Aus dem Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ) Institut der Leibniz Gemeinschaft und aus der Medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie und Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

## Einfluss von IL-10 auf den Systemischen Lupus erythematodes am murinen FcyRIIB-Knock-out Modell

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Katja Neumann

aus Berlin

Datum der Promotion: 30.05.2015

## Inhaltsverzeichnis

Abstr	act	5
1.	Einführung	7
1.1. 1.1.1. 1.1.2. 1.1.2. 1.1.2.2 1.1.3.2 1.1.3.2 1.1.3.2 1.1.3.2 1.1.3.2	<ul> <li>Systemischer Lupus erythematodes</li> <li>Kriterien [5]</li> <li>Pathogenese / Ätiologie</li> <li>Assoziierte Gene / genetische Prädisposition</li> <li>Autoantikörper</li> <li>Immunpathologie</li> <li>Gestörte Apoptose</li> <li>Geschlechtshormone</li> <li>Umweltfaktoren</li> <li>Regulatorische T-Zellen und ihre Rolle beim SLE</li> <li>Phänotyp regulatorischer T-Zellen</li> <li>Zellkontaktabhängige Effektormechanismen von Treg</li> <li>Sekretion suppressorischer Zytokine (IL-10) als zellkontaktunabhängig</li> <li>Effektormechanismus von Treg</li> <li>Treg beim SLE</li> <li>Zytokine beim SLE</li> </ul>	7 8 9 10 12 13 14 14 14 14 15 16 18
1.2. 1.2.1. 1.2.2. 1.2.3.	Mausmodelle des SLE NZBxNZW (NZM2410 und NZM2328) MLR/lpr FcγRIIB defiziente Mäuse (RIIB-/-)	24 25 26 27
2.	Eigene Fragestellungen	29
3.	Material und Methoden	31
3.1.	Material	31
3.1.2. 3.1.2. 3.1.2.2 3.1.2.2 3.1.2.2 3.1.2.2 3.1.2.2 3.1.2.2 3.1.2.5 3.1.3. 3.1.4. 3.1.5. 3.1.6.	Pufferlösungen PBS (phosphate buffered saline) PBS/BSA PBS/BSA/Azid FACS-Antikörper und sekundäre Reagenzien PBS/BSA/Azid PBS/BSA/Azid PBS/BSA/Azid PBS/BSA/Azid PBS/BSA/Azid PBS/BSA/Azid PBS/BSA/Azid TAE PBS/BSA/Azid PBS/BS/BSA/Az	31 32 32 32 32 32 32 32 32 32 32 33 33 33
3.1.7. 3.1.8.	Verbrauchsmaterialien Technische Geräte	36 37

3.2.	Methoden	37	
3.2.1.	Versuchstiere	37	
3.2.2.	Genotypisierung	38	
3.2.2.1	I. Isolation der DNS aus den SSBP	38	
3.2.2.2	2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38	
3.2.2.3	3. Gel-Elektrophorese	41	
3.2.3.	Mauskreuzung	42	
3.2.4.	Tierexperimentelle Methoden	43	
3.2.4.1	I. Abbruchkriterien	43	
3.2.4.2	2. Untersuchung auf Proteinurie und Leukozyturie	43	
3.2.4.3	<ol> <li>Blutentnahme zur Auto-Antikörperbestimmung</li> </ol>	43	
3.2.4.4	4. Organpräparation	44	
3.2.4.5	5. Zellzählung	45	
3.2.5.	MACS	46	
3.2.5.1	I. Allgemeines	46	
3.2.5.2	2. CD43-B-Zell-Depletion	46	
3.2.6.	FACS (Fluorescence-activated cell sorter)	48	
3.2.6.1	Allgemeines Prinzip	48	
3.2.6.2	2. Verwendete (Oberflächen-) Rezeptoren	49	
3.2.6.3	3. Unterteilung der verschiedenen FACS-Panel	52	
3.2.6.4	Färbung der intrazellulären Moleküle (FoxP3)	53	
3.2.6.5	5. Stimulation der Zellen zur Zytokinproduktion	54	
3.2.6.6	6. Gating	55	
3.2.7.	Autoantikorper-ELISA	57	
3.2.7.1		5/	
3.2.7.2		59	
3.2.7.3	3. SmD1 <sub>(83-119)</sub> -ELISA	60	
3.2.8.	Statistische Auswertung	61	
٨	Frachrisco	ດວ	
4.		02	
	Na alexa da a sufalenziale de ll. 40 Kasale auto	~~	
4.1.	Nachweis des erfolgreichen IL-TU-Knock-outs	62	
4.2.	Uberlebensstatistik der vier Genotypen	64	
4.3.	Glomerulonephritis	66	
4.3.1	Proteinurie / Leukozyturie	66	
4.3.2.	Histologische Untersuchung der Nieren	68	
4.4.	Milzgröße und Zellzahl	68	
	gg	•••	
45	Weitere Organnathologien	70	
ч.Э.			
1.6 Destimmung der D.Zellzehl in der Milz durch MACC CD40.D			
4.0.			
	Zelldepletion	71	
4.7.	Durchflusszytometrische Analyse der Milzlymphozyten	72	
4.7.1.	Charakterisierung der T-Zellen der Milz	72	
	-		

4.7.1.1	<ol> <li>Durchflusszytometrische Unterscheidung von zytotoxischen T-Zellen un T-Helferzellen</li> </ol>	ıd ′3
4.7.1.2	<ol> <li>Unterscheidung der T-Helferzellen in T-Gedächtnis- und T- Effektorzellen</li> </ol>	'4
4.7.1.3	<ol> <li>Untersuchung des Aktivierungsstatus der CD4+ T-Zellen mithilfe der</li> <li>Oberflöchenmerker CD60 und CD25</li> </ol>	- -
4.7.1.4	4. Regulatorische (FoxP3+) CD4+ T-Zellen	'9
4.7.2.	Unterscheidung der B-Zellen der Milz in nalve B-Zellen und Plasmazellen	31
4.8.	Zytokinproduktion der T-Helferzellen8	2
4.8.1.	Darstellung der Th2-Antwort mithilfe von II-4	3
4.8.3.	Simultane Produktion von IFN-y und IL-10 sowie IL-4 und IL-10	,4 ;5
4.9.	Untersuchung der Mäuse auf SLE-typische Autoantikörper gegen	
	doppelsträngige DNS8	7
5.	Diskussion8	8
5.1.	Bisherige Studienlage zum Einfluss von IL-10 auf den SLE8	8
5.2.	Einfluss der IL-10-Defizienz auf das Überleben FcyRIIB-defiziente	r
	Mäuse8	9
5.3.	Darstellung typischer Manifestationen des SLE in Abhängigkeit vo	n
<b>5</b> 0 4	IL-10	2
5.3.1.	Einfluss von IL-10 auf Proteinurie und Leukozyturie im Fcy-RIIB-K.o Modell	)2
5.3.2.	Autoantikörper im FcγRIIB-K.oModell unter IL-10-Defizienz	)5
5.3.3.	Andere Organbeteiligungen der FcyRilB-defizienten Tiere in	
	Abhangigkeit von IL-10 9	17
5.4.	Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten	97
5.4.	Abhangigkeit von IL-109 Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten Mäuse in Abhängigkeit von IL-109	97 8
5.4. 5.4.1.	Abhangigkeit von IL-10	8 18
5.4. 5.4.1. 5.4.1.1	Abhangigkeit von IL-10	8 8 18
5.4. 5.4.1. 5.4.1.1 5.4.1.2	<ul> <li>Abhangigkeit von IL-10</li> <li>Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten</li> <li>Mäuse in Abhängigkeit von IL-10</li> <li>Einfluss von IL-10 auf das T-Zell-Kompartiment</li> <li>IL-10-Defizienz verursacht keine quantitativen Unterschiede der CD3+</li> <li>zum Todeszeitpunkt im betrachteten RIIB-/- Modell</li> <li>Betrachtung der zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unter Einflus</li> </ul>	17 18 18 18 18 18
5.4. 5.4.1. 5.4.1.1 5.4.1.2 5.4.1.2	<ul> <li>Abhangigkeit von IL-10</li> <li>Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten</li> <li>Mäuse in Abhängigkeit von IL-10</li> <li>Einfluss von IL-10 auf das T-Zell-Kompartiment</li> <li>IL-10-Defizienz verursacht keine quantitativen Unterschiede der CD3+</li> <li>zum Todeszeitpunkt im betrachteten RIIB-/- Modell</li> <li>Betrachtung der zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unter Einflus</li> <li>von IL-10-Defizienz</li> <li>Einfluss von IL-10 im RIIB-/- Modell auf den Aktivierungsstatus (CD69+)</li> </ul>	17 18 18 18 18 18 18 19
5.4. 5.4.1. 5.4.1.1 5.4.1.2 5.4.1.2	<ul> <li>Abhangigkeit von IL-10</li> <li>Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten</li> <li>Mäuse in Abhängigkeit von IL-10</li> <li>Einfluss von IL-10 auf das T-Zell-Kompartiment</li> <li>IL-10-Defizienz verursacht keine quantitativen Unterschiede der CD3+</li> <li>zum Todeszeitpunkt im betrachteten RIIB-/- Modell</li> <li>Betrachtung der zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unter Einflus</li> <li>von IL-10-Defizienz</li> <li>Einfluss von IL-10 im RIIB-/- Modell auf den Aktivierungsstatus (CD69+)</li> <li>der CD4+T-Zellen</li> </ul>	17 18 18 18 18 18 19 10
5.4. 5.4.1. 5.4.1.1 5.4.1.2 5.4.1.2 5.4.1.2	<ul> <li>Abhangigkeit von IL-10</li> <li>Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten</li> <li>Mäuse in Abhängigkeit von IL-10</li> <li>Einfluss von IL-10 auf das T-Zell-Kompartiment</li> <li>IL-10-Defizienz verursacht keine quantitativen Unterschiede der CD3+</li> <li>zum Todeszeitpunkt im betrachteten RIIB-/- Modell</li> <li>Betrachtung der zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unter Einflus</li> <li>von IL-10-Defizienz</li> <li>Einfluss von IL-10 im RIIB-/- Modell auf den Aktivierungsstatus (CD69+)</li> <li>der CD4+T-Zellen</li> <li>Betrachtung der T-Gedächtniszellen im RIIB-/- Modell in Abhängigkeit</li> <li>von IL-10</li> </ul>	17 18 18 18 18 18 19 10 12
5.4. 5.4.1. 5.4.1.1 5.4.1.2 5.4.1.2 5.4.1.2 5.4.1.2	<ul> <li>Abhangigkeit von IL-10</li> <li>Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten</li> <li>Mäuse in Abhängigkeit von IL-10</li> <li>Einfluss von IL-10 auf das T-Zell-Kompartiment</li> <li>IL-10-Defizienz verursacht keine quantitativen Unterschiede der CD3+</li> <li>zum Todeszeitpunkt im betrachteten RIIB-/- Modell</li> <li>Betrachtung der zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unter Einflus</li> <li>von IL-10-Defizienz</li> <li>Einfluss von IL-10 im RIIB-/- Modell auf den Aktivierungsstatus (CD69+)</li> <li>der CD4+T-Zellen</li> <li>Betrachtung der T-Gedächtniszellen im RIIB-/- Modell in Abhängigkeit</li> <li>von IL-10</li> <li>Veränderungen der regulatorischen T-Zellen unter Einfluss von IL-10-</li> </ul>	8 8 8 8 9 ) 10 12 14

5.5.	Zytokinsynthese unter IL-10-Defizienz	.107
5.6.	IL-10-defiziente C57/BL6J – ein neues SLE-Modell?	.109
6.	Zusammenfassung	.111
7.	Literaturverzeichnis	.113
8.	Anhang	.121

## Abstract

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IL-10 auf den systemischen Lupus erythematodes erstmals am murinen FcγRIIB-K.o.-Modell untersucht. Dazu wurden die Versuchsgruppen RIIB-/-IL-10-/- (IL-10 defiziente RIIB-k.o. Mäuse), RIIB-/-IL-10+/- (RIIB-k.o. Mäuse mit heterozygotem IL-10 Defekt) und RIIB-/-IL-10+/+ (RIIB-k.o. Mäuse mit intaktem IL-10-Gen) einander gegenübergestellt.

Es zeigte sich ein verlängertes medianes Überleben der RIIB-/-IL-10-/- im Vergleich zu den Gruppen (RIIB-/-IL-10+/+ und RIIB-/-IL-10+/-). IL-10-kompetenten Allerdings waren die Parameter Splenomegalie, Proteinurie, Leukozyturie, anti-ds-DNS-Ak zum Zeitpunkt des Todes bei den IL-10-defizienten FcyRIIB-/- Mäusen im Vergleich IL-10-kompetenten zu den Populationen erhöht. Auch zeigten die RIIB-/-IL-10-/- Tiere im Vergleich zu den RIIB-/-IL-10+/- und RIIB-/-IL-10+/- verstärkte T-Zellaktivierung (CD4+CD69+), eine Tendenz zu verstärkter Th1-Antwort (IFN-y-Produktion) und hatten verminderte Fraktionen an regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+FoxP3+). Möglicherweise wirkt das komplexe Zytokin zu verschiedenen Phasen der Erkrankung konträr. Daher scheinen sowohl die Gabe von IL-10 in frühen Phasen der Erkrankung als auch die Gabe von anti-IL-10-Ak im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf mögliche Therapieoptionen zu sein, die es lohnt weiter zu evaluieren.

Zur Beurteilung der Auswirkungen des IL-10-Defektes auf "gesunde" Tiere des gleichen Inzuchtstammes (C57/BL6J) wurden auch IL-10-/- Mäuse ohne FcγRIIB-Knock-out analysiert. Interessanterweise entwickelten die Tiere ebenfalls ein SLE-ähnliches Krankheitsbild. Neben einer erhöhten Mortalität in diesem Stamm ließen sich auch unabhängig vom FcγRIIB-Knock-out erstmals Proteinurie / Leukozyturie und zelluläre Infiltrate in den Nieren der IL-10-/- nachweisen, die in der Literatur für IL-10-K.o.-Mäuse bisher nicht beschrieben wurden. In previous studies there is contradictory evidence whether IL-10 influences the complex pathogenesis of SLE positively or negatively. It seems to be crucial which model (MRL-lpr vs. NZBxNZW) is chosen. We investigated the role of IL-10 deficiency in the pathogenesis of SLE in the murine FcγRIIB-knock-out model. FcγRIIB-deficient mice develop a disease which is very similar to human SLE. We compared RIIB-/-IL-10-/- to RIIB-/-IL-10+/+ and FcγRIIB deficient mice with a heterozygous defect of IL-10 (RIIB-/-IL-10+/-). We investigated a higher mortality of the RIIB-/-IL-10+/+ (241 days) compared to the RIIB-/-IL-10-/- (431 days).

Accordingly IL-10 could act as a pathogenicity factor in this murine model of SLE. However, typical parameters of SLE (i.e. splenomegaly, proteinuria, leukocyturia, anti-nuclear antibodies) were elevated in the IL-10 deficient mice compared to the groups RIIB-/-IL-10+/+ and RIIB-/-IL-10+/-. T cells of IL-10 deficient Fc $\gamma$ RIIB-k.o. mice showed an activated phenotype (CD4+CD69+), tended to an increased th1 response (IFN- $\gamma$  production) and reduced fractions of CD4+CD25+FoxP3+ (natural tregs). It might be argued whether IL-10 as a pluripotent cytokine might act contradictory in different stages of this autoimmune disease. Consistently the immune regulatory activity could dominate in the early phase of disease while in terminal stage of SLE reactive excessive increased secretion of IL-10 could lead to activation of plasma cells, accumulation of immune complexes and destruction of organs and tissues.

Thus, both, the application of r-IL-10 in the initial phase of SLE and anti-IL-10 antibodies in advanced stages of disease could be therapeutic options which should be further elucidated.

As we were interested in the effect of IL-10 deficiency in "healthy" mice of the same inbred strain (C57/BL6J) we analyzed IL-10-/- mice without FcγRIIB-knock-out. Surprisingly these IL-10-/- mice developed a disease syndrome similar to SLE. Not only an increased mortality (380 days median survival of the IL-10-/- mice) compared to the C57/BL6J strain (about 800 days) but also proteinuria, leukocyturia and glomerular infiltrates were observed for the first time in IL-10-/- mice independently of FcγRIIB-knock-out. Thus, this study arises the question whether IL-10 deficient mice are suitable as a novel model of murine SLE which may serve as a starting-point for further research.

# 1. Einführung

# 1.1. Systemischer Lupus erythematodes

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine rheumatologische Erkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Sie ist durch einen schubartigen Verlauf mit multiplen Symptomen wie Fieber, Abgeschlagenheit, Arthralgien, Organmanifestationen, insbesondere in Form von Glomerulonephritis, aber auch durch Beteiligung von Herz, ZNS, Haut und Lunge gekennzeichnet.

Die Erkrankung betrifft beide Geschlechter, besonders häufig sind jedoch Frauen im gebärfähigen Alter betroffen (90% der Erkrankten sind weiblich).

Die Inzidenzrate schwankt weltweit und wird zwischen 1-10 Neuerkrankungen im Jahr /100000 angegeben. Die Prävalenzrate liegt zwischen 20-50 / 100000 und hat sich in den letzten 50 Jahren nahezu verzehnfacht [1-3]. Es gibt große ethnische Unterschiede, so ist beispielsweise bei Frauen afroamerikanischen Hintergrundes die Prävalenz zehnfach höher als in der kaukasischen Bevölkerung [4].

## 1.1.1. Kriterien [5]

Die vom American College of Rheumatology 1997 letztmalig aktualisierten Kriterien für den systemischen Lupus erythematodes erlauben die Diagnose eines SLE bei Zutreffen von mindestens 4 Kriterien. Diese sind:

ACR Kriterien zur Diagnosestellung des SLE

- 1. Schmetterlingserythem (Malar Rash)
- 2. Diskoider Lupus
- 3. Photosensibilität
- 4. Auftreten von oronasalen Ulzerationen
- 5. Nichterosive Arthritis (mind. 2 betroffene Gelenke
- 6. Serositis (i.e. Pleuritis oder Perikarditis)
- 7. **Renale Funktionsstörung** (persistierende Proteinurie (>0,5g/Tag oder zelluläre Bestandteile im Urin / Zylindurie)
- 8. **Neurologische Störungen** (insbesondere epileptische Krampfanfälle oder Psychosen in Abwesenheit von Drogen / metabolischen Entgleisungen)
- 9. **Hämatologische Störungen** (hämolytische Anämie, Leukopenie (<4000 Leukozyten/ml), Lymphopenie (<2000 Lymphozyten/ml), Thrombozytopenie (<100.000 Thrombozyten/ml) jeweils an mind. 2 Untersuchungstagen)
- 10. **Immunologische Pathologien** (anti-DNA-, anti-Sm-, anti-Phospholipid-Antikörper)
- 11. Antinukleäre Antikörper (ANA)

## 1.1.2. Pathogenese / Ätiologie

Die Ursachen des SLE sind ebenso wie das klinische Bild der Erkrankung sehr komplex. Etliche prädisponierende Faktoren sind bekannt, die für sich allein genommen keine Erkrankung auslösen, erst ihre Summation bricht die Schwelle der Immuntoleranz und führt zum Vollbild des SLE. Abbildung 1(modifiziert nach Mok et al. [6]) fasst die verschiedenen Einflussfaktoren des SLE zusammen, die im Folgenden erklärt werden.



Abbildung 1:Pathogenese des SLE (modifiziert nach Mok et al.)

## 1.1.2.1. Assoziierte Gene / genetische Prädisposition

Hinweise, dass Erbfaktoren einen Einfluss haben, liefern Studien an eineiigen Zwillingen, die eine Konkordanz des SLE von 24% haben, während die von zweieiigen Zwillingen nur bei 2% liegt [7]. Allerdings zeigt die doch relativ geringe Übereinstimmungsrate von 24%, dass weitere Faktoren, i.e. Umwelteinflüsse, neben der genetischen Prädisposition eine erhebliche Rolle für den tatsächlichen Ausbruch der Krankheit spielen. Bereits in den 90er Jahren wurden Zusammenhänge zwischen bestimmten HLA-Typen und Autoimmunerkrankungen postuliert. Dabei scheinen besonders die Varianten HLA-A1, -DR3 und –B8 prädisponierend für die Ausprägung einer Autoimmunerkrankung [8]. Weitere Analysen identifizierten prädisponierende Mutationen in Genabschnitten, die für immunologische Funktionen codieren, i.e. in Komplementfaktoren, FcγR, IL-10, Fas/FasL und Mannose-bindendem-Lektin (MBL) [9]. Diese Mutationen können zu Störungen in der Antigenerkennung, Opsonierung, Apoptose und in der Beseitigung von Immunkomplexen führen.

Während die Genese des SLE meistens polygen und durch zusätzliche Umweltfaktoren bedingt ist, gibt es einige seltene Formen, bei denen der Ausbruch der Krankheit auf monogene Veränderungen zurückgeführt werden kann. So scheinen insbesondere Veränderungen im Gen für den Komplementfaktor C1q direkt mit einer ausgesprochen schweren Form des SLE assoziiert zu sein [10].

#### 1.1.2.2. Autoantikörper

Der Nachweis von Autoantikörpern, insbesondere von ANA (antinukleären Antikörpern) ist ein wesentliches diagnostisches Kriterium des SLE [5]. Sie sind bei mehr als 90% der Patienten im Serum nachzuweisen. ANA sind gegen Zellkernbestandteile wie Histone, Chromatin oder Nucleosomen gerichtet. Noch spezifischer für den SLE sind Antikörper gegen doppelsträngige DNA und anti-Sm-Ak, die gegen das Sm-Ribonukleopeptid gerichtet sind [11].

Ferner werden bei SLE-Patienten weitere Antikörper wie Anti-Phospholipid-Ak, Anti-Neuronale-Ak, Anti-Ro-Ak, Antikörper gegen hämatologische Zellen (Anti-Erythrozyten, Anti-Lymphozyten, Anti-Thrombozyten-Ak) nachgewiesen.

Neben ihrer pathogenen Rolle bei der Ausbildung von Entzündungsreaktionen und Immunkomplexen, können sie auch gewebsspezifisch schädigen. Beispielsweise werden Anti-Neuronale-Ak mit der Entstehung von Psychosen und Anti-Ro-Ak mit Hautläsionen und kardialen Manifestationen (insbesondere Störungen des Reizleitungssystems [12]) des SLE in Zusammenhang gebracht. Nicht alle Auto-Ak sind direkt pathogen. So gelten antinukleäre Antikörper zwar als nephritogen, jedoch gibt es auch Patienten, die trotz hoher ANA keine oder nur eine sehr geringe Glomerulonephritis ausbilden [13, 14]. Wie bei den anderen Pathogenitätsfaktoren ist auch hier davon auszugehen, dass erst die Summation mehrerer begünstigender Faktoren den SLE auslöst.

## 1.1.2.3. Immunpathologie

wesentlichen pathologischen Erscheinungen des SLE Die sind abnorme Entzündungsreaktionen und Blutgefäßveränderungen durch bandförmige oder okklusive Vaskulopathien, Immunkomplexablagerungen und Vaskulitis. Am besten sind diese Erscheinungen am Beispiel der Lupusnephritis untersucht worden. Die Nieren der erkrankten Patienten zeigen Entzündungsreaktionen, vermehrte Proliferation der Mesangiumzellen, Zerstörung der Basalmembran und Ablagerung von Immunkomplexen (aus Immunglobulinen oder Komplementfaktoren). Ähnliche pathologische Erscheinungen treten auch in anderen Organen (z.B. Mikroinfarkte im ZNS) auf.

#### Gestörte Immunantwort und Immunregulation

Beim SLE zeigen sich zahlreiche Dysbalancen und Fehlregulationen des Immunsystems, diese betreffen v.a. die Lymphozyten und Monozyten. Es entsteht ein Teufelskreis aus verstärkter B-Zellaktivierung, vermehrter (Auto-) Antikörperproduktion (Hypergammaglobulinämie) und Ablagerung von Immunkomplexen. Diese B-Zellanomalien werden durch verstärkte Th-Aktivität erst ermöglicht [6].

Zusammengefasst finden sich beim SLE folgende Immunpathologien:

1. B-Zellen

Die Anzahl der Ig-produzierenden B-Zellen im Blut von SLE-Patienten ist erhöht. Sie zeigen eine verstärkte Aktivierung, i.e. ist die zytoplasmatische Ca-Konzentration nach Stimulation über den BCR im Vergleich zu gesunden Probanden bei SLE-Patienten erhöht [15]. Die B-Zellen scheinen empfänglicher für die Stimulation durch Zytokine wie IL-6 [16] und IL-10 (siehe 1.1.4). Ferner kommt es zur "Epitoperweiterung" (epitope spreading), d.h. eine ursprünglich gegen ein bestimmtes Epitop eines komplexen Moleküls gerichtete Immunantwort wird im Laufe der Antigenprozessierung durch die B-Zellen auf weitere Bestandteile dieses Moleküls ausgeweitet, wodurch die Immunantwort forciert wird [17]. Die B-Zellen von SLE-Patienten sind also deutlich reaktionsfreudiger auf Stimulation mit polyklonalen Ag und Zytokinen.

2. T-Zellen

Dass T-Zellen eine wesentliche Rolle beim SLE spielen, wurde u.a. dadurch gezeigt, dass thymektomierte MRL<sup>Ipr</sup>-Mäuse eine verminderte Lymphoproliferation, Auto-Ak-Konzentrationen, bessere Nierenfunktion und längere Überlebenszeit haben. Thymektomie führt zur Eliminierung der Untergruppe von Th, die in den lymphoproliferativen Prozess involviert sind und auf Alloantigene reagieren [18].

Mihara et al. [19] zeigten an thymusaplastischen (Nacktmäusen) und "normalen" NZBxNZW-Mäusen, dass zwar alle Tiere B-Zellhyperreagibilität (unabhängig von T-Zellen) zeigten, die Manifestation des SLE in Form der Glomerulonephritis jedoch nur bei Mäusen mit Thymozyten auftrat. Die T-Zellen sind also der determinierende Faktor für die Krankheitsmanifestation des SLE.

T-Lymphozyten von SLE-Patienten sind hyperaktiviert, d.h. sie exprimieren Aktivierungsmarker wie CD69 in stärkerem Maße und haben einen höheren intrazellulären pH-Wert [20]. Auch die Zahl aktivierter T-Zellen im Blut von SLE-Patienten ist gegenüber gesunden Individuen erhöht. Das weist auf chronische Immunaktivierung dieser Patienten hin [6]. Weitere Pathologien der T-Zellen sind eine verminderte IL-2-Produktion nach Stimulation [21] und eine Polarisierung der T-Zellfunktion in Richtung der Unterstützung der B-Zellreifung und Ig-Produktion [6].

3. Gestörte Funktion der Phagozyten

Sowohl die Phagozytose von apoptotischen Zellen [22] als auch von Immunkomplexen ist bei SLE-Patienten vermindert. Das ist u.a. durch Anomalien der Fcγ-Rezeptoren und Komplementfaktoren (i.e. CR1) der Phagozyten [6, 23] bedingt. So zirkulieren die apoptotischen Zellen lange im Blut und können als Immunogen für autoreaktive Lymphozyten dienen und zur Immunkomplexbildung beitragen.

#### 4. Defekte der Komplementfaktoren

Sowohl qualitative als auch quantitative Defekte der frühen Proteine der Komplementkaskade (C1q, C2, C4), Fcγ und deren Rezeptoren [10] führen zu verminderter Clearance von Immunkomplexen / apoptotischem Material.

- 5. Verminderte Aktivität von Suppressorzellen (i.e. Treg siehe 1.1.3)
- 6. Veränderte Zytokinproduktion (siehe 1.1.4)

#### 1.1.2.4. Gestörte Apoptose

Ursprünglich wurde davon ausgegangen, dass "zu wenig" Apoptose eine Ursache des SLE sein könnte. Das wurde auf Beobachtungen im MRL/lpr- und gld-Maus-Modell zurückgeführt. Die Tiere haben einen Defekt im Fas / Fas-Ligand, die die Apoptose vermitteln. Durch diesen Defekt kommt es zu einer verminderten Eliminierung autoreaktiver Zellen und zur Entwicklung eines SLE-ähnlichen Krankheitsbildes mit massiver Lymphoproliferation und Glomerulonephritis [24, 25]. Dieses Modell lässt sich allerdings schlecht auf SLE-Patienten übertragen. Einerseits zeigen diese eher eine Lymphopenie als eine Lymphoproliferation, zweitens ist die Vergleich zu Gesunden deutlich Apoptoserate im gesteigert [26]. Es scheint also beim SLE eher ein Übermaß als ein Mangel an Apoptose vorzuliegen.

Durch die stark gesteigerte Apoptoserate erscheint es auch leichter für körpereigene, intrazelluläre Antigene durch das "Netz der Selbsttoleranz hindurchschlüpfen" und als "Fremd"-Antigene erkannt zu werden. Ferner ist, wie bereits erwähnt, die Clearance des apoptotischen Materials gestört [22]. Die Zelltrümmer verweilen also und können als Ag für autoreaktive Lymphozyten dienen. Dies geschieht nicht nur im Blut, sondern auch in den Lymphfollikeln, sodass dort autoreaktive Thymozyten ausgebildet werden.

Im Verlauf der Apoptose werden intrazelluläre Antigene (DNA, Histone, Nukleosomen) im Zusammenhang mit Proteinkomplexen frei. Dadurch können autoreaktive B-Zellen Unterstützung von Th bekommen. Normalerweise erkennen T-Zellen nur auf MHC-Molekülen präsentierte Peptide, also keine DNA. Präsentiert die B-Zelle jedoch den gesamten Nucleosomen-Komplex, kann die T-Zelle dessen Peptidanteil erkennen und stimulierende Zytokine zur weiteren Ak-Produktion durch die B-Zelle sezernieren [27]. Durch die Autoantikörper kommt es zu einer

Modifikation der Apoptose: Nehmen Phagozyten apoptotisches Material normalerweise in einem nicht entzündlichen Zusammenhang auf, erfolgt keine Costimulation, sondern es werden antientzündliche Zytokine sezerniert und die Sekretion von Entzündungsstimuli verhindert, d.h. Teile der phagozytierten Proteine werden zwar präsentiert, aber eine Immunantwort gleichzeitig unterdrückt [28]. Phagozytieren Makrophagen allerdings apoptotisches Material, das mit (Auto-) ist (i.e. DNA, Nukleosomen), Antikörpern opsoniert gegen liegt ein proinflammatorisches Szenario vor; es erfolgt eine Costimulation und die Immunantwort auf die präsentierten Ag beginnt.

Zusammengefasst fördert das gestörte Gleichgewicht zwischen Clearance und Apoptose die Entwicklung des SLE.

## 1.1.2.5. Geschlechtshormone

Wie die bevorzugte Erkrankung von Frauen bereits vermuten lässt, scheinen auch Sexualhormone, insbesondere Östrogene, einen Einfluss auf die komplexe Erkrankung zu nehmen. So wurden bei Erkrankten erhöhte Spiegel von 16α-Hydroxyöstrogen gemessen, während die Androgenspiegel vermindert waren [29]. Erhöhte Östrogenkonzentration kann zu vermehrter B-Zell-Proliferation und Ak-Produktion führen. Ferner wird die IL-2-Produktion von T-Zellen durch hohe Östrogenspiegel verhindert. Diese Effekte treten nur bei SLE-Patienten auf und scheinen auf eine erhöhte Empfindlichkeit von SLE-T-Zellen für Östrogene hinzuweisen. Östrogene sind wahrscheinlich in der Lage den SLE zu verschlechtern, indem sie das Überleben von autoaggressiven Zellen verlängern und die Th2-Antwort stimulieren, die durch B-Zell-Stimulation wiederum zu vermehrter (Auto-) Ak-Produktion [6, 29] führt.

## 1.1.2.6. Umweltfaktoren

Neben den erwähnten prädisponierenden Faktoren können auch chemische und physikalische Einflüsse wie UV-Licht, Rauchen, Medikamente / Drogen (i.e. Hydralazin, Chlorpromazin, Isoniazid, Phenytoin) und Tabakrauch den SLE über Begünstigung von inflammatorischen Antworten und Apoptose fördern. Auch bestimmte mikrobielle Erreger können über molekulares Mimikry die Entstehung von Autoantikörpern auslösen [6].

## 1.1.3. Regulatorische T-Zellen und ihre Rolle beim SLE

## 1.1.3.1. Phänotyp regulatorischer T-Zellen

Regulatorische T-Zellen wurden zunächst als CD4+CD25+ Zellen beschrieben. Da CD25 auch von aktivierten T-Zellen (in der frühen Aktivierungsphase, nach 1-2 Tagen) exprimiert wird, ist es nur ungenügend geeignet, CD4+CD25+Treg von aktivierten CD4+ T-Zellen zu unterscheiden.

