

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

Vorstand: Prof. Dr. med. Martin Reincke

UNTERSUCHUNGEN ZUR PATHOPHYSIOLOGISCHEN ROLLE
DER TNF-REZEPTOREN 1 UND 2 IM MAUSMODELL
DES PRISTAN-INDUZIERTEN LUPUS ERYTHEMATODES

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sophie Anna-Katharina Schlosser

aus

Gräfelfing

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. Volker Vielhauer

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jörg C. Prinz
Dr. Dirk Baumjohann

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2018

Meiner Familie

INHALT

| | |
|-------------------------------------------------------------|----|
| Zusammenfassung | 7 |
| 1 Einleitung | 9 |
| 1.1 Systemischer Lupus erythematoses (SLE)..... | 9 |
| 1.1.1 Epidemiologie | 9 |
| 1.1.2 Ätiologie und Pathogenese | 9 |
| 1.1.3 Lupusnephritis..... | 12 |
| 1.1.4 Klinik | 13 |
| 1.1.5 Diagnose..... | 15 |
| 1.1.6 Therapie..... | 21 |
| 1.1.7 TNF α -Inhibitoren..... | 22 |
| 1.2 TNF und seine Rezeptoren | 26 |
| 1.2.1 Struktur | 26 |
| 1.2.2 Signaltransduktion | 28 |
| 1.3 Vorarbeiten und Hypothese..... | 31 |
| 2 Material und Methoden | 33 |
| 2.1 Material | 33 |
| 2.1.1 Versuchsmäuse | 33 |
| 2.1.2 Geräte..... | 33 |
| 2.1.3 Chemikalien, Puffer und Lösungen | 34 |
| 2.1.4 Antikörper | 36 |
| 2.1.5 Verbrauchsmaterial | 37 |
| 2.2 Versuchstiere und experimentelles Protokoll..... | 37 |
| 2.2.1 Tierhaltung..... | 37 |
| 2.2.2 Intraperitoneale Injektion von Pristan bzw. PBS | 37 |
| 2.2.3 Klinische Kontrolle | 38 |
| 2.2.4 Urinentnahme | 38 |
| 2.2.5 Gewinnung von Serum..... | 38 |
| 2.2.6 Lavage..... | 39 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.2.7 | Perfusion und Gewebeentnahme | 39 |
| 2.3 | Methoden | 41 |
| 2.3.1 | Kreatinin-Bestimmung im Urin | 41 |
| 2.4 | Immunologische Methoden | 41 |
| 2.4.1 | Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) | 41 |
| 2.4.2 | Aufbereitung der Lavageflüssigkeit zur Analyse im Durchflusszytometer | 42 |
| 2.4.3 | Aufbereitung von Milzzellen zur Analyse im Durchflusszytometer | 43 |
| 2.4.4 | Aufbereitung von Nierenzellen zur Analyse im Durchflusszytometer | 44 |
| 2.4.5 | Analyse immunologischer Oberflächenmarker im Durchflusszytometer | 45 |
| 2.5 | Morphologische und histologische Untersuchungen | 45 |
| 2.5.1 | Beschichten der Objektträger | 45 |
| 2.5.2 | Herstellen von Gewebeschnitten | 45 |
| 2.5.3 | Entparaffinieren der Gewebeschnitte | 46 |
| 2.5.4 | Färbung | 46 |
| 2.5.5 | Dehydrierung von Gewebeschnitten | 47 |
| 2.5.6 | Morphometrische Auswertung | 47 |
| 2.5.7 | Statistische Auswertung | 48 |
| 3 | Ergebnisse | 50 |
| 3.1 | Charakterisierung des Pristan-induzierten SLE-Modells in Wildtyp-tieren | 50 |
| 3.2 | Charakterisierung der Frühphase des Pristan-induzierten SLE an Wildtyp- und TNFR-defizienten Mäusen | 58 |
| 3.3 | Charakterisierung der Spätphase des Pristan-induzierten SLE an Wildtyp- und TNFR-defizienten Mäusen | 61 |
| 3.3.1 | Mortalität des Pristan-induzierten SLE in Wildtyp- und TNFR- defizienten Mäusen | 61 |
| 3.3.2 | Gewichtsentwicklung | 62 |
| 3.3.3 | Systemische Autoimmunreaktivität in der Milz | 63 |
| 3.3.4 | Antikörperinduktion in Pristan-injizierten Wildtyp- und TNFR- defizienten Mäusen | 69 |
| 3.3.5 | Kutane Manifestation des SLE | 72 |

| | | |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
| 3.3.6 | Arthritis | 73 |
| 3.3.7 | Endorganschaden der Niere | 73 |
| 4 | Diskussion..... | 80 |
| 4.1 | Vor- und Nachteile des Pristan-induzierten Mausmodell des SLE | 80 |
| 4.2 | Funktionelle Rolle der TNFR-Rezeptoren im Mausmodell des SLE..... | 86 |
| 4.2.1 | Charakterisierung der Frühphase des Pristan-induzierten SLE in Wildtyp- und TNFR-defizienten Mäusen..... | 86 |
| 4.2.2 | Charakterisierung der Spätphase des Pristan-induzierten SLE in Wildtyp- und TNFR-defizienten Mäusen..... | 87 |
| 4.3 | TNF-Rezeptor-spezifische Therapieansätze | 94 |
| 4.4 | Schlussfolgerung und Ausblick..... | 95 |
| 5 | Literature Cited | 98 |
| 6 | Abkürzungsverzeichnis | 109 |
| | Danksagung | 113 |
| | Lebenslauf | Fehler! Textmarke nicht definiert. |
| | Eidestättliche Versicherung | 114 |

ZUSAMMENFASSUNG

Der Systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine chronisch entzündliche, potentiell lebensbedrohliche Autoimmunerkrankung, die mit einer Schädigung zahlreicher Organe einhergeht. Die Lupusnephritis ist dabei häufig die wichtigste Organmanifestation, die die Morbidität und Mortalität von SLE-Patienten wesentlich mitbestimmt. Das klassische proinflammatorische Zytokin Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF) ist bei SLE-Patienten deutlich erhöht. Neben seiner Rolle als proinflammatorischer Mediator besitzt TNF eine wichtige immunregulatorische Funktion, die Autoimmunphänomenen entgegenwirkt. Die zum Teil gegensätzlichen TNF-Effekte werden von den TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt, die durch praktisch alle Zellen des Organismus exprimiert werden können. Kleine unkontrollierte klinische Studien zeigten deutliche therapeutische Effekte TNF-blockierender Therapien auf Lupusarthritis und Lupusnephritis. Auch bei anderen autoimmunologischen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn werden TNF-Blocker erfolgreich angewendet. Allerdings treten unter TNF-blockierender Therapie auch antinukleäre und anti-dsDNA-Antikörper bis zur Entwicklung SLE-artiger Krankheitsbilder auf.

Dieser Dissertation liegt die Hypothese zugrunde, dass die beiden TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 pro- und antiinflammatorische TNF-Effekte im Verlauf des SLE unterschiedlich vermitteln. Hierfür wurde ein SLE-artiges Krankheitsbild durch Pristan in TNF-Rezeptor-defizienten Knockoutmäusen induziert und die Autoimmunantwort sowie inflammatorischen Endorganschäden (Haut, Lunge, Niere, Milz) im Vergleich zu Wildtyptieren untersucht.

Im Alter von 3 Monaten wurde in weiblichen C57BL/6-Mäusen unterschiedlichen Genotyps (Wildtyp, TNFR1-Knockout, TNFR2-Knockout, TNFR1- und 2-Knockout) mittels intraperitonealer Injektion von 500 μ l Pristan ein Lupus erythematoses induziert. Der Kontrollgruppe wurde 500 μ l PBS injiziert. Im Verlauf wurden Urinproben auf Proteinurie untersucht und Autoantikörperspiegel (Gesamt-IgG, anti-snRNP, anti-Sm, anti-dsDNA, anti-Histon-Antikörper und Rheumafaktor) im Serum mittels ELISA bestimmt. Eine erste Gruppe erhielt 28 Tage nach Injektion eine intraperitoneale Lavage. Die Lavageflüssigkeit wurde im Anschluss durchflusszytometrisch untersucht. Im Alter von 10 Monaten erfolgte beim restlichen Teil der Tiere die Entnahme von Milz, Lunge und Nieren zur durchflusszytometrischen und histologischen Charakterisierung.

Die Durchflusszytometrische Untersuchung der Lavageflüssigkeit 28 Tage nach Induktion des Krankheitsbildes ergab keine Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen hinsichtlich

der Ausprägung der peritonealen Entzündung. Ebenso war im weiteren Verlauf bis Monat 10 das Ausmaß der peritonealen Granulombildung vergleichbar. Dies zeigt, dass initial eine vergleichbare Entzündungsreaktion unabhängig vom Genotyp ausgelöst werden konnte und spätere Unterschiede in der Ausprägung der Autoimmunantwort nicht auf ein initiales Ungleichgewicht in der Entzündungsreaktion zurückgeführt werden können. Es zeigte sich eine vergleichbare Mortalität und Gewichtsentwicklung in allen Genotypen. Eine unterschiedliche Ausprägung der entwickelten Splenomegalie war in keinem Genotyp festzustellen. In TNFR1-defizienten Tieren waren jedoch relativ mehr B-Lymphozyten und CD4+-T-Helfer-Zellen in der Milz nachweisbar und in Milzen TNFR2-defizienter Tiere fanden sich weniger T-Zellen und insbesondere weniger CD8+ zytotoxische T-Zellen. Die Ausbildung von Autoantikörpern (IgG, RF, Anti-Sm und Anti-snRNP) war in allen Genotypen vergleichbar, ebenso wie die Endorganschäden in Haut und Niere. TNFR-spezifische Effekte sind damit nur gering im Pristan-Modell nachweisbar, sodass davon auszugehen ist, dass die pathophysiologische Rolle von TNF im Modell des Pristan-induzierten SLE in C57BL/6 Mäusen limitiert ist. Aufgrund der pathophysiologischen Nähe zum humanen chemisch induzierten SLE und der breiten Ausbildung des Antikörperprofils ist das Pristan-induzierte Mausmodell jedoch dennoch interessant und sollte in zukünftigen Studien in TNFR-defizienten Mäusen mit einem genetischen Hintergrund verwendet werden, der einen ausgeprägteren Phänotyp im Modell des Pristan-induzierten Lupus zeigt (z.B. BALB/c).

1 EINLEITUNG

1.1 SYSTEMISCHER LUPUS ERYTHEMATODES (SLE)

1.1.1 EPIDEMIOLOGIE

Der systemische Lupus erythematodes (SLE) ist eine schwere entzündliche Autoimmunerkrankung aus der Gruppe der Kollagenosen. Die Prävalenz beläuft sich auf 20 bis 70 Erkrankte pro 100,000 Einwohner (1). Die Prävalenzrate unter Frauen ist bedeutend höher mit 164 Erkrankten pro 100,000 Einwohner unter der weißen Bevölkerung sowie bis 406 Erkrankten pro 100,000 Einwohner unter der afroamerikanischen Bevölkerung (2). Damit sind 80-90% der erkrankten Frauen. Tritt unter Afroamerikanerinnen der SLE eher im reproduktiven Alter auf, so zeigt er in der weißen Bevölkerung die höchste Inzidenz im Alter über 40 Jahren (2). Östrogene werden als prädisponierender Faktor vermutet. So konnte die Nurse's Health Study zeigen, dass Frauen mit früher Menarche, während einer Schwangerschaft, unter Kontrazeptiva-Einnahme oder postmenopausaler Hormonersatztherapie ein signifikant erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines SLE haben (Hazard Ratio von 1,5 bis 2,1) (3, 4).

1.1.2 ÄTIOLOGIE UND PATHOGENESE

Die Ätiologie des SLE ist multifaktoriell (Abbildung 1). SLE-assoziierte Gendefekte lassen Rückschlüsse auf die Pathogenese der Erkrankung zu (Tabelle 1). So sind entsprechende Gene, deren Defekte mit SLE assoziiert sind, Mediatoren von Apoptose oder Inflammation. Defizienz von Genen (z.B. C1q oder C4), Genkopievarianten (z.B. C4a/C4b, FCGR3B), Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs, z.B. STAT4, FCGR2A, ITGAM), epigenetische Modifikationen wie Splicingvarianten oder Hypomethylierung (z.B. ITGAL, CD40LG, CD70 und PPP2CA) und Dysregulation von microRNAs (z.B. miR-189, miR-61, miR-78, miR-21) können für die Entstehung eines SLE prädisponieren (5–9). Defizienz der Komplementfaktoren C1q, C4a/C4b, sowie C2 und die Mutation des Gens TREX1 besitzen die höchsten Hazard Ratios zwischen 5 und 25 (5). Weitaus häufiger als diese Konstellationen prädisponieren bestimmte Genregionen des Major Histocompatibility Komplexes II (MHC) wie HLA-DR, DQ und DP für die Entwicklung eines SLE (5, 10).

Tabelle 1: SLE-assoziierte Gene nach Rullo et al. (11)

| Signalweg | Gen |
|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| DNA-Degradierung, Apoptose und Beseitigung von Zellschutt | FCGR2, ACP5, TREX1, DNASE1, DNASE1L3, ATG5 |
| Toll like-Rezeptor (TLR) und Typ I Interferon (IFN) Signalweg | TLR7, IRF5, IRF7/PHRF1, IRF8, IRAK1, IFIH1, TYK2, PRDM1, STAT4, TREX1, ACP5 |
| NF-κB Signalweg | IRAK1, TNFAIP3, TNIP1, UBE2L3, PRKCB |
| Ausbildung von Immunkomplexen und Phagozytose | C1q, C1R/C1S, C2, C4a/b, FCGR2A/B, FCGR3A/B |
| B-Zellen (Funktion und Signalwege) | FCGR2B, BLK, LYN, BANK1, PRDM1, ETS1, IKZF1, AFF1, RASGRP3, IL-10, IL-21, NCF2, PRKCB, HLA-DR2 & DR3, MSH5, IRF8 |
| T-Zellen (Funktion und Signalwege) | PTPN22, TNFSF4, CD44, ETS1, IL-10, IL-21, TYK2, STAT4, PRDM1, AFF1, IKZF1, HLA-DR2 & DR3 |
| Neutrophile und Monozyten (Funktion und Signalweg) | ITGAM, ICAMs, FCGR2B, FCGR3A/B, IL-10, IRF8 |

Hinweise auf einen großen Einfluss von Umweltfaktoren finden sich in der Zwillingsforschung: Monozygote Zwillinge zeigen nur eine Konkordanz zwischen 20-30% (12). Rauchen, ultraviolette Strahlung, Viren wie Epstein-Barr-Virus oder Parvovirus B19 werden als Trigger diskutiert (13). Auch chemische Stoffe wie aromatische Amine und Organophosphate, sowie Medikamente wie Thiazide, Kalziumkanalblocker, Protonenpumpeninhibitoren und Interferon α können auslösende Faktoren sein (14).

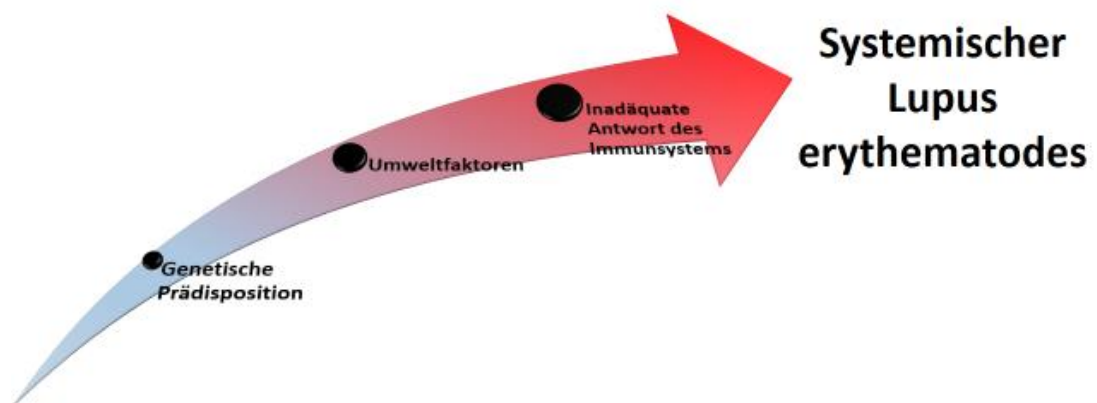


Abbildung 1: Genetische Prädisposition und Umweltfaktoren führen über eine inadäquate Antwort des Immunsystems zur Entwicklung eines SLE.

Ein Kennzeichen des SLE ist die durch genetische Variationen oder Umwelteinflüsse gesteigerte Apoptose und verzögerte Beseitigung von Apoptoseresiduen (15) sowie eingeschränkte Deletion autoreaktiver Lymphozyten, die zu sekundärer Nekrose, unvollständiger Chromatinverdauung und Freisetzung von damage-associated molecular patterns (DAMPs) führen (Abbildung 2). Diese aktivieren Toll like-Rezeptoren auf dendritischen Zellen und B-Zellen (16). Hierauf kommt es zur Produktion von Interferon alpha, welches eine nicht adäquate antivirale Immunantwort induziert (17). Vergleichbar zu einer Influenza treten bei SLE-Patienten Fatigue, Fieber, Myalgien und Arthralgien auf (17).

Die Maturation von B-Zellen zu Plasmazellen führt zur Produktion von Autoantikörpern, die gegen nukleäre Antigene wie Doppelstrang-DNA (dsDNA), Histone, SSA, SSB, Chromatin und Ribonucleoprotein (RNP) gerichtet sind (18). Diese können über Kreuzreaktion mit bestimmten extrazellulären Matrixmolekülen verschiedener Gewebe zur lokalen Bildung von Immunkomplexen führen, wie man sie zum Beispiel in den Glomeruli SLE-Erkrankter findet (19). Darüber hinaus werden direkt Immunkomplexe gebildet, die im Organismus zirkulieren und B-Zellen erneut zu weiterer Proliferation stimulieren (20). Sie lagern sich in Geweben, wie Niere, Haut, Herz, Lunge, Gelenke und ZNS ab und lösen über Aktivierung von Fc-Rezeptoren auf Makrophagen des retikuloendothelialen Systems, Komplement vermittelter Zytotoxizität und/oder Penetration der Zellmembran eine Schädigung dieser Gewebe im Sinne einer Immunkomplex-vermittelten Kleingefäßvaskulitis aus (21). Antikörper gegen Oberflächenantigene von Erythrozyten, Thrombozyten und Lymphozyten induzieren Zelltod – klinisch als Anämie, Thrombozytopenie und Lymphozytopenie apparent. T-Gedächtniszellen und langlebige Plasmazellen im Knochenmark führen zu einem chronischen Krankheitsverlauf mit Exazerbation bei Auftreten von massivem Zelltod (z.B. unter UV-Licht) oder Infektionen (22).

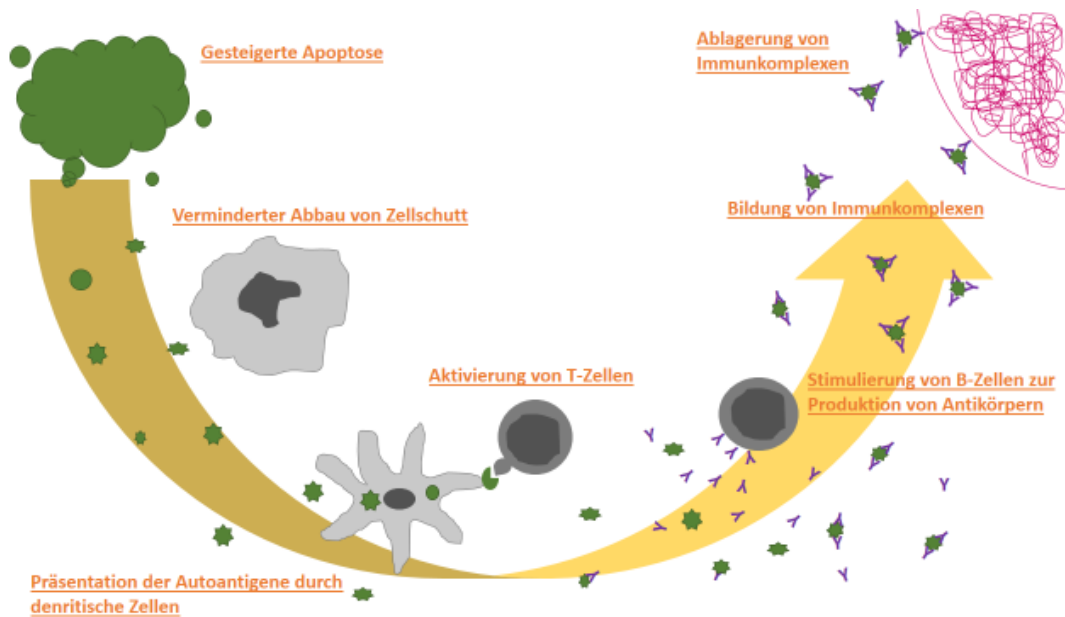


Abbildung 2: Infolge vermehrt anfallender Apoptoseprodukte kommt es über Antigenpräsentation durch dendritische Zellen zu einer Aktivierung des erworbenen Immunsystems, Bildung von Immunkomplexen und Schädigung von Organen durch ihre Ablagerung im Bereich kleiner Gefäße (Immunkomplex-vermittelte Gefäßvaskulitis).

1.1.3 LUPUSNEPHRITIS

Morbiditäts- und mortalitätsbestimmend ist eine renale Beteiligung im Sinne einer Lupusnephritis (23). Ca. 60 % der Patienten leiden an einer renalen Beteiligung, die initial oft klinisch stumm verläuft (24). Normalerweise treten die ersten renalen Auffälligkeiten innerhalb der ersten 3 Jahre nach Diagnosestellung auf. Männliches Geschlecht, junges Alter und nicht-europäische Herkunft sind Risikofaktoren für eine frühe renale Beteiligung. 10-30 % der Patienten entwickeln im Verlauf eine terminale Niereninsuffizienz (25).

Immunkomplexe lagern sich in den mesangialen, subendothelialen und subepithelialen Kompartimenten der Glomeruli ab (26). Sie enthalten häufig dsDNA-Antikörper, die gegen Nukleosomen gerichtet sind. Andere Bestandteile der Immunkomplexe sind teilweise auch Chromatin, Komplement C1q, Laminin, Sm, SSA/Ro, SSB/La, Ubiquitin, Ribosome sowie Sm-Autoantikörper. Antikörper (z.B. anti-DNA IgG1 und IgG3) können auch alleine an Strukturen des Glomerulums binden und die Produktion proinflammatorischer Substanzen stimulieren (25). Vermutlich vermittelt eine Kreuzreaktivität mit extrazellulären Matrixstrukturen der glomerulären Basalmembran wie Laminin, Typ IV-Kollagen, Heparansulfat und intrazelluläre Matrixstrukturen wie α -Aktinin-4 und Myosin die Anlagerung (19).

Subepitheliale Deposition schädigt über Aktivierung der klassischen Komplementfaktorkaskade die Epithelzellen (Podozyten) des Glomerulums. Mesangiale und subendotheliale Ablagerungen führen über Gefäßkontakt zusätzlich zur Stimulation von Leukozyten, Toll like-Rezeptoren und Fcγ-Rezeptoren (23). Die chemotaktischen Komplementspaltprodukte C3a und C5a rekrutieren Neutrophile und Monozyten in das Gewebe. Aktivierung und Überexpression von Adhäsionsmolekülen des Endothels führen zu einer vermehrten glomerulären Akkumulation von proinflammatorischen Leukozyten. Infiltrierende Makrophagen, T-Zellen, aber auch aktivierte glomeruläre Zellen produzieren inflammatorische Zytokine wie TNF, IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17, TGF-β, IFNγ, CSF-1 und PDGF (24). Es kommt zu einer mesangialen, fokalen oder diffus proliferativen Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis.

Aufgrund der extrem breit gefächerten histopathologischen Variabilität der Lupusnephritis erfolgte 2003 eine Klassifikation durch die International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) (Tabelle 2).

Tabelle 2: Klassifikation der International Society of Nephrology/Renal Pathology Society (ISN/RPS) (2003), (27)

| | |
|------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Klasse I | Minimale mesangiale Lupusnephritis |
| Klasse II | Mesangiale proliferative Lupusnephritis |
| Klasse III | Fokale Lupusnephritis (< 50 % der Glomeruli) |
| A | Aktive Läsionen |
| A/C | Aktive und chronische Läsionen |
| C | Chronische Läsionen |
| Klasse IV | Diffuse Lupusnephritis (> 50 % der Glomeruli) |
| A | Aktive Läsionen |
| A/C | Aktive und chronische Läsionen |
| C | Chronische Läsionen |
| S | Segmental |
| G | Global |
| Klasse V | Membranöse Lupusnephritis |
| Klasse VI | Fortgeschrittene sklerosierende Lupusnephritis (> 90 % ubiquitär sklerosierte Glomeruli ohne Restaktivität) |

1.1.4 KLINIK

Beginn und Schübe des SLE können durch Sonnenexposition, UV-Bestrahlungen (28), Infektionen (29), Überlastung (30), Operationen oder Schwangerschaft ausgelöst werden.

Schwere und Verlauf der Krankheit sind individuell sehr unterschiedlich. Verschiedenste Organsysteme können involviert sein.

Allgemeinsymptome wie Abgeschlagenheit, Myalgien, Gewichtsveränderungen und Fieber treten in 50-100 % der Fälle auf. Ein häufiges Symptom sind Gelenkbeschwerden. In der Regel handelt es sich um eine symmetrische wandernde Polyarthrit mit bevorzugtem Befall von Knien, Handgelenken und den proximalen Interphalangealgelenken (31). Die meisten Patienten sind von Hautmanifestationen wie dem Schmetterlingserythem nach Sonnenexposition, diskoiden Effloreszenzen, Alopezie und oralen sowie nasalen Ulzera betroffen (32) (Abbildung 3).



Abbildung 3: Kutane Manifestationen: Schmetterlingserythem, diskoider Lupus, orale Ulzera (von links nach rechts), Copyright Logical Images, Inc. (links und Mitte); Courtesy of Samuel Moschella, MD (rechts), Uptodate

In 16-40 % der Fälle tritt ein Raynaud-Syndrom auf (31). Bei renaler Manifestation finden sich klinisch im Urinsediment Erythrozyten, Leukozyten und granuläre sowie zelluläre Urinzylinder. Es kommt meist zu einer Proteinurie, in 80 % der Fälle zu einer Mikrohämaturie und in 50 % der Fälle zu einer Abnahme der renalen Funktion (24). SLE-Vaskulitis kann zu gastrointestinalen Manifestationen wie Pankreatitis, Peritonitis und Colitis führen. Lungenmanifestationen sind Pleuritis, Pleuraergüsse, Pneumonitis, interstitielle Lungenerkrankungen, pulmonaler Hypertonus und alveoläre Hämorrhagie. Perikarditis, verruköse Endokarditis und Myokarditis sind kardiale Komplikationen. Zudem ist das Risiko für die Ausprägung einer koronaren Herzerkrankung erhöht (33). Bei neurologischer Beteiligung kann es zu kognitiven Einschränkungen, organischem Hirnsyndrom, Delirium, Psychosen, epileptischen Anfällen, Kopfschmerzen, Myelitis, Meningitis und peripherer Neuropathie kommen. Häufig tritt eine Keratokonjunktivitis sicca auf. Eine Antikörpervermittelte Leukopenie, milde Anämie und Thrombozytopenie bestimmen das Blutbild. Bei Vorhandensein von Antiphospholipidantikörpern oder bei schwerem nephrotischem Syndrom ist das Risiko für thrombembolische Ereignisse deutlich erhöht. In bis zu 50 % der Fälle kommt es zu einer Lymphadenopathie mit Splenomegalie. Die 5-Jahres-Überlebensraten von 50 %

Anfang der 50er Jahre vergangenen Jahrhunderts sind auf über 90 % bereits in den 70er Jahren überdurchschnittlich im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung gestiegen, doch sie liegen dennoch unter dem vergleichbaren demographischen Kollektiv (1). Die 10-Jahres-Überlebensrate beträgt nur 70 % (13).

1.1.5 DIAGNOSE

Definiert wird der SLE klassischerweise über die Kriterien des American College of Rheumatology. 1971 (Cohen, 1971) wurden diese erstmalig festgelegt, 1982 überarbeitet (34) und 1997 (35) erneut aktualisiert. Die klinische Heterogenität spiegelt sich in den elf Kennzeichen wieder, die sie umfassen. Mit einem Vorliegen von mindestens vier dieser Kriterien ist ein SLE bei einer Sensitivität von 84 % und Spezifität von 92 % wahrscheinlich. Eine höhere Sensitivität bei vergleichbarer Spezifität weisen die Kriterien der Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC) von 2012 auf (36). Sie könnten die ACR-Kriterien bald ablösen (siehe Tabelle 3).

Labortests sollten die Bestimmung des Blutbildes, der Nierenwerte und des CRP-Wertes umfassen. Zudem sollten ein Urinstatus/-sediment und ein 24h-Sammelurin zur Bestimmung der Kreatininclearance sowie der Proteinurie durchgeführt werden. Folgende Antikörper sollten bei Verdacht bestimmt werden: Antinukleäre Antikörper, Antiphospholipid-Antikörper, Antikörper gegen doppelsträngige DNA und Anti-Smith-Antikörper (Abbildung 4). Darüber hinaus empfiehlt sich die Bestimmung der Komplementfaktoren C3, C4 und CH50, da ein Verbrauch der Komplementfaktoren auf eine erhöhte Aktivität der Erkrankung hinweist. Abhängig von den klinischen Beschwerden sollten konventionelle Röntgenbilder der beteiligten Gelenke, ein Röntgenthorax, eine Echokardiographie und eine Nierenultraschalluntersuchung durchgeführt werden. Ggf. muss eine erweiterte Bildgebung erfolgen. Zur Verifikation der Diagnose ist in manchen Fällen eine Biopsie erforderlich.

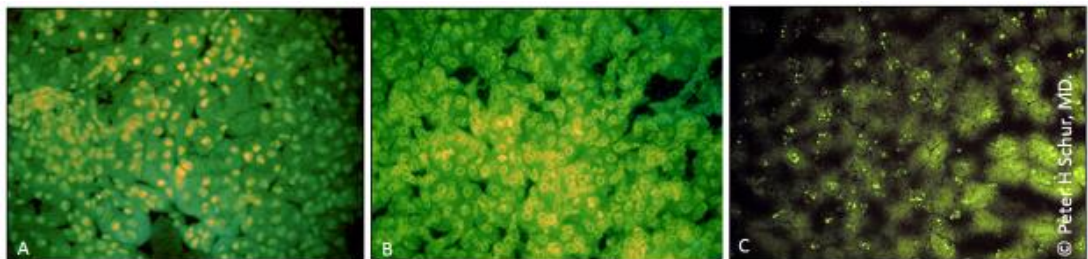


Abbildung 4: Immunfluoreszenzfärbung für SLE-typische Antikörper: A Antikörper gegen Nukleosomen, B Antikörper gegen dsDNA, C Antikörper gegen extrahierbare nukleäre Antigene wie Sm, RNP, Ro (SSA) und La (SSB), Courtesy of Peter H Schur, MD, Uptodate

Der klinische Verlauf des SLE ist charakterisiert durch Schübe und Remissionen. Ein enges Monitoring ist daher erforderlich. Als Verlaufparameter zur Aktivitätsmessung der Erkrankung eignet sich die Bestimmung von CRP, IgG, anti-dsDNA-Antikörper und Komplementfaktoren (C3, C4, CH50). Darüber hinaus sollten je nach Ausprägung organspezifische Untersuchungen durchgeführt werden.

Tabelle 3: SLE-Kriterien des American College of Rheumatology (ACR) vs. der Kriterien der Systemic Lupus International Collaborating Clinics (SLICC)

| ACR | | SLICC | |
|----------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Mindestens 4 der 11 Kriterien müssen für die Diagnose eines SLE zutreffen. | | Für eine Klassifizierung als SLE ist erforderlich, dass vier Kriterien (davon mindestens ein klinisches und ein immunologisches) erfüllt sind oder bei positiven ANA oder anti-dsDNA-Antikörpern histologisch eine Lupusnephritis diagnostiziert wird. | |
| Schmetterlingserythem | Umschriebenes Erythem, flach oder erhaben, über den Wangen und am Nasenrücken mit Aussparung der Nasolabialfalten | Akuter kutaner Lupus | Schmetterlingserythem, bullöser Lupus, toxische epidermale Nekrolyse, makropapuläres Lupuserythem oder Subakuter kutaner Lupus (psoriasiform ohne Induration und/oder ringförmige polycyclische Läsionen ohne Narbenbildung, gelegentlich mit Dyspigmentierung oder Ausbildung von Teleangiektasien) |
| Fotosensibilität | Hauterscheinungen als inadäquate Reaktion nach Sonnenlichtexposition, anamnestisch oder durch den Arzt beobachtet | | |
| Diskoider Lupus erythematodes | rötliche Papeln mit Schuppenbildung und folliculärer Hyperkeratose, atrophische Narben in älteren Läsionen möglich | Chronischer kutaner Lupus | Diskoider Lupus; lokal (oberhalb des Nackens); generalisiert (oberhalb und unterhalb des Nackens); hypertroph (verruköser) Lupus, Lupuspannikulitis, Erythematosis tumidus; Perionlupus oder Overlap diskoider Lupus/Lichen planus |
| | | Nicht Narben bildende Alopezie | Diffuse Verdünnung oder Fragilität des Haares mit sichtbar abgebrochenen Haaren (nach Ausschluss anderer Ursachen wie Alopezia areata, Medikamente, Eisenmangel, androgene Alopezie) |
| Orale oder nasale Schleimhautulzera | Orale oder nasopharyngeale Ulzera, gewöhnlich schmerzlos, durch den Arzt erhoben | Orale oder nasale Ulzera | Ulzera des Gaumens, buccal, der Zunge oder nasal (nach Ausschluss anderer Ursachen wie Vaskulitis, M. Behçet, Infektionen (HSV), CEDs, reaktive Arthritis, säurereiche Nahrung) |

| | | | |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Nichterosive Arthritis | von ≥ 2 peripheren Gelenken (Schmerzempfindlichkeit, Schwellung oder Erguss) | Gelenkbeschwerden | Synovitis von ≥ 2 Gelenken, charakterisiert durch Schwellung oder Erguss oder Schmerzempfindlichkeit von ≥ 2 Gelenken und mindestens 30min Morgensteifigkeit |
| Serositis | Pleuritis (anamnestisch pleuritischer Schmerz oder Pleurareiben oder Pleuraerguss in der Bildgebung) oder Perikarditis (Elektrokardiographischer Nachweis oder Perikardreiben oder Perikarderguss in der Bildgebung) | Serositis | Typische Pleuritis > 1 Tag, Pleuraerguss, oder Pleurareiben oder Typischer perikardialer Schmerz (Schmerzen im Liegen mit Besserung im nach vorne gebeugten Sitzen) > 1 Tag, Perikarderguss, Perikardreiben oder Perikarditis im EKG nach Ausschluss anderer Ursachen wie Infektion, Urämie und Dressler-Syndrom |
| Renale Störung | Proteinurie > 0,5 g/d oder > 3+ ohne Quantifizierung oder Zylindurie (Erythrozytenzylinder, Hämoglobinzyylinder, Granulierte Zylinder, tubuläre Zylinder oder gemischt) | Renal | Urin: Protein/Kreatinin-Ratio (oder 24h-Proteinmessung) von 500 mg Protein/24h oder Erythrozytenzylinder |
| Neurologische Störung | Epileptische Anfälle (Ausschluss von Drogeneinnahme und metabolischen Entgleisungen, wie z.B. Urämie, Ketoazidose, Elektrolytstörungen) oder Psychose (Ausschluss von Drogeneinnahme und metabolischen Entgleisungen, wie z.B. Urämie, Ketoazidose, Elektrolytstörungen) | Neurologisch | Epileptische Anfälle; Psychose; Mononeuritis multiplex (nach Ausschluss anderer Ursachen wie primäre Vaskulitis); Myelitis, periphere oder kraniale Neuropathie (nach Ausschluss von anderen bekannten Ursachen wie primäre Vaskulitis, Infektion, Diabetes mellitus); oder Akute Verwirrung (nach Ausschluss anderer Ursachen wie toxische/metabolische Ursachen, Urämie, Medikamente) |

| | | | |
|-------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Hämatologische Befunde | Coombs positive hämolytische Anämie mit Retikulozytose oder Leukozytopenie < 4,000/mm ³ in ≥ 2 Fällen oder Lymphozytopenie < 1,500/mm ³ in ≥ 2 Fällen oder Thrombozytopenie < 100,000/mm ³ ohne Einwirkung von Drogen oder Medikamenten | Hämolytische Anämie | Hämolytische Anämie |
| | | Leukozytopenie oder Lymphozytopenie | Leukozytopenie (< 4,000/mm ³ mindestens einmal) (nach Ausschluss anderer bekannter Ursachen wie Felty-Syndrom, Medikamente, portale Hypertension) ODER Lymphozytopenie (< 1,000/mm ³ mindestens einmal) (nach Ausschluss anderer bekannter Ursachen wie Kortikosteroide, Medikamente und Infektionen) |
| | | Thrombozytopenie | Thrombozytopenie (< 100,000/mm ³) mindestens einmal nach Ausschluss anderer bekannter Ursachen wie Medikamente, portale Hypertension und thrombotische thrombozytopenische Purpura |
| Antinukleäre Antikörper (ANA) | Erhöhter ANA-Titer in der Immunhistochemie | ANA | ANA-Konzentration oberhalb der Laborreferenzwerte |
| Immunologische Befunde | Anti-ds DNS oder Anti-Sm oder Antiphospholipid-Antikörper | Anti-dsDNA | Anti-dsDNA-Antikörper-Konzentration oberhalb der Laborreferenzwerte (oder > 2fache des Referenzbereiches bei ELISA-Bestimmung) |
| | | Anti-Sm | Antikörper gegen Sm nukleäres Antigen |
| | | Antiphospholipid-Antikörper | Positivität für Antiphospholipid-Antikörper: positives Testergebnis für Lupusantikoagulanz, falsch-positives Testergebnis für Rapid Plasma Reagin, mäßige oder hohe Titer für Antikardiolipin-Antikörper (IgA, IgG oder IgM), oder positives Testergebnis für anti-β2-Glykoprotein I (IgA, IgG oder IgM) |

| | | | |
|--|--|-----------------------------|----------------------------------------------------------------|
| | | Niedrige Komplementfaktoren | Niedriges C3, niedriges C4 oder Niedriges CH50 |
| | | Direkter Coombs-Test | Direkter Coombstest nach Ausschluss einer hämolytischen Anämie |

1.1.6 THERAPIE

Die Therapie des SLE erfordert ein hohes Maß an Compliance. Sonnenschutz, Nikotinkarenz und Sport sind empfehlenswerte Allgemeinmaßnahmen. Bei kutaner Manifestation kann eine topische Therapie angewendet werden. Bei muskuloskelettalen Beschwerden, Fieber, Kopfschmerzen und leichtgradiger Serositis sind nichtsteroidale Antiphlogistika wie Naproxen eine gute Option. Als Basistherapie sollten alle Patienten Antimalariamedikamente wie Hydrochloroquin erhalten (37), da hierdurch die Schubfrequenz und Steroiddosis verringert werden können. Auch die renale Prognose ist deutlich besser (38). Bei renaler, kardialer, pulmonaler, hepatischer, hämatogener (Hämolyse, Thrombozytopenie) oder cerebraler Organbeteiligung sind im Falle erhöhter Krankheitsaktivität systemische Glukokortikoide (z.B. 1-2 mg/kg KG Prednisolon) zu verabreichen. Zur Kontrolle der Krankheitsaktivität und zur Einsparung von Glukokortikoiden ist zusätzlich eine immunsuppressive Therapie mit Methotrexat, Cyclophosphamid, Azathioprin oder Mycophenolat indiziert (39, 40). Ein Zusatztherapeutikum bei SLE-Erkrankten, die auf konventionelle Therapie nicht ausreichend ansprechen, ist Belimumab (Benlysta®), ein Inhibitor des zur TNF-Familie gehörenden löslichen humanen B-Lymphozyten-Stimulator-Proteins (Blys) (41).

