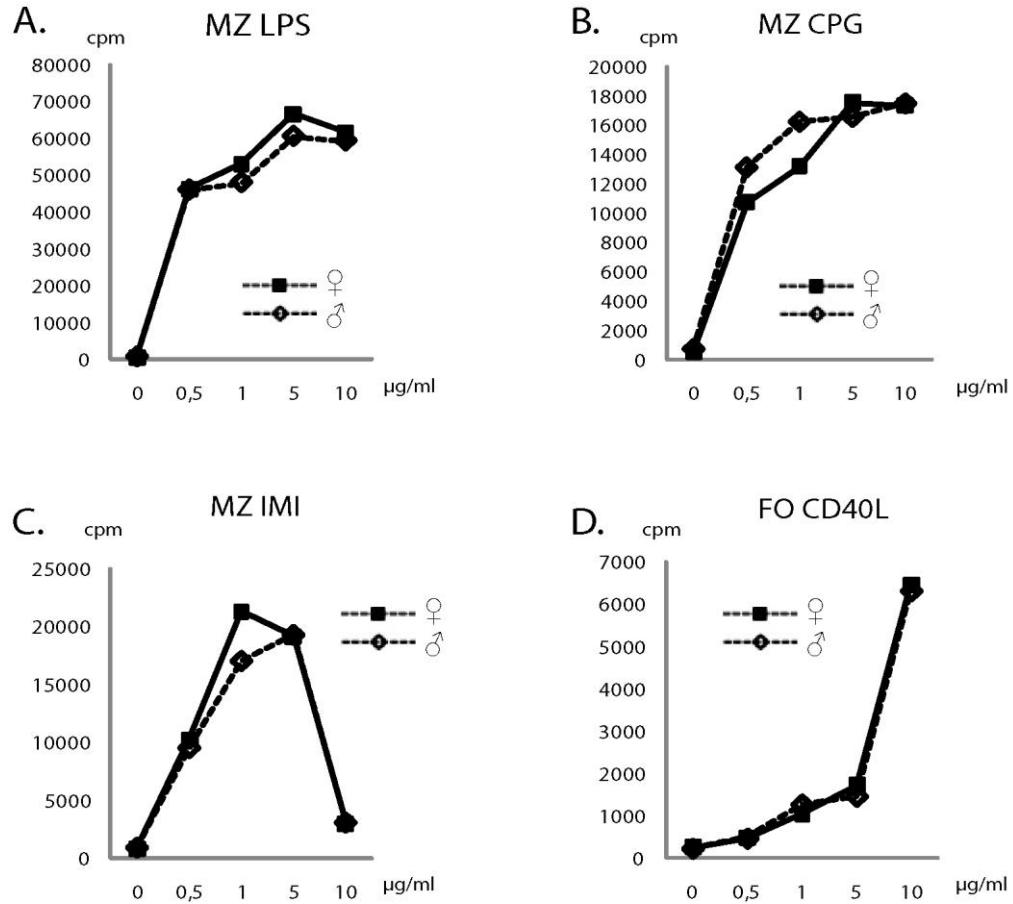
Im Geschlechtervergleich fand sich kein Unterschied in der Frequenz autoreaktiver Fo- oder Mz-B-Zellen gegen die getesteten Autoantigene dsDNA und SmD1<sub>(83-119)</sub>, unabhängig vom Stimulus (LPS oder anti-CD40+IL4) oder Alter.

### **3.5 Vergleich der Aktivierbarkeit und Proliferation weiblicher und männlicher B-Zellen im CFSE- und [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Proliferationsassay**

In den ELISPOT-Assays konnte kein signifikanter geschlechtsspezifischer Unterschied in der Frequenz autoreaktiver B-Zellen gemessen werden. Die deutlich höheren anti-dsDNA- und anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-Ak-Titer bei Weibchen spiegeln sich nicht in einer höheren Frequenz autoreaktiver B-Zellen wider. Weibliche und männliche Mäuse haben die gleichen Voraussetzungen bezüglich des primären autoreaktiven B-Zell-Pools.

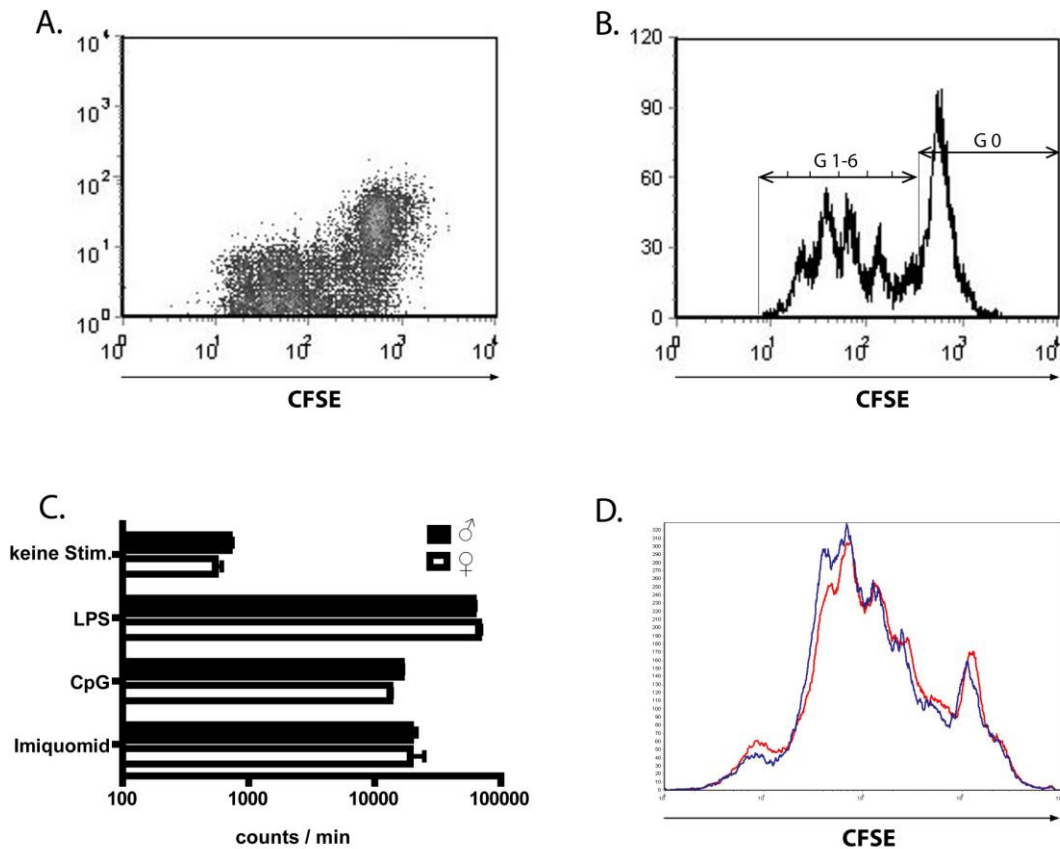
In einem weiteren Schritt wurde die Aktivierbarkeit der B-Zellen beider Geschlechter getestet. Wie in den vorangegangenen Experimenten fand die Auftrennung in Fo- und Mz-B-Zellen mittels FACS statt. Die Zellen wurden anschließend in Kultur polyklonal über den Toll-like Rezeptor (TLR-4, TLR-7 oder TLR-9) bzw. mit anti-CD40+IL4 stimuliert.

Als TLR-Stimulus wurde LPS (TLR-4), CpG (TLR-9) und Imiquimod (TLR-7) verwendet. Die anschließende Messung der Zellproliferation erfolgte anhand zweier unterschiedlicher Methoden, dem CFSE-Proliferationsassay und der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation.



**Abbildung 11:** Messung der Proliferation anhand der [<sup>3</sup>H]-Thymidin-Inkorporation. A.-D. Gegenüberstellung der Zell-Proliferation nach Stimulierung weiblicher und männlicher Mz- und Fo-B-Zellen mit LPS, CpG, Imiquimod oder anti-CD40+IL4 unterschiedlicher Konzentration.