Eine genauere Unterscheidung wurde durch das Protein FoxP3, das Sakaguchi et al. [30] als entscheidenden Transkriptionsfaktor regulatorischer T-Zellen entdeckten, möglich. Natürliche regulatorische T-Zellen haben demnach den Phänotyp CD4+CD25+FoxP3+. Sie bilden einen Anteil von 5-10% der CD4+ T-Zellen in der Peripherie. Natürliche Treg sind enorm wichtig für die Regulation der Immunantwort und um Autoimmunität zu verhindern. In ihrer Abwesenheit entstehen sowohl im murinen wie auch im humanen Modell schwere Autoimmunerkrankungen [31]. Neben den natürlichen Treg gibt es auch sogenannte adaptive oder induzierte Treg. Es handelt sich dabei um regulatorische Zellen, die sich in der Peripherie aus naiven T-Zellen entwickeln. Zu ihnen gehören beispielsweise die Tr1 und Th3-Zellen, die die regulatorischen Zytokine IL-10 sowie TGF-ß sezernieren. Es wird angenommen, dass diese Zellen, im Gegensatz zu den natürlichen Treg, eher verschiedene Differenzierungsstufen von T-Zellen als eine eigenständige Zellpopulation darstellen [32]. Werden CD4+CD25–FoxP3– Zellen mit TGF-β stimuliert, beginnen sie, FoxP3 zu exprimieren und sezernieren TGF-β, werden also zu adaptiven Treg (CD4+CD25-FoxP3+) [32]. T<sub>r1</sub> Zellen produzieren nach Aktivierung große Mengen an IL-10 und wenig TGF<sup>β</sup>, wohingegen Th3 Zellen vor allem TGF<sup>β</sup> sezernieren. Im Gegensatz zu CD4+CD25+ Treg, bei denen die Suppression zumindest in vitro kontaktabhängig zu sein scheint, funktionieren die Tr1 und Th3 kontaktunabhängig über Sekretion der oben genannten suppressorischen Zytokine.

# 1.1.3.2. Zellkontaktabhängige Effektormechanismen von Treg

Verschiedene suppressorische Mechanismen, über die Treg das Immunsystem regulieren, werden beschrieben [33]. Sie können zellkontaktabhängig durch Granzym- oder Perforin-gesteuerte Mechanismen ihre Zielzellen zerstören. Auch

hemmen sie das T-Zell-Wachstum, indem sie in den T-Zellen cAMP hochregulieren, das die Sekretion des Wachstumsfaktors IL-2 hemmt [33]. Weiterhin können Treg durch Expression von CTLA-4 regulatorisch auf APC einwirken. CTLA-4 bindet mit größerer Affinität CD80/CD86 als CD28. Damit entfällt das costimulatorische Signal für die T-Zellen [33]. Auch können Treg die Expression des Enzyms IDO auf DC stimulieren. IDO setzt die essentielle Aminosäure Tryptophan in Kynurenin um, das toxisch für die umgebenden T-Zellen ist [33]. Treg exprimieren CD25, das IL-2 mit hoher Affinität bindet. IL-2 ist ein wichtiger Überlebensfaktor für Treg. Da T-Zellen IL-2 zur Proliferation benötigen, hemmen Treg also auch über den Konsum von IL-2 das T-Zellwachstum [33].

# 1.1.3.3. Sekretion suppressorischer Zytokine (IL-10) als zellkontaktunabhängiger Effektormechanismus von Treg

Treg können auch zellkontaktunabhängig über Sekretion regulatorischer Zytokine wie TGF-β und IL-10 suppressorisch wirken. IL-10 und TGF-β wurden lange als zentrale Mechanismen der Treg-vermittelten Immunsuppression diskutiert. Dabei waren die Studienergebnisse sehr verschieden, je nachdem, ob die Suppression *in vitro* oder *in vivo* betrachtet wurde.

IL-10 scheint in vitro nicht determinierend für die Suppression, vielmehr erscheinen Effektormechanismen vitro kontaktabhängige in wesentlich [34]. In vivo ist IL-10 dagegen entscheidend. Die Proliferation und suppressorische Kapazität der Treg wird durch Gabe von anti-IL-10-Ak massiv eingeschränkt [35]. Auch die Prädisposition IL-10-defizienter Mäuse für entzündliche Darmerkrankungen [36] unterstreicht die wesentliche Rolle von IL-10 für die Immunhomöostase. IL-10 hemmt die Zytokinsynthese von IFN-y , IL-12 und TNF [37]. Damit wird der Spiegel dieser proinflammatorischen Zytokine gesenkt und deren hemmende Wirkung auf TGF-B vermindert. Somit wird das Zytokinmilieu zugunsten der suppressiven Zytokine verschoben [34]. Möglicherweise kann IL-10 die T-Zell-Aktivierung auch indirekt hemmen, indem es auf IL-10-sensitiven APC die zur T-Zell-Aktivierung nötige Ag-Präsentation hemmt [38].

#### 1.1.3.4. Treg beim SLE

Beim SLE sind funktionelle und quantitative Anomalien der Treg augenscheinlich. Es wird über eine Reduktion der Treg bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, sowohl im humanen [39-41] wie auch im murinen SLE-Modell [42], berichtet. Diese kommt einer Imbalance der Initiatoren und Regulatoren der Immunantwort gleich. Bonelli et al. [43] zeigten, dass in SLE-Patienten reduzierte Fraktionen von CD4+CD25+ T-Zellen vorlagen. Die vorhandenen Treg der SLE-Patienten haben oft funktionale Abnormitäten. So wird häufiger als bei gesunden Individuen ein aktivierter Phänotyp der Treg (CD25+CD69+) nachgewiesen, wohingegen dieser aktivierte Zelltyp bei gesunden Probanden nahezu nicht auftritt. Je ausgeprägter diese Veränderungen der Treg waren, desto ausgeprägter war auch die Aktivität des SLE bei den untersuchten Patienten [43].

Auch werden in einigen Studien vermehrt CD4+CD25-FoxP3+ bei SLE-erkrankten Patienten beschrieben [44]. Neben dem oben beschriebenen Differenzierungsstatus adaptiver Treg, die nach TGFβ- Stimulation FoxP3 auf ihrer Oberfläche exprimieren, könnten diese Zellen auch "atypische" natürliche Treg [45] oder "aktivierte Non-Treg" [46] repräsentieren.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass Störungen des Gleichgewichts zwischen Effektor-T-Zellen und Treg wesentlich in der Genese des SLE sind [47]. So führte die Depletion von CD25+Treg zu einer deutlichen Zunahme von SmD1(83-119)spezifischen autoreaktiven CD4+T-Zellen und einer Verschlechterung des SLE (gemessen anhand des SLEDA-Index)).

Ferner wurde gezeigt, dass das konventionelle zytostatische Behandlungsregime des SLE nicht nur mit einer deutlichen Reduktion der Effektor-T-Zellen, sondern auch mit einer Verminderung der Treg einhergeht [48]. Entsprechend führte ein adoptiver Transfer von Treg in NZBxNZW-Mäuse nach Behandlung des SLE mit CTX zu einer signifikanten Verlängerung des Überlebens der Tiere im Vergleich zu den Mäusen, die nur mit CTX behandelt wurden [48]. Offensichtlich konnte das Defizit an Treg, das der zytostatischen Therapie geschuldet war, zumindest zeitweilig durch Transfer von Treg ausgeglichen werden.

Des Weiteren scheint ein qualitativer Defekt der Treg beim aktiven SLE wesentlich.

So zeigen Treg von Patienten mit aktivem SLE eine verminderte Fähigkeit die Proliferation und Zytokinsekretion von CD4+ Effektor-T-Zellen zu supprimieren und exprimieren weniger FoxP3 [49]. Die verminderte Funktion dieser Treg scheint allerdings reversibel zu sein. Denn nach in vitro-Stimulation mit anti-CD3 und IL-2 entspricht ihre suppressorische Kapazität nahezu wieder der von gesunden Kontrollpersonen [49]. Das legt den Schluss nahe, dass nicht die Treg an sich, sondern vielmehr die veränderten Umgebungsbedingungen beim aktiven SLE für die Funktionsstörungen der Treg verantwortlich sind. Insbesondere dem Zytokin IL-2 scheint hier eine wesentliche Funktion zuzukommen. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass im NZBxNZW-Modell des SLE eine Störung der Homöostase zwischen Effektor-T-Zellen und Treg auf der Grundlage einer verminderten IL-2-Sekretion besteht [50]. Bei Neutralisation von IL-2 entsteht eine Imbalance von Treg und Effektor-T-Zellen und der SLE wird in jungen NZBxNZW-Mäusen initiiert. Bei Gabe von r-IL-2 kann in Tieren mit aktivem SLE die Balance zwischen Treg und Effektor-T-Zellen zumindest teilweise wiederhergestellt und die Krankheitsprogression des SLE verzögert werden [50]. So scheint die beschriebene Funktionsstörung der Treg sekundär, reversibel. einem Mangel IL-2 geschuldet und an

## 1.1.4. Zytokine beim SLE

#### IL-10

IL-10 ist ein Zytokin mit einer Schlüsselrolle, das von nahezu allen Leukozyten synthetisiert werden kann und eine immunregulatorische Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem bildet. Die Hauptproduzenten von IL-10 sind *in vivo* T-Helferzellen, Monozyten, Makrophagen und dendritische Zellen. Allerdings können unter entsprechenden Umgebungsbedingungen auch andere Zellen wie B-Lymphozyten, zytotoxische T-Zellen, NK-Zellen, Mastzellen und Granulozyten IL-10 synthetisieren. Genauso verhält es sich mit nichtimmunologischen Zellen wie Keratinozyten und Epithelzellen, die das Zytokin als Antwort auf Infektionen oder Gewebsschädigung herstellen [51].



Abbildung 2: Der IL-10-Rezeptor und seine Signalkaskade

Der IL-10-Rezeptor ist ein Tetramer (siehe Abbildung 2 [52]), das aus zwei homodimeren Untereinheiten, IL-10R1 und IL-10R2, besteht. IL-10R1 bindet den Liganden IL-10 mit hoher Affinität und ist auf hämatopoetischen Stammzellen zu finden, während IL-10R2 auf den meisten Gewebszellen angesiedelt ist und für die Aktivierung von Tyk2 (einer Januskinase) zuständig ist [53]. Wird der IL-10-Rezeptor durch Ligandenbindung an der extrazellulären Domäne von IL-10R1 aktiviert, werden die Janus-Tyrosin-Kinasen Jak1 und Tyk2 phosphoryliert, diese phosphorylieren Tyrosinreste am intrazellulären Ende der IL-10R1-Kette (Y446 und Y496). Daraufhin kann der Transkriptionsfaktor STAT3 binden, wird

aktiviert und zu einem Homodimer verbunden, als welches er in den Zellkern transloziert. Dort bindet er an STAT-bindende-Elemente (SBE), die Promotoren vieler IL-10-gesteuerter Gene sind. So beispielsweise auch an SOCS-3 (Suppressor of Cytokine Signaling-3), das den Signalweg von TNF- $\alpha$  und IL-1 inhibiert und gleichzeitig die Neusynthese von SOCS-3 induziert. Weiterhin kann IL-10 die Aktivität der IKK (I-kappa-B-Kinase) hemmen und somit verhindern, dass der

Transkriptionsfaktor NFK-B im Zellkern an seine DNA-Promotorregionen bindet. Da NFK-B ein wesentlicher Transkriptionsfaktor vieler proinfammatorischer Zytokine ist, wirkt IL-10 über die Inhibierung der DNA-Bindung dieses Faktors immunregulatorisch [51].

Die Hauptangriffsziele in der Immunregulation von IL-10 sind antigenpräsentierende Zellen und T-Zellen.

Die Wirkung von IL-10 auf antigenpräsentierende Zellen beruht vor allem auf Herabregulation von Oberflächenproteinen der MHC-II-Klasse sowie Hemmung der Expression costimulatorischer Moleküle wie B7 (CD80/86) und des Adhäsionsmoleküls CD57 [54]. Ferner verhindert IL-10 die Reifung von dendritischen Zellen und hemmt die Zytokinsekretion sowohl von Th1-Zytokinen (IL-2, IFN-γ) als auch von Th2-Zytokinen (z.B. IL-4) und weiterer Entzündungsstimuli (IL-6, IL-12, TNF) [52, 55].

Hemmung der Reifung und Aktivierung von APC ist vermutlich einer der entscheidenden immunregulatorischen Wege, wie IL-10 auf die antigenspezifische T-Helferzellantwort Einfluss nimmt und das adaptive Immunsystem beeinflusst, um überschießende Immunantworten zu verhindern [56].

IL-10 kann jedoch auch auf direktem Wege auf T-Zellen einwirken. So wird die Tyrosinphosphorylierung von CD28 in T-Zellen durch IL-10 blockiert. Dadurch wird sowohl die Sekretion von Th1- als auch von Th2-Zytokinen verhindert [57]. Auf bereits aktivierte T-Zellen oder Memory-T-Zellen hat IL-10 jedoch keinen Einfluss, da diese den IL-10R herunterregulieren, ebenso wenig wie auf T-Zellen, die ein sehr starkes Signal über den T-Zellrezeptor empfangen und deshalb keine Costimulation über CD28 benötigen [58].

Die biologische Rolle von IL-10 erschöpft sich jedoch nicht in der Immunsuppression. Das Zytokin spielt eine wesentlich komplexere Rolle und hat auch immunstimulierende Funktionen. Es ist bekannt, dass IL-10 die Reifung und Differenzierung von B-Zellen, Granulozyten, Keratinozyten und Mastzellen beschleunigt. Ebenso fördert es die Aktivierung von CD8+ T-Zellen und NK-Zellen [59].

Für NK-Zellen ist IL-10 ein Proliferationsfaktor und verstärkt, besonders im Beisein von IL-18, sogar deren IFN-γ-Produktion [60, 61].

IL-10 ist mit Immunpathologien verknüpft, wenngleich seine Rolle bezüglich des SLE umstritten ist. So wiesen mehrere Studien nach, dass die Autoantikörperproduktion

im murinen und humanen Modell positiv mit IL-10 korreliert und die Gabe von anti-IL-10-Antikörpern die Produktion von Autoantikörpern signifikant reduziert [62], [63]. Auch die Zahl apoptotischer T-Zellen kann durch anti-IL-10-Antikörpergabe reduziert werden [64]. SLE-Patienten haben höhere Spiegel von IL-10 im Serum als gesunde Probanden [62, 65]. Der Hintergrund für die gesteigerte IL-10-Produktion der B-Zellen könnte eine antiapoptotische Funktion von IL-10 auf autoreaktive B-Zellen, die normalerweise im Keimzentrum spontan absterben (durch vermehrte Expression von bcr2), sein. Über den bcr2-abhängigen Signalweg wird die Apoptose verhindert, sodass die autoreaktiven B-Zellen überleben können und Autoantikörper produzieren [66]. Da B-Zellen in der Lage sind, selbst IL-10 zu synthetisieren, kann eine Art Teufelskreis entstehen.

Auch im murinen NZBxNZW-Modell konnte eine verzögerte Krankheitsentwicklung des SLE bei kontinuierlicher Gabe von anti-IL-10-Antikörpern beobachtet werden [67]. Diese Ergebnisse scheinen auf eine pathogene Rolle von IL-10 bei der Pathogenese des SLE zu verweisen.

Allerdings gibt es auch gegensätzliche Beobachtungen. Kühn et al. [68] zeigten an IL-10-/- Mäusen einen Zusammenhang zwischen chronischer Enterocolitis und IL-10-Defizienz. Ferner war der Krankheitsverlauf bei IL-10 defizienten Mäusen im MRL-Fas<sup>lpr</sup>-Modell protrahiert und aggraviert. Bei den Tieren wurde eine vermehrte Produktion von IFN-γ und anti-ds-DNS-Antikörpern nachgewiesen, wohingegen die IL-10-Gabe die Autoantikörperproduktion reduzierte [69].

Alles in allem sind die Einflüsse von IL-10 auf den SLE sehr komplex und von der Konzentration des Zytokins, den Umgebungsbedingungen und dem Zeitpunkt der Erkrankung abhängig.

Daher wird in dieser Arbeit erstmals der Einfluss von IL-10-Defizienz am vielversprechenden RIIB-/- Modell des SLE untersucht.

#### IL-4

IL-4 ist ein Zytokin, das typischerweise von Th2-Zellen aber auch von NK und Mastzellen produziert wird. Nach Stimulation mit IL-4 entwickeln sich naive T-Zellen zu Th2, die ihrerseits wieder IL-4 produzieren und somit autokrin die weitere Th2-Differenzierung stimulieren. Th2-Zellen haben das typische Sekretionsmuster IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13. Entgegen der Th1-Antwort, die vorwiegend zellvermittelt und über die Produktion opsonierender Antikörper abläuft, regeln Th2-Zellen die humorale Abwehr. Durch IL-4 wird besonders der Klassenwechsel zu IgM, IgA und

speziell IgE gefördert [70]. Wie alle Th2-Zytokine hat auch IL-4 als wichtiger Faktor für die Proliferation, Aktivierung und den Ig-Klassenswitch von B-Lymphozyten Einfluss auf den SLE

Beim SLE ist von einer Imbalance der Th1- und Th2-Zytokine auszugehen: Ursprünglich wurde von einer Th2-gelenkten Erkrankung ausgegangen, die über eine vermehrte Zahl von Th2-Zellen und gesteigerte Th2-Zytokinproduktion letztlich zu gesteigerter (Auto-) Antikörperproduktion führt [71]. Neuere Studien sehen das Th1/Th2-Verhältnis eher zugunsten der IFN-γ produzierenden Th1 verschoben [72]. Die Produktion von Autoantikörpern durch B-Zellen ist ein entscheidender Schritt in der Krankheitsprogression und die vermehrte Aktivierung von B-Zellen durch Th2-Zytokine könnte dafür ursächlich sein. Es konnte auch gezeigt werden, dass IL-4 bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden in größeren Mengen von DN-T-Zellen (doppelt-negativen-T-Zellen (CD3+CD4-CD8-)) und NK-Zellen produziert wird [73]. Weiterhin wird auch eine Beziehung zwischen IL-4 und selbstreaktivem IgE angenommen. Bei SLE-Patienten waren in Studien die selbstreaktiven IgE-Spiegel erhöht korrelierten mit deutlich und der Krankheitsaktivität [74].

#### IFN-γ

IFN-γ ist ein typisches Th1-Zytokin. Es wurde ursprünglich Makrophagenstimulierender Faktor genannt. Mittlerweile wurde nachgewiesen, dass auch NK-Zellen, BC und APC IFN-γ sezernieren. Auch der IFN-γ-Rezeptor weist eine weite Verteilung im Gewebe auf [75]. Die Stimulation von Makrophagen durch IFN-γ bewirkt direkte antimikrobielle Reaktionen sowie die Verstärkung von Ag-Präsentation und –Prozessierung [75]. Weiterhin verstärkt IFN-γ die Expression von MHC-I und MHC-II Molekülen an der Zelloberfläche und fördert damit Zytotoxizität, Ig-Klassenwechsel und Antikörperproduktion. Da die Sekretion von IFN-γ über Zytokine wie IL-12 und IL-18, die hauptsächlich von APC synthetisiert werden, gesteuert wird, ist IFN-γ eine Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem [75].

Zahlreiche Studien weisen einen agravierenden Effekt von IFN-γ auf den SLE nach [76, 77]. Bei SLE-Patienten konnten im Vergleich zu gesunden Probanden signifikant höhere IFN-γ-Spiegel nach CD3/CD28-Stimulation gemessen werden. Durch die höheren Spiegel an IFN-γ produzieren die Monozyten und Makrophagen der SLE-Patienten größere Mengen an BLyS (löslicher B-

21

Lymphozytenstimulationsfaktor), was wiederum durch verstärkte B-Zell-Proliferation und –Reifung zur Pathogenität beiträgt.

Auch korrelieren höhere IFN-γ-Spiegel und Ausmaß der Lupusnephritis positiv [78]. Ebenso verhält es sich mit dem Serumspiegel der Autoantikörper und glomerulärer Expression von IFN-γ [79].

Nukleotidpolymorphismen im IFN-γ-Gen werden mit erhöhter Inzidenz von SLE in Zusammenhang gebracht [80], insbesondere sind die Bindungsstellen von NF-Kappa B betroffen. Da NF-Kappa B ein wichtiger Transkriptionsfaktor für IFN-γ ist, ist davon auszugehen, dass die vermehrte IFN-γ-Expression durch o.g. Veränderungen der NF-Kappa B-Bindungsstelle mit erhöhter Erkrankungswahrscheinlichkeit für den SLE einhergeht [80].

Auch im Mausmodell wurden Beziehungen zwischen IFN-γ und Lupusnephritis hergestellt. So führt eine Deletion des IFN-γ-Gens bzw. des IFN-γ-Rezeptors zur Krankheitsregression im NZBxNZW und MRL-Fas(lpr) -Modell. Folgerichtig wurde durch Gabe von anti-IFN-γ-Rezeptor-Antikörpern die Morbidität reduziert. So ist die anti-IFN-γ-Rezeptor-Antikörpergabe ein therapeutischer Ansatz beim SLE [81].

#### IL-2

IL-2 ist eines der wichtigsten Zytokine für die T-Zellhomöostase. T-Zellen sind sowohl der Hauptproduzent als auch Konsument von IL-2. Sie stimulieren über auto- und parakrine Mechanismen die Produktion von IL-2 und dem IL-2-Rezeptor [82]. Daher wurde lange angenommen, dass Defekte in der IL-2-Achse zu Immunschwäche und erhöhter Infektanfälligkeit führen. Stattdessen treten bei IL-2 defizienten Mäusen schwere Autoimmunerkrankungen auf. Beispielsweise wurde im MLR/lpr-Mausmodell mit fortschreitender Progression des SLE eine verminderte IL-2-Produktion und auch eine verminderte Ansprechbarkeit der Lymphozyten auf IL-2 beobachtet [82]. Auch in anderen Modellen führt IL-2-Defizienz zu massiver Lymphoproliferation, verminderter Apoptose aktivierter Zellen (AICD = activation induced cell death) und Entwicklung von Autoimmunerkrankungen wie entzündlichen Darmerkrankungen [83]. AICD dient der Verminderung von Effektorzellen durch Apoptose, um eine überschießende Immunantwort zu verhindern. Dadurch, dass dieser Prozess bei SLE-Patienten durch IL-2-Defizienz gestört ist, können auch autoreaktive T-Zellen verstärkt überleben. So spielt IL-2 neben seiner Funktion als Wachstumsfaktor für T-Zellen eine entscheidende Rolle bei immunregulatorischen Prozessen [50, 84].

Bei SLE-Patienten sind parallel zu den erniedrigten IL-2-Spiegeln [85] auch die Konzentrationen der Treg vermindert. Treg benötigen IL-2 einerseits als wichtigen Überlebensfaktor für ihre Proliferation und andererseits, um ihre regulatorische Funktion auszuüben [86]. Weiterhin führen niedrige IL-2-Spiegel zur Induktion von Th17, die als stark inflammatorisch gelten und daher Autoimmunität verstärken können [86].

Auf molekularer Ebene ist bei den SLE-Patienten offenbar die Aktivität des Transkriptionsfaktors CREM (cAMP response element modulator alpha) pathologisch erhöht. CREM wird durch Aktivierung des CD3-Rezeptors aktiviert und inhibiert die Transkription von IL-2, indem es CREB (CRE-binding protein), das an der gleichen Stelle des IL-2-Promotors wie CREM bindet. verdrängt [87]. Niedrige IL-2-Konzentrationen fördern also die Progression des SLE durch verminderten AICD, verminderte Zahl an Treg (und damit gestörtes Gleichgewicht zwischen Effektorzellen und regulatorischen T-Zellen) und erhöhte IL-17-Konzentration.

Humrich et al. [50] gehen davon aus, dass die IL-2-Defizienz sekundär ist und durch vermehrte Aktivierung von Effektor-T-Zellen, die kein IL-2 mehr produzieren, zu begründen ist. Im NZBxNZW-Modell kann das Gleichgewicht zwischen Effektor- und regulatorischen T-Zellen durch Gabe von IL-2 wiederhergestellt [50] und die Progression des SLE vermindert werden.

Aufgrund o.g. Erkenntnisse, scheint IL-2 ein lohnenswerter Ansatz zur Therapie des SLE zu sein, wobei die Dosis kritisch zu wählen sein wird, um eine mögliche Verstärkung der T-Zell-Effektorantwort bei Überdosierung zu vermeiden.

## 1.2. Mausmodelle des SLE

Das Mausmodell ist das vorherrschende Modell zur Erforschung des SLE. Es existieren dabei so viele verschiedene Mausmodelle wie bei keiner anderen Autoimmunerkrankung. Die Vorzüge des Mausmodells sind die ähnliche Anatomie und Physiologie von Maus und Mensch, leicht zu beherrschende Ansprüche bezüglich Haltung und Platz, schnelle und zahlreiche Generationenfolge, passende Lebensdauer, gute Möglichkeiten, die umgebenden Umweltfaktoren zu kontrollieren und ein komplett sequenziertes Genom der Maus. Ferner ist das Mausmodell durch die starke Ähnlichkeit zwischen murinem und humanem Immunsystem zur Veranschaulichung des SLE prädisponiert. Letztlich entscheidend ist aber die Möglichkeit, überhaupt SLE-ähnliche Erkrankungen in verschiedenen Mausstämmen zu induzieren.

Im Wesentlichen werden drei Modellarten unterschieden:

- spontaner SLE (u.a.: NZW, NZB, F1(NZBxNZW), NZM2410 / NZM2328, MRL/Fas<sup>lpr</sup>)
- induzierbarer SLE (z.B. M. bovis-induzierte systemische Autoimmunität in NOD-Mäusen)
- SLE durch Genmanipulation (FcγRIIB-k.o.(RIIB-/-))

Das Auftreten von Autoantikörpern und die inflammatorische Endorganschädigung sind allen Modellen gemeinsam. Sie unterscheiden sich in klinischer Ausprägung, Schwere der Erkrankung und bevorzugtem Geschlecht [88].

Die NZB/W und MRL/lpr-Modelle sind bis heute die am häufigsten verwendeten und besterforschten Tiermodelle des SLE, weshalb sie im Folgenden kurz vorgestellt werden sollen. Die folgende Arbeit basiert jedoch ausschließlich auf dem RIIB-/-Mausmodell auf dessen Grundlage der Einfluss von IL-10-Defizienz, vergleichend zu den anderen Modellen, untersucht wird.

## 1.2.1. NZBxNZW (NZM2410 und NZM2328)

Dieses murine Modell ist eines der ältesten und das "klassische" Modell des SLE. Der Mausstamm entspricht der F1-Generation der Kreuzung zwischen NZB und NZW-Mäusen [89]. Die NZB- und NZW-Stämme weisen per se kaum Zeichen der Autoimmunität auf, wohingegen bei ihrer Kreuzung die F1-Generation schwere Zeichen der autoimmunen Systemerkrankung, charakterisiert durch Autoantikörper (u.a. gegen ds-DNS), massive Lymphoproliferation und schwere Immunkomplexvermittelte Glomerulonephritis (im Alter von 5-6 Monaten), an der die Tiere letztlich im Alter von ca. 12 Monaten versterben, zeigt [90]. Ähnlich wie beim humanen SLE sind weibliche Tiere stärker betroffen, was auf eine Assoziation des SLE mit Östrogenen rückschließen lässt. Die Tiere haben im Vergleich zu anderen Modellen und dem humanen SLE aber keine Autoantikörper gegen RNA-enthaltene Strukturen [91].

Aus einer versehentlichen Rückkreuzung von NZB/W F1 und NZW-Mäusen entstanden die Mausstämme NZM2410 und NZM2328, die beide eine wesentlich stärkere Ausprägung des SLE mit früherem Krankheitsausbruch als die NZB/W F1 zeigen, NZM2328 dabei mit einer schwächeren Geschlechterspezifität als NZM2410. Beide Stämme haben die gleiche Autoantikörperspezifität wie die NZB/W F1 [89].

Auf der Grundlage dieser Stämme konnten Genloci, die für den SLE prädisponieren, identifiziert werden. Diese sind insbesondere Sle1, Sle2, Sle3. Sle1 vermittelt Autoimmunität gegen Chromatin / Bestandteile des Zellkerns, verbunden mit der Hyperresponsibilität von B- und T-Lymphozyten, der Ursache für das Auftreten antinukleärer Antikörper [92].

Sle2 begünstigt B-Zellhyperaktivität mit polyreagiblen IgM-Antikörpern und verstärktes Auftreten von B1-Zellen [93].

Sle3 ist verbunden mit erhöhtem Anteil an aktivierten CD4+-T-Zellen am T-Zellpool, die AICD und vermehrte reduzierten Autoreaktivität zeigen [94]. Ausgehend von diesen Kenntnissen wurden bigene Mausstämme mit Sle2 und Sle3 gezüchtet. Diese bildeten noch keinen SLE aus, erst in den Stämmen mit allen 3 Genloci (Sle1, Sle2, Sle3) wurde Autoimmunität ausgelöst. Daraus wurde rückgeschlossen, dass die Antikörper gegen Chromatin der krankheitsauslösende Faktor in diesem Modell sind [95]. Da in den ursprünglichen NZW-Mäusen keine Autoimmunglomerulonephritis auftrat, sind im Genom der NZW-Mäuse vermutlich suppressorische Genabschnitte für Sle1-3 (Sles) vorhanden.

## 1.2.2. **MLR/lpr**

Der Mausstamm entstand aus einer Kreuzung verschiedener Inzuchtstämme (LG/J C3H/Di, C57BL/6, AKR/J) [91]. Eine Untergruppe dieses Stammes, die MRL/lpr, entwickelte ein SLE-ähnliches Krankheitsbild mit Lymphadenopathie, vermehrt doppelt negativen (DN-) T-Zellen (CD4-CD8-), hoher Konzentration von Autoantikörpern (ANA, anti-ds-, anti-ss-DNA-, anti-Sm-Antikörper, Rheumafaktor), Immunkomplexen und gesteigerter Mortalitätsrate. Anders als bei den NZB/W-Mäusen ist die Krankheitsentwicklung nicht geschlechtsabhängig [91], [96]. Die genetische Ursache liegt bei diesen Mäusen in einer rezessiven Mutation auf Chromosom 19, genannt lpr. Diese ändert die Transkription des Fas-Rezeptors [25, 97]. Dieser Oberflächenrezeptor gehört zur Gruppe der TNF(tumor necrosis factor) -Rezeptoren. Fas induziert bei Interaktion mit seinem Liganden (FasL) Apoptose der betroffenen Zelle. Mutationen (durch alternatives Splicing) von Fas führen im Ipr-Modell zu einer verminderten Apoptose von T- und B-Zellen und dadurch zu einem vermehrten Auftreten autoreaktiver Lymphozyten [24]. Wie schon im NZB/W-Modell beschrieben, sind auch im MRL/Fas<sup>lpr</sup>-Modell mehrere verschiedene Mutationen zur Ausprägung des SLE nötig. So entwickeln weder die C3H/HeJ noch die C57BL/6J-Mausstämme eine Glomerulonephritis, wenn die Fas<sup>lpr</sup>-Mutation eingekreuzt wird, erst im MRL-Stamm wird bei Einbringen der oben beschriebenen Fas-Mutation eine Autoimmunglomerulonephritis induziert. Das verdeutlicht erneut die komplexe Ätiologie des SLE. der erst durch das Zusammentreffen mehrerer Prädispositionsfaktoren entsteht [91].

## 1.2.3. FcγRIIB defiziente Mäuse (RIIB-/-)

Das Modell basiert auf einem Gen-Knock-out des FcγRIIB-Rezeptors auf dem Hintergrund des Inzuchtstammes C57/BI6J [98].

Der FcyRIIB gehört zur Gruppe der Immunglobulinrezeptoren, die den Fc-Teil eines Antikörpers binden. Es gibt dabei aktivierende Fc-Rezeptoren wie FcyRI, FcyRIII,



#### Abbildung 3: Fcy-Rezeptoren der Maus [99]

Die FcyR finden sich auf den meisten hämatopoetischen Zellen (Mastzellen, Granulozyten, DC, Monozyten), jedoch nicht auf T-Zellen. Die meisten dieser Zellen exprimieren sowohl aktivierende wie auch inhibierende Fcy-Rezeptoren. Die resultierende Immunantwort entspricht dann dem Verhältnis aktivierender zu inhibierender Oberflächenrezeptoren [99]. Während die aktivierenden Fcy-R über ein sogenanntes ITAM (Immunrezeptor Tyrosin-basiertes aktivierendes Motiv) der Zelle für Effektorfunktionen wie Phagozytose, Signale Freisetzuna von Entzündungsmediatoren (z.B. IFN-y) und Antikörper-vermittelte Zytotoxizität liefern, wirkt Bindung des FcyRIIB über ein ITIM (Immunrezeptor-Tyrosin-basiertes inhibierendes Motiv) immunregulatorisch, z.B. über die Sekretion inhibitorischer Zytokine (IL-10) [99]. Eine besondere Rolle spielen die inhibitorischen FcyR ferner über die Entfernung niedrig-affiner oder autoreaktiver B-Zellen, die nicht in der frühen B-Zell-Entwicklung deletiert wurden. Hierbei werden über die Bindung des FcyRIIB apoptotische Prozesse in der entsprechenden B-Zelle vermittelt [98],[100]. Defekte im FcyRIIB-Rezeptor führen zur vermehrten Bildung von Antikörpern und zu vermehrten anaphylaktischen Reaktionen durch Erniedrigung der Aktivierungsschwelle für Mastzellen über aktivierende Fcv-RIII [101]. Die Rolle von FcyRIIB in der Immunregulation wird anhand einer Studie an H-2b-Mäusen, die bei FcyRIIB-K.o. nach Immunisierung mit bovinem Kollagen II (CII) eine Kollagen-induzierte-Arthritis (CIA) entwickeln, verdeutlicht. RIIB-kompetente H-2bMäuse weisen demgegenüber keine CIA nach entsprechender Immunisierung auf [102].

Diese Studie zeigt, dass Fehlregulationen im RIIB-Signalweg das Auftreten von Autoimmunerkrankungen begünstigen. Die RIIB-Defizienz allein reicht allerdings noch nicht zum Auftreten spontaner Autoimmunität aus, denn, wie erwähnt, entstehen Autoimmunerkrankungen wie der SLE aus dem komplexen Zusammenspiel vieler Faktoren.