Die Therapie der Lupusnephritis erfordert stets eine supportive Therapie. Der Blutdruck sollte mittels Angiotensin II-Antagonisten unter 130/80 mmHg eingestellt werden. Die Proteinurie sollte weniger als 500-1000 mg/Tag oder 60 % des Ausgangswertes betragen. Das Fettstoffwechselprofil sollte ggf. mittels Statintherapie optimiert werden. Bei Vorliegen von Antiphospholipidantikörpern sollte eine Plättchenhemmung mit ASS erfolgen (39, 40).

Die Art der immunsuppressiven Induktionstherapie zum Einleiten einer Remission der Lupusnephritis ist abhängig vom Ausmaß der entzündlichen Schädigung in den Nierenglomeruli, die in der Nierenbiopsie erfasst wird. Patienten mit milder mesangioproliferativer Lupusnephritis (Klasse I oder II), bei denen keine nekrotischen oder sichelförmigen Läsionen vorliegen, Blutdruck und Serumkreatinin sich im Normbereich befinden und nur eine geringe Proteinurie besteht, können bei stabilem Verlauf in der Regel ohne Immunsuppression mit oben beschriebener supportiver Therapie behandelt werden. Bei Patienten mit fokal proliferativer oder diffus proliferativer Lupusnephritis (Klasse III bzw. IV) sollte die Therapie aus Glukokortikoiden kombiniert mit Cyclophosphamid oder Mycophenolatmofetil bestehen. Sollte nach drei Monaten Therapie keine Remission erzielt werden, sollte auf das alternative immunsuppressive Regime gewechselt werden. Zur Erhaltungstherapie nach Erreichen einer Remission können Azathioprin (2 mg/kgKG/d), Mycophenolatmofetil (z.B. 2 x 1000 mg/d), Ciclosporin und Cyclophosphamid über 18-24

Monate eingesetzt werden. Bei Versagen der zuvor genannten Optionen kann ein Therapieversuch mit Rituximab erfolgen. Im Falle einer membranösen Lupusnephritis (Klasse IV) empfiehlt sich die Therapie mit Prednisolon und Cyclophosphamid oder Mycophenolatmofetil. Bei Therapie refraktärem Verlauf kann eine Therapie mit Ciclosporin und Tacrolimus erwogen werden (39, 40).

Diese konventionell immunsuppressive Therapie ist mit erheblichen Nebenwirkungen wie Infektionen, Infertilität und Tumorinduktion verbunden. Daher konzentrieren sich die Forschungsbemühungen auf die Suche nach nebenwirkungsärmeren, selektiven immunmodulatorischen Therapien, wie sie bei anderen Autoimmunerkrankungen unter anderem in Form Zytokin-blockierender Antikörper (Biologics) angewandt werden (Abbildung 5).

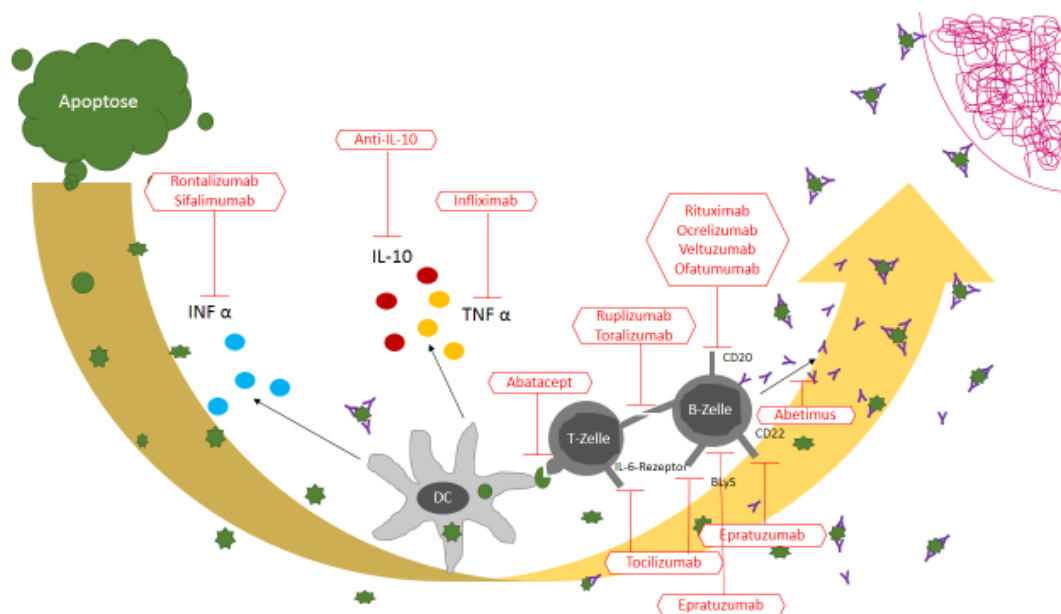


Abbildung 5: Neue potentielle Biologica-Therapien des SLE (42–45)

1.1.7 TNF α -INHIBITOREN

Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF) ist als klassisches proinflammatorisches Zytokin unter anderem Ziel der selektiven Therapie. TNF-Inhibitoren werden bereits mit großem Erfolg bei rheumatoider Arthritis, Spondylitis ankylosans, polyartikulärer juveniler idiopathischer Arthritis, Psoriasis, Psoriasisarthritis, Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn eingesetzt. 2010 waren die TNF-Blocker Etanercept (Enbrel[®]), Adalimumab (Humira[®]) und Infliximab (Remicade[®]) unter

den Top 20 der nach Industrieumsatz führenden Arzneimittel und teilweise noch vor dem humanen Insulinwirkstoff unter den Top 20 der umsatzstärksten Biologica-Wirkstoffe (46).

Tabelle 4: Top 10 der Biologica-Wirkstoffe nach Umsatz (2010) (46)

| Rang | Wirkstoff | Ausgaben (Mio. €) | Anzahl Packungen (Tsd.) | verordnete Tagesdosen (Tsd.) | Versicherte (Tsd.) |
|------|--------------------|----------------------|----------------------------|---------------------------------|-----------------------|
| 1 | Interferon beta-1a | 86,1 | 39,9 | 1.262,6 | 4,9 |
| 2 | Adalimumab | 70,8 | 15,9 | 1.104,9 | 4,4 |
| 3 | Etanercept | 59,4 | 16,6 | 970,6 | 4,1 |
| 4 | Insulin (human) | 57,8 | 686,9 | 46.287,6 | 123,3 |
| 5 | Somatotropin | 27,8 | 10,2 | 686,9 | 1,7 |
| 6 | Infliximab | 24,4 | 10,4 | 936,1 | 1,6 |
| 7 | Insulin lispro | 21,2 | 167,0 | 12.685,4 | 31,5 |
| 8 | Insulin aspart | 19,2 | 153,2 | 11.414,2 | 30,2 |
| 9 | Insulin glargin | 19,2 | 162,0 | 9.414,2 | 48,7 |
| 10 | Natalizumab | 18,2 | 7,9 | 236,2 | 0,8 |

Infliximab ist ein chimärer monoklonaler Antikörper, der aus einem humanen konstanten Fragment von IgG1 und einer variablen murinen Bindungsstelle für TNF besteht. Es bindet mit hoher Affinität und Spezifität lösliches sowie membran-gebundenes TNF, sowie TNF, das bereits am TNF-Rezeptor gebunden ist. Infliximab neutralisiert auf diese Weise lösliches und membrangebundenes TNF und kann die Aktivierung der TNF-Rezeptoren vor und nach der Bindung an den TNF-Rezeptor inhibieren.

Das Fusionsprotein Etanercept besteht aus der extrazellulären Ligandenbindungsdomäne des humanen TNF-Rezeptors 2 (TNFR2/p75) und der F_c-Domäne des humanen IgG1-Antikörpers. Die F_c-Domäne besitzt die Scharnier-CH₂- und CH₃-Region des IgG1-Moleküls. Die CH₁-Region ist nicht enthalten. Etanercept bindet an lösliches TNF und Lymphotoxin-α mit höherer Affinität als die TNF-Rezeptoren. Ursache der höheren Affinität ist der dimere Aufbau von Etanercept. Das Arzneimittel blockiert so kompetitiv die Aktivierung der an der Zellmembran befindlichen TNF-Rezeptoren. Die F_c-Domäne des IgG1-Antikörpers führt zu einer verlängerten Halbwertszeit.

Ein komplett humaner monoklonaler Antikörper vom Typ IgG1 ist Adalimumab, der ebenfalls TNF bindet und seine Interaktion mit den membranständigen TNF-Rezeptoren (TNFR1/p55; TNFR2/p75) blockiert.

Certolizumab ist ein TNF-inhibierender Antikörper der neueren Generation und besteht aus der F_{ab}-Domäne eines rekombinanten, humanisierten monoklonalen Antikörpers, der an Polyethylenglykol konjugiert wurde und mit einer Dissoziationskonstante von 90pM dosisabhängig membranständiges und lösliches TNF bindet. Lymphotoxin- α wird nicht neutralisiert. Da Certolizumab keine Fragment-kristallisierbare F_c-Domäne besitzt, tritt weder eine Komplementfixierung noch eine antikörperabhängige zellvermittelte Zelltoxizität in vitro auf. Außerdem kommt es in vitro zu keiner Apoptose in Monozyten oder Lymphozyten, die aus humanem peripherem Blut gewonnen wurden und zu keiner Degranulation der Neutrophilen. Aufgrund der Pegylierung wird das Arzneimittel langsamer im Körper eliminiert und kann weniger häufig verabreicht werden.

Golimumab ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper des Typs IgG1 κ , der mit löslichem und membranständigen TNF Komplexe bildet und so die Bindung an die TNF-Rezeptoren verhindert.

TNF-Spiegel sind auch bei SLE-Patienten deutlich erhöht, sogar in stärkerem Maße als bei anderen Autoimmunerkrankungen. Die TNF-Konzentration korreliert mit der Krankheitsaktivität (47). Insbesondere wird bei allen Lupusnephritis-Formen TNF in den Glomeruli stark exprimiert (48) und korreliert mit der histologischen Klassifikation (49). MRL/lpr-Mäuse sind ein gängiges SLE-Modell. Diese Mäuse produzieren massive Mengen an TNF (50). Hemmt man TNF, kommt es in verschiedenen Mausmodellen zu einer Reduktion der Krankheitsaktivität. MRL/lpr-Mäuse haben eine geringer ausgeprägte Arthritis und Pneumonitis (51). Im Modell des Antikörper induzierten Lupus von C3H.SW Mäusen sind bei regelmäßiger Behandlung mit rat anti-mouse mAb V1q, einem monoklonalem TNF-Antikörper, Nephritis und Leukozytopenie reduziert (52). Auch New Zealand Mäuse sind ein klassisches Model für SLE. Kreuzt man New Zealand Black (NZB) Mäuse mit New Zealand White (NZW) Mäusen, entwickelt die F1-Generation (NZB/W) Autoantikörper und ein Lupus-ähnliches klinisches Krankheitsbild (53). In Nieren von NZB/W Mäuse werden große Mengen an TNF produziert und geringe Dosen von rekombinantem TNF können in der späten Phase der Erkrankung zu einer Aggravierung führen (54).

Die meisten klinischen Therapiestudien mit TNF-Blockern beim SLE erfolgten bisher mit Infliximab und unkontrolliert. Dennoch sah man deutliche und anhaltende Effekte auf Lupusarthritis und Lupusnephritis (54, 55). Die TNF-Blockade bewirkte insbesondere eine lang anhaltende Verbesserung der Lupusnephritis (Proteinurie) nach Therapieende, während die entzündliche Gelenksymptomatik nach Beenden der Therapie wieder zunahm (56). Sogar im Falle eines Patienten mit Ausbildung einer diffusen proliferativen therapierefraktären

Nephritis kam es nach Therapie mit Infliximab zur anhaltenden Remission (55). TNF-Blockade wirkt sich auch positiv auf Hauteffloreszenzen aus (57).

Trotz dieser vielversprechenden Daten ergeben sich Bedenken gegen den Einsatz TNF-blockierender Therapien bei SLE-Patienten (Tabelle 5). 0,5-1% der Patienten mit z.B. rheumatoider Arthritis oder Morbus Crohn entwickeln unter Behandlung mit TNF-Blockern antinukleäre und anti-dsDNA-Antikörper (58–62). Seltener treten auch SLE-artige Krankheitsbilder auf (63, 64). Die häufigsten Befunde sind Hauteffloreszenzen, Blutbildveränderungen, Arthritis und Serositis (65, 66). Im Mittel treten die Symptome 9 Monate nach Beginn einer Therapie auf. In seltenen Fällen kommt es sogar zu der Entwicklung einer Glomerulonephritis (67, 68). Diese klinischen und laborchemischen Veränderungen bilden sich in der Regel nach Beendigung der TNF-Inhibitor-Therapie zurück (69, 70)(70). Interessanterweise sind die spontanen SLE-entwickelnden NZB/W-Mäuse durch eine verminderte Fähigkeit zur TNF-Produktion gekennzeichnet. Wird jungen New Zealand Mäusen dagegen TNF hochdosiert verabreicht, entwickeln sie deutlich später Autoantikörper und eine Lupusnephritis (71). Auch bereits erkrankte Mäuse profitieren in Form verlängerten Überlebens von einer Hochdosis-TNF-Substitution (71). Kreuzt man NZB-Mäuse mit TNF-defizienten Mäusen und TNF-WT-Mäusen als Kontrollgruppe, erleiden hemizygoten NZB x TNF (0)-Mäuse in der F1-Generation einen deutlich erschwerten Verlauf mit insbesondere deutlich schwerer verlaufender renaler Beteiligung im Vergleich zur Kontrollgruppe (72). Diese klinischen und tierexperimentellen Daten sprechen neben der bekannten proinflammatorischen Funktion von TNF für eine wichtige immunregulatorische Funktion, die Autoimmunphänomene entgegenwirkt.

Tabelle 5: TNF-Inhibitoren und ihre häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen (73)

| | |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Adalimumab | Reaktionen an der Einstichstelle (20 %), SLE und anti-DNA-Antikörper , Angioödem, Infektion, Medikamentenüberempfindlichkeit, saisonale Allergie, Serumkrankheit, Anaphylaxie, Anti-Adalimumab-Antikörper (AAA), demyelinisierende Krankheiten des Nervensystems |
| Etanercept | Reaktionen an der Einstichstelle (40 %), Autoantikörper (ANA) , Anti-Etanercept-Antikörper, SLE-ähnliche-Krankheiten , Infektionen, Psoriasis, Stevens-Hohnson-Syndrom, Toxische Epidermale Nekrolyse (TEN), Macrophage Activation Syndrome (MAS), ANCA + Vaskulitis, Interstitielle Lungenerkrankungen, Lymphome |
| Golimumab | Reaktionen an der Einstichstelle, Infektionen, demyelinisierende Krankheiten, schwere Hypersensitivität, autoimmune Phänomene |
| Infliximab | Infektionen, Ausschläge, Infusionsreaktionen (3,8 %), Hypersensitivität, Autoantikörperproduktion (6 %) , SLE, Serumkrankheit, Vaskulitis, Exanthem |

So kann TNF beispielsweise T-Zell-vermittelte Immunantworten durch Induktion von Apoptose in aktivierten T-Lymphozyten begrenzen (74). Aus diesem Grund ist die Einsatzfähigkeit einer

TNF-blockierenden Therapie beim SLE und der Lupusnephritis begrenzt, trotz der ausgeprägten entzündungshemmenden Effekte dieser Therapie bei anderen Autoimmunerkrankungen.

1.2 TNF UND SEINE REZEPTOREN

1.2.1 STRUKTUR

TNF, spezifischer Angriffspunkt der TNF-Blocker, ist ein klassisches proinflammatorisches Zytokin. Erste Hinweise auf die Existenz von TNF fanden sich bereits im 18. Jahrhundert. Die Tumormasse von Krebspatienten verzeichnete gelegentlich bei schwerer bakterieller Infektion des Patienten einen deutlichen Rückgang (75). 1975 arbeiteten Carswell et al. an einer Studie zur hämorrhagischen Tumornekrose von mit Endotoxin behandelten und mit *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG-) infizierten Mäusen. Dabei entdeckten sie im Serum dieser Mäuse eine Substanz, die ebenfalls wie Endotoxin eine Nekrose der Tumormassen bewirkt. Sie benannten diese Substanz nach ihrer Wirkung als Tumor Nekrose Faktor alpha und vermuteten, dass Endotoxin die Freisetzung von TNF aus Makrophagen induziert und so die Tumornekrose nach Endotoxinbehandlung vermittelt wird (76). Die Hoffnungen, die in eine Chemotherapie mit TNF gesetzt wurden, konnten aber nicht erfüllt werden, da bei effektiven Dosen eine hohe Toxizität für gesundes Gewebe bis zum letalen Schocksyndrom besteht (77).

Das für TNF kodierende Gen liegt auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (Mensch) bzw. Chromosom 17 (Maus). TNF wird als ein 26 kDa großes Typ II Transmembranprotein (mTNF) exprimiert, das beim Menschen aus 233 Aminosäuren besteht (Abbildung 6). Die ersten 76 Aminosäuren wirken als Signalpeptid und binden TNF an die Plasmamembran (78). Nach proteolytischer Spaltung durch die Metalloprotease TNF α converting enzyme (TACE) zwischen Ala-66 und Val-67 lagern sich die 17kDa großen löslichen Proteine (sTNF) zu 51kDa biologisch aktiven Homotrimeren zusammen. Auch mTNF ist als membranständiges Homotrimer biologisch aktiv (79).

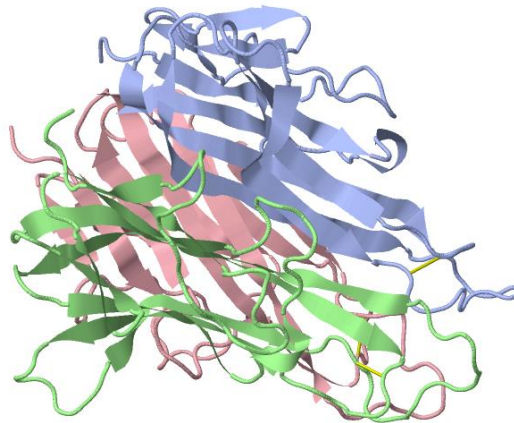


Abbildung 6: Struktur von TNF (*M. musculus*)

Eine Vielzahl von Zellen produziert TNF (Tabelle 6). Unter ihnen finden sich hämatopoetische Zellen, wie vor allem aktivierte Makrophagen, aber auch nicht-hämatopoetische Zelllinien wie renale glomeruläre und tubuläre Epithelzellen (80).

Tabelle 6: TNF-produzierende Zellen

| hämatopoetische Zellen | nichthämatopoetische Zellen |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Makrophagen | Endothelzellen |
| CD4+ und CD8+-T-Lymphozyten | glatte Muskelzellen |
| B-Lymphozyten | Tumorzelllinien |
| LAK-Zellen | Fibroblasten |
| NK-Zellen | Mesangialzellen |
| Mastzellen | glomeruläre Zellen |
| Neutrophile | tubuläre Zellen |
| Astrozyten | |

Induziert wird die Ausschüttung durch verschiedenste physikalische, chemische und immunologische Stimuli.

Die biologische Wirkung von TNF wird nach Bindung an seine zwei Rezeptoren, TNF-Rezeptor 1 (TNFR1) und TNF-Rezeptor 2 (TNFR2), vermittelt. Beide Rezeptoren gehören zur TNF-Rezeptor-Superfamilie, welche auch Rezeptoren für FAS, CD40, CD27 und RANK-Ligand umfasst. Mitglieder der TNF-Rezeptor-Superfamilie sind Typ I-Transmembran-Glykoproteine. Charakteristisch für die TNF-Rezeptor-Superfamilie ist eine extrazelluläre

Domäne, die aus ein- bis sechsfachen Wiederholungen von Cystein-reichen Motiven besteht (79). Diese Domäne dient zur Bindung der entsprechenden Liganden.

TNFR1 ist ein 55kDa großer Membranrezeptor, der ubiquitär exprimiert wird. Eine der wenigen Ausnahmen sind Erythrozyten und unstimulierte T-Lymphozyten. Er besteht aus 434 Aminosäuren. Die N-terminale, extrazelluläre Region besteht aus vier der oben genannten Cystein-reichen Motive. Die intrazelluläre Seite ist durch die nahe am C-terminalen Ende sitzende sogenannte Todesdomäne gekennzeichnet (78).

Der 75kDa große Membranrezeptor TNFR2 findet sich hingegen vor allem auf T-Zellen, aber auch auf Endothelzellen, Zellen des Nervengewebes (Oligodendrozyten, Astrozyten), Myozyten, Thymozyten und mesenchymalen Stammzellen (81). Er besteht aus 439 Aminosäuren. Die extrazelluläre Region enthält ebenfalls wie TNFR1 vier Cystein-reiche Motive. Die verschiedenen intrazellulär aktivierten Signalwege der beiden Rezeptoren spiegeln sich in dem Fehlen von Homologie in der intrazellulären Region wider (79). In der intrazellulären Region von TNFR2 findet sich keine Todesdomäne, sondern eine Bindungsstelle für TNF-Receptor associated factor (TRAF2) (78).

Tabelle 7: Vergleich der TNF-Rezeptoren

| | TNFR1 | TNFR2 |
|-----------------------|---------------------------|----------------------------------|
| Größe | 55kDa | 75kDa |
| Anzahl Aminosäuren | 434 Aminosäuren | 439 Aminosäuren |
| Sekretion | Ubiquitär | vor allem hämatopoetische Zellen |
| Aktivierung | sTNF, mTNF | mTNF |
| extrazelluläre Domäne | 4 Cystein reiche Regionen | 4 Cystein reiche Regionen |
| intrazelluläre Domäne | Todesdomäne DD | Bindungsstelle für TRAF2 |

1.2.2 SIGNALTRANSDUKTION

Beide Rezeptoren binden die membrangebundene (mTNF) und die lösliche Form (sTNF) des TNF-Liganden. TNFR2 scheint jedoch bevorzugt von der membrangebundenen Form aktiviert zu werden. mTNF vermittelt über Zell-Zell-Kontakte juxtakrin entsprechende Signale, die lösliche Form sTNF kommuniziert über parakrine und systemische Wege (82).

TNFR1 und TNFR2 aktivieren nach Bindung von TNF jeweils spezifische Signalwege (Abbildungen 7 und 8). TNFR1 vermittelt überwiegend die inflammatorischen Prozesse, die TNF zugeschrieben werden (83). TNFR1 kann nach Bindung von TNF über seine cytoplasmatische Todesdomäne das Adaptermolekül TNFR1-associated DEATH domain

(TRADD) binden und hierüber TRAF2 und andere Adaptorproteine wie cIAP1, cIAP-2 und RIP1 aktivieren, welche über zelluläre Signalwege schlussendlich die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1 stimulieren. Diese spielen eine entscheidende Rolle in der Immunantwort, Zellproliferation und Apoptose. Ein anderer Signalweg induziert direkt Apoptose über die Endozytose des aktivierten TNF/TNFR1-Komplexes und die anschließende Komplexbildung von TRADD, FADD und Caspase 8. Ist Caspase 8 inhibiert, kann in bestimmten Zellen eine regulierte Form der Nekrose (Nekroptose) ausgelöst werden (78, 84).

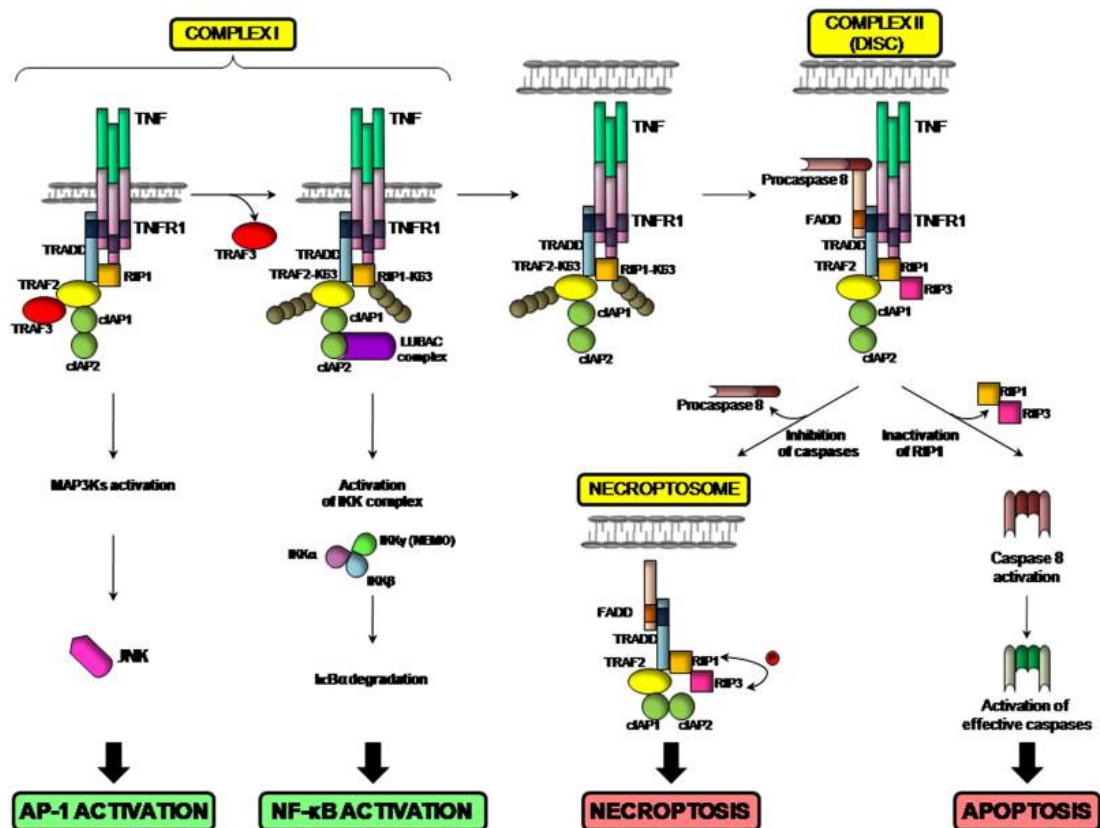


Abbildung 7: TNF-Signaltransduktionswege (78)

Zunächst vermutete man nur eine modulatorische Funktion von TNFR2 für TNFR1-Signalwege. Die meisten Studien konzentrieren sich auch hauptsächlich auf die Rolle von TNFR1. Man weiß, dass TNFR2 jedoch vornehmlich protektiv das Überleben der Zellen sichert und Zellproliferation über verschiedene NF- κ B-Wege eigenständig aktivieren kann (82). Über die direkte Interaktion der intrazellulären Domäne mit TRAF2 können TRAF1, TRAF3, cIAP1 und cIAP2 aktiviert werden. Durch diese können über MAP-Kinase-Kinase-Kinasen (MAP3Ks) und die I κ B-Kinase (IKK) die Transkriptionsfaktoren NF- κ B und AP-1

induziert werden (78). TNFR2 kann darüber hinaus zur Depletion von TRAF2 führen und damit AP-1- und NF- κ B-Signaltransduktion inhibieren. TNFR1 und TNFR2 können auch miteinander interagieren. So kann TNFR2 die TNFR1-abhängige Aktivierung von Caspase 8 beschleunigen (84). Zudem vermutet man, dass TNFR2 die Bindungsrate von TNFR1 mit TNF reguliert, indem es über rasche Assoziation und Dissoziation des Liganden, die lokale Konzentration von TNF an der Zelloberfläche erhöht (85). Tartaglia et al. etablierten zudem den Begriff „ligand passing“ (85). Hierunter versteht man, dass die Bindung eines Liganden an TNFR2 an TNFR1 weitergegeben werden kann, um ein TNFR1-Signal zu verstärken.

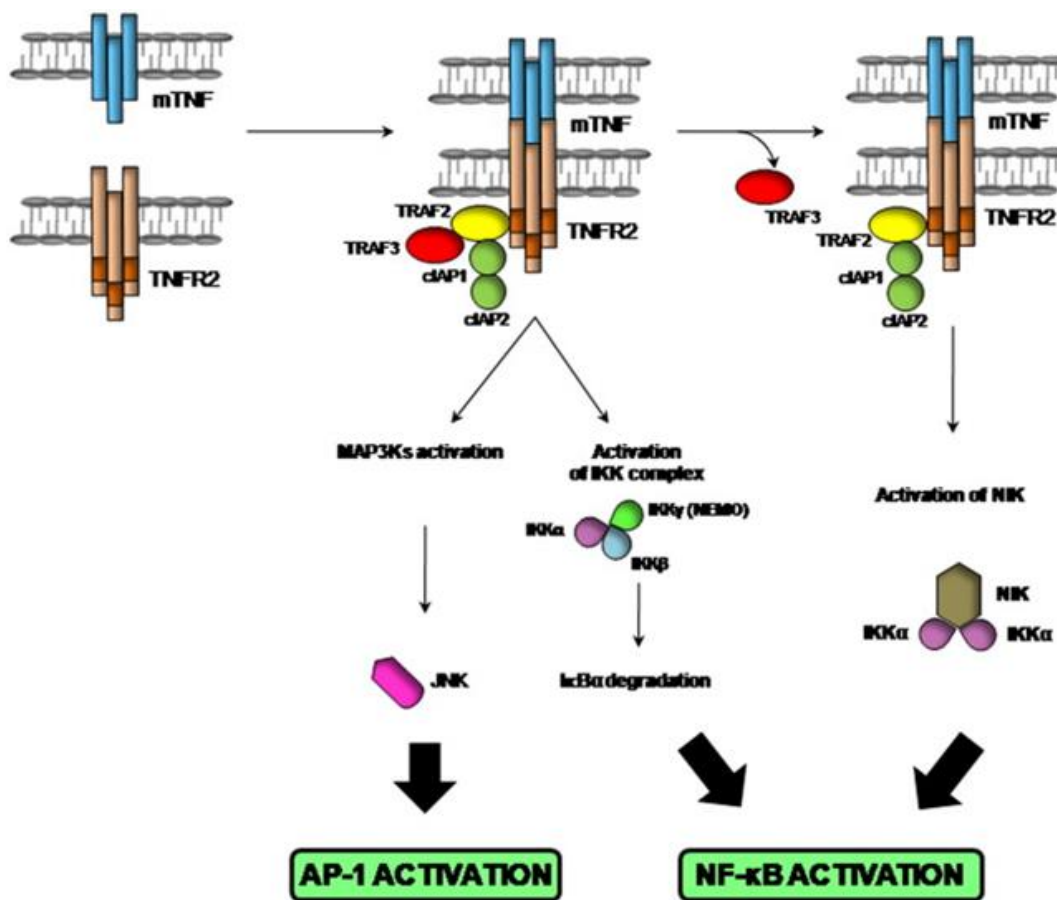


Abbildung 8: Signaltransduktionsweg von TNFR2 (78)

1.3 VORARBEITEN UND HYPOTHESE

Tierexperimentelle Daten zeigen, dass die zum Teil gegensätzlichen inflammatorischen und immunregulatorischen TNF-Effekte teilweise selektiv von den TNF-Rezeptoren TNFR1 und TNFR2 vermittelt werden können (74, 80). Auch Arbeiten unserer Arbeitsgruppe unterstützen diese Daten:

Vielhauer et al. konnte in einem Mausmodell einer SLE-artigen Immunkomplex- Glomerulonephritis zeigen, dass TNFR1-defiziente Mäuse weniger Proteinurie sowie eine geringere renale Leukozyteninfiltration und glomeruläre Schädigung zu frühen Zeitpunkten des Modells entwickeln (86). Im weiteren Verlauf bildete sich jedoch eine Wildtyp-Tieren vergleichbare Glomerulonephritis aus, sodass TNFR1-Defizienz die Entwicklung der Immunkomplex-Glomerulonephritis zwar verzögert, aber nicht verhindern kann. Tatsächlich zeigt sich in nephritischen Nieren TNFR1-defizienter Mäuse eine vermehrte Infiltration von T-Lymphozyten mit verminderter Apoptose. Diese Daten weisen darauf hin, dass ein anfänglich fehlender proinflammatorischer Effekt von TNFR1 durch Fehlen einer immunregulatorischen Funktion im weiteren Verlauf aufgehoben wird. TNFR2-defiziente Mäuse hingegen entwickelten keine Glomerulonephritis und waren vor der Erkrankung geschützt (86). Im Gegensatz zu TNFR1 scheint daher TNFR2 eine essentielle proinflammatorische Rolle zu spielen und die initiale glomeruläre Schädigung nach Immunkomplexablagerung zu vermitteln (86). Die Mechanismen dieser proinflammatorischen Funktion von TNFR2 im Glomerulum sind allerdings nicht bekannt.

Taubitz et al. zeigten in Microarray-Genexpressionsanalysen intakter Glomeruli von WT und TNFR-defizienten Mäusen, dass die glomeruläre Expression von Adhäsionsmolekülen, Chemokinen, Komplementfaktoren und proapoptotischen Molekülen nach Stimulation mit sTNF vor allem TNFR1-vermittelt sind (87). In TNF-stimulierten TNFR1-defizienten Glomeruli konnte keine Chemokinsekretion nachgewiesen werden. Während die mRNA-Expression entzündlicher Mediatoren in TNFR2-defizienten Glomeruli nach sTNF-Stimulation nicht vermindert war, wies eine verminderte Chemokinsekretion in TNFR2-defizienten Glomeruli auf posttranslationale, proinflammatorische Effekte dieses Rezeptors hin. TNFR1-defiziente Mäuse zeigten keine TNF-induzierte glomeruläre Leukozyteninfiltration. In TNFR2-defizienten Mäusen war die glomeruläre Infiltration durch mononukleäre Phagozyten reduziert, die glomeruläre Infiltration durch Neutrophile blieb unbeeinflusst. Somit scheint die Aktivierung intrinsischer glomerulärer Zellen durch lösliches TNF im Wesentlichen abhängig von TNFR1 zu sein. TNFR2 unterstützt TNFR1-abhängige Effekte, v.a. posttranslational (87, 88).

Dem vorliegenden Projekt liegt entsprechend der Vorarbeiten die Hypothese zugrunde, dass beim SLE TNFR1 und TNFR2 proinflammatorische und immunregulatorische TNF-Funktionen unterschiedlich vermitteln. TNFR1 könnte einerseits proinflammatorische TNF-Effekte auslösen, die zu renaler Leukozyteninfiltration und lokalem Gewebeschaden führen. Andererseits könnte über TNFR1, z.B. durch Apoptose-Induktion in autoimmunen T-Zellen, die systemische Autoimmunreaktion begrenzt werden. TNFR1-Defizienz würde damit insgesamt nicht zu einer verminderten Krankheitsaktivität des SLE führen und möglicherweise Autoimmunität begünstigen. Eine TNFR2-Defizienz könnte dagegen aufgrund der Vorarbeiten die Immunkomplex-vermittelten Organschäden beim SLE hemmen, ohne die immunregulatorische Autoimmunreaktivitäts-begrenzende Funktion von TNF zu blockieren. Eine spezifische TNFR2-Blockade wäre daher potentiell geeignet, selektiv wesentliche proinflammatorischen TNF-Effekte zu hemmen, ohne die antiinflammatorische TNF-Wirkung zu vermindern.

Diese Hypothese wurde an einem Pristan-induziertem Mausmodell des SLE untersucht (89, 90), welches in Wildtyp- sowie TNFR1-, TNFR2- und TNFR1/2-defizienten Knockout-Mäusen induziert wurde.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 VERSUCHSMÄUSE

| | | |
|------------------|------------|------------------------------------------------|
| C57BL/6J Wildtyp | | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA |
| TNFR 1-/- | (C57BL/6J) | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA |
| TNFR 2-/- | (C57BL/6J) | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA |
| TNFR 1;2-/- | (C57BL/6J) | The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA |

Die Knockout-Mäuse waren mindestens bis zur F6-Generation mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt.