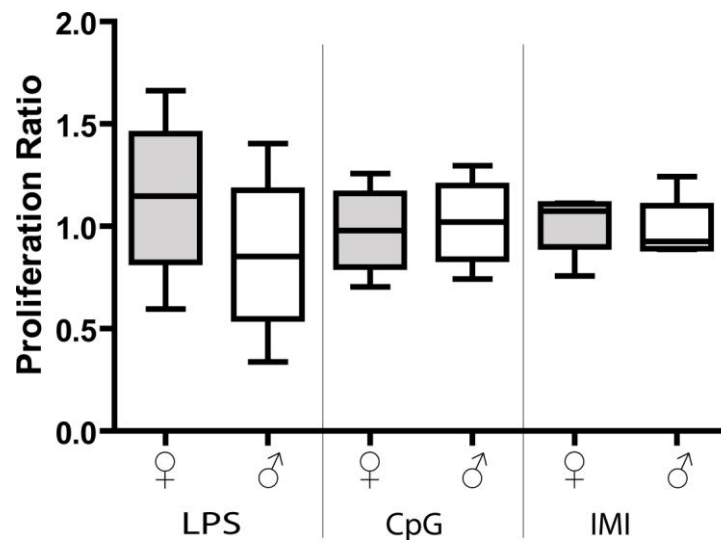
Bei keinem Stimulus konnte im direkten Vergleich weiblicher und männlicher B-Zellen ein Unterschied in der Aktivierungsschwelle oder Proliferationsrate beobachtet werden. Die Messung wurde mit zwei verschiedenen Methoden verifiziert. (Abbildung 11 und 12)



**Abbildung 12:** CFSE-Proliferations-Assay. FACS-Blot (A.) und Histogramm (B.) mit Abgrenzung der Zellgenerationen (G0: nicht proliferierte Zellen, G1-G6: Zellgenerationen 1-6). Mz-B-Zellen nach Stimualtion mit LPS (C. und D.) Gegenüberstellung der Proliferation von weiblichen und männlichen B-Zellen (hier dargestellt Mz-B-Zellen) nach Stimulierung mit LPS, CpG oder Imiquomid. (rot – Weibchen, blau – Männchen)

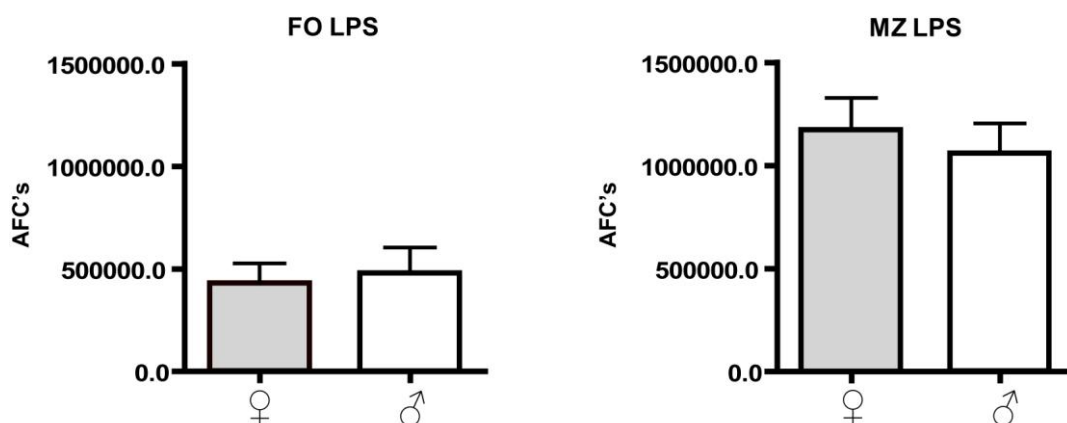
Um die Daten beider Methoden kombinieren zu können wurde erneut die Ratio der Messdaten beider Geschlechter bestimmt und in Abbild 13 gegeneinander aufgetragen. Der Wert 1,0 definiert die gleichrangige Proliferation beider Geschlechter.

Weibliche und männliche B-Zellen zeigten keinen Unterschied in ihrer Proliferations-eigenschaft unter gleichen Reiz- und Kulturbedingungen.



**Abbildung 13:** Proliferations-Ratio aus unterschiedlichen Experimenten - [<sup>3</sup>H]-Thymidin und CFSE-Proliferationsassay. Es zeigt sich kein geschlechtsspezifischer Unterschied in der Proliferation der Zellen.

Zum Vergleich wurden die mittels ELISPOT gemessenen Gesamtantikörperproduzenten pro  $0,5 \times 10^6$  B-Zellen nach Stimulation mit LPS unabhängig ihrer Spezifität gegenübergestellt. Dem Ergebnis der Proliferationsassays entsprechend, fand sich auch hinsichtlich der Gesamtantikörperproduktion kein Unterschied im Geschlechtervergleich. Somit zeigten B-Zellen der untersuchten Milzkompartimente auch in den ELISPOT-Messungen keinen geschlechtsspezifischen Unterschied hinsichtlich ihrer Aktivierbarkeit. (Abbildung 14)



**Abbildung 14:** Anzahl der AFCs nach 3-tägiger Stimulation von je  $0,5 \times 10^6$  Mz und Fo B-Zellen mit LPS. Es zeigte sich kein Unterschied in der Anzahl der Antikörperproduzenten (unabhängig von Spezifität und Typ).

Zusammenfassend lässt sich in den vorliegenden Messungen kein Hinweis auf einen geschlechtsspezifischen Unterschied in der Aktivierbarkeit von B-Zellen gegenüber den verwendeten Stimulanzen finden. Trotz der beim SLE vorgeschriebenen B-Zell-Hyperaktivität und Unterschiede in der Aktivierbarkeit weiblicher und männlicher Immunzellen, fand sich in der vorliegenden Arbeit in keiner der verwendeten Methoden ein Unterschied in der Proliferation und/oder Aktivierbarkeit der B-Zellen im Geschlechtervergleich.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Antikörpertiter und Krankheitsprogression bei weiblichen und männlichen Mäusen

Die Aktivität und Progression der Erkrankung in weiblichen und männlichen Mäusen wurde anhand von Serum- und Urinparametern im Alter zwischen 6 und 34 Wochen dokumentiert. Die für den SLE spezifischen anti-dsDNA und anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörper dienten als Serummarker für die Krankheitsaktivität. Parallel dazu wurde die Protein- und Leukozyturie als klinischer Verlaufsparemeter für die Krankheitsprogression und Surrogat für die Nephritis herangezogen.

Weibliche NZB/W F1 Mäuse zeigten im Gegensatz zu ihren männlichen Geschwistern früh nachweisbare IgG-Ak gegen dsDNA und SmD1<sub>83-119</sub>. Bei Weibchen wurde im Alter zwischen 18 und 22 Wochen ein steiler Anstieg der IgG-Titer gemessen, während bei Männchen bis zur 34. Woche kein relevanter Anstieg zu verzeichnen war.

Übereinstimmende Angaben finden sich hierzu auch in der Literatur. Antinukleäre Antikörper, einschließlich anti-dsDNA-, anti-Nukleosom-, anti-Chromatin und anti-Histon-Ak, werden bei NZB/W F1 Mäusen ab einem Alter von 2-3 Monaten beschrieben. Anti-DNA-IgM-Ak tauchen im Alter zwischen 3 und 5 Monaten, anti-DNA-Ak vom IgG-Typ (hauptsächlich IgG2a und IgG2b) sind ab dem 5. bis 7. Lebensmonat nachweislich. Bei Männchen wird in der Literatur erst nach dem 12. Lebensmonat ein Isotypen-switch mit Anstieg der IgG-Titer beschrieben.<sup>2</sup>

Interessanterweise ließ sich bei Weibchen der Anstieg der anti-SmD1<sub>83-19</sub>- IgG im Serum vier Wochen vor dem der anti-dsDNA-IgG messen. Eine wichtige Rolle des SmD1<sub>83-119</sub>-Antigens in diesem Zusammenhang wurde in Vorarbeiten an murinen SLE-Modellen (NZB/W F1 und MRL/lpr-Mausstämmen) erkannt (siehe hierzu Kap. 1.2.1).

Sm-Antikörper finden sich bei MRL/lpr-Mäuse in ca. 25% im Alter von 5 Monaten.<sup>118</sup> Anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörper ließen sich in MRL/lpr-Mäusen bereits im Alter von 6-8 Wochen nachweisen.<sup>119</sup>

Ein Zusammenhang zwischen Antikörpern gegen das Sm-Peptid und dem Auftreten von anti-dsDNA-Antikörpern wurde bereits in mehreren Arbeitsgruppen hergestellt. Unter anderem konnte durch die Exposition mit dem SmD1<sub>83-119</sub>-Peptid eine gegen dsDNA gerichtete Immunantwort induziert werden.<sup>120, 121</sup>



#### *Manifestation der Nephritis mit dem Anstieg der anti-dsDNA- und anti- SmDI<sub>83-119</sub>-Ak:*

Parallel zum Anstieg der IgG-Titer gegen beide Antigene fand sich bei Weibchen ab der 26. Lebenswoche eine Protein- und Leukozyturie als Indikatoren für die progrediente Nephritis im Rahmen des fortschreitenden Krankheitsprozesses. Die Ausbildung einer Nephritis mit anti-dsDNA-IgG- und Komplementablagerungen in den Glomeruli ist bei NZB/W F1 Mäusen in der Literatur vorbeschrieben und deckt sich mit unseren Beobachtungen. (siehe Kap. 1.3) Die progrediente Niereninsuffizienz ist bei SLE-Patienten und auch im murinen Modell ein entscheidender, oft lebenslimitierender, Prozess. Die Protein- und Leukozyturie wurde mit einem Urin-Stix-Test erhoben und diente in dieser Arbeit als klinischer Verlaufsparemeter. Ein Nachteil dieser Messmethode ist sicherlich die grobe Abstufung der pathologischen Urinwerte, die nach Farbumschlag in fünf verschiedene Schweregrade eingeteilt wurden. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass mit dieser Messmethode niedrig-pathologische Werte bei Männchen nicht registriert wurden. Aufgrund des insgesamt deutlichen Unterschieds zu Weibchen, war diese einfache Methode jedoch für einen direkten Vergleich ausreichend.