Bolland et al [98] entwickelten aus mehreren begünstigenden Faktoren schließlich ein murines SLE-Modell auf Basis von Rückkreuzungen des Inzuchtstammes C57/BI6 mit RIIB-/- Mäusen. Dass die Entwicklung spontaner Autoimmunität auch hier polykausal ist, zeigen Experimente der gleichen Forschungsgruppe, bei denen der RIIB-K.o. auf BALB(c)-Mäuse rückgekreuzt wurde. Diese entwickelten im Gegensatz zu den C57/BI6 RIIB-/- Mäusen nämlich keine spontane Autoimmunität. Demzufolge ist RIIB-/- ein Prädispositionsfaktor für den SLE, zur vollständigen Ausprägung der Erkrankung sind allerdings weitere Genmutationen wie beispielsweise der genetische Hintergrund der C57/BI6-Mäuse bzw. begünstigende Umweltfaktoren nötig.

Die Erkrankung in diesem Modell basiert vor allem auf der Fehlregulation des FcγRIIB auf B-Zellen, wie an Knochenmarkstransferexperimenten gezeigt wurde [98]. Die Tiere entwickeln spontane Autoimmunität, gekennzeichnet durch das Auftreten von anti-ds-DNS-Antikörpern, anti-Chromatin-Antikörpern und Glomerulonephritis.

So hatte die Mehrzahl der Mäuse nach 5 Monaten (nach 9 Monaten bereits 90% der Mäuse) eine schwere Proteinurie. Ferner waren die Mäuse im Alter von 8 Monaten anämisch, zeigten einen aktivierten Zellphänotyp und systemische Entzündungsreaktionen bei histologischer Aufarbeitung der Organe [98].

Aufgrund der Ähnlichkeit zum humanen SLE und der Möglichkeit der Kombination mit weiteren Genmutationen (wie in dieser Arbeit dem IL-10-/-) ist das FcγRIIB-/-Modell geeignet zur weiteren Forschung bezüglich Ätiologie und möglicher Therapien des SLE.

28

# 2. Eigene Fragestellungen

Wie beschrieben, spielt IL-10 eine sehr komplexe Rolle bezüglich des SLE.

Um diesen Einfluss genauer zu untersuchen, verwendeten wir das murine FcγRIIB-K.o.-Modell des SLE. Dieses Modell bietet im Vergleich zu den bisherigen murinen SLE-Modellen entscheidende Vorteile. Aufgrund des komplexen genetischen Hintergrundes des NZB/W-Modelles sind dort bisher Knock-outs des IL-10-Genes nicht möglich, sodass der IL-10-Einfluss nur über Gabe von anti-IL-10-Ak untersucht werden kann. Das MRL/lpr-Modell hingegen gleicht eher einer lymphoproliferativen Erkrankung und bildet den SLE daher nicht in gleicher Komplexität wie das FcγRIIB-K.o.-Modell ab. Daher stellt die erstmalige Generation des IL-10-K.o. auf dem RIIB-/-Hintergrund in dieser Arbeit die Weichen für neue Erkenntnisse des Einflusses von IL-10 auf die komplexe rheumatologische Systemerkrankung.

Nach der Kreuzung ergaben sich folgende Genotypen:

- RIIB-/- Mäuse mit SLE und intakter IL-10-Produktion
- RIIB-/-IL-10-/- Mäuse mit SLE und IL-10-Defizienz
- RIIB-/-IL-10+/- Mäuse mit SLE und heterozygotem IL-10 Defekt, also eigeschränkter IL-10-Produktion

Diese Gruppen wurden jeweils mit "gesunden" C57/BL6J Mäusen mit IL-10-Knockout (IL-10-/-) verglichen. Ausgewertet wurden die Parameter Überlebenszeit, Proteinurie und Leukozyturie, Splenomegalie, Produktion von Auto-Ak sowie evtl. weitere pathologische Organmanifestationen.

Folgende Fragen sollten davon ausgehend beantwortet werden:

- Lässt sich ein protektiver oder morbiditätsverstärkender Effekt von IL-10 anhand der o.g. Parameter evaluieren?
- Treten auch in IL-10-defizienten Mäusen ohne FcγRIIB-K.o. Veränderungen auf?
- Hat ein heterozygoter Genotyp (II-10+/-) pathologische Einflüsse?
- Ergeben sich Auffälligkeiten bei Differenzierung der einzelnen Zellpopulationen (T-/B-Lymphozyten, Th1/Th2, zentrale / Effektorgedächtniszellen, regulatorische T-Zellen)?
- Wie ist der Aktivierungsstatus der T-Zellen?
- Liegen Auffälligkeiten in der Zytokinproduktion (IL-4, IL-10, IFN-γ) vor?

Ursprünglich war die Generierung von IL-10-Knochenmarkschimären vorgesehen, um den IL-10-K.o. selektiv für einzelne Zellpopulationen beurteilen zu können, sodass wir noch Tiere mit RAG-K.o. züchteten. Diese bilden keine reifen Lymphozyten aus und sollten für den Knochenmarkstransfer verwendet werden. Nachdem wir jedoch keine Genehmigung zur Bestrahlung der Tiere erhielten, verzichteten wir auf diesen Teil des Versuches.

#### Material und Methoden 3.

## 3.1. Material

#### Chemikalien 3.1.1.

Name

Hersteller Aceton Roth Invitrogen Agarose Brefeldin A Sigma Aldrich BSA (N,O-Sigma-Aldrich Bis(trimethylsilyl)acetamid) Carbonate-Bicarbonate Fluka Cytofix/Cytoperm **BD** Biosciences CD43-MicroBeads Miltenyi Biotec **DNA-Gewichtsmarker VI** Roche EDTA (Ethylendiamintetraacetat) Sigma-Aldrich Ethanol Roth Ethidium-Bromid Roth Formaldehyd 70% Roth Gelatine Sigma-Aldrich  $H_2O_2$  (30%) Roth  $H_2SO_4$ Roth Heparin (5000 U/ml) Biochrom HCI Roth Ionomycin (als 1mg/ml Lösung in Sigma Dimethylsulfoxid (DMSO)) Isopropanol Roth Sigma-Aldrich KCI KHCO<sub>3</sub> Roth KH<sub>2</sub>PO₄ Roth Sigma-Aldrich MgCl<sub>2</sub> NaCl Roth Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> Sigma-Aldrich NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Roth NaN<sub>3</sub> Roth PCR-Puffer (10xPuffer) Genexpress PCR-Dinukleotide Invitrogen PMA (Phorbol-12-Sigma-Aldrich myristat-13-acetat) Proteinase K Sigma-Aldrich Saponin Sigma SDS (Natriumdodecylsulfat) Merck Taq-Polymerase Rapidozym TMB (Tetramethybenzidin) **BD** Biosciences Tris-HCI Sigma-Aldrich Trypanblaulösung (0,4% in PBS) Sigma-Aldrich Tabelle 1: verwendete Chemikalien

## 3.1.2. Pufferlösungen

## 3.1.2.1. **PBS (phosphate buffered saline)**

- 1000ml H<sub>2</sub>O bidest
- 8,0g NaCl
- 0,2g KCl
- 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
- 1,42g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x2H<sub>2</sub>O
- pH auf 7,2 eingestellt, Lösung autoklaviert

#### 3.1.2.2. **PBS/BSA**

- 500ml PBS
- 2,5g BSA
- Lösung steril filtriert (0,2 μm Ø)

## 3.1.2.3. PBS/BSA/Azid

- · 500ml PBS/BSA
- · 1ml 10% NaN<sub>3</sub> (Roth, Karlsruhe)
- · Lösung steril filtriert (Durchmesser 0,2µm)

## 3.1.2.4. **TAE**

- · 57% Essigsäure
- · 2 M Tris-HCI
- · 100 mM EDTA pH 8.0

## 3.1.2.5. **Erylysepuffer**

- · 500ml H<sub>2</sub>O bidest.
- · 0,5g KHCO<sub>3</sub> (Roth, Karlsruhe)
- · 4,15g NH<sub>4</sub>Cl (Roth, Karlsruhe)
- · 18,5mg EDTA (Sigma, München)
- · Lösung mit HCI eingestellt auf pH 7,43
- · Lösung steril filtriert (Durchmesser 0,2µm)

## 3.1.2.6. **TE-Lösung**

- ·10mM Tris-HCl pH8.0
- ·1mM EDTA pH 8.0

## 3.1.2.7. Tail Lysis Solution (TLS)

- · 5mM EDTA pH8.0
- · 100mM Tris-HCl pH8.5
- · 0.2% SDS
- · 200mM NaCl
- · 100µg/ml Proteinase K

## 3.1.3. Zellkulturmedium (RPMI (FCS/PS/ME))

- · RPMI 1640 Medium mit 2mM L-Glutamine (PAA Laboratories, Cölbe)
- · 10% FCS (hitzeinaktiviertes fetales bovines Serum) (Sigma-Aldrich, München)
- $\cdot$  100IE/ml Penicillin G und 100  $\mu$  g/ml Streptomycin (PAA Laboratories, Cölbe)
- · 50 µM 2-Mercaptoethanol (Invitrogen, Karlsruhe)

Abkürzung	Name	Emissionsmaximum in nm	Messkanal	
FITC	Fluoresceinisothiocyanat	525	FL - 1	
PerCP	Peridinin- Chlorophyll-a	675	FL - 3	
PE	(R-Phycoerythrin)	575	FL - 2	
APC	Allophycocyanin	660	FL - 4	
Taballa 2: vanvandata Eluaraabrama				

## 3.1.4. Verwendete Fluorochrome

Tabelle 2: verwendete Fluorochrome

## 3.1.5. FACS-Antikörper und sekundäre Reagenzien

Bezeichnung	Klon	Konjugat	Verdünnung	Hersteller
anti-murin CD3	145-2C11	PE	1:200	DRFZ
anti-murin CD4	RM4-5	PerCP	1:200	BD Bioscience
anti-murin CD8	53.67 DRFZ	FITC	1:200	DRFZ
anti-murin CD19	1D3	APC	1:100	BD Bioscience
anti-murin CD44	IM7	FITC	1:400	DRFZ
anti-murin CXCR3	220803	APC	1:50	R&D Systems
anti-murin CD62L	MEL14	PE	1:400	DRFZ
anti-murin IgD	11-26c.2a	FITC	1:200	BD Bioscience
anti-murin CD138	N418	PE	1:800	BD Bioscience
anti-murin CD25	PC61	APC	1:200	BD Biosciences,
anti-murin FoxP3	FJK-16s	PE	1:200	BD Pharmingen
anti-murin IFN-γ	AN18.17.24	FITC	1:200	DRFZ
anti-murin IL-10	JES5-16E3	APC	1:200	BD Pharmingen
anti-murin IL-4	11B11	PE	1:200	DRFZ

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten FACS-Antikörper

- Fc-γ-Block (Isotyp: Ratten-IgG2a,λ (eBioscience))

- Fixierungs-Permeabilisierungslösung (frisch angesetzt aus Fixation/Permeabilization Concentrate und Fixation/Permeabilization Diluent im Verhältnis 1:4 (eBioscience)

- Permeabilisierungspuffer (Permeabilization Buffer (eBioscience) 1:10 in H<sub>2</sub>O bidest. verdünnt)
- PMA/Ionomycin (PMA 10ng/ml, Ionomycin 1µg/ml Endkonzentration)

## 3.1.6. Pufferlösungen und Reagenzien für ELISA

PBS/BSA(3%)/Tween

- · PBS
- · 3% BSA (Sigma, München, Deutschland)
- · 0,05% Tween 20 (Merck, München, Deutschland)
- · Lösung steril filtriert (0,2  $\mu$  m  $\varnothing$ )

#### PBS/10%FCS

- · PBS
- · 10% FCS (Sigma, München, Deutschland)

Phosphat-Citrat-Puffer (0,05M, pH 5)

- · 25,7ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (142g/mol)
- · 24,3ml 0,1M Citronensäuremonohydrat (210,1g/mol)
- $\cdot$  mit 50ml destilliertem H\_2O auf 100ml aufgefüllt, pH auf 5 (mithilfe von NaOH/HCI) eingestellt

#### Carbonatpuffer

- · 75ml 0,1 molare NaHCO<sub>3</sub>-Lösung (Roth, München)
- · 25ml 0,1 molare Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Lösung (Roth, München)

Substratlösung (frisch angesetzt)

- · 1/2 Tablette 3,3´,5,5´-Tetramethybenzidin-Dichlorid (TMB) (Sigma)
- · Auflösen in 10ml Phosphat-Citrat-Puffer
- $\cdot$  unmittelbar vor Zugabe der Substratlösung auf ELISA-Platten 2µl / 10ml H\_2O\_2 (30%) zugegeben

## Stopplösung

- · 100ml 1-molare H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Roth, München, Deutschland)
- · 0,63g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> x7H<sub>2</sub>O (Roth, München, Deutschland)
- · 0,315g Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (Roth, München, Deutschland)

Antikörper und Peptide für ELISA

- · Anti-Murines-IgG-HRP (polyklonal) (Sigma, München)
- · Murines Anti-DsDNA-IgG (ATCC, Rockville, USA)
- · Anti-SmD1-IgG (aus Poolserum von MRL/lpr-Mäusen)
- · SmD1(83-119) Peptid (Dr. Henklein, Biochemie der HU-Berlin)
- · 1%ige Ds-DNA-Stammlösung (10mg/ml) in PBS (pH 7,2)
# 3.1.7. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
- 0,2ml PCR	Peqlab
Reaktionsgefäße	
<ul> <li>1,5ml Reaktionsgefäße</li> </ul>	Sarstedt
(Eppendorf Tube)	
- Plastikröhrchen (15ml,	Falcon
50ml) (FalconTube)	
- Petrischale	Corning, Schipohl-Rijk,
	Niederlande
- Plastikspitzen für	Schubert/Pharmacia
Pipetten	
- 30µm Pre-Seperation	Miltenyi Biotec
Filter	
- 48-Well Platten zur	Corning, Schipohl-Rijk,
Zellkultivierung	Niederlande
- FACS-Röhrchen	Sarstedt
- Multistix	Bayer Diagnostics, München
(Urinteststreifen)	
- 96-Well Platte mit	Corning, Schipohl-Rijk,
flachem Wellboden, aus	Niederlande
Polystyrene	
hochbindend, steril und	
unsteril	
- Cell Strainer (Zellsieb)	BD Biosciences, Heidelberg,
70µmø	Deutschland
<ul> <li>MACS LS-Säulen und</li> </ul>	Miltenyi Biotec, Bergisch
entsprechende Magnete	Gladbach, Deutschland
und Halterungen	
- Mikroskopische	Corning, USA
Objektträger	

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Elektrophorese- Netzteil	E850 (1200V 500mA)	Consort
Inkubator	Function Line	Heraeus
Pipetten		Eppendorf
Pipettierhilfe	Pipetboy acu	Integra Biosciences
Thermocycler	ТЗ	Biometra
Vortexer	Vortex Genie 2	Scientific Industries
Zentrifuge	Biofuge und Biofuge Fresco	Heraeus
Zentrifuge	Multifuge 3 L-R	Heraeus
Zytometer	FACS Calibur	BD Biosciences
Zellzählkammer	Neubauer improved- Zählkammer	Brand, Wiesbaden
Mikroskop		Leica, Wetzlar
Kühlschrank, 4°C		Liebherr
Gefrierschrank, -20°C		Bosch
UV-Transluminator	Vilber-Lourmat	Vilber

# 3.1.8. Technische Geräte

# 3.2. Methoden

# 3.2.1. Versuchstiere

Die Experimente wurden an Inzucht-Stämmen der Maus (mus musculus) durchgeführt. Es wurde mit dem FcyRIIB-/- (RIIB-/-) Mausmodell des SLE auf dem genetischen Hintergrund von C57/BL6J Mäusen gearbeitet. Das FcyRIIB-/- Modell zeigt Parallelen zum humanen SLE, wie die Produktion von Autoantikörpern und das Auftreten einer Nierenentzündung. Bei den Mäusen, die in diesem Projekt eingesetzt wurden, handelt es sich um eigens für Tierversuche gezüchtete Mäuse. Diese wurden vom Institut für Risikobewertung in Marienfelde oder aus der Versuchstierzucht der Charité in Steglitz bezogen (Forschungseinrichtungen für Experimentelle Medizin, FEM, Charité - Campus Benjamin Franklin, Krahmerstr. 6, 12207 Berlin, Projektnummer 843, Projektleiterin Frau Prof. Riemekasten). Im Verlauf der Kreuzung wurden die Tiere in die Quarantäne (SPF-Bereich) überführt. Fütterung, Haltung und Monitoring erfolgten nach den Richtlinien der FELASA (Federation of Laboratory Animal Science Associations).

Für die Arbeit wurden aufgrund geringer Populationen sowohl weibliche als auch männliche Tiere verwendet. Da sich bei der Datenanalyse keine geschlechtsspezifischen Unterschiede zeigten (Daten nicht gezeigt), erfolgt im

Ergebnisteil keine Auftrennung der Parameter nach männlichen und weiblichen Tieren.

## 3.2.2. Genotypisierung

## 3.2.2.1. Isolation der DNS aus den SSBP

Die Isolation der Schwanzspitzenbiopsien erfolgte nach der von Laird et al. 1991 [103, 104] etablierten Methode.

Die Schwanzspitze (~7mm) wurde in ein Eppendorf Tube überführt, 500µl TLS (Tail Lysis Solution) zum Ablösen von Fell und Knochen zugegeben und bei 55°C über 4 Stunden auf dem Heizblock inkubiert. Im Anschluss wurde, um noch anhaftende Fellreste abzulösen, "gevortext" bis der Knochen sichtbar wurde.

Während der folgenden Zentrifugation mit 10000 rpm RT für 7min wurde die DNS im Überstand von den festen Bestandteilen am Boden des Tubes getrennt.

Die Überstände wurden in ein neues 1,5ml Eppendorf Tube mit 500µl 2-Isopropanol dekantiert, welches dann einige Male vorsichtig gewendet wurde, bis ein Knäuel DNA ausfiel, das mit der Spitze einer P20 Pipette aufgenommen und in ein 1,5ml Tube mit 150µl TE, überführt wurde. Mit Hilfe des Eppendorf Thermomixers 5436 (10 Min bei 55°C) wurde die aggregierte DNA wieder in Lösung gebracht.

Von der gelösten DNA wurden 0,5-1µl zur folgenden PCR verwendet.

## 3.2.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Allgemeines Prinzip [105]

Die PCR dient der Vervielfältigung eines bestimmten DNS-Abschnitts *in vitro*. Der Prozess besteht aus einer zyklischen Abfolge nachfolgend beschriebener Arbeitsschritte, die bis zu 30mal wiederholt werden.

Benötigt werden für das zu amplifizierende DNS-Fragment: Primer (siehe Tabelle 4), Desoxynukleotidtriphosphate, die thermostabile DNS-Polymerase, die in 3´-5´-Richtung den vorliegenden DNS-Einzelstrang kopiert und Oligonukleotide, die komplementär zu den Basenpaaren der Enden des DNS-Abschnittes sind. Sie dienen der Anlagerung der DNS-Polymerase an ein freies 3`-OH-Ende. Initial erfolgt bei Temperaturen von 94°C das Auftrennen (Melting) des zu vervielfältigenden DNS-Doppelstranges, indem Wasserstoffbrückenbindungen aufgebrochen werden, sodass zwei DNS-Einzelstränge vorliegen. Im Anschluss wird die Temperatur für die Anlagerung der Primer (Anealing) an die DNS-Einzelstränge gesenkt.

Im finalen Schritt, der Elongation, lagert sich die Polymerase (in dieser Arbeit wurde die Taq-DNS-Polymerase verwendet) an die Primer an und synthetisiert den komplementären DNS-Einzelstrang aus den im Reaktionsansatz vorliegenden Desoxynukleotidtriphosphaten (dATP, dGTP, dTTP, dCTP).

Die beiden Stränge bilden nun die Vorlage für den nächsten Durchlauf - die Menge des zu vervielfältigenden Fragments verdoppelt sich dementsprechend bei jedem Zyklus, sodass am Ende der PCR Kopien des Fragments in einer Zahl von etwa 2<sup>30</sup> vorliegen.

## Durchführung der PCR für die Gene IL-10, RAG und RIIB

## Mastermix (pro DNA-Probe)

H <sub>2</sub> 0 (Aqua bi	dest)
50 mM	MgCl2
10 x	PCR-Puffer
25 mM	PCR-Dinukleotide
100 µM	DNA-Primer (Tabelle 4)
5 U/μl	Taq-Polymerase

## **DNS-Primer**

Gen	Bezeichnung	Nukleotidsequenz (5' > 3')
RIIB PCR	RIIB wt fw	ATC TTC CAA AGG CTG TGG TC
	RIIB ko fw	CTC GTG CTT TAC GGT ATC GCC
	RIIB rev	TTG ACT GTG GCC TTA AAC GTG TAG
IL-10 PCR	IMR0086 = IL-10 T	GTG GGT GCA GTT ATT GTC TTC CCG
	IMR0087 = IL-10 T1	GCC TTC AGT ATA AAA GGG GGA CC
	IMR0088 = IL-10 Neo5	CCT GCG TGC AAT CCA TCT TG
RAG PCR	IMR0189	TGG ATG TGG AAT GTG TGC GAG
	IMR1746	GAG GTT CCG CTA CGA CTC TG
	IMR3104	CCG GAC AAG TTT TTC ATC GT

## Tabelle 4: (DNS-Primer)

Der Mastermix (s.o.) wurde in der der Anzahl der Proben entsprechenden Menge auf Eis angesetzt, wobei die taq-Polymerase zuletzt zugegeben wurde. Im Anschluss wurden 19µl des Reaktionsansatzes, auf Eis, in 0,2ml PCR-Reaktionsgefäße pipettiert und jeweils 1 µl der o.g. DNS-Probe bzw. der Positivkontrolle (Probe von bekanntem Gen-K.o. von IL-10-/- Maus aus Pool), Negativkontrolle (Probe von Bl-6-Maus aus Pool) und des Leerwertes (1 µl Aqua bidest.) aufgetragen. Die PCR wurde im auf 94°C vorgeheizten ("hot start") T3 Thermocycler durchgeführt. Die Temperaturprogramme wurden individuell auf die einzelnen Primer abgestimmt. Tabelle 5 zeigt eine zusammenfassende Übersicht

Am Ende der PCR wurden die Proben bei 4°C zur Weiterverwendung aufbewahrt.

Arbeitsschritt	Gen	Temperatur	Dauer		
Initiale Denaturierung	IL-10, RAG	94°C	2min		
	RIIB	94°C	5min		
Denaturierung	alle	94°C	30s	$\uparrow$	
Primerbindung	IL-10, RAG	64,9°C	45s		
	RIIB	60°C	30s		35x Zykluswiederholung IL-10, RAG
Elongation	IL-10, RAG	72°C	1min		38x Zykluswiederholung
	RIIB	72°C	30s	$\downarrow$	סווח
Finale Elongation	IL-10, RAG	72°C	5min		
	RIIB	72°C	10min		
Ende	alle	4°C	unendlich		

## Temperaturprogramme der verschiedenen PCR

Tabelle 5: Temperaturprogramme der verschiedenen Typisierungs-PCR

## 3.2.2.3. Gel-Elektrophorese

Das 2%ige PCR-Gel wurde aus 2g Agarose, die in 100ml 1xTAE-Puffer gelöst wurde, hergestellt. Nach dem Aufkochen wurden 5  $\mu$ l Ethidiumbromid zugesetzt und in eine entsprechende Form ausgegossen. Nach dem Aushärten des Gels wurden die DNS-Proben (20  $\mu$ l DNS mit jeweils 2  $\mu$ l Orange G-Ladepuffer (10x)) sowie der DNS-Gewichtsmarker VI (2  $\mu$ l DNS-Marker VI + 2  $\mu$ l Orange G-Ladepuffer + 16  $\mu$ l Aqua bidest.) als Größenstandard aufgetragen.

Es erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben entsprechend ihrer Fragmentlänge (siehe Tabelle 6) in einer Elektrophoresekammer mit 1xTAE als Laufpuffer bei 140V über eine Stunde.

Mittels des UV-Transilluminators wurden die entstandenen Banden bei 312nm sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte anhand der Basenpaargröße mit Orientierung am DNA-Marker VI (siehe Abbildung 4 und Tabelle 6).

Gen	Genotyp	Fragmentlänge in Basenpaaren (bp)	
	+/+	200 bp	
IL-10	+/-	450 bp + 200 bp	
	-/-	450 bp	1033
	+/+	474 bp	
RAG	+/-	530 bp + 474 bp	2% Agarose Gel
	-/-	530 bp	Abbildung 4: DNA-Marker
	+/+	430 bp	Divitiviance
RIIB	+/-	430 + 300bp	
	-/-	300 bp	

Tabelle 6: DNA-Typisierung nach Fragmentlänge in bp

VI

## 3.2.3. Mauskreuzung



# Abbildung 5: Kreuzungsplan

Ziel war es, 5-10 Mäuse der entsprechenden Genotypen (IL-10+/+RIIB-/-, IL-10-/-RIIB-/-, IL-10+/-RIIB-/-, IL-10-/-RIIB+/+) zur weiteren Analyse zu erhalten. Die Bestimmung des Genotyps erfolgte über PCR der Schwanzspitzenbiopsien (SSBP) jeweils im Alter von ca. 1 Monat. Die Generationszeit betrug im Schnitt 3-4 Monate. Pro Paarung waren 3-7 Nachkommen zu erwarten. Aus der Kreuzung der F0 der Gruppe A (Kreuzungsziel RIIB-/-IL-10-/-) entstanden Nachkommen (F1) des Genotyps RIIB+/- IL10+/-. Nach Bestätigung des Genotyps über PCR der SSBP wurden die Mäuse der F1 untereinander verpaart. Es entstanden die F2 RIIB+/+IL10-/-, RIIB+/+ IL10+/-, RIIB+/+IL10+/+, RIIB+/-IL10+/+, RIIB+/-IL10+/-, RIIB+/-IL10-/-, RIIB-/-IL10+/+, RIIB-/-IL10+/- und RIIB-/-IL10-/-, wobei pro Kreuzung maximal ein Nachkomme den Genotyp RIIB-/-IL10-/- aufwies. Im weiteren Verlauf wurden die heterozygoten IL-10+/- und RIIB+/- Mäuse sowie die homozygoten RIIB-/-IL10-/untereinander weiter gekreuzt. Letztlich wurden die Mäuse der F4/F5 (Genotyp RIIB-/-IL10-/-, RIIB-/-II10+/-, RIIB-/-IL10+/+, RIIB+/+IL10-/-) für die weitere Analyse genutzt.

Die Kreuzung B (Kreuzungsziel: RIIB-/-RAG-/-IL-10-/-) erfolgte analog, wobei die RAG-/- defizienten Tieren nicht weiter verwendet wurden, da die Genehmigung des

Gesundheitsministeriums zur Bestrahlung dieser Tiere, die für das folgende Experiment geplant war, nicht erfolgte.

# 3.2.4. **Tierexperimentelle Methoden**

## 3.2.4.1. Abbruchkriterien

Bei Erfüllung der Abbruchkriterien wurden die Mäuse für die weiteren Untersuchungen in die Laborräume des DRFZ verbracht. Unter Berücksichtigung der "Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere" definierten wir folgende Abbruchkriterien [104]:

- Abnahme des Körpergewichtes (um 20% des Ausgangsgewichts)

- Strubbeliges Fell
- Gekrümmter Rücken
- Verstärkte Atmung
- Krämpfe, Torkeln
- Schwellungen, Neubildungen
- Verletzungen, Hautveränderungen
- Hautfalten bleiben stehen
- Tier vermeidet Bewegungen, Schmerzen beim Anfassen

## 3.2.4.2. Untersuchung auf Proteinurie und Leukozyturie

Die benötigten Urinproben wurden (bei Vorliegen o.g. Abbruchkriterien) spontan oder durch leichten Druck auf den Unterbauch unmittelbar vor dem Töten der Tiere gewonnen.

Die Bestimmung von Proteinurie und Leukozyturie erfolgte semiquantitativ mit Urinteststreifen (Medi-Test Combi 6).

Abstufungen für Proteinurie: 0mg/dl, Spur, 30mg/dl, 100mg/dl, 300mg/dl; Abstufungen für Leukozyturie: 0mg/dl, Spur, 70mg/dl, 100mg/dl.

## 3.2.4.3. Blutentnahme zur Auto-Antikörperbestimmung

Vor der Blutentnahme wurden die Tiere 2-5 min mit Rotlicht bestrahlt und in einer Metallhalterung fixiert. Die Blutentnahme erfolgte aus der Schwanzvene, die mit einem Skalpell geritzt wurde. Das Blut wurde in Eppendorf-Gefäßen mit 10 µl Heparin aufgefangen, bei 3000rpm über 8 Minuten zentrifugiert und das Serum für den späteren Autoantikörper-ELISA bei -20°C eingefroren.

## 3.2.4.4. **Organpräparation**

Die Mäuse wurden im Anschluss an die Blutentnahme durch cervikale Dislokation getötet und anschließend das Fell mit 70% Ethanol desinfiziert. Fell und Unterhaut wurden von der Körperfaszie getrennt, es erfolgte die Eröffnung der Bauchhöhle und Entnahme von Milz und Nieren.

## <u>Milz</u>

Die Milz wurde in ein FalconTube mit PBS/BSA/EDTA gegeben, ausgemessen (siehe Abbildung 6) und kühl bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Die Milz wurde zur Gewinnung der Splenozytensuspension mit dem Kolben einer 5ml-Spritze durch ein Zellsieb (Falcon CellStrainer) mit einem Porendurchmesser von 70µm gedrückt. Im Anschluss wurde die Zellsuspension 8 Min. bei 1300rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das verbleibende Zellpellet wurde zur Entfernung der Erythrozyten mit 2ml Erylyse resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Erylysepuffer ist eine hypotone Salzlösung, die, gemäß des Prinzips der Osmose, einen Wassereinstrom in die Erythrozyten bewirkt, so dass diese platzen; die übrigen Zellen bleiben nahezu unversehrt. Nach der angegebenen Zeit wurden 10ml PBS/BSA/EDTA zugegeben und nochmals 6 min bei 1300rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Splenozyten in 5ml PBS/BSA/EDTA aufgenommen.



Abbildung 6: Vermessung der Milzgröße

## <u>Nieren</u>

Die Nieren wurden in 25ml Falcon Tubes mit 4%igem Formaldehyd überführt und bis Paraffineinbettung im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt. zur Die Einbettung und weitere Untersuchung auf zelluläre Infiltrate erfolgte in der der Charité Universitätsmedizin Berlin, wo Frau Kühl Pathologie Dr. freundlicherweise die histopathologische Analyse durchführte. Für die Bestimmung struktureller Veränderungen in den Nierentubuli und -glomeruli wurden die Nierenschnitte einer Periodsäure-Schiff-Färbung (PAS) und Hämatoxylin-Eosin-Bei der PAS-Färbung werden glykogenhaltige Färbung (HE) unterzogen. Bestandteile angefärbt und Kohlenhydrate oxidiert, wobei die entstehenden Aldehydgruppen rot, die Zellkerne blau und die Basalmembranen leuchtend rot erscheinen. Bei der HE-Färbung werden die Zellkerne durch den basischen Farbstoff Hämatoxylin blau und das Zytoplasma durch den sauren Farbstoff Eosin rot gefärbt. Die vorliegenden Schnitte wurden dann auf das Vorliegen zellulärer Infiltrate in den Glomeruli (Abstufungen: vorhanden (+), nicht vorhanden (-), nicht auswertbar (?)) ausgewertet.

## 3.2.4.5. Zellzählung

Zur Bestimmung der Zellzahl der Milzen wurden auf 10µl Zellsuspension je 90µl Trypanblau zugegeben (entspricht einer Verdünnung von 1:10). Von der Lösung wurden 10µl auf einem Deckplättchen in eine Neubauer Zählkammer gegeben. Es wurden jeweils 2 Großquadrate ausgezählt und das arithmetische Mittel gebildet. Die Berechnung der Milzzellzahl erfolgte nach der Formel:

Zellzahl der Milz / ml = Mittelwert x 10 (Verdünnungsfaktor der Lösung) x 10<sup>4</sup> Gesamtzahl der Milzzellen = Zellzahl der Milz/ml x Ausgangsvolumen in FalconTube

## 3.2.5. **MACS**

## 3.2.5.1. Allgemeines

Es handelt sich um ein magnetisches Verfahren zur Auftrennung verschiedener Zellpopulationen [106],[107]. Dabei werden paramagnetische Partikel mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenantigene beschichtet. Für diese Arbeit wurden MicroBeads der Firma Miltenyi Biotec (50nm große mit monoklonalen Antikörpern

beschichtete paramagnetische Partikel) verwendet. Nachdem die MicroBeads an die Oberflächenproteine der spezifischen zu sortierenden Zellpopulation einer Lösung gebunden haben, wird die Suspension auf eine mit Stahlwolle gefüllte Säule gegeben. Nach Anlegen eines entsprechend starken Magnetfeldes werden die paramagnetischen Partikel an die Stahlwolle gebunden.

Dementsprechend ist sowohl eine Negativselektion der nichtgebundenen Zellen, die die Säule passieren, als auch eine Positivselektion der gebundenen Zellen möglich, die nach Entfernen des elektrischen Feldes wieder freigesetzt werden.

Da die Microbeads sehr klein sowie "bioverträglich" sind und die gesamte Prozedur kurz und unkompliziert ist, bleibt die Lebensfähigkeit und Funktion der aufgetrennten Zellen erhalten.