2.1.2 GERÄTE

| | | |
|----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Waagen | Waage BP 110 S Mettler PJ 3000 | Sartorius, Göttingen, D Mettler-Toledo, Greifensee, CH |
| Zellinkubatoren | Type B5060 EC-CO ₂ | Heraeus Sepatech, München, D |
| Zentrifugen | Heraeus Minifuge T Heraeus Biofuge primo Heraeus Sepatech Biofuge A | VWR International, Darmstadt, D Kendro Laboratory Products, Hanau, D Heraeus Sepatech, München, D |
| ELISA-Reader | Tecan, GENios Plus | Tecan, Crailsheim, D |
| ELISA-Wascher | Microplate-Washer Elx50 | Biotek, Bad Friedrichshall, D |
| Mikroskope | Leica DC 300F Olympus BX50 LSM510 laser scanning microscope | Leica Microsystems, Cambridge, UK Olympus Mikroskope, Hamburg, D Carl Zeiss, Jena, D |
| Spektrophotometer | Beckman DU® 530 | Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA |
| TaqMan Sequence Detection System | ABI prism™ 770 Sequence Detector | PE Biosystems, Weiterstadt, D |
| Durchflusszytometer | FACSCalibur | Becton Dickinson, San Jose, USA |
| Andere | Kryostat RM 2155 Homogenisator ULTRA-TURRAX T25 MidiMACS Mikrotom HM 340E pH meter WTW Thermomixer 5436 Vortex Genie 2™ Wasserbad HI 1210 | Leica Microsystems, Bensheim, D IKA GmbH, Staufen, D Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D Microm, Heidelberg, D WTW GmbH, Weilheim, D Eppendorf, Hamburg, D Bender&Hobein AG, Zürich, CH Leica Microsystems, Bensheim, D |

2.1.3 CHEMIKALIEN, PUFFER UND LÖSUNGEN

2.1.3.1 CHEMIKALIEN

| | |
|------------------------------------------|---------------------------------------------|
| Albustix Teststreifen | Bayer, D |
| Annexin V FACS Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| BSA, Bovines Serum Albumin | Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, D |
| Dulbecco's PBS | PAA Laboratories GmbH, Cölbe, D |
| DMSO | Merck, Darmstadt, D |
| EDTA | Calbiochem, San Diego, USA |
| Einbettmedium | Jung, Leica Microsystems, Nussloch, D |
| Eosin | Sigma, Deisenhofen, D |
| Ethanol | Merck, Darmstadt, D |
| FACS Flow | Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Formalin | Merck, Darmstadt, D |
| HCl (5N) | Merck, Darmstadt, D |
| H ₂ SO ₄ | Merck, Darmstadt, D |
| Kaliumchlorid | Merck, Darmstadt, D |
| Kollagenase Typ I | Sigma, Deisenhofen, D |
| Kryogel | Jung, Leica Microsystems, Nußloch, D |
| MicroBead Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| Natriumchlorid | Merck, Darmstadt, D |
| Natriumhydroxid 0,16mol/L | DiaSys Diagnostik Systems GmbH, Holzheim, D |
| Pikrinsäure 4,0mmol/L | DiaSys Diagnostik Systems GmbH, Holzheim, D |
| Standard Creatinin FS 2mg/dl (177µmol/L) | DiaSys Diagnostik Systems GmbH, Holzheim, D |
| Trypan Blau | Sigma, Deisenhofen, D |
| Tween | Fluka, Buchs, CH |

2.1.3.2 PUFFER

| | |
|----------------------|-------------------------------------------------------------|
| 10 x HBSS mit Ca, Mg | 4 g KCl |
| pH 7,4 | 0,6 g KH ₂ PO ₄ |
| | 80 g NaCl |
| | 0,621 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O |
| | 3,5 g NaHCO ₃ |
| | 1,4 g CaCl ₂ |
| | 1,0 g MgCl ₂ ·6H ₂ O |
| | 1,0 g Mg SO ₄ ·7H ₂ O |
| | 10 g D-Glucose |
| | 1000 ml H ₂ O |

| | |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 10 x HBSS ohne Ca, Mg pH 7,4 | 4 g KCl 0,6 g KH ₂ PO ₄ 80 g NaCl 0,621 g Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O 1000 ml H ₂ O |
| 2 mM EDTA in HBSS ohne Ca, Mg | 10 ml HBSS ohne Ca, Mg 7,44 mg EDTA |
| Carbonat-Bicarbonat-Puffer 0,05 M pH 9.6 | 1,59 g Na ₂ CO ₃ 2,93 g NaHCO ₃ 1000 ml H ₂ O |
| FACS-Puffer | PBS 0,2 % BSA 0,1 % Na-Azid |
| Formalinlösung | 1:10 Formaldehyd/PBS |
| MACS-Puffer pH 7,2 | 5 g BSA 1000 ml PBS 4 ml 0,5 M EDTA |
| Paris Puffer pH 7,4 | 20 mM Tris-HCl 125 mM NaCl 10 mM KCl 10 mM Na-Acetat |
| PBS/0,5 % Tween/ BSA-Puffer pH 7,0 | 200 ml PBS 0,5 % Tween 0,5 g BSA |
| Tris-Ammonium-Chlorid-Puffer pH 7,2 | 1,03 g Tris-Base 3,74 g Ammoniumchlorid 500 ml H ₂ O |
| Tris-NaCl/ 0,5 % Tween/ BSA-Puffer pH 8,0 | 6,06 g Tris 8,18 g NaCl 1000 ml H ₂ O 0,5 % Tween 2 g BSA |

2.1.3.3 LÖSUNGEN

| | |
|--------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|
| Annexin V FACS Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| Antidot Narkose | 0,1 mg/ml Flumazenil 5 mg/ml Atipamezol 0,4 mg/ml Naloxon |
| DNase-Stammlösung | 20 mM Tris/HCl 1 mM Mg Cl ₂ 50 % Glycerol |
| Kollagenase Lösung | 1,0 mg/ml Kollagenase in 1 x HBSS mit Ca, Mg |
| Kollagenase/DNase Lösung | 1,0 mg/ml Kollagenase und 1,0 mg/ml DNase-Stammlösung in 1x HBSS mit Ca, Mg |
| MicroBead Kit | Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D |
| Narkoselösung | 1 mg/ml Midazolam 0,05 mg/ml Fentanyl 1 mg/ml Medetomidin |

2.1.4 ANTIKÖRPER

| | |
|-----------------------------------------------------------------|---------------------------------------|
| Affinity Horseradish Peroxidase Goat Anti-Mouse Albumin B220-PE | Bethyl Laboratories, Montgomery, USA |
| CD 45-PE Cy5 | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD11b-PE | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD11c-FITC | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD11c-PE | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD25-PERCP | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD3 | Serotec, Oxford UK |
| CD3-FITC | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD40-FITC | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD45-PE | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD4-APC | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| CD8-PE.Cy5 | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| F4/80 | Serotec, Oxford, UK |
| F4/80-APC | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| HRP-conjugated Goat Anti-Mouse IgG (heavy and light chain) | SouthernBiotech, Birmingham, AL |
| Ly6 G-FITC | BD/Becton Dickinson, Heidelberg, D |
| Purified Goat Anti-Mouse Albumin | Bethyl Laboratories, Montgomery, USA |
| Rabbit IgG | Jackson, Immuno Research Laboratories |
| RNP-SM Antigen | Binding Site Sera |
| Smith Antigen | Immunovision, Springdale, AR |
| Smith Antigen Antibody | Abcam |

2.1.5 VERBRAUCHSMATERIAL

| | |
|---------------------------------------|---------------------------------------|
| Kanülen 20 G, 26 G und 30 G | BD Drogheda, IRL |
| 70 µm Cell Strainer Nylon | BD Biosciences, Erembodegem, Be |
| Reaktionsgefäße 500, 1500 und 2000 µl | Eppendorf, Hamburg, D |
| Tubes 15 und 50 ml | TPP, Trasadingen, CH |
| Petrischalen | Greiner, Nürtingen, D |
| Pipettenspitzen 1-1000 µl | Eppendorf, Hamburg, D |
| Histokassetten | NeoLab, Heidelberg, D |
| Preseparation Filter | Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, D |
| Mikroskopgläser | Menzel-Gläser, Braunschweig, D |
| Spritzen | Becton Dickinson, D |
| Pipettenspitzen 1-1000 µl | Eppendorf, Hamburg, D |

2.2 VERSUCHSTIERE UND EXPERIMENTELLES PROTOKOLL

2.2.1 TIERHALTUNG

Weibliche C57BL/6 Wildtyp-, TNFR1-Knockout-, TNFR2-Knockout- und TNFR1-/TNFR2-Knockout-Mäuse wurden im Alter von 12 Wochen bei einem Gewicht von 17,3 g bis 23,6 g aus der eigenen Zucht (Zentrale Versuchstierhaltung, Campus Innenstadt, Klinikum der Universität, Nussbaumstr. 21, 80336 München) bezogen. Initial stammen die Elterntiere aus der Tierzucht von The Jackson Laboratory, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA. Die Knockout-Mäuse waren mindestens bis zur F6-Generation mit C57BL/6-Mäusen rückgekreuzt. Die Haltung der Tiere erfolgte in Makrolonkäfigen der Größe II mit einer Grundfläche von 360 cm² unter üblichen Haltungsbedingungen. Die Käfige waren mit jeweils vier Tieren besetzt. Die Tiere erhielten eine individuelle Ohrmarkierung. Die Mäuse hatten freien Zugang zu Altromin Standarddiät und Wasser. Der Betrieb der Anlage erfolgte im 12-Stunden-Hell/Dunkel-Rhythmus. Die Temperatur betrug zwischen 20 °C und 22 °C. Die Luftfeuchtigkeit wurde zwischen 50-60 % konstant gehalten. Die Tiere wurden regelmäßig hinsichtlich Verhaltensauffälligkeiten und Nahrungsaufnahme kontrolliert. Umsetzen der Tiere und Reinigen der Käfige erfolgte 1 x wöchentlich. Alle experimentellen Verfahren wurden nach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und wurden von der Regierung von Oberbayern genehmigt.

2.2.2 INTRAPERITONEALE INJEKTION VON PRISTAN BZW. PBS

Zur Induktion eines Lupus erythematodes wurde ein Pristan-induziertes Modell gewählt, welches Satoh et al. 1994 zum ersten Mal publizierten (91). Hierbei wird Mäusen das

verzweigte Alkan Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadekan) intraperitoneal injiziert. Pristan kommt natürlicherweise in Pflanzen, in der Leber von Haien und in Mineralöl vor. Durch Injektion von Pristan kommt es zu einer chronischen Entzündung mit Bildung von intraperitonealen Lipogranulomen sowie Akkumulation von apoptotischen Zellen, u.a. im Knochenmark. Hierüber wird endogenes TLR7 stimuliert, welches, wie beim humanen SLE-Erkrankten, über CD11b⁺ Ly6C^{high} Monozyten zu einem Interferon-vermittelten Ausbruch eines Lupus-ähnlichen Syndroms führt (92). Dieses ist gekennzeichnet durch hohe Antikörperkonzentrationen (Gesamt-IgG, anti-dsDNA, anti-SM/RNP, anti-Su, etc.), welche ca. 3 Monate nach Injektion festzustellen sind (93), sowie hohe Konzentrationen von TNF (92). Je nach Mausstamm kommt es zur Ausprägung einer Immunkomplex-vermittelten Glomerulonephritis, Arthritis oder pulmonalen Vaskulitis (93). Wie beim Menschen ist ein stärkerer Phänotyp des Krankheitsbildes bei weiblichen Individuen zu beobachten, daher wurden ausschließlich weibliche Versuchstiere verwendet (94).

Die Tiere wurden in zwei Gruppen randomisiert (Abbildung 9). Im Alter von 12 Wochen erhielt Gruppe 1 eine intraperitoneale Injektion von 500 µl Pristan; Gruppe 2 erhielt eine intraperitoneale Injektion von 500 µl PBS. Die Injektion erfolgte mit einer 29 G-Kanüle langsam in den rechten unteren Bauchquadranten.

2.2.3 KLINISCHE KONTROLLE

Alle vier Wochen wurden die Tiere auf cervicale, axilläre sowie inguinale Lymphadenopathie kontrolliert. Die Haut wurde auf Läsionen überprüft (Score: 0 keine Läsionen, 1 milde Läsionen, 2 schwere Läsionen) und die Gelenke auf Veränderungen in der Beweglichkeit untersucht. Ebenso wurde das Gewicht der Tiere erhoben.

2.2.4 URINENTNAHME

Vor Injektion von Pristan bzw. PBS und in monatlichen Abständen nach Injektion wurde Spontanurin entnommen und der Proteingehalt des Urins bestimmt. Hierzu wurden die Mäuse am Nackenfell gegriffen, auf den Rücken gedreht und die Blase durch Massage entleert. Der Urin wurde in Eppendorfgefäßen gesammelt. Im Anschluss wurde die Proteinurie mittels Albuminstixteststreifen grob quantifiziert. Bis zur Bestimmung der restlichen Parameter mittels Kreatinin-Kit und Albumin-ELISA wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

2.2.5 GEWINNUNG VON SERUM

Ebenso wurde vor Injektion von Pristan bzw. PBS und in monatlichen Abständen nach Injektion ca. 200 µl Blut durch Punktion der Vena saphena entnommen. Vor der Punktion

wurden die Tiere unter der Wärmelampe kurz (< 1 min) erwärmt, das Fell am Bein wurde mit einem elektrischen Rasierer entfernt und die Haut mit Vaseline eingerieben. Zum Todeszeitpunkt wurde Blut (500 µl) aus dem retroorbitalen Venenplexus in Narkose mittels einer Kapillare entnommen.

Nach Gerinnung bei Raumtemperatur (ca. 30 min) wurde das Vollblut fünf Minuten bei 2500 g zentrifugiert. Das Serum wurde abpipettiert und bei einer Temperatur von -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

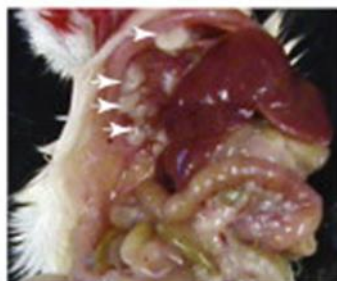
2.2.6 LAVAGE

Bei einem ersten Teil der Mäuse wurde am 28. Tag nach intraperitonealer Injektion von Pristan eine Peritoneallavage durchgeführt. Nach Narkotisierung der Maus erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 2,5 ml angewärmten NaCl 0,9 %. Das Abdomen der Maus wurde für 1 min massiert um die Flüssigkeit optimal zu verteilen. Im Anschluss wurde bis zum Peritoneum vorpräpariert und bei geeigneter seitlicher Lagerung der Maus die Lavageflüssigkeit mit einer Spritze entnommen. Nach Zählung der Zellzahl wurden mit jeweils 8 µl Lavageflüssigkeit Ausstriche angefertigt, die für eine halbe Stunde an der Luft trockneten. Der restliche Bestand der Lavageflüssigkeit wurde für 5min bei 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und bei -20 °C bis zur weiteren Auswertung gelagert. Das Pellet wurde mit 1 ml PBS aufgelöst und anschließend zur Analyse für die Durchflusszytometrie vorbereitet.

2.2.7 PERFUSION UND GEWEBEENTNAHME

Die Tötung der Tiere erfolgte im Alter von 10 Monaten. Nach Narkotisierung der Tiere erfolgte eine Öffnung des Situs und Beurteilung der Granulombildung nach folgendem Score (Tabelle 8).

Tabelle 8: Darstellung der Pristan induzierten Granulombildung von Reeves et al. (93) sowie Score zur quantitativen Beurteilung der Granulombildung



- | | |
|---|-----------------------|
| 0 | keine Granulome |
| 1 | fokal, Größe < 0,5 mm |
| 2 | fokal, Größe > 0,5 mm |
| 3 | ubiquitär |

Anschließend wurden die Organe mit angewärmten PBS über die linke Herzkammer mit niedrigem Druck bis zur völligen Blutleere gespült. Granulome, Nieren, Lunge und Milz wurden entnommen. Die Kapsel der Niere wurde entfernt. Das Gewicht der Milz wurde im Verhältnis zum Körpergewicht gemessen. Ein Teil der Gewebe wurde zur histologischen Aufbereitung in Histokassetten in 10 % Formalin über Nacht fixiert. Für die Zellisolation zur anschließenden Durchflusszytometrie wurden Teile der Niere und Milz in steriles PBS auf Eis gegeben.

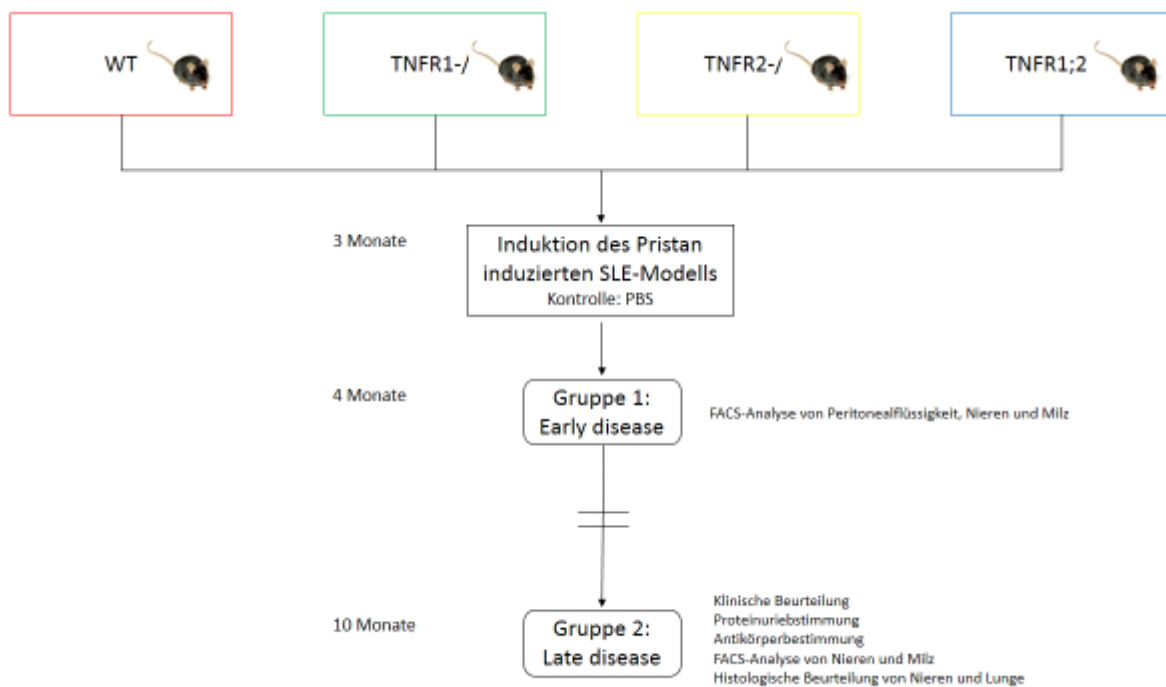


Abbildung 9: Studiendesign

2.3 METHODEN

2.3.1 KREATININ-BESTIMMUNG IM URIN

Zur Bestimmung der Albuminurie im Spontanurin wurde der Albumin/Kreatinin-Quotient im Urin bestimmt. Für die Messung der Kreatininkonzentration wurden die jeweilige Urinprobe und Aqua ad in iniectabilia im Verhältnis 1:10 gemischt und jeweils 10 µl dreifach auf eine 64-well-plate aufgetragen. Zur Bestimmung des Leerwerts wurde dreifach 10 µl Aqua ad in iniectabilia auf die 64-well-plate aufgetragen. Es erfolgte die Herstellung einer Standardverdünnungsreihe mittels 177 µmol/L Standard des Creatinin FS Kits von Diagnostic Systems und Aqua ad in iniectabilia. Diese wurde dreifach in die 64-well-plate pipettiert. Vier Teile 0,16 mmol/L Natriumhydroxid wurden mit einem Teil 4,0 mmol/L Pikrinsäure unter Abdunkelung gemischt. 200 µl des Substrats wurden auf die Proben gegeben. Kreatinin im Urin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrinsäure einen Komplex, der zu einem orangeroten Farbumschlag führt. Die Extinktion wurde mittels der Software XFluor4 im TECAN GENIOS Plus bei einer Wellenlänge von 492 nm nach 60 Sekunden und weiteren 120 Sekunden gemessen. Die Extinktionsdifferenz wurde bestimmt. Die Kreatininkonzentration, welche proportional zur Extinktionsdifferenz ist, wurde nach folgender Formel bestimmt:

$$\text{Kreatinin} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) = \frac{(\text{EZ Probe} - \text{E1 Probe}) - (\text{EZ Leerwert} - \text{E1 Leerwert})}{(\text{EZ Standard} - \text{E1 Standard}) - (\text{EZ Leerwert} - \text{E1 Leerwert})} \times \text{Konzentration Standard} \left(\frac{\text{mg}}{\text{dl}} \right) \times \text{Verdünnungsfaktor } 10$$

2.4 IMMUNOLOGISCHE METHODEN

2.4.1 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)

Konzentrationen verschiedener Proteine (Albumin, IgG, Rheumafaktor, Sm-Autoantikörper, U1snRNP-Autoantikörper) wurden mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA) bestimmt (Tabelle 9). 96-Well-Platten wurden dafür über Nacht mit bestimmten Antikörpern im Kühlschrank bei 4°C beschichtet (Coating). Nach Abwaschen loser Antikörper und Blockierung freier Proteinbindungsstellen wurden eine Standardverdünnungsreihe und die zu untersuchenden Proben in verschiedenen Verdünnungsreihen auf die beschichteten Platten gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Alle Proben wurden 3-fach pipettiert. Das zu bestimmende in den Proben enthaltene Protein bindet an die Antikörper. Nach Waschung der Platte wurde ein biotinylierter Detektionsantikörper mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase

(horseradish peroxidase) hinzugegeben und für weitere zwei Stunden inkubiert, während der der Detektionsantikörper an die Antikörper-Protein-Komplexe bindet. Nach Waschung der Platte wurden die an die Antikörper-Protein-Komplexe gebundenen Detektionsantikörper durch Reaktion mit 100 µl/well 3,3',5,5'Tetramethylbenzidin sichtbar gemacht. Nach ausreichender Intensität der Farbreaktion wurde diese durch Zugabe von 100 µl/well H₂SO₄ nach 15-30 Minuten beendet. Im Anschluss erfolgte mittels ELISA-Reader eine Messung der Absorption bei 450 nm, die proportional zur Konzentration des Proteins in den gesuchten Proben ist. Anhand der Standardverdünnungsreihe mit bekannter Proteinkonzentration konnte die Konzentration des zu bestimmenden Proteins für die entsprechenden Proben berechnet werden. Stand keine bekannte Proteinkonzentration zur Verfügung wurden optische Dichten verwendet.

Tabelle 9 Coating-Protokoll

| | Albumin | IgG | Rheumafaktor | Anti-Sm | Anti-U1snRNP |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------------|
| Antikörper-Coating (100 µl/well) mit 0,05 M Carbonat- Bicarbonat-Puffer bei 4 °C über Nacht | 1:10 000 Purified Anti- Mouse-Albumin | 1:100 Goat Anti- Mouse IgG (heavy and light chain) | 10 µg/ml Unconjugated Rabbit IgG (heavy and light chain) | 1:250 5 mg/ml Smith antigen | 1:800 0,774 mg/ml RNP-Sm antigen |
| Standard | Mouse Albumin Standard (Mouse Reference Serum, RS10- 101, Bethyl, Montgomery, Texas US) | Mouse IgG Standard (Mouse Reference Serum, RS10-101, Bethyl, Montgomery, Texas US) | Serum einer festgelegten Referenz-C57BL/6- Maus 10 Monate nach Pristaninjektion | | |
| Detektionsantikörper (100 µl/well) | 1:10 000 | 1:50 000 | 1:500 | 1:50 000 | 1:50 000 |
| | HRP-Goat Anti- Mouse Albumin | HRP-Goat Anti-Mouse IgG | | | |

2.4.2 AUFBEREITUNG DER LAVAGEFLÜSSIGKEIT ZUR ANALYSE IM DURCHFLUSSZYTOMETER

Die Lavageflüssigkeit wurde zur Quantifizierung der Apoptose und Charakterisierung der Leukozytensubpopulationen für die Durchflusszytometrie vorbereitet. 400 µl des Pellets wurden zwei Mal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen und der Überstand nach 5-minütiger

Zentrifugation (100 g) bei 4 °C verworfen. Anschließend wurden die Zellen auf 2 Mio./100 µl mit FACS-Puffer verdünnt. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden jeweils 5 µl mit Ratten- und Mausserum hinzugegeben und für 10 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 1,4 µl des jeweiligen Antikörpers und Licht-geschützte Inkubation auf Eis über 60 min. CD45 ist eine Tyrosinphosphatase, die auf allen Leukozyten gefunden werden kann. Zur Bestimmung der Grundgesamtheit der Leukozyten erfolgte eine Färbung mit CD45 (Cyc-PE). Granulozyten wurden mit CD45 (Cyc-PE), CD11b (PE) und Ly6G (FITC) identifiziert. F4/80 ist ein Oberflächenantigen von Makrophagen. CD11b, auch bekannt als Integrin α M, ist ein Oberflächenantigen und vermittelt Leukozytenadhäsion und -migration innerhalb von Entzündungsprozessen. CD11c ist ein Typ I Membranprotein, das vor allem auf dendritischen Zellen exprimiert wird. Makrophagen wurden daher mit CD45 (Cyc-PE), CD11b (PE) und F4/80 (APC) markiert. Dendritische Zellen erhielten eine Färbung mit CD45 (Cyc-PE), CD11b (PE) und CD11c (FITC). Zur späteren Kompensation der einzelnen Fluorochrome erfolgten zusätzliche Einzelfärbungen. Es wurde ein letzter Waschvorgang mit FACS-Puffer durchgeführt.

Der restliche Teil der Zellen wurde mit 1 x Binding-Puffer des Annexin-Kits verdünnt und dann mit jeweils 5 µl FITC-Annexin und Propidiumiodid für 25 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um den Anteil apoptotischer Zellen zu bestimmen. Phosphatidylserin ist ein Bestandteil der Zellinnenmembran. Im Rahmen der Apoptose transloziert Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran. Das Protein Annexin kann dann das Lipid Phosphatidylserin bei Exposition binden. Um apoptotische von nekrotischen Zellen zu differenzieren, erfolgte eine zusätzliche Färbung mit Propidiumiodid. Dieser Farbstoff kann nur die perforierte Zellwand nekrotischer Zellen durchdringen. Lebende Zellen sind durch einen Annexin und Propidiumiodid negativen Status gekennzeichnet. Apoptotische Zellen sind Annexin positiv, aber Propidiumiodid negativ. Nekrotische Zellen weisen eine Annexin- und Propidiumiodid-positive Färbung auf.

2.4.3 AUFBEREITUNG VON MILZZELLEN ZUR ANALYSE IM DURCHFLUSSZYTOMETER

Zur Vorbereitung des Milzgewebes für die Durchflusszytometrie wurde die Milz im Ganzen durch einen 70 µm Filter unter Zuhilfenahme von PBS passiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS wurde die Suspension zur Lyse der Erythrozyten bei 37 °C für 5 min mit TAC-Puffer inkubiert. Anschließend wurde die Lyse mittels MACS-Puffer gestoppt und die Suspension erneut gefiltert und mit FACS-Puffer gewaschen. Zur Quantifizierung wurden 100 µl counting

beads auf die Milzzellsuspension gegeben. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurden, wie bei der Aufbereitung der Nierenzellen, 5 µl Ratten- und Mausserum zu 100 µl der Zellsuspension im FACS-Röhrchen hinzugegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte zur Färbung die einstündige Inkubation mit Fluorchrommarkierten Antikörpern (1,4 µl) und das mehrmalige Waschen mit FACS-Puffer. Lymphozyten wurden mit CD3e (FITC) markiert. Zytotoxische T-Zellen wurden durch Färbung mit CD3e (FITC) und CD8 (Cyc) erkannt. T-Helferzellen wurden durch Färbung mit CD3e (FITC) und CD4 (APC), B-Zellen wurden durch Färbung mit B220 (PE) identifiziert. Zudem markierten wir aktivierte T-Helferzellen mit CD4 (APC) und CD25 (PERP), sowie aktivierte dendritische Zellen mit CD11c (PE) und CD40 (FITC). CD40 ist ein Oberflächenantigen, welches zur Antigenpräsentation dient und im hämatopoetischen System auf dendritischen Zellen, B-Zellen und Makrophagen gefunden werden kann. Es erfolgten abermals zusätzliche Färbungen zur späteren Kompensation der einzelnen Fluorochrome mittels Isotyp CD40. Bei 5 Wildtyptieren, 8 TNFR1^{-/-} Tieren, 5 TNFR2^{-/-} Tieren und 8 TNFR1^{-/-};2^{-/-} Tieren wurden zur Milzzellsuspension zur Quantifizierung der Zellzahlen 100 µl counting beads hinzugegeben.

2.4.4 AUFBEREITUNG VON NIERENZELLEN ZUR ANALYSE IM DURCHFLUSSZYTOMETER

Zur Analyse der infiltrierenden Leukozyten in der Niere wurde diese für die Durchflusszytometrie aufbereitet. Nach Zerkleinerung des Nierengewebes in Paris-Puffer erfolgte nach Abzentrifugation ein Waschvorgang mit HBSS (mit Ca, Mg). Im Anschluss wurde das Gewebe durch Zugabe von Kollagenase und DNase für 20min bei 37 °C angedaut. Nach zwei weiteren Waschvorgängen mit HBSS (mit Ca, Mg) wurde die Suspension mit 2 mM EDTA für 20 min bei 37 °C inkubiert. Nach Abzentrifugation wurde das Gewebe erneut für 20 min bei 37 °C mittels Kollagenase angedaut. Zur Herstellung einer Einzelzellsuspension wurde das Gewebe mehrmals durch eine 20 G, 26 G und 30 G-Kanüle gespritzt. Es erfolgte ein erneuter Waschvorgang mit DPBS. Das Zellpellet wurde schließlich in 1 ml FACS-Puffer gelöst, durch 70 µm Cell Strainer gefiltert und anschließend erneut mit DPBS gewaschen. Danach wurde das Pellet in 200 µl FACS-Puffer suspendiert. Zur Blockade unspezifischer Bindungen wurde 5 µl Ratten- und Mausserum zu 100 µl der Zellsuspension im FACS-Röhrchen hinzugegeben und für 10min bei Raumtemperatur inkubiert. Hinterher wurden die Proben mit Fluorchrommarkierten Antikörpern (1,4 µl) gefärbt, für 60 min inkubiert und mehrmals mit FACS-Puffer gewaschen. Leukozyten wurden mit CD45 (PE) markiert. Die Lymphozytenpopulation durch CD45 (PE) und CD3 (FITC) identifiziert. T-Helferzellen wurden mit CD45 (PE), CD3 (FITC) und CD4 (APC) angefärbt, zytotoxische T-Zellen mit CD45 (PE), CD3 (FITC) und CD8 (Cyc).

Zur Erkennung von Makrophagen wurden CD45 (PE) und F4/80 (APC) verwendet, für dendritische Zellen CD 45 (PE) und CD11c (FITC). Es wurden zusätzliche Färbungen zur späteren Kompensation der einzelnen Fluorochrome mittels Isotypen CD11c und F4/80 hergestellt.

2.4.5 ANALYSE IMMUNOLOGISCHER OBERFLÄCHENMARKER IM DURCHFLUSSZYTOMETER

Mittels Durchflusszytometer konnten Zellen anhand von Größe, Struktur und markierten Oberflächeneigenschaften charakterisiert werden. Eine zuvor mittels an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelte Antikörper spezifisch eingefärbte Zellsuspension wurde über einen dünnen Flüssigkeitsstrom an einem Laser vorbeigeführt. Die Fluoreszenzfarbstoffe (FITC, PE, PE.Cy5, APC, etc.) wurden durch den Laser angeregt und emittierten Licht einer spezifischen Wellenlänge. Dieses wurde vom Durchflusszytometer (FACSCalibur) registriert. Da sich die Emissionswellen der Fluoreszenzfarbstoffe teilweise überschneiden, wurden Kompensationseinstellungen benutzt. Über Einzelfärbungen der Fluoreszenzfarbstoffe war es möglich, den Anteil der in andere Kanäle einstreudenden Emissionen abzuziehen. Über den Forwardscatter des Durchflusszytometers ließ sich zusätzlich die Größe einer Zelle bestimmen, über den Sidewardscatter die Granularität der Zelle. Die Auswertung erfolgte mittels CellQuest Software.

2.5 MORPHOLOGISCHE UND HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die Herstellung der histologischen Schnitte erfolgte durch die MTAs Janina Mandelbaum und Dan Draganovici.

2.5.1 BESCHICHTEN DER OBJEKTTRÄGER

Zur morphologischen Untersuchung der Gewebe wurden Schnitte angefertigt. Um einem Abtragen der Gewebeschnitte während den Färbungsvorgängen vorzubeugen, musste zuvor eine Beschichtung der Objektträger erfolgen. Hierfür wurden die Objektträger nach zweimaligem 5-minütigem Bad in Azeton für weitere fünf Minuten mit einer 3-Aminopropyltriethoxysilan-Lösung behandelt. Anschließend wurden sie mit entmineralisiertem Wasser gespült, über Nacht getrocknet und bei Raumtemperatur trocken gelagert.

2.5.2 HERSTELLEN VON GEWEBESCHNITTEN

Mittels eines Rotationsmikrotoms wurden 4 µm dünne Paraffinschnitte angefertigt. Über ein Wasserbad (40 °C bis 42 °C) wurden diese auf 3-Aminopropyltriethoxysilan-beschichtete

Objektträger überführt. Über Nacht wurden die Paraffinschnitte im Wärmeschrank (60 °C) getrocknet und anschließend bei Raumtemperatur gelagert.

2.5.3 ENTPARAFFINIEREN DER GEWEBESCHNITTE

Damit sich die hydrophilen Farbstoffe der nachfolgenden Färbungen im Gewebe anreichern können, erfolgte die Entparaffinierung der Gewebeschnitte in einer absteigenden Alkoholreihe nach folgendem Protokoll.

| | | | |
|------|---------|---------|-------|
| 24,0 | Minuten | Xylol | |
| 3,0 | Minuten | Ethanol | 100 % |
| 1,5 | Minuten | Ethanol | 96 % |
| 0,5 | Minuten | Ethanol | 70 % |
| 0,5 | Minuten | Ethanol | 50 % |

Anschließend wurden die Schnitte in entmineralisiertem Wasser gebadet.

2.5.4 FÄRBUNG

2.5.4.1 PERIODIC-ACID-SCHIFF-FÄRBUNG (PAS-FÄRBUNG)

Durch wässrige Perjodsäure werden bei der PAS-Färbung nicht substituierte 1,2-Glykol-Gruppen zu Aldehyden aufgespalten und oxidiert. Diese lassen sich mit fuchsinschwefliger Säure (Schiff-Reagens) anhand der Bildung eines roten basischen Farbstoffes darstellen. Dadurch gelingt der Nachweis von (Muco-)Polysacchariden, Muco- und Glucoproteiden, sowie Gluco- und Phospholipiden. Diese Substanzen sind Bestandteile unter anderem von Kollagen, Basalmembranen, Zellwänden und Muzinen.

Die entparaffinierten Schnitte des Nieren-, Lungen-, Milz- und Granulomgewebes werden zunächst für 10 Minuten durch ein Bad in 1%iger Perjodsäure (1g Perjodsäure in 100ml Aqua dest.) oxidiert. Anschließend werden sie mit entmineralisiertem Wasser gespült und für 3 bis 5 Minuten in Schiff'sche Reagenz (40ml Schiff'sche Reagenz in 60ml Aqua dest.) getaucht. Nach einer Minute Spülung mit Sulfitwasser (10ml 10%ige Natriumbisulfit-Lösung und 10ml HCl 1M in 200ml Aqua dest.) werden die Schnitte 10 Minuten gewässert und dann mit Hämalaun gegengefärbt. Erneut folgt eine Spülung.

2.5.4.2 IMMUNHISTOLOGIE

Für die beiden hier verwendeten Immunfärbemethoden wurde die Avidin-Biotin-Methode verwendet. Ein unmarkierter Primärantikörper bindet die nachzuweisenden Antigene. Die F_c-Region des Primärantikörpers wird spezifisch von einem Sekundärantikörper gebunden,

welcher mit einem Biotinmolekül gekoppelt ist. Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex lagert sich mit seinen freien Avidin-Bindungsstellen an den Sekundärantikörper an. Chromogen AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol) wird durch die Peroxidase in einen sichtbaren Farbkomplex überführt.

Nach Antigenfreilegung und der Blockierung falsch-positiver endogener Substanzen wurde das Nieren- und Granulomgewebe mit 20 µl des entsprechend verdünnten Primärantiköpers (Anti-Ratten-CD3; Anti-Ratten-F4/80) ca. eine Stunde inkubiert. Nach Spülen mit PBS folgte eine Inkubation mit 20 µl des Sekundärantikörpers. Einem weiteren Spülen mit PBS schloss sich eine 30-minütige Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Avidin-Biotin-Komplex an. Nach Hinzufügen des Chromogens AEC und Kontrolle der Färbung unter dem Mikroskop wurde die Reaktion bei gewünschter Intensität mittels PBS gestoppt. Nach 10 Minuten erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalanlösung. Nach 30 Sekunden erfolgte ein Waschen der Schnitte mit Leitungswasser. Nach Fixierung mit Aquate wurden die Schnitte mit Deckgläschen konserviert.

2.5.5 DEHYDRIERUNG VON GEWEBESCHNITTEN

Zur Herstellung eines optisch homogenen Dauerpräparates nach Behandlung mit den wässrigen Farblösungen wurde eine Entwässerung der Gewebeschnitte. Hier kam die aufsteigende Alkoholreihe zur Anwendung:

| | | | |
|-----|---------|---------|------|
| 0,5 | Minuten | Ethanol | 50% |
| 0,5 | Minuten | Ethanol | 70% |
| 1,5 | Minuten | Ethanol | 96% |
| 3,0 | Minuten | Ethanol | 100% |

Bis zur endgültigen Konservierung mit Deckgläschen wurden die Gewebeschnitte in Xylol gelagert.

2.5.6 MORPHOMETRISCHE AUSWERTUNG

Zur Quantifizierung des renalen Schadens in der PAS-Färbung wurde der Aktivitätsindex nach Austin et. Al. (95) verwendet (Tabelle 10).

Tabelle 10: Aktivitätsindex nach Austin et al. (95)

| Kriterium | 1+ | 2+ | 3+ |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------|---------------------|
| Glomeruläre Zellproliferation (Verlust des Zirkulationsraumes aufgrund von segmentalen (oder globalen) proliferativen Veränderungen) | < 25% | 25% - 50% | > 50% |
| Leukozytenexsudation (Exsudation \geq 2 polymorphonukleären Leukozyten/Glomerulum) | mild | moderat | exzessiv |
| Karyorrhesis (pyknotische und fragmentierte Kerne) und fibrinoide Nekrose (Eosinophiles Material in verfestigten Glomeruli-Segmenten) (x Faktor 2) | < 25% der Glomeruli | 25-50% der Glomeruli | > 50% der Glomeruli |
| Zelluläre Ablagerungen (x Faktor 2) | < 25% der Glomeruli | 25-50% der Glomeruli | > 50% der Glomeruli |
| Hyaline Ablagerungen (Eosinophiles homogenese Material entlang der luminalen Oberfläche der glomerulären Kapillären) | wenig | moderat | exzessiv |
| Interstitielle Entzündung (Infiltration mononukleärer Zellen (Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen) in den interstitiellen Raum) | mild | moderat | exzessiv |

Zur Quantifizierung der Lymphozytenpopulationen wurden 20 zufällig ausgewählte Glomeruli bzw. Gesichtsfelder der Nierenrindenregion der CD3-gefärbten Gewebeschnitte bei 400-facher Vergrößerung fotografiert und die markierten Lymphozyten gezählt. Ebenso wurde mit den histologischen Schnitten des Lungengewebes verfahren.

Zur Quantifizierung der Makrophagenpopulation wurden 15 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder der F4/80-gefärbten Gewebeschnitte bei 400-facher Vergrößerung fotografiert und die markierten Makrophagen gezählt.

Die Auswertung erfolgte in allen Fällen verblindet.

2.5.7 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mittels SPSS. Zur Berechnung der statistischen Signifikanz wurde im Falle des Vergleichs der Pristangruppe mit der PBS-Gruppe zunächst ein Shapiro-Wilk-Test zur Prüfung der Normalverteilung

angewendet. Bei nicht vorliegender Normalverteilung wurde im Anschluss ein U-Test für unabhängige Stichproben durchgeführt. Wurden mehr als zwei Stichproben getestet, wurde zur Prüfung der Hypothese, dass es keinen Unterschied zwischen den Genotypen gibt, bei Vorliegen von nicht verbundenen, unabhängigen Variablen ein Kruskal-Wallis-Test angewendet. Bei Ablehnen der Nullhypothese wurde anschließend nach Prüfung der Varianzhomogenität durch den Levene-Test bei Vorliegen leicht unterschiedlicher Gruppengrößen bei Varianzgleichheit als Posthoc-Test ein Bonferroni-Test durchgeführt, im Falle einer nicht vorliegenden Varianzgleichheit ein Dunnett-T3-Test durchgeführt. Kategoriale Variablen wurden mit dem Chi-Quadrat-Test untersucht. Ein p-Wert von $p < 0,05$ bzw. $p < 0,01$ wurde als signifikant angenommen und entsprechend mit * oder ** gekennzeichnet. Überlebenszeitanalysen wurden mittels Kaplan-Meier-Kurven dargestellt und signifikante Unterschiede mittels Log Rank-, Breslow- und Tarone Ware-Test überprüft.

