

# **Analyse der Wirkung des Naturstoffes Oxacyclododecindion in einem chronisch-inflammatorischen Krankheitsmodell**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität

in Mainz

von

Jenny Henke

geboren in Frankfurt/Oder

Mainz

2014



Dekan:

1. Berichterstatter:
2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2014



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XIII</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>XIX</b>
<b>Abstract (Englisch) .....</b>	<b>XXI</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises.....	1
1.2 Rheumatoide Arthritis.....	1
1.2.1 Pathogenese der rheumatoiden Arthritis.....	2
1.2.2 Therapie der rheumatoiden Arthritis.....	3
1.2.3 Modell zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis.....	3
1.3 Systemischer Lupus erythematodes.....	5
1.3.1 Pathogenese des systemischen Lupus erythematodes .....	6
1.3.2 Pathogenese der Lupus Nephritis .....	10
1.3.3 Therapie des systemischen Lupus erythematodes .....	12
1.3.4 Modell zur Untersuchung der Lupus Nephritis .....	13
1.4 Regulation der Genexpression .....	14
1.4.1 Transkriptionelle Mechanismen .....	15
1.4.2 Posttranskriptionelle Mechanismen .....	15
1.4.3 microRNAs als Regulatoren der Genexpression .....	16
1.5 Bedeutung der p38 MAPK in inflammatorischen Prozessen .....	18
1.6 Wirkstoffe aus Pilzen als Inhibitoren der Expression proinflammatorischer Gene .....	19
1.7 Zielsetzung der Arbeit .....	22
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>23</b>
2.1 Material.....	23
2.1.1 Laborgeräte .....	23
2.1.2 Software .....	25
2.1.3 Chemikalien und Lösungen .....	25
2.1.4 weitere Lösungen und Puffer .....	27
2.1.5 Bakterienmedien .....	32
2.1.6 Bakterienkultur .....	32
2.1.7 Marker.....	32
2.1.8 Kits.....	33
2.1.9 Verbrauchsmaterialien .....	33

2.1.10	Plasmide.....	34
2.1.11	Antikörper.....	35
2.1.12	Inhibitoren.....	36
2.1.13	Zytokine.....	37
2.1.14	Enzyme.....	37
2.1.15	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur.....	38
2.1.16	Zelllinien.....	38
2.1.17	Oligonukleotide.....	39
2.1.18	Versuchstiere.....	41
2.2	Zellbiologische Methoden.....	42
2.2.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	42
2.2.2	Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen.....	42
2.2.3	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	43
2.2.4	Stimulation und Behandlung eukaryotischer Zellen.....	43
2.2.5	Behandlung der Zellen mit 5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside ...	44
2.3	Molekularbiologische Methoden.....	45
2.3.1	Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe.....	45
2.3.2	Isolation von DNA aus Gewebe.....	46
2.3.3	Isolation von microRNA aus Gewebe.....	46
2.3.4	RNA Quantifizierung und Detektion von Verunreinigungen.....	46
2.3.5	Qualitative RNA-Analyse.....	47
2.3.6	Agarose-Gelelektrophorese.....	48
2.3.7	Reverse Transkription von mRNA in cDNA.....	49
2.3.8	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	49
2.3.9	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR).....	50
2.3.10	microRNA PCR-Array.....	52
2.3.11	microRNA qRT-PCR-System.....	55
2.3.12	DNA-Mikroarray-Analysen.....	56
2.3.12.1	Isolation und Markierung der RNA.....	58
2.3.12.2	Hybridisierung des Genchips.....	59
2.3.12.3	Auswertung der Genchips.....	60
2.3.13	Klonierung.....	61
2.3.13.1	Restriktion von DNA.....	62
2.3.13.2	Phenol-Chloroform-Extraktion.....	62
2.3.13.3	Kinase-Behandlung.....	62
2.3.13.4	Auffüllen überhängender 5'-Enden.....	63
2.3.13.5	5'-Dephosphorylierung.....	63
2.3.13.6	Elution von DNA aus Agarose.....	63
2.3.13.7	Ligation von DNA.....	64
2.3.13.8	Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien.....	64
2.3.13.9	Plasmid-DNA-Präparation.....	64
2.4	Proteinbiochemische Methoden.....	65