#### **4.2 Die Milz ist das Organ mit der höchsten Anzahl an Autoantikörperproduzenten**

Neben der Messung der Autoantikörper-Titer, wurden lymphatische Organe in Hinblick auf die Autoantikörperproduzenten pro Organ miteinander verglichen. Aufbereitete Zellen aus Milz, Lymphknoten, Thymus und Knochenmark von NZB/W F1 Mäusen wurden im ELISPOT ex-vivo auf anti-dsDNA-Produzenten untersucht.

Die meisten spontan anti-dsDNA-sezernierenden Zellen fanden sich mit deutlichem Abstand in der Milz. Einhergehend beobachteten wir mit zunehmendem Alter und Krankheitsprogression eine Splenomegalie, die insbesondere für die weiblichen Tiere dieses Mausstammes typisch ist. Die nächst größere Nische für anti-dsDNA-Ak-Produzenten fand sich im Knochenmark, im Vergleich zur Milz jedoch geringerer Anzahl. Verglichen mit dem gepoolten Knochenmark beider Femore, wiesen die Milzen der Mäuse pro Organ eine über 100-fach höhere Anzahl an Gesamt- und anti-dsDNA-Antikörperproduzenten auf. In der Annahme, dass sich bei Mäusen nur 12-16% des gesamten Knochenmarks im Femur befinden<sup>122</sup>, enthält die Milz, auch nach Umrechnung auf das gesamte Knochenmark, mit großem Abstand die höchste Anzahl autoreaktiver Zellen.

### **4.3. Vergleich der B-Zell-Subpopulationen in weiblichen und männlichen Milzen**

Für das grundlegende Verständnis der Pathophysiologie des SLE nimmt die Identifizierung der autoreaktiven B-Zell-Population eine entscheidende Stellung ein. Eine genaue Charakterisierung der für die Krankheitsmanifestation verantwortlichen B-Zell-Subpopulation kann eine gezielte und effiziente Therapie ermöglichen.<sup>123</sup> Der markante Unterschied in der Krankheitsmanifestation weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse bietet ein gutes Studienobjekt zur Analyse dieser Frage.

Es wurden die zwei Hauptkompartimente der B-Zell-Population der Milz, die Fo- und Mz-Zellen, mittels FACS aussortiert und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Reaktivität gegenüber dem dsDNA- und SmD1<sub>83-119</sub>-Antigen untersucht.

Die durchflusszytometrische Analyse der Milzen weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse zeigte mit zunehmendem Alter ein wachsendes Mz-B-Zell-Kompartiment. Dies wurde für beide Geschlechter in gleichem Maße beobachtet. Ein im Verlauf überproportional expandierendes Mz-Kompartiment wurde bereits in Vorarbeiten an NZB/W F1 Mäusen beobachtet und mit dem SLE in Verbindung gebracht.<sup>124, 125</sup>

Bis auf eine Altersdynamik im folliculären Kompartiment weiblicher Mäuse, fand sich kein geschlechtsspezifischer oder altersabhängiger Unterschied in der Komposition der B-Zell-Subpopulationen der Milz. In älteren Weibchen wurde im Alter von 6 Monaten ein im Verhältnis zu allen B-Zellen der Milz reduziertes Fo-B-Zell-Kompartiment registriert, keine Dynamik dagegen bei Männchen gleichen Alters. Ob es sich hierbei um eine grundsätzlich geschlechtsspezifische Divergenz der B-Zell-Reifung handelt oder am ehesten den fortgeschrittenen Entzündungsprozess bei Weibchen widerspiegelt, kann nicht unterschieden werden. Eine Reduktion des Fo-Kompartiments bei erhaltenem Mz-Kompartiment wurde in transgenen Mausmodellen (3-32 V<sub>H</sub> tg NZB/W und tg C57BL/6; Tillman et al.) als Ergebnis funktionierender Toleranzmechanismen beschrieben, die die Ausreifung autoreaktiver B-Zell-Vorstufen unterbinden.<sup>124</sup> Ob hier ebenfalls eine Hemmung der Ausdifferenzierung der B-Zellen bei gesteigertem Aufkommen autoreaktiver B-Zell-Vorstufen vorliegt, kann nur spekuliert werden. Da sich allerdings, wie weiter unten dargestellt, diese Beobachtung nicht in der Frequenz autoreaktiver B-Zellen nachvollziehen lässt, ist dies am ehesten Ausdruck des Entzündungsprozesses im Rahmen der fortgeschrittenen Erkrankung der weiblicher Mäuse.

#### 4.4 Frequenzen autoreaktiver B-Zellen der Milz im Geschlechtervergleich

Die höhere Prävalenz des SLE beim weiblichen Geschlecht, die sich auch in dem hier verwendeten Mausmodell widerspiegelt, wurde bereits in frühen Studien mit den Sexualhormonen in Verbindung gebracht. Zahlreiche Studien konnten einen Zusammenhang herstellen: Messung der Hormonspiegel bei SLE-Patienten zeigten erhöhte Werte von Östrogen und/oder Prolaktin<sup>7, 40</sup> und reduzierte Testosteron- und DHEA-Spiegel.<sup>42, 43</sup> Auch in Kastrationsexperimenten an Mausmodellen konnte das Paradigma eines „krank machenden“ Östrogens (insbesondere des 17 $\beta$ -Estradiols) und eines die Krankheit vorbeugenden Androgens bestätigt werden.<sup>7, 44</sup> Der Nachweis beider bekannter Östrogenrezeptoren (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ) auf B-Lymphozyten zeichnet eine direkte Wirkung des Hormons auf Immunzellen vor.<sup>126</sup>

In Vorarbeiten wurde an einem transgenen Mausmodell gezeigt, dass Östrogen auf die Toleranzmechanismen der B-Zell-Entwicklung Einfluss nimmt und darüber die Ausreifung anti-dsDNA reaktiver B-Zellen begünstigen kann. Genetisch veränderte BALB/c Mäuse mit Expression eines transgenen anti-dsDNA-Ak (R4A-IgG2b-BALB/c) bilden darin in mehreren Entwicklungsstufen hoch-affine anti-dsDNA-B-Zellen, die jedoch durch negativer Selektion oder Anergy reguliert wurden. Anti-dsDNA-Ak-Titer im Serum waren zunächst kaum nachweisbar. Erst durch Exposition dieser Mäuse mit Estradiol (vs Placebo) wurde ein deutlicher Anstieg der hoch-affinen anti-dsDNA-Ak im Serum gemessen.<sup>53</sup> Diskutiert werden dabei Mechanismen, die auf der Stufe der Transienten B-Zell-Vorstufe, die Ausselektion autoreaktiven Zellen durch Beeinflussung des BCR-Signalwegs verhindern. Unter anderem wird ein direkter Hormoneinfluss auf die Expression BCR-inhibierender Faktoren wie CD22 und SHP-1, sowie auf Apoptosemechanismen durch bcl-2-Induktion angenommen. Die unter dem Hormonmeinfluss in-vivo vermehrt gebildeten dsDNA-reaktiven B-Zellen fanden sich in dem expandierten Mz-Kompartiment.<sup>126, 127</sup>

Vor dem geschilderten Hintergrund wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich der vorgeschlagene Pathomechanismus beim NZB/W F1 Mausstamm, im direkten Vergleich weiblicher und männlicher Mäuse nachvollziehen lässt.

Im Vergleich der Subpopulationen fand sich im Mz-Kompartiment zwar der größere Anteil an anti-dsDNA-Ak-Produzenten. Im direkten Vergleich zwischen weiblichen und männlichen Mäusen konnte dagegen weder unter den Mz- noch den Fo-B-Zellen ein Unterschied hinsichtlich der Anzahl oder Frequenz der anti-dsDNA- oder anti-SmD1<sub>83-119</sub>-

Ak-Produzenten gemessen werden – trotz fortgeschrittener Erkrankung mit hohen Autoantikörpertitern bei weiblichen Mäusen. Weibchen und Männchen haben damit gleiche Voraussetzungen in Bezug auf den primären B-Zell-Pool der Milz, unabhängig vom Alter und Krankheitsprogress.