3 ERGEBNISSE

3.1 CHARAKTERISIERUNG DES PRISTAN-INDUZIERTEN SLE-MODELLS IN WILDPTYTIEREN

Zur Induktion eines SLE-artigen Krankheitsbildes war 14 weiblichen C57/B6 Wildtyp-Mäusen im Alter von 3 Monaten 0,5 ml Pristan intraperitoneal injiziert worden. Zur Kontrolle injizierten wir 6 weiblichen C57/B6 Wildtyp-Mäusen 0,5 ml PBS. Im Alter von 10 Monaten wurde der Corpus eröffnet, auf Ausbildung von Granulomen als Zeichen einer induzierten intraperitonealen Entzündung untersucht und nach im Methodenteil vorgestelltem Scoresystem klassifiziert. In der PBS-Gruppe konnte keine Granulombildung nachgewiesen werden, hingegen fanden sich bei 93,3 % der Pristan-injizierten Wildtypmäuse Granulome (Abbildung 10). Bevorzugt traten diese perihepatisch und subphrenal auf.

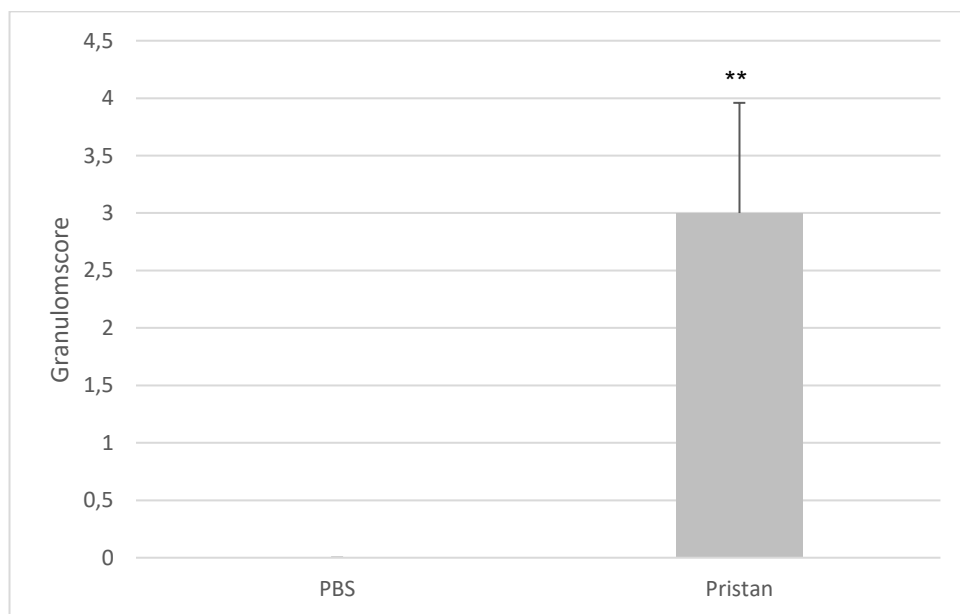


Abbildung 10: Darstellung der Mediane mit mittlerer absoluter Abweichung der erhobenen Granulomscores der PBS ($n = 6$) - und Pristan-Gruppe ($n = 14$) in Wildtyptieren. Nach im Methodenteil beschriebenen Granulomscore lag der Median bei 3, d.h. es zeigten sich ubiquitär Granulome. $p < 0,001$.

Beide Mausgruppen gediehen unter gleichen Haltungsbedingungen adäquat. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Gewichtskurve. Im Alter von 10 Monaten lag

das Gewicht der Mäuse in der Pristan-Gruppe (n = 12) im Durchschnitt bei 26,3 g, in der PBS-Gruppe (n = 6) bei 27,1 g (U-Test, p = 0,327). Des Weiteren wurden die Mäuse auf weitere typische Symptome einer SLE-Erkrankung untersucht, um die Induktion des Krankheitsbildes sicherzustellen. In beiden Mausgruppen ergaben sich keine klinischen Anhaltspunkte für eine Arthritis. Kutane Läsionen waren in keiner der PBS-Mäuse zu dokumentieren, wohingegen 27% der Pristan-Mäuse im Laufe der Erkrankung kutane Läsionen an Kopf oder Corpus entwickelten (Abbildung 11).

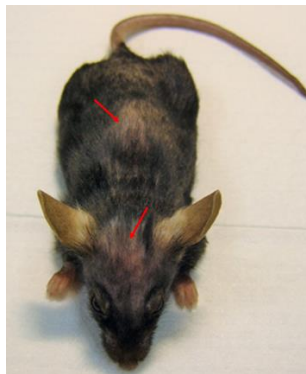


Abbildung 11: Hautläsionen bei Pristan behandelter Maus im Alter von 10 Monaten

Im Rahmen autoimmuner Prozesse wird häufig eine Splenomegalie beobachtet. Daher wurde das Milzgewicht der Mäuse im Alter von 10 Monaten bestimmt. Das durchschnittliche Milzgewicht der Pristan-Gruppe lag mit ca. 0,155 g signifikant über dem Durchschnittsgewicht der PBS-Gruppe (0,102 g) (Abbildung 12). 86 % der Mäuse der Pristan-Gruppe entwickelten eine Splenomegalie, welche definiert wurde als Milzgewicht > 105 mg (Abbildung 12). Dieser Wert setzt sich aus der Summe des Mittelwertes der PBS-Gruppe und ihrer Standardabweichung zusammen. Kein Tier der PBS-Gruppe entwickelte eine Splenomegalie.

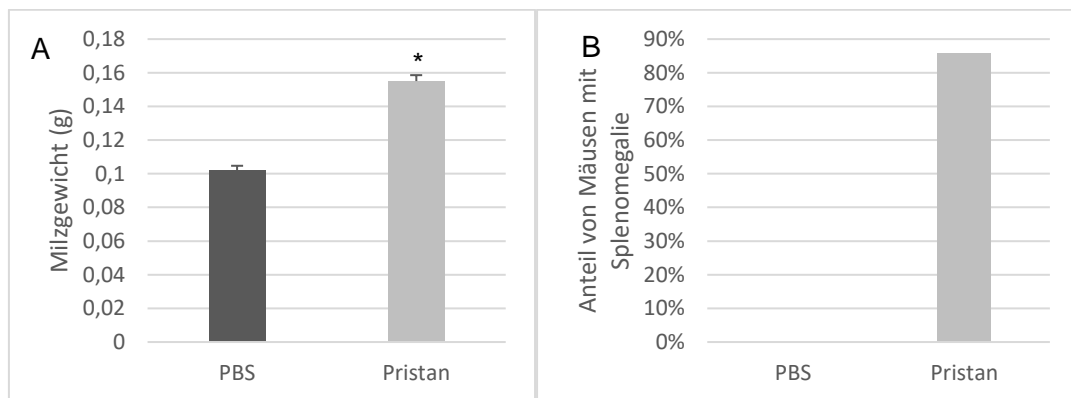


Abbildung 12: A Wildtypmäuse der Pristan-Gruppe ($n = 14$) zeigten ein signifikant erhöhtes Milzgewicht (g) im Alter von 10 Monaten verglichen mit Wildtypmäusen der PBS-Gruppe ($n = 6$); U-Test, $p = 0.012$. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler. B Anteil der Mäuse mit Splenomegalie von Tieren der PBS-Gruppe im Vergleich zur Pristangruppe.

Die Durchflusszytometrie ergab einen erhöhten relativen Anteil Milz infiltrierender B-Zellen für Tiere der Pristan-Gruppe. Der Anteil zytotoxischer T-Zellen waren in Milzen der Pristangruppe geringer, dafür zeigte sich ein erhöhter Anteil von regulatorischen T-Helferzellen in den Milzen der Pristangruppe im Vergleich zur PBS-Gruppe. Unterschiede hinsichtlich der Infiltration von dendritischen Zellen ergaben sich nicht (Abbildungen 13 und 14).

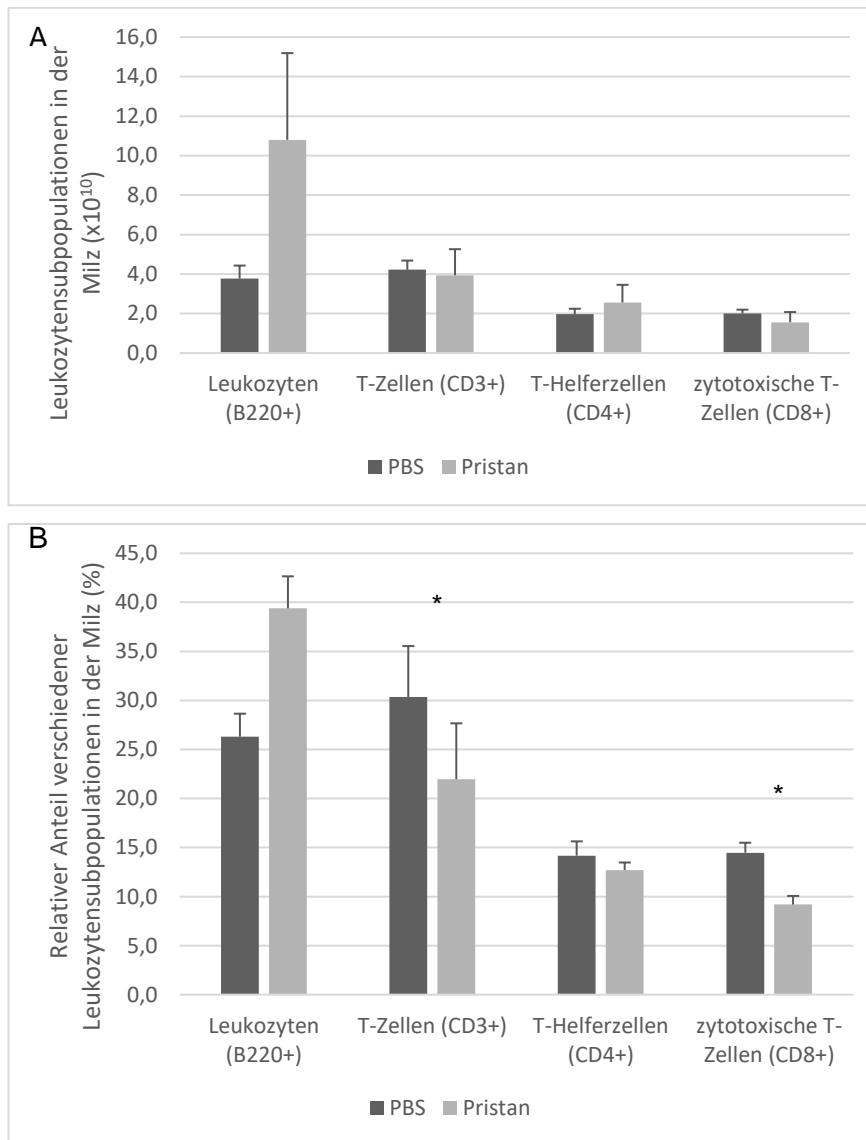


Abbildung 13: A Absolute Anzahl von verschiedenen Leukozytensubpopulationen in der Milz von Mäusen der Pristan-Gruppe ($n = 14$) und PBS-Gruppe ($n = 6$). Der U-Test ergibt keine signifikanten Unterschiede für B-Zellen ($p = 0,126$), T-Zellen ($p = 0,537$), T-Helferzellen ($p = 0,931$) und zytotoxische Zellen ($p = 0,429$). B Relativer Anteil von verschiedenen Leukozytensubpopulationen in der Milz von Mäusen der Pristan-Gruppe ($n = 14$) und PBS-Gruppe ($n = 6$). Der U-Test ergibt signifikante Unterschiede für B-Zellen ($p = 0,005$), T-Zellen ($p = 0,009$) und zytotoxische Zellen ($p = 0,003$). Es sind keine Unterschiede für T-Helferzellen nachweisbar ($p = 0,397$). Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler.

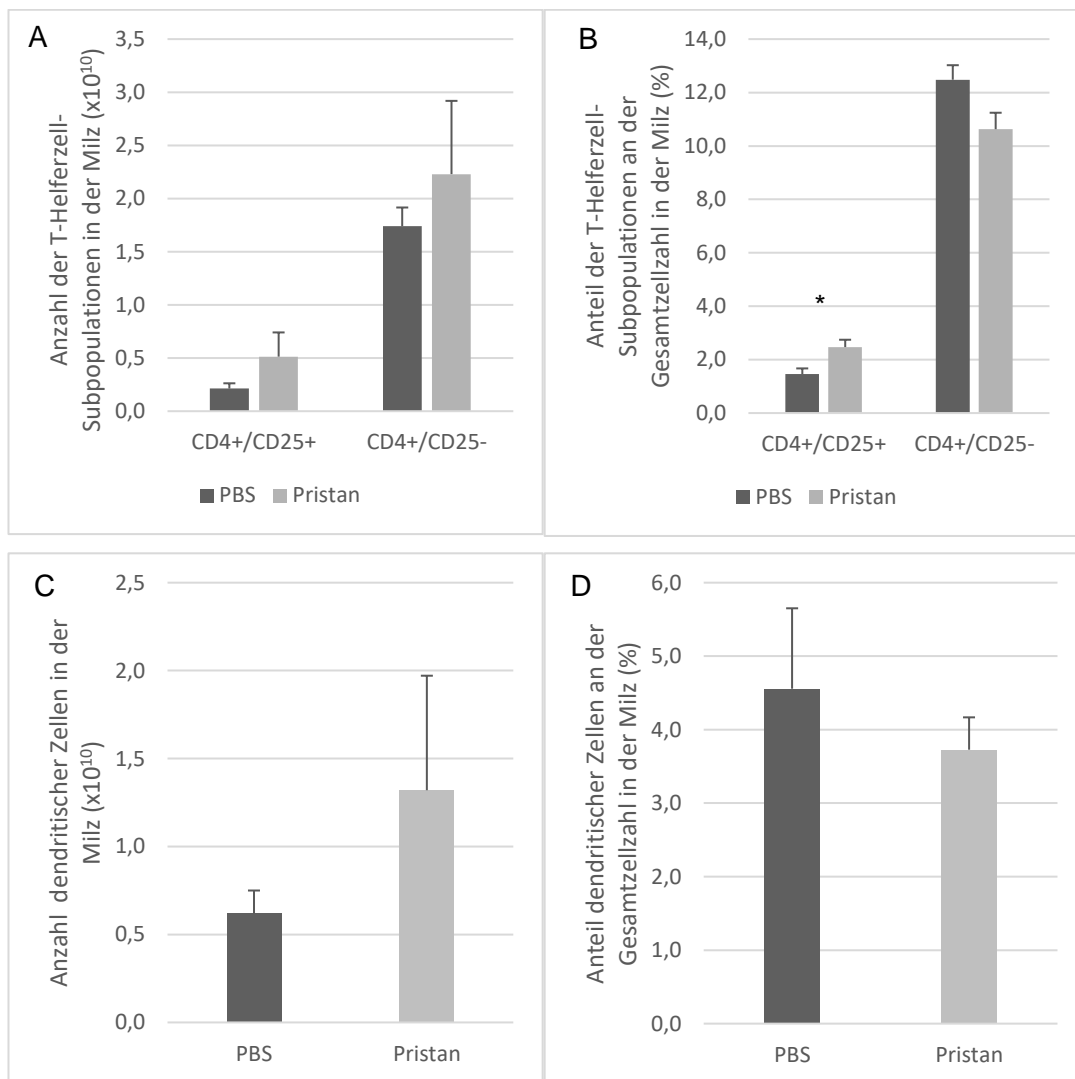


Abbildung 14: A Absolute Anzahl von Milz infiltrierenden T-Helferzellen für Mäuse der Pristan-Gruppe (n = 14) und PBS-Gruppe (n = 6). Der U-Test ergibt keine signifikanten Unterschiede für regulatorische CD4+/CD25+-T-Helferzellen (p = 0,429) sowie für CD4+/CD25- T-Helferzellen (p = 1). B Relativer Anteil Milz infiltrierender regulatorischer T-Helferzellen für Mäuse der Pristan-Gruppe (n = 14) und PBS-Gruppe (n = 6). Der U-Test ergibt signifikante Unterschiede für regulatorische CD4+/CD25+ T-Helferzellen (p = 0,009). Es sind keine Unterschiede für CD4+/CD25- T-Helferzellen nachweisbar (p = 0,109). C Absolute Anzahl von Milz infiltrierenden dendritischen Zellen für Mäuse der Pristan-Gruppe (n = 14) und PBS-Gruppe (n = 6). Der U-Test ergibt keine signifikanten Unterschiede für dendritische Zellen (p = 1). D Relativer Anteil Milz infiltrierender dendritischer Zellen für Mäuse der Pristan-Gruppe (n = 14) und PBS-Gruppe (n = 6). Der U-Test ergibt keine signifikanten Unterschiede für regulatorische dendritische Zellen (p = 0,602). Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler.

Eine relevante Hypergammaglobulinämie konnte dagegen in unserer Versuchsreihe nicht eindeutig nachgewiesen werden (Abbildung 15A). 25 % der Pristan-Mäuse (n = 12) und 20% der PBS-Tiere (n = 5) entwickelten eine Hypergammaglobulinämie, die als Wert > 362 µg/ml

definiert wurde. Dies entspricht der Summe des Mittelwertes der PBS-Gruppe und ihrer Standardabweichung. Der mittels ELISA gemessene IgG-Wert betrug in der PBS-Gruppe (n = 5) im Schnitt 204,2 µg/ml, in der Pristangruppe (n = 11) 380,2 µg/ml (Abbildung 15), dieser Unterschied war nicht signifikant. Es ergab sich ebenso kein signifikanter Unterschied für die Ausbildung eines Rheumafaktors (RF) (U-Test, p = 0,072) (Abbildung 15B). 54% der Pristan-Mäuse (n = 13) und 0% der PBS-Tiere (n = 5) entwickelten erhöhte RF-Werte im ELISA, die als Wert > 0,61 Optische Dichte im ELISA definiert wurde. Dies entspricht der Summe des Mittelwertes der PBS-Gruppe und ihrer Standardabweichung. Die mittels ELISA gemessene Optische Dichte der Messung von Sm im Blut betrug in der PBS-Gruppe (n = 5) im Mittel 0,04, in der Pristangruppe (n = 12) 0,18 (Abbildung 15C). Im U-Test war dieser Unterschied bei einem p-Wert von 0,014 signifikant. 83% der Pristan-Mäuse und 20% der PBS-Mäuse entwickelten erhöhte Sm-Werte im ELISA, die als Wert > 0,07 Optische Dichte im ELISA definiert wurden.

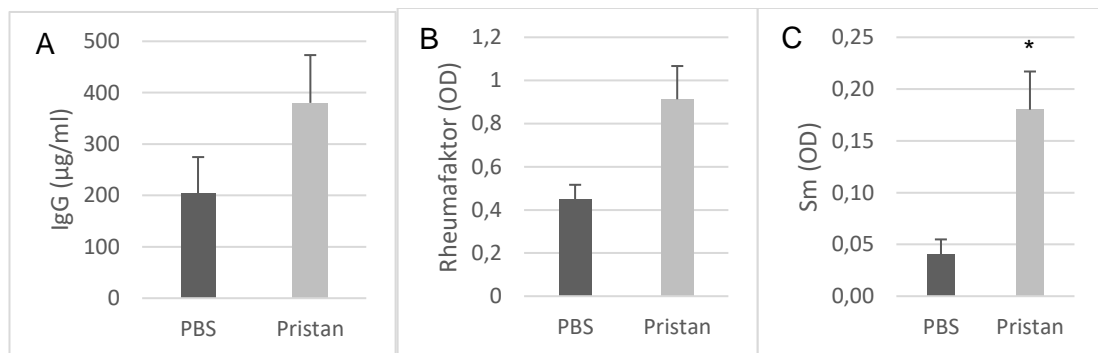


Abbildung 15: A Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Immunglobulinkonzentrationen (µg/ml) im Serum von Wildtyp-Tieren der Pristangruppe (n = 11) im Vergleich zur PBS-Gruppe (n = 5) im Alter von 10 Monaten; U-Test, p = 0,510. B Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Ausbildung eines Rheumafaktors (µg/ml) im Serum von Wildtyp-Tieren der Pristangruppe (n = 13) im Vergleich zur PBS-Gruppe (n = 6) im Alter von 10 Monaten; U-Test, p = 0,072. C Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied bei der Ausbildung von Antikörpern gegen Sm mit erhöhten Werten in der Pristangruppe im Serum von Wildtyp-Tieren der Pristangruppe (n = 12) im Vergleich zur PBS-Gruppe (n = 5); U-Test, p = 0,014.

In den Lungen fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich einer Leukozyteninfiltration in der PBS-Gruppe ($24,6 \pm 5,6$ Leukozyten/Gesichtsfeld; n = 6) im Vergleich zur Pristan-Gruppe ($27,4 \pm 19,8$ Zellen/Gesichtsfeld; n = 14) (U-Test, p = 0,841) (Abbildung 16).

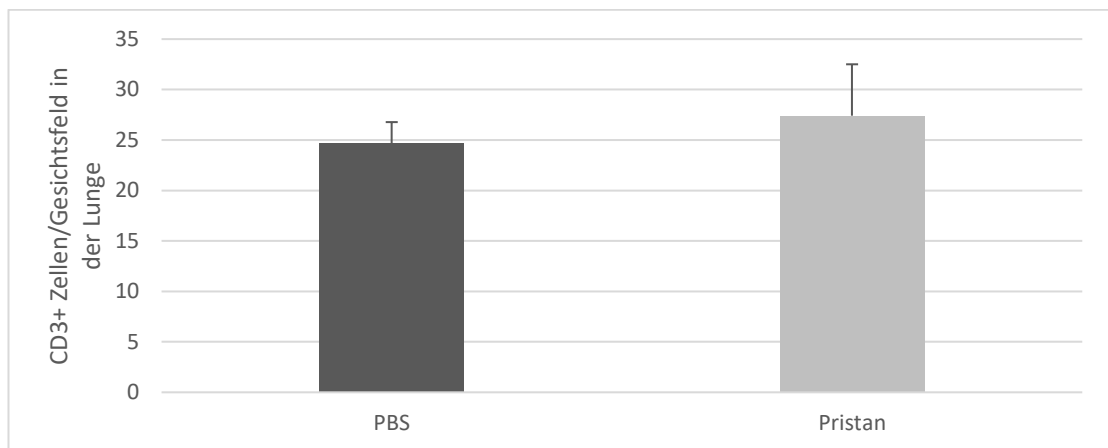


Abbildung 16: CD3+ Zellen/Gesichtsfeld in der Lunge. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Wildtyp-Tieren der Pristangruppe (n = 14) im Vergleich zur PBS-Gruppe (n = 6) im Alter von 10 Monaten; U-Test, $p = 0.841$. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler.

Die Albuminurie lag im Mittel bei 29,4 $\mu\text{g}/\text{mg}$ Albumin/Kreatinin in der PBS-Gruppe (n = 5) und bei 25,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ in der Pristan-Gruppe (n = 14). Eine relevante Albuminurie trat damit in der Interventionsgruppe nach zehn Monaten nicht auf (U-Test, $p = 0,754$) (Abbildung 17).

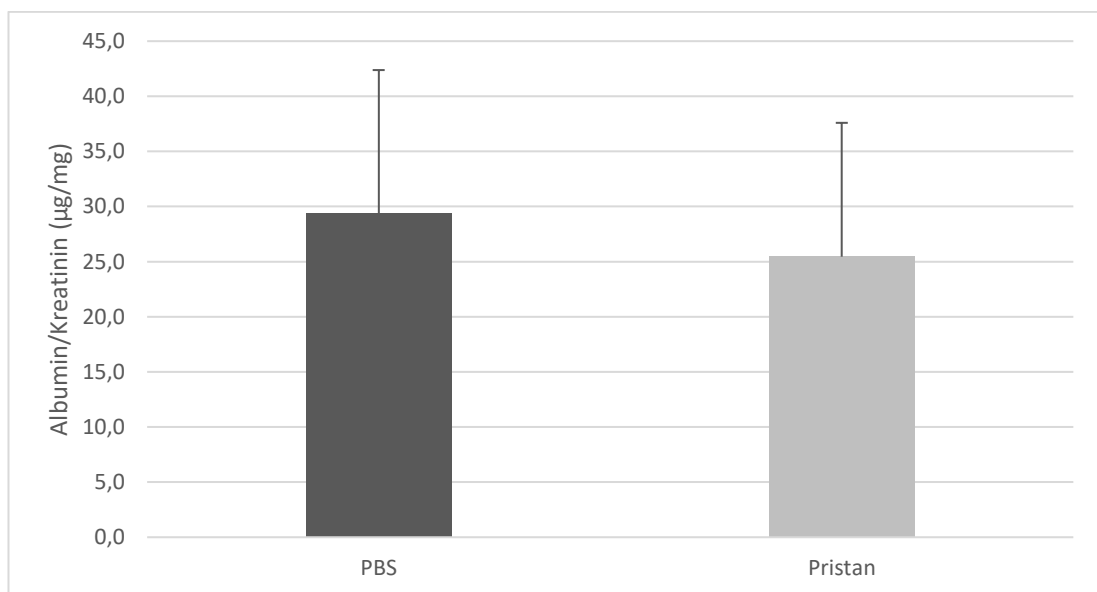


Abbildung 17: Mittelwert und Standardfehler der Proteinurie (Albumin/Kreatinin) in $\mu\text{g}/\text{mg}$ von Wildtyp-Tieren der Pristangruppe (n = 14) und der PBS-Gruppe (n = 5) im Alter von 10 Monaten. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede (U-Test, $p = 0,754$).

PAS-Färbung der Nieren der Pristan- (n = 14) und PBS-Gruppe (n = 5) ergaben nur bei zwei Tieren der Pristangruppe minimale pathologische Auffälligkeiten im Sinne weniger zellulärer Ablagerungen in einigen wenigen Glomeruli (Tabelle 11).

Tabelle 11 Beurteilung der Nieren (PAS-Färbung) nach dem Aktivitätsindex nach Austin et al. (95)

| | PBS (n = 14) | Pristan (n = 5) |
|-----------------------------------|--------------|-----------------|
| (Mittelwert ± Standardabweichung) | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,1 |

Als Zeichen der nephrogenen Autoimmunantwort wurde das Ausmaß der renalen Leukozytenakkumulation mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Hier ergab sich ein durchschnittlicher Anteil von 3,7% CD45-positiver Leukozyten an den Gesamtnierenzellen in der PBS-Gruppe (n = 6) und von 8,3% in der Pristangruppe (n = 14). Damit konnte eine signifikant erhöhte Leukozyteninfiltration in den Nieren der Pristan-behandelten Wildtyp-Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung 18).

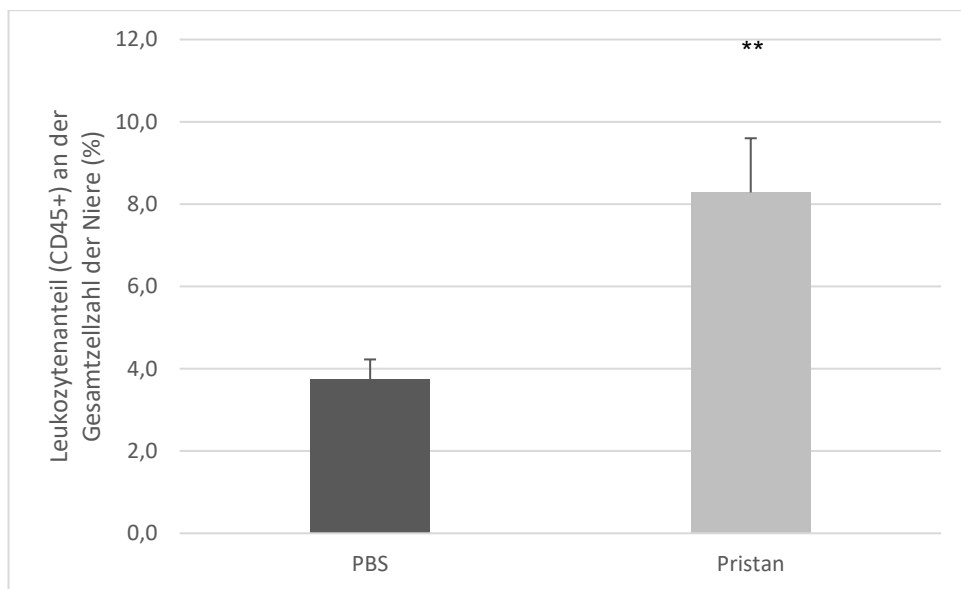


Abbildung 18: Mittels Durchflusszytometrie wurde der prozentuale Anteil von CD45+ Zellen in Nieren PBS- und Pristan behandelter Wildtyp-Mäuse im Alter von 10 Monaten bestimmt. Es zeigte sich ein hoch signifikanter Unterschied Leukozytenanteil an der Gesamtzellzahl der Niere (%) für die Pristan-Gruppe (n = 14) im Vergleich zur PBS-Gruppe (n = 6); U-Test, p=0.005. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler.

Zusammenfassend zeigten sich in den Pristan-behandelten Wildtyp-Mäusen zu Monat 10 die folgenden Manifestationen des Pristan-induzierten SLE (Abbildung 19): Peritoneale Granulome in 93%, Splenomegalie in 86%, kutane Effloreszenzen in 27% und vermehrte renale Leukozyteninfiltration (Durchflusszytometrie) in 79% sowie vermehrte glomeruläre

Leukozyteninfiltration (Histologie) in 57% der Pristan-Tiere im Vergleich zu den PBS-injizierten Kontrolltieren. Dagegen fand sich in den C57BL/6-Mäusen unserer Versuchsreihe keine signifikant vermehrte Hypergammaglobulinämie wie in der Literatur vorbeschrieben, aber ein vermehrtes Auftreten von Lupus-assoziierten Autoantikörpern wie Rheumafaktor und anti-Sm. In den Lungen fanden sich keine Unterschiede hinsichtlich einer Leukozyteninfiltration. Auch zeigten die Mäuse trotz vermehrter renaler Leukozyteninfiltration als Zeichen einer beginnenden Lupusnephritis keine signifikante Albuminurie oder einen histologischen Nierenschaden. Da entsprechend der Arbeitshypothese dieser Dissertation mit einem zum Teil verschlechterten Phänotyp des Pristan-induzierten SLE in TNFR-defizienten Mäusen gerechnet werden konnte, wurden trotz des relativ milden SLE-Phänotyps die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen von TNFR1-defizienten, TNFR2-defizienten und TNFR1/2-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in diesem Modell durchgeführt.

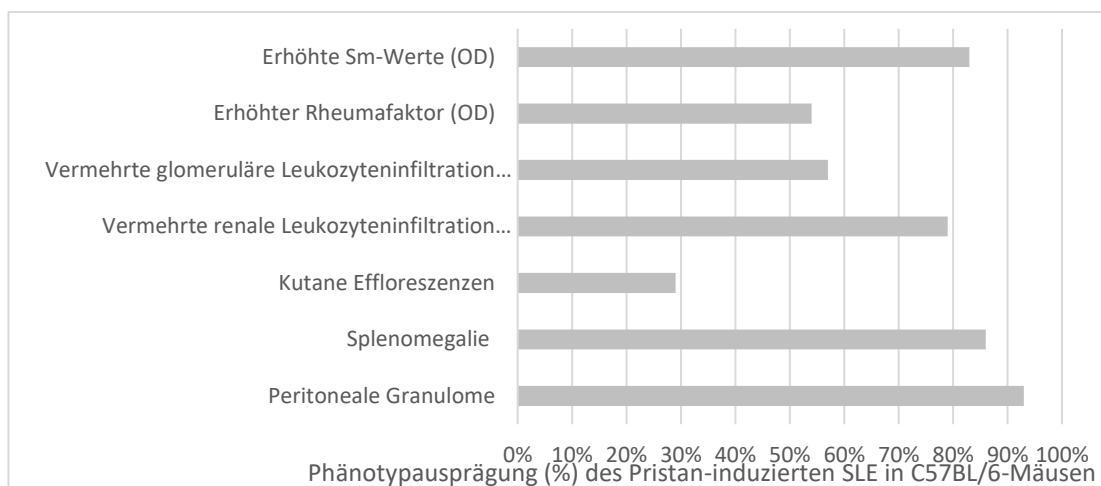


Abbildung 19: Darstellung des Anteils der jeweiligen Phänotypausprägung (Glomeruläre und renale Leukozyteninfiltration, kutane Effloreszenzen, erhöhte SM-AK-Bildung, vermehrte relative splenale Leukozyteninfiltration, Splenomegalie, peritoneale Granulome) der Wildtyptiere der Pristangruppe im Alter von 10 Monaten in %.

3.2 CHARAKTERISIERUNG DER FRÜHPHASE DES PRISTAN-INDUZIERTEN SLE AN WILDTYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Zur Untersuchung der Ausgangshypothese erfolgt der Phänotypvergleich von TNFR-defizienten Mäusen mit Wildtypmäusen im Modell des Pristan-induzierten SLE. Um die durch

die Pristaninjektion hervorgerufene Frühphase, die durch eine peritoneale Granulom-bildende intraperitoneale Entzündung gekennzeichnet ist, weiter zu charakterisieren, erfolgte einen Monat nach Pristaninjektion eine peritoneale Lavage. Die gewonnene Spülflüssigkeit wurde durchflusszytometrisch auf Apoptosevorgänge untersucht. Darüber hinaus erfolgte eine Charakterisierung des leukozytären Zellinhalts.

Die Gesamtzellzahl der Lavage war in TNFR1^{-/-} ($5,4 \times 10^4 \pm 3,7 \times 10^4$ Zellen/ μ l), TNFR2^{-/-} ($1,4 \times 10^4$ Zellen $\pm 7,2 \times 10^3$ Zellen/ μ l) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Mäusen ($1,4 \times 10^4 \pm 4,0 \times 10^3$ Zellen/ μ l) im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen ($3,1 \times 10^5 \pm 1,7 \times 10^5$) tendenziell erniedrigt; angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung. Aufgrund der starken Streuung in den Wildtyp-Tieren war dieser Unterschied jedoch nicht signifikant. In der peritonealen Lavage lagen in Wildtyptieren mit einem Anteil von 68,8% überwiegend vitale Annexin- und Propidiumiodid-negative Zellen vor. Zu nahezu gleichen Teilen fanden sich Annexin-positive, Propidiumiodid-negative apoptotische (16,3%) und Annexin- und Propidiumiodid-positive nekrotische Zellen (14,8%). Die untersuchten Genotypen zeigten keine signifikanten Unterschiede in den relativen Anteilen lebender Zellen ($p = 0,919$), apoptotischer Zellen ($p = 0,915$) und nekrotischer Zellen ($p = 0,861$) im Kruskal-Wallis-Test (Abbildung 20).

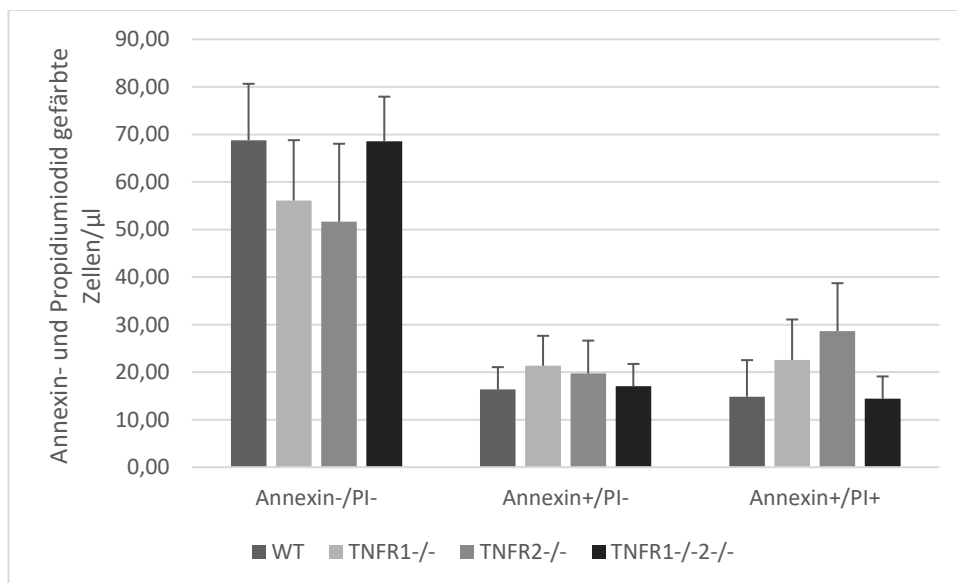


Abbildung 20: Annexin und Propidiumiodid gefärbte Zellen in der Peritoneallavage von WT ($n = 5$), TNFR1^{-/-} ($n = 7$), TNFR2^{-/-} ($n = 4$) und TNFR1^{-/-};2^{-/-}-Mäusen ($n = 4$). Darstellung in %: Es zeigen sich keine Unterschiede im relativen Anteil Annexin-/PI- lebender Zellen ($p = 0,916$), Annexin+/PI- apoptotischer Zellen ($p = 0,915$) und Annexin+/PI+ nekrotischer Zellen ($p = 0,861$) zwischen den untersuchten Genotypen im Kruskal-Wallis-Test. Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler.

Die infiltrierenden Leukozytenpopulationen in der Peritoneallavage wurden ebenfalls durchflusszytometrisch untersucht. Im Durchschnitt lag bei Wildtyptieren der Anteil der Neutrophilen an der Leukozytengesamtheit bei 31,7%, der Makrophagenanteil belief sich im Durchschnitt auf 6,1%, der Anteil der dendritischen Zellen auf 1,8%. Der Kruskal-Wallis-Test ergab keine Unterschiede für die einzelnen Genotypen in Bezug auf Anteil der Granulozyten ($p = 0,061$), Makrophagen ($p = 0,233$) oder dendritischen Zellen ($p = 0,531$) (Abbildung 21).

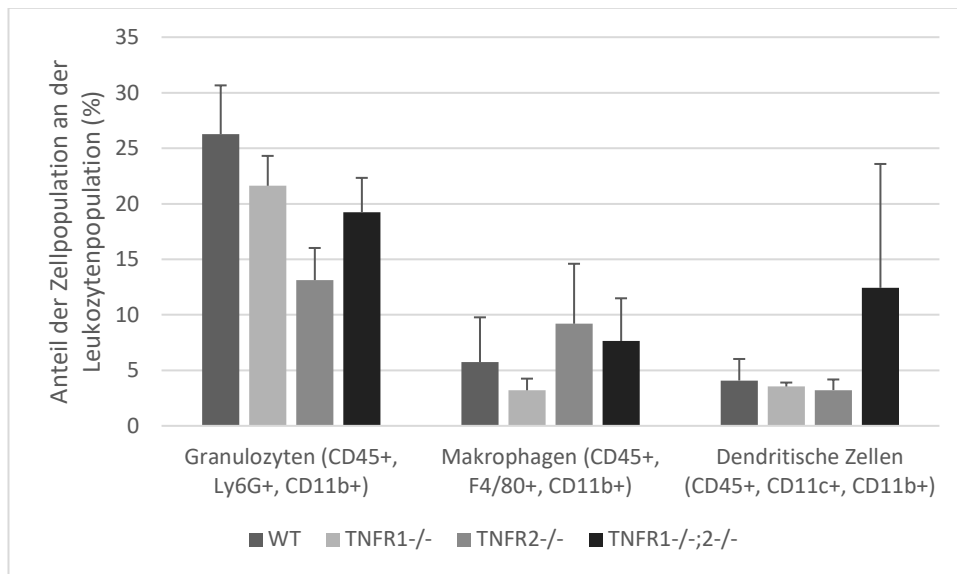


Abbildung 21: Darstellung der verschiedenen Leukozytenpopulationen in der Peritoneallavage von WT ($n = 7$), TNFR1^{-/-} ($n = 7$), TNFR2^{-/-} ($n = 5$) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Tieren ($n = 5$) einen 4 Wochen nach Injektion von Pristan. Für den relativen Anteil der Zellpopulationen an der Gesamtleukozytenpopulation fanden sich im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede (Neutrophilen $p = 0,061$, Makrophagen $p = 0,233$, dendritischen Zellen $p = 0,531$). Angegeben sind Mittelwert und Standardfehler.