Abbildung 7: Prinzip MACS

## 3.2.5.2. CD43-B-Zell-Depletion

Für den folgenden Versuch wurden die Zellen nach dem Oberflächenprotein CD43 aufgetrennt. CD43 wird von allen Leukozyten, außer unreifen und ruhenden B-Zellen, präsentiert. Dementsprechend werden die ruhenden B-Zellen negativ selektiert, wohingegen alle anderen Leukozyten der Zellsuspension positiv selektiert werden und an der Magnetsäule haften bleiben. Die Splenozytensuspension (siehe 3.2.4.4) wurde 5 Minuten bei 1300rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die CD43 MicroBeads (10µl/10Mio. Gesamtzellen) zugegeben.

Nach 15minütiger Inkubation des Ansatzes im Kühlschrank (4°C), wurde 1ml PBS/BSA zum Auswaschen nicht gebundener MicroBeads zugegeben und nochmals

5 Min. bei 2000rpm zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das verbleibende Pellet in 1ml PBS/BSA resuspendiert. Die MACS LS-Säulen wurden in das Magnetfeld des MACS Seperators eingebracht und mit 3ml PBS/BSA benetzt. Im Anschluss wurde die präparierte Zellsuspension in die MACS LS-Säule gegeben. Nach dem Durchlaufen der Proben über die Säule wurde der Überstand aufgefangen und nochmals 2x mit 3ml PBS/BSA-Pufferlösung gespült. Für das nachfolgende Experiment wurden nur die negativ-selektierten (Fraktion 2 nach Eluation), ruhenden (CD43<sup>-</sup>) B-Zellen verwendet. Die CD43<sup>+</sup> Leukozyten wurden verworfen.

Im Anschluss erfolgte die Zellzählung der Negativselektion (siehe 3.2.4.5), entsprechend der Anzahl der ruhenden B-Zellen. Zur Kontrolle der Reinheit der B-Lymphozyten erfolgte die FACS-Messung nach Färbung mit CD19-APC, einem Oberflächenprotein, welches von B-Zellen exprimiert wird.

# 3.2.6. FACS (Fluorescence-activated cell sorter)

## 3.2.6.1. Allgemeines Prinzip

Mit Hilfe des FACS lassen sich einzelne Zellpopulationen durch fluoreszenzmarkierte monoklonale Antikörper, die an die Oberflächenproteine der Zellen binden, differenzieren [107].

Dazu werden gemischte Zellpopulationen zunächst mit, für die verschiedenen Oberflächenmoleküle der Subpopulationen spezifischen, monoklonalen Antikörpern, die an Fluoreszenzfarbstoffe (sog. Fluorochrome) gebunden sind, markiert.

Fluorochrome sind photoaktive Stoffe, die Licht spezifischer Wellenlänge emittieren, wenn sie mit monochromatischem Licht angeregt werden.

Die markierten Zellen werden im FACS-Gerät in einer Salzlösung aufgenommen und durch eine Kapillare gepresst. Es entsteht ein Strahl aus einzelnen Zellen, der von einem Laserstrahl abgetastet wird. Das Licht wird dabei je nach Zellgröße und Partikelgehalt der Zellen jeweils unterschiedlich gestreut und von Photodetektoren (Forward- und Sideward-Scatter) registriert. Damit gelingt eine Differenzierung nach Granularität der Zellen. Des Weiteren Größe und werden die o.q. Fluoreszenzfarbstoffe angeregt, sodass Zellen, die diese Farbstoffe über die spezifischen Antikörper gebunden haben, Licht der spezifischen Wellenlänge emittieren, welches ebenfalls von Photodetektoren gemessen wird. Demzufolge gelingt eine weitere Differenzierung der Zellen nach den, mit verschiedenen Fluoreszenzantikörpern markierten, Oberflächenproteinen.

Die Informationen werden elektronisch analysiert, sodass aus einem Zellgemisch einzelne Zellen mit bestimmten Eigenschaften abgetrennt und die Expressionsrate verschiedener Oberflächenmoleküle auf der Zelloberfläche dargestellt werden kann. Bei mehreren untersuchten Oberflächenproteinen wird üblicherweise die Darstellung in einem DotPlot gewählt. Dabei entspricht jede fluoreszenzmarkierte Zelle einem Punkt. Bei der Analyse einer großen Zellzahl repräsentiert die Farbdichte farbiger DotPlots die gemessene Zelldichte. Anhand der Zelldichte ist es dann möglich, bestimmte Zellsubpopulationen zu identifizieren und durch Anlegen sogenannter Gates getrennt voneinander zu analysieren.



Abbildung 8: Prinzip eines FACS-Gerätes [107]

# 3.2.6.2. Verwendete (Oberflächen-) Rezeptoren

## <u>CD3</u>

CD3 ist essentieller Teil des T-Zell-Rezeptor- (TCR)-Komplexes und somit auf allen T-Zellen vorhanden. Die  $\alpha$ -Kette des TCR interagiert dabei mit der  $\epsilon$ - und der  $\delta$ -Kette, die  $\beta$ -Kette des TCR mit dem  $\gamma$ -/ $\epsilon$ -Dimer des CD3-Moleküls. Nach Bindung eines Peptid-MHC-Komplexes an den TCR sowie costimulatorischer Moleküle (CD4 bzw. CD8) werden über intrazelluläre Tyrosinkinasen des TCR die Effektorfunktionen vermittelt [108].

## <u>CD4</u>

CD4 ist der Co-Rezeptor für MHC-II-Moleküle und wird von T-Helferzellen (Th1 und Th2) exprimiert.

## <u>CD8</u>

CD8 wird von zytotoxischen T-Zellen exprimiert und ist Co-Rezeptor für MHC-I-Moleküle.

## <u>CD19</u>

CD19 ist ein Transmembranglykoprotein, das zu der Ig-Familie gehört [109]. Es wird nahezu ausschließlich auf follikulären dendritischen Zellen und B-Zellen exprimiert. CD19 ist nahezu während des gesamten Reifungsprozesses der B-Zellen nachweisbar, die Expression geht erst während der Entwicklung zur Plasmazelle zurück. Als B-Zell-Corezeptor (gemeinsam mit CD21, CD81 und CD225) hat es substanzielle Funktionen in B-Zell-Homöostase, -Aktivierung und –Differenzierung. Aufgrund der nahezu ausschließlichen Expression auf B-Zellen ist es geeignet, die B-Zellen in der Durchflusszytometrie von den anderen Zellen abzugrenzen.

## <u>CD25</u>

CD25 ist die α-Kette des IL-2-Rezeptors. Da natürliche Treg CD25 in starkem Maß exprimieren, ist es oft üblich die CD4+ T-Zellen, die CD25 exprimieren als Treg zu bezeichnen [110]. Allerdings entspricht das nicht ganz den Tatsachen, denn CD25 wird auch von aktivierten T-Zellen exprimiert [111]. Das zeigt, dass die Population der CD4+CD25+ T-Zellen sehr heterogen ist.

## <u>CD44</u>

CD44 ist ein Glykoprotein, das an der Zelloberfläche exprimiert wird und als Rezeptor für Hyaluronsäure, Matrixproteasen und Kollagene an der Zell-Zellbindung, Adhäsion und Migration beteiligt ist. Daher spielt CD44 eine große Rolle bei Prozessen wie Lymphozyten-Homing, -Rezirkulation und –Aktivierung.

Im Rahmen dieser Arbeit wird CD44 vor allem als Marker für murine Gedächtniszellen verwendet. "Gedächtnis" heißt dabei in Bezug auf das Immunsystem, dass ein Lebewesen schneller, gezielter und stärker bei Reexposition mit dem gleichen Ag reagieren kann.

Murine Gedächtniszellen exprimieren CD44 in starkem Maße, wohingegen Aktivierungsmarker wie CD25 nur schwach exprimiert werden. Gedächtniszellen können leichter als naive Zellen aktiviert werden, benötigen für die optimale Antwort (auch bei niedrigen Ag-Konzentrationen) aber ebenfalls ein costimulatorisches Signal [112]. Sie können bei Abwesenheit des Ag als "ruhende" Zellen überleben, erneuter Ag-Kontakt führt zu Proliferation und zu effektiverer Antwort auf das Ag.

## <u>CD62L</u>

CD62L gehört zur Gruppe der Adhäsionsmoleküle. Es spielt eine wesentliche Rolle bei der Wanderung von T-Zellen ins entzündete Gewebe durch Vermittlung der Bindung an HEV (high epithelial venules) und Epithelien inflammatorischen Gewebes [113]. Nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors wird CD62L, unter Mitwirkung eines Dysintegrins und einer Metalloendoprotease, von der Oberfläche der T-Zelle entfernt. Dadurch kann sich die T-Zelle wieder lösen und in den Blutstrom eintreten [114].

Die beschriebene Bedeutung für das Homing der Lymphozyten ins entzündete Gewebe wird durch Experimente an CD62L-defizienten Mäusen gezeigt. Diese zeigen nach einem entzündlichen Stimulus deutlich verminderte Einwanderung von Lymphozyten und Monozyten in das entzündete Peritoneum [115].

Da CD62L nach Aktivierung des TCR von der Zellmembran entfernt wird, dient es zur Unterscheidung von naiven (CD62L+) von Effektor-T-Zellen (CD62L-).

## <u>CD69</u>

CD69 ist ein Molekül, das durch Zellaktivierung induziert wird. Es wird in der frühesten Phase (nach wenigen Stunden) der Aktivierung gebildet. CD69 gehört zu den Typ-II Transmembranglykoproteinen mit einer C-Typ-Lektin- Bindungsstelle am extrazellulären Ende des Moleküls [116]. Seine Expression wird auf den meisten hämatopoetischen Stammzellen (T-/ B-Lymphozyten, NK-Zellen sowie auf murinen Makrophagen, Neutrophilen, Eosinophilen und Granulozyten) durch Aktivierung induziert, während es konstitutiv auf der Oberfläche humaner Monozyten, Thrombozyten und Langerhanszellen der Epidermis vorhanden ist. Studien weisen darauf hin, dass CD69 in die Pathogenese einiger Immunerkrankungen wie Rheumatoidarthritis, Asthma bronchiale, Autoimmunhepatitiden und AIDS involviert ist [116, 117]. In ruhenden Lymphozyten ist das CD69-Molekül nicht auf der Oberfläche vorhanden, sondern in der Zelle lokalisiert, kann jedoch nach Aktivierung sehr schnell an die Zelloberfläche transportiert werden, da diese Translokation nicht von einer Proteinneusynthese von CD69 abhängig ist, weil es bereits im Zytoplasma in einer Golgi-Struktur gespeichert wird [118]. CD69 ist der früheste Marker, der auf der T-Zellmembran nach Stimulation mit Anti-CD3, PMA oder mitogenen Lektinen exprimiert wird. Auch das costimulatorische Signal der Bindung von Anti-CD28 induziert die CD69-Expresion auf T-Lymphozyten durch Induktion eines extrazellulären Ca2+-Einstroms und der damit verbundenen Aktivierung einer Tyrosinkinase [119].

## <u>CD138</u>

CD 138 ist ein Transmembranprotein, welches als Transmembranrezeptor agiert und in Funktionen wie Zell-Matrix-Interaktionen, Zellproliferation und -migration involviert ist [120]. Neben reifen Epithelzellen exprimieren besonders Plasmazellen CD138 in hoher Konzentration, weshalb es zu deren durchflusszytometrischer Identifikation sehr geeignet ist.

## <u>lgD</u>

IgD wird gemeinsam mit IgM auf den meisten reifen B-Lymphozyten exprimiert, wohingegen Plasmazellen kein IgD mehr aufweisen [124]. Während IgM bereits von den unreifen Vorstufen der B-Zellen exprimiert wird, erscheint IgD erst auf der Oberfläche reifer B-Zellen. Nur ein sehr kleiner Anteil von B-Zellen exprimiert IgD ohne IgM. Diese B-Zellen scheinen vor allem in der Mucosa des Respirationstraktes vorzukommen; sie aktivieren basophile Granulozyten durch IgD-Quervernetzung, wirken also proinflammatorisch im Respirationstrakt. Dysfunktionen wie das Hyper-IgD-Syndrom, weisen darauf hin, dass IgD eine Rolle in der Homöostase des Immunsystems spielt [121]. IgD wird in dieser Arbeit als Marker für naive B-Zellen verwendet (CD19+IgD+).

## 3.2.6.3. Unterteilung der verschiedenen FACS-Panel

Es wurden folgende Panels für die FACS-Analyse gewählt. Die verwendeten Antikörper sind unter 3.1.5 beschrieben.

Oberflächen-Antigene			Intrazelluläre Antigene	Zytokine
Panel 1	Panel 2	Panel 3	Panel 4	Panel
(entsprechend	(Memory-T-Zellen,	(B-Zell-	(regulatorische	PMA/lono
Differenzierung	T-Helferzellen,	Differenzierung)	T-Zellen)	
der T-/ B-Zellen)	naive T-Zellen)			
CD3	CD44	lgD	CD69	IFN-γ
CD4	CD4	CD138	CD4	CD4
CD8	CXCR3	CD19	CD25	IL-10
CD19	CD62L		FoxP3	IL-4

Tabelle 7: FACS-Panel

Es wurde ein Mastermix aus den fluoreszenzmarkierten Antikörpern (siehe Tabelle 3, Seite 34) gepuffert in je 800μl PBS/BSA und je 8μl Fcγ-Block (zur Blockierung unspezifischer AK-Bindung über den Fc-Rezeptor) angesetzt. Für die Färbungen wurden je 500.000 Zellen verwendet, mit PBS/BSA auf 1,5ml aufgefüllt und 5 Min. bei 4°C und 2000rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt. Das Pellet wurde in 100μl Mastermix resuspendiert. Im Anschluss erfolgte die Antikörper-Antigenkonjugation durch Inkubation im Dunklen bei 4°C über 30 Min. Der sich anschließende Waschschritt diente der Entfernung ungebundener Ak. Dazu wurden 300μl PBS/BSA zugegeben, 5 Min. bei 4°C und 2000rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das verbliebende Pellet wurde in 200μl PBS/BSA resuspendiert und bis zur folgenden FACS-Analyse kühl (4°C) und lichtgeschützt aufbewahrt.

## 3.2.6.4. Färbung der intrazellulären Moleküle (FoxP3)

Für die Färbung von intrazellulären Molekülen sind zwei zusätzliche Bedingungen nötig:

Erstens wird die Antikörperlösung mit Saponin angesetzt. Dieses verursacht eine Perforation der Zellmembran, sodass die Farbstoffe ins Zellinnere gelangen und intrazelluläre Proteine gefärbt werden können. Durch einen weiteren Waschschritt wird das Saponin wieder entfernt, die Zellporen schließen sich und eine zusätzliche Anfärbung von Oberflächenmarkern ist möglich.

Zweitens müssen die Zellen zum Anfärben intrazellulärer Moleküle fixiert (PFA) sein. Für die FoxP3-Färbung (Panel 4) wurde anstelle von Saponin ein fertiges Permeabilisierungs-/Fixierungs-Set der Firma eBioscience verwendet.

## Färbung Panel 4

Zunächst erfolgte wie oben beschrieben die Färbung der Oberflächenmoleküle (CD69, CD4, CD25). Im Anschluss wurden 100µl der Permeabilisierungs-/Fixierungslösung (25µl Fixierungs-/Permeabilisierungskonzentrat und 75µl Fixierungs-/Permeabilisierungsdiluent) zugegeben und das Pellet mithilfe des Vortex-Gerätes gelöst, 30Min bei 4°C inkubiert und mit 100µl Permeabilisierungspuffer gewaschen. Es wurde der FoxP3-PE-Antikörper zugegeben und erneut 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Nach 2 anschließenden Waschschritten mit je 100µl Permeabilisierungspuffer wurde das Zellpellet in 300µl PBS/BSA/Azid resuspendiert und bis zur FACS-Analyse kühl (4°C) und dunkel gelagert.

## 3.2.6.5. Stimulation der Zellen zur Zytokinproduktion

Durch PMA/Ionomycin wird die Stimulation und Costimulation des T-Zellrezeptors simuliert. Dementsprechend werden bei Zugabe dieser beiden Chemikalien in einem RPMI-Zellkulturmedium alle T-Zellen, unabhängig von ihrer Rezeptorspezifität, zur Zytokinproduktion angeregt. Um zu verhindern, dass die produzierten Zytokine sezerniert werden, wurde nach 2 Stunden Brefeldin A zugesetzt, welches die Funktion des Golgi-Apparates und des Endoplasmatischen Retikulums stört, sodass die entstandenen Zytokine in den Zellen verbleiben, wo sie nach entsprechender Fixierung für die FACS-Analyse zugänglich sind.

Erneut wurden 500.000 Zellen pro FACS-Messung verwendet. Es erfolgte jeweils die Dreifachbestimmung einer Positivgruppe (PMA/Iono-stimuliert) und einer Negativgruppe (unstimuliert).

Die Zellen wurden in eine Zellkulturplatte mit je 150µl Zellkulturlösung steril pipettiert. Der Positivgruppe wurde PMA/Iono in 1:1000 Verdünnung zugesetzt und die Proben 2 Stunden im Zellkulturschrank inkubiert. Nach Zugabe von 3µl Brefeldin A erfolgte die nochmalige 2-stündige Inkubation, bevor die Zellen mit 2%PFA fixiert wurden und für die folgende intrazelluläre Färbung zur Verfügung standen.

Nach Zentrifugation der Kulturplatte bei 1300rpm über 2 Min wurde der Überstand verworfen und die entsprechenden fluoreszenzmarkierten Antikörper in je 100µl Saponin sowie Fcγ-Block (1:100 verdünnt) zugesetzt, 15 Minuten im dunklen Kühlschrank inkubiert, 2 Min bei 1300rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen, das Pellet in 100µl PBS/BSA/Azid pro Well aufgenommen und bis zur FACS-Messung kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

#### 3.2.6.6. Gating

Nach der durchflusszytometrischen Analyse wurden die erhaltenen Daten mithilfe des Programms FlowJo 7.5.5. ausgewertet. Dafür wurden sogenannte DotPlots verwendet, in denen Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht zueinander in Beziehung gesetzt werden. Jeder dargestellte Punkt entspricht mindestens einer Zelle bzw. zwei Zellen mit gleichen Eigenschaften. Um die Zelldichte genauer auswerten zu können, kamen außerdem farbige Dichte-DotPlots (wobei die Farbintensität der Zelldichte entspricht) und Histogramme zum Einsatz.

## Lymphozytengate

Zunächst wurden im Dichte-DotPlot des Vorwärts-/Seitwärts-Scatters die interessierenden Lymphozyten anhand der charakteristischen Größe und Granularität von anderen Zellen, Zelltrümmern und Artefakten abgegrenzt (siehe Abbildung 9).



Abbildung 9: Lymphozytengate

## Weiterführende Analyse der Lymphozytenpopulationen

Ausgehend von den Lymphozyten wurden anhand der entsprechenden Färbungen in den Kanälen FL1-4 die weiteren Unterdifferenzierungen im Dotplot vorgenommen:

## Panel 1:

Zunächst wurde nach T-/B-Lymphozyten anhand von CD3 und CD19 differenziert (siehe Abbildung 10).

Im CD3-Gate wurde dann weiter in CD4 und CD8 aufgetrennt, sodass im DotPlot die Populationen CD3+CD19- (T-Zellen), CD3+CD19-CD4+(T-Helferzellen), CD3+CD19-CD8+ (zytotoxische T-Zellen) und CD3-CD19+ (B-Zellen) analysiert werden konnten.

## Panel 2:

Die CD4+ Zellen wurden identifiziert (siehe Abbildung 11). Im CD4-Gate wurden dann die Fraktionen mittels Dotplot der CD4+CD44+T-Zellen (T-Gedächtniszellen) und CD4+CD44- (naive T-Zellen) unterschieden. Die T-Gedächtniszellen wurden im Dotplot weiter hinsichtlich der Expression von CD62L zentrale Gedächtnis-T-Zellen in (CD4+CD44+CD62L+)und Effektor-T-Memoryzellen (CD4+CD44+CD62L-)



Abbildung 10: Differenzierung der Lymphozyten nach CD3/CD19





unterschieden. Schließlich wurden die letztgenannten beiden Populationen hinsichtlich der Expression des Aktivierungsmarkers CXCR3 in aktivierte T-Effektor-Gedächtniszellen (CD4+CD44+CD62L-CXCR3+) und aktivierte zentrale Gedächtniszellen (CD4+CD44+CD62L+CXCR3+) aufgetrennt.

**Panel 3:** Es wurde nach CD19 gegatet (B-Zellen). Die B-Zellen wurden dann im IgD-Gate mittels Anlegen von Quadranten in naive B-Zellen (CD19+IgD+CD138-) und Plasmazellen (CD19+IgD-CD138+) unterteilt. **Panel 4:** Im CD4-Gate wurde analog zu den vorherigen Panels mittels Quadrantenanalyse die Zahl der aktivierten T-Helferzellen entsprechend der Expression von CD69 (CD4+CD69+) bestimmt. Des Weiteren wurden die CD4+-T-Zellen auf CD25 gegatet. Die Fraktionen der ermittelten CD4+CD25+ und CD4+CD25- wurden nochmals mittels Expression von FoxP3 in natürliche regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+FoxP3+), "atypische" regulatorische T-Zellen (CD4+CD25-FoxP3+) und aktivierte nicht-regulatorische T-Zellen (CD4+CD25+FoxP3-) unterteilt.

**Panel PMA/Iono**: Die stimulierten und unstimulierten Fraktionen (siehe 3.2.6.5) wurden getrennt analysiert. Es wurde jeweils die Fraktion der Zytokin-produzierenden T-Helferzellen mittels Gating auf IL-10, IL-4 und IFN-γ ermittelt. Zur Analyse kamen: CD4+IL-10+ (entsprechend IL-10 produzierenden T-Helferzellen), CD4+IL-4+, CD4+IFN-γ+ sowie CD4+IL-10+IL-4+ (gleichzeitig IL-4 und IL-10 produzierende T-Helferzellen) und CD4+IL-10+IFN-γ+ (gleichzeitig IL-10 und IFN-γ produzierende T-Helferzellen).

# 3.2.7. Autoantikörper-ELISA

## 3.2.7.1. Allgemeines

Das Verfahren dient der Bestimmung der Antikörperkonzentration (hier anti-ds-DNS-Ak bzw. anti-SmD1-Ak). Eine Lochplatte wird mit dem korrelierenden Antigen beschichtet und die zu bestimmenden Proben unbekannter Antikörperkonzentration



A) Autoantikörper werden auf mit Antigen beschichtete Platte gegeben

B) Nach Inkubation / Waschen sind Autoantikörper fest an Antigen gebunden

- C) Enzym-gekoppelter Nachweisantikörper bindet an Autoantikörper
- D) Chromogenes Substrat wird zugegeben
- E) Enzym setzt Substrat zu farbigem Produkt um (Farbintensität entsprechend Menge an gebundenem Antikörper

Abbildung 12: Schematische Darstellung eines Autoantikörper-ELISA

zugegeben. Eine Verdünnungskurve wird erstellt, indem Proben bekannter Konzentration aufgetragen werden. Nach Blockierung unspezifischer Bindungen wird die Platte inkubiert. Im Anschluss werden nicht-gebundene Antikörper in einem Waschschritt entfernt. Die an die Antigene gebundenen Antikörper bleiben in den Wells haften.

Nun werden Nachweisantikörper, die an ein Enzym gebunden sind, zugesetzt. Diese Nachweisantikörper binden an murines IgG. Es wird nochmals inkubiert und anschließend nicht-gebundene Nachweisantikörper ausgewaschen. Jetzt sind die gebundenen Antikörper indirekt über die Nachweisantikörper mit einem Enzym (hier Meerrettich-Peroxidase) verbunden. Dieses Enzym katalysiert eine Farbreaktion. Nach Zugabe des farblosen Substrates wird dieses durch das gebundene Enzym in ein farbiges Produkt umgesetzt. Nach einem definierten Zeitraum wird die Farbreaktion durch Zugabe von Säure, z.B. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (das Enzym ist pH-abhängig) gestoppt (siehe Abbildung 12).



Photometrisch kann die jetzt Farbintensität der Proben gemessen werden, welche proportional der Menge gebundener Antikörper ist. Anhand der Proben bekannter Antikörperkonzentration kann eine Standardkurve (Farbintensität im



Verhältnis zu Antikörperkonzentration (siehe Abbildung 13) erstellt werden. Anhand dieser Standardkurve kann mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes auf die Ak-Konzentrationen der Proben zurückgerechnet werden:

 $E = lg\left(\frac{l_0}{l_1}\right) = \varepsilon^* c^* d$ (E: Extinktion,  $\varepsilon$ : Extinktionskoeffizient,  $I_0$ : Intensität des einfallenden Lichtes,  $I_1$ : transmittiertes Licht, d: Schichtdicke der Küvette, c: Konzentration der Lösung)

## 3.2.7.2. **Ds-DNS-ELISA**

a) <u>Coating:</u> Zunächst wurden hochbindende 96-Well Polystyren-ELISA-Platten mit ds-DNS beschichtet (Coating). Für die DNS-Bindung am Plattenboden wurden zunächst 100µl methyliertes PBS/BSA (1mg/ml methyliertes BSA pro ml PBS) pro Well pipettiert und die Platten erst 2 Stunden bei Raumtemperatur, dann 1 Tag im Kühlschrank inkubiert.

Die Platten wurden abgekippt und 3mal mit 100µl PBS (0,1%) Tween pro Well gewaschen.

Im Anschluss wurden je 100µl der ds-DNS-Lösung (1mg/1ml) in PBS zugegeben und erneut 2 Stunden bei Raumtemperatur und 24 Stunden im Kühlschrank inkubiert, die Platten danach abgekippt, ausgeschlagen und bis zur Verwendung eingefroren.

b) <u>ELISA:</u> Platten und Proben (Mausseren s. 3.2.4.3) wurden aufgetaut. Die Platten wurden 3mal mit PBS/0,05% Tween gewaschen, mit 200µl RPMI/FCS 10% pro Well über 60 Minuten bei Raumtemperatur geblockt. Dann wurden die Platten abgekippt, 2mal mit PBS/Tween gewaschen, ausgeklopft und Proben und Standardkurve (je 100µl/Well) wie folgt aufgetragen:

- Proben (Doppelbestimmung) in 1:100 Verdünnung (1µl Serum auf 100µl PBS/BSA 1%)
- Standardkurve: High Standard 20µg/ml murine anti-ds-DNS-IgG wurden als 1:2 Verdünnungsreihe in 8 Wells pipettiert (erste Probe unverdünnt, achte Probe 1:128 verdünnt)
- Leerwert: PBS/0,05% Tween

Die Platten wurden 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Plattenrüttler inkubiert und im Anschluss erneut 3mal mit PBS/0,05%Tween gewaschen und ausgeklopft. Dann wurden je 100µl Nachweisantikörperlösung pro Well (αmurines-IgG-HRP (1:5000 in PBS/1%BSA verdünnt)), aufgetragen und nochmals 2 Stunden inkubiert. Nach einem letzten Waschschritt mit 3mal PBS/0,05%Tween wurden unter halbdunklen Arbeitsbedingungen in iedes Well 100µl Substratlösung pipettiert. Sobald eine leichte Blaufärbung auftrat wurden je 100µl Stopplösung zugesetzt, die optische Dichte (OD) der Proben am Photometer bestimmt und mithilfe der Auswertungssoftware SoftMax Pro Version 5.0.1 (Molecular Devices) die Antikörperkonzentration ermittelt.

## 3.2.7.3. SmD1<sub>(83-119)</sub>-ELISA

- a) <u>Coating</u>: 50µl einer 0,5% Lösung SmD1<sub>(83-119)</sub> in Carbonatpuffer wurden in jedes Well gegeben und die Platten 8 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden sie abgekippt und bis zur weiteren Verwendung eingefroren.
- b) ELISA: Platten und Seren wurden aufgetaut, die Platte 3mal mit (je 100µl/Well) PBS/(0,1%) Tween gewaschen und im Anschluss eine Stunde bei Raumtemperatur mit RPMI/(10%)FCS geblockt. Dann wurden die Platten abgekippt und die Proben in Doppelbestimmung analog zum ds-DNS-ELISA aufgetragen. Als Standardkurve wurde murines anti-SmD1-IgG ebenfalls analog zur Eichkurve beim ds-DNS-ELISA in entsprechender Verdünnungsreihe aufgebracht. Die Leerwertbestimmung erfolgte mit PBS/(0,1%) Tween. Nach 2stündiger Inkubation folgten die Waschschritte, das Aufbringen der Nachweisantikörper, der Substratlösung und die photometrische Messung wie bereits beim ds-DNS-ELISA beschrieben.

Da bei der Auswertung keine Standardkurve erstellt werden konnte, musste auf die Auswertung der SmD1-Ak im Serum der Tiere verzichtet werden.

# 3.2.8. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit GraphPad Prism (Version 5.02 (GraphPad Software, Inc.)) sowie Microsoft Excel 2010. Zur Anwendung kam unter der Annahme einer nonparametrischen Verteilung der Mann-Whitney-U-Test. Ferner wurde unter Prism eine Überlebenskurve nach Kaplan-Meier erstellt; die Überlebenskurven wurden mittels des Mantel-Cox-Tests untereinander verglichen. Das Signifikanzniveau wurde bei p<0,05 festgelegt.

Für die folgende Auswertung wurden die Daten von 2 Tieren (RIIB-/-IL-10-/-), die überdurchschnittlich lange überlebten (>690 Tage) und als Ausreißer bewertet wurden, außer Acht gelassen, um eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden.

Es wurden 4 Gruppen von Mäusen der entsprechenden Genotypen analysiert. Dabei fasste die IL-10-/-RIIB-/--Gruppe 14 Tiere, die IL-10+/-RIIB-/- Gruppe 6 Tiere, die IL-10-/- Gruppe 7 Tiere und die RIIB-/- Gruppe 8 Tiere.

Aufgrund der aufwendigen Zucht, begrenzten Stallkapazitäten und der reduzierten Fruchtbarkeitsrate der Lupus-Mäuse war eine größere Gruppenstärke nicht möglich.

# 4. Ergebnisse

# 4.1. Nachweis des erfolgreichen IL-10-Knock-outs

Um nachzuweisen, dass die Zucht der IL-10 defizienten Tiere erfolgreich war, wird hier zuerst die Analyse der IL-10-Produktion dargestellt (siehe Abbildung 14). Dazu wurde durchflusszytometrisch die IL-10-Produktion (jeweils stimuliert und unstimuliert) der CD4+ T-Zellen in der Milz aller vier Genotypen gemessen. Wie bei den nachfolgenden Analysen auch, handelt es sich hierbei um eine reine Endpunktbestimmung; die IL-10-Sekretion wurde nur zum Todeszeitpunkt der Mäuse bestimmt.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der IL-10-K.o. in den beiden Gruppen IL-10-/und RIIB-/-IL-10-/- erfolgreich war, denn beide Gruppen wiesen in der Fluoreszenzmessung sowohl im unstimulierten wie auch im stimulierten Zustand lediglich ein Hintergrundrauschen für IL-10 im Rahmen des statistischen Messfehlers auf.

Dementsprechend sind alle im Folgenden genannten Ergebnisse unter IL-10-Abstinenz der Gruppen IL-10-/- und RIIB-/-IL-10-/- zu werten.

Nachfolgend wurde beurteilt, wie sich der heterozygote Phänotyp (IL-10+/-) auf die Sekretion dieses Zytokins auswirkt; ohne Stimulation wiesen beide Gruppen eine ähnliche Sekretion von IL-10 auf (RIIB-/- 2,35% (SD 1,12%) RIIB-/-IL-10+/- 2,24% (SD 0,48%)). Nach Stimulation konnte die Sekretion in der RIIB-/- Gruppe (+9,39%) stärker gesteigert werden als in der RIIB-/-IL-10+/- Vergleichsgruppe (+2,32%) (p<0,01).



Abbildung 14: Darstellung der IL-10-Produktion der CD4+T-Zellen der Milz

# 4.2. Überlebensstatistik der vier Genotypen

Da diese Arbeit erstmals den IL-10-K.o. bei FcγRIIB-defizienten Mäusen untersucht, steht die Überlebensstatistik im Zentrum der Charakterisierung dieser Tiere. Die vier betrachteten Genotypen basieren auf dem genetischen Hintergrund der C57/BL6J Mäuse. Es wurden IL-10-/-, RIIB-/-IL-10-/-, RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/- vergleichend betrachtet, um Einflüsse des IL-10-K.o. auf das Überleben beurteilen zu können. Aus der Literatur wurden zum Vergleich mit "gesunden" C57/BL6J Mäusen die entsprechenden Überlebensparameter übernommen [122, 123].

Die Mäuse wurden bei Erreichen der Abbruchkriterien (siehe 3.2.4.1) getötet.

Die Unterschiede zwischen den gezeigten Kurven (siehe Abbildung 15) waren signifikant (p=0,004 im Mantel-Cox-Test aller vier Gruppen, bei Vergleich von jeweils 2 Gruppen lag der p-Wert im Mantel-Cox-Test stets im Signifikanzbereich (p<0,05) zwischen 0,0001 (Vergleich RIIB-/-IL-10-/- mit RIIB-/-IL-10+/-) und 0,04 (Vergleich RIIB-/-IL-10-/- mit RIIB-/-).

Da sich bei getrennter Analyse von weiblichen und männlichen Tieren keine geschlechtsspezifischen Unterschiede ergaben (Daten nicht gezeigt), wurde sowohl bei der Überlebensstatistik wie auch bei Darstellung der anderen Ergebnisse keine Unterscheidung nach Geschlechtern vorgenommen.