Zwei wichtige Unterschiede lassen sich in Bezug auf die Vorarbeiten anführen. Zum einen wurden die Versuche von Grimaldi et al. an transgenen Mausmodellen (R4A-IgG2b, Offen et al., 1992; Shefner et al., 1991) durchgeführt, deren B-Zellen die schwere Kette eines nephritogenen, hochaffinen anti-dsDNA-Antikörpers ausbilden. Dieser Eingriff in das BCR-Repertoire und B-Zell-Funktion generiert ein vereinfachtes Modell, das zu Studienzwecken zwar ausreichende Mengen anti-dsDNA-reaktive B-Zellen bereitstellt. Eine physiologische B-Zell-Entwicklung kann allerdings nicht vorausgesetzt werden. Ein weiterer Kritikpunkt sind die hohen Östrogendosen, die den Versuchstieren kontinuierlich in Form von Pellets appliziert wurden. Andererseits ist der Anteil anti-dsDNA-spezifischer B-Zellen unter physiologischen Bedingungen sehr niedrig. Die hier registrierten Frequenzen lagen zwischen ca. 0,5 und 1,5%. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Frequenz autoreaktiver B-Zellen der Milz könnten außerhalb der Sensitivitätsgrenzen der hier verwendeten Methoden liegen. Subtile, jedoch für die Krankheitsmanifestation entscheidende Unterschiede, waren eventuell nicht greifbar.

Eine Einschränkung dieser Arbeit ist sicherlich, die hier nicht bestimmte Affinität der anti-dsDNA-B-Zellen und der sezernierten Autoantikörper. Es ist bekannt, dass insbesondere hoch-affine anti-dsDNA-Ak für die Organschäden beim SLE verantwortlich sind. (Auch in den angesprochenen Vorarbeiten wird die Regulierung hoch-affiner anti-dsDNA-B-Zellen, als Erfolg funktionierender Toleranzmechanismen gesehen, die unter Östrogeneinfluss gebrochen werden können.) Ein möglicher Unterschied in der Frequenz hoch-affiner autoreaktiver Zellen wird in dieser Arbeit nicht berücksichtigt. Weiterführende Messungen der Autoantikörper-Affinität auf der Grundlage der bereits erhobenen Daten, ist sicherlich ein wichtiger Schritt in der Aufklärung des Geschlechter-Bias in dem verwendeten NZB/W F1 Mausstamm.

*Zusammenfassend* fand sich im direkten Vergleich weiblicher und männlicher Mäuse kein Unterschied in der Komposition der untersuchten Milzkompartimente oder Frequenz autoreaktiver B-Zellen für die hier verwendeten Antigene. Ein erhöhtes Aufkommen autoreaktiver Zellen bei Weibchen als Resultat einer abweichenden B-Zell-Reifung, wie in

Vorarbeiten vorgeschlagen, ließ sich in der vorliegenden Arbeit somit nicht nachweisen. Vor dem genetischen Hintergrund des verwendeten NZB/W-Mausstamms haben beide Geschlechter in Bezug auf das untersuchte primäre B-Zell-Repertoire der Milz die gleichen Voraussetzungen.

#### **4.5 Aktivierbarkeit und Proliferation von Mz- und Fo-B-Zellen im Geschlechtervergleich**

Wie in den vorangegangenen Kapiteln dargestellt, fand sich im B-Zell-Pool weiblicher und männlicher Milzen kein Unterschied. Im Kontrast dazu stehen hohe Auto-Ak-Titer und die fortgeschrittene Erkrankung bei weiblichen Mäusen. Beim SLE gelten B-Zellen als hyperreaktiv. Unterschiede in der Aktivierungsschwelle zwischen weiblichen und männlichen Zellen wurden ebenfalls beschrieben.<sup>128, 129</sup> In den letzten Jahren konnte v.a. die Aktivierung der Immunzellen über den Toll-like Rezeptor mit einigen Autoimmun-erkrankungen, u.a. mit dem SLE, in Verbindung gebracht werden.<sup>130, 131</sup> Die Beobachtung, dass auch körpereigene Nukleisäure-Chromatin-Komplexe über CpG-Motive Immunzellen über den Toll-like Rezeptor aktivieren können, zeigte einen neuen Mechanismus in der Autoimmunpathogenese auf. Im murinen SLE-Modell MRL<sup>lpr/lpr</sup> hatte die Exposition mit TLR-Liganden (u.a. mit unmethylierter CpG-DNA) eine Aggravierung der Erkrankung zur Folge.<sup>132</sup> Unterstützung finden diese Daten auch in den gut dokumentierten fehlerhaften zellulären Apoptosemechanismen beim SLE.<sup>133</sup> CpG-Motive sind u.a. während der Apoptose aktiv.

Von den bisher bekannten 11 unterschiedlichen Toll-like Rezeptoren, wurden in vorausgegangenen Studien insbesondere die Rezeptoren TLR-7 und TLR-9 mit der Aktivierung autoreaktiver B-Zellen und Verlust der B-Zell-Toleranz in Verbindung gebracht.<sup>134-136</sup> Darin konnte u.a. auch beim NZB/W-Mausstamm die Krankheitsentwicklung durch Inhibition dieser Rezeptoren unterdrückt werden.<sup>137, 138</sup> Untersuchungen an knock-out-Mäusen zeichneten allerdings ein komplexeres Bild, in dem der TLR-9 auch eine vor Krankheitsexazerbation schützende Rolle übernimmt, während dann vor allem der Stimulus über den TLR-7 für die Manifestation der Erkrankung verantwortlich gemacht wird.<sup>138</sup> Die Interaktionen dieser Rezeptorfamilie sind bisher nicht vollständig bekannt, es zeichnet sich ein heterogenes Bild ihrer Rolle beim SLE.

Eine Hypothese zur Pathophysiologie des Geschlechter-Bias ist die ungleichmäßige Inaktivierung X-chromosomaler Gene bei Weibchen. (siehe hierzu Kap. 1.1.4) Darauf aufbauend, konnte im Mausmodell durch Steigerung der Expression des auf dem X-Chromosom kodierten TLR-7 ein autoreaktiver Status induziert werden. B- und T-Zellen waren unter der Überexpression des TLR-7 spontan aktiviert und wiesen eine deutlich höhere Reaktivität gegenüber Imiquimod auf. Bei allen Mäusen fanden sich Autoimmunantikörper, die im Versuchsarm mit höherer TLR-7-Genexpression mit einer schnell letalen Autoimmunerkrankung einherging.<sup>34</sup>

Eine aktuelle Studie zeigte erstmalig, dass sich weibliche Immunzellen über den Toll-like Rezeptor leichter aktivieren lassen. Die Stimulierung peripherer Blutlymphozyten mit einem TLR-7-Liganden führte bei weiblichen Spendern zu einer stärkeren Antwort als bei Männern.<sup>128</sup>

Inwieweit bei gleichen zellulären Voraussetzungen beider Geschlechter eine gesteigerte Reagibilität weiblicher B-Zellen den Geschlechter-Bias begründet, wurde in der vorliegenden Arbeit mit zwei unterschiedlichen etablierten Messmethoden überprüft. Hierfür wurden B-Zellen in hoher Reinheit aus Milzen weiblicher und männlicher NZB/W F1 Mäuse isoliert und auf ihre Aktivierbarkeit und Proliferation gegenüber einem TLR-4-, TLR-7- und TLR-9-Stimulus sowie einer Kombination aus anti-CD40 und IL-4 untersucht. Die Messdaten wurden mit einem CFSE-Proliferations-Assay (Lyons and Parish, 1994) erhoben und mittels <sup>3</sup>[H]-Thymidin-Inkorporation verifiziert.

In beiden Messmethoden zeigten die untersuchten B-Zellen, sowohl Fo- als auch Mz B-Zellen, im Geschlechtervergleich keinen Unterschied in ihrer Aktivierbarkeit gegenüber LPS, Imiquimod, CpG oder anti-CD40+IL4.

In der Anzahl proliferierender Zellen und auch der Autoantikörper-Produzenten, fand sich kein Unterschied zwischen weiblichen und männlichen NZB/W F1 Mäusen.

Somit zeigten sich in diesen Messungen keine B-Zell-intrinsische Eigenschaften, die Weibchen zu SLE prädisponiert.