Im weiteren Verlauf bildeten sich Granulome aus, wie bereits durch Reeves et al. 2009 (93) beschrieben. Hier zeigte sich in den Post-Hoc-Tests keine signifikanten Unterschiede zwischen TNFR-defizienten Tieren und der Wildtypkontrolle in der Ausprägung (Abbildung 22).

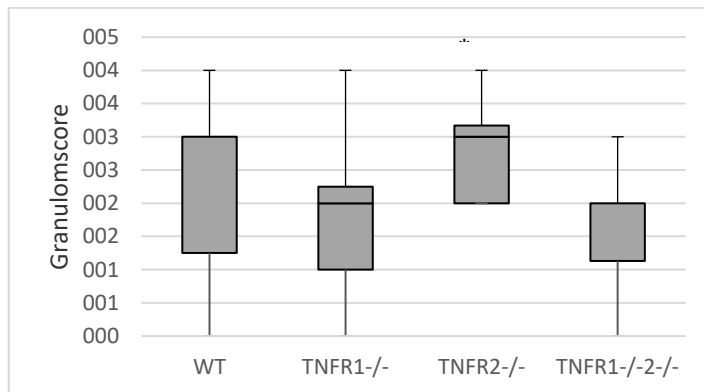


Abbildung 22: Boxplotdarstellung mit Minimum, Maximum, 1. Quartile, Median und 3. Quartile der Granulomausbildung im Alter von 10 Monaten für WT ($n = 14$), TNFR1^{-/-} ($n = 20$), TNFR2^{-/-} ($n = 12$) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} ($n = 14$). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Wildtypkontrolle.

Zusammenfassend weisen diese Daten auf eine in allen Genotypen ähnlich ablaufende initiale Immunantwort hin. Allerdings scheinen sowohl TNFR1 als auch TNFR 2 zur peritonealen Leukozyteninfiltration beizutragen, da im Vergleich zu Wildtyptieren die Zellzahl der Peritoneallavage in allen TNFR-defizienten Genotypen tendenziell vermindert war, ohne dass der relative Anteil apoptotischer oder nekrotischer Zellen Unterschiede aufwies.

3.3 CHARAKTERISIERUNG DER SPÄTPHASE DES PRISTAN-INDUZIERTEN SLE AN WILDTYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Nachdem in allen Genotypen eine vergleichbare initiale peritoneale Entzündungsreaktion als Voraussetzung für die Induktion der nachfolgenden Autoimmunreaktion aufgezeigt werden konnte, erfolgte die Phänotypanalyse der autoimmunen Phase im Alter von 10 Monaten.

3.3.1 MORTALITÄT DES PRISTAN-INDUZIERTEN SLE IN WILDTYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Das Überleben der Mäuse aus der in Woche 12 mit Pristan behandelten Gruppe wurde bis zum Versuchsende im Alter von 10 Monaten registriert und mittels Kaplan-Meier-Kurve dargestellt. Mittels Log Rank- ($p=0.153$), Breslow- ($p=0.170$) und Tarone Ware-Test ($p=0.161$) konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Kaplan-Meier-Kurven der Wildtyp-, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Gruppe festgestellt werden (Abbildung 23).

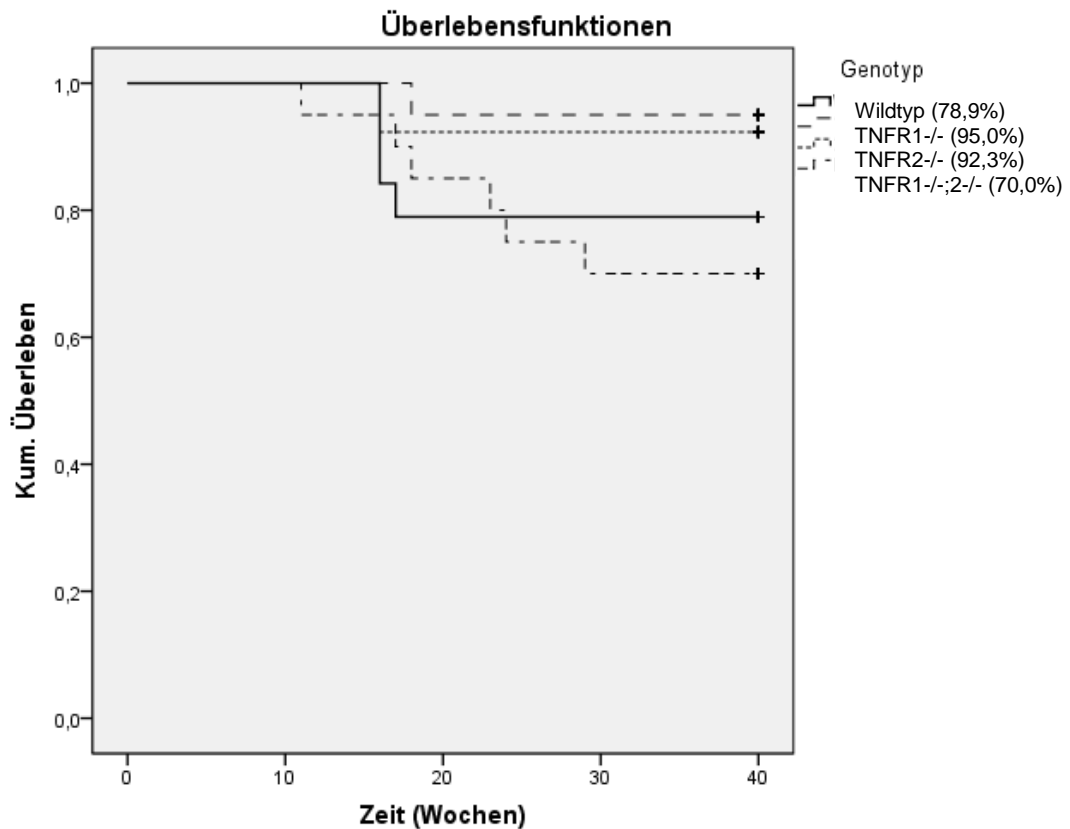


Abbildung 23: Überleben der Pristan behandelten Mäuse nach Genotypen ($n \geq 13$ je Genotyp).

3.3.2 GEWICHTSENTWICKLUNG

Die unterschiedlichen Genotypen der Mausgruppe mit Pristan-induziertem SLE-artigem Krankheitsbild zeigten korrelierend zur Überlebensanalyse keine Unterschiede in der Gewichtsentwicklung (Abbildung 24). Dies wurde anhand des Vergleichs des Körpergewichtes im Alter von 10 Monaten überprüft (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,013$; anschließende Post-Hoc-Tests ohne Signifikanz).

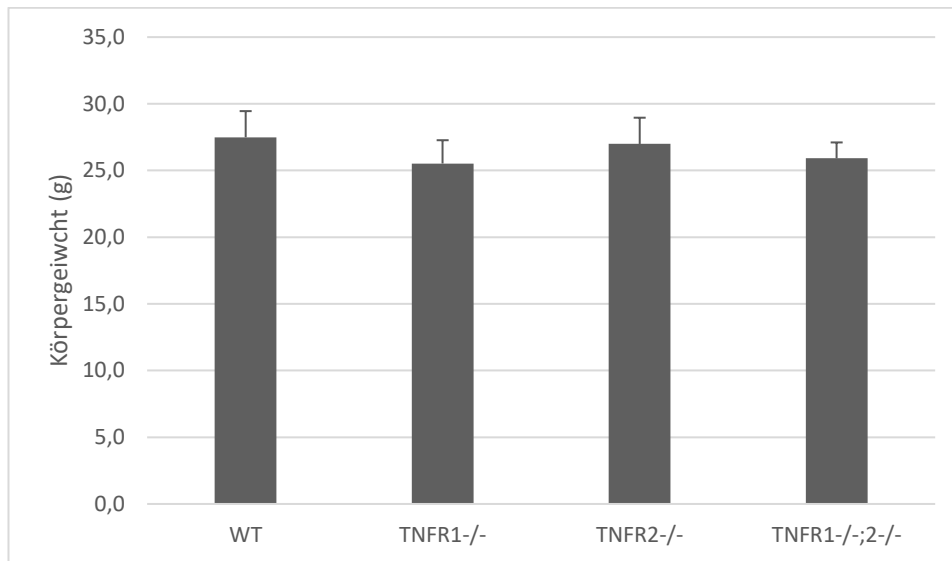


Abbildung 24: Der Vergleich des Körpergewichts von Wildtyp- und TNFR1-/-, TNFR2-/- sowie TNFR1-/-;2-/- Tieren im Alter von 10 Jahren ergab keine signifikanten Unterschiede (Kruskal-Wallis-Test $p = 0,013$; anschließende Post-Hoc-Tests ohne Signifikanz). Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung, $n \geq 11$ je Genotyp.

3.3.3 SYSTEMISCHE AUTOIMMUNREAKTIVITÄT IN DER MILZ

3.3.3.1 SPLENOMEGALIE

Für die beim SLE auftretende Splenomegalie war im Vergleich mit der PBS-Gruppe ein Referenzbereich festgelegt worden: Eine Splenomegalie wurde ab einem Milzgewicht von >105 mg definiert. Nach diesem Kriterium entwickelten 86% der Wildtyp-Tiere sowie 86% der TNFR1-/-;2-/- Gruppe eine Splenomegalie, gefolgt von 70% der TNFR1-/- Gruppe und 64% der TNFR2-/- Gruppe. Um etwaige konstitutionelle Einflüsse der Milzgröße auszuschließen, erfolgte ein Vergleich, nachdem das Milzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht gesetzt wurde. Hier zeigten sich im Kruskal-Wallis-Test keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen ($p = 0,223$) (Abbildung 25).

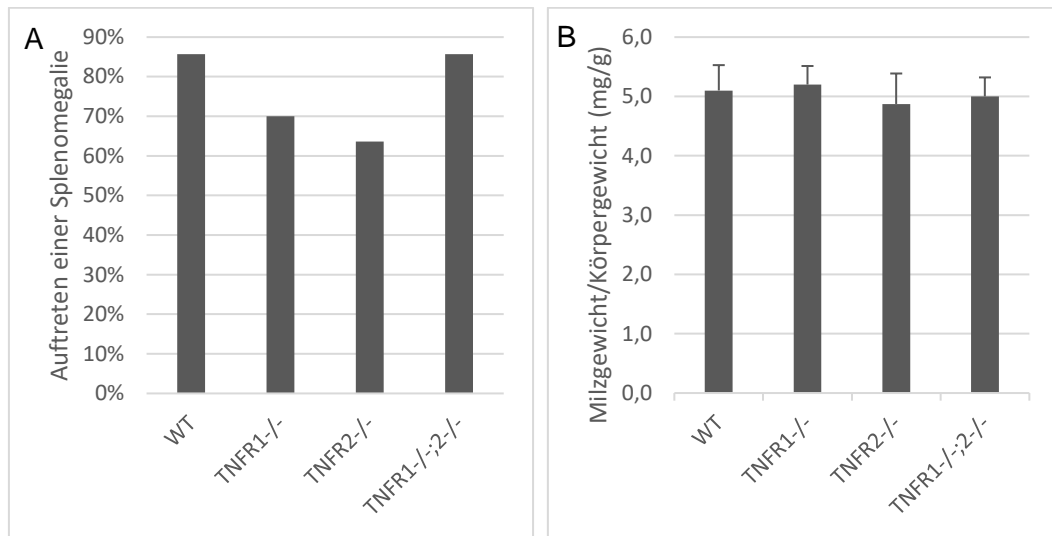


Abbildung 25: A) Vergleichende Darstellung der Häufigkeit einer Splenomegalie im Genotyp WT (86%), TNFR1^{-/-} (70%), TNFR2^{-/-} (64%), TNFR1^{-/-};2^{-/-} (86%). Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,392$); B) Darstellung des Anteils des Milzgewichts am Körpergewicht im Alter von 10 Monaten Pristaninjektion für WT-Tiere, TNFR1^{-/-}-Tiere, TNFR2^{-/-}-Tiere und TNFR1^{-/-};2^{-/-}-Tiere. Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,223$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 12$ je Genotyp.

3.3.3.2 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER LEUKOZYTENINFILTRATION DER MILZ NACH INTRAPERITONEALER PRISTAN-INJEKTION

Zur weiteren Charakterisierung der Autoimmunreaktion wurden die Milzen der zehn Monate alten Mäuse zu einem Lysat verarbeitet und durchflusszytometrisch analysiert. B-Zellen wurden über das Glykoprotein B220-PE identifiziert, T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor CD3ε-FITC. Letztere wurden nochmals mittels CD4-APC und CD8-Cyc in T-Helferzellen und zytotoxische Zellen differenziert.

Nach Berechnung der absoluten Zellzahlen in der Milz konnte im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied innerhalb der Genotypen für die Verteilung der B-Zellen ($p = 0,299$), T-Zellen ($p = 0,173$), T-Helferzellen ($p = 0,138$), zytotoxischen Zellen ($p = 0,099$), regulatorischen T-Zellen ($p = 0,327$) und Antigen präsentierenden dendritischen Zellen ($p = 0,442$) gefunden werden (Abbildung 26 A).

Für den relativen Anteil an den Gesamtleukozyten der Milz zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test allerdings für B-Zellen ($p = 0,003$), T-Zellen ($p < 0,001$), T-Helfer-Zellen ($p < 0,001$) und zytotoxische Zellen ($p < 0,001$) ein signifikanter Unterschied (Abbildung 26B).

Im Post-Hoc-Test zeigte sich ein signifikant erhöhter Anteil von B-Zellen für TNFR1^{-/-} Mäuse im Milzlysat im Vergleich zur Wildtypkontrolle ($p = 0,019$).

Dagegen zeigte sich ein signifikant erniedrigter Anteil an T-Zellen in Milzen von TNFR2^{-/-} Mäusen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle ($p = 0,028$), während die Werte in TNFR1^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Tieren vergleichbar waren.

Auch bei Untersuchung der T-Zell-Subgruppen zeigten sich signifikante Unterschiede. TNFR1^{-/-} Tiere hatten einen signifikant höheren Anteil an T-Helferzellen als die Wildtyp-Kontrolle ($p < 0,001$). Bei der Verteilung der zytotoxischen T-Zellen zeigte sich in TNFR2^{-/-} Tieren ein signifikant geringerer Anteil an CD8⁺ T-Zellen im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle ($p = 0,001$).

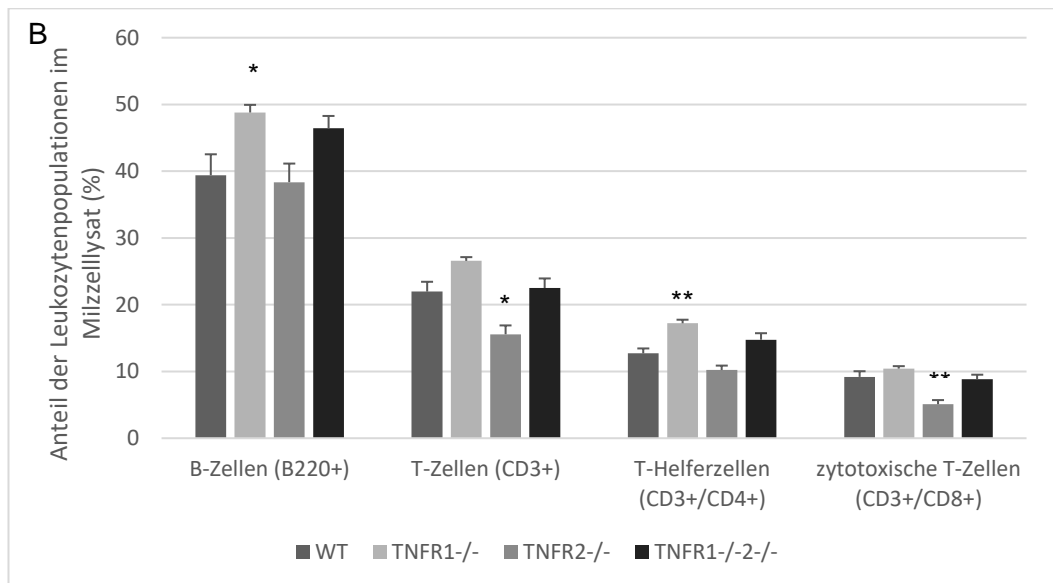
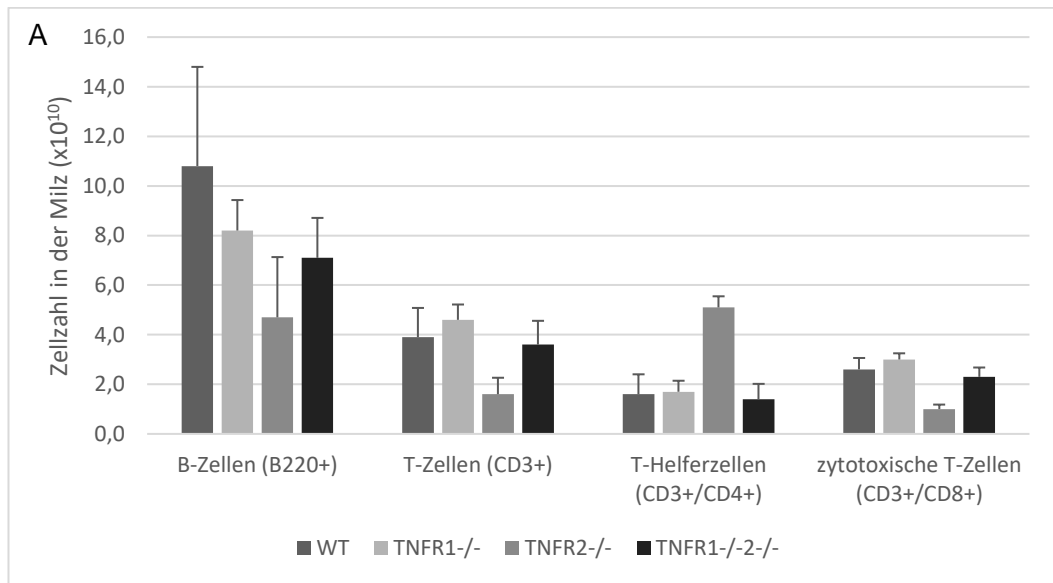


Abbildung 26: A) Darstellung der absoluten Zellzahlen der Leukozyten in der Milz in der durchflusszytometrischen Analyse des Milzlysats 10 Monate alter Mäuse der Genotypen WT ($n = 5$), TNFR1^{-/-} ($n = 8$), TNFR2^{-/-} ($n = 5$) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} ($n = 8$). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. B) Darstellung der relativen Häufigkeit von Leukozytenpopulationen am Milzlysats in der durchflusszytometrischen Analyse des Milzlysats 10 Monate alter Mäuse der Genotypen WT, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-}. Es zeigte sich im Vergleich zu Wildtypieren für TNFR1^{-/-} Tiere ein signifikant erhöhter Anteil von B-Zellen ($p = 0,019$) und T-Helferzellen ($p < 0,001$). Für TNFR2^{-/-} Tiere waren im Vergleich zu Wildtypieren signifikant weniger T-Zellen ($p = 0,028$) und zytotoxische T-Zellen ($p = 0,001$) nachweisbar. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler; $n \geq 12$ je Genotyp.

Regulatorische T-Zellen, die durch die Oberflächenantigene CD4 und CD25 charakterisiert sind, spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der Immunantwort. Für Autoimmunerkrankungen ist v.a. ihre Aufgabe der Erhaltung der Selbsttoleranz gegenüber Eigen-Antigenen relevant. Alle Genotypen zeigen in der Milz deutlich mehr CD25⁻ CD4⁺-Zellen als CD25⁺ Zellen. Bei Analyse der absoluten Zellzahlen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen TNF-Rezeptor-defizienten Tieren und der Wildtyp-Kontrolle für CD25⁺ oder CD25⁻ CD4⁺ Zellen (Abbildung 27A). Auch der relative Anteil CD4⁺/CD25⁺ Zellen und CD4⁺/CD25⁻ Zellen war im Vergleich zu Wildtyp-Tieren in den TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Mäusen nicht unterschiedlich (Abbildung 27B).

Es zeigte sich ein signifikant höherer Anteil an CD4⁺/CD25⁻ Zellen der TNFR1^{-/-} Gruppe im Vergleich zur Wildtyp-Kontrolle ($p = 0,035$), übereinstimmend mit dem signifikant hohen Anteil aller CD4⁺ T-Zellen.

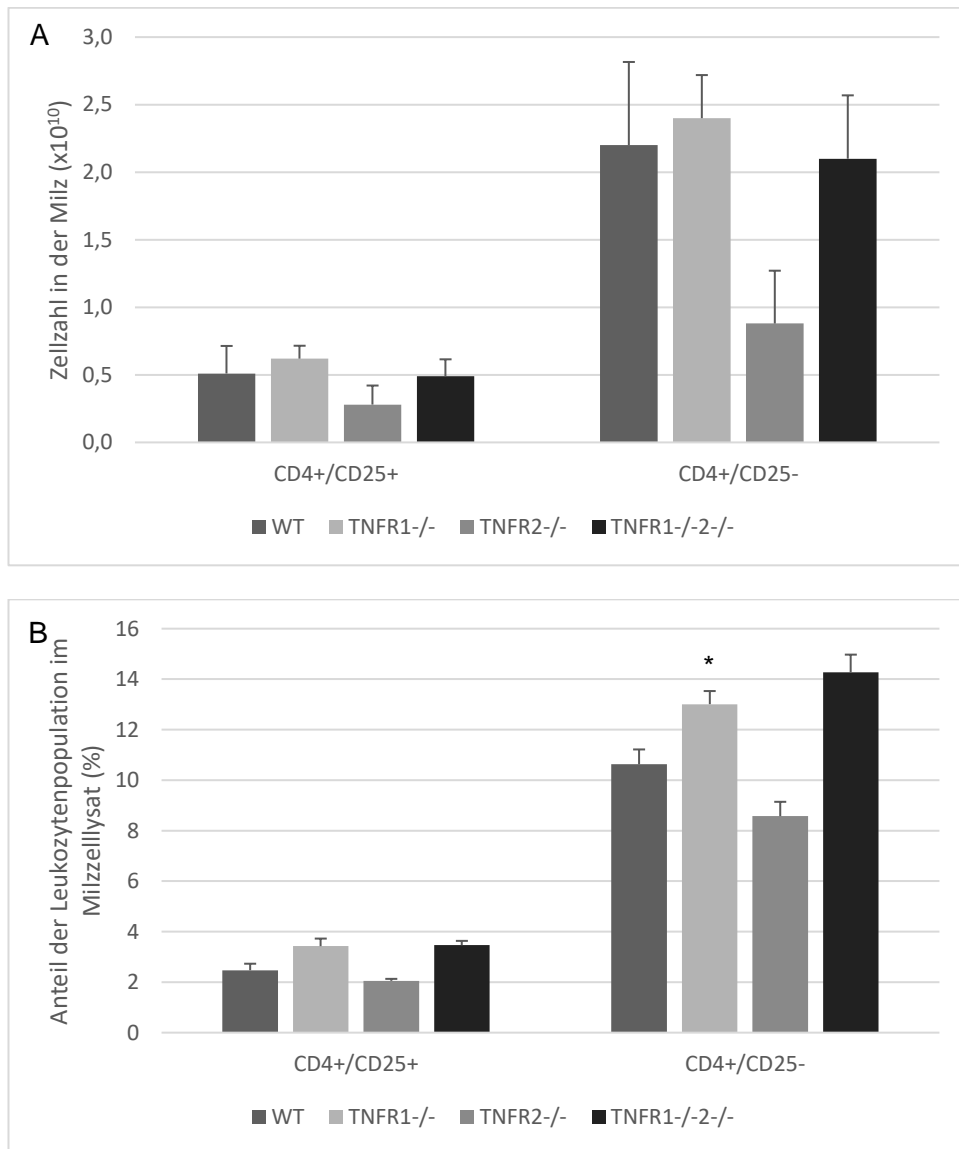


Abbildung 27: A) Darstellung von CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen und CD4⁺CD25⁻ Zellen in der Milz in 10 Monate alten Mäuse der Genotypen WT (n = 5), TNFR1^{-/-} (n = 8), TNFR2^{-/-} (n = 5) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} (n = 8). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. B) Darstellung der relativen Häufigkeit CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen und CD4⁺CD25⁻ Zellen im Milzzelllysate in der durchflusszytometrischen Analyse 10 Monate alter Mäuse der Genotypen WT, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-}. Es zeigte sich im Vergleich zu Wildtypieren für TNFR1^{-/-} Tiere ein signifikant erhöhter Anteil von CD4⁺CD25⁻ Zellen (p = 0,035). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, n ≥ 12.

Aktiviert dendritische Zellen der Milz wurden als CD11c⁺, CD40⁺ Zellen identifiziert. Es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in der absoluten und relativen Verteilung CD11c⁺/CD40⁺ Zellen (p = 0,523) in den Milzzelllysaten der unterschiedlichen Genotypen (Abbildung 28).

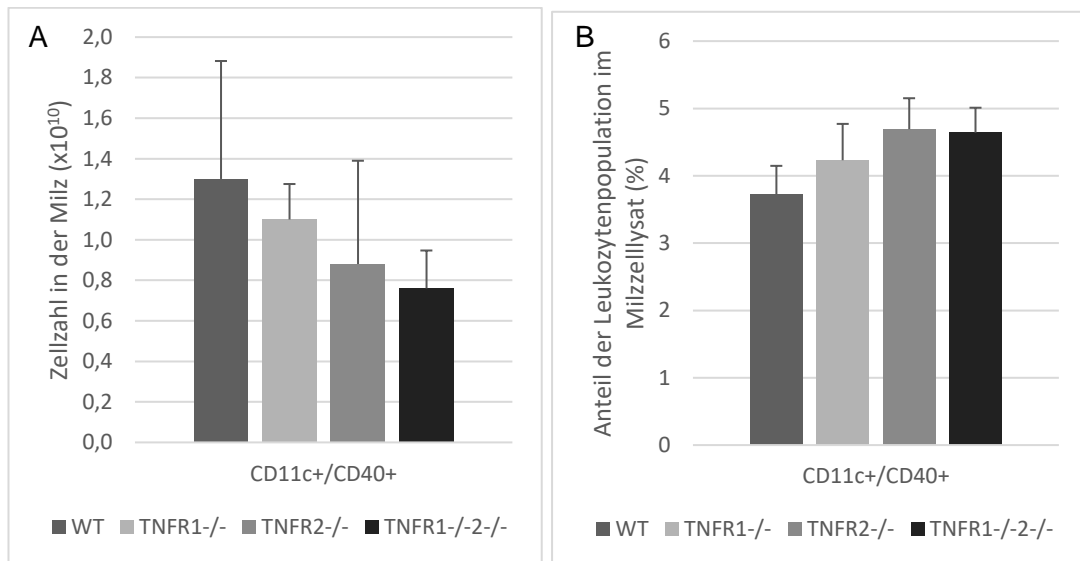


Abbildung 28: A) Darstellung von CD40+ dendritischen Zellen in der Milz von 10 Monate alten Mäusen der Genotypen WT (n = 5), TNFR1-/- (n = 8), TNFR2-/- (n = 5) und TNFR1-/-;2-/-(n = 8). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. B) Darstellung der relativen Häufigkeit CD40+ dendritischer Zellen im Milzzelllysate in der durchflusszytometrischen Analyse 10 Monate alter Mäuse der Genotypen WT, TNFR1-/-, TNFR2-/- und TNFR1-/-;2-/-. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, n \geq 12 je Genotyp.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass TNFR1-Defizienz den relativen Anteil von B-Lymphozyten und CD4+ T-Zellen der Milz erhöht, während TNFR2-Defizienz die relative Zahl von T-Zellen, insbesondere CD8+ T-Zellen vermindert. Diese Daten weisen auf eine Autoimmunität eher begrenzende Funktion von TNFR1 und eine proentzündliche Rolle von TNFR2 im Verlauf des SLE hin.

3.3.4 ANTIKÖRPERINDUKTION IN PRISTAN-INJIZIERTEN WILD-TYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Ein wesentliches Merkmal der Autoimmunreaktion des SLE ist eine erhöhte systemische Autoantikörperbildung. Als Zeichen einer chronischen Autoimmunaktivierung untersuchten wir daher die IgG-Konzentrationen im Blut der Interventionsgruppen im Alter von 10 Jahren. Hier ergab der Kruskal-Wallis-Test keinen signifikanten Unterschied ($p = 0,066$) (Abbildung 29).

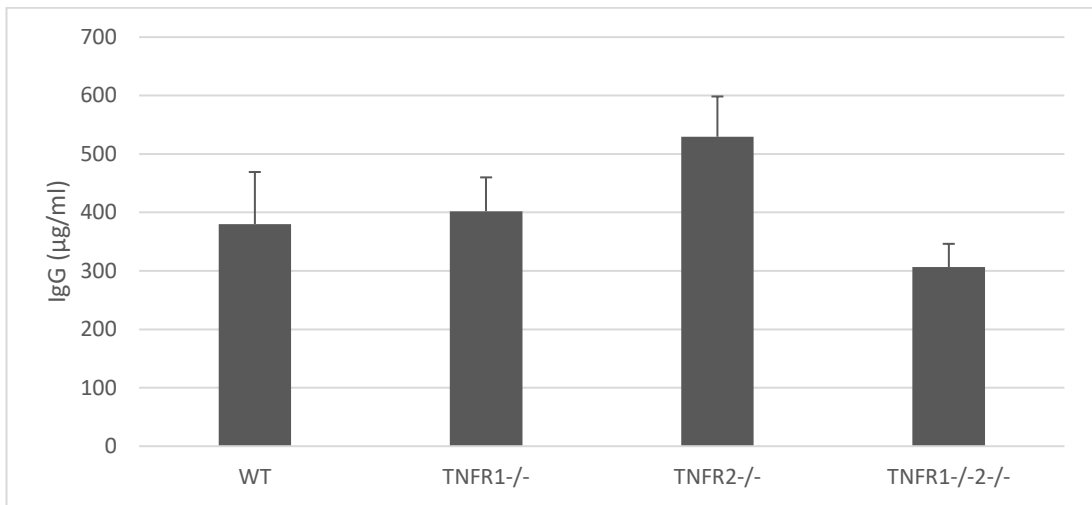


Abbildung 29: Darstellung der Serum-IgG-Konzentrationen in µg/ml der WT-Tiere, TNFR1-/- -Tiere, TNFR2-/- -Tiere und TNFR1-/-2-/ -Tiere zehn Monate nach Pristaninjektion. Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,066$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 10$ je Genotyp.

Für rheumatologische Erkrankungen sind spezifische Antikörper wie zum Beispiel der Rheumafaktor bekannt. Dieser ist in 15-35% der Fälle auch beim SLE erhöht (96). Mittels ELISA wurde der Rheumafaktor-Titer im Blut der Interventionsgruppen im Alter von 10 Monaten bestimmt. Im Kruskal-Wallis-Test zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Höhe des Rheumafaktors zwischen den einzelnen Genotypen ($p = 0,377$) (Abbildung 30).

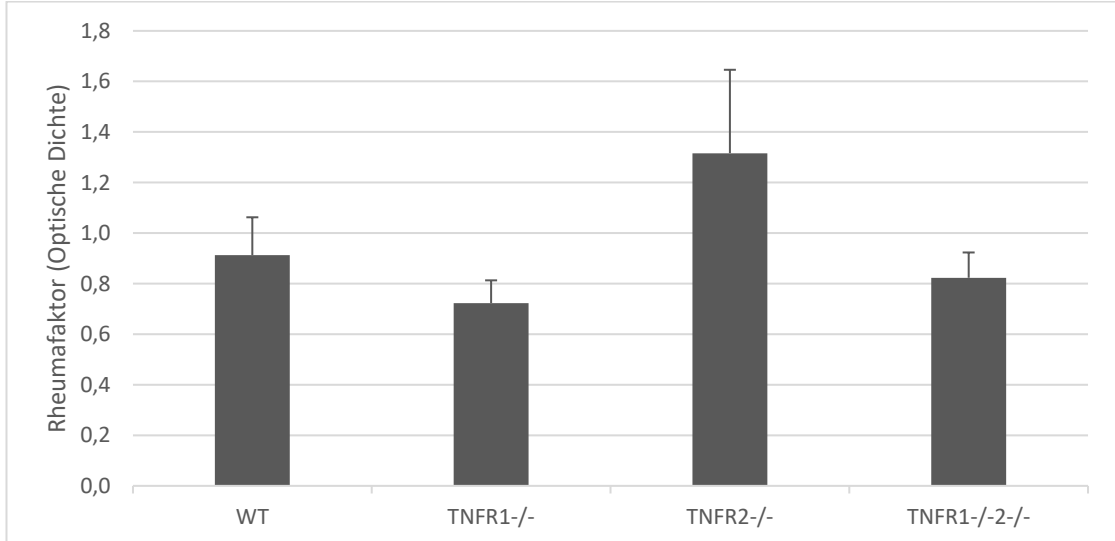


Abbildung 30: Darstellung der Rheumafaktorkonzentration im Serum von WT-Tieren, TNFR1-/- -Tieren, TNFR2-/- -Tieren und TNFR1-/-2-/ -Tieren. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,377$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 10$ je Genotyp.

Bei niedriger Sensitivität zeigen Anti-Sm-Antikörper eine hohe Spezifität für SLE. Im Blut von ca. 7-25 % der SLE-Patienten können Anti-Sm-Antikörper nachgewiesen werden (97). Im Alter von 10 Monaten wurde mittels ELISA die Anti-Sm-Antikörperkonzentration im Serum der Mäuse der Pristan-Interventionsgruppen untersucht. Der Kruskal-Wallis-Test ergab hier einen signifikanten Unterschied innerhalb der unterschiedlichen Genotypen ($p = 0,019$). Im Vergleich zur Wildtypkontrolle ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zu TNFR2^{-/-} ergaben sich für TNFR1^{-/-} signifikant erhöhte Werte im Posthoc-Test ($p < 0,001$) (Abbildung 31).

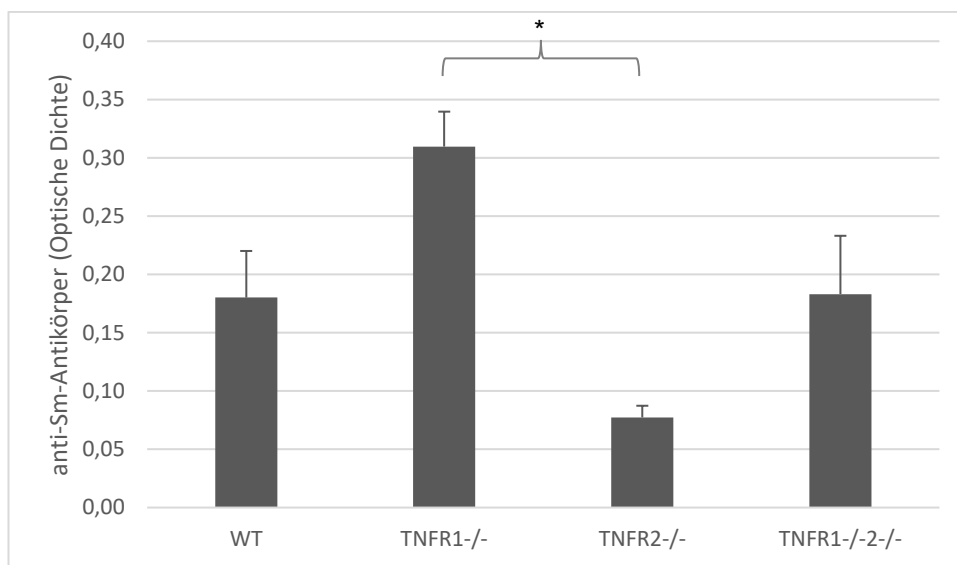


Abbildung 31: Darstellung der anti-Sm-Konzentration im Serum von 10 Monate alten Mäusen der Genotypen WT, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-}. Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Antikörperspiegel der TNFR1^{-/-} Gruppe im Vergleich zur TNFR2^{-/-} Gruppe (Dunnett-T3-Test, $p < 0,001$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 10$ je Genotyp.

Gemeinsam mit anti-Sm-Antikörpern treten auch häufig anti-U1-RNP-Autoantikörper auf. In 20-40% der SLE-Erkrankten können im Blut anti-U1-RNP-Antikörper nachgewiesen werden (97). Im Alter von 10 Monaten wurde das Blut Pristan-injizierter Mäuse mittels ELISA auf U1-RNP-Antikörper untersucht. Hier zeigte sich im Kruskal-Wallis-Test kein signifikanter Unterschied innerhalb der unterschiedlichen Genotypen ($p = 0,311$) (Abbildung 32).

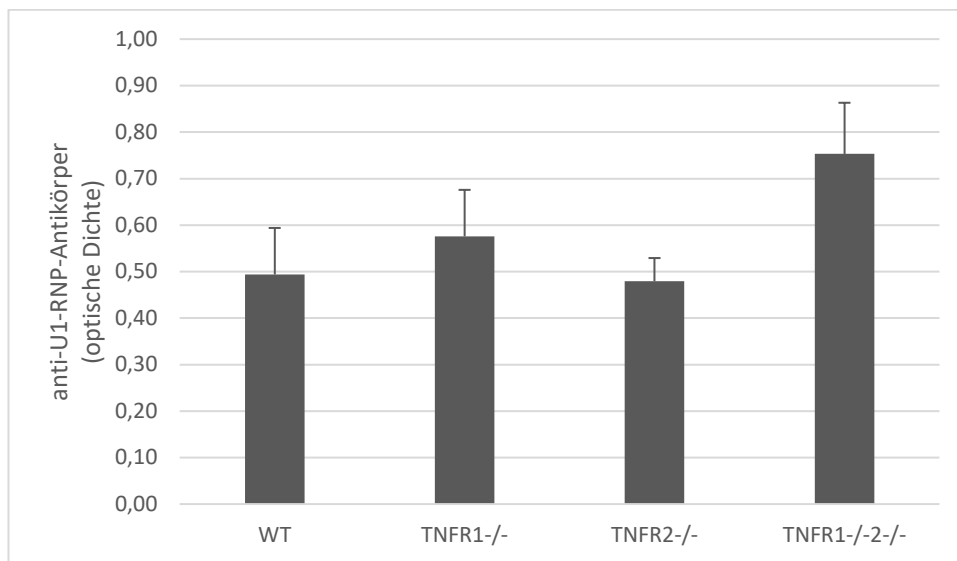


Abbildung 32: Darstellung der anti-U1-RNP-Antikörperkonzentration im Serum von 10 Monate alten Mäusen der Genotypen WT, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-}. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,311$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 9$ je Genotyp.