Die mittlere Überlebenszeit war in der RIIB-/-Gruppe (SLE-Kontrollgruppe) am kürzesten (332Tage), gefolgt von RIIB-/-IL-10+/- (SLE-Gruppe mit heterogenem IL-10-Defekt) (367 Tage) und IL-10-/- ("gesunde" Kontrollgruppe, d.h. ohne Lupushintergrund mit IL-10-K.o.) (383 Tage). Die RIIB-/-IL-10-/- Gruppe hatte die längste Überlebenszeit (433Tage). Bei Betrachtung des medianen Überlebens (siehe Tabelle 8) ergab sich das gleiche Bild.

Die Tiere mit IL-10-Defekt lebten länger als die IL-10-kompetenten Mäuse. Neben der längsten Überlebenszeit hatten die IL-10-/-RIIB-/- Mäuse auch die geringste Frühsterblichkeit (siehe Abbildung 15). Die RIIB-/- wiesen eine sehr große Frühsterblichkeit auf, wohingegen die Überlebenskurve im weiteren Verlauf abflacht, sodass das mediane (241 Tage) und das mittlere Überleben (332 Tage) der RIIB-/-Gruppe divergieren.

### Überlebenskurve



Populationen C57BL/6) in Tagen. n(RIIB-/-)= 8, n(IL-10-/-) = 7, n(RIIB-/-IL-10+/-)=6, n(RIIB-/-IL-10-/-)=14. Größte Frühsterblichkeit im RIIB-/- Stamm (medianes Überleben 241 Tage), höchste Überlebensrate im RIIB-/-IL-10-/- Stamm (medianes Überleben 433 Tage). p=0,04.

Abbildung 15: Überleben der verschiedenen Genotypen in Tagen

Genotyp	Mediane Überlebenszeit (Überleben von 50% der Ausgangspopulation) in Tagen	Mittlere Überlebenszeit in Tagen
RIIB-/-	241	332
RIIB-/-IL-10+/-	365	367
IL-10-/-	380	383
RIIB-/-IL-10-/-	431	433
Vergleichend C57/BL6J [122]	852	882

Tabelle 8: Mittleres und medianes Überleben in Tagen

# 4.3. Glomerulonephritis

# 4.3.1. **Proteinurie** / Leukozyturie

Als Marker für die Lupusnephritis wurden die 4 Gruppen bezüglich Proteinurie und Leukozyturie zum Todeszeitpunkt / bei Erreichen der Abbruchkriterien miteinander verglichen (siehe Abbildung 16). Die Analyse erfolgte semiquantitativ mithilfe von Urinteststreifen.

In den Tieren des Genotyps RIIB-/-IL-10-/- und IL-10-/- war eine vermehrte Proteinund Leukozyturie zu verzeichnen.

Die Proteinurie und Leukozyturie der RIIB-/-IL-10-/- Gruppen war im Vergleich zur Gruppe RIIB-/- signifikant erhöht (p=0,03). Im Mann-Whitney-U-Test war jeweils ein signifikanter Unterschied zwischen RIIB-/- und den 3 anderen Gruppen (p jeweils zwischen 0,03 und 0,04) zu erheben, wohingegen die Unterschiede zwischen den Gruppen IL-10-/-, RIIB-/-IL-10+/- und RIIB-/-IL-10-/- untereinander nicht signifikant waren. Tendenziell zeigte die Gruppe RIIB-/-IL-10-/- jedoch eine vermehrte Ausscheidung von Protein im Vergleich zur Gruppe RIIB-/-IL-10+/-. So fanden sich in der RIIB-/-IL-10-/- Gruppe mehrere Tiere mit einer Proteinausscheidung von >300mg/dl.

Interessanterweise fanden wir auch in den Mäusen des Genotyps IL-10-/-, für die kein SLE oder Proteinurie beschrieben sind, eine fast ebenso hohe mittlere Proteinurie (108,6 mg/dl) wie bei den RIIB-/-IL-10-/-. Auch die IL-10-heterozygoten Mäuse wiesen noch eine signifikant höhere Leukozytund Proteinurie (76,7 mg/dl) als die RIIB-/-Mäuse auf.

Obwohl die Mäuse des Genotyps RIIB-/- gemäß der Beschreibung (siehe 1.2.3) einen SLE entwickeln sollten, konnten wir nahezu keine Proteinurie nachweisen (siehe Tabelle 9).

Damit lässt sich konstatieren, dass die Sterblichkeit der Mäuse und die Proteinurie sich gegensätzlich verhielten. Die RIIB-/-IL-10-/- hatten, obwohl sie die längste Überlebenszeit aufwiesen, eine vermehrte Proteinurie (im Mittel 116,4 mg/dl). Die RIIB-/- mit der höchsten Frühsterblichkeit und dem geringsten medianen Überleben zeigten hingegen kaum Proteinurie (im Mittel 31,3g/dl).



Abbildung 16: Darstellung von Protein- und Leukozyturie zum Todeszeitpunkt

_	Mittleres Überleben	Proteinurie	
Genotyp	(in Tagen)	(Mittelwert in mg/dl)	
RIIB-/-IL-10-/-	433	116,4	
IL-10-/-	383	108,6	
RIIB-/-IL-10+/-	367	76,7	
RIIB-/-	332	31,3	

Tabelle 9: Vergleich Proteinurie und Überlebenszeit

# 4.3.2. Histologische Untersuchung der Nieren

Bei der histologischen Aufarbeitung der Nieren fiel - wie auch bei der Proteinurie beschrieben - auf, dass die Gruppe RIIB-/-IL-10-/- die Gruppe mit den meisten (44%) zellulären Infiltraten in den Glomeruli darstellte (siehe Tabelle 10).

In der Gruppe RIIB-/- zeigte hingegen nur ein Tier entsprechende Veränderungen. Damit sind Mortalität und renale Infiltrate gegenläufig, denn in der Gruppe mit dem längsten Überleben (RIIB-/-IL-10-/-) finden sich die meisten Tiere mit entsprechenden histologischen Veränderungen.

Interessanterweise fand sich auch in der Gruppe IL-10-/-, für die bisher kein SLE beschrieben ist, ein Tier mit renalen Infiltraten.

In der Gruppe RIIB-/-IL-10+/- wiesen wir keine Lupusnephritis nach. Da nur eine begrenzte Zahl der Nieren ausgewertet werden konnte, sind die o.g. prozentuellen Daten jedoch nur sehr begrenzt zu verwerten und zu analysieren.

Genotyp	Anzahl der	Tiere mit zellulären	Anteil der Tiere
	ausgewerteten	Infiltraten	mit renalen
	Nierenhistologien		Infiltraten
RIIB-/-IL-10-/-	9	4	44,4%
IL-10-/-	5	1	20%
RIIB-/-IL-10+/-	3	0	0%
RIIB-/-	3	1	33,3%

Tabelle 10: Histologische Untersuchung der Nieren auf zelluläre Infiltrate

# 4.4. Milzgröße und Zellzahl

Da die Milz als primäres lymphatisches Organ eine Vorrangstellung in der Entwicklung autoimmuner Erkrankungen einnimmt, kann ihre Größe und Zellzahl als Marker für die Krankheitsaktivität genutzt werden. Die Milzen wurden nach dem Töten der Mäuse entnommen und wie unter 3.2.4.4 beschrieben vermessen und präpariert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 17 dargestellt.



Abbildung 17: Darstellung von Milzgröße und Splenozytenzahl

Die Splenomegalie war bei den RIIB-/-IL-10-/- Mäusen ausgeprägter (im Mittel 1,1cm<sup>2</sup>) mit signifikantem Unterschied zu den drei anderen untersuchten Gruppen (p=0,03), zwischen denen jeweils keine signifikanten Unterschiede bestanden. Allenfalls tendenziell zeichnete sich auch hier wieder eine leichte Splenomegalie bei der IL-10-/- Gruppe ab.

Wie auch schon bei der Proteinurie (siehe 4.3) beschrieben, zeigen also die Tiere des Genotyps RIIB-/-IL-10-/- mit der längsten Überlebenszeit am häufigsten eine Splenomegalie

Bei Zählung der Splenozyten ergaben sich, bei relativ großer Streuweite innerhalb der einzelnen Gruppen, keine signifikanten Unterschiede.

# 4.5. Weitere Organpathologien

In der RIIB-/-IL-10-/- Gruppe fiel bei einem Fünftel der Tiere ein Darmprolaps auf.

Ferner fanden wir bei 2 von 14 Tieren der RIIB-/-IL-10-/- Gruppe schwere Bewegungsstörungen; sie vermieden die Bewegung der hinteren Extremitäten. Ob eine mögliche entzündliche Erkrankung des Hüftgelenks oder neuromuskuläre Probleme ursächlich waren, bleibt derzeit spekulativ. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte keine Histologie des Hüftgelenks.

Bei 1/14 Tieren der RIIB-/-IL-10-/- Mäuse imponierte eine Hepatomegalie (2,7 x 3,5cm) mit Lymphozyteninfiltration (4,6x10<sup>6</sup>/ml).

5/14 Tieren der Gruppe IL-10-/-RIIB-/- wiesen eine Alopezie auf.

In der RIIB-/- Gruppe entwickelten 1/5 der Tiere Tumore im Unterbauch. Auch hier erfolgte im Rahmen dieser "Pilot-Studie" keine histologische Aufarbeitung, sodass Aussagen über die Dignität der Geschwüre in dieser Arbeit nicht möglich sind.

In den anderen Gruppen (RIIB-/-IL-10+/- und IL-10-/-) waren keine derartigen Pathologien auffällig.

# 4.6. Bestimmung der B-Zellzahl in der Milz durch MACS-CD43-B-Zelldepletion

Zur Ermittlung der absoluten Zahl der B-Zellen in der Milz wurde, wie unter 3.2.5.2 beschrieben, die magnetische CD43-Zellsortierung durchgeführt. Es erfolgte die anschließende Erfolgskontrolle mittels durchflusszytometrischer Messung der CD19-Expression.

Ähnlich wie auch bei der Gesamtzahl der Splenozyten (siehe Abbildung 17) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich der Zahl der B-Zellen.



MACS-Separation (postmortal).. n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10+/-)=6, n(RIIB-/-)=6. Keine signifikanten Unterschiede der 4 Genotypen.

Abbildung 19: Zellzählung der B-Lymphozyten nach MACS-CD43-Depletion



Forward-Scatter

Abbildung 18: CD19-Expression nach CD43-MACS
## 4.7. Durchflusszytometrische Analyse der

## Milzlymphozyten

Anhand der Gesamtzahl der Splenozyten ließ sich kein signifikanter Einfluss des IL-10-Gen-K.o. festmachen (siehe 4.4).

Daher interessierte die Differenzierung der Milzzellen, um nähere Aussagen bezüglich der zellspezifischen Unterschiede der vier Mauspopulationen zum Todeszeitpunkt treffen zu können.

Die Zellen wurden wie unter 3.2.6 beschrieben aufbereitet und nach entsprechenden Färbungen durchflusszytometrisch analysiert. Für jede Probe erfolgte zur Reduktion messtechnischer Schwankungen eine Dreifachbestimmung. Für die Analyse wurden die Mittelwerte verwendet.

#### 4.7.1. Charakterisierung der T-Zellen der Milz

Bei der Differenzierung der Lymphozyten fanden sich keine signifikanten Unterschiede in den Fraktionen der CD3+ (T-Zellen) zwischen den 4 Populationen (siehe Abbildung 20). Tendenziell (p=0,08) fanden wir eine leichte Vermehrung der T-Lymphozyten (CD3+) in den Tieren des Genotyps RIIB-/- und RIIB-/-IL-10-/- (23 bzw. 25% der Lymphozyten im Vergleich zu 15 % bei der Gruppe RIIB-/-IL-10+/- und 19% bei den IL-10-/-).

Im Folgenden wurden die CD3+ T-Zellen der Milz weiter hinsichtlich ihrer Subspezialisierung analysiert, um eine genauere Charakterisierung der 4 Gruppen bezüglich ihres T-Zell-Phänotyps zum Zeitpunkt des Todes vornehmen zu können.



Prozentualer Anteil der CD3+ Lymphozyten der Milz an der Gesamtzahl der Lymphozyten der Milz. n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=11, n(RIIB-/-)=8, n(RIIB-/-IL-10+/-)=6. Keine signifikanten Unterschiede. Tendenziell (p=0,08) höhere CD3+ Fraktion in den Populationen IL-10-/-RIIB-/- und RIIB-/-.

Abbildung 20: Anteile der T-Zellen an den Milzlymphozyten

# 4.7.1.1. Durchflusszytometrische Unterscheidung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen

Die CD3+ T-Zellen der Milz wurden weiter nach ihrem Expressionsstatus von CD4 bzw. CD8 unterschieden.

Bei der Analyse der zytotoxischen T-Zellen (CD8+) in der Milz unterschieden sich die Gruppen IL-10-/- und RIIB-/-IL-10-/- deutlich; 20,5% (Median) der Lymphozyten der IL-10-/- waren CD8+, wohingegen bei den RIIB-/-IL-10-/- nur 9,8% CD8+ T-Zellen gemessen wurden (p=0,03). Für die anderen beiden Untersuchungsgruppen beobachteten wir bei großer Streuweite diese Unterschiede nicht. Der Medianwert der RIIB-/- lag bei 20,3% (SD 10,7%) CD8+ T-Zellen und 11% für die RIIB-/-IL-10-/- 16,2% (SD 11,3%).

Für C57/BL6 Mäuse wurden die CD8+ T-Zellen mit einem Anteil von 8-10% der Milzlymphozyten beschrieben, also vergleichbar mit der Population IL-10-/-.

Bezüglich der T-Helferzellen (CD4+) fanden sich zwischen den Populationen keine signifikanten Differenzen. Ihr Anteil lag zwischen 11% (bei den RIIB-/-IL-10+/-) und 17% (bei den RIIB-/-) der Milzlymphozyten (siehe Abbildung 21). Die Ergebnisse sind

im Literaturvergleich ähnlich zu denen "gesunder" C57/BL6-Mäusen [123], bei denen 12,2-15,5% CD4+ T-Zellen in der Milz gemessen wurden.



Abbildung 21: Zytotoxische und T-Helferzellen der Milz

#### 4.7.1.2. Unterscheidung der T-Helferzellen in T-Gedächtnis-

#### und T-Effektorzellen

Anhand der Oberflächenmarker CD62L und CD44 können die CD4-T-Zellen in die Populationen der naiven T-Zellen (CD62L+CD44-), der Effektor-T-Gedächtnis – Zellen ( $T_{EM}$ ) (CD62L-CD44+) und der zentralen T-Gedächtnis-Zellen (CD62L+CD44+) unterteilt werden.

Die Analyse erfolgte zum Zeitpunkt des Erreichens der Abbruchkriterien / des Todes der Tiere. Wie in der graphischen Darstellung (siehe Abbildung 22) ersichtlich, waren die wenigsten der analysierten CD4+-T-Lymphozyten zentrale Gedächtniszellen (CD62L+CD44+). Der Anteil dieser T-Lymphozyten-Subpopulation lag über alle Untersuchungsgruppen hinweg bei 5-6% ohne signifikante Unterschiede.

Der Anteil der naiven T-Zellen (CD4+CD62L+CD44-) an den CD4+ T-Zellen war nur im Vergleich zwischen RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/- signifikant verschieden (p=0,009). So fanden sich bei den RIIB-/-IL-10+/- im Mittel 25,7% (SD 9,3%) naive CD4+T- Zellen, bei den RIIB-/- nur 13,96% (SD 4,1%). Aufgrund der großen Standardabweichungen fand sich im Vergleich der CD4+CD62L+CD44- T-Zellen bei den IL-10-/- (25,4%, SD 11,6%) und den RIIB-/-IL-10-/- (15,1%, SD 11,4%) keine Signifikanz.

Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen Überlebenszeit (siehe 4.2) und Anzahl der naiven CD4+T-Zellen herstellen, denn zwischen der Population mit dem längsten medianen Überleben (RIIB-/-IL-10-/-) und der Gruppe mit der höchsten Frühsterblichkeit (RIIB-/-) war diese T-Zell-Subpopulation nicht signifikant verschieden.

Der größte Anteil der CD4+-Lymphozyten ließ sich bei allen untersuchten Mäusen als Effektor-Gedächtniszellen (CD62L-CD44+) subklassifizieren. Im Vergleich der 4 Gruppen bestanden keine signifikanten Abweichungen vom Gesamtdurchschnitt. Der Anteil der CD4+CD44+CD62L- lag im Mittel stets bei 40-45% der CD4+T-Zellen (siehe Abbildung 22).

Durch den Aktivierungsmarker CXCR3, der von kürzlich aktivierten T-Lymphozyten exprimiert wird, differenzierten wir die Effektor- und zentralen Gedächtniszellen weiter hinsichtlich ihres Aktivierungsgrades ( $T_{EM}$ (in-/akt.) und ( $T_{CM}$ (in-/akt.).

Die zentralen Gedächtniszellen der RIIB-/-IL-10-/- Mäuse exprimierten CXCR3 zu einem höheren Anteil (45%), als die  $T_{CM}$  der anderen Genotypen (40-42%, p=0,037), zwischen denen keine statistisch relevanten Unterschiede bestanden (siehe Abbildung 23). Wir fanden also die zentralen Gedächtniszellen am stärksten in der Gruppe mit dem längsten Überleben (RIIB-/-IL-10-/-) aktiviert. Bezüglich der Effektor-Gedächtniszellen exprimierten die IL-10-/- (66,8%, SD 2,8%) sowie die RIIB-/- (64%, SD 13,3%) Mäuse am stärksten den Aktivierungsmarker CXCR3. Die RIIB-/-IL-10-/hatten im Mittel 51,4% CXCR3+  $T_{EM}$  (SD 8,1%) und die RIIB-/-IL-10+/- im Mittel 58,4% (SD 5,1%). Der Unterschied war somit sowohl zwischen IL-10-/- und IL-10-/-RIIB-/- (p=0,009) wie auch zwischen IL-10-/- und RIIB-/-IL-10+/- (p=0,02) signifikant. Wir fanden also zum Todeszeitpunkt die  $T_{EM}$  der IL-10-/-RIIB-/-, die die Population mit dem längsten Überleben darstellen, am wenigsten aktiviert, die  $T_{EM}$  der RIIB-/-, der Mäuse mit dem kürzesten Überleben, am meisten aktiviert.



Anteil der zentralen T-Gedächtniszellen (CD3+CD4+CD62L+CD44+) an T-Helferzellen (CD4+) in Prozent zum Zeitpunkt des Erreichens der Abbruchkriterien / des Todes. n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=11, n(RIIB-/-)=6, n(RIIB-/-IL-10+/-)=.6. Unterschiede nicht signifikant.



Anteil der naiven T-Zellen (CD3+CD4+CD62L+CD44-) an T-Helferzellen (CD4+) in Prozent bei Erreichen der Abbruchkriterien / Tod. Signifikant weniger naive T-Zellen bei den Tieren RIIB-/- (13%) als bei den RIIB-/-IL-10+/- (25%), sonst keine relevanten Unterschiede. n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=11, n(RIIB-/-)=6, n(RIIB-/-IL-10+/-)=6.

Effektor-Memory-Zellen(CD44+, 62L- / CD4+)



Anteil der Effektor-T-Gedächtniszellen (CD3+CD4+CD62L-CD44+) an T-Helferzellen (CD4+) der Milz in Prozent beim Erreichen der Abbruchkriterien / zum Todeszeitpunkt. n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=11, n(RIIB-/-)=6, n(RIIB-/-IL-10+/-)=.6. Unterschiede nicht signifikant.

Abbildung 22: Unterscheidung naiver T-Zellen, zentraler und Effektor-T-Gedächtniszellen



Abbildung 23: Darstellung des Aktivierungsstatus der CD4+ T-Gedächtniszellen der Milz mithilfe des Aktivierungsmarkers CXCR3

#### 4.7.1.3. Untersuchung des Aktivierungsstatus der CD4+ T-Zellen mithilfe der Oberflächenmarker CD69 und CD25

Nach Gating der Lymphozyten auf CD4-positive Zellen wurden die Frequenzen der Populationen CD4+CD69+ und CD4+CD25+ bestimmt.

**CD69** stellt für Aktivierungsphase den Marker die frühe dar. CD25 wird dagegen erst nach mehreren Stunden exprimiert. Vor Entdeckung von FoxP3 wurden CD4+CD25+ T-Zellen üblicherweise als Treg klassifiziert, was aber eine unscharfe Definition war, da die Population der CD4+CD25+ heterogen ist und neben den Treg auch langaktivierte T-Zellen beinhaltet, die im Gegensatz zu den natürlichen Treg nicht den Marker FoxP3 exprimieren. Wir fanden in den 4 Populationen 3-7% dieser CD4+CD25+FoxP3- T-Zellen (siehe Abbildung 24). In der Abbildung 25 wird deutlich, dass zum Zeitpunkt des Todes (bei Erreichen der Abbruchkriterien) die IL-10-defizienten CD4+ Milzzellen einen wesentlich höheren Anteil kurzfristig aktivierter (CD69+) T-Zellen als die der IL-10-kompetenten Tiere aufwiesen (p<0,001). Ferner hoben sich die RIIB-/-IL-10-/- nochmal signifikant von den IL-10-/- ab (p=0,043). So zeigen innerhalb der Population der RIIB-/-IL-10-/- im Mittel 40,14% (SD 6,2%) der CD4+ den aktivierten Phänotyp CD4+CD69+. Bei den IL-10-/- waren es immerhin 32,77% (SD 5,6%), wohingegen die IL-10 kompetenten Tiere wesentlich geringere Expressionsraten von CD69 innerhalb der CD4+ aufweisen (RIIB-/-IL-10+/- 25,71% (SD 2,38%), RIIB-/- 21,68% (SD 2,48%).



Abbildung 24: Anteil der CD4+CD25+FoxP3-

In Beziehung zum Überleben lässt sich also festhalten:

Die RIIB-/-IL-10-/- Mäuse mit dem längsten Überleben exprimieren den Aktivierungsmarker CD69 am stärksten, die beiden Gruppen mit dem kürzesten Überleben (RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/-) am schwächsten. Im Gegensatz dazu fiel bei Analyse der CD4+CD25+ Milzzellen zum gleichen Zeitpunkt auf (siehe Abbildung 25), dass die RIIB-/-IL-10-/- den signifikant (p=0,02 in One-Way-ANOVA-Analyse der 4 Gruppen) geringsten Anteil an CD4+CD25+T-Zellen hatten (7,1% der CD4+ (SD 3,1%)).

Damit unterschied sich diese Gruppe signifikant von den anderen, bei denen eine CD25-Expression zwischen 9% und 13% ermittelt wurde (IL-10-/-11,3% (SD 2,4%), RIIB-/- 9,2% (SD 2,3%), RIIB-/-IL-10+/- 13,02% (SD 2,1%)). Hier zeigten also die Tiere mit dem längsten durchschnittlichen Überleben (IL-10-/- RIIB-/-) die wenigsten CD4+CD25+ T-Zellen.



RIIB-/-IL-10-/-, gefolgt von IL-10-/-.

RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/- auf

ähnlichem Niveau.

n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=10, n(RIIB-/-)=4, n(RIIB-/-IL-10+/-)=4. Signifikante Unterschiede zwischen IL-10-/- und RIIB-/-IL-10-/- (p=0,02) sowie RIIB-/-IL-10-/- und RIIB-/-IL-10+/-(p=0,008).

Abbildung 25: Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf den CD4 T-Zellen der Milz

#### 4.7.1.4. Regulatorische (FoxP3+) CD4+ T-Zellen

Wie unter 1.1.3 beschrieben, sind beim SLE die Treg in Quantität und Qualität verändert. In dieser Arbeit wurde daher neben der Analyse der natürlichen Treg (CD4+CD25+FoxP3+) auch das Auftreten etwaiger "atypischer" Treg (CD4+CD25-FoxP3+) untersucht. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte zum Zeitpunkt des Todes bei Erreichen der Abbruchkriterien. Die Anteile der natürlichen Treg (CD4+CD25+FoxP3+) sind in Prozent der CD4+T-Zellen der Milz angegeben (siehe Abbildung 26). Im gesunden Organismus sind etwa 5-10% der CD4+ T-Zellen natürliche Treg. Bezogen darauf, hatten nur die IL-10-/- Tiere einen "normal" großen Anteil an CD4+CD25+FoxP3+ Zellen (natürliche Treg) von 8,2% (SD 3,6%).

Alle anderen Populationen wiesen einen reduzierten Anteil der natürlichen Treg auf. Dabei hatten die beiden Gruppen RIIB-/- (2,6%, SD 3%) und RIIB-/-IL-10-/- (3,71%, SD 3,3%) ähnliche Expressionsraten und unterschieden sich damit signifikant von der Gruppe IL-10-/- (p=0,03).

Die Unterschiede zwischen IL-10-/- und RIIB-/-IL-10+/- waren aufgrund der großen Streubreite der IL-10-/-Gruppe nicht signifikant. Bei der Analyse der CD4+CD25-FoxP3+ T-Zellen ("atypische Treg") fanden sich 79 höhere Expressionsraten bei den Gruppen mit IL-10-Defekt (IL-10-/- 20,6% (SD 3%), RIIB-/-IL-10-/- 16,8% (SD 4,8%), RIIB-/-IL-10+/- 16% (SD 0,9%)) im Vergleich zur RIIB-/- Gruppe (6,01%, (SD 4,3%)). Somit hatte die RIIB-/- Gruppe (Population mit der kürzesten Überlebenszeit) signifikant weniger CD4+CD25-FoxP3+ als die anderen Gruppen (p=0,048).

CD25-PoxP3+ von CD4+ der Milz in %



Anteilige Darstellung der natürlichen Treg (CD4+CD25+FoxP3+) an allen CD4+T-Zellen der Milz (postmortal). n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=10, n(RIIB-/-)=4, n(RIIB-/-IL-10+/-)=4. Signifikant höhere Anteile an Treg (8,2%) in IL-10-/- im Vergleich zu RIIB-/- (2,6%) und IL-10-/-RIIB-/-(3,3%). p<0,05.

(CD4+, CD25-, FoxP3+) / CD4+



Anteilige Darstellung der CD4+CD25-FoxP3+ ("atypische Treg") an allen CD4+T-Zellen der Milz (postmortal). n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=10, n(RIIB-/-)=4, n(RIIB-/-IL-10+/-)=4. RIIB-/- haben im Vergleich zu den anderen drei Gruppen mit IL-10-Defekt signifikant niedrigere Fraktion an CD4+CD25-FoxP3+ (p=0,04).

Abbildung 26: FoxP3 +CD4+ T-Zellen der Milz

## 4.7.2. Unterscheidung der B-Zellen der Milz in naive B-Zellen und Plasmazellen

Mithilfe des Markers CD19 wurden die B-Zellen differenziert. Innerhalb dieser Zellfraktion wurde mithilfe des Oberflächenmarkers CD138 zwischen Plasmazellen (CD19+ CD138+) und naiven B-Zellen (CD19+ CD138-) unterschieden. IgD diente zur weiteren Identifikation der naiven B-Zellen (CD19+IgD+). Bei allen Populationen fanden wir in der Milz die B-Zellen (CD19+) zum Todeszeitpunkt als vorherrschende Lymphozytensubpopulation. Ihr Anteil lag ohne große Schwankungen in den 4 Gruppen zwischen 50-55% der Lymphozyten (siehe Abbildung 27).



Darstellung des prozentualen Anteils der B-Lymphozyten (CD19+) an der Gesamtzahl der Lymphozyten in der Milz. Keine signifikanten Unterschiede der Gruppen. n(IL-10-/-)=7, n(IL-10-/-RIIB-/-)=11, n(RIIB-/-)=8, n(RIIB-/-IL-10+/-)=6.

#### Abbildung 27: Anteil der B-Zellen an den Milzlymphozyten

Vergleichend fanden sich in der Literatur für C57/BL6-Mäuse [123] ähnliche B-Zell-Fraktionen von 57,8% der Milzlymphozyten. Bei der weiteren Differenzierung der B-Zellen zeigten die RIIB-/-IL-10-/- Mäuse einen größeren Anteil an Plasmazellen als die anderen Gruppen.

So exprimierten 7,57% (SD 1,75%) der B-Zellen der RIIB-/-IL-10-/-Milz in der das Oberflächenmolekül CD138. Unterschied Damit war der signifikant (p=0,014) zu den anderen Untersuchungsgruppen,

die sich nicht signifikant unterschieden und einen durchschnittlichen Anteil von 5% Plasmazellen aufwiesen (siehe Abbildung 28).

In unserem Versuchsmodell war somit in den RIIB-/-IL-10-/-, die am längsten überlebten, die Anzahl Antikörper-produzierender B-Zellen (CD19+CD138+) am höchsten.

Die Anzahl der ruhenden ("naiven") IgD+ B-Zellen in der Milz unterschied sich in den vier Gruppen nicht signifikant.

Die Fraktionen dieser IgD+ B-Zellen in der Milz lagen zwischen den Genotypen relativ stabil zwischen 60 und 65% der CD19+. Die IL-10-/- hatten 65,8% (SD 3,3%), die RIIB-/-IL-10-/- 62,8 (SD 3,8%), die RIIB-/- 61,4 (SD 5,1%) und die RIIB-/-IL-10+/- 65,7 (SD 5,6%) CD19+IgD+ (siehe Abbildung 28).



Abbildung 28: Anteile naiver B-Zellen und Plasmazellen an den Milzlymphozyten

#### 4.8. Zytokinproduktion der T-Helferzellen

Wie unter 3.2.6 beschrieben, erfolgte die Stimulation der Milzzellen (nach Tod der Mäuse bei Erreichen der Abbruchkriterien) mit PMA/Iono. Bei der anschließenden FACS-Messung wurde jeweils ein Zytokin der Th1-Antwort (IFN-γ) und der Th2-Antwort (IL-4) analysiert. Dabei wurden die Sekretionsmuster im stimulierten und unstimulierten Zustand der Untersuchungsgruppen miteinander verglichen.

#### 4.8.1. Darstellung der Th2-Antwort mithilfe von II-4

Die Zahl IL-4 positiver CD4+ T-Zellen der Milz lag bei allen Gruppen im unstimulierten Zustand ähnlich (IL-10-/-: 4,98%, RIIB-/-IL-10-/-: 4,79% RIIB-/-: 4,12%, RIIB-/-IL-10+/-: 3,55% (SD jeweils um 1%)). Durch PMA/Iono-Stimulation ließ sich das Sekretionsniveau von IL-4 in allen Gruppen deutlich (p jeweils <0,01) steigern.



signifikanter Anstieg der IL-4-Sekretion nach Stimulation. Stärkere Steigerung der IL-4-Sekretion aller 3 Gruppen mit IL-10-Defekt im Vergleich zu RIIB-/-(p stets <0,05) . n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=14, n(RIB-/-)=6, n(RIIB-/-IL-10+/-)=4.

#### Abbildung 29: IL-4-positive CD4+ T-Zellen der Milz vor und nach Stimulation

In der Gruppe IL-10-/- stieg die Zahl der IL-4 positiven CD4+ Milzzellen im Vergleich zum unstimulierten Zustand um +10,95%, bei den RIIB-/-IL-10-/- um +7,92%, bei den RIIB-/- um +6,4% und bei den RIIB-/-IL-10+/- um +9,48% (siehe Abbildung 29). Nach Stimulation war auffällig, dass die CD4+ T-Zellen der RIIB-/-, also der Tiere mit dem kürzesten Überleben, die geringste Steigerung der IL-4-Produktion aller Gruppen zeigten (p<0,04).

Die größte Th2-Antwort mittels IL-4 hatten die IL-10-/-, die im Vergleich der 4 Gruppen das zweitlängste Gesamtüberleben zeigten. Die IL-4-Sekretionssteigerung der RIIB-/-IL-10-/- und RIIB-/-IL-10+/- lag auf einem ähnlichen Niveau. Insgesamt zeigten die IL-10-defizienten bzw. heterozygoten Mäuse also eine stärkere Th2-Antwort, gemessen an der IL-4-Sekretion.

#### 4.8.2. Darstellung der Th1-Antwort mit IFN-γ

Es lag eine vergleichbare intrinsische Aktivität von IFN-γ wie schon bei IL-4 beobachtet vor (IL-10-/-: 4,2%, RIIB-/-IL-10-/-: 6,1%, RIIB-/-: 4,5%, RIIB-/-IL-10+/-: 5,8% der CD4+ (SD 0,5-1,8%)). Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant, tendenziell waren ein größerer Teil der IL-10-defizienten / heterozygoten Mäuse im nicht-stimulierten Zustand IFN-γ-positiv (stärkste unstimulierte Produktion von IFN-γ durch RIIB-/-IL-10-/- (p=0,09)).

Nach Stimulation zeigten alle Untersuchungsgruppen einen signifikanten Anstieg von IFN- $\gamma$  positiven CD4+ T-Zellen (IL-10-/-: +16,46%, RIIB-/-IL-10-/-: +14,15%, RIIB-/-: +14,99%, RIIB-/-IL-10+/-: +11,61% (p jeweils <0,01)). Dabei lagen die Gruppen IL- 10-/-, IL-10-/-RIIB-/- und RIIB-/- auf einem ähnlichen Niveau; nur die RIIB-/-IL-10+/- zeigten einen signifikant geringeren Anstieg IFN- $\gamma$ -positiver CD4+ T-Zellen (p<0,05). Letztlich lassen sich in dieser Untersuchungsreihe keine signifikanten Unterschiede in der Th1-Antwort mittels IFN- $\gamma$  finden, tendenziell scheinen die RIIB-/- Mäuse mit dem kürzesten Überleben einen etwas höheren Anteil IFN- $\gamma$ -positiver CD4+ T-Zellen zu zeigen (siehe Abbildung 30).