## 5. Zusammenfassung

Wie bei fast allen Autoimmunerkrankungen findet sich beim SLE eine vielfach höhere Prävalenz beim weiblichen Geschlecht. Trotz vieler Forschungsarbeiten über SLE, ist der genaue Pathomechanismus und damit die Möglichkeit einer gezielten Therapie weiterhin unbekannt. Neben zahlreichen erkannten Immundefekten wird in den autoreaktiven B-Zellen eine Schlüsselrolle in der Pathogenese des SLE gesehen. Störungen in der Signalkette, niedrige Aktivierungsschwelle und defekte Toleranzmechanismen wurden sowohl bei SLE-Patienten, als auch im murinen SLE-Modell gezeigt. Zudem fanden sich interessante Ansätze zur hormonellen Steuerung der B-Zell-Reifung und Differenzierung, die ein Erklärungsmodell für den Geschlechter-Bias bieten.

In dieser Arbeit wurden B-Zell-Populationen der Milz aus weiblichen und männlichen Mäusen analysiert und hinsichtlich ihrer Komposition, dem Anteil autoreaktiver Zellen und Stimulierbarkeit verglichen. Die Registrierung autoreaktiver B-Zellen und Messung der Krankheitsaktivität erfolgte durch die Bestimmung zweier für den SLE pathognomonischer Autoantikörper – anti-dsDNA- und anti-SmD1<sub>83-119</sub>-Antikörper.

Bei Weibchen wurden höhere Autoantikörper-Titer gemessen, die hauptsächlich in der Milz gebildet werden. In den Untersuchungen der B-Zell-Subpopulationen der Milz konnten wir zeigen, dass sich die Komposition der B-Zell-Kompartimente und Anteil autoreaktiver B-Zellen in weiblichen und männlichen NZB/W F1 Mäusen nicht unterscheidet. Ebenfalls fand sich keine Differenz in der Aktivierbarkeit der B-Zellen gegenüber einem TLR- oder anti-CD40+IL-4-Stimulus.

Der frühe Krankheitsbeginn mit hohen Autoantikörpertitern bei weiblichen Mäusen kann somit nicht mit einem unterschiedlich ausgeprägtem primären B-Zell-Pool der Milz oder einer gesteigerten intrinsischen Aktivität der B-Zellen erklärt werden.

Die Frage nach der Ursache für den Geschlechtsdimorphismus bleibt weiterhin bestehen. Aufgrund einer Vielzahl an Daten ist die Hormon-Theorie weiterhin die attraktivste Erklärung für den unterschiedlichen Krankheitsverlauf. Neben der direkten Wirkung auf B-Zellen beeinflussen Östrogene auch das direkte zelluläre Umfeld. Unter anderem ist der stimulierende Einfluss der Östrogene auf T-Zellen beschrieben, die wiederum B-Zellen aktivieren können. Zum Beispiel exprimieren aktivierte T-Zellen von SLE-Patienten, im Gegensatz zu gesunden, bei gleichzeitigem Stimulus mit Östrogen vermehrt CD40-

Liganden<sup>139,140</sup> Ein weiteres Beispiel sind Monozyten, die unter Östrogeneinfluss das B-Zell-stimulierende IL10 vermehrt produzieren.<sup>141</sup> Neben den bereits erwähnten Beispielen beeinflussen Geschlechtshormone in unterschiedlicher Weise auch andere Immunzellen, die ihrerseits auf die B-Zell-Entwicklung und -Stimulierung steuern können.<sup>142</sup> Damit entsteht ein viel komplexeres Bild, in dem Geschlechtshormone ein pro- bzw. antiinflammatorisches Milieu beeinflussen. Der genaue Mechanismus ist bisher nicht bekannt. Es wird u.a. auch ein direkter Effekt auf die Expression von Transkriptionsfaktoren angenommen, die Schlüsselfunktionen in Entzündungsreaktionen einnehmen und den Progress einer Autoimmunreaktion begünstigen.<sup>143</sup> Zudem ist auch ein lebensverlängernder Effekt auf autoreaktive Zellen beschrieben worden.<sup>52</sup>

Mehr Studien zum komplexen Zusammenspiel von Geschlechtshormone und Immunzellen sind notwendig, um die Grundlagen des augenfälligen Geschlechtsdimorphismus zu verstehen und der komplexen Pathologie des SLE näher zu kommen.



## 6. Literaturverzeichnis

1. Peeva E, Zouali M. Spotlight on the role of hormonal factors in the emergence of autoreactive B-lymphocytes. *Immunol Lett* 2005;101(2):123-43.
2. Rus V MH, in Dubois' Lupus Erythematosus. Wallace DJ and H BV. Dubois' Lupus Erythematosus 6th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2002:65-83.; 2002.
3. Jonsson H, Nived O, Sturfelt G, Silman A. Estimating the incidence of systemic lupus erythematosus in a defined population using multiple sources of retrieval. *Br J Rheumatol* 1990;29(3):185-8.
4. Gleicher N, Barad DH. Gender as risk factor for autoimmune diseases. *J Autoimmun* 2007;28(1):1-6.
5. Lleo A, Battezzati PM, Selmi C, Gershwin ME, Podda M. Is autoimmunity a matter of sex? *Autoimmun Rev* 2008;7(8):626-30.
6. Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001;2(9):777-80.
7. Lahita RG. The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1999;11(5):352-6.
8. Borchers AT, Naguwa SM, Shoenfeld Y, Gershwin ME. The geoepidemiology of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev*;9(5):A277-87.
9. Weinstein Y, Ran S, Segal S. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. *J Immunol* 1984;132(2):656-61.
10. Wagner HJ, Hornef M, Teichert HM, Kirchner H. Sex difference in the serostatus of adults to the Epstein-Barr virus. *Immunobiology* 1994;190(4-5):424-9.
11. Villacres MC, Longmate J, Auge C, Diamond DJ. Predominant type 1 CMV-specific memory T-helper response in humans: evidence for gender differences in cytokine secretion. *Hum Immunol* 2004;65(5):476-85.
12. Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol* 2008;8(9):737-44.
13. Selmi C, Mayo MJ, Bach N, et al. Primary biliary cirrhosis in monozygotic and dizygotic twins: genetics, epigenetics, and environment. *Gastroenterology* 2004;127(2):485-92.
14. Jawaheer D, Seldin MF, Amos CI, et al. A genomewide screen in multiplex rheumatoid arthritis families suggests genetic overlap with other autoimmune diseases. *Am J Hum Genet* 2001;68(4):927-36.
15. Graham RR, Ortmann WA, Langefeld CD, et al. Visualizing human leukocyte antigen class II risk haplotypes in human systemic lupus erythematosus. *Am J Hum Genet* 2002;71(3):543-53.
16. Castro J, Balada E, Ordi-Ros J, Vilardell-Tarres M. The complex immunogenetic basis of systemic lupus erythematosus. *Autoimmun Rev* 2008;7(5):345-51.
17. Ghebrehiwet B, Peerschke EI. Role of C1q and C1q receptors in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Curr Dir Autoimmun* 2004;7:87-97.
18. Manderson AP, Botto M, Walport MJ. The role of complement in the development of systemic lupus erythematosus. *Annu Rev Immunol* 2004;22:431-56.
19. Sestak AL, Nath SK, Sawalha AH, Harley JB. Current status of lupus genetics. *Arthritis Res Ther* 2007;9(3):210.
20. Karassa FB, Trikalinos TA, Ioannidis JP. Role of the Fc gamma receptor IIa polymorphism in susceptibility to systemic lupus erythematosus and lupus nephritis: a meta-analysis. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1563-71.