Zusammengefasst zeigen die Untersuchungen zur humoralen Autoimmunaktivität im Wesentlichen vergleichbare Autoantikörperspiegel von Wildtyp- und TNFR-defizienten Mäusen mit Pristan-induziertem SLE. Die in TNFR1^{-/-} Tieren im Vergleich zu TNFR2^{-/-} Mäusen erhöhten anti-Sm-Antikörpertiter weisen jedoch ähnlich wie der erhöhte relative B-Lymphozyten- und CD4-T-Zell-Anteil in der Milz von TNFR1^{-/-} Tieren auf eine Autoimmunität begrenzende Funktion von TNFR1 hin.

3.3.5 KUTANE MANIFESTATION DES SLE

Nachdem die Daten der Milzanalysen auf eine vermehrte Autoimmunaktivität in TNFR1^{-/-} Tieren im Vergleich zur Wildtypgruppe hinwiesen, wurde im Folgenden die Ausprägung der kutanen Manifestation des Pristan-Induzierten SLE untersucht. Die Ausbildung von Hauteffloreszenzen ist ein typisches klinisches Symptom des SLE, wie auch in der SLICC-Klassifikation beschrieben. Nach Pristaninjektion wurden die Mäuse kontinuierlich auf Hautläsionen untersucht (Abbildung 33). Hierbei konnte im Chi-Quadrat-Test kein Unterschied in der Ausprägung von Effloreszenzen zum Zeitpunkt des Versuchsendes ($p = 0,072$) sowie über die gesamte Versuchsdauer ($p = 0,131$) festgestellt werden.

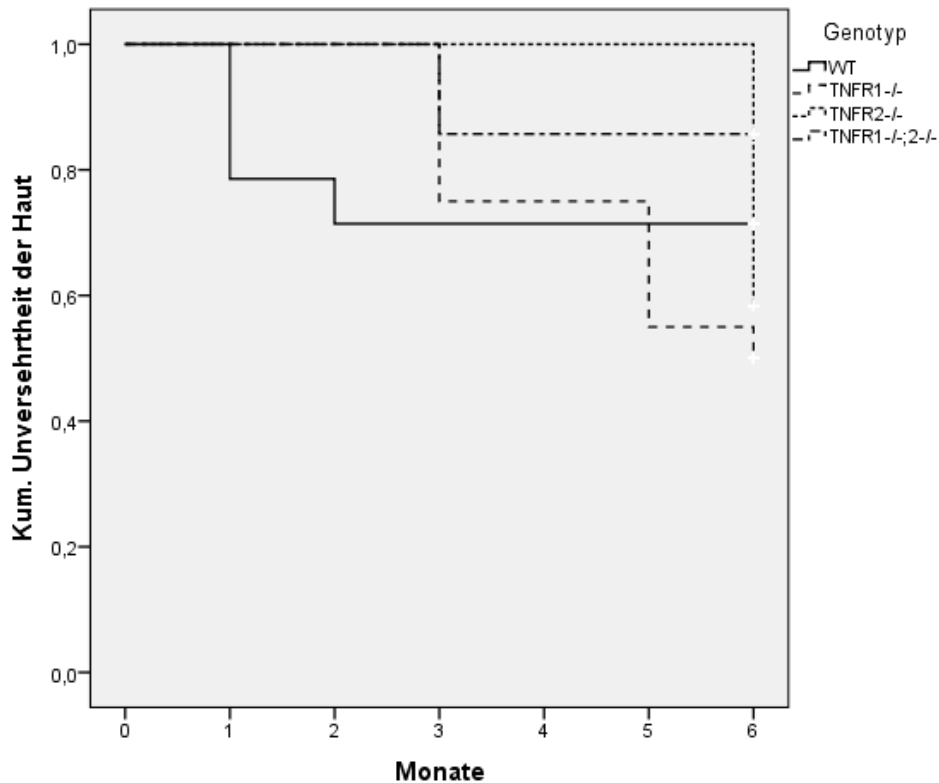


Abbildung 33: Darstellung des erstmaligen Auftretens von Hautläsionen der Tiere im Beobachtungszeitraum 0 bis 6 Monate nach Pristaninjektion für WT-Tiere, TNFR1-/- -Tiere, TNFR2-/- -Tiere und TNFR1-/-;2-/- -Tiere; Chi-Quadrat-Test ($p = 0,131$). Es ergab sich kein signifikanter Unterschied im Auftreten von Hautläsionen, $n \geq 12$ je Genotyp.

3.3.6 ARTHRITIS

Eine Arthritis, ein weiteres Kriterium der SLICC-Klassifikation, war in allen Genotypen im vorliegenden Mausmodell nicht festzustellen.

3.3.7 ENDORGANSCHADEN DER NIERE

Nachdem bereits pathologische Veränderungen für Milz und Haut beschrieben werden konnten, erfolgte eine Analyse der Endorganschäden der Niere für TNFR-defiziente Tiere im Vergleich zu Wildtypieren.

3.3.7.1 PROTEINURIE

Eine relevante Proteinurie konnte in keiner der Genotypen nachgewiesen werden (Abbildung 34).

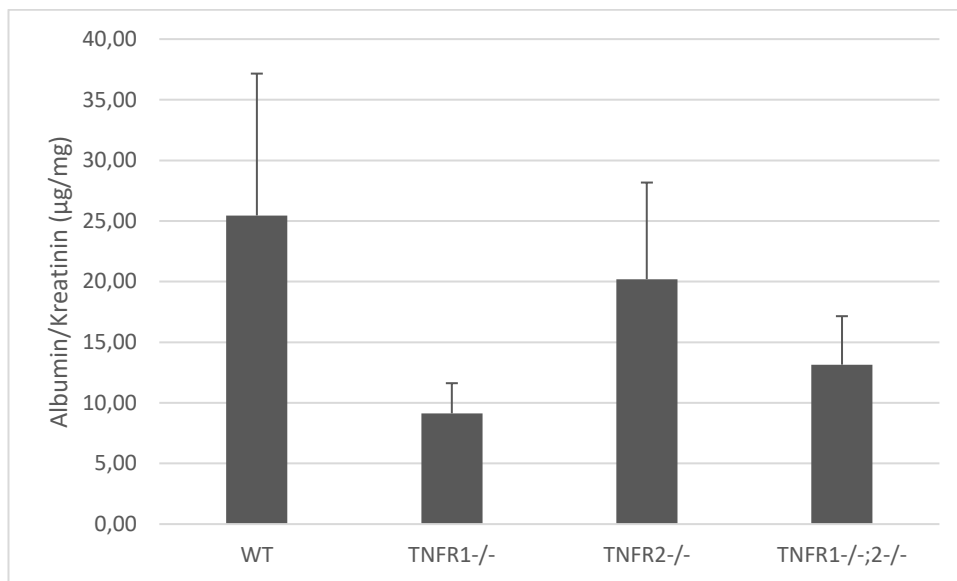


Abbildung 34: Albumin/Kreatinin-Ratio ($\mu\text{g}/\text{mg}$). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen WT, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-} im Alter von 10 Monaten (Kruskal-Wallis-Test, $p = 0,127$). Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 9$ je Genotyp.

3.3.7.2 HISTOLOGISCHER SCHADEN DER NIERE

Zur Quantifizierung des histologischen Schadens der Niere wurde der Aktivitätsscore nach Austin et al. (95) auf jedes Tier in allen Genotypen ermittelt. In der Auswertung der PAS-Färbung zeigten sich übergreifend in allen Genotypen normal konfigurierte Glomeruli und fehlende tubulointerstitielle Veränderungen (Tabelle 12).

Tabelle 12: Beurteilung des histologischen Schadens der Niere nach dem Aktivitätsscore von Austin et al. (95)

| | WT (n = 14) | TNFR1 ^{-/-} (n = 18) | TNFR2 ^{-/-} (n = 12) | TNFR1 ^{-/-} ;2 ^{-/-} (n = 11) |
|-----------------------------------|----------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------------------------|
| Mittelwert und Standardabweichung | 0,0 ± 0,1 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,1 | 0,0 ± 0,0 |

3.3.7.3 DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSE DER LEUKOZYTENINFILTRATION DER NIERE NACH INTRAPERITONEALER PRISTAN-INJEKTION

Nach Identifizierung der Leukozyten aus dem Nierenlysat von Mäusen im Alter von 10 Monaten mittels des Markers CD45, erfolgte die Identifizierung von T-Zellen über den T-Zell-Rezeptor CD3 und Subdifferenzierung in T-Helfer-Zellen (CD4) und zytotoxische Zellen (CD8). Darüber hinaus wurde das Zelllysat auf CD11c positive dendritische Zellen und F4/80 positive Makrophagen untersucht. In der Post-Hoc-Analyse ergaben sich keine signifikanten

Unterschiede in der Zahl renal infiltrierender CD45+ Leukozyten zwischen TNFR1^{-/-} (p = 0,095), TNFR2^{-/-} (p = 0,090) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Tieren (p = 0,321) und der Wildtypkontrolle. Auch für die Niereninfiltration durch T-Zellen (p = 0,023) fanden sich in der Post-Hoc-Analyse für TNFR1^{-/-} (p = 0,116), TNFR2^{-/-} (p = 0,123) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Tieren (p = 0,998) im Vergleich zur Wildtypkontrolle keine signifikanten Unterschiede. Die Analyse der CD45+/CD3+/CD4+ T-Helfer-Zellen ergab korrelierend hierzu ebenfalls in der Post-Hoc-Analyse keine signifikanten Unterschiede für TNFR1^{-/-} (p = 0,053), TNFR2^{-/-} (p = 0,071) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Tieren (p = 1,0) im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Für CD45+/CD3+/CD8+ zytotoxische Zellen ergab sich eine signifikant geringere renale Infiltration in TNFR2^{-/-}-Tieren (p = 0,015) im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe, während sich für TNFR1^{-/-} (p = 0,073) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} (p = 0,894) weiterhin keine Unterschiede zeigten. Für den Anteil der CD45+/F4/80+ Makrophagen war für TNFR1^{-/-} Tiere (p = 0,005) eine signifikant geringere Niereninfiltration im Vergleich zur Wildtypkontrolle nachweisbar, während sich für TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-} keine signifikanten Unterschiede zeigten. Für CD45+/CD11c+ dendritischen Zellen ergab sich kein signifikanter Unterschied für TNFR1^{-/-} (p = 0,103), TNFR2^{-/-} (p = 0,077) und TNFR1^{-/-};2^{-/-} Tiere (p = 0,116) im Vergleich zur Wildtypkontrolle (Abbildung 35).

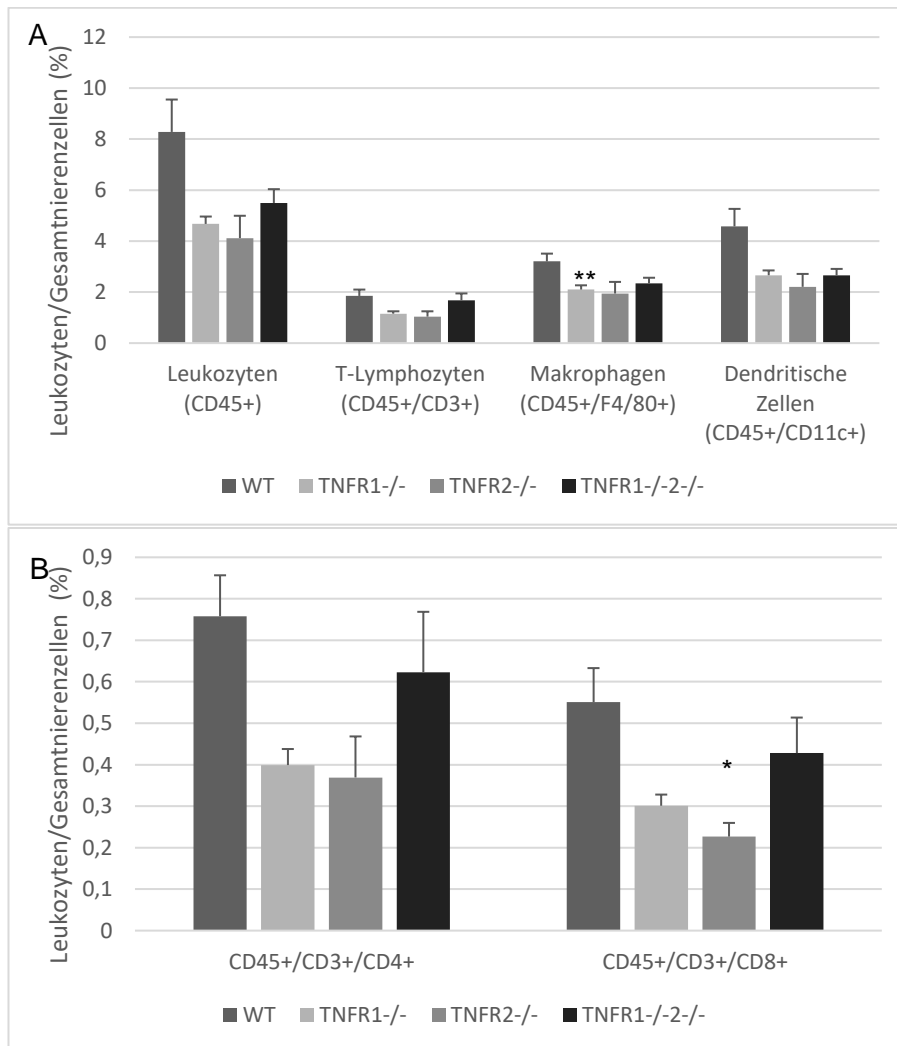


Abbildung 35: A) Darstellung der Häufigkeit renaler Leukozyten (CD45+), T-Zellen (CD45+, CD3+), Makrophagen (CD45+, F4/80+) und dendritischer Zellen (CD45+, CD11c+) nach durchflusszytometrischer Bestimmung in Nierenlysaten 10 Monate alter Mäuse der Genotypen WT, TNFR1-/-, TNFR2-/- und TNFR1-/-;2-/-. TNFR1-/-Tiere zeigten im Vergleich zu Wildtypieren eine signifikant niedrigere Makrophageninfiltration der Niere ($p = 0,005$). Im Übrigen ergab sich in den Post-Hoc-Analysen keine signifikanten Unterschiede. B) Darstellung von T-Helfer-Zellen (CD45+, CD3+, CD4+) und zytotoxischen T-Zellen (CD45+, CD3+, CD8) für WT-, TNFR1-/-, TNFR2-/- und TNFR1-/-;2-/- Tiere. Es zeigte sich eine signifikant geringere Infiltration von zytotoxischen T-Zellen in den Nieren von 10 Monate alten Pristan injizierten Mäusen mit TNFR2-/- Hintergrund im Vergleich zu Wildtypieren ($p = 0,015$). Weitere signifikante Unterschiede ergaben sich nicht. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 12$ je Genotyp.

Neben der durchflusszytometrischen Darstellung erfolgte eine immunhistologische Untersuchung des Leukozyteninfiltrats in Nieren der 10 Monate alten Pristan-injizierten Mäuse.

Zur Identifizierung der T-Zell-Infiltration erfolgte eine immunhistochemische Färbung für CD3.

Die Anzahl von glomerulären CD3+ T-Zellen wurden in 20 Glomerula je Maus ermittelt. Interstitielle CD3+ Zellen wurden bei 400-facher Vergrößerung in 20 Gesichtsfeldern pro Nierenrinde je Maus ausgezählt. Die morphometrische Auswertung ergab eine vergleichbare glomeruläre und tubulointerstitielle T-Zellinfiltration in allen vier untersuchten Genotypen (Abbildung 36).

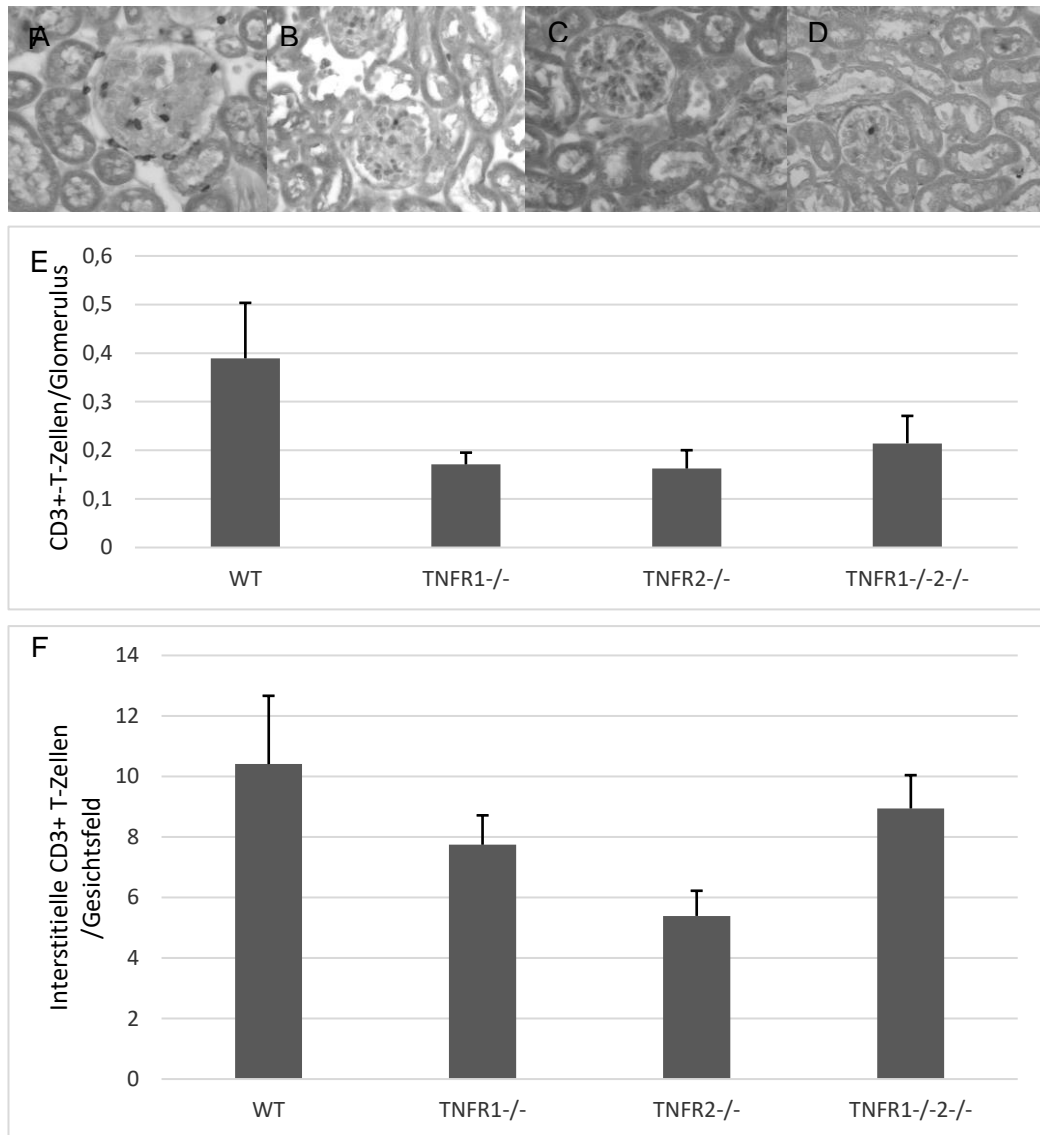


Abbildung 36: A-D) Histologische Schnitte (400-fache Vergrößerung) von Nieren 10 Monate alter Mäuse nach immunhistochemischer Färbung von CD3: A) Wildtyp B) TNFR1^{-/-} C) TNFR2^{-/-} D) TNFR1^{-/-};2^{-/-}. E) Darstellung der Leukozyten/Glomerulus; F) sowie Leukozyten/Gesichtsfeld tubulointerstitiell für die Genotypen WT, TNFR1^{-/-}, TNFR2^{-/-} und TNFR1^{-/-};2^{-/-}. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test. Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, n ≥ 12 je Genotyp.

Daneben wurden zur Quantifizierung der Makrophagenpopulation histologische Schnitte von Nieren einer immunhistochemischen F4/80-Färbung unterzogen und bei 400-facher Vergrößerung morphometrisch ausgewertet (Abbildung 37). Auch hier zeigte kein signifikanter Unterschied innerhalb der verschiedenen Genotypen ($p = 0,330$).

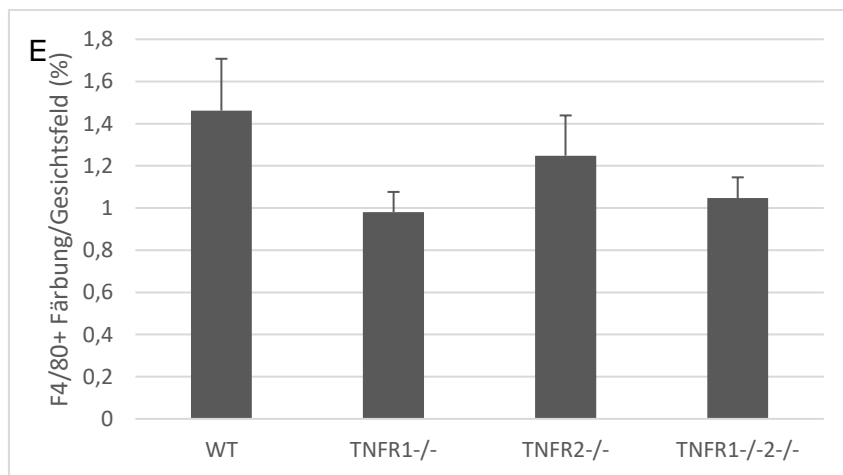
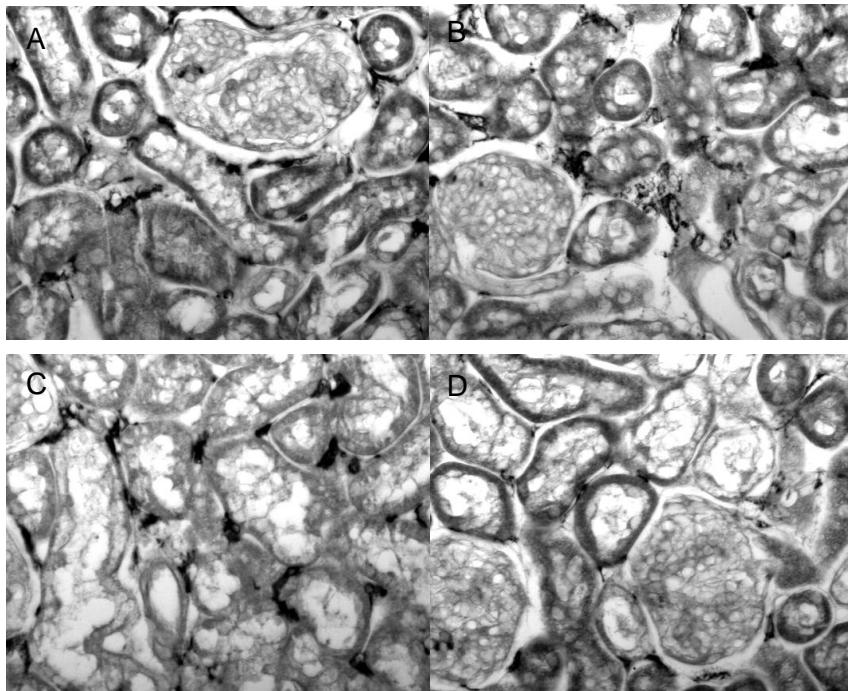


Abbildung 37: Histologische Schnitte (400-fache Vergrößerung) von Nieren 10 Monate alter Mäuse nach immunhistochemischer Färbung von F4/80: A) Wildtyp B) TNFR1-/- C) TNFR2-/- D) TNFR1-/-;2-/- . E) Darstellung des Anteils F480+-gefärbter Areale. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede im Kruskal-Wallis-Test ($p = 0,330$) für die Genotypen WT, TNFR1-/-, TNFR2-/- und TNFR1-/-;2-/- . Angegeben sind Mittelwerte und Standardfehler, $n \geq 12$ je Genotyp.

Zusammenfassend zeigt die Analyse des renalen Phänotyps im Gegensatz zu vorpublizierten Untersuchungen in C57/BL/6-Mäusen in den hier verwendeten Wildtyp- und TNF-Rezeptor-defizienten Mauslinien bei fehlender Proteinurie und histologischen Veränderungen keine ausgeprägte renale Endorganschädigung. Entsprechend ergab sich im Wesentlichen auch ein vergleichbares Ausmaß der renalen Leukozyteninfiltration in den untersuchten Genotypen.

4 DISKUSSION

4.1 VOR- UND NACHTEILE DES PRISTAN-INDUZIERTEN MAUSMODELL DES SLE

Verschiedene Mausmodelle sind für den SLE etabliert. Man unterscheidet hierbei spontane und induzierte Mausmodelle. Zu den spontanen Mausmodellen gehören MRL/lpr Mäuse und BXSB/Yaa Mäuse sowie New Zealand Black/New Zealand White F1 Mäuse und ihre Derivate NZM2328 und NZM2410 (98),(99). Die Induktion eines lupusähnlichen Krankheitsbildes ist unter anderem über Überexpression oder Deletion einzelner Gene, Injektion von Seren oder Lymphozyten SLE-prädisponierter Mäuse, Impfung mit apoptotischen dendritischen Zellen oder DNA- und RNA-Komplexen möglich (100). Der Vorteil eines mittels des Kohlenwasserstofföls 2,6,10,14-Tetramethylpentadekan (Pristan) induzierten Mausmodells ist die pathophysiologische Nähe zum humanen chemisch induzierten SLE und breite Ausbildung des Autoantikörperprofils (Tabelle 13).

Tabelle 13: Modifiziert nach (100); Vergleich verschiedener Mausmodelle bezüglich Manifestationen eines SLE

| Manifestation | NZB/W F1 | MRL/lpr | BXSB/Yaa | Pristan |
|------------------------|----------|---------|----------|---------|
| Arthritis | - | + | - | + |
| Serositis | - | - | - | + |
| Exanthem | - | + | - | - |
| Nephritis | + | + | + | + |
| Neurologische Symptome | - | + | + | - |
| Vaskulitis | +/- | + | + | + |
| Anti-Sm-Antigen | - | + | - | + |
| Anti-dsDNA | + | + | + | + |
| Anti-ribosomal P | - | + | - | + |
| Anti-snRNP | - | + | - | + |

Pristan ist ein verzweigtes Alkan, das natürlicherweise in vielen Pflanzen und Mineralölen vorkommt (Abbildung 38).

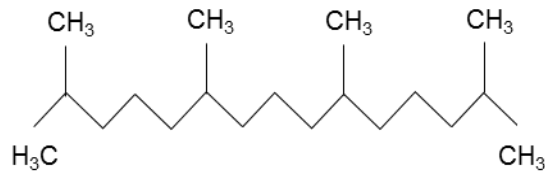


Abbildung 38: 2,6,10,14-Tetramethylpentadekan (Pristan)

Der Mensch kommt tagtäglich mit Kohlenwasserstoffen wie Pristan in Berührung. Dinscoy konnte 1982 in 44 Fällen Lipogranulome in Steatose-freien Lebern nachweisen. Die Gaschromatographie ergab, dass diese durch Ingestion von gesättigten Kohlenwasserstoffen wie z.B. Mineralölen verursacht wurden (101). Initial wurden diese als harmlos betrachtet. Aspiration von Mineralöl kann jedoch zu proliferativer Lungenfibrose und lipoider Pneumonie führen, die teilweise gutes Ansprechen auf Steroide zeigt (102). Darüber hinaus konnte die schwedische Fall-Kontroll-Studie EIRA eine Assoziation zwischen Mineralölexposition und dem Auftreten einer rheumatoiden Arthritis nachweisen (103). Auch SLE trat neben einer rheumatoiden Arthritis bei Bewohnern, die in der für ihre ausgeprägte Ölindustrie bekannten Stadt Hobbs (New Mexico) vermehrt Ölabbfällen ausgesetzt waren, in erhöhter Zahl auf (104). Einige Autoren vermuten hinter der Geschlechterverteilung bei Autoimmunerkrankungen die Triggerung durch Mineralöle in Kosmetika (105).

Ein anderes Einsatzgebiet von Mineralölen ist die Vakzinierung von Menschen und Tieren. Hier wurden Mineralöle als Adjuvantien jahrzehntelang eingesetzt. Nach und nach erhöhte sich jedoch der Verdacht, dass sie ähnlich wie im murinen Pristan-Modell in einigen Fällen Autoimmunreaktionen und -erkrankungen auslösen können. Die genaue Aufklärung ist durch die komplexe Impfreaktion erschwert. In Tierversuchen ergaben sich jedoch erste Hinweise auf eine klinische Relevanz (106). So wiesen Kuroda et. al. für die in humanen und veterinären Impfungen als Adjuvans verwendeten Substanzen Pristan, Bayol F (inkomplettes Freund Adjuvans) und Squalen (MF59) in exponierten BALB/c-Mäusen die Induktion von SLE-assoziierten Autoantikörpern gegen nRNP/Sm und -Su nach (107). Auch in Lachsfarmen ist eine Vakzinierung mit Impfstoffen mit oben genannten Adjuvantien seit den 90er Jahren üblich. Koppang et al. zeigten ein vermehrtes Auftreten von Autoantikörperbildung, granulomatösen Entzündungen der Leber und Immunkomplex-Glomerulonephritiden in geimpften Lachsen (108). Auch bei Menschen zeigte sich nach Vakzinierung mit Adjuvantien vermehrt das Auftreten von Autoimmunerkrankungen. 2011 wurde daher erstmals von Shoenfeld und Agmon-Levin der Begriff ASIA (autoimmune/inflammatory syndrome induced

by adjuvants) geprägt (109). Er beschreibt ein Syndrom, welches nach Impfungen durch Adjuvantien verursacht auftritt und durch Myalgine, Myositiden, Muskelschwäche, Arthralgien, Arthritis, Fatigue, Schlafstörungen und der Prädisposition gegen demyelinisierende Autoimmunerkrankungen gekennzeichnet ist. Die Autoren zählten hierzu das Golfkriegssyndrom, bei welchem Autoantikörper gegen Squalen nachgewiesen werden konnten (110). Des Weiteren inkludierten sie die makrophagische Myofasziitis, welche nach Impfungen in der Nähe der Einstichstelle zu lokalisierten Entzündungen führt und Aluminiumverbindungen im Adjuvans zugeschrieben wird, als auch Silikosen und andere post-vakzine Syndrome (111). In einzelnen Fallstudien werden Antiphospholipidsyndrom (112), Riesenzellarthritis (113), Polymyalgia rheumatica (113), Guillain-Barré-Syndrom (114), adulter Morbus Still (114), Sjögren-Syndrom (115) und auch SLE (116) diesem Adjuvans-assoziiertem Krankheitssyndrom zugeschrieben.

Vergleichbar den Mineralölen in Adjuvantien finden sich einige Medikamente, von denen man annimmt, dass sie einen SLE induzieren können. Gut untersucht ist dies für Hydralazin und Procainamid. Evidenz besteht auch für Carbamazepin, Chlorpromazin, Hydrazin, Isoniazid, Methyldopa, Minocyclin, Penicillamin und Phenytoin (117–119). Vorteil des Pristan induzierten Modells gegenüber SLE-Induktion durch oben genannte Medikamente ist das breitere Spektrum an Antikörpern, das durch Pristan hervorgerufen wird (120).

Parallelen des Mausmodells zeigen sich nicht nur in der Ätiologie, sondern auch im Bereich des Risikoprofils und der Pathogenese. Wie im Menschen verläuft die Erkrankung bei weiblichen Mäusen schwerer (94). Daher wurden für die hier durchgeführten Versuche ausschließlich weibliche Mäuse verwendet.

Übermäßige Produktion von Interferon I spielt eine bedeutende Rolle in der Pathogenese des Pristan-induzierten SLE (Abbildung 39). Auch im Menschen kann eine Therapie mit IFN α zur SLE führen (121). Des Weiteren ist der Interferon-Spiegel in SLE-Erkrankten erhöht (93) und eng mit der Produktion von antinukleären Antikörpern und Schwere der Erkrankung assoziiert (122). Der Pristan-induzierte SLE ist das einzige Mausmodell, das diese Interferonsignatur aufweist.

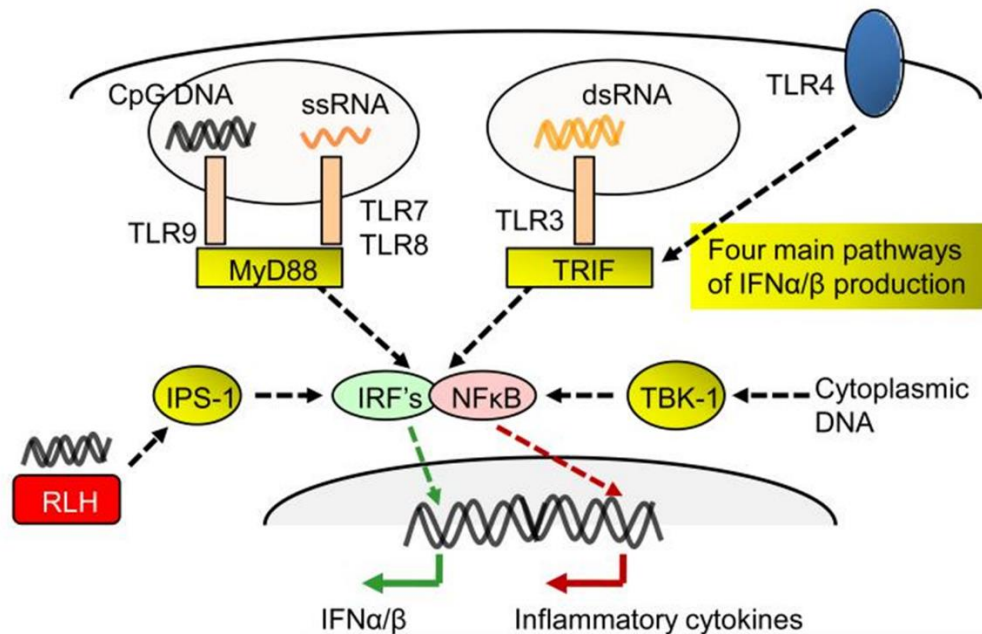


Abbildung 39: Induktion der Produktion von IFN-I und pro-inflammatorischen Zytokinen über TLR 3 und über TRIF (Toll like-Rezeptoren 3 und 4), MyD88 (Toll like-Rezeptoren 7, 8, und 9), IPS-1 (Rig-I like helicases, RLH), und TBK1. dsDNA, Unmethylierte CpG Motive der DNA, single stranded RNA, dsRNA führen über oben dargestellte Signalwege zur Aktivierung der IFN α und β Genexpression. TMPD führt ausschließlich über den TLR7-MyD88-IRF7-Signalweg zu Genexpression von IFN α and β (93).

Durch Injektion in die Peritonealhöhle kann Pristan eine chronische Entzündung in Form von Lipogranulomen hervorrufen und zur Produktion des Chemokins MCP-1 (CCL2) führen. MCP-1 bewirkt, dass unreife Monozyten mit den Oberflächenmarkern CD11b, Ly6C^{high}, Mac-3, F4/80 und CCR2 das Knochenmark verlassen und über den Blutkreislauf die entzündete Peritonealhöhle und ektopes Lymphgewebe erreichen, welches sich reaktiv auf Pristan entwickelt hat (Abbildung 40). Hier produzieren sie nach verminderter Expression von F4/80 in großen Mengen IFN α und IFN β über Aktivierung des MyD88-IRF7-Signalweges nach Erkennung von unmethylierten CpG-Motiven in DNA oder Einzelstrang-RNA. Nach einigen Tagen kommt es zur Apoptose der Zellen (93).

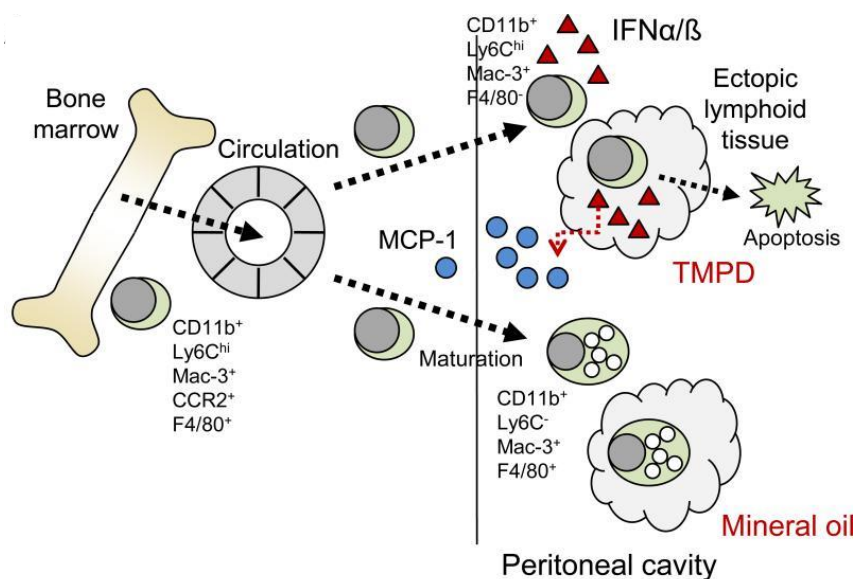


Abbildung 40: Pathogenese des Mausmodell des Pristan-induzierten SLE (93)

In der Folge kann es über IFN α , IFN β , aber auch IFN γ , IL-6 und IL-12 zur Induktion von Autoantikörpern und klinischer Manifestation des SLE kommen. Antikörper richten sich gegen Zellbestandteile wie Doppelstrang-DNA (dsDNA), Einzelstrang-DNA (ssDNA), Chromatin, Sm, Ribonucleoprotein (RNP), Su, und Ribosomen (106), die bei übermäßigem apoptotischen und nekrotischen Zelluntergang vermehrt freigesetzt werden.

In der vorliegenden Arbeit gelang es ein SLE-artiges Krankheitsbild in weiblichen C57/B6-Mäusen zu induzieren. Erfolgreich konnte mittels Pristan eine peritoneale Entzündung mit Ausbildung von Granulomen als Zeichen der Immunantwort ausgelöst werden. Die größte Ausbildung von Granulomen lag perihepatisch vor. Typische Symptome des humanen SLE sind Hauteffloreszenzen, Arthritis, Serositis, renale und cerebrale Störungen sowie Blutbildveränderungen und Ausbildung von Antikörpern. Im Mausmodell der vorliegenden Arbeit konnten einige der oben genannten Merkmale beobachtet werden. So konnten kutane Effloreszenzen, eine renale Leukozyteninfiltration sowie Splenomegalie nachgewiesen werden. Allerdings entwickelten sich weitere typische SLE-Manifestationen wie Arthritis oder Proteinurie nicht. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (91, 93, 120). Dennoch ist von einer erfolgreichen Induktion des chemisch induzierten Pristan-Modells auszugehen, da 80% der behandelten Mäuse mindestens drei der SLE-Manifestationen zeigten.