Darstellung der IFN-g sezernierenden CD4+T-Zellen der Milz mit und ohne Stimulation mit PMA/lono (postmortal). Bei allen Gruppen signifikanter Anstieg der IFN-g-Sekretion mit Stimulation. Sekretionssteigerung nach Stimulation in RIIB-/-IL-10+/- geringer als in den anderen Gruppen (p<0,05). n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=14, n(RIB-/-)=6, n(RIIB-/-IL-10+/-)=4.

Abbildung 30: IFN-γ-positive CD4+ T-Zellen der Milz (un-/stimuliert)

Das Verhältnis der Th1 (IFN-γ) / Th2 (IL-4) ergab bei den einzelnen Gruppen:

IL-10-/-: 16,74% (Th1) zu 15,93 (Th2) = 1,05 RIIB-/-IL-10-/-: 17,2% (Th1) zu 12,71% (Th2) = 1,35 RIIB-/-: 15,21% (Th1) zu 10,55% (Th2) = 1,44 RIIB-/-IL-10+/-: 12,15% (Th1) zu 13,03% (Th2) = 0,93 Tendenziell ließ sich (außer bei den RIIB-/-IL-10+/-) eine leichte Verschiebung zugunsten der Th1- Antwort (IFN-γ) erkennen.

# 4.8.3. Simultane Produktion von IFN-γ und IL-10 sowie IL-4 und IL-10

Eigentlich repräsentieren IFN-γ (Th1) und IL-10 (Th2 und Treg) Zytokine, die von verschiedenen Zellpopulationen sezerniert werden. Wie von Saraiva et al. [124] gezeigt, können aber beide Th-Population unter entsprechenden Bedingungen (starke Ag-Präsenz) zusätzlich IL-10 produzieren.

Ohne Stimulation hatten sowohl RIIB-/- als auch RIIB-/-IL-10+/- ähnliche Anteile an gleichzeitig IL-10 und IFN-γ positiven CD4+T-Zellen (RIIB-/-: 1,13 % (SD 1%) und RIIB-/-IL-10+/-: 0,73% (SD 0,36%)). Nach Stimulation zeigten beide Gruppen einen signifikanten Anstieg der für beide Zytokine positiven CD4+T-Zellen (RIIB-/-: +2,47% und RIIB-/-IL-10+/-: +1,41% (p<0,01)). Wie schon bei der IL-10-Produktion gesehen, war auch hier der Anstieg in der RIIB-/- Gruppe signifikant höher (p<0,04, siehe Abbildung 31).

Da, wie unter 4.1 beschrieben, der IL-10-K.o. erfolgreich war, konnten wir weder in der Population IL-10-/- noch in der Population RIIB-/-IL-10-/- CD4+ T-Zellen, die IL-10 und IFN- $\gamma$  synthetisieren, nachweisen.

Ähnliche Ergebnisse ergaben sich für die gleichzeitig IL-4 und IL-10 positiven CD4+T-Zellen (siehe Abbildung 32), auch hier fand sich ein ähnliches Grundniveau mit deutlicher Steigerung nach Stimulation. Allerdings waren die Unterschiede zwischen RIIB-/-IL-10+/- und RIIB-/- hier nicht signifikant, wiesen aber tendenziell in die gleiche Richtung wie für IFN-γ und IL-10 berichtet.



Abbildung 31: CD4+ T-Zellen mit Synthese von IFN-y und IL-10



Darstellung der gleichzeitig IL-4 und IL-10 sezernierenden CD4+T-Zellen der Milz vor und nach Stimulation mit PMA/lono. Bei IL-10-/- und RIIB-/-IL-10-/- nur Hintergrundrauschen. Bei den anderen beiden Gruppen signifikanter Anstieg der Sekretion nach Stimulation. n(IL-10-/-)=7, n(RIIB-/-IL-10-/-)=14, n(RIB-/-)=6, n(RIIB-/-IL-10+/-)=4.



# 4.9. Untersuchung der Mäuse auf SLE-typische Autoantikörper gegen doppelsträngige DNS

Die Messung erfolgte nach den unter 3.2.7 angegeben ELISA-Protokollen. Antikörper gegen doppelsträngige DNS ließen sich vermehrt in der Untersuchungsgruppe mit RIIB-/-IL-10-/- nachweisen, die im Mittel etwa die dreifache Konzentration an Auto-Ak im Vergleich zu den Gruppen RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/-



Konzentration der Anti-ds-DNA-Ak (ug/ml) der 4 Genotypen bei Erreichen der Abbruchkriterien. n(IL-10-/-)=4, n(RIIB-/-IL-10-/-)=6, n(RIIB-/-)=3, n(RIIB-/-IL-10+/-)=3. Höhere Ak-Konzentration in den RIIB-/-IL-10-/- als in den IL-10-kompetenten Tieren.

## Abbildung 33: Auto-Antikörper gegen ds-DNS

aufwies. Dabei war der Unterschied zwischen der Gruppe RIIB-/-IL-10-/- und RIIB-/- signifikant (p<0,08). Im Vergleich zu den RIIB-/-IL-10-+/- lässt sich eine Tendenz zugunsten erhöhter anti-ds-DNS-Ak in den RIIB-/-IL-10-/- Tieren erkennen. Auch in der Gruppe IL-10-/- fanden sich im Mittel doppelt so hohe anti-ds-DNS-Ak-Konzentrationen wie in den Gruppen RIIB-/- bzw. RIIB-/-IL-10+/-. Aufgrund der geringen Gruppenstärken erreicht dieser Trend jedoch nicht das Signifikanzniveau. Es fand sich dementsprechend die höchste anti-ds-DNS-Ak-Konzentration in den Tieren mit der geringsten Mortalität (siehe Abbildung 33).

## 5. Diskussion

## 5.1. Bisherige Studienlage zum Einfluss von IL-10 auf den SLE

In den bisher untersuchten SLE-Modellen sind die Studienmeinungen zum Einfluss von IL-10 auf die Mortalität je nach untersuchtem Modell (humane vs. diverse murine Modelle) kontrovers.

So werden bei SLE-Patienten erhöhte IL-10-Spiegel im Vergleich zu gesunden Probanden gemessen, die mit der Krankheitsaktivität (SLEDAI) korrelieren. Bei Gabe von anti-IL-10-Ak kann sowohl im humanen [63, 62, 65] wie auch im murinen NZBxNZW Modell der Krankheitsverlauf verzögert werden [67]. Hingegen wird durch Gabe von IL-10 die Krankheitsaktivität im NZBxNZW Modell akzeleriert [67].

Gegensätzliche Aussagen liefern Studien am murinen MRL-lpr-Modell. MRL-lpr Mäuse mit IL-10-K.o. haben eine verstärkte Auto-Ak-Produktion [69] und eine exzessive Erhöhung der IFN-γ Produktion, die in einer entsprechenden Verschlechterung des SLE resultieren [156].

In neueren Studien wird eher über einen protektiven Einfluss von IL-10 in späten Krankheitsphasen des SLE berichtet; so kann bei "alten" NZB/W Mäusen mit vollständig ausgebrochenem SLE die Krankheitsaktivität durch *in vitro* gezüchtete polyklonale CD4+IL-10+ T-Zellen vermindert und das Überleben gesteigert werden [125]. Auch im murinen NZM2410-Modell wird eine protektive Rolle von IL-10 bei kontinuierlicher moderater Applikation gesehen, die vermutlich auf verminderter T-Zellaktivierung beruht, während die B-Zellen kaum beeinträchtigt sind [126].

Ein Erklärungsversuch für die widersprüchlichen Ergebnisse ist, dass IL-10 vor allem in der frühen Phase des SLE als protektives Zytokin wirkt, indem es pathogene Th1-Antworten in Form von IFN-γ-Produktion, Glomerulonephritis und IFN-γ-getriggerter Autoantikörperproduktion vermindert. Mit zunehmender Krankheitsprogression wird die Autoantikörperproduktion und Gewebsschädigung durch exzessiv gesteigerte IL-10-Produktion entscheidender; der initial protektive Einfluss von IL-10 wandelt sich in der späteren Krankheitsphase zum Pathogenitätsfaktor. Daher kann die anti-IL-10-Antikörpergabe im fortgeschrittenen Stadium einen krankheitsmildernden Einfluss auf die Progression des SLE haben [69]. Allerdings gibt es in den bisherigen murinen SLE-Modellen deutliche Limitationen bei der Realisierung der IL-10-Defizienz. Das NZBxNZW-Modell basiert auf einem genetisch so komplexen Hintergrund, dass hier bisher kein IL-10-K.o. vorgenommen werden konnte. Die entsprechenden Studien zum Einfluss von IL-10 beziehen sich daher meist auf Experimente mit Gabe von anti-IL-10-Ak. Im MRL-*Fas<sup>lpr</sup>*- Modell ist der IL-10-K.o. zwar möglich, allerdings handelt es sich hier um ein recht einfaches Modell, das eher einer lymphoproliferativen Erkrankung gleicht, also nur annäherungsweise Aussagen über den SLE ermöglicht.

Deshalb ist das in dieser Arbeit beschriebene Modell so interessant, weil es sowohl den SLE auf dem Hintergrund des FcyRIIB-/- Modells realitätsnah abbildet als auch den genetischen IL-10-K.o. realisiert.

Um festzustellen, ob der IL-10-K.o. auch bei "gesunden" Mäusen des gleichen genetischen Hintergrundes (C57/BL6J) bereits spezifische pathogene Veränderungen der Tiere auslöst, wurde die Gruppe IL-10-/- den FcγRIIB-defizienten C57/BI6J Mauspopulationen vergleichend gegenübergestellt.

## 5.2. Einfluss der IL-10-Defizienz auf das Überleben FcγRIIB-defizienter Mäuse

Grundlegend bei der vorliegenden Pilotstudie an IL-10-defizienten FcyRIIB-/- Mäusen ist die Betrachtung der Mortalität in Abhängigkeit von der IL-10-Defizienz.

Wie in Abbildung 15 und Tabelle 8 ersichtlich, hatte, entgegen unseren Erwartungen, die Gruppe RIIB-/-IL-10-/- das längste Überleben (die Tiere wurden bei Erreichen des finalen Krankheitsstadiums (Abbruchkriterien siehe 3.2.4.1) getötet). Das mediane Überleben der Tiere des Genotyps RIIB-/-IL-10-/- betrug 431 Tage, während bei den RIIB-/- Tieren nach 241 Tagen und bei den RIIB-/-IL-10+/- nach 365 Tagen 50% der Ausgangspopulation verstorben war. Die mediane Überlebenszeit der Gruppe RIIB-/- ist etwas länger als von Bolland et al. [98] beschrieben, bei denen nach 270 Tagen 48% der Ausgangspopulation der RIIB-/- Mäuse verstorben war. Auffällig bei den hier vorliegenden Daten ist die hohe Frühsterblichkeit des RIIB-/-Stammes. Während nach 241 Tagen bereits die Hälfte der Tiere (4 von 8 Mäusen) verstorben war, verlief die Überlebenskurve für die verbleibenden Mäuse wesentlich flacher.

Betrachtete man diese 4 früh verstorbenen Tiere als Ausreißer und untersuchte nur das Überleben der 4 verbleibenden Tiere der Gruppe RIIB-/-, ergäbe sich ein medianes Überleben von 385 Tagen (Daten nicht gezeigt), das dann im Bereich der Untersuchungsgruppe RIIB-/-IL-10+/- (365 Tage) läge. Im Literaturvergleich werden für den verwendeten Inzuchtstamm C57/BL6J mediane Überlebenszeiten von 750-900 Tagen (z.B. bei Massie et al. [122] 852 Tage) angegeben. Die Überlebenszeit der FcγRIIB-defizienten Tiere ist im Vergleich zu den bisherigen Daten an RIIB-/-Mäusen [98] relativ lang; im Vergleich zu "gesunden" Inzuchtmäusen aber deutlich reduziert.

Bei der Datenanalyse zeigten sich keine geschlechtsspezifischen Unterschiede im Überleben und den anderen untersuchten Parametern (Daten nicht gezeigt).

Die "gesunde" IL-10-defiziente Vergleichsgruppe (d.h. ohne FcγRIIB-K.o.) zeigte ein medianes Überleben von 380 Tagen, die Tiere überlebten somit signifikant länger als die Mäuse der Gruppen RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/-.

So scheint die IL-10-Defizienz vor dem genetischen Hintergrund der C57/BL6J-Mäuse entscheidend für das Überleben; IL-10 wirkt in dieser Studie als Pathogenitätsfaktor, denn die IL-.10-defizienten Tiere überleben (unabhängig von der FcγRIIB-Defizienz) länger als die IL-10-kompetenten Mäuse.

In vorangegangen Studien wurde in Abhängigkeit vom betrachteten Tiermodell teils über einen protektiven Einfluss von IL-10 im MRL-*Fas<sup>/pr</sup>* Modell [69], teils aber auch über einen negativen Effekt in SLE-Patienten und im NZBxNZW Modell [65, 67] berichtet.

Ursachen eines möglichen pathogenen und damit morbiditäts- und mortalitätsfördernden Effektes von IL-10 könnten dessen stimulierende / proinflammatorische Effekte in der komplexen Immunantwort (siehe 1.1.4) sein. Es ist möglich, dass die längere Überlebenszeit der IL-10-defizienten Mäuse in der hier vorliegenden Arbeit Ausdruck des fehlenden, potentiell pathogenen Einflusses von IL-10 auf die Immunantwort ist. Insofern ist die verminderte Mortalität der FcγRIIB-/-IL10-/- Mäuse im Vergleich zu den RIIB-/- Mäusen konsistent zu den o.g. Untersuchungen an NZBxNZW und SLE-Patienten.

Dem hier publizierten mortalitätssteigernden Einfluss von IL-10 widersprechen Studien, die IL-10 als "Immunmoderator" im murinen MRL-*Fas<sup>lpr</sup>* Modell eine protektive Rolle bezüglich des SLE zusprechen. So betrug nach 17 Wochen die Überlebensrate der MRL-Fas<sup>lpr</sup> IL-10–/– Mäuse nur 50 Prozent der MRL-Fas<sup>lpr</sup> IL-10+/+ und 90% der MRL-Fas<sup>lpr</sup> IL-10+/- Tiere.

Damit lag das mediane Überleben dieser MRL-Fas<sup>lpr</sup>IL-10-/- Tiere (ca.100 Tage) nur bei 1/4 der in dieser Arbeit berichteten Überlebenszeit der FcγRIIB-/-IL-10-/- Mäuse (ca. 421 Tage).

Offensichtlich ist der Einfluss von IL-10 auf die Mortalität des SLE aufgrund der immunologischen Pluripotenz des Zytokins stark vom betrachteten murinen Modell abhängig.

Zusammengefasst sind die Einflüsse von IL-10 auf die Mortalität in den unterschiedlichen SLE-Modellen widersprüchlich.

Im hier vorliegenden murinen RIIB-/- Modell fand sich bei IL-10-Defizienz eine Steigerung der Überlebensrate wie auch im NZBxNZW-Modell unter Gabe von anti-IL-10-Ak (Ishida et al. [67]). Im Gegensatz dazu führte IL-10-Defizienz im MRL-Fas<sup>lpr</sup> Modell von Yin et al. [69] zu erhöhter Mortalität.

Einschränkend zu den Ergebnissen ist die geringe (max. 14 Tiere in der Gruppe RIIB-/-IL-10-/- und nur 6 Tiere in der Gruppe RIIB-/-IL-10+/-) und unterschiedliche Gruppenstärke der vier Populationen anzumerken, die in der vorliegenden Arbeit durch die entsprechenden Zuchtbedingungen nicht anders zu realisieren war. Zur Bestätigung der Ergebnisse sollten daher die Untersuchungen an Populationen größerer Stärke wiederholt werden.

## 5.3. Darstellung typischer Manifestationen des SLE in Abhängigkeit von IL-10

# 5.3.1. Einfluss von IL-10 auf Proteinurie und Leukozyturie im Fcy-RIIB-K.o.-Modell

Die Glomerulonephritis ist eine der zentralen Pathologien des SLE (siehe 1.1.1). Insofern interessierte, wie sich die Parameter Proteinurie und Leukozyturie im hier erstmals generierten und beschriebenen murinen Stamm FcyRIIB-/-IL-10-/verhalten. Im zugrunde liegenden FcyRIIB-K.o. Modell des SLE auf dem genetischen Hintergrund des Inzuchtstammes C57/BL6J ist die Lupusnephritis eine der entscheidenden Endorganmanifestationen. Bolland und Ravetch [98], die dieses murine SLE-Modell einführten, beschrieben eine signifikant erhöhte Proteinurie und Leukozyturie der RIIB-/- im Vergleich zur Kontrollgruppe. Sie führten die Lupusnephritis häufigste Todesursache RIIB-/als der Tiere an. In ihrer Studie berichten sie, dass im Alter von 5 Monaten 40% der RIIB-/- eine ausgeprägte Proteinurie (>100mg/dl) hatten, im Alter von 9 Monaten bereits 90%. Bei den hier getesteten RIIB-/-Mäusen fand sich zum Zeitpunkt des Todes hingegen kaum Proteinurie. Es konnten nur Spuren einer Proteinurie und Leukozyturie (durchschnittlich 30mg/dl, nur ein Tier >100mg/dl) nachgewiesen werden (siehe Abbildung 16). Auch fanden sich bei der histopathologischen Untersuchung nur bei einem Tier des Genotyps RIIB-/- glomeruläre Zellinfiltrate entsprechend einer Lupusnephritis (siehe Tabelle 10). Es ist davon auszugehen, dass diese RIIB-/-Mäuse zum Zeitpunkt des Todes / finalen Krankheitsstadiums nicht unter einer Glomerulonephritis ihr schweren litten. Daher muss Tod durch andere Manifestationen des SLE zu erklären sein.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu der o.g. Studie von Bolland et al. [98]. Ein Erklärungsversuch dieser gegensätzlichen Ergebnisse wäre, dass unter unseren SPF-Versuchsbedingungen die RIIB-/- Mäuse (noch) keine schwere Nierenmanifestation des SLE entwickelt hatten. Möglicherweise sind dazu weitere sekundäre (Umwelt-/ mikrobielle) Faktoren notwendig, die unter den hiesigen SPF-Bedingungen nicht auftraten. Andererseits ist auch denkbar, dass die Tiere, bereits vor dem Auftreten einer schweren Nephritis, so schwer an anderen Organmanifestationen litten, dass sie vor Ausbildung der Nephritis starben.

Bolland und Ravetch [98] berichten über eine histologisch gesicherte, generalisierte Vaskulitis der betroffenen RIIB-/- Tiere. Sie wiesen neben der Glomerulonephritis bei den entsprechenden Mäusen zum präfinalen Zeitpunkt von 8 Monaten (medianes Überleben der RIIB-/- waren in dieser Studie 9 Monate) entzündliche Infiltrate, entsprechend einer systemischen Vaskulitis, u.a. in Leber, Pankreas, Speicheldrüsen, Lunge und Muskeln nach [98].

Da in der hier vorliegenden Pilotstudie keine histologische Aufarbeitung der entsprechenden Organe erfolgte, sind anhand der vorliegenden Daten keine Aussagen darüber möglich, ob die untersuchten RIIB-/- ebenfalls unter einer systemischen Vaskulitis litten, die möglicherweise zum Tode führte. Wie unter 4.5 beschrieben, fanden wir bei zwei der untersuchten RIIB-/- Mäuse makroskopisch Tumoren im Unterbauch. Da auch diese nicht histologisch aufgearbeitet wurden, ist ihre Dignität unklar und damit auch, ob einige der RIIB-/-Tiere möglicherweise an einer malignen Erkrankung verstarben.

Zum derzeitigen Zeitpunkt bleibt somit festzuhalten, dass die RIIB-/- Mäuse, obwohl sie das geringste mediane Überleben hatten, die geringste Protein- und Leukozyturie aufwiesen. Welche Ursache letztlich zu ihrem frühen Versterben führte, ist hier nicht endgültig zu klären. Es bleibt also zukünftigen Studien vorbehalten, eine genaue histologische Untersuchung aller Organe dieser Tiere vorzunehmen.

Bei den Tieren mit zusätzlichem IL-10-K.o. fand sich gegenüber den RIIB-/- eine signifikant höhere Protein- und Leukozyturie. So wiesen die RIIB-/-IL-10-/- Mäuse eine durchschnittliche Proteinurie von 150mg/dl auf (siehe Abbildung 16). 5 Tiere hatten am Lebensende eine Proteinausscheidung >300mg/dl. Das ist insofern erstaunlich, als dass die Gruppen RIIB-/-IL-10-/- und IL-10-/- die Gruppen mit dem längsten medianen Überleben in dieser Studie waren (siehe Abbildung 15). Auch fanden sich häufiger Zellinfiltrate in den untersuchten Nieren (siehe Tabelle 10). An dieser Stelle muss allerdings nochmals auf die Limitation dieser Studie hingewiesen werden. Die semiquantitative Analyse der Protein-/ Leukozyturie erfolgte nur zum Todeszeitpunkt, also dem finalen Krankheitsstadium der Tiere, in

93

die Abbruchkriterien dem sie beschriebenen erreichten. Zur differenzierten Beurteilung der glomerulären Schädigung wäre ein kontinuierliches Screening der Tiere auf Protein-/ Leukozyturie nötig. Das ermöglichte auch Aussagen zur Altersabhängigkeit der Nierenschädigung. Anhand dieser Studie ist demnach nur eine Endpunktbetrachtung der final erkrankten Tiere möglich. Ferner konnte nur ein Teil der Nieren histologisch untersucht werden. sodass die Aussagen zu den mikroskopischen Nierenveränderungen nur sehr eingeschränkt zu verwerten sind.

Wie erwähnt, erfolgte in dieser Pilotstudie auch keine histopathologische Aufarbeitung der anderen Organe, sodass Todesursachen abseits der Glomerulonephritis nicht klar zu benennen sind. Es ist daher spekulativ, ob bei den IL-10-defizienten Gruppen die Glomerulonephritis die Haupttodesursache darstellt, während die IL-10-kompetenten Tiere aufgrund anderer Pathologien verstarben. Im Versuch, die geringere Lebenserwartung der RIIB-/- und die größere Proteinurie (siehe Tabelle 9) der IL-10-defizienten Gruppen in Einklang zu bringen, kann spekuliert werden, ob die Glomerulonephritis möglicherweise erst in einem höheren Alter bzw. bei länger bestehender Krankheit auftritt. Demnach wäre die Erkrankung bei den RIIB-/- so akzeleriert, dass diese die Glomerulonephritis "erst gar nicht erlebten". Die IL-10-defizienten Tiere hingegen erreichten ein höheres Alter, das sie eventuell für eine Lupusnephritis prädestinierte. In diesem Zusammenhang wäre auch zu erwägen, ob IL-10 möglicherweise zu verschiedenen Erkrankungsphasen einen unterschiedlichen Einfluss auf den SLE hat. Konsistent mit den hier vorgestellten, wenn auch eingeschränkt beurteilbaren, Ergebnissen wäre ein pathogener Effekt von IL-10 in der früheren Krankheitsphase, weshalb die RIIB-/eventuell schneller versterben. In der prolongierten Erkrankungsphase, die die meisten der RIIB-/- Mäuse, aufgrund ihrer großen Frühsterblichkeit (siehe Abbildung 15) in dieser Arbeit nicht erreichten, könnte IL-10 hingegen protektiv wirken. Lässt man die Frühsterblichkeit der RIIB-/-Mäuse außer Acht und betrachtet man nur die RIIB-/-, die ein Lebensalter von mehr als 300 Tagen erreichten (was ungefähr der Lebenserwartung der IL-10-defizienten Gruppen entspräche), liegt deren Proteinurie im Mittel bei 30mg/dl (Daten nicht gezeigt) und damit deutlich unter der mittleren Proteinausscheidung der RIIB-/-IL-10-/- und IL-10-/-(jeweils >100mg/dl). Damit könnte IL-10 im höheren Alter einen (nephro-) protektiven Einfluss auf den SLE haben.

Unter Einbeziehung dieser Einschränkungen könnte die IL-10-Defizienz ein Pathogenitätsfaktor für die Lupusnephritis (zumindest im hohen Lebensalter) sein.

## 5.3.2. Autoantikörper im FcγRIIB-K.o.-Modell unter IL-10-Defizienz

Es wurde untersucht, ob der IL-10-K.o. einen Einfluss auf die Produktion von Autoantikörpern im FcγRIIB-K.o.-Modell hat. Der Nachweis von Auto-Ak ist diagnostisches Kriterium beim SLE [5], denn sie können bei mehr als 90% der Patienten im Serum nachgewiesen werden. Hier wurden Antikörper gegen doppelsträngige DNS (anti-ds-DNS-Ak) untersucht.

Die RIIB-/-IL-10-/- Mäuse hatten zum Todeszeitpunkt bis zu 3fach erhöhte anti-ds-DNS-Antikörpertiter im Vergleich zu den IL-10-kompetenten Gruppen (siehe Abbildung 33).

Auch im MRL-lpr Modell scheint IL-10-Defizienz mit erhöhten Auto-Ak-Titern einherzugehen [69]. Die IL-10-/- Mäuse dieses Modells hatten bei der Untersuchung der Serumspiegel der anti-ds-DNS-Ak signifikant erhöhte Level im Vergleich zu den Tieren der IL-10+/+ Gruppe. Allerdings bestand dieser Unterschied nur zum Untersuchungszeitpunkt nach 10 Wochen. Zu einem späteren Zeitpunkt (nach 17 Wochen) unterschieden sich die IL-10-/- und IL-10+/+ MRL-lpr Mäuse nicht mehr signifikant. Yin et. al. [69] mutmaßten, das sei dadurch bedingt, dass die kränksten Tiere (mit den folglich höchsten Auto-Ak-Konzentrationen) zu diesem Zeitpunkt bereits verstorben waren, wodurch die Ergebnisse "verfälscht" wurden. Wie bei den anderen untersuchten Parametern auch, ist die Studienlage auch bezüglich der Auto-Ak Produktion widersprüchlich. So werden in Studien am NZBxNZW-Modell bei Gabe von anti-IL-10-Ak reduzierte Auto-Antikörpertiter gemessen [67]. Beim humanen SLE korrelieren ebenfalls hohe IL-10-Spiegel und hohe Auto-Ak-Titer; Gabe von anti-IL-10-Ak senkt in diesen Untersuchungen die Spiegel der anti-ds-DNS-Ak [62, 65]. Angesichts der Tatsache, dass in dieser Arbeit die Tiere mit der höchsten Mortalität (RIIB-/-) die geringsten anti-ds-DNS-Ak und die RIIB-/-IL-10-/- (geringste Mortalität) die höchsten Autoantikörpertiter hatten (siehe Abbildung 33), besteht hier keine direkte Korrelation zwischen Antikörpertiter und Sterblichkeit.

Das könnte durch mehrere Ansätze zu erklären sein:

Erstens korreliert die Höhe der anti-ds-DNS-Ak nicht bei allen Patienten mit der Schwere der Endorganmanifestation. So zeigten SLE-Patienten mit hohen Antikörpertitern gegen ds-DNS teilweise nur geringe Nephritiszeichen und umgekehrt [13, 14].

Zweitens sind möglicherweise Antikörperspezifitäten gegen Strukturen wie das SmD1<sub>(83-119)</sub>Antigen aussagekräftiger als die anti-ds-DNS-Ak. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass die Spiegel der anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-Ak eng mit der Krankheitsaktivität des SLE korrelieren [11]. Dabei könnte eine Kreuzreaktivität zwischen den beiden Antigenen (ds-DNS und SmD1<sub>(83-119)</sub>) vorliegen [11]. Immunisierung mit dem SmD1<sub>(83-119)</sub>-Ag steigert die Produktion von anti-ds-DNS-Ak deutlich [130], während Auto-Ak gegen das SmD1-Ribonukleopeptid oftmals erst im späten Krankheitsverlauf des SLE nachgewiesen werden können. Daher wird das SmD1<sub>(83-119)</sub>-Ag vor allem in der Funktion eines T-Zell-aktivierenden Ag gesehen, welches die Reifung und Ak-Produktion von anti-ds-DNS-synthetisierenden Plasmazellen fördert.

In Folgestudien werden daher die Bestimmung der anti-SmD1<sub>(83-119)</sub>-Ak-Konzentration und der Vergleich zur hier bestimmten anti-ds-DNS-Ak-Konzentration interessant sein.

Drittens muss darauf hingewiesen werden, dass im Rahmen dieser Arbeit nur eine geringe Anzahl von Tieren analysiert werden konnte. In Folgestudien sollte die statistische Reliabilität durch größere Populationen erhöht werden. Ferner müsste eine periodische Analyse der Auto-Ak-Titer erfolgen, um den Verlauf der Erkrankung besser mit der Auto-Ak-Konzentration korrelieren zu können.

Letztlich ist noch zu bedenken, dass es sich bei dem FcyRIIB-Modell um ein Akabhängiges Modell handelt, bei dem die Tiere einen Defekt im inhibierenden Immunglobulin-Rezeptor haben. Insofern sind die Ak-Reaktivitäten in diesem Modell sicher verändert. Inwieweit das ein Bias für die Beurteilung des SLE und dessen Abhängigkeit von IL-10 darstellt, müssen die angesprochenen Folgestudien zeigen.

## 5.3.3. Andere Organbeteiligungen der FcγRIIBdefizienten Tiere in Abhängigkeit von IL-10

Da der SLE eine Multisystemerkrankung ist, interessierte, ob es neben den o.g. glomerulären Manifestationen noch pathogene Veränderungen anderer Organe gäbe.

Als Indiz für erhöhte Immunaktivität / Autoimmunität kann die Splenomegalie gewertet werden. Die Milzen der Tiere wurden vermessen und miteinander verglichen. Dabei fiel eine vermehrte Milzschwellung in der Gruppe RIIB-/-IL-10-/- im Vergleich zu den anderen Gruppen (siehe Abbildung 17) auf. Analog fand sich im MRL-Faslpr Modell [69] bei den IL-10-defizienten Tieren ebenfalls Splenomegalie und verstärkte Lymphoproliferation.

Die Ergebnisse ähneln denen der Lupusnephritis (siehe 5.3.1), müssten aber ebenfalls durch größere Populationen verifiziert werden.

In der Erstbeschreibung des verwendeten FcγRIIB-K.o.-Modells fiel neben der Glomerulonephritis eine generalisierte Vaskulitis auf. Betroffen waren u.a. die Speicheldrüsen, Pankreas, Leber, Muskeln und Zunge [98]. Auch im NZBxNZW und MRL<sup>lpr</sup> Modell wurden ähnliche Veränderungen gefunden. 15-30% der Mäuse hatten ferner kardiale Veränderungen entsprechend sub-/akuter Myokardinfarkte [131]. Bei den MRL<sup>lpr</sup> -Tieren imponierte bei mehr als 50% der Mäuse eine Polyarteriitis, die v.a. die renalen und koronaren Arterien betraf.

Auch eine Gelenkbeteiligung wurde in 20-25% der alten MRL<sup>lpr</sup> Mäuse beschrieben. Bei diesen traten Gelenkschwellungen besonders der hinteren Extremitäten mit histologischen Veränderungen wie bei Rheumatoidarthritis auf.

In den Modellen NZBxNZW und MRL<sup>lpr</sup> wird vereinzelt auch über Neoplasien in Form von Lymphomen und Adenokarzinomen berichtet [131].

In unserem Modell fanden wir nur in der Gruppe RIIB-/- bei 2/8 Mäusen makroskopisch Tumore im Unterbauch unklarer Dignität. Ob sie, wie bereits von Andrews et al. [131] berichtet, malignen Neubildungen entsprechen, ist bei fehlender Histologie spekulativ.

Bezüglich etwaiger kardialer Veränderungen als mögliche Todesursache, die in NZBxNZW und MRL<sup>lpr</sup>-Mäusen gefunden wurden [131], kann bei den hier

betrachteten Tieren keine Aussage getroffen werden. Daher sind in Folgestudien auch Untersuchungen des kardialen Status anzustreben.

In der Gruppe RIIB-/-IL-10-/- fanden wir vereinzelt pathologische Veränderungen der Leber (1/14 Tieren hatte eine Hepatomegalie mit Lymphozyteninfiltration).

Ferner fielen bei 5/14 Tieren des Genotyps RIIB-/-IL-10-/- Alopezie und bei 2/14 Tieren der gleichen Gruppe Bewegungsstörungen der hinteren Extremität auf, die sowohl im Rahmen einer Arthritis / Arthrose als auch neuromuskulär bedingt sein könnten. In den anderen 3 Gruppen fanden wir diese Veränderungen nicht. Allerdings erfolgte (abgesehen von den Nieren) keine histologische Aufarbeitung der Organe, sodass keine Aussagen darüber möglich sind, ob die beschriebenen Veränderungen eine entzündliche / autoimmune Ursache haben. Vermutet werden kann, dass diese Organpathologien mit der IL-10-Defizienz im RIIB-/-Modell assoziiert sind, da sie bei den IL-10-kompetenten Gruppen nicht auftraten. Dies zu klären wird Aufgabe nachfolgender Studien, die die entsprechenden Organe histopathologisch aufarbeiten, sein. Zum jetzigen Zeitpunkt kann nur beschrieben werden, dass in der Gruppe RIIB-/-IL-10-/- Hepatomegalie, Alopezie und Bewegungsstörungen des Hüftgelenks auftraten, hingegen in IL-10-kompetenten Untersuchungsgruppen nicht.