21. Zulian F, Schumacher HR, Calore A, Goldsmith DP, Athreya BH. Juvenile arthritis in Turner's syndrome: a multicenter study. *Clin Exp Rheumatol* 1998;16(4):489-94.
22. Gilliland WR, Stashower ME. Klinefelter's syndrome and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Rheumatol* 2000;18(1):107-9.
23. Kobayashi S, Shimamoto T, Taniguchi O, Hashimoto H, Hirose S. Klinefelter's syndrome associated with progressive systemic sclerosis: report of a case and review of the literature. *Clin Rheumatol* 1991;10(1):84-6.
24. Valiaho J, Riikonen P, Vihinen M. Novel immunodeficiency data servers. *Immunol Rev* 2000;178:177-85.
25. Ozbalkan Z, Bagislar S, Kiraz S, et al. Skewed X chromosome inactivation in blood cells of women with scleroderma. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1564-70.
26. Brix TH, Knudsen GP, Kristiansen M, Kyvik KO, Orstavik KH, Hegedus L. High frequency of skewed X-chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to thyroid autoimmunity. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(11):5949-53.
27. Invernizzi P. Role of X chromosome defects in primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 2007;37 Suppl 3:S384-8.
28. Stewart JJ. The female X-inactivation mosaic in systemic lupus erythematosus. *Immunol Today* 1998;19(8):352-7.
29. Chitnis S, Monteiro J, Glass D, et al. The role of X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *Arthritis Res* 2000;2(5):399-406.
30. Invernizzi P. The X chromosome in female-predominant autoimmune diseases. *Ann N Y Acad Sci* 2007;1110:57-64.
31. Richardson BC. Epigenetics and autoimmunity. Overview. *Autoimmunity* 2008;41(4):243-4.
32. Lu Q, Wu A, Tesmer L, Ray D, Yousif N, Richardson B. Demethylation of CD40LG on the inactive X in T cells from women with lupus. *J Immunol* 2007;179(9):6352-8.
33. Ozelik T. X chromosome inactivation and female predisposition to autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 2008;34(3):348-51.
34. Deane JA, Pisitkun P, Barrett RS, et al. Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* 2007;27(5):801-10.
35. Font J, Pallares L, Cervera R, et al. Systemic lupus erythematosus in the elderly: clinical and immunological characteristics. *Ann Rheum Dis* 1991;50(10):702-5.
36. Tucker LB, Menon S, Schaller JG, Isenberg DA. Adult- and childhood-onset systemic lupus erythematosus: a comparison of onset, clinical features, serology, and outcome. *Br J Rheumatol* 1995;34(9):866-72.
37. Petri M, Robinson C. Oral contraceptives and systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(5):797-803.
38. Nossent HC, Swaak TJ. Systemic lupus erythematosus. VI. Analysis of the interrelationship with pregnancy. *J Rheumatol* 1990;17(6):771-6.
39. Jungers P, Dougados M, Pelissier C, et al. Lupus nephropathy and pregnancy. Report of 104 cases in 36 patients. *Arch Intern Med* 1982;142(4):771-6.
40. Rezaieyazdi Z, Hesamifard A. Correlation between serum prolactin levels and lupus activity. *Rheumatol Int* 2006;26(11):1036-9.
41. Lahita RG, Bradlow HL, Kunkel HG, Fishman J. Alterations of estrogen metabolism in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1979;22(11):1195-8.
42. Jungers P, Nahoul K, Pelissier C, Dougados M, Tron F, Bach JF. Low plasma androgens in women with active or quiescent systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1982;25(4):454-7.

43. Verthelyi D, Petri M, Ylamus M, Klinman DM. Disassociation of sex hormone levels and cytokine production in SLE patients. *Lupus* 2001;10(5):352-8.
44. Roubinian JR, Talal N, Greenspan JS, Goodman JR, Siiteri PK. Effect of castration and sex hormone treatment on survival, anti-nucleic acid antibodies, and glomerulonephritis in NZB/NZW F1 mice. *J Exp Med* 1978;147(6):1568-83.
45. Duvic M, Steinberg AD, Klassen LW. Effect of the anti-estrogen, Nafoxidine, on NZB/W autoimmune disease. *Arthritis Rheum* 1978;21(4):414-7.
46. Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, et al. Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 2003;17(2):203-8.
47. Liu MM, Albanese C, Anderson CM, et al. Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* 2002;277(27):24353-60.
48. Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 1999;140(12):5566-78.
49. Cohen-Solal JF, Jeganathan V, Grimaldi CM, Peeva E, Diamond B. Sex hormones and SLE: influencing the fate of autoreactive B cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006;305:67-88.
50. Medina KL, Garrett KP, Thompson LF, Rossi MI, Payne KJ, Kincade PW. Identification of very early lymphoid precursors in bone marrow and their regulation by estrogen. *Nat Immunol* 2001;2(8):718-24.
51. Vogl D, Falk W, Dorner M, Scholmerich J, Straub RH. Serum levels of pregnenolone and 17-hydroxypregnenolone in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: relation to other adrenal hormones. *J Rheumatol* 2003;30(2):269-75.
52. Grimaldi CM. Sex and systemic lupus erythematosus: the role of the sex hormones estrogen and prolactin on the regulation of autoreactive B cells. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18(5):456-61.
53. Grimaldi CM, Hill L, Xu X, Peeva E, Diamond B. Hormonal modulation of B cell development and repertoire selection. *Mol Immunol* 2005;42(7):811-20.
54. Saha S, Tieng A, Pepeljugoski KP, Zandamn-Goddard G, Peeva E. Prolactin, Systemic Lupus Erythematosus, and Autoreactive B Cells: Lessons Learnt from Murine Models. *Clin Rev Allergy Immunol* 2009.
55. Matsunaga A, Miller BC, Cottam GL. Dehydroisoandrosterone prevention of autoimmune disease in NZB/W F1 mice: lack of an effect on associated immunological abnormalities. *Biochim Biophys Acta* 1989;992(3):265-71.
56. Hartkamp A, Geenen R, Godaert GL, Bijl M, Bijlsma JW, Derksen RH. Effects of dehydroepiandrosterone on fatigue and well-being in women with quiescent systemic lupus erythematosus. A randomized controlled trial. *Ann Rheum Dis* 2009.
57. Crosbie D, Black C, McIntyre L, Royle PL, Thomas S. Dehydroepiandrosterone for systemic lupus erythematosus. *Cochrane Database Syst Rev* 2007(4):CD005114.
58. Nordmark G, Bengtsson C, Larsson A, Karlsson FA, Sturfelt G, Ronnblom L. Effects of dehydroepiandrosterone supplement on health-related quality of life in glucocorticoid treated female patients with systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity* 2005;38(7):531-40.
59. Lambert NC, Lo YM, Erickson TD, et al. Male microchimerism in healthy women and women with scleroderma: cells or circulating DNA? A quantitative answer. *Blood* 2002;100(8):2845-51.
60. Srivatsa B, Srivatsa S, Johnson KL, Bianchi DW. Maternal cell microchimerism in newborn tissues. *J Pediatr* 2003;142(1):31-5.

61. van Dijk BA, Boomsma DI, de Man AJ. Blood group chimerism in human multiple births is not rare. *Am J Med Genet* 1996;61(3):264-8.
62. Bianchi DW, Zickwolf GK, Weil GJ, Sylvester S, DeMaria MA. Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years postpartum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(2):705-8.
63. Sarkar K, Miller FW. Possible roles and determinants of microchimerism in autoimmune and other disorders. *Autoimmun Rev* 2004;3(6):454-63.
64. Adams KM, Nelson JL. Microchimerism: an investigative frontier in autoimmunity and transplantation. *Jama* 2004;291(9):1127-31.
65. Kremer Hovinga IC, Koopmans M, Baelde HJ, et al. Chimerism occurs twice as often in lupus nephritis as in normal kidneys. *Arthritis Rheum* 2006;54(9):2944-50.
66. Murata H, Nakauchi H, Sumida T. Microchimerism in Japanese women patients with systemic sclerosis. *Lancet* 1999;354(9174):220.
67. Jimenez SA, Artlett CM. Microchimerism and systemic sclerosis. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17(1):86-90.
68. Trowsdale J, Betz AG. Mother's little helpers: mechanisms of maternal-fetal tolerance. *Nat Immunol* 2006;7(3):241-6.
69. Stevens AM, Hermes HM, Rutledge JC, Buyon JP, Nelson JL. Myocardial-tissue-specific phenotype of maternal microchimerism in neonatal lupus congenital heart block. *Lancet* 2003;362(9396):1617-23.
70. Robson MG, Walport MJ. Pathogenesis of systemic lupus erythematosus (SLE). *Clin Exp Allergy* 2001;31(5):678-85.
71. Freni-Titulaer LW, Kelley DB, Grow AG, McKinley TW, Arnett FC, Hochberg MC. Connective tissue disease in southeastern Georgia: a case-control study of etiologic factors. *Am J Epidemiol* 1989;130(2):404-9.
72. Cooper GS, Dooley MA, Treadwell EL, St Clair EW, Gilkeson GS. Smoking and use of hair treatments in relation to risk of developing systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28(12):2653-6.
73. Petri M, Allbritton J. Hair product use in systemic lupus erythematosus. A case-control study. *Arthritis Rheum* 1992;35(6):625-9.
74. Jimenez-Alonso J, Sabio JM, Perez-Alvarez F, Reche I, Hidalgo C, Jaimez L. Hair dye treatment use and clinical course in patients with systemic lupus erythematosus and cutaneous lupus. *Lupus* 2002;11(7):430-4.
75. Wang J, Kay AB, Fletcher J, Formica MK, McAlindon TE. Is lipstick associated with the development of systemic lupus erythematosus (SLE)? *Clin Rheumatol* 2008;27(9):1183-7.
76. Simard JF, Costenbader KH. What can epidemiology tell us about systemic lupus erythematosus? *Int J Clin Pract* 2007;61(7):1170-80.
77. Ahmed SA, Hissong BD, Verthelyi D, Donner K, Becker K, Karpuzoglu-Sahin E. Gender and risk of autoimmune diseases: possible role of estrogenic compounds. *Environ Health Perspect* 1999;107 Suppl 5:681-6.
78. McClain MT, Heinlen LD, Dennis GJ, Roebuck J, Harley JB, James JA. Early events in lupus humoral autoimmunity suggest initiation through molecular mimicry. *Nat Med* 2005;11(1):85-9.
79. Moon UY, Park SJ, Oh ST, et al. Patients with systemic lupus erythematosus have abnormally elevated Epstein-Barr virus load in blood. *Arthritis Res Ther* 2004;6(4):R295-302.
80. Marchini B, Dolcher MP, Sabbatini A, Klein G, Migliorini P. Immune response to different sequences of the EBNA I molecule in Epstein-Barr virus-related disorders and in autoimmune diseases. *J Autoimmun* 1994;7(2):179-91.