Die Ausbildung SLE-typischer Symptome nach Pristaninjektion ist abhängig vom Mausstamm, in welchem das Modell induziert wurde (Tabelle 14). Arthritiden konnten bisher nur in BALB/c-, CBA- und DBA/1-Stämmen nachgewiesen werden (123, 124). BALB/c- und SJL-Stämme präsentieren darüber hinaus Immunkomplex-Glomerulonephritiden, wohingegen C57/B6-Stämme eine deutlich mildere mesangiale Glomerulonephritis entwickeln (120, 120, 124–126). Auch bei der Ausbildung von Antikörpern zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Mausstämmen, aber auch zwischen den Individuen innerhalb eines Mausstamms. Im Falle der C57/BL6-Mäuse entwickelt weniger als 1/3 der Mäuse Antikörper gegen Nukleinsäuren. Da uns die TNF-Rezeptor-defizienten Knockoutmäuse, die für die Bearbeitung der untersuchten Fragestellung verwendet werden sollten, nur im C57/BL6-Jackson-Hintergrund zur Verfügung standen, wurde in der vorliegenden Arbeit das Pristan-induzierte SLE-Modell in diesem Mausstamm untersucht. Die relative schwache phänotypische Ausprägung des Pristan-induzierten SLE im C57/BL6-Hintergrund stellt allerdings eine wesentliche Limitation der vorliegenden Arbeit dar, insbesondere, da auch entgegen unserer initialen Hypothese TNFR1-Defizienz nicht zu einer deutlichen Verschlechterung des Krankheitsbildes führte.

Tabelle 14: Manifestation des SLE abhängig vom Mausstamm nach (93) und (91)

| Manifestation | | | C57/B6 | BALB/c | DBA/1 | SJL/J | A.SW |
|------------------------|----------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------|--------|-------|-------|------|
| Arthritis | | | - | +/- | +/- | - | |
| Serositis | | | + | + | | | |
| Nephritis | | | (+) | + | | + | |
| Hypergammaglobulinämie | | | (+) | | | + | + |
| Autoantikörper | Autoantigen | Nukleinsäure | | | | | |
| Anti-Sm* | U1, U2, U4-U6, und U5snRNPs (Proteine B', B, D, E, F, G) | U1, U2, U4, U6, U5 small nuclear RNAs | 10% | + | | | |
| Anti-RNP | U1 snRNP (Proteine A, C, 70K) | U1 small nuclear RNA | 24-25%+ | +/- | +/- | | +/- |
| Anti-ribosomal P* | Ribosomale P0, P1, P2 Proteine | ribosomale RNase | 16-20%+ | - | - | +/- | +/- |
| Anti-Su | Argonaute 2 Protein | Micro-RNAs | 18-25%+ | +/- | +/- | | +/- |
| Anti-dsDNA* | Native DNA | Native DNA | 0%-36% +/- | +/- | - | - | - |
| Anti-Chromatin | DNA-Histon-Komplexe | DNA | 0% | +/- | | | |

4.2 FUNKTIONELLE ROLLE DER TNFR-REZEPTOREN IM MAUSMODELL DES SLE

In klinischen Fallserien zeigen sich immer wieder Exazerbationen autoimmuner Erkrankungen unter der Gabe von TNF-Blockern, so zum Beispiel von Psoriasis (127, 128), kutaner Sarkoidose (129), Morbus Crohn oder Uveitis (130). Tierexperimentelle Daten hatten Hinweise darauf gegeben, dass TNF-induzierte Autoimmunantworten abhängig vom vermittelnden TNF-Rezeptor unterschiedlich ausgeprägt auftreten. Auch in unserer Arbeitsgruppe hatte man nachgewiesen, dass TNFR1 zwar proinflammatorische TNF-Effekte wie die Expression von Zytokinen oder die lokale Leukozyteninfiltration vermittelt, gleichzeitig jedoch auch Autoimmunität begrenzende Funktionen wie die Apoptoseinduktion in (auto-)reaktiven T-Zellen besitzt (86–88). Entsprechend konnte TNFR1-Defizienz die Entwicklung einer Immunkomplex-Glomerulonephritis nicht verhindern (86). Dagegen schützte TNFR2-Defizienz vollständig vor einem Immunkomplex-vermittelten renalen Organschaden (86). Daher entwickelten wir die Hypothese, dass TNFR1 und TNFR2 im Verlauf des SLE pro- und antiinflammatorische Funktionen unterschiedlich vermitteln. Unsere Vermutung aufgrund der Vorarbeiten war, dass TNFR1 proinflammatorische Prozesse auslöst, jedoch auch Autoimmunität begrenzenden und damit entzündungshemmende Effekte besitzt. Dagegen sollte TNFR2, wie im Modell der Immunkomplex-Glomerulonephritis, entscheidend den entzündlichen Gewebeschaden vermitteln. Zur Untersuchung dieser Hypothese wurde in C57/BL6-Mäusen mit genetischer TNFR1- und/oder TNFR2-Defizienz sowie Wildtyp-Tieren als Kontrollen das Modell des Pristan-induzierten SLE untersucht. Nach unserer Hypothese erwarteten wir, dass TNFR1-defiziente Mäuse einen verschlechterten Phänotyp, TNFR2-defiziente Mäuse dagegen ein milderer Krankheitsbild entwickeln.

4.2.1 CHARAKTERISIERUNG DER FRÜHPHASE DES PRISTAN-INDUZierten SLE IN WILDTYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Ein erster Fokus wurde auf die initiale Ausprägung der intraperitonealen Entzündung nach Pristaninjektion gelegt, die die nachfolgende Autoimmunität induziert. In der Peritoneallflüssigkeit, die 28 Tage nach Pristaninjektion gewonnen wurde, lagen mit 61,3% überwiegend vitale, Annexin- und PI-negative Zellen vor. In Bezug auf die relative Häufigkeit von vitalen, (Annexin -/PI -), apoptotische (Annexin +/PI-) und nekrotische (Annexin+/PI+) Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen. Auch war die relative Häufigkeit der einzelnen Leukozytensubpopulationen in der Peritoneallavage hinsichtlich Granulozyten, Makrophagen und dendritische Zellen, welche die

Primärantwort der Immunreaktion prägen, zwischen den Wildtyp-Tieren und TNFR-defizienten Mäusen vergleichbar. Allerdings war die Gesamtzellzahl in der Peritoneallavage in TNFR1-defizienten, TNFR2-defizienten und TNFR1/2-defizienten Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Tieren tendenziell erniedrigt. Es ist daher möglich, dass in den TNFR-defizienten Tieren der SLE in geringerem Maße induziert werden konnte. Die Frühphase der Peritonitis und Granulombildung stellt die entzündliche Fremdkörperreaktion dar, die nachfolgend die Autoimmunreaktion auslöst. Bei Fortschreiten der Entzündungsreaktion kam es zur Ausbildung von Granulomen, wie bereits durch Reeves et al. 2009 beschrieben (93). Hier waren in unserem Modell keine signifikanten Unterschiede zwischen den TNFR-defizienten Mäusen und den Wildtyp-Tieren nachweisbar. Eine Studie von Senaldi et al. hatte hingegen in einem Bakterien-induziertem Modell mit Ausbildung von Granulomen einen Unterschied zwischen TNFR1-defizienten und Wildtyp-Tieren beschrieben (131). Die Autoren injizierten entweder Hitze-abgetötetes *Corynebacterium parvum* oder lebendes *Bacillus Calmette-Guérin* in C57BL/6 Mäuse und induzierten hierbei Granulome. Nach Injektion eines der beiden Bakterien kam es jeweils zu geringerer Ausprägung von Granulomen in TNFR1-Tieren im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe (131). TNFR2 und TNFR1/2-defiziente Mäuse wurde jedoch nicht untersucht, sodass nicht unbedingt von einem spezifisch TNFR1-vermittelten TNF-Effekt ausgegangen werden kann. Des Weiteren kann eingewandt werden, dass die Vergleichbarkeit dieses infektiös induzierten Modells zum durch eine Noxe ausgelösten autoimmunen Modell sehr eingeschränkt ist. Im vorliegenden Pristan-induzierten SLE kann davon ausgegangen werden, dass trotz initial tendenziell verminderter Leukozytenzahl im Peritoneum TNFR-defizienter Tiere bei gleichartiger Ausprägung der peritonealen Granulome im weiteren Verlauf eine weitgehend vergleichbare Entzündungsreaktion unabhängig vom Genotyp ausgelöst werden konnte und spätere Unterschiede in der Ausprägung des SLE-Phänotyps nicht auf ein Ungleichgewicht in der initialen Entzündungsreaktion zurückzuführen sind.

4.2.2 CHARAKTERISIERUNG DER SPÄTPHASE DES PRISTAN-INDUZIERTEN SLE IN WILDTYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Im Weiteren wurde die Spätphase des Pristan-induzierten SLE an Wildtyp- und TNFR-defizienten Mäusen im Alter von 10 Monaten, ein halbes Jahr nach Pristaninjektion, untersucht und Unterschiede in der Ausprägung des Autoimmunphänotyps analysiert.

4.2.2.1 MORTALITÄT UND GEWICHTSENTWICKLUNG DES PRISTAN-INDUZIERTEN SLE IN WILDTYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Die verschiedenen TNFR-Genotypen zeigten hinsichtlich ihres Überlebens keinen Unterschied zu Wildtypkontrollen. Jacob N et. al. züchtete New Zealand Mixed 2328 Mäuse, welche eine Veranlagung zu SLE zeigen, mit einer Defizienz für TNFR1, TNFR2 oder TNFR1/2. Kombinierte Defizienz für TNFR1 und 2 führte in diesen Mäusen zu einer signifikant erhöhten Mortalität im Vergleich zu den anderen Genotypen (132). Zhou et al. kreuzten TNFR1-defiziente Mäuse mit Fas-defizienten C57BL/6-*pr/pr* Mäusen, welche eine systemische Autoimmunerkrankung entwickeln (133). Im Vergleich zum Wildtyp entwickelten TNFR1-defiziente C57BL/6-*pr/pr* Mäuse einen früheren Krankheitsbeginn und litten an höheren Mortalitätsraten (133). Die Autoren folgerten hieraus, dass antiinflammatorische, Autoimmunität begrenzende TNF-Effekte in diesen Mausmodellen über beide TNFR-Rezeptoren oder vorrangig TNFR1 vermittelt werden. Im Pristan-induzierten Modell scheint ein TNFR-defizienter Genotyp hingegen keinen Einfluss auf das Überleben zu haben. Auch in Bezug auf das Gedeihen waren im Vergleich zur Wildtypkontrolle bei allen verschiedenen TNFR-Genotypen keine signifikanten Unterschiede nachweisbar.

4.2.2.2 SYSTEMISCHE AUTOIMMUNREAKTIVITÄT IN DER MILZ

Adjustiert zum Körpergewicht zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich des Auftretens einer Splenomegalie zwischen den unterschiedlichen Genotypen im Alter von 10 Monaten. Bezogen auf die relativen Anteile der leukozytären Subpopulationen zeigten sich jedoch in der Durchflusszytometrie signifikante Unterschiede. Entsprechend unserer Hypothese war in Milzen von TNFR1-defizienten Mäusen ein signifikant erhöhter relativer Anteil an B-Lymphozyten und T-Helferzellen im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe nachweisbar. In Milzen TNFR2-defizienter Mäusen zeigte sich hingegen ein signifikant geringerer Anteil an zytotoxischen T-Zellen im Vergleich zur Wildtypgruppe. Für regulatorische T-Zellen und dendritischen Zellen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Auch Jacob et al. untersuchten Milzen der New Zealand Mixed 2328 Mäuse mit SLE-Phänotyp (132). Im Alter von zwei und sechs Monaten analysierten sie die jeweilige Milzarchitektur der TNFR1-, TNFR2-, TNFR1/2- und Wildtyp-Mäuse. Es zeigte sich zu beiden Zeitpunkten in den Milzen aller TNFR-defizienten Tieren eine verminderte Follikelbildung. Erneut war diese insbesondere in TNFR1/2-defizienten Tieren am deutlichsten ausgeprägt. In TNFR1- und TNFR1/2-defizienten Tieren war im Alter von zwei Monaten zunächst eine geringere Entwicklung von Keimzentren im Vergleich zu Wildtyptieren nachweisbar, im Weiteren zeigten

TNFR1/2-defiziente Mäuse jedoch eine an Zahl vermehrte und ausgeprägtere Entwicklung von Keimzentren im Vergleich zu Wildtyptieren im Alter von sechs Monaten. Vor allem T-Zellen und T-Helferzellen waren in Milzen TNFR1/2-defizienter Mäuse vermehrt, nicht jedoch in TNFR1- oder TNFR2-defizienten Tieren. Dies war in unserem Modell für T-Helferzellen in TNFR1-defizienten Mäusen, nicht aber für TNFR1/2-Mäuse nachweisbar. In Gegensatz zu unserem Modell fanden Jacob et al. keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Infiltration von B-Zellen zwischen den einzelnen Genotypen. An anderen murinen Lupusmodellen gab es bisher keine Untersuchung der splenalen Pathophysiologie von TNFR1 und TNFR2. Deng et al. konnten 2010 nachweisen, dass IgG aus Seren SLE-erkrankter Patienten und Mäusen die Differenzierung von Monozyten zu dendritischen Zellen TNFR1-, aber nicht TNFR2-vermittelt induziert wird (134). Wir konnten hier keine verminderte Aktivierung dendritischer Zellen in der Milz von TNFR1-defizienten Tieren zeigen. Unsere Ergebnisse der splenalen Leukozytenpopulationen stärken jedoch die Projekthypothese, dass TNFR1-Aktivierung durch einen T- und B-Zell hemmenden Effekt eine verstärkte Autoimmunität hemmende TNF-Wirkung vermittelt. Entsprechend war in TNFR1-defizienten Mäusen eine verstärkte Ausbildung von Autoantikörpern und pathogenen Immunkomplexen zu erwarten.

4.2.2.3 ANTIKÖRPERINDUKTION IN PRISTAN-INJIZIERTEN WILDTYP- UND TNFR-DEFIZIENTEN MÄUSEN

Im Alter von 10 Monaten wurden die Seren aller Mäuse 7 Monate nach Pristaninjektion auf die Ausbildung von Antikörpern untersucht. In vorhergehenden Studien hatte sich gezeigt, dass Antikörper teilweise erst nach 6 Monaten ausgebildet werden (106), sodass auf eine Untersuchung zu früheren Zeitpunkten verzichtet wurde. Eine Darstellung der Kinetik war bereits von Satoh et. al. gezeigt worden (91, 106, 135, 136). Signifikante Unterschiede in der Ausbildung einer Hypergammaglobulinämie konnten nicht nachgewiesen werden. Ebenso ergab die ELISA-Analyse der Seren keine signifikanten Unterschiede in der Ausbildung von Auto-Antikörpern gegen anti-Sm, U1snRNP sowie in der Ausbildung des Rheumafaktors zwischen TNFR-defizienten Mäusen im Vergleich zur Wildtypkontrolle. Doch ergab die Bestimmung des für SLE hochspezifischen antinukleären Antikörpers Anti-Sm, welcher sich gegen Bestandteile der snRNPs richtet, eine signifikante, mehr als dreifach vermehrte Autoimmunaktivität in der TNFR1-defizienten Gruppe im Vergleich zur TNFR2-defizienten Mäusen. Allerdings besteht kein Zusammenhang zwischen Höhe der Antikörperkonzentration und Krankheitsaktivität (97). Die TNF-Rezeptoren scheinen aber hinsichtlich der Autoantikörperinduktion im vorliegenden Pristan-induzierten Lupusmodell im Vergleich zum

Wildtyp keinen deutlichen Einfluss zu haben. Die signifikant erhöhten Anti-Sm-Antikörpertiter in TNFR1-defizienten Mäusen im Vergleich zu TNFR2-defizienten Tieren sprechen jedoch erneut für eine Autoimmunaktivität eher begrenzende Funktion von TNFR1. Übereinstimmend konnten Zhou et al. in TNFR1-defizienten C57BL/6-*lpr/lpr* Mäusen verglichen mit C57BL/6-*lpr/lpr*-Mäusen deutlich erhöhte IgG1, IgG2 und IgG anti-dsDNA-Antikörpern nachweisen (133). Zusätzlich muss berücksichtigt werden, dass Antikörper nur in ca. 0-25% der C57BL/6-Mäuse im Modell des Pristan-induzierten Lupus induziert werden können und daher Untersuchungen zur humoralen Autoimmunität in diesem Modell limitiert sind.

4.2.2.4 KUTANE MANIFESTATION DES SLE

Es konnte generell erstmalig die Ausbildung von Hauteffloreszenzen im Modell des Pristan-induzierten SLE bei C57/B6-Mäusen festgestellt werden. Kritisch ist zu hinterfragen, ob es sich hierbei um SLE typische kutane Effloreszenzen handelt oder andere dermatologische Erkrankungen infrage kommen. Für ersteres spricht, dass in der PBS-WT-Gruppe keine Effloreszenzen zu verzeichnen waren und auch für TNFR-defiziente Mäuse die spontane Entwicklung von Hautveränderungen nicht berichtet wurde. Hier sind weitere histologische Analysen vonnöten. Die Ausbildung von Hauteffloreszenzen war in den TNF-Rezeptor-defizienten Tieren im Vergleich zur Wildtypkontrolle nicht unterschiedlich ausgeprägt. In einem anderen Modell injizierten Deng et al. TNFR1-defizienten und TNFR2-defizienten Mäusen intrakutan Serum von SLE-Patienten. In TNFR1-defizienten Mäuse war keine kutane Inflammation nachweisbar, wohingegen TNFR2-defiziente Mäuse eine Entzündung entwickelten, sodass die Autoren von TNFR1-vermittelten Hautläsionen beim SLE ausgehen (134). Diese Ergebnisse stehen in Widerspruch zu unserer These, dass TNFR1 eher Autoimmunität-begrenzende Wirkungen von TNF vermittelt und TNFR2 die Entzündungsreaktion vermittelt. Unsere Ergebnisse zeigten hingegen entsprechend unserer Hypothese einen allerdings nicht signifikanten Trend zu späterem Auftreten von Hautläsionen in TNFR2-defizienten Mäusen.

4.2.2.5 ARTHRITIS

Wie aus der Literatur bekannt und im vorigen Kapitel beschrieben, konnte in unserem Modell mit Induktion des Pristan-vermittelten SLE in C57BL/6-Mäusen keine Arthritis beobachtet werden. Zhou et al. hatte dagegen in TNFR1-defizienten C57BL/6-*pr/pr* Mäusen im Gegensatz zum Wildtyp das Auftreten einer Arthritis mit Hyperplasie der Synovialzellen und mononukleärer Zellinfiltration der Synovia beobachten können (133), was in Übereinstimmung mit unserer Hypothese wieder auf einen Autoimmunität-begrenzenden Effekt von TNFR1

hinweist. Andere Studien haben hingegen auch hierzu widersprüchliche Ergebnisse gezeigt. So tritt in einem Modell der Kollagen-induzierten rheumatoiden Arthritis die Erkrankung in TNFR1-defizienten Mäusen mit deutlich niedriger Inzidenz auf und zeigt einen milderen Phänotyp (137). In einem weiteren Mausmodell fehlen der murinen TNF mRNA endogene 3'UTR Adenosin-Uracil-reiche Elemente und damit vermutlich die Fähigkeit zur translationalen Unterdrückung von TNF mRNA. Dies löst spontan eine Arthritis aus, welche sich in TNFR2-defizienten Mäusen deutlich aggressiver äußert (138). Arntz et al. injizierte im Mausmodell der Kollagen-induzierten Arthritis vor Beginn der Erkrankung einen adenoviralen Vektor, welcher eine short hairpin RNA gegen TNFR1 trägt (139). Hierüber konnte eine dreifach verringerte mRNA Expression erreicht werden. TNF-induzierte NF-kappaB Aktivierung war um 70% reduziert. In der Folge kam es zu einer reduzierten Expression von IL-1 β , IL-6 und Saa1 in der Leber sowie T-bet, GATA-3 und ROR γ T in der Milz. Auch IFN γ (Th1)-, IL-4 (Th2)- und IL-17- (Th17)-produzierende Zellen waren vermindert in der Milz nachweisbar. Insgesamt zeigte sich eine deutlich mildere Arthritis (139). Diese Daten sprechen für eine proinflammatorische TNFR1-Wirkung in verschiedenen autoimmunen Arthritis-Modellen, gleichzeitig konnte jedoch bei Bestehen eines SLE-artigen Krankheitsbildes auch wieder eine immunsuppressive TNFR1-Funktion beschrieben werden, die der Entstehung einer Arthritis entgegenwirkt.

4.2.2.6 HISTOLOGISCHE ANALYSE DES ENDORGANSCHADENS DER LUNGE

Neben den Nieren wurden auch die Lungen histologisch auf eine Leukozyteninfiltration untersucht. Im vorliegenden Modell des Pristan-induzierten Lupus kommt es in C57BL/6-Mäusen zu keinem pulmonalen Phänotyp. Zhou et al. beschrieb in TNFR1-defizienten C57BL/6-*pr/pr* Mäusen eine massive mononukleäre Zellinfiltration, allerdings ohne TNFR2- oder TNFR1/2-defiziente Mäuse bzw. den pulmonalen Wildtypphänotyp zu beschreiben (133). Zwei weitere Studien mit einem Asthma-Mausmodell zeigen Ergebnisse entsprechend unserer Hypothese, die TNFR1 eine anti-inflammatorische Rolle und TNFR2 eher eine proinflammatorische Rolle zuschreiben: Zhu et al. konnten in einem Asthmodell bei adipösen Cpe(fat) Mäusen nachweisen, dass TNFR1-defiziente Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine ausgeprägtere spontane bronchiale Hyperreagibilität entwickeln. Insbesondere IL-17A mRNA-Expression und IL-13 waren in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit erhöht (137). Williams et al. zeigten im selben Modell eine erniedrigte pulmonale mRNA-Expression von Endothelin und trkB in TNFR2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Endothelin- und trkB-Expression ist mit bronchialer Hyperreagibilität assoziiert. Ebenso zeigt sich eine Erniedrigung von IL-17A in der bronchoalveolären Lavageflüssigkeit in TNFR2-defizienten Tieren im Vergleich zum Wildtyp. Dies legt nahe, dass TNFR2 über Endothelin, trkB und IL-17A

proinflammatorisch an der Entwicklung einer bronchialen Hyperreagibilität beteiligt ist (137). Bertok et al. führte allerdings eine therapeutische Studie mit einem TNFR1-spezifischen Antikörper in einem Mausmodell eines mit LPS induzierten Lungenschadens durch und konnte hierdurch entgegen unserer Hypothese Inflammation vermindern (140).

4.2.2.7 ENDORGANSCHADEN DER NIERE

Die renale Endorganschädigung beim SLE ist häufig prognosebestimmend. In den hier untersuchten C57BL/6-Mäusen mit Pristan-induziertem SLE war allerdings eine Proteinurie als klinisches Symptom einer SLE-Nephritis in keinem der Genotypen nachweisbar. Dagegen zeigte sich als frühe Manifestation einer Lupusnephritis eine gegenüber gesunden Wildtypmäusen vermehrte renale Leukozyteninfiltration in Pristan-behandelten Tieren. Die TNF-Rezeptor-defizienten Mäuse wiesen allerdings im Wesentlichen eine vergleichbare Infiltration renaler Leukozyten auf. Nieren der TNFR1-defizienten Gruppe wurden jedoch im Vergleich zur Wildtypgruppe signifikant geringer von Makrophagen infiltriert. In der TNFR2-defizienten Gruppe zeigte sich eine signifikant geringere Infiltration von zytotoxischen T-Zellen im Vergleich zur Wildtypgruppe. Im Übrigen zeigten sich keine Unterschiede für die renale Infiltration von T-Zellen, T-Helfer-Zellen und dendritischen Zellen. Sowohl TNFR1 als auch TNFR2 scheinen somit zur renalen Infiltration einzelner Leukozytensubpopulationen bei der Lupusnephritis beizutragen. Entsprechend der wenigen signifikanten Unterschiede bezüglich der renalen Zellinfiltration von TNFR1- und TNFR2-defizienten Tiere zum Wildtyp, konnten Jacob et al. im New Zealand Black x New Zealand White F(1) Mausmodell des SLE ebenfalls keine Unterschiede in der Ausprägung der Lupusnephritis zwischen TNFR1- und TNFR2-defizienten Mäusen im Vergleich zum Wildtyp, weder immunologisch, pathologisch noch klinisch, nachweisen. Anders als in unserem Modell beobachteten die Autoren jedoch bei TNFR1/2-defizienten Mäuse im Vergleich zum Wildtyp eine ausgeprägtere Proteinurie und diffuse proliferative Glomerulonephritis mit glomerulär deutlich erhöhter Ablagerung von IgG1, IgG2b und C3, infolge derer die Mäuse wenig später starben (132). Die Autoren schreiben damit den beiden TNF-Rezeptoren im NZM 2328 Mausmodell gewisse überlappende entzündungsbegrenzende Funktionen zu. Hierdurch ist bei Fehlen eines Rezeptors eine erfolgreiche Kompensation durch den jeweilig anderen Rezeptor möglich. Zhou et al. wiesen dagegen in TNFR1-defizienten C57BL/6-*pr/pr* Mäusen eine frühere und häufiger auftretende Proteinurie nach. Im Gegensatz zu Wildtyptieren waren in fast allen TNFR1-defizienten C57BL/6-*pr/pr* Mäusen Ablagerungen von Immunkomplexen in Glomeruli nachweisbar (133). Dies lässt entsprechend unserer Hypothese annehmen, dass TNFR1 protektiv in der Pathophysiologie der Lupusnephritis wirkt. Neben der durchflusszytometrischen Darstellung

erfolgte in unserem Modell ebenso eine histologische Untersuchung der Nieren der 10 Monate alten Pristan-injizierten Mäuse, um das Kompartiment der vornehmlichen Infiltration zu bestimmen. Es konnte jedoch korrelierend mit den Ergebnissen von Jacob et al. kein Unterschied innerhalb der TNFR1- und TNFR2-defizienten Genotypen für die Leukozyteninfiltration im Glomerulum und Tubulointerstitium festgestellt werden. Allerdings zeigten auch TNFR1/2-defiziente Mäuse keine verstärkte renale Leukozyteninfiltration.

In anderen Modellen renaler Erkrankungen scheint TNFR2 entsprechend unserer Hypothese jedoch eine proinflammatorische Rolle zu vermitteln: Ramesh und Reeves verabreichten C57BL/6 Mäusen Cisplatin, welches aufgrund seiner Tubulustoxizität akutes Nierenversagen induziert (141). TNFR2-defiziente Mäuse entwickelten eine weniger eingeschränkte Nierenfunktion und zeigten geringere renale Nekrose, Apoptose und Leukozyteninfiltration im Vergleich zu TNFR1-defizienten oder Wildtyp-Tieren. Auch die Expression von TNF und ICAM-1 war vermindert. Daher ist davon auszugehen, dass TNFR2 eine wichtige Rolle in der TNF-vermittelten renalen Cisplatin-induzierten Entzündungsreaktion spielt (141).

In-vivo-Vorarbeiten unserer Gruppe hatten im nephrotoxischen Serumnephritis-Mausmodell nachweisen können, dass die Glomerulonephritis in TNFR1-defizienten Mäusen verzögert mit initial geringerer Proteinurie, geringerer renaler Infiltration und glomerulärer Schädigung abläuft (86). Dies korreliert mit weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe: Isolierte murine Glomeruli wurden ex vivo mit löslichem TNF stimuliert (87). In TNFR1-defizienten nicht jedoch TNFR2-defizienten Glomeruli zeigten sich daraufhin eine verminderte Expression von verschiedenen Zelladhäsionsmolekülen, proinflammatorischen Chemokinen der CXC- und CC-Subfamilien und proinflammatorischen Zytokinen wie Pro-Interleukon-1 β und IL-6 (87). Dies spricht für eine entscheidende Rolle von TNFR1 in der Vermittlung von glomerulärer Entzündung. Im nephrotoxischen Serumnephritismodell hatten sich allerdings im Weiteren in TNFR1-defizienten Mäusen trotz initial verzögertem Phänotyp eine letztendlich zum Wildtyp ähnlich ablaufende Erkrankung gezeigt, während TNFR2-defiziente Mäuse komplett vor der Entwicklung einer Glomerulonephritis geschützt waren (86). Zudem zeigte sich eine verminderte Apoptose von T-Zellen in TNFR1-defizienten Mäusen, was auf einen möglichen zusätzlichen immunsuppressiven TNFR1-Effekt hinweist (86). Die proinflammatorischen TNFR2-abhängigen Mechanismen die offenbar essentiell für die Entwicklung der nephrotoxischen Serumnephritis sind (86), konnten dagegen bisher nicht charakterisiert werden. Die durchgeführten in vitro-Untersuchungen an sTNF-stimulierten Glomeruli zeigen, dass TNFR2 proinflammatorische TNFR1-Funktionen verstärken kann, konnten jedoch keine TNFR-spezifischen inflammatorischen Effekte in Glomeruli nach Stimulation mit sTNF

nachweisen (87). Mäusen, welchen sTNF intraperitoneal injiziert worden war, zeigten bei TNFR1-Defizienz keinerlei glomeruläre Leukozyteninfiltration im Gegensatz zu TNFR2-defizienten Tieren, was nahelegt, dass sTNF Effekte vor allem über TNFR1 vermittelt werden (87). Möglicherweise ist für TNFR2-vermittelte proinflammatorische Effekte in vivo vor allem seine Aktivierung durch mTNF von Bedeutung.

4.3 TNF-REZEPTOR-SPEZIFISCHE THERAPIEANSÄTZE

TNF-Rezeptor-spezifische Antagonisten wurden bisher nicht im SLE, jedoch in verschiedenen Arthritismodellen in kleinen Studien getestet. Sie konzentrieren sich bisher vor allem auf die selektive Inhibition von TNFR1 (142–145). Dabei gibt es zwei Ansatzpunkte: Zum einen nutzt man dominant-negative TNF-Derivate, welche ausschließlich lösliches TNF (sTNF) hemmen und keine Signaltransduktion auslösen. Während TNFR1 überwiegend von sTNF, aber auch von membranständigem (mTNF) aktiviert werden kann, wird TNFR2 vor allem von mTNF vollständig aktiviert (143, 146), (Abbildung 41). Zum anderen wurden TNFR1-spezifische TNF-Derivate oder antagonistische Antikörper entwickelt, die direkt TNFR1 hemmen.

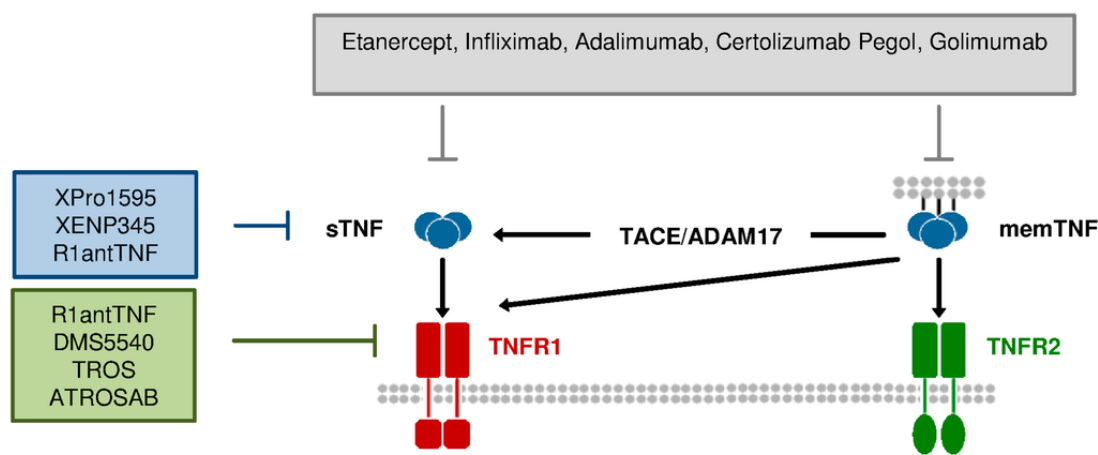


Abbildung 41: Etanercept, Infliximab, Adalimumab, Certolizumab und Golimumab hemmen durch TNF-Blockade unselektiv TNFR1-Liganden und TNFR2-Liganden. Neue Strategien hingegen hemmen selektiv TNFR1 direkt (z.B. R1antTNFR, DMS5540, TROS, ATROSAB) über exklusive Inhibition von sTNF (z.B. XPro1595, XENP345, R1antTNFR), während TNFR2-spezifische Therapien bisher nicht entwickelt wurden. (138) modifiziert.

XPro1595 gehört zu ersterer Klasse selektiver TNF-Inhibitoren, die erstmals 2003 von Steed et al. beschrieben wurde (43). Es handelt sich bei XPro1595 um sTNF mit den Mutationen C31H, Y87H und A145R. XPro1595 bildet über den Austausch von Untereinheiten mit endogenem sTNF Heterotrimere, welche zur Inaktivierung von sTNF führen. Mit mTNF kommt es zu keiner Interaktion. Die antiinflammatorische Wirkung von XPro1595 wurde in

verschiedenen Tiermodellen wie der Arthritis (147), aber auch autoimmuner Enzephalomyelitis (148), Dextran-Natriumsulfat induzierter Colitis (149), *Citrobacter rodentium* induzierter infektiöser Colitis (150), fokaler zerebraler Ischämie (151), spinaler Ischämie (152), Lipopolysaccharid-induzierter Hepatitis (153) nachgewiesen.

R1AntTNF wurde von Shibata et al. 2008 als TNF-Derivat mit selektiver TNFR1-Hemmung identifiziert. Mukai et al. identifizierten weitere R1AntTNF-Derivate (154). Die Affinität von R1antTNF zu TNFR1 entspricht in etwa Wildtyp-TNF (3.3nM vs. 1.4nM). Die Affinität zu TNFR2 ist hingegen deutlich eingeschränkt (92.9µM vs. 2.1nM) (143).

Verschiedene experimentelle Studien demonstrieren einen entzündungshemmenden Effekt dieser selektiven TNFR1-Blockaden. Inwieweit diese jedoch ähnlich wie TNF-Blockade auch entzündungsbegrenzende Autoimmunität limitierende TNF-Funktion inhibiert, ist bisher nicht untersucht. Ob eine selektive TNFR1-Blockade beim SLE therapeutisch effektiver sein könnte, ist ebenfalls bisher nicht untersucht. Die hier erhobenen Daten im Pristan-induzierten SLE-Model konnten jedoch keine proinflammatorische, sondern eher eine entzündungsbegrenzende Funktion von TNFR1 nachweisen. Daher könnte eine TNFR1-Blockade beim SLE möglicherweise auch verstärkt Autoimmunität auslösen.

Dagegen gibt es bisher keine Versuche einer selektiven TNFR2-Blockade. Diese wäre möglicherweise geeignet, selektiv proinflammatorische vor allem durch mTNF-vermittelte Effekte von TNF zu hemmen, ohne immunsuppressive, durch TNFR1-induzierte TNF-Wirkungen zu vermindern.

4.4 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Erstmalig wurde in der vorliegenden Arbeit die funktionelle Rolle von TNFR1 und TNFR2 im Pristan-induzierten SLE an C57BL/6 Mäusen untersucht. TNFR-spezifische Effekte sind gemäß unseren Daten im Pristan-Modell gering oder nur tendenziell vorhanden, sodass davon auszugehen ist, dass die pathophysiologische Rolle von TNF im Modell des Pristan-induzierten SLE zumindest in C57BL/6 Mäusen limitiert ist (Tabelle 15).

Tabelle 15: Zusammenfassung der Phänotypanalyse des Pristan-induzierten SLE in TNFR-defizienten C57BL/6-Mäusen: = : nicht signifikante, ↓ : signifikant geringere, ↑ : signifikant größere Unterschiede der entsprechenden Genotypvergleiche.

| | TNFR1 ^{-/-} vs. WT | TNFR2 ^{-/-} vs. WT | TNFR1 ^{-/-} ; 2 ^{-/-} vs. WT |
|-------------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------|
| Ausbildung von Granulomen absolut/relativ | | | |
| - Peritoneal-Lavage: | | | |
| Zellzahl | =/= | =/= | =/= |
| Leukozyten | =/= | =/= | =/= |
| - Makroskopisch | =/= | =/= | =/= |
| Überleben | = | = | = |
| Gewichtsentwicklung | = | = | = |
| Splenomegalie | = | = | = |
| Leukozytenzahl der Milz | | | |
| - Durchflusszytometrie absolut/relativ | | | |
| B-Zellen | =/↑ | =/= | =/= |
| T-Zellen | =/= | =/↓ | =/= |
| T-Helfer-Zellen | =/↑ | =/= | =/= |
| Zytotoxische T-Zellen | =/= | =/↓ | =/= |
| Regulatorische T-Zellen | =/= | =/= | =/= |
| Dendritische Zellen | =/= | =/= | =/= |
| Antikörper | | | |
| - IgG | =/= | =/= | =/= |
| - RF | =/= | =/= | =/= |
| - Anti-Sm | =/= | =/= | =/= |
| - Anti-snRNP | =/= | =/= | =/= |
| Kutane Effloreszenzen | = | = | = |
| Arthritis | 0 | 0 | 0 |
| Nephritis | | | |
| Proteinurie | 0 | 0 | 0 |
| Leukozyteninfiltration der Niere | | | |
| - Durchflusszytometrie relativ | | | |
| T-Zellen | = | = | = |
| T-Helfer-Zellen | = | = | = |
| Zytotoxische T-Zellen | = | ↓ | = |
| Makrophagen | ↓ | = | = |
| Dendritische Zellen | = | = | = |
| - Histologie | = | = | = |

Aufgrund der pathophysiologischen Nähe zum humanen chemisch induzierten SLE und breiten Ausbildung des Antikörperprofils ist das Pristan-induzierte Mausmodell jedoch dennoch ein interessantes Modell. Für zukünftige Studien ist anzustreben, TNFR-defiziente

Mäuse in einem genetischen Hintergrund zu verwenden, der einen ausgeprägteren Phänotyp im Pristan-induzierten Modell des SLE entwickelt, wie zum Beispiel BALB/c Mäuse. Zudem empfiehlt es sich, die spezifische Rolle von mTNF versus sTNF im Pristan-induzierten SLE-Modell zu untersuchen, z.B. unter Verwendung von ausschließlich mTNF-exprimierten Mäusen (155). Derartige Arbeiten könnten eine proinflammatorische Rolle des mTNF/TNFR2-Signalwegs beim SLE näher charakterisieren und möglicherweise TNFR2 als therapeutisches Target identifizieren, das immunsuppressive Autoimmunität-begrenzende TNFR1-vermittelte Effekte beim Lupus nicht hemmt.