## 5.4. Unterschiede im zellulären Phänotyp der FcγRIIB-defizienten Mäuse in Abhängigkeit von IL-10

#### 5.4.1. Einfluss von IL-10 auf das T-Zell-Kompartiment

## 5.4.1.1. IL-10-Defizienz verursacht keine quantitativen Unterschiede der CD3+ zum Todeszeitpunkt im betrachteten RIIB-/- Modell

Ausgehend von der zentralen Rolle der T-Zellen als "Induktoren" des SLE analysierten wir die T-Zellen und ihre Subpopulationen durchflusszytometrisch.

Da IL-10, wie einleitend beschrieben (siehe 1.1.4) hemmend auf die T-Zell-Proliferation (durch Bindung / Blockade des costimulatorischen Moleküls CD28 und Hemmung der Ag-Präsentation auf APC [56-58, 133]) wirken kann, wären quantitative Veränderungen der CD3+ im Zusammenhang mit IL-10-Defizienz durchaus denkbar.

Ferner wären auch Einflüsse auf die Zahl der T-Zellen durch den FcγRIIB-Defekt, durch den weitere immunregulatorische Kapazität und Apoptose autoreaktiver Zellen [98, 100] entfällt, möglich.

Allerdings wurden in dieser Arbeit bezüglich der Gesamtzahl der T-Lymphozyten (CD3+) keine signifikanten Unterschiede in Abhängigkeit von IL-10-Defizienz festgestellt (siehe Abbildung 20). Alle betrachteten Populationen zeigten T-Zell-Fraktionen im Bereich von 15-25% der Lymphozyten. Auch bei der früheren Beschreibung des FcγRIIB-K.o.-Modells war die Gesamtzahl der CD3+ gegenüber der des Inzuchtstammes C57/BL6J [98] nicht verändert. Unter Berücksichtigung der Limitationen der hier vorliegenden Studie ist die Gesamtzahl der T-Zellen in der Milz zum finalen Krankheitszeitpunkt wohl nicht durch IL-10-Defizienz verändert.

Nachdem sich keine quantitativen Unterschiede der CD3+ festmachen ließen, wurde untersucht, ob innerhalb der T-Zellen Auffälligkeiten in Funktion und Subpopulationen vorlägen.

### 5.4.1.2. Betrachtung der zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen unter Einfluss von IL-10-Defizienz

Es wurde der Anteil der T-Helferzellen (CD3+CD4+) an der Gesamtzahl der Lymphozyten der Milz zum Todeszeitpunkt durchflusszytometrisch untersucht. Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede in der Zahl der CD3+CD4+ zwischen den vier Mauspopulationen (siehe Abbildung 21). Ferner waren die Anteile der CD4+T-Zellen in der Milz mit 12-17% vergleichbar denen des zugrunde liegenden Inzuchtstammes C57/BL6J [123] (hier werden 12-15% CD4+T-Zellen beschrieben). Dementsprechend können anhand dieser Arbeit auch keine quantitativen Veränderungen dieses T-Zell-Kompartiments bei IL-10-Defizienz konstatiert werden.

Die Fraktion der zytotoxischen T-Zellen (CD8+) war in den RIIB-/-IL-10-/- im Vergleich zu den IL-10-kompetenten Populationen deutlich geringer (siehe Abbildung 21). Die Angaben für den Inzuchtstamm C57/BL6J beziffern die CD8+ T-Zellen mit

einem Anteil von 9%. Damit scheinen die CD8+ T-Zell-Fraktionen der IL-10kompetenten Tiere in dieser Arbeit erhöht (siehe Abbildung 21). Allerdings muss dabei einbezogen werden, dass sich die Angaben des "gesunden" Inzuchtstammes auf ein Lebensalter von 15 Wochen beziehen, wohingegen die hier betrachteten Tiere bei der postmortalen Analyse ein durchschnittliches Alter > 300 Tage hatten, sodass der o.g. Vergleich zu den C57/BL6J nur bedingt möglich ist.

Die Tiere mit der geringsten Mortalität (RIIB-/-IL-10-/-) hatten in dieser Arbeit auch die geringste Anzahl an CD8+ T-Zellen zum finalen Krankheitszeitpunkt. Inwieweit daraus Rückschlüsse auf eine mögliche pathologische Involvierung der CD8+ T-Zellen in die Progression des SLE im hier betrachteten Modell möglich ist, ist anhand der vorliegenden Daten und den bereits mehrfach erwähnten Limitationen der Studie hochspekulativ und bleibt damit Folgestudien vorbehalten.

## 5.4.1.3. Einfluss von IL-10 im RIIB-/- Modell auf den Aktivierungsstatus (CD69+) der CD4+T-Zellen

Bisherige Studien beschreiben den SLE als eine Erkrankung, die maßgeblich von den CD4+T-Zellen beeinflusst wird. So wurde beispielsweise im murinen Experiment an NZB/NZW durch Gabe von anti-CD4-Ak die Progression des SLE vermindert [134].

Daher erfolgte, unter der Annahme einer insbesondere von den T-Helferzellen abhängigen Erkrankung, die weiterführende Analyse der CD4+T-Zellen. Es wurde zunächst untersucht, ob die Tiere zum Todeszeitpunkt einen verstärkt aktivierten Phänotyp der CD4+ zeigten. Betrachtet wurden dabei die Oberflächenmoleküle CD69 ("early-activation-marker") und CD25.

Die Rolle von CD69 als verstärkendem Faktor für Autoimmunerkrankungen wird schon länger diskutiert [116].

So weisen Patienten mit chronisch entzündlichen Erkrankungen wie der Rheumatoidarthritis erhöhte Anteile CD69-positiver T-Zellen in entzündlich verändertem Gewebe und in der Synovialflüssigkeit auf. Im Vergleich zu gesunden Probanden konnten in einer Studie ca. dreifach erhöhte (30,3% vs. 13%) Expressionsraten von CD69 auf T-Zellen nachgewiesen werden [135]. Sowohl bei der durch Anti-Kollagen-II-Ak induzierten Arthritis [136] als auch bei allergischen Atemwegserkrankungen war der Krankheitsverlauf bei CD69-defizienten Mäusen deutlich gelindert [137].

Insbesondere die Th2-gesteuerten Entzündungsreaktionen nach Gabe des Allergens Ovalbumin in der Lunge von CD69-defizienten Tieren waren abgeschwächt und die Einwanderung von CD4+ T-Zellen in die Lunge vermindert [137]. Diese Ergebnisse weisen auf eine bedeutsame Rolle der CD69+CD4-Zellen in der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen hin.

Auch bezüglich des SLE wird über eine vermehrte Aktivierung der CD4+ berichtet. So wurden bei NZBxNZW Mäusen deutlich erhöhte Anteile an CD4+CD69+ gemessen [138].

Die Arbeitsgruppe berichtet über einen möglichen pathogenen Effekt dieser CD4+CD69+ Zellen in der Milz älterer NZBxNZW Mäuse auf die Produktion insbesondere von IL-2 [138]. So zeigten sie, dass die CD4+CD69+ nicht nur kein IL-2 mehr produzierten, sondern sogar die Produktion von IL-2 durch CD4+ bei Co-Kultivierung hemmten. Wie bereits in der Einleitung erwähnt (siehe 1.1.4), spielt IL-2 eine entscheidende Rolle in der Homöostase der Immunantwort und für das Gleichgewicht der einzelnen T-Zellpopulationen [50, 85, 86]. Vor dem Hintergrund dieser Erkenntnisse wurde untersucht, ob IL-10 möglicherweise einen Einfluss auf die Progression des SLE mittels Beeinflussung der T-Zell-Aktivierung nimmt.

Es fiel eine vermehrte Expression des Aktivierungsmarkers CD69 auf den T-Helferzellen der IL-10-/-RIIB-/- Mäuse auf (siehe Abbildung 25). Die IL-10-/-RIIB-/-Mäuse wiesen dabei signifikant höhere Fraktionen an CD4+CD69+ als die IL-10kompetenten Tiere (40,1% bei RIIB-/-IL-10-/- vs. 21,7% bei den RIIB-/-) auf. Allerdings sind die Anteile der CD4+CD69+ T-Zellen im Vergleich zu den Daten von Bolland et al. [98] geringer. Sie maßen für die RIIB-/- Tiere Anteile der CD69+ T-Helferzellen von 49% (SD 3,1%). Für die gesunde Kontrollgruppe C57/BL6J geben sie Werte von 25,5% (SD 7,8%) an.

In Bezug auf diese Daten lägen die IL-10-kompetenten Tiere im Bereich der "gesunden" C57/BL6J; die IL-10-defizienten Mäuse zeigten pathologisch erhöhte Fraktionen der CD4+CD69+.

Die RIIB-/-IL-10-/- Mäuse lebten jedoch trotz der am stärksten aktivierten CD4+T-Zellen am längsten, sodass wie schon bei der Proteinurie in dieser Arbeit kein direkter Zusammenhang zwischen Mortalität und aktiviertem Phänotyp besteht. So kann hier nur gemutmaßt werden, ob die phänotypischen Veränderungen der T-Zellen hin zu einem stärkeren Anteil der CD4+CD69+, die in den oben erwähnten anderen Studien mit vermehrter Krankheitsaktivität des SLE einhergingen, erst im Lebensalter auftreten. das die RIIB-/höheren aufgrund ihrer großen Frühsterblichkeit nicht erreichten. Auch hier wären in Folgestudien Aufschlüsse beim Vergleich der Populationen zu mehreren definierten Alterszeitpunkten zu erwarten. Diese Arbeit kann als Pilotstudie nur den Endpunkt der Erkrankung beschreiben. Zu diesem Zeitpunkt zeigen die Tiere mit der größten Frühsterblichkeit (RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/-) die kleinsten Anteile von CD4+CD69+ und die Tiere mit der längsten Überlebenszeit (RIIB-/-IL-10-/-) die meisten aktivierten T-Zellen.

## 5.4.1.4. Betrachtung der T-Gedächtniszellen im RIIB-/-Modell in Abhängigkeit von IL-10

Bei Analyse der T-Gedächtniszellen (CD4+CD44+) unterschieden sich die untersuchten Mauspopulationen im Wesentlichen nicht (siehe Abbildung 22). IL-10 scheint also in dieser Arbeit zum finalen Krankheitsstadium des SLE keinen Einfluss auf die Gesamtzahl der T-Gedächtniszellen zu nehmen.

Anhand des Oberflächenmarkers CD62L wurden die T-Helferzellen in die verschiedenen "Gattungen" der Gedächtniszellen subklassifiziert. CD62L ist dabei ein Adhäsionsmolekül, das die naiven T-Zellen exprimieren, um in entzündetes Gewebe einzuwandern. Nach Ag-Kontakt wird CD62L von der Oberfläche entfernt [114]. Dementsprechend kann anhand der Expression dieses Moleküls unterschieden werden, ob die T-Zelle bereits Ag-Kontakt hatte (CD62L-) oder noch naiv ist (CD62L+). Während die Effektorgedächtniszellen ( $T_{EM}$ ) (CD62L-CD44+) Hyperresponsibilität nach Ag- / anti-CD3-Stimulation zeigen und durch schnelle Proliferation und Aktivierungskapazität gekennzeichnet sind, sind die zentralen Gedächtniszellen ( $T_{CM}$ )(CD62L+CD44+) eher ruhende Zellen mit trägerer Aktivierung und Proliferation.

Wir fanden allseits, unabhängig von der IL-10-Kompetenz der betrachteten Tiere, ein Vorherrschen (40-45%) von Effektorgedächtniszellen (CD4+CD44+CD62L-) an den CD4+T-Zellen der Milz.

Das verwundert für die Fc $\gamma$ RIIB-defizienten Tiere nicht, ist doch von einer verstärkten Aktivität der Immunantwort zum betrachteten finalen Erkrankungszeitpunkt des SLE auszugehen. Erneut wurde aber, wie auch schon bezüglich der Proteinurie (siehe 5.3.1) beobachtet, dass auch die IL-10-/- Tiere ohne Fc $\gamma$ RIIB-Defekt ähnlich viele T<sub>EM</sub> als Hinweis auf eine Autoimmunerkrankung, welche so bisher nicht beschrieben ist, hatten. Auch hier sei auf die beschriebenen Beschränkungen dieser Pilotstudie hingewiesen, sodass es folgenden Studien vorbehalten bleibt, diese phänotypischen Veränderungen der T-Zellen im IL-10-/- Modell zu verifizieren.

Im Anschluss wurde der Aktivierungszustand der Gedächtniszellen anhand des Chemokinrezeptors CXCR3 beurteilt. CXCR3 dient v.a. als Marker für T-Zellen mit hoher Migrationsfähigkeit für inflammatorisches Gewebe [139].

Es fand sich besonders bei den RIIB-/-IL-10-/-, die aber die Gruppe mit dem längsten medianen Überleben darstellten, eine verstärkte CXCR3-Expression der  $T_{CM}$  (45%), die bei allen anderen Genotypen nicht so stark ausgeprägt war (im Durchschnitt 40%) (siehe Abbildung 23).

Auch hier kann neben dem Verweis auf studieninterne Limitationen ähnlich wie bei der Diskussion der Organmanifestationen des SLE nur spekuliert werden, ob diese vermehrte CXCR3-Expression mit dem höheren Lebensalter der Tiere zusammenhängt.

Eine mehrmalige Bestimmung dieses Markers zu definierten Alterszeitpunkten sollte in folgenden Studien genaueren Aufschluss darüber bringen, wie der IL-10-K.o. sich zu früheren Krankheitszeitpunkten auf den Expressionsstatus auswirkt und ob möglicherweise vermehrte CXCR3-Expression der  $T_{CM}$  an der Pathogenese des SLE im RIIB-/-Modell beteiligt ist.

#### 5.4.1.5. Veränderungen der regulatorischen T-Zellen unter Einfluss von IL-10-Defizienz im RIIB-/- Modell

Den Treg kommt als Garanten der Immunhomöostase eine wesentliche Rolle zu. Ihre Defekte und Defizite führen zu fatalen Autoimmunerkrankungen [31]. Sie sind im humanen [39-41] wie auch im murinen SLE-Modell [42] im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen verändert, was die Immunhomöostase stört. Treg von SLE-Patienten haben verminderte suppressorische Fähigkeiten und exprimieren weniger FoxP3. Diese Veränderungen scheinen reversibel bei *in vitro*-Stimulation mit anti-CD3 und IL-2 [49]. Das legt den Schluss nahe, dass im SLE eine Störung der Homöostase zwischen Effektor-T-Zellen und Treg auf der Grundlage einer verminderten IL-2-Sekretion besteht [50], die bei Gabe von r-IL-2 zumindest teilweise wiederhergestellt kann (siehe 1.1.3.4).

In der hier vorliegenden Arbeit wurden die Anteile der Treg an den CD4+ T-Zellen der Milz anhand der Expression des Markers FoxP3 bestimmt. Es fand sich die Hypothese quantitativ verminderter Treg (CD4+CD25+FoxP3+) beim SLE bestätigt (siehe Abbildung 26). Die Tiere mit RIIB-K.o. hatten signifikant weniger Treg als die RIIB+/+IL-10-/- Mäuse. Zwischen den einzelnen Tieren mit RIIB-K.o. waren die Unterschiede nicht signifikant, sodass (am Lebensende der Tiere) die IL-10-Defizienz keinen Einfluss auf die Gesamtzahl der Treg zu haben scheint. In Folgestudien sind Bestimmungen der Treg zu mehreren, definierten Alterszeitpunkten anzustreben, um zu erkennen, ob der Beginn der aktiven Erkrankung mit Veränderungen der Treg in den IL-10-defizienten Tieren einhergeht. erscheint in zukünftigen Studien eine funktionelle Ferner Analyse der suppressorischen Kapazität der Treg (i.e. Proliferationshemmung von Effektor-Tder IL-10-defizienten Tiere des RIIB-K.o.-Modells unerlässlich, da die Zellen) Sekretion von IL-10 ein etablierter Effektormechanismus der CD4+CD25+FoxP3+ (siehe 1.1.3) ist.

Die Verminderung der Treg zum Todeszeitpunkt bedingt das zum finalen Krankheitszeitpunkt bestehende immunologische Ungleichgewicht mit einem konsekutiven Vorherrschen der Effektorzellen bei FcyRIIB-defizienten Mäusen. Bei der Analyse der CD4+FoxP3+ Zellen fanden sich in dieser Arbeit vermehrt CD4+CD25-FoxP3+ T-Zellen (siehe Abbildung 26). Das vermehrte Vorkommen dieser T-Zellen wurde schon in anderen Studien beschrieben [44], [45, 141] und korrelierte mit der Krankheitsaktivität des SLE positiv. In der Vergangenheit sind bezüglich dieser Zellen mehrere Thesen aufgestellt worden: Einerseits wurde argumentiert, es handele sich um "atypische" Treg, die in ihrer suppressorischen Funktion eingeschränkt seien und somit zur Progression des SLE beitrügen [45]. Die Gegenthese lautete, es handele sich vielmehr um aktivierte Non-Treg [46]. In aktuellen Arbeiten werden diese CD4+CD25-FoxP3+ als peripheres Reservoir für die natürlichen Treg angesehen [142]. Sie könnten bei Bedarf (i.e. bei vermehrtem Auftreten autoreaktiver T-Zellen) die Expression von CD25 wiedererlangen und dazu beitragen, die T-Zell-Homöostase wiederherzustellen.

In dieser Arbeit fanden wir in den Gruppen stark schwankende Anteile der CD4+CD25-FoxP3+ zwischen 6 – 20% der CD4+ T-Zellen.

Auffällig war, dass die Zahl dieser "atypischen Treg" in den Tieren mit IL-10-Defizienz höher (IL-10-/- 20,6% (SD 3%)) als in den IL-10-kompetenten Gruppen (RIIB-/- 6% (SD 4%)) war. Somit hatte die RIIB-/- Gruppe (Population mit der kürzesten Überlebenszeit) signifikant weniger "atypische Treg" als die anderen Gruppen. Das könnte vielleicht die These untermauern, bei den CD4+CD25-FoxP3+ handele es sich um ein peripheres Reservoir, aus dem Treg bei Bedarf rekrutiert werden können [142]. Möglicherweise konnten die Tiere mit dem längeren Überleben (IL-10-/- und RIIB-/-IL-10-/-), da sie mehr CD4+CD25-FoxP3+ hatten, auf ein größeres Reservoir an Treg zurückgreifen und waren deshalb länger gegen die Autoimmunreaktionen geschützt als die anderen beiden Gruppen. Da die Tiere mit IL-10-K.o. länger lebten und mehr CD4+CD25-FoxP3+ T-Zellen hatten, könnte IL-10 hemmend auf die Ausprägung dieser Treg wirken. Entsprechend wäre bei den IL-10-kompetenten Populationen das T-Zell-Gleichgewicht mehr zu den Effektor-T-Zellen verschoben.

Auch hier wären Verlaufsbetrachtungen der CD4+CD25-FoxP3+ T-Zellen zu verschieden Krankheitszeitpunkten sinnvoll, um beurteilen zu können, ob der Beginn der aktiven SLE-Erkrankung mit Veränderungen in der Zahl der CD4+CD25-FoxP3+ einhergeht.

## 5.4.2. Auswirkungen der IL-10-Defizienz auf das B-Zell-Kompartiment

Wie einleitend beschrieben, sind Zellen des B-Zellkompartiments, besonders in Form Auto-Ak-sezernierender Plasmazellen (CD19+CD138+), in die Pathogenese des SLE [18-20] involviert.

Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Gesamtzahl der B-Zellen zwischen den betrachteten Populationen (IL-10-/-, RIIB-/-IL-10-/-, RIIB-/-, RIIB-/-IL-10+/-) zum Endpunkt der Erkrankung festgestellt werden (siehe Abbildung 27). Auch unterscheidet sich die Zahl der B-Zellen in dieser Arbeit (50-55% der Milzlymphozyten) kaum von "gesunden" C57/BL6J Mäusen (57-58%) [123] und den (B220+) Zellen der RIIB-/- Mäusen in der Studie von Bolland et al. [98]. Die Gesamtzahl der B-Zellen ist daher in dieser Arbeit zum Todeszeitpunkt nahezu unverändert zu gesunden Kontrollen und scheint (zumindest zu diesem finalen Zeitpunkt) auch von IL-10-Defizienz unbeeinflusst.

Die weitergehende Untergliederung in naive B-Zellen und Plasmazellen zeigte bei den RIIB-/-IL-10-/- im Vergleich zu den anderen Populationen eine verstärkte Reifung zu Plasmazellen (siehe Abbildung 28). Das verwundert insoweit, als dass diese Population das längste mediane Überleben zeigte. So kann der Zusammenhang zwischen größter Mortalität und den meisten Autoantikörper-produzierenden B-Zellen anhand der hier vorliegenden Daten nicht gezogen werden. Möglicherweise ist der SLE eher eine T-Zell-abhängige Erkrankung, sodass die beschriebenen phänotypischen Unterschiede im B-Zell-Kompartiment nicht wesentlich für die Krankheitsprogression sind.

Erneut, diese Studie kann nur den Endpunkt des SLE in den betrachteten Genotypen beschreiben, wobei auffällt, dass die RIIB-/-IL-10-/- signifikant mehr Plasmazellen als die anderen Populationen haben. Inwieweit diese Unterschiede zu Krankheitsbeginn relevant sind, müssen weitere Studien beurteilen.

### 5.5. Zytokinsynthese unter IL-10-Defizienz

Wie bereits einleitend erwähnt, ist beim SLE von einer Imbalance der Th1/Th2-Zytokine auszugehen, die in der Konsequenz zu vermehrter Auto-Ak-Produktion führt [55, 71-74, 76-78]. Die Studienergebnisse, welche T-Helferpopulation dominiere, sind uneinheitlich; es wird sowohl über eine vorherrschende Th2-Antwort [71] als auch über eine dominierende Th1-Zytokinsekretion in Form von IFN-γ berichtet [72, 76, 78, 143].

Trotz offensichtlicher Divergenz der Studienmeinungen, welche Zytokine vorherrschen, scheint unumstritten, dass das Ungleichgewicht zwischen Th1 und Th2 ein wesentlicher Pathogenitätsfaktor für den SLE ist. In der vorliegenden Arbeit wurden IL-4 und IFN-γ stellvertretend untersucht.

IL-4 fördert als Th2-Zytokin die Proliferation von B-Lymphozyten und ihre Reifung zu Ak-produzierenden Plasmazellen. Die Zahl der IL-4-positiven CD4+ T-Zellen stieg nach Stimulation mit PMA/Iono bei den IL-10-defizienten und IL-10+/- Mäusen stärker an, als bei den IL-10-kompetenten RIIB-/- (siehe Abbildung 29).

Da die Bestimmung von IL-4 hier zum Finalstadium der Erkrankung erfolgte, erscheint eine pathologische Auslenkung der Zytokinproduktion plausibel. Anhand der vorliegenden Daten scheint die Abwesenheit von IL-10 die Zytokinsynthese zugunsten der proinflammatorischen Komponente zu verschieben. Da auch beim heterozygoten Phänotyp (RIIB-/-IL-10+/-) deutlich mehr IL-4-positive CD4+ T-Zellen gemessen wurden, scheint schon ein relativer Mangel an IL-10 zur Verschiebung der T-Zell-Antwort zu genügen. Da aber die RIIB-/- die größte Mortalität im Intergruppenvergleich zeigen, scheint IL-10-Mangel (zumindest in den RIIB-/-) nicht allein ursächlich. So ist die Beurteilung der Relevanz der gesteigerten IL-4-Sekretion bei IL-10-Defizienz in dieser Arbeit schwierig zu beurteilen, da hier nur Daten zum Todeszeitpunkt vorliegen. Zu diesem Zeitpunkt ist von einem maximalen Ungleichgewicht der Immunantwort im Sinne schwerer Autoimmunität auszugehen. Die Veränderungen der Zytokinsekretion sollten in weiteren Studien an IL-10defizienten RIIB-/- Tieren auch im früheren Krankheitsverlauf untersucht werden. Nur so kann rückgeschlossen werden, ob Veränderungen der Zytokinproduktion unter IL-10-Defizienz mit dem Krankheitsbeginn korrelieren.

IFN-γ wird sowohl beim humanen SLE als auch im murinen Modell als Pathogenitätsfaktor beschrieben.
SLE-Patienten zeigen, bedingt durch hohe IFN-γ Spiegel, B-Zellhyperaktivität, verstärkte B-Zell-Proliferation [76, 77] und in der Konsequenz erhöhte Auto-Ak-Produktion und Lupusnephritis [78],[79].

Auch MRL-lpr Mäuse haben eine erhöhte Konzentration von IFN-γ. Studien berichten über bis zu 100fach erhöhte IFN-γ-m-RNA in den lymphatischen Zellen von MRL-lpr Mäusen im Vergleich zur Kontrollgruppe [144], die mit hohen Autoantiköpertitern korrelieren [145]. Durch K.o. des IFN-γ Gens konnte im MRL-lpr-Modell die Krankheitsaktivität des SLE reduziert werden [143].

In der vorliegenden Arbeit waren die Unterschiede in der IFN-γ-Produktion der CD4+ T-Zellen nach Stimulation mit PMA/Iono nicht signifikant (siehe Abbildung 30).

Tendenziell ergab sich für IFN-γ aber ein ähnliches Bild wie für IL-4. Im Vergleich der Verhältnisse der beiden T-Helferzellpopulationen überwog die Synthese von IFN-γ tendenziell leicht gegenüber der von IL-4 (außer in der RIIB-/-IL-10+/- Gruppe). Dabei muss allerdings kritisch angemerkt werden, dass die Stärke der vier Gruppen verschieden war und möglicherweise nicht groß genug, um Signifikanzniveau zu erreichen. Ferner wurde nur die Zytokinproduktion der T-Helferzellen gemessen, andere Zellpopulationen wie NK-Zellen, Mastzellen bzw. APC sezernieren jedoch auch IL-4 bzw. IFN-γ, sodass die Messung der Zytokine im Serum *in vivo* möglicherweise aussagekräftiger als die Messung der CD4+-Zytokinsekretion *in vitro* wäre.

Auch wäre eine Untersuchung zwischen Alter und gemessener Zytokinproduktion interessant, um einen möglichen Zusammenhang zwischen Krankheitsprogression im RIIB-k.o.-Modell und Konzentration von IL-4 bzw. IFN-γ beurteilen zu können.

Bei abschließender Analyse der Zytokinproduktion stellten wir fest, dass einige der CD4+ Zellen sowohl IFN-γ als auch IL-10 bzw. sowohl IL-4 als auch IL-10 produzierten (siehe Abbildung 31 und Abbildung 32).

Eigentlich ist IFN-γ ein Th1- und IL-10 ein Th2-Zytokin. Beide T-Helferzellpopulationen hemmen normalerweise die Stimulation der anderen Population [70]. In Anwesenheit hoher Ag- und IL-12-Konzentrationen können jedoch auch Th1-Zellen IL-10 produzieren. Dabei wird eine sogenannte ERK MAP-Kinase (extracelular signal regulated mitogen activated protein kinase) aktiviert, die einen STAT4-Signalweg aktiviert, an dessen Ende die Sekretion von IL-10 steht [124]. Auch Th2-Zellen benötigen für die IL-10-Produktion die Aktivierung von ERK1/2; so wird auch hier durch hohe Ag-Dosen die Sekretion von IL-10 induziert. Sinn dieser Signalwege ist vermutlich eine Feedbackhemmung, d.h. die Vermeidung einer überschießenden Immunreaktion bei hohen Antigendosen durch IL-10 Sekretion.

Der Nachweis von sowohl IL-4+/IL-10+ T-Zellen als auch von IFNγ+/IL-10+ T-Zellen in den RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/- wäre somit konsistent mit einer (pathologisch) erhöhten Immunaktivierung wie sie hier im Finalstadium des SLE vorliegen dürfte.

# 5.6. IL-10-defiziente C57/BL6J – ein neues SLE-Modell?

Interessanterweise zeigten auch die IL-10-/- Tiere, die aufgrund des fehlenden RIIB-K.o. eigentlich keinen SLE entwickeln sollten, eine vermehrte Protein- und Leukozyturie um 100mg/dl (siehe Abbildung 16). Auch fanden wir - zumindest bei einer der auswertbaren Nierenhistologien dieser Gruppe - zelluläre Infiltrate in den Glomeruli (siehe Tabelle 10).

Die Lebenserwartung der Gruppe war mit 380 Tagen im Vergleich zu IL-10kompetenten Tieren des gleichen C57/BL6J-Inzuchtstammes (750-900 Tage [122]) limitiert.

Weiterhin fanden wir erhöhte Serumspiegel von ds-DNS-Ak in den IL-10-/- Mäusen (die Ak-Spiegel waren annähernd doppelt so hoch wie in den IL-10-kompetenten Tieren der Gruppen RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/-). Als weitere Indizien einer systemischen Autoimmunerkrankung fanden wir in den IL-10-/- Tieren im Vergleich zu den RIIB-/- und RIIB-/-IL-10+/- einen erhöhten Anteil an aktivierten T-Helferzellen (CD4+CD69+) (siehe Abbildung 25), Effektorgedächtniszellen (siehe Abbildung 22) und tendenziell eine Splenomegalie (siehe Abbildung 17).

Es stellt sich daher die Frage, ob IL-10-Defizienz im C57/BL6J-Stamm ein SLEähnliches Krankheitsbild auslösen kann.

Bisherige Untersuchungen an IL-10-defizienten Mäusen etablierten den Zusammenhang zwischen IL-10-Defizienz und Enterocolitis [68, 128]. Die Schwere

der Darmentzündung ist dabei maßgeblich vom betrachteten Inzuchtstamm und den mikrobiellen Umgebungsfaktoren abhängig.

Ein Zusammenhang zwischen Glomerulonephritis oder gar SLE und IL-10-/- Mäusen konnte jedoch nach ausgiebiger Literaturrecherche bisher nirgendwo belegt werden.

Ausgehend von den hier erhobenen Daten sind die IL-10-defizienten C57/BL6/J Mäuse möglicherweise als Ansatz für ein alternatives murines Modell des SLE geeignet.

Auf die Limitationen dieser Arbeit ist bereits mehrfach hingewiesen worden. In Folgestudien müsste anhand von histologischen Organuntersuchungen und regelmäßigen (zu verschiedenen Zeitpunkten der Erkrankung) Bestimmungen der Urinparameter und des Antikörperstatus die entzündliche Systemerkrankung belegt oder ausgeschlossen werden. Wie erwähnt, liefert diese Arbeit nur Indizien dafür, dass der IL-10-K.o., aufgrund der beschriebenen immunregulatorischen Rolle dieses Zytokins, als neuartiges Modell zur Erforschung des SLE geeignet sein könnte.

#### 6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von IL-10 auf den systemischen Lupus erythematodes erstmals am murinen FcγRIIB-K.o.-Modell (auf dem genetischen C57/BL6J-Hintergrund) untersucht. Die bisherige Studienlage ist uneins, ob IL-10 aufgrund seiner komplexen teils immunsuppressiven, teils immunstimulierenden Rolle einen positiven oder negativen Einfluss auf die Pathogenese des SLE nimmt. Nachdem bisherige Studien widersprüchliche Ergebnisse im murinen MRL-Ipr und NZBxNZW Modell lieferten, nutzten wir vergleichend das murine FcγRIIB-Modell des SLE, bei dem die Tiere, aufgrund des Gen-K.o. des inhibitorischen Fc-Rezeptors, ein dem humanen SLE ähnliches Krankheitsbild entwickeln. Dabei wurden die Versuchsgruppen RIIB-/-IL-10-/- (IL-10 defiziente RIIB-K.o. Mäuse), RIIB-/-IL-10+/- (RIIB-K.o. Mäuse mit heterozygotem IL-10 Defekt) und RIIB-/-IL-10+/+ (RIIB-K.o. Mäuse mit intaktem IL-10-Gen) gegenübergestellt.

Es zeigte sich ein verlängertes medianes Überleben der RIIB-/-IL-10-/- (431 Tage) im Vergleich zu den IL-10-kompetenten Gruppen (RIIB-/-IL-10+/+ (241Tage) und RIIB-/-IL-10+/- (365Tage)), sodass IL-10 als Pathogenitätsfaktor wirken könnte. Allerdings waren die Parameter Splenomegalie, Proteinurie, Leukozyturie und anti-ds-DNS-Ak zum Zeitpunkt des Todes bei den IL-10-defizienten FcγRIIB-/- Mäusen im Vergleich zu den IL-10-kompetenten Populationen erhöht. Auch zeigten die RIIB-/-IL-10-/- Tiere im Vergleich zu den RIIB-/-IL-10+/- und RIIB-/-IL-10+/- verstärkte T-Zellaktivierung (CD4+CD69+), eine Tendenz zu verstärkter Th1-Antwort (IFN-γ-Produktion) und hatten verminderte Fraktionen an regulatorischen T-Zellen (CD4+CD25+FoxP3+).

Möglicherweise wirkt das komplexe Zytokin zu verschiedenen Phasen der Erkrankung konträr; initial könnte eine immunregulatorische Funktion (Hemmung der überschießenden Th1- und humoralen Immunantwort) überwiegen, während im Finalstadium der Erkrankung die reaktiv exzessiv gesteigerte IL-10-Sekretion zu vermehrter Aktivierung Auto-Ak-produzierender Plasmazellen und konsekutiv zur Endorganschädigung durch Ablagerung von Immunkomplexen führen könnte. Daher scheinen sowohl die Gabe von IL-10 in frühen Phasen der Erkrankung als auch die Gabe von anti-IL-10-Ak im fortgeschrittenen Krankheitsverlauf mögliche Therapieoptionen zu sein, die es lohnt weiter zu evaluieren.