81. Sarzi-Puttini P, Atzeni F, Iaccarino L, Doria A. Environment and systemic lupus erythematosus: an overview. *Autoimmunity* 2005;38(7):465-72.
82. Chan OT, Madaio MP, Shlomchik MJ. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* 1999;169:107-21.
83. Yanaba K, Bouaziz JD, Matsushita T, Magro CM, St Clair EW, Tedder TF. B-lymphocyte contributions to human autoimmune disease. *Immunol Rev* 2008;223:284-99.
84. Chan OT, Hannum LG, Haberman AM, Madaio MP, Shlomchik MJ. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* 1999;189(10):1639-48.
85. 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 hyper-responsive to T cell-derived stimuli. *J Immunol* 1997;159(12):5810-20.
86. Reininger L, Winkler TH, Kalberer CP, Jourdan M, Melchers F, Rolink AG. Intrinsic B cell defects in NZB and NZW mice contribute to systemic lupus erythematosus in (NZB x NZW)F1 mice. *J Exp Med* 1996;184(3):853-61.
87. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1997;40(9):1725.
88. Deocharan B, Qing X, Beger E, Putterman C. Antigenic triggers and molecular targets for anti-double-stranded DNA antibodies. *Lupus* 2002;11(12):865-71.
89. Desai DD, Krishnan MR, Swindle JT, Marion TN. Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice. *J Immunol* 1993;151(3):1614-26.
90. Putterman C, Diamond B. Immunization with a peptide surrogate for double-stranded DNA (dsDNA) induces autoantibody production and renal immunoglobulin deposition. *J Exp Med* 1998;188(1):29-38.
91. Kurien BT, Scofield RH. Autoantibody determination in the diagnosis of systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2006;64(3):227-35.
92. von Muhlen CA, Tan EM. Autoantibodies in the diagnosis of systemic rheumatic diseases. *Semin Arthritis Rheum* 1995;24(5):323-58.
93. Yasuma M, Takasaki Y, Matsumoto K, Kodama A, Hashimoto H, Hirose S. Clinical significance of IgG anti-Sm antibodies in patients with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 1990;17(4):469-75.
94. Hoch SO, Eisenberg RA, Sharp GC. Diverse antibody recognition patterns of the multiple Sm-D antigen polypeptides. *Clin Immunol* 1999;92(2):203-8.
95. Riemekasten G, Marell J, Trebeljahr G, et al. A novel epitope on the C-terminus of SmD1 is recognized by the majority of sera from patients with systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 1998;102(4):754-63.
96. Riemekasten G, Kawald A, Weiss C, et al. Strong acceleration of murine lupus by injection of the SmD1(83-119) peptide. *Arthritis Rheum* 2001;44(10):2435-45.
97. Wardemann H, Yurasov S, Schaefer A, Young JW, Meffre E, Nussenzweig MC. Predominant autoantibody production by early human B cell precursors. *Science* 2003;301(5638):1374-7.
98. Mebius RE, Kraal G. Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol* 2005;5(8):606-16.
99. Welsch U. Sobotta - Atlas Histologie: Urban&Fischer Verlag; 2005.
100. van Krieken JH, te Velde J. Normal histology of the human spleen. *Am J Surg Pathol* 1988;12(10):777-85.
101. Allen CD, Okada T, Cyster JG. Germinal-center organization and cellular dynamics. *Immunity* 2007;27(2):190-202.
102. Wilson FJ KM, Gibney JA, Matta S. "Chapter 10. Lymphoid System" *Histology Image Review*.

103. Kumararatne DS, Bazin H, MacLennan IC. Marginal zones: the major B cell compartment of rat spleens. *Eur J Immunol* 1981;11(11):858-64.
104. Oliver AM, Martin F, Kearney JF. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J Immunol* 1999;162(12):7198-207.
105. Gunn KE, Brewer JW. Evidence that marginal zone B cells possess an enhanced secretory apparatus and exhibit superior secretory activity. *J Immunol* 2006;177(6):3791-8.
106. Allman D, Pillai S. Peripheral B cell subsets. *Curr Opin Immunol* 2008;20(2):149-57.
107. Vinuesa CG, Sanz I, Cook MC. Dysregulation of germinal centres in autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9(12):845-57.
108. Grammer AC, Slota R, Fischer R, et al. Abnormal germinal center reactions in systemic lupus erythematosus demonstrated by blockade of CD154-CD40 interactions. *J Clin Invest* 2003;112(10):1506-20.
109. Huang W, Sinha J, Newman J, et al. The effect of anti-CD40 ligand antibody on B cells in human systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1554-62.
110. Drexler SK, Foxwell BM. The role of toll-like receptors in chronic inflammation. *Int J Biochem Cell Biol*;42(4):506-18.
111. Cancro MP, Kearney JF. B cell positive selection: road map to the primary repertoire? *J Immunol* 2004;173(1):15-9.
112. Hardy RR, Hayakawa K, Parks DR, Herzenberg LA. Demonstration of B-cell maturation in X-linked immunodeficient mice by simultaneous three-colour immunofluorescence. *Nature* 1983;306(5940):270-2.
113. Pani G, Siminovitch KA, Paige CJ. The motheaten mutation rescues B cell signaling and development in CD45-deficient mice. *J Exp Med* 1997;186(4):581-8.
114. Samardzic T, Marinkovic D, Danzer CP, Gerlach J, Nitschke L, Wirth T. Reduction of marginal zone B cells in CD22-deficient mice. *Eur J Immunol* 2002;32(2):561-7.
115. Li Y, Li H, Weigert M. Autoreactive B cells in the marginal zone that express dual receptors. *J Exp Med* 2002;195(2):181-8.
116. Pillai S, Cariappa A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat Rev Immunol* 2009;9(11):767-77.
117. Cancro MP. Signalling crosstalk in B cells: managing worth and need. *Nat Rev Immunol* 2009;9(9):657-61.
118. Eisenberg RA, Craven SY, Warren RW, Cohen PL. Stochastic control of anti-Sm autoantibodies in MRL/Mp-lpr/lpr mice. *J Clin Invest* 1987;80(3):691-7.
119. Riemekasten G, Hahn BH. Key autoantigens in SLE. *Rheumatology (Oxford)* 2005;44(8):975-82.
120. Reyes PA, Tan EM. DNA-binding property of Sm nuclear antigen. *J Exp Med* 1977;145(3):749-54.
121. Dempsey LA, Hanakahi LA, Maizels N. A specific isoform of hnRNP D interacts with DNA in the LR1 heterodimer: canonical RNA binding motifs in a sequence-specific duplex DNA binding protein. *J Biol Chem* 1998;273(44):29224-9.
122. Grimaldi CM, Michael DJ, Diamond B. Cutting edge: expansion and activation of a population of autoreactive marginal zone B cells in a model of estrogen-induced lupus. *J Immunol* 2001;167(4):1886-90.
123. Crispin JC, Liossis SN, Kis-Toth K, et al. Pathogenesis of human systemic lupus erythematosus: recent advances. *Trends Mol Med*;16(2):47-57.
124. Wellmann U, Werner A, Winkler TH. Altered selection processes of B lymphocytes in autoimmune NZB/W mice, despite intact central tolerance against DNA. *Eur J Immunol* 2001;31(9):2800-10.