5 LITERATURE CITED

1. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, Scofield L, Reinlib L, Cooper GS. Understanding the epidemiology and progression of systemic lupus erythematosus. *Semin. Arthritis Rheum.* 2010; 39(4):257–68.
2. Chogle AR, Chakravarty A. Cardiovascular events in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis: Emerging concepts, early diagnosis and management. *J Assoc Physicians India* 2007; 55:32–40.
3. Buyon JP, Clancy RM. Neonatal lupus: basic research and clinical perspectives. *Rheum. Dis. Clin. North Am.* 2005; 31(2):299.
4. Simard JF, Costenbader KH. What can epidemiology tell us about systemic lupus erythematosus? *Int. J. Clin. Pract.* 2007; 61(7):1170–80.
5. Grammatikos AP, Tsokos GC. Immunodeficiency and autoimmunity: lessons from systemic lupus erythematosus. *Trends Mol Med* 2012; 18(2):101–8.
6. Boackle SA. Advances in lupus genetics. *Curr Opin Rheumatol* 2013; 25(5):561–8.
7. Deng Y, Zhao J, Sakurai D, Kaufman KM, Edberg JC, Kimberly RP et al. MicroRNA-3148 modulates allelic expression of toll-like receptor 7 variant associated with systemic lupus erythematosus. *PLoS Genet.* 2013; 9(2):e1003336.
8. Sui W, Hou X, Che W, Yang M, Dai Y. The applied basic research of systemic lupus erythematosus based on the biological omics. *Genes Immun.* 2013; 14(3):133–46.
9. Squatrito D, Emmi G, Silvestri E, Ciucciarelli L, D’Elios MM, Prisco D et al. Pathogenesis and potential therapeutic targets in systemic lupus erythematosus: from bench to bedside. *Auto Immun Highlights* 2014; 5(2):33–45.
10. Crow MK. Collaboration, genetic associations, and lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 2008; 358(9):956–61.
11. Rullo OJ, Tsao BP. Recent insights into the genetic basis of systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013; 72(Supplement 2):ii56-ii61.
12. Deapen D, Escalante A, Weinrib L, Horwitz D, Bachman B, Roy-Burman P et al. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1992; 35(3):311–8.
13. Tsokos GC. Systemic lupus erythematosus. *N. Engl. J. Med.* 2011; 365(22):2110–21.
14. Chang C, Gershwin ME. Drugs and autoimmunity--a contemporary review and mechanistic approach. *J. Autoimmun.* 2010; 34(3):75.
15. Gaipf US, Munoz LE, Rödel F, Pausch F, Frey B, Brachvogel B et al. Modulation of the immune system by dying cells and the phosphatidylserine-ligand annexin A5. *Autoimmunity* 2007; 40(4):254–9.

16. Marshak-Rothstein A, Rifkin IR. Immunologically active autoantigens: the role of toll-like receptors in the development of chronic inflammatory disease. *Annu Rev Immunol* 2007; 25:419–41.
17. Migliorini A, Anders H-J. A novel pathogenetic concept-antiviral immunity in lupus nephritis. *Nat Rev Nephrol* 2012; 8(3):183–9.
18. Liu Y, Anders H-J. Lupus nephritis: from pathogenesis to targets for biologic treatment. *Nephron Clin Pract* 2014; 128(3-4):224–31.
19. van Bavel, Casandra C., Fenton KA, Rekvig OP, van der Vlag, Johan, Berden JH. Glomerular targets of nephritogenic autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2008; 58(7):1892–9.
20. Tiffin N, Adeyemo A, Okpechi I. A diverse array of genetic factors contribute to the pathogenesis of Systemic Lupus Erythematosus. *Orphanet J Rare Dis* 2013; 8(1):2.
21. Reichlin M. Cell Injury Mediated by Autoantibodies to Intracellular Antigens. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1995; 76(3):215–9.
22. Allam R, Anders H-J. The role of innate immunity in autoimmune tissue injury. *Current Opinion in Rheumatology* 2008; 20(5):538–44.
23. Borchers AT, Leibushor N, Naguwa SM, Cheema GS, Shoenfeld Y, Gershwin ME. Lupus nephritis: a critical review. *Autoimmun Rev* 2012; 12(2):174–94.
24. Saxena R, Mahajan T, Mohan C. Lupus nephritis: current update. *Arthritis Res Ther* 2011; 13(5):240.
25. Yung S, Chan TM. Autoantibodies and Resident Renal Cells in the Pathogenesis of Lupus Nephritis: Getting to Know the Unknown. *Clinical and Developmental Immunology* 2012; 2012(2):1–13.
26. Kulkarni OP, Anders H-J. Lupus nephritis. How latest insights into its pathogenesis promote novel therapies. *Current Opinion in Rheumatology* 2012; 24(5):457–65.
27. Weening JJ, D'Agati VD, Schwartz MM, Seshan SV, Alpers CE, Appel GB et al. The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2004; 15(2):241–50.
28. Nived O, Johansen PB, Sturfelt G. Standardized ultraviolet-A exposure provokes skin reaction in systemic lupus erythematosus. *Lupus* 1993; 2(4):247–50.
29. Hess EV, Farhey Y. Epidemiology, genetics, etiology, and environment relationships of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 1994; 6(5):474–80.
30. Pawlak CR, Witte T, Heiken H, Hundt M, Schubert J, Wiese B et al. Flares in patients with systemic lupus erythematosus are associated with daily psychological stress. *Psychother Psychosom* 2003; 72(3):159–65.
31. Greco CM, Rudy TE, Manzi S. Adaptation to chronic pain in systemic lupus erythematosus: applicability of the multidimensional pain inventory. *Pain Med* 2003; 4(1):39–50.

32. Renner R, Sticherling M. The different faces of cutaneous lupus erythematosus. *G Ital Dermatol Venereol* 2009; 144(2):135–47.
33. Frieri M. Mechanisms of disease for the clinician: systemic lupus erythematosus. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 2013; 110(4):228–32.
34. Tan EM, Cohen AS, Fries JF, Masi AT, McShane DJ, Rothfield NF et al. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1982; 25(11):1271–7.
35. Hochberg MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 1997; 40(9):1725.
36. Petri M, Orbai A-M, Alarcón GS, Gordon C, Merrill JT, Fortin PR et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* 2012; 64(8):2677–86.
37. Anders H-J. Standards und Perspektiven in der Behandlung der Lupusnephritis. *Dtsch med Wochenschr* 2013; 138(31/32):1582–4.
38. Pons-Estel GJ, Alarcón GS, McGwin G, Danila MI, Zhang J, Bastian HM et al. Protective effect of hydroxychloroquine on renal damage in patients with lupus nephritis: LXV, data from a multiethnic US cohort. *Arthritis Rheum* 2009; 61(6):830–9.
39. Bertsias GK, Tektonidou M, Amoura Z, Aringer M, Bajema I, Berden, Jo H M et al. Joint European League Against Rheumatism and European Renal Association-European Dialysis and Transplant Association (EULAR/ERA-EDTA) recommendations for the management of adult and paediatric lupus nephritis. *Ann Rheum Dis* 2012; 71(11):1771–82.
40. Hahn BH, McMahon MA, Wilkinson A, Wallace WD, Daikh DI, FitzGerald JD et al. American College of Rheumatology guidelines for screening, treatment, and management of lupus nephritis. *Arthritis Care Res* 2012; 64(6):797–808.
41. Dooley M, Houssiau F, Aranow C, D'Cruz D, Askanase A, Roth D et al. Effect of belimumab treatment on renal outcomes: results from the phase 3 belimumab clinical trials in patients with SLE. *Lupus* 2012; 22(1):63–72.
42. Murphy G, Lisnevskaja L, Isenberg D. Systemic lupus erythematosus and other autoimmune rheumatic diseases: challenges to treatment. *The Lancet* 2013; 382(9894):809–18.
43. Steed PM, Tansey MG, Zalevsky J, Zhukovsky EA, Desjarlais JR, Szymkowski DE et al. Inactivation of TNF signaling by rationally designed dominant-negative TNF variants. *Science* 2003; 301(5641):1895–8.
44. Marian V, Anolik JH. Treatment targets in systemic lupus erythematosus: biology and clinical perspective. *Arthritis Res Ther* 2012; 14(Suppl 4):S3.
45. Wofsy D. Recent progress in conventional and biologic therapy for systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* 2013; 72(Supplement 2):ii66–ii68.
46. Windt R, Glaeske G, Hoffmann F. Versorgung mit TNF- α -Blockern und regionale Unterschiede im Jahr 2010. *Z Rheumatol* 2011; 70(10):874–81.

47. Davas EM, Tsirogianni A, Kappou I, Karamitsos D, Economidou I, Dantis PC. Serum IL-6, TNFalpha, p55 srTNFalpha, p75srTNFalpha, srIL-2alpha levels and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol* 1999; 18(1):17–22.
48. Herrera-Esparza R, Barbosa-Cisneros O, Villalobos-Hurtado R, Avalos-Diaz E. Renal expression of IL-6 and TNFalpha genes in lupus nephritis. *Lupus* 1998; 7(3):154–8.
49. Aringer M, Smolen JS. Efficacy and safety of TNF-blocker therapy in systemic lupus erythematosus. *Expert Opin Drug Saf* 2008; 7(4):411–9.
50. Yokoyama H, Kreft B, Kelley VR. Biphasic increase in circulating and renal TNF-alpha in MRL-lpr mice with differing regulatory mechanisms. *Kidney Int* 1995; 47(1):122–30.
51. Edwards, C K 3rd, Zhou T, Zhang J, Baker TJ, De M, Long RE et al. Inhibition of superantigen-induced proinflammatory cytokine production and inflammatory arthritis in MRL-lpr/lpr mice by a transcriptional inhibitor of TNF-alpha. *J Immunol* 1996; 157(4):1758–72.
52. Segal R, Dayan M. Suppression of experimental systemic lupus erythematosus (SLE) in mice via TNF inhibition by an anti-TNFalpha monoclonal antibody and by pentoxiphylline. *Lupus* 2001; 10(1):23–31.
53. Jacob CO, McDevitt HO. Tumour necrosis factor-alpha in murine autoimmune 'lupus' nephritis. *Nature* 1988; 331(6154):356–8.
54. Aringer M, Houssiau F, Gordon C, Graninger WB, Voll RE, Rath E et al. Adverse events and efficacy of TNF-alpha blockade with infliximab in patients with systemic lupus erythematosus: long-term follow-up of 13 patients. *Rheumatology (Oxford)* 2009; 48(11):1451–4.
55. Hayat SJ, Uppal SS, Narayanan Nampoory, M R, Johny KV, Gupta R, Al-Oun M. Safety and efficacy of infliximab in a patient with active WHO class IV lupus nephritis. *Clin Rheumatol* 2007; 26(6):973–5.
56. Aringer M, Graninger WB, Steiner G, Smolen JS. Safety and efficacy of tumor necrosis factor alpha blockade in systemic lupus erythematosus: an open-label study. *Arthritis Rheum* 2004; 50(10):3161–9.
57. Norman R, Greenberg RG, Jackson JM. Case reports of etanercept in inflammatory dermatoses. *J Am Acad Dermatol* 2006; 54(3 Suppl 2):42.
58. Charles PJ, Smeenk RJ, Jong J de, Feldmann M, Maini RN. Assessment of antibodies to double-stranded DNA induced in rheumatoid arthritis patients following treatment with infliximab, a monoclonal antibody to tumor necrosis factor alpha: findings in open-label and randomized placebo-controlled trials. *Arthritis Rheum* 2000; 43(11):2383–90.
59. Mohan AK, Edwards ET, Cote TR, Siegel JN, Braun MM. Drug-induced systemic lupus erythematosus and TNF-alpha blockers. *Lancet* 2002; 360(9333):646.
60. Eriksson C, Engstrand S, Sundqvist K-G, Rantapaa-Dahlqvist S. Autoantibody formation in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNF alpha. *Ann Rheum Dis* 2005; 64(3):403–7.

61. Bandt M de. Lessons for lupus from tumour necrosis factor blockade. *Lupus* 2006; 15(11):762–7.
62. Beigel F, Schnitzler F, Paul Laubender R, Pfennig S, Weidinger M, Göke B et al. Formation of antinuclear and double-strand DNA antibodies and frequency of lupus-like syndrome in anti-TNF- α antibody-treated patients with inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 2011; 17(1):91–8.
63. Puertas-Abreu E, Polanco E, Azocar M, Mundarain L, Nuñez-Sotelo C, Montaña R et al. Onset of lupus like syndrome in patients with spondyloarthritis treated with anti-TNF- α . *Int Arch Med* 2012; 5(1):7.
64. Williams VL, Cohen PR. TNF alpha antagonist-induced lupus-like syndrome: report and review of the literature with implications for treatment with alternative TNF alpha antagonists. *International Journal of Dermatology* 2011; 50(5):619–25.
65. Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Munoz S, Soria N, Galiana D, Bertolaccini L et al. Autoimmune diseases induced by TNF-targeted therapies: analysis of 233 cases. *Medicine (Baltimore)* 2007; 86(4):242–51.
66. Sifuentes Giraldo, Walter A., Ahijón Lana M, García Villanueva, María Jesús, González García C, Vázquez Diaz M. Chilblain lupus induced by TNF- α antagonists: a case report and literature review. *Clin Rheumatol* 2012; 31(3):563–8.
67. Stokes MB, Foster K, Markowitz GS, Ebrahimi F, Hines W, Kaufman D et al. Development of glomerulonephritis during anti-TNF-alpha therapy for rheumatoid arthritis. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20(7):1400–6.
68. Haake H, Koneke J, Amann K, Vom Dahl J, Janssen U. Development of systemic lupus erythematosus with focal proliferative lupus nephritis during anti-TNF-alpha therapy for psoriatic arthritis. *Med Klin (Munich)* 2007; 102(10):852–7.
69. Bandt M de, Sibilia J, Le Loet X, Prouzeau S, Fautrel B, Marcelli C et al. Systemic lupus erythematosus induced by anti-tumour necrosis factor alpha therapy: a French national survey. *Arthritis Res Ther* 2005; 7(3):51.
70. Debandt M, Vittecoq O, Descamps V, Le Loet X, Meyer O. Anti-TNF-alpha-induced systemic lupus syndrome. *Clin Rheumatol* 2003; 22(1):56–61.
71. Gordon C, Ranges GE, Greenspan JS, Wofsy D. Chronic therapy with recombinant tumor necrosis factor-alpha in autoimmune NZB/NZW F1 mice. *Clin Immunol Immunopathol* 1989; 52(3):421–34.
72. Kontoyiannis D, Kollias G. Accelerated autoimmunity and lupus nephritis in NZB mice with an engineered heterozygous deficiency in tumor necrosis factor. *Eur J Immunol* 2000; 30(7):2038–47.
73. Scherer K, Spoerl D, Bircher AJ. Adverse drug reactions to biologics. *J Dtsch Dermatol Ges* 2010; 8(6):411–26.

74. Kollias G, Kontoyiannis D. Role of TNF/TNFR in autoimmunity: specific TNF receptor blockade may be advantageous to anti-TNF treatments. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2002; 13(4-5):315–21.
75. Coley WB. The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. 1893. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1991; (262):3–11.
76. Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1975; 72(9):3666–70.
77. Tracey KJ, Beutler B, Lowry SF, Merryweather J, Wolpe S, Milsark IW et al. Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 1986; 234(4775):470–4.
78. Cabal-Hierro L, Lazo PS. Signal transduction by tumor necrosis factor receptors. *Cell Signal* 2012; 24(6):1297–305.
79. Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech* 2000; 50(3):184–95.
80. Vielhauer V, Mayadas TN. Functions of TNF and its receptors in renal disease: distinct roles in inflammatory tissue injury and immune regulation. *Semin Nephrol* 2007; 27(3):286–308.
81. Naude, Petrus J W, den Boer, Johan A, Luiten, Paul G M, Eisel, Ulrich L M. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J* 2011; 278(6):888–98.
82. Richter C, Messerschmidt S, Holeiter G, Tepperink J, Osswald S, Zappe A et al. The Tumor Necrosis Factor Receptor Stalk Regions Define Responsiveness to Soluble versus Membrane-Bound Ligand. *Molecular and Cellular Biology* 2012; 32(13):2515–29.
83. Kollias G. TNF pathophysiology in murine models of chronic inflammation and autoimmunity. *Semin Arthritis Rheum* 2005; 34(5 Suppl1):3–6.
84. Twu Y-C, Gold MR, Teh H-S. TNFR1 delivers pro-survival signals that are required for limiting TNFR2-dependent activation-induced cell death (AICD) in CD8+ T cells. *Eur. J. Immunol.* 2011; 41(2):335–44.
85. Tartaglia LA, Pennica D, Goeddel DV. Ligand passing: the 75-kDa tumor necrosis factor (TNF) receptor recruits TNF for signaling by the 55-kDa TNF receptor. *J. Biol. Chem.* 1993; 268(25):18542–8.
86. Vielhauer V, Stavrakis G, Mayadas TN. Renal cell-expressed TNF receptor 2, not receptor 1, is essential for the development of glomerulonephritis. *J Clin Invest* 2005; 115(5):1199–209.
87. Taubitz A, Schwarz M, Eltrich N, Lindenmeyer MT, Vielhauer V, Tansey MG. Distinct Contributions of TNF Receptor 1 and 2 to TNF-Induced Glomerular Inflammation in Mice. *PLoS ONE* 2013; 8(7):e68167.
88. Schwarz M, Taubitz A, Eltrich N, Mulay SR, Allam R, Vielhauer V. Analysis of TNF-mediated recruitment and activation of glomerular dendritic cells in mouse kidneys by compartment-specific flow cytometry. *Kidney Int* 2013; 84(1):116–29.

89. Leiss H, Niederreiter B, Bandur T, Schwarzecker B, Blüml S, Steiner G et al. Pristane-induced lupus as a model of human lupus arthritis: involvement of autoantibodies, internal organ and joint inflammation. *Lupus* 2013; 22(8):778–92.
90. Bigazzi PE. Murine lupus induced by tetramethylpentadecane: an animal model of systemic human autoimmunity. *Clin. Immunol.* 2005; 114(2):97–9.
91. Satoh M, Reeves WH. Induction of lupus-associated autoantibodies in BALB/c mice by intraperitoneal injection of pristane. *J Exp Med* 1994; 180(6):2341–6.
92. Zhuang H, Szeto C, Han S, Yang L, Reeves WH. Animal Models of Interferon Signature Positive Lupus. *Front Immunol* 2015; 6:291.
93. Reeves WH, Lee PY, Weinstein JS, Satoh M, Lu L. Induction of autoimmunity by pristane and other naturally occurring hydrocarbons. *Trends in Immunology* 2009; 30(9):455–64.
94. Smith DL, Dong X, Du S, Oh M, Singh RR, Voskuhl RR. A female preponderance for chemically induced lupus in SJL/J mice. *Clin Immunol* 2007; 122(1):101–7.
95. Austin HA, Muenz LR, Joyce KM, Antonovych TT, Balow JE. Diffuse proliferative lupus nephritis: Identification of specific pathologic features affecting renal outcome. *Kidney Int* 1984; 25(4):689–95.
96. Shmerling RH, Delbanco TL. The rheumatoid factor: an analysis of clinical utility. *Am. J. Med.* 1991; 91(5):528–34.
97. Lyons R, Narain S, Nichols C, Satoh M, Reeves WH. Effective use of autoantibody tests in the diagnosis of systemic autoimmune disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005; 1050:217–28.
98. Peng SL. Experimental use of murine lupus models. *Methods Mol. Med.* 2004; 102:227–72.
99. Perry D, Sang A, Yin Y, Zheng Y-Y, Morel L. Murine Models of Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2011; 2011(6):1–19.
100. Rottman JB, Willis CR. Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis. *Vet. Pathol.* 2010; 47(4):664–76.
101. Dincsoy HP, Weesner RE, MacGee J. Lipogranulomas in non-fatty human livers. A mineral oil induced environmental disease. *Am. J. Clin. Pathol.* 1982; 78(1):35–41.
102. Bandla HP, Davis SH, Hopkins NE. Lipoid pneumonia: a silent complication of mineral oil aspiration. *Pediatrics* 1999; 103(2):E19.
103. Sverdrup B, Källberg H, Bengtsson C, Lundberg I, Padyukov L, Alfredsson L et al. Association between occupational exposure to mineral oil and rheumatoid arthritis: results from the Swedish EIRA case-control study. *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7(6):303.
104. Dahlgren J, Takhar H, Anderson-Mahoney P, Kotlerman J, Tarr J, Warshaw R. Cluster of systemic lupus erythematosus (SLE) associated with an oil field waste site: a cross sectional study. *Environ Health* 2007; 6:8.

105. Whitehouse M. Oily adjuvants and autoimmunity: now time for reconsideration? *Lupus* 2012; 21(2):217–22.
106. Satoh M, Kuroda Y, Yoshida H, Behney KM, Mizutani A, Akaogi J et al. Induction of lupus autoantibodies by adjuvants. *J. Autoimmun.* 2003; 21(1):1–9.
107. Kuroda Y, Nacionales DC, Akaogi J, Reeves WH, Satoh M. Autoimmunity induced by adjuvant hydrocarbon oil components of vaccine. *Biomed. Pharmacother.* 2004; 58(5):325–37.
108. Koppang EO, Bjerkas I, Haugarvoll E, Chan, Edward K L, Szabo NJ, Ono N et al. Vaccination-induced systemic autoimmunity in farmed Atlantic salmon. *J Immunol* 2008; 181(7):4807–14.
109. Shoenfeld Y, Agmon-Levin N. 'ASIA' - autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants. *J. Autoimmun.* 2011; 36(1):4–8.
110. Phillips CJ, Matyas GR, Hansen CJ, Alving CR, Smith TC, Ryan, Margaret A K. Antibodies to squalene in US Navy Persian Gulf War veterans with chronic multisymptom illness. *Vaccine* 2009; 27(29):3921–6.
111. Gherardi RK, Authier FJ. Macrophagic myofasciitis: characterization and pathophysiology. *Lupus* 2012; 21(2):184–9.
112. Blank M, Israeli E, Shoenfeld Y. When APS (Hughes syndrome) met the autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *Lupus* 2012; 21(7):711–4.
113. Soriano A, Verrecchia E, Marinaro A, Giovinale M, Fonnesu C, Landolfi R et al. Giant cell arteritis and polymyalgia rheumatica after influenza vaccination: report of 10 cases and review of the literature. *Lupus* 2012; 21(2):153–7.
114. Cerpa-Cruz S, Paredes-Casillas P, Landeros Navarro E, Bernard-Medina AG, Martínez-Bonilla G, Gutiérrez-Ureña S. Adverse events following immunization with vaccines containing adjuvants. *Immunol. Res.* 2013; 56(2-3):299–303.
115. Colafrancesco S, Perricone C, Priori R, Valesini G, Shoenfeld Y. Sjögren's syndrome: another facet of the autoimmune/inflammatory syndrome induced by adjuvants (ASIA). *J. Autoimmun.* 2014; 51:10–6.
116. Jara LJ, Medina G, Gómez-Bañuelos E, Saavedra MA, Vera-Lastra O. Still's disease, lupus-like syndrome, and silicone breast implants. A case of 'ASIA' (Shoenfeld's syndrome). *Lupus* 2012; 21(2):140–5.
117. D'Cruz D. Autoimmune diseases associated with drugs, chemicals and environmental factors. *Toxicol. Lett.* 2000; 112-113:421–32.
118. Rubin RL. Drug-induced lupus. *Toxicology* 2005; 209(2):135–47.
119. Vedove CD, Del Giglio M, Schena D, Girolomoni G. Drug-induced lupus erythematosus. *Arch. Dermatol. Res.* 2009; 301(1):99–105.

120. Satoh M, Richards HB, Shaheen VM, Yoshida H, Shaw M, Naim JO et al. Widespread susceptibility among inbred mouse strains to the induction of lupus autoantibodies by pristane. *Clin. Exp. Immunol.* 2000; 121(2):399–405.
121. Ioannou Y, Isenberg DA. Current evidence for the induction of autoimmune rheumatic manifestations by cytokine therapy. *Arthritis Rheum* 2000; 43(7):1431–42.
122. Pascual V, Farkas L, Banchereau J. Systemic lupus erythematosus: all roads lead to type I interferons. *Curr Opin Immunol* 2006; 18(6):676–82.
123. Leiss H, Niederreiter B, Bandur T, Schwarzecker B, Bluml S, Steiner G et al. Pristane-induced lupus as a model of human lupus arthritis: evolution of autoantibodies, internal organ and joint inflammation. *Lupus* 2013; 22(8):778–92.
124. Li J-Z, Ding J, Merim B, Li H-W, Zhang Y, Shen H et al. Study on experimental systemic lupus erythematosus mouse model induced by pristane. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi* 2011; 27(2):119–22.
125. Barnes JL, Williams NL, Ketheesan N. Susceptibility to *Burkholderia pseudomallei* is associated with host immune responses involving tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) and TNF receptor-2 (TNFR2). *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2008; 52(3):379–88.
126. Landauer K, Unutmaz C, Egli S, Berger V, Lais S, Liebig T et al. Process development of ATROSAB, an anti TNFR1 Monoclonal Antibody: in three steps from research to GMP. *BMC Proc* 2011; 5 Suppl 8:P42.
127. Ko JM, Gottlieb AB, Kerbleski JF. Induction and exacerbation of psoriasis with TNF-blockade therapy: a review and analysis of 127 cases. *J Dermatolog Treat* 2009; 20(2):100–8.
128. Barthel C, Biedermann L, Frei P, Vavricka SR, Kündig T, Fried M et al. Induction or exacerbation of psoriasis in patients with Crohn's disease under treatment with anti-TNF antibodies. *Digestion* 2014; 89(3):209–15.
129. Santos G, Sousa LE, João, Alexandre Miguel Bruno Lopes. Exacerbation of recalcitrant cutaneous sarcoidosis with adalimumab--a paradoxical effect? A case report. *An Bras Dermatol* 2013; 88(6 Suppl 1):26–8.
130. Wendling D, Prati C. Paradoxical effects of anti-TNF- α agents in inflammatory diseases. *Expert Rev Clin Immunol* 2014; 10(1):159–69.
131. Senaldi G, Yin S, Shaklee CL, Piguet PF, Mak TW, Ulich TR. *Corynebacterium parvum*- and *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin-induced granuloma formation is inhibited in TNF receptor I (TNF-RI) knockout mice and by treatment with soluble TNF-RI. *J Immunol* 1996; 157(11):5022–6.
132. Jacob N, Yang H, Pricop L, Liu Y, Gao X, Zheng SG et al. Accelerated pathological and clinical nephritis in systemic lupus erythematosus-prone New Zealand Mixed 2328 mice doubly deficient in TNF receptor 1 and TNF receptor 2 via a Th17-associated pathway. *J. Immunol.* 2009; 182(4):2532–41.

133. Zhou T, Edwards CK3, Yang P, Wang Z, Bluethmann H, Mountz JD. Greatly accelerated lymphadenopathy and autoimmune disease in lpr mice lacking tumor necrosis factor receptor I. *J Immunol* 1996; 156(8):2661–5.
134. Deng G-M, Liu L, Kyttaris VC, Tsokos GC. Lupus serum IgG induces skin inflammation through the TNFR1 signaling pathway. *J Immunol* 2010; 184(12):7154–61.
135. Satoh M, Bjerkas I, Haugarvoll E, Chan, Edward K L, Szabo NJ, Jirillo E et al. Polyclonal hypergammaglobulinemia and autoantibody production induced by vaccination in farmed Atlantic salmon. *Fish Shellfish Immunol* 2011; 30(4-5):1080–6.
136. Satoh M, Kuroda Y, Yoshida H, Behney KM, Mizutani A, Akaogi J et al. Induction of lupus autoantibodies by adjuvants. *J Autoimmun* 2003; 21(1):1–9.
137. Mori L, Iselin S, Libero G de, Lesslauer W. Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice. *J Immunol* 1996; 157(7):3178–82.
138. Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, Cominelli F, Kollias G. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity* 1999; 10(3):387–98.
139. Arntz OJ, Geurts J, Veenbergen S, Bennink MB, van den Brand, Ben T, Abdollahi-Roodsaz S et al. A crucial role for tumor necrosis factor receptor 1 in synovial lining cells and the reticuloendothelial system in mediating experimental arthritis. *Arthritis Res. Ther.* 2010; 12(2):R61.
140. Bertok S, Wilson MR, Morley PJ, Wildt R de, Bayliffe A, Takata M. Selective inhibition of intra-alveolar p55 TNF receptor attenuates ventilator-induced lung injury. *Thorax* 2012; 67(3):244–51.
141. Ramesh G, Reeves WB. TNFR2-mediated apoptosis and necrosis in cisplatin-induced acute renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 285(4):8.
142. Kontermann RE, Scheurich P, Pfizenmaier K. Antagonists of TNF action: clinical experience and new developments. *Expert Opin Drug Discov* 2009; 4(3):279–92.
143. Fischer R, Kontermann R, Maier O. Targeting sTNF/TNFR1 Signaling as a New Therapeutic Strategy. *Antibodies* 2015; 4(1):48–70.
144. Tansey MG, Szymkowski DE. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. *Drug Discov. Today* 2009; 14(23-24):1082–8.
145. van Hauwermeiren F, Vandenbroucke RE, Libert C. Treatment of TNF mediated diseases by selective inhibition of soluble TNF or TNFR1. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 2011; 22(5-6):311–9.
146. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell* 1995; 83(5):793–802.

147. Zalevsky J, Secher T, Ezhevsky SA, Janot L, Steed PM, O'Brien C et al. Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection. *J Immunol* 2007; 179(3):1872–83.
148. Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE et al. Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain* 2011; 134(Pt 9):2736–54.
149. Huang S-C, Lee C-t, Chung B-c. Tumor necrosis factor suppresses NR5A2 activity and intestinal glucocorticoid synthesis to sustain chronic colitis. *Sci Signal* 2014; 7(314):ra20.
150. Nyagode BA, Jahangardi R, Merrell MD, Tansey MG, Morgan ET. Selective effects of a therapeutic protein targeting tumor necrosis factor- α on cytochrome P450 regulation during infectious colitis: Implications for disease-dependent drug-drug interactions. *Pharmacol Res Perspect* 2014; 2(1):e00027.
151. Clausen BH, Degn M, Martin NA, Couch Y, Karimi L, Ormhøj M et al. Systemically administered anti-TNF therapy ameliorates functional outcomes after focal cerebral ischemia. *J Neuroinflammation* 2014; 11(1):203.
152. Novrup HG, Bracchi-Ricard V, Ellman DG, Ricard J, Jain A, Runko E et al. Central but not systemic administration of XPro1595 is therapeutic following moderate spinal cord injury in mice. *J Neuroinflammation* 2014; 11(1):159.
153. Olleros ML, Vesin D, Fotio AL, Santiago-Raber M-L, Tauzin S, Szymkowski DE et al. Soluble TNF, but not membrane TNF, is critical in LPS-induced hepatitis. *J Hepatol* 2010; 53(6):1059–68.
154. Mukai Y, Nakamura T, Yoshioka Y, Shibata H, Abe Y, Nomura T et al. Fast binding kinetics and conserved 3D structure underlie the antagonistic activity of mutant TNF: useful information for designing artificial proteo-antagonists. *J. Biochem.* 2009; 146(2):167–72.
155. Ruuls SR, Hoek RM, Ngo VN, McNeil T, Lucian LA, Janatpour MJ et al. Membrane-bound TNF supports secondary lymphoid organ structure but is subservient to secreted TNF in driving autoimmune inflammation. *Immunity* 2001; 15(4):533–43.

6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

| | |
|-------------|-------------------------------------------------------|
| 6-OHDA | 6-Hydroxydopamine |
| ACP5 | Acid phosphatase 5, tartrate resistant |
| ACR | American College of Rheumatology |
| AEC | 3-Amino-9-ethylcarbazol |
| AFF1 | AF4/FMR2 family member 1 |
| ALT | Alanine transaminase |
| ANA | Anti-Nuclear Antibody |
| ANCA | Anti-Neutrophil Cytoplasmic Antibody |
| ANOVA | Analysis of Variance |
| AP-1 | Activator Protein 1 |
| APC | Allophycocyanin |
| ASIA | Autoimmune/Inflammatory Syndrome Induced by Adjuvants |
| AST | Aspartat-Aminotransferase |
| ATG5 | Autophagy protein 5 |
| B220 | Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C |
| Bank1 | B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 |
| BCG | Bacillus Calmette-Guérin |
| BLK | B lymphocyte kinase/ Tyrosine-protein kinase |
| BLyS | B-cell activating factor |
| BSA | Bovine serum albumin |
| C | Complement component |
| CCI(4) | Tetrachlorkohlenstoff |
| CCR2 | C-C chemokine receptor type 2 |
| CD | cluster of differentiation |
| CED | Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen |
| CH50 | Total complement activity |
| CHO-Zellen | Chinese hamster ovary cell |
| clAP1/BIRC2 | Baculoviral IAP repeat-containing protein 2 |
| clAP2/BIRC3 | Baculoviral IAP repeat-containing protein3 |
| ConA | Concanavalin A |
| Cpe | Carboxypeptidase E |
| CRP | C-reactive protein |
| CSF-1 | Colony stimulating factor 1 |
| DD | Death domain |
| DMSO | Dimethyl sulfoxide |
| DNA | Deoxyribonucleic acid |
| DNASE1 | Deoxyribonuclease I |
| DNASE1L3 | Deoxyribonuclease I-like 3 |
| dsDNA | double stranded DNA |

| | |
|-----------------|---------------------------------------------------------------|
| EAE | Experimental autoimmune encephalomyelitis |
| EBV | Epstein–Barr virus |
| EDTA | Ethylenediaminetetraacetic acid |
| ELAM-1 | Endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| ETS1 | Protein C-ets-1 |
| F1 | Filial 1 |
| F4/80/ EMR1 | EGF-like module-containing mucin-like hormone receptor-like 1 |
| FACS | Fluorescence-activated cell sorting |
| FADD | Fas-Associated protein with Death Domain |
| FAS | Fatty acid synthase |
| FCGR2 | Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II |
| FITC | Fluorescein isothiocyanate |
| FOXP3 | Forkhead box P3 |
| GATA-3 | Trans-acting T-cell-specific transcription factor |
| GM-CSF | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor |
| HBSS | Hanks' Balanced Salt Solution |
| HEK293 T-Zellen | Human Embryonic Kidney 293 T-cells |
| HLA | Human leukocyte antigen |
| HRP | Horseradish peroxidase |
| HSV | Herpes simplex virus |
| ICAM-1 | Intercellular Adhesion Molecule 1 |
| IFIH1 | Interferon induced with helicase C domain 1 |
| IFN | Interferon |
| IgG | Immunoglobulin G |
| IKK | IκB kinase |
| IKZF1 | Ikaros family zinc finger protein 1 |
| IL | Interleukin 1 |
| IPS-1 | interferon-beta promoter stimulator 1 |
| IRAK1 | Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 |
| IRF | Interferon regulatory factor |
| ISR | Injection site reaction |
| ITGAL | Integrin, alpha L |
| ITGAM | Integrin alpha M |
| LDH | Lactate dehydrogenase |
| Ly6 | Lymphocyte antigen 6 complex |
| LYN | LYN proto-oncogene |
| MAPK3 | Mitogen-activated protein kinase 3 |
| MAS | Macrophage activation syndrome |
| MHC | Major histocompatibility complex |
| miR | microRNA |
| mRNA | Messenger RNA |
| MSH5 | MutS protein homolog 5 |

| | |
|----------------|-------------------------------------------------------------------------|
| mTNF | membrane-associated TNF |
| MyD88 | Myeloid differentiation primary response gene 88 |
| NCF2 | Neutrophil cytosol factor 2 |
| NF- κ B | Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells |
| PBS | Phosphate buffered saline |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PHRF1 | PHD And Ring Finger Domains 1 |
| PI | Propidium iodide |
| PPP2CA | Serine/threonine-protein phosphatase 2A catalytic subunit alpha isoform |
| PRDM1 | PR domain zinc finger protein 1 |
| PRKCB | Protein kinase C beta type |
| PTPN22 | Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 22 |
| RAG1 | Recombination activating gene 1 |
| RAG2 | Recombination activating gene 2 |
| RANK | Receptor Activator of Nuclear Factor κ B |
| RASGRP3 | Ras guanyl-releasing protein 3 |
| RF | Rheumatoid factor |
| RIP1 | Receptor interacting protein 1 |
| RNP | Ribonucleoprotein |
| ROR γ T | RAR-related orphan receptor gamma in thymus |
| ROS | Reactive oxygen species |
| Saa1 | Serum amyloid A1 |
| scFv | Single-chain variable fragment |
| SLE | Systemic lupus erythematosus |
| SLICC | Systemic Lupus International Collaborating Clinics |
| Sm | Smith antigen |
| SNP | Single-nucleotide polymorphism |
| snRNA | Small nuclear ribonucleic acid |
| snRNP | Small nuclear ribonucleic proteins |
| SOCS | Suppressor of cytokine signaling proteins |
| Anti-SSA/Ro | Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen A |
| Anti-SSB/La | Anti-Sjögren's-syndrome-related antigen B |
| STAT4 | Signal transducer and activator of transcription 4 |
| sTNF | Soluble Tumor necrosis factor |
| TACE | tumor necrosis factor converting enzyme |
| T-bet | T-box transcription factor |
| TBK1 | TANK-binding kinase 1 |
| TGF- β | Transforming growth factor beta |
| Th-Zelle | T helper cells |
| TLR | Toll like Receptor |
| TMEV | Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus |
| TMPD | N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine |
| TNF | Tumor necrosis factor |

| | |
|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------|
| TNFAIP3 | Tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3 |
| TNFR | Tumor necrosis factor receptor |
| TNFR1 | Tumor necrosis factor receptor 1 |
| TNFR1 ^{-/-} | Tumor necrosis factor receptor 1 knockout |
| TNFR1 ^{-/-} ; 2 ^{-/-} | Tumor necrosis factor receptor 1 and 2 knockout |
| TNFR2 | Tumor necrosis factor receptor 2 |
| TNFR2 ^{-/-} | Tumor necrosis factor receptor 2 knockout |
| TNFSF4 | Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 4 |
| TNIP1 | TNFAIP3 interacting protein 1 |
| TRADD | Tumor necrosis factor receptor type 1-associated DEATH domain |
| TRAF | TNF receptor associated factor |
| TREX1 | Three prime repair exonuclease 1 |
| TRIF | TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethane |
| TYK2 | Tyrosine kinase 2 |
| UBE2L3 | Ubiquitin-conjugating enzyme E2 L3 |
| VCAM-1 | Vascular cell adhesion molecule 1 |
| WT | Wildtype |

DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn PD Dr. Volker Vielhauer für die Möglichkeit, in einem anregenden Umfeld experimentelle Grundlagenforschung zu erlernen und seine exzellente Betreuung. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Hans-Joachim Anders für die freundliche Unterstützung. Ein großer Dank geht auch an alle Mitglieder unserer Arbeitsgruppe, insbesondere an Nuru Eltrich, Patricia Lemnitzer, Dr. Martin Schwarz, Dr. Anela Taubitz, Anne Mühe, Dan Draganovi, Dr. Onkar Kulkarni, Dr. Rahul Pawar, Dr. Ramanjaneyulu Allam und PD Dr. Maciej Lech. Vielen Dank auch allen nicht namentlich genannten Mitarbeitern der Klinischen Biochemie für inhaltliche, methodische und menschliche Unterstützung.

Meinen Eltern, Geschwistern und meinem Julian danke ich für die uneingeschränkte Unterstützung!

EIDESTÄTTLICHE VERSICHERUNG

Schlosser, Sophie Anna-Katharina

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Untersuchungen zur pathophysiologischen Rolle der TNF-Rezeptoren 1 und 2 im Mausmodell des Pristan-induzierten Lupus erythematoses

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

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

Regensburg, 26.03.2018

Sophie Anna-Katharina Schlosser