2.4.1	Gewinnen von Proteinextrakten aus Zellen und Gewebe.....	65
2.4.2	Quantifizierung von Proteinen.....	66
2.4.3	Proteinfällung nach Wessel und Flügge.....	67
2.4.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	67
2.4.5	Immundetektion mittels Western Blot.....	68
2.4.6	Immundetektion mittels Proteome Profiler™.....	70
2.4.7	Enzymatische Immundetektion mittels ELISA.....	70
2.4.8	Cyp3A4 Aktivitätsanalyse.....	72
2.5	Immunhistochemische Untersuchungen.....	73
2.5.1	Herstellung von Schnittpräparaten.....	73
2.5.2	Immunfärbungen.....	73
2.5.3	Elastika van Gieson Färbung.....	74
2.5.4	Periodic acid-Schiff Reaktion (PAS).....	74
2.5.5	Immunfluoreszenzfärbung: Ablagerung von IgG und C3.....	75
2.5.6	Durchflusszytometrische Analysen.....	76
2.6	Mausmodelle und Tierexperimente.....	78
2.6.1	Typisierung von Mäusen.....	78
2.6.1.1	HLA-DR4.AE° Mausstamm.....	78
2.6.1.2	MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mausstamm.....	79
2.6.2	Induktion einer Arthritis bei HLA-DR4.AE° Mäusen.....	79
2.6.3	Bestimmung des Arthritisindex.....	81
2.6.4	Oxacyclododecindion-Behandlung von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	81
2.6.5	Proteinmessung im Urin.....	81
2.6.6	Isolation von Makrophagen.....	81
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>83</b>
3.1	Induktion der CIA bei HLA-DR4.AE° Mäusen.....	83
3.1.1	Generierung einer Positivkontrolle für die Typisierung der HLA-DR4.AE° Mäuse.....	83
3.1.2	Typisierung der HLA-DR4.AE° Mäuse.....	84
3.1.3	Etablierung einer CIA in HLA-DR4.AE° Mäusen.....	85
3.2	Typisierung und Charakterisierung von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen für die Wahl eines Behandlungszeitraumes mit Oxacyclododecindion.....	89
3.2.1	Typisierung der MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse.....	89
3.2.2	Charakterisierung des Krankheitsverlaufes in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	90
3.2.2.1	Anatomische Veränderung im Krankheitsverlauf der MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse.....	91
3.2.2.2	mRNA Expressionsanalysen zwischen Balb/c und MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufes.....	93
3.2.2.3	Vergleichende mRNA Expressionsanalysen in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	95
3.3	Behandlung weiblicher MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse mit Oxacyclododecindion.....	98
3.3.1	mRNA Expressionsanalysen in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen unter der Oxacyclododecindion-Behandlung.....	98
3.3.1.1	mRNA Expressionsanalysen proinflammatorischer Marker in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen unter der Oxacyclododecindion-Behandlung.....	99

3.3.1.2	mRNA Expressionsanalysen SLE-assoziiierter Marker in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen unter der Oxacyclododecindion-Behandlung.....	102
3.3.2	Proteinexpression in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen unter Oxacyclododecindion-Behandlung.....	103
3.3.3	Histopathologische Untersuchungen der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen nach Oxacyclododecindion-Behandlung .....	107
3.3.3.1	Nachweis von Immunzellinfiltraten in der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen mittels periodic acid-Schiff Reaktion (PAS).....	107
3.3.3.2	Nachweis fibrinogenen Materials in der Niere mittels Elastika van Gieson Färbung.....	108
3.3.4	Charakterisierung der Immunzellinfiltrate in der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen nach Oxacyclododecindion-Behandlung.....	110
3.3.4.1	Immunhistochemische Färbungen in Nieren von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	110
3.3.4.2	Durchflusszytometrische Analysen von Nierenzellsuspensionen der MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse.....	111
3.3.5	Analyse klinischer Marker der Lupus Nephritis in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen nach Oxacyclododecindion-Behandlung .....	115
3.3.5.1	Analyse der Nierenfunktion über Messung der Proteinausscheidung im Harn von Oxacyclododecindion-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	115
3.3.5.2	Analyse der IgG-Subklassen, dsDNA-Antikörper und C3-Konzentration in Seren von Oxacyclododecindion-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	116
3.3.5.3	Analyse der IgG- und C3-Ablagerungen in der Niere von Oxacyclododecindion-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	119
3.4	Targetmoleküle von Oxacyclododecindion .....	120
3.4.1	Genexpressionsanalysen in der Niere via Mikroarray .....	120
3.4.1.1	Identifizierung zellulärer Signalwege an denen die signifikant durch Oxacyclododecindion regulierten Gene des DNA-Mikroarray beteiligt sind.	121
3.4.1.2	Überprüfung der DNA-Mikroarray-Analyse mittels qRT-PCR.....	123
3.4.1.3	Netzwerk und Upstream-Analyse der DNA-Mikroarray-Daten mit Qiagens Ingenuity Software .....	133
3.4.2	mRNA-Stabilitätsuntersuchungen in Oxacyclododecindion-behandelten Zellen mit 5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside.....	135
3.4.3	microRNA Expressionsanalysen in Nieren Oxacyclododecindion-behandelter MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse .....	140
3.4.4	Einfluss von Oxacyclododecindion auf die Aktivierung der p38 MAPK .....	143
3.4.5	Analyse der Cyp3A4 Aktivierung durch Oxacyclododecindion .....	146
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>149</b>
4.1	Etablierung einer CIA im Stamm der HLA-DR4.AE° Mäuse.....	149
4.2	Analyse des Krankheitsverlaufes der MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse .....	151
4.3	<i>In-vivo</i> Wirkung von Oxacyclododecindion auf den Krankheitsverlauf der MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse .....	153
4.3.1	Oxacyclododecindion reduziert die Expression von inflammatorischen und SLE-assoziierten Mediatoren in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	153
4.3.2	Immunzellinfiltrate in der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen werden durch Oxacyclododecindion-Behandlung reduziert .....	158