125. Schuster H, Martin T, Marcellin L, Garaud JC, Pasquali JL, Korganow AS. Expansion of marginal zone B cells is not sufficient for the development of renal disease in NZBxNZW F1 mice. *Lupus* 2002;11(5):277-86.
126. Grimaldi CM, Cleary J, Dagtas AS, Moussai D, Diamond B. Estrogen alters thresholds for B cell apoptosis and activation. *J Clin Invest* 2002;109(12):1625-33.
127. Bynoe MS, Grimaldi CM, Diamond B. Estrogen up-regulates Bcl-2 and blocks tolerance induction of naive B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(6):2703-8.
128. Berghofer B, Frommer T, Haley G, Fink L, Bein G, Hackstein H. TLR7 ligands induce higher IFN-alpha production in females. *J Immunol* 2006;177(4):2088-96.
129. Hill L, Jeganathan V, Chinnasamy P, Grimaldi C, Diamond B. Differential roles of estrogen receptors alpha and beta in control of B-cell maturation and selection. *Mol Med*;17(3-4):211-20.
130. Fischer M, Ehlers M. Toll-like receptors in autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 2008;1143:21-34.
131. 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(3):553-61.
132. Anders HJ, Banas B, Linde Y, et al. Bacterial CpG-DNA aggravates immune complex glomerulonephritis: role of TLR9-mediated expression of chemokines and chemokine receptors. *J Am Soc Nephrol* 2003;14(2):317-26.
133. Viglianti GA, Lau CM, Hanley TM, Miko BA, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Activation of autoreactive B cells by CpG dsDNA. *Immunity* 2003;19(6):837-47.
134. Leadbetter EA, Rifkin IR, Hohlbaum AM, Beaudette BC, Shlomchik MJ, Marshak-Rothstein A. Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors. *Nature* 2002;416(6881):603-7.
135. Lau CM, Broughton C, Tabor AS, et al. RNA-associated autoantigens activate B cells by combined B cell antigen receptor/Toll-like receptor 7 engagement. *J Exp Med* 2005;202(9):1171-7.
136. Berland R, Fernandez L, Kari E, et al. Toll-like receptor 7-dependent loss of B cell tolerance in pathogenic autoantibody knockin mice. *Immunity* 2006;25(3):429-40.
137. Barrat FJ, Meeker T, Chan JH, Guiducci C, Coffman RL. Treatment of lupus-prone mice with a dual inhibitor of TLR7 and TLR9 leads to reduction of autoantibody production and amelioration of disease symptoms. *Eur J Immunol* 2007;37(12):3582-6.
138. Santiago-Raber ML, Dunand-Sauthier I, Wu T, et al. Critical role of TLR7 in the acceleration of systemic lupus erythematosus in TLR9-deficient mice. *J Autoimmun*;34(4):339-48.
139. Pernis AB. Estrogen and CD4+ T cells. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19(5):414-20.
140. Rider V, Jones S, Evans M, Bassiri H, Afsar Z, Abdou NI. Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 2001;28(12):2644-9.
141. Kanda N, Tsuchida T, Tamaki K. Estrogen enhancement of anti-double-stranded DNA antibody and immunoglobulin G production in peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 1999;42(2):328-37.
142. Straub RH. The complex role of estrogens in inflammation. *Endocr Rev* 2007;28(5):521-74.
143. McKay LI, Cidlowski JA. Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev* 1999;20(4):435-59.

## 7. Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

AIHA – Autoimmunhämolytische Anämie  
ANA – Antinukleäre Antikörper  
AP – Alkalische Phosphatase  
APC – antigen-presenting cell  
BAFFR – B cell-activating factor receptor  
BCIP – 5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat  
BCR – B cell receptor, B-Zell-Rezeptor  
BSA – Bovines Serumalbumin  
CD – Cluster of Differentiation  
cpm – counts per minute  
CTLA-4 – cytotoxic T lymphocyte antigen-4, Rezeptor der CD28-Familie  
DAPI – 4',6-Diamidino-2'-phenylindol Dihydrochlorid  
DC – dendritic cell, dendritische Zelle  
DNA – deoxyribonucleic acid, Desoxyribonukleinsäure  
dsDNA-IgM-Ak – IgM-Antikörper gegen dsDNA  
dsDNA-IgG-Ak – IgG-Antikörper gegen dsDNA  
dsRNA – single-stranded RNA, Doppelstrang-RNA  
dsDNA – double-stranded DNA, Doppelstrang-DANN  
EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure  
ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, Enzymimmunoassay  
ELISPOT – enzyme-linked immunospot assay  
FACS – fluorescence-activated cell sorter, Durchflusszytometer  
FcR – Fc-Rezeptor  
FCS – Forwards Scatter  
FITC – Fluorescein-5-isothiocyanat  
Foxp3 – forkhead box P3  
HIGM 1 – Hyper-IgM-Syndrom Typ 1  
HsP90 – heat shock protein 90  
IBD – inflammatory bowel disease , Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen  
IPEX-Syndrom – immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked



syndrome

IFN – Interferon

Ig – Immunglobulin

IL – Interleukin

IRF5 – Interferon regulatory factor 5

Ku – Heterodimer aus zwei Polypeptiden, Ku70 und Ku80

MACS – magnetic-activated cell sorter , magnetischer Zellseparator

mAk – monoklonaler Antikörper

MBL – Mannose-binding lectin

MHC – Major Histocompatibility Complex

MRL/lpr – MRL-Mäuse homozygot für die lpr Mutation

MS – Multiple Sklerose

nRNP – nukleäres Ribonukleoprotein

NF- $\kappa$ B – Canonical Nuclear Factor  $\kappa$ B

Notch2 – Neurogenic locus notch homolog protein 2

NZB/W F1 – erste Filialgeneration von New Zealand Black (NZB) und New Zealand  
White (NZW) Mäusen

PAMP – pathogen-associated molecular pattern, Pathogen-assoziiertes Molekul

PBC – Primär Biliäre Sklerose

PBS – phosphate-buffered saline, Phosphat -gepufferte Saline

PCNA – Proliferating Cell Nuclear Anrigen

PD-1 – Programmed Cell Death-1

RA – Rheumatoide Arthritis

RNA – ribonucleic acid, Ribonukleinsäure

RT – Raumtemperatur

SLE – Systemischer Lupus Erythematoses

Sm – Smith-Protein

SmD1 – Teil des Sm-Proteins

SmD1<sub>(83-119)</sub> – Aminosäuren 83-119 des SmD1-Proteins

SmD1<sub>(83-119)</sub> IgM-Ak – IgM-Antikörper gegen SmD1<sub>(83-119)</sub>

SmD1<sub>(83-119)</sub> IgG-Ak – IgG-Antikörper gegen SmD1<sub>(83-119)</sub>

SSc – Systemische Sklerose

ssDNA – single-stranded deoxyribonucleic acid, einzelsträngige DNA

snRNA – small nuclear ribonucleic acid, kleine nukleäre Ribonukleinsäure

t-RNA – Transfer-RNA

SS-A – Sjögren-Syndrom-Antigen A (Ro)

SS-B – Sjögren-Syndrom-Antigen B (La)

SSC – Side Scatter

U1-RNP – U1-Ribonukleoprotein

## **Erklärung**

„Ich, Erwin Grußie, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:  
„Bedeutung von Geschlechtsunterschieden bei der Differenzierung von autoreaktiven  
B-Zellen zu verschiedenen B-Zell-Subtypen“ selbst verfasst und keine anderen als die  
angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die Hilfe Dritter verfasst und auch in  
Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

## **Danksagung**

An erster Stelle geht mein Dank an Prof. Dr. Gabriela Riemekasten für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, vielen Anregungen und Ratschlägen und nicht zuletzt für ihre Geduld.

Zu ganz besonderem Dank bin ich Philipp Enghard verpflichtet, der mir stets tatkräftig zur Seite stand und nicht nur in fachspezifischen Fragen immer ein offenes Ohr hatte. Er brachte mir alles über Laborarbeit bei. Seine wertvollen Ratschläge waren entscheidend für das Gelingen dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an die restliche Arbeitsgruppe, insbesondere an Reinmar und Jens, die mich bei meinen ersten Schritten im Labor begleitet haben.

Großer Dank geht auch den B-Zell-Klub und die Kollegen aus anderen Arbeitsgruppen, insbesondere an Kai und Toralf, die immer einen guten Rat parat hatten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Katharina Raba und Toralf Kaiser für die Assistenz bei der Zellsortierung.

Meine innigste Dankbarkeit gilt meinen Freunden und meiner Frau.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## **Publikationsliste**

Enghard P, **Grussie** E, Rieder C, Burmester GR, Riemekasten G.

Subset size, activation threshold and distribution of autoreactive MZ and FO B cells do not differ in a sex-specific manner in the NZB/W F1 murine lupus model: an experimental mouse study. *Lupus*. 2011 Oct;20(12):1240-9. Epub 2011 Aug 15.

Enghard P, Humrich JY, Chu VT, **Grussie** E, Hiepe F, Burmester GR, Radbruch A, Berek C, Riemekasten G.

Class switching and consecutive loss of dsDNA-reactive B1a B cells from the peritoneal cavity during murine lupus development. *Eur J Immunol*. 2010 Jun;40(6):1809-18.