Zur Beurteilung der Auswirkungen des IL-10-Defektes auf "gesunde" Tiere des gleichen Inzuchtstammes analysierten wir auch IL-10-/- Mäuse ohne FcyRIIB-Knock-out.

Interessanterweise entwickelten die Tiere ebenfalls ein SLE-ähnliches Krankheitsbild. Wir fanden in diesem Stamm nicht nur eine im Vergleich zu den C57/BL6 erhöhte Mortalität (medianes Überleben IL-10-/- 380 Tage). Vielmehr wiesen wir auch unabhängig vom FcγRIIB-Knock-out erstmals Proteinurie / Leukozyturie und zelluläre Infiltrate in den Nieren der IL-10-/- nach, die in der Literatur für IL-10-K.o.-Mäuse bisher nicht beschrieben wurden.

Die mit dieser Arbeit aufgeworfene Frage, ob IL-10-defiziente Mäuse aufgrund der beschriebenen pathogenen Veränderungen als alternatives SLE-Modell geeignet sind, wird in Folgestudien zu klären sein.

### 7. Literaturverzeichnis

- 1. Danchenko, N., J.A. Satia, and M.S. Anthony, *Epidemiology of systemic lupus erythematosus: a comparison of worldwide disease burden.* Lupus, 2006. 15(5): p. 308-18.
- 2. Manson, J.J. and A. Rahman, *Systemic lupus erythematosus.* Orphanet J Rare Dis, 2006. 1: p. 6.
- 3. Gabriel, S.E. and K. Michaud, *Epidemiological studies in incidence, prevalence, mortality, and comorbidity of the rheumatic diseases.* Arthritis Res Ther, 2009. 11(3): p. 229.
- 4. Johnson, A.E., et al., *The prevalence and incidence of systemic lupus erythematosus in Birmingham, England. Relationship to ethnicity and country of birth.* Arthritis Rheum, 1995. 38(4): p. 551-8.
- 5. Piette, J.C., Updating the American College of Rheumatology criteria for systemic lupus erythematosus: comment on the letter by Hochberg. Arthritis Rheum, 1998. 41(4): p. 751.
- 6. Mok, C.C. and C.S. Lau, *Pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* J Clin Pathol, 2003. 56(7): p. 481-90.
- 7. Deapen, D., et al., *A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1992. 35(3): p. 311-8.
- 8. Bishof, N.A., et al., *DP polymorphism in HLA-A1,-B8,-DR3 extended haplotypes associated with membranoproliferative glomerulonephritis and systemic lupus erythematosus.* Pediatr Nephrol, 1993. 7(3): p. 243-6.
- 9. Kelly, J.A., K.L. Moser, and J.B. Harley, *The genetics of systemic lupus erythematosus: putting the pieces together.* Genes Immun, 2002. 3 Suppl 1: p. S71-85.
- 10. Ghebrehiwet, B. and E.I. Peerschke, *Role of C1q and C1q receptors in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.* Curr Dir Autoimmun, 2004. 7: p. 87-97.
- 11. Riemekasten, 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): p. 754-63.
- 12. Yoshimi, R., et al., *Clinical and pathological roles of Ro/SSA autoantibody system.* Clin Dev Immunol, 2012. 2012: p. 606195.
- 13. Mortensen, E.S. and O.P. Rekvig, *Nephritogenic Potential of Anti-DNA Antibodies against Necrotic Nucleosomes.* Journal of the American Society of Nephrology, 2009. 20(4): p. 696-704.
- 14. Seredkina, N., et al., *Lupus nephritis: enigmas, conflicting models and an emerging concept.* Mol Med, 2013. 19(1): p. 161-9.
- 15. Liossis, S.N., et al., *B cells from patients with systemic lupus erythematosus display abnormal antigen receptor-mediated early signal transduction events.* J Clin Invest, 1996. 98(11): p. 2549-57.
- 16. Linker-Israeli, M., et al., *Élevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis.* J Immunol, 1991. 147(1): p. 117-23.
- 17. Monneaux, F. and S. Muller, *Epitope spreading in systemic lupus erythematosus: Identification of triggering peptide sequences.* Arthritis & Rheumatism, 2002. 46(6): p. 1430-1438.
- 18. Wofsy, D., et al., *Thymic influences on autoimmunity in MRL-lpr mice.* Scand J Immunol, 1982. 16(1): p. 51-8.

- 19. Mihara, M., et al., Immunologic abnormality in NZB/NZW F1 mice. Thymusindependent occurrence of B cell abnormality and requirement for T cells in the development of autoimmune disease, as evidenced by an analysis of the athymic nude individuals. J Immunol, 1988. 141(1): p. 85-90.
- 20. Portales-Perez, D., et al., *Abnormalities in CD69 expression, cytosolic pH and Ca2+ during activation of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus.* Lupus, 1997. 6(1): p. 48-56.
- 21. Crispin, J.C. and J. Alcocer-Varela, *Interleukin-2 and systemic lupus erythematosus--fifteen years later.* Lupus, 1998. 7(4): p. 214-22.
- 22. Herrmann, M., et al., *Impaired phagocytosis of apoptotic cell material by monocyte-derived macrophages from patients with systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 1998. 41(7): p. 1241-50.
- 23. Brambila-Tapia, A.J. and I.P. Davalos-Rodriguez, [Fcgamma receptor polymorphisms and systemic lupus erythematosus]. Rev Invest Clin, 2009. 61(1): p. 66-72.
- 24. Takahashi, T., et al., *Generalized lymphoproliferative disease in mice, caused by a point mutation in the Fas ligand.* Cell, 1994. 76(6): p. 969-76.
- 25. Strasser, A., P.J. Jost, and S. Nagata, *The many roles of FAS receptor signaling in the immune system.* Immunity, 2009. 30(2): p. 180-92.
- 26. Emlen, W., J. Niebur, and R. Kadera, *Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 1994. 152(7): p. 3685-92.
- 27. Mohan, C., et al., *Nucleosome: a major immunogen for pathogenic autoantibody-inducing T cells of lupus.* J Exp Med, 1993. 177(5): p. 1367-81.
- 28. Fadok, V.A., et al., *Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF.* J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 890-8.
- 29. Lahita, R.G., *The role of sex hormones in systemic lupus erythematosus.* Curr Opin Rheumatol, 1999. 11(5): p. 352-6.
- 30. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3.* Science, 2003. 299(5609): p. 1057-61.
- 31. Sakaguchi, S., et al., *Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.* Immunol Rev, 2006. 212: p. 8-27.
- 32. Jonuleit, H. and E. Schmitt, *The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations.* J Immunol, 2003. 171(12): p. 6323-7.
- 33. Sakaguchi, S., et al., *Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?* International Immunology, 2009. 21(10): p. 1105-1111.
- 34. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober, *Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta.* J Exp Med, 2001. 194(5): p. 629-44.
- 35. Sundstedt, A., et al., *Role for IL-10 in suppression mediated by peptide-induced regulatory T cells in vivo.* J Immunol, 2003. 170(3): p. 1240-8.
- 36. Berg, D.J., et al., Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. J Clin Invest, 1996. 98(4): p. 1010-20.

- 37. Fontenot, J.D. and A.Y. Rudensky, *A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3*. Nat Immunol, 2005. 6(4): p. 331-7.
- 38. Suri-Payer, E. and H. Cantor, *Differential cytokine requirements for regulation of autoimmune gastritis and colitis by CD4(+)CD25(+) T cells.* J Autoimmun, 2001. 16(2): p. 115-23.
- 39. Liu, M.F., et al., *Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus.* Scand J Immunol, 2004. 59(2): p. 198-202.
- 40. Crispin, J.C., A. Martinez, and J. Alcocer-Varela, *Quantification of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus.* J Autoimmun, 2003. 21(3): p. 273-6.
- 41. Liu, M.F., et al., *Decreased CD4+CD25+ T Cells in Peripheral Blood of Patients with Systemic Lupus Erythematosus.* Scandinavian Journal of Immunology, 2004. 59(2): p. 198-202.
- 42. Hsu, W.T., J.L. Suen, and B.L. Chiang, *The role of CD4CD25 T cells in autoantibody production in murine lupus.* Clin Exp Immunol, 2006. 145(3): p. 513-9.
- 43. Bonelli, M., et al., *Quantitative and qualitative deficiencies of regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus (SLE).* Int Immunol, 2008. 20(7): p. 861-8.
- 44. Horwitz, D.A., *Identity of mysterious CD4+CD25-Foxp3+ cells in SLE.* Arthritis Res Ther, 2010. 12(1): p. 101.
- 45. Bonelli, M., et al., *Phenotypic and functional analysis of CD4+ CD25- Foxp3+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus.* J Immunol, 2009. 182(3): p. 1689-95.
- 46. Yang, H.X., et al., Are CD4+CD25-Foxp3+ cells in untreated new-onset lupus patients regulatory T cells? Arthritis Res Ther, 2009. 11(5): p. R153.
- 47. Engler, J.B., et al., Unmasking of autoreactive CD4 T cells by depletion of CD25 regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis, 2011. 70(12): p. 2176-83.
- 48. Weigert, O., et al., *CD4+Foxp3+ regulatory T cells prolong drug-induced disease remission in (NZBxNZW) F1 lupus mice.* Arthritis Res Ther, 2013. 15(1): p. R35.
- 49. Valencia, X., et al., *Deficient CD4+CD25high T Regulatory Cell Function in Patients with Active Systemic Lupus Erythematosus.* The Journal of Immunology, 2007. 178(4): p. 2579-2588.
- 50. Humrich, J.Y., et al., *Homeostatic imbalance of regulatory and effector T cells due to IL-2 deprivation amplifies murine lupus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. 107(1): p. 204-9.
- 51. Moore, K.W., et al., *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor.* Annu Rev Immunol, 2001. 19: p. 683-765.
- 52. Mosser, D.M. and X. Zhang, *Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine*. Immunol Rev, 2008. 226: p. 205-18.
- 53. Donnelly, R.P., H. Dickensheets, and D.S. Finbloom, *The interleukin-10 signal transduction pathway and regulation of gene expression in mononuclear phagocytes.* J Interferon Cytokine Res, 1999. 19(6): p. 563-73.
- 54. Ding, L., et al., *IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression.* J Immunol, 1993. 151(3): p. 1224-34.

- 55. Su, D.L., et al., *Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE.* J Biomed Biotechnol, 2012. 2012: p. 347141.
- 56. Hedrich, C.M. and J.H. Bream, *Cell type-specific regulation of IL-10 expression in inflammation and disease.* Immunol Res, 2010. 47(1-3): p. 185-206.
- 57. Joss, A., et al., *IL-10 directly acts on T cells by specifically altering the CD28 co-stimulation pathway.* Eur J Immunol, 2000. 30(6): p. 1683-90.
- 58. Akdis, C.A. and K. Blaser, *Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression.* Immunology, 2001. 103(2): p. 131-6.
- 59. Groux, H., et al., *Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells.* J Immunol, 1998. 160(7): p. 3188-93.
- 60. Shibata, Y., et al., *Immunoregulatory roles of IL-10 in innate immunity: IL-10 inhibits macrophage production of IFN-gamma-inducing factors but enhances NK cell production of IFN-gamma.* J Immunol, 1998. 161(8): p. 4283-8.
- 61. Cai, G., R.A. Kastelein, and C.A. Hunter, *IL-10 enhances NK cell proliferation, cytotoxicity and production of IFN-gamma when combined with IL-18.* Eur J Immunol, 1999. 29(9): p. 2658-65.
- 62. Llorente, L., et al., Role of interleukin 10 in the B lymphocyte hyperactivity and autoantibody production of human systemic lupus erythematosus. J Exp Med, 1995. 181(3): p. 839-44.
- 63. Park, Y.B., et al., *Elevated interleukin-10 levels correlated with disease activity in systemic lupus erythematosus.* Clin Exp Rheumatol, 1998. 16(3): p. 283-8.
- 64. Wang, H., et al., *The abnormal apoptosis of T cell subsets and possible involvement of IL-10 in systemic lupus erythematosus.* Cell Immunol, 2005. 235(2): p. 117-21.
- 65. Llorente, L., et al., *Clinical and biologic effects of anti-interleukin-10 monoclonal antibody administration in systemic lupus erythematosus.* Arthritis Rheum, 2000. 43(8): p. 1790-800.
- 66. Levy, Y. and J.C. Brouet, Interleukin-10 prevents spontaneous death of germinal center B cells by induction of the bcl-2 protein. J Clin Invest, 1994. 93(1): p. 424-8.
- 67. Ishida, H., et al., *Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice.* J Exp Med, 1994. 179(1): p. 305-10.
- 68. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis*. Cell, 1993. 75(2): p. 263-74.
- 69. Yin, Z., et al., *IL-10 regulates murine lupus.* J Immunol, 2002. 169(4): p. 2148-55.
- 70. Romagnani, S., *Th1/Th2 cells.* Inflamm Bowel Dis, 1999. 5(4): p. 285-94.
- 71. Funauchi, M., et al., *Decreased Th1-like and increased Th2-like cells in systemic lupus erythematosus.* Scand J Rheumatol, 1998. 27(3): p. 219-24.
- 72. Sugimoto, K., et al., *Decreased IL-4 producing CD4+ T cells in patients with active systemic lupus erythematosus-relation to IL-12R expression.* Autoimmunity, 2002. 35(6): p. 381-7.
- 73. Dean, G.S., et al., *Characterization of CD3+ CD4- CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: production of IL-4.* Lupus, 2002. 11(8): p. 501-7.
- 74. Charles, N., et al., Basophils and the T helper 2 environment can promote the development of lupus nephritis. Nat Med, 2010. 16(6): p. 701-7.
- 75. Schroder, K., et al., *Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions.* J Leukoc Biol, 2004. 75(2): p. 163-89.

- 76. Harigai, M., et al., *Excessive production of IFN-gamma in patients with systemic lupus erythematosus and its contribution to induction of B lymphocyte stimulator/B cell-activating factor/TNF ligand superfamily-13B.* J Immunol, 2008. 181(3): p. 2211-9.
- 77. Viallard, J.F., et al., *Th1 (IL-2, interferon-gamma (IFN-gamma)) and Th2 (IL-10, IL-4) cytokine production by peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients with systemic lupus erythematosus (SLE).* Clin Exp Immunol, 1999. 115(1): p. 189-95.
- 78. Tucci, M., et al., Overexpression of interleukin-12 and T helper 1 predominance in lupus nephritis. Clin Exp Immunol, 2008. 154(2): p. 247-54.
- 79. Chan, R.W., et al., *Intrarenal cytokine gene expression in lupus nephritis.* Ann Rheum Dis, 2007. 66(7): p. 886-92.
- 80. Kim, K., et al., Interferon-gamma gene polymorphisms associated with susceptibility to systemic lupus erythematosus. Ann Rheum Dis, 2010. 69(6): p. 1247-50.
- 81. Lawson, B.R., et al., *Treatment of murine lupus with cDNA encoding IFN-gammaR/Fc.* J Clin Invest, 2000. 106(2): p. 207-15.
- 82. Dauphinee, M.J., et al., Interleukin 2 deficiency is a common feature of autoimmune mice. J Immunol, 1981. 127(6): p. 2483-7.
- 83. Willerford, D.M., et al., *Interleukin-2 receptor alpha chain regulates the size and content of the peripheral lymphoid compartment.* Immunity, 1995. 3(4): p. 521-30.
- 84. Ohl, K. and K. Tenbrock, *Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus.* J Biomed Biotechnol, 2011. 2011: p. 432595.
- 85. Alcocer-Varela, J. and D. Alarcon-Segovia, *Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus.* J Clin Invest, 1982. 69(6): p. 1388-92.
- 86. Setoguchi, R., et al., *Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization.* J Exp Med, 2005. 201(5): p. 723-35.
- 87. Juang, Y.T., et al., *Transcriptional activation of the cAMP-responsive* modulator promoter in human T cells is regulated by protein phosphatase 2Amediated dephosphorylation of SP-1 and reflects disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. J Biol Chem, 2011. 286(3): p. 1795-801.
- 88. Kono, D.H. and A.N. Theofilopoulos, *Genetics of SLE in mice*. Springer Semin Immunopathol, 2006. 28(2): p. 83-96.
- 89. Rudofsky, U.H. and D.A. Lawrence, New Zealand mixed mice: a genetic systemic lupus erythematosus model for assessing environmental effects. Environ Health Perspect, 1999. 107 Suppl 5: p. 713-21.
- 90. Rottman, J.B. and C.R. Willis, *Mouse Models of Systemic Lupus Erythematosus Reveal a Complex Pathogenesis.* Veterinary Pathology Online, 2010. 47(4): p. 664-676.
- 91. Perry, D., et al., *Murine models of systemic lupus erythematosus.* J Biomed Biotechnol, 2011. 2011: p. 271694.
- 92. Morel, L., et al., *The major murine systemic lupus erythematosus susceptibility locus, Sle1, is a cluster of functionally related genes.* Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001. 98(4): p. 1787-1792.
- 93. Mohan, C., et al., *Genetic dissection of systemic lupus erythematosus pathogenesis: Sle2 on murine chromosome 4 leads to B cell hyperactivity.* J Immunol, 1997. 159(1): p. 454-65.

- 94. Sobel, E.S., et al., *Genetic dissection of systemic lupus erythematosus pathogenesis: evidence for functional expression of Sle3/5 by non-T cells.* J Immunol, 2002. 169(7): p. 4025-32.
- 95. Morel, L., et al., *Genetic reconstitution of systemic lupus erythematosus immunopathology with polycongenic murine strains.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(12): p. 6670-5.
- 96. Andrews, B.S., et al., *Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains.* J Exp Med, 1978. 148(5): p. 1198-215.
- 97. Watson, M.L., et al., *Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci.* J Exp Med, 1992. 176(6): p. 1645-56.
- 98. Bolland, S. and J.V. Ravetch, *Spontaneous autoimmune disease in Fc(gamma)RIIB-deficient mice results from strain-specific epistasis.* Immunity, 2000. 13(2): p. 277-85.
- 99. Nimmerjahn, F. and J.V. Ravetch, *Fcgamma receptors as regulators of immune responses.* Nat Rev Immunol, 2008. 8(1): p. 34-47.
- 100. van Roon, J.A., Activating and inhibitory Fc gamma receptors in rheumatoid arthritis: from treatment to targeted therapies. Arthritis Res Ther, 2007. 9(4): p. 106.
- 101. Takai, T., et al., Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. Nature, 1996. 379(6563): p. 346-9.
- 102. Yuasa, T., et al., *Deletion of fcgamma receptor IIB renders H-2(b) mice susceptible to collagen-induced arthritis.* J Exp Med, 1999. 189(1): p. 187-94.
- 103. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure.* Nucleic Acids Res, 1991. 19(15): p. 4293.
- 104. Thiel, R., ed. *Empfehlung des Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter für die vorzeitige Tötung erheblich leidender Versuchstiere*. ed. A.B. Tierschutzbeauftragter. 2009: Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin (FEM).
- 105. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction.* Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. 51 Pt 1: p. 263-73.
- 106. https://www.miltenyibiotec.com/Products-and-Services/MACS-Cell-Separation.aspx
- 107. Murphy K., T.P., WalportM., ed. *Die Werkzeuge des Immunologen*. Janeway Immunologie, Vol. 7. 2009, Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg. 952-954.
- 108. Call ME, P.J., Wiedmann M, Wucherpfennig KW, *The organization principle in the formation of the t cell receptor-CD3 complex.* Cell, 2002. 11: p. 967-979.
- 109. Wang, K., G. Wei, and D. Liu, *CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy.* Exp Hematol Oncol, 2012. 1(1): p. 36.
- 110. Sakaguchi, S., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.* J Immunol, 1995. 155(3): p. 1151-64.
- 111. Nelson, B.H., *IL-2, regulatory T cells, and tolerance.* J Immunol, 2004. 172(7): p. 3983-8.
- 112. Dutton, R.W., L.M. Bradley, and S.L. Swain, *T cell memory.* Annu Rev Immunol, 1998. 16: p. 201-23.

- 113. Kansas, G.S., *Structure and function of L-selectin.* APMIS, 1992. 100(4): p. 287-93.
- 114. Venturi, G.M., et al., *Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release.* Immunity, 2003. 19(5): p. 713-24.
- 115. Arbones, M.L., et al., *Lymphocyte homing and leukocyte rolling and migration are impaired in L-selectin-deficient mice.* Immunity, 1994. 1(4): p. 247-60.
- 116. Marzio, R., J. Mauel, and S. Betz-Corradin, *CD69 and regulation of the immune function.* Immunopharmacol Immunotoxicol, 1999. 21(3): p. 565-82.
- 117. Hamann, J., H. Fiebig, and M. Strauss, *Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain.* J Immunol, 1993. 150(11): p. 4920-7.
- 118. Gavioli, R., et al., *CD69 molecule in human neutrophils: its expression and role in signal-transducing mechanisms.* Cell Immunol, 1992. 142(1): p. 186-96.
- 119. Vandenberghe, P., et al., Ligation of the CD5 or CD28 molecules on resting human T cells induces expression of the early activation antigen CD69 by a calcium- and tyrosine kinase-dependent mechanism. Immunology, 1993. 78(2): p. 210-7.
- 120. O'Connell, F.P., J.L. Pinkus, and G.S. Pinkus, *CD138 (syndecan-1), a plasma cell marker immunohistochemical profile in hematopoietic and nonhematopoietic neoplasms.* Am J Clin Pathol, 2004. 121(2): p. 254-63.
- 121. Chen, K. and A. Cerutti, *The function and regulation of immunoglobulin D.* Curr Opin Immunol, 2011. 23(3): p. 345-52.
- 122. Massie, H., V. Aiello, and S. Sternick, *Comparative survival of C57BL/6J mice on two commonly used mouse diets.* AGE, 1991. 14(2): p. 53-56.
- 123. http://jaxmice.jax.org/support/phenotyping/B6data000664.pdf.
- 124. Saraiva, M., et al., Interleukin-10 Production by Th1 Cells Requires Interleukin-12-Induced STAT4 Transcription Factor and ERK MAP Kinase Activation by High Antigen Dose. Immunity, 2009. 31(2): p. 209-219.
- 125. Undeutsch, R., et al., *CD4 T cells producing IL-10 have a beneficial effect in murine lupus.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2011. 70(Suppl 2): p. A73.
- 126. Blenman, K.R., et al., *IL-10 regulation of lupus in the NZM2410 murine model.* Lab Invest, 2006. 86(11): p. 1136-48.
- 127. Houssiau, F.A., et al., *Serum interleukin 10 titers in systemic lupus erythematosus reflect disease activity.* Lupus, 1995. 4(5): p. 393-5.
- 128. Rennick, D.M., M.M. Fort, and N.J. Davidson, *Studies with IL-10-/- mice: an overview.* J Leukoc Biol, 1997. 61(4): p. 389-96.
- 129. Enghard, P., D. Langnickel, and G. Riemekasten, *T cell cytokine imbalance towards production of IFN-gamma and IL-10 in NZB/W F1 lupus-prone mice is associated with autoantibody levels and nephritis.* Scand J Rheumatol, 2006. 35(3): p. 209-16.
- 130. Riemekasten, G., et al., *Identification and characterization of SmD183-119reactive T cells that provide T cell help for pathogenic anti-double-stranded DNA antibodies.* Arthritis Rheum, 2003. 48(2): p. 475-85.
- 131. Andrews, B.S., et al., *Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains.* The Journal of Experimental Medicine, 1978. 148(5): p. 1198-1215.
- 132. Theofilopoulos, A.N., et al., *Influence of thymic genotype on the systemic lupus erythematosus-like disease and T cell proliferation of MRL/Mp-lpr/lpr mice.* J Exp Med, 1981. 153(6): p. 1405-14.
- 133. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages.* J Immunol, 1991. 147(11): p. 3815-22.

- 134. Wofsy, D. and W.E. Seaman, *Successful treatment of autoimmunity in NZB/NZW F1 mice with monoclonal antibody to L3T4.* The Journal of Experimental Medicine, 1985. 161(2): p. 378-391.
- 135. Afeltra, A., et al., *Expression of CD69 antigen on synovial fluid T cells in patients with rheumatoid arthritis and other chronic synovitis.* Ann Rheum Dis, 1993. 52(6): p. 457-60.
- 136. Murata, K., et al., *CD69-null mice protected from arthritis induced with antitype II collagen antibodies.* Int Immunol, 2003. 15(8): p. 987-92.
- 137. Miki-Hosokawa, T., et al., *CD69 controls the pathogenesis of allergic airway inflammation.* J Immunol, 2009. 183(12): p. 8203-15.
- 138. Ishikawa, S., et al., A Subset of CD4+ T Cells Expressing Early Activation Antigen CD69 in Murine Lupus: Possible Abnormal Regulatory Role for Cytokine Imbalance. The Journal of Immunology, 1998. 161(3): p. 1267-1273.
- 139. Qin, S., et al., *The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions.* J Clin Invest, 1998. 101(4): p. 746-54.
- 140. Ruth, J.H., et al., *Selective lymphocyte chemokine receptor expression in the rheumatoid joint.* Arthritis Rheum, 2001. 44(12): p. 2750-60.
- 141. Zhang, B., et al., *Clinical significance of increased CD4+CD25-Foxp3+ T cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus.* Ann Rheum Dis, 2008. 67(7): p. 1037-40.
- 142. Yan, B. and Y. Liu, *The Nature of Increased Circulating CD4CD25Foxp3 T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus: A Novel Hypothesis.* Open Rheumatol J, 2009. 3: p. 22-4.
- 143. Balomenos, D., R. Rumold, and A.N. Theofilopoulos, *Interferon-gamma is required for lupus-like disease and lymphoaccumulation in MRL-lpr mice.* J Clin Invest, 1998. 101(2): p. 364-71.
- 144. Prud'homme, G.J., D.H. Kono, and A.N. Theofilopoulos, *Quantitative* polymerase chain reaction analysis reveals marked overexpression of interleukin-1 beta, interleukin-1 and interferon-gamma mRNA in the lymph nodes of lupus-prone mice. Mol Immunol, 1995. 32(7): p. 495-503.
- 145. Takahashi, S., et al., *Imbalance towards Th1 predominance is associated with acceleration of lupus-like autoimmune syndrome in MRL mice.* J Clin Invest, 1996. 97(7): p. 1597-604.

## 8. Anhang

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1:	verwendete Chemikalien	31
Tabelle 2:	verwendete Fluorochrome	33
Tabelle 3:	Übersicht der verwendeten FACS-Antikörper	34
Tabelle 4:	DNS-Primer	39
Tabelle 5:	Temperaturprogramme der verschiedenen Typisierungs-PCR	40
Tabelle 6:	DNA-Typisierung nach Fragmentlänge in bp	41
Tabelle 7:	FACS-Panel	52
Tabelle 8:	Mittleres und medianes Überleben in Tagen	65
Tabelle 9:	Vergleich Proteinurie und Überlebenszeit	67
Tabelle 10:	Histologische Untersuchung der Nieren auf zelluläre Infiltrate	68
Abbildung 1:	Pathogenese des SLE	8
Abbildung 2:	Der IL-10-Rezeptor und seine Signalkaskade	. 18
Abbildung 3:	Fcy-Rezeptoren der Maus	27
Abbildung 4:	DNA-Marker VI	41
Abbildung 5:	Kreuzungsplan	42
Abbildung 6:	Vermessung der Milzgröße	44
Abbildung 7:	Prinzip MACS	46
Abbildung 8:	Prinzip eines FACS-Gerätes	49
Abbildung 9:	Lymphozytengate	55
Abbildung 10:	Differenzierung der Lymphozyten nach CD3/CD19	56
Abbildung 11:	FACS-Darstellung der CD4+T-Zellen	56
Abbildung 12:	Schematische Darstellung eines Autoantikörper-ELISA	57
Abbildung 13:	Standardkurve am Beispiel des ds-DNS-Ak-ELISA	58
Abbildung 14:	Darstellung der IL-10-Produktion der CD4+T-Zellen der Milz	63
Abbildung 15:	Überleben der verschiedenen Genotypen in Tagen	65
Abbildung 16:	Darstellung von Protein- und Leukozyturie zum Todeszeitpunkt	67
Abbildung 17:	Darstellung von Milzgröße und Splenozytenzahl	69
Abbildung 18:	CD19-Expression nach CD43-MACS	71
Abbildung 19:	Zellzählung der B-Lymphozyten nach MACS-CD43-Depletion	71
Abbildung 20:	Anteile der T-Zellen an den Milzlymphozyten	73
Abbildung 21:	Zytotoxische und T-Helferzellen der Milz	74
Abbildung 22:	Unterscheidung naiver T-Zellen, zentraler und Effektor-T-	
Ū	Gedächtniszellen	76
Abbildung 23:	Darstellung des Aktivierungsstatus der CD4+ T-Gedächtniszellen	
5	der Milz mithilfe des Aktivierungsmarkers CXCR3	. 77
Abbildung 24:	Anteil der CD4+CD25+FoxP3-	78
Abbilduna 25:	Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf den CD4 T-Zellen der Milz	79
5	<u> </u>	171
		1 <b>7</b> 1

Abbildung 26: FoxP3 +CD4+ T-Zellen der Milz	80
Abbildung 27: Anteil der B-Zellen an den Milzlymphozyten	81
Abbildung 28: Anteile naiver B-Zellen und Plasmazellen an den Milzlymphozyten	82
Abbildung 29: IL-4-positive CD4+ T-Zellen der Milz vor und nach Stimulation	83
Abbildung 30: IFN-γ-positive CD4+ T-Zellen der Milz (un-/stimuliert)	84
Abbildung 31: CD4+ T-Zellen mit Synthese von IFN-γ und IL-10	86
Abbildung 32: CD4+ T-Zellen mit Produktion von IL-4 und IL-10	86
Abbildung 33: Auto-Antikörper gegen ds-DNS	87

# Verwendete Abkürzungen

Ag	Antigen
Ak	Antikörper
APC	Antigen präsentierende Zelle
CD	"Cluster of Differentiation" (Oberflächenmarker)
DC	dendritische Zelle
Ds-DNA-Ak	Antikörper gegen Doppelstrang-DNA
IL-10-/-	Mäuse des Genotyps FcγRIIB+/+IL-10-/-
NK	Natürliche Killerzelle
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
RIIB-/-	Mäuse des Genotyps FcγRIIB-/-IL-10+/+
RIIB-/-IL-10-/-	Mäuse des Genotyps FcγRIIB-/-IL-10-/-
RIIB-/-IL-10+/-	Mäuse des Genotyps FcγRIIB-/-IL-10+/-
SD	Standardabweichung
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
SLEDA-Index	Systemic Lupus Erythematodes Disease Activity Index
Ss-DNA-Ak	Antikörper gegen Einzelstrang-DNA
T <sub>CM</sub>	zentrale T-Gedächtniszellen (von engl. central memory t cells)
T <sub>EM</sub>	Effektor-Gedächtniszellen (effector memory t cells)
TLR	"toll like receptor"
Treg	von engl. "regulatory t cell" - regulatorische T-Zellen

#### Danksagung

Ich bedanke mich bei meiner Arbeitsgruppenleiterin Frau Prof. Dr. Riemekasten für das interessante Thema, die konstruktive Zusammenarbeit und die immer wieder kritische und anregende Durchsicht meines Manuskriptes. Danke, dass Sie so viel Geduld mit mir hatten und auch nach längeren Pausen immer wieder mit Rat und Tat zur Verfügung standen.

Danke an Philipp Enghard, der mich in die Laborarbeit einführte und die grundlegende Kreuzung der Mausstämme sowie ungezählte PCRs der Schwanzspitzenbiopsien begleitete. Neben seinen spannenden Erklärungen vergaß er auch nie, mich zur Disziplin anzuhalten.

Einen großen Dank an Reinmar Undeutsch, der mich im weiteren Verlauf betreute, mich den Umgang mit Versuchstieren lehrte, zu nachtschlafender Zeit mit mir am FACS-Gerät saß, sich auch in seiner Freizeit mit mir traf, um Daten zu diskutieren oder meinen Computer aufzurüsten und immer wieder ein aufmunterndes Wort für mich hatte, wenn ich nicht voran kam.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. Kühl aus der Pathologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, die freundlicherweise die histopathologische Analyse der Nierenbiopsien durchführte sowie bei Angelika Rose von unserer Arbeitsgruppe, die mir bei der Aufarbeitung der Nieren half und nochmals kritisch den Methoden- und Ergebnisteil meiner Arbeit durchsah, bedanken.

Auch danke ich meinem ehemaligen Oberarzt Dr. Ralf Wenk, der meinen Ehrgeiz die Arbeit fertigzustellen, bestärkte und mir half, zeitliche Freiräume dafür zu schaffen.

Ein ganz inniger Dank gilt meiner Familie. Danke meiner "kleinen" Schwester Laura, die als Physikdoktorandin das Wohl und Wehe des Forschens so gut nachfühlen kann. Du bist die beste Freundin, die man sich wünschen kann. Danke meinen Eltern, die mich als mitfühlende Zuhörer und große Stütze immer wieder aufgerichtet haben. Ohne euch wäre ich nicht die, die ich bin.

#### Lebenslauf

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

#### **Eidesstattliche Versicherung**

"Ich, Katja Neumann, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Einfluss von IL-10 auf den Systemischen Lupus erythematodes am murinen FcyRIIB-K.o. Modell" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe "Uniform Requirements for Manuscripts (URM)" des ICMJE -*www.icmje.org*) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst."

Datum

Unterschrift