4.3.3	Wirkung von Oxacyclododecindion auf die Nierenfunktion.....	160
4.3.3.1	Oxacyclododecindion stabilisiert die Funktionsfähigkeit der Niere.....	161
4.3.3.2	Mechanismen, die die Funktionsfähigkeit der Niere bedingen, werden durch Oxacyclododecindion positiv beeinflusst .....	161
4.4	Genexpressionsanalysen zur Identifizierung weiterer Zielmoleküle von Oxacyclododecindion .....	164
4.4.1	Zielmoleküle von Oxacyclododecindion die mittels der DNA-Mikroarray-Analyse identifiziert werden konnten.....	164
4.4.2	Analyse der DNA-Mikroarray-Daten mittels Ingenuity Software führte zur Identifizierung weiterer putativer Zielmoleküle.....	167
4.4.2.1	Netzwerkanalysen .....	167
4.4.2.2	„Upstream Regulator“-Analyse.....	169
4.5	Wirkmechanismus von Oxacyclododecindion im MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mausmodell .....	171
4.5.1	Oxacyclododecindion hat einen destabilisierenden Effekt auf die mRNA proinflammatorischer Gene .....	171
4.5.2	Oxacyclododecindion reguliert <i>in-vivo</i> die Expression von microRNAs.....	172
4.5.3	Oxacyclododecindion reguliert die Aktivität der p38 MAPK .....	175
4.6	Cyp3A4 Aktivität wird durch Oxacyclododecindion nicht beeinflusst.....	177
<b>A</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>179</b>
A.1	Ingenuity Netzwerkanalysen.....	179
A.1.1	Grafische Darstellung der Netzwerke.....	179
A.1.2	Tabellarische Darstellung der Netzwerke.....	196
A.2	DNA-Mikroarray-Analyse.....	198
A.2.1	Tabellarische Darstellung der signifikant regulierten Gene aus den DNA-Mikroarray-Analysen.....	198
	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>207</b>
	<b>Erklärung.....</b>	<b>225</b>
	<b>Publikationen.....</b>	<b>226</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>227</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>228</b>



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1:	Schematische Darstellung der Pathogenese der Lupus Nephritis .....	11
Abbildung 1.2:	Chemische Strukturformel von Oxacyclododecindion (Oxa).....	20
Abbildung 1.3:	Die TGF- $\beta$ und JAK/STAT-Signaltransduktion (A) sowie hemmende Wirkung von Oxa auf die DNA-Bindekapazität der Komplexe (B).....	21
Abbildung 2.1:	Schematische Darstellung der Durchführung des microRNA PCR-Arrays nach Angaben des Herstellers .....	53
Abbildung 2.2:	Der Ablauf einer DNA-Mikroarray-Analyse (schematisch dargestellt nach N. Schmidt).....	57
Abbildung 2.3:	Schematischer Aufbau eines Western Blots.....	69
Abbildung 3.1:	Klonierung der Positivkontrolle pcRSriptDRB1: Auftrennung des PCR Produktes und des Kontrollschnitts auf einem 2 %igen Agarosegel .....	84
Abbildung 3.2:	Exemplarische Darstellung einer Typisierung von HLA-DR4.AE $^{\circ}$ Mäusen .....	84
Abbildung 3.3:	Analyse der mRNA Expression von S100A8 und KSRP in PBMCs und vorderen Pfoten im Versuchsschema A der CIA in HLA-DR4.AE $^{\circ}$ Mäusen .....	86
Abbildung 3.4:	mRNA Expressionsanalyse von S100A8 und KSRP in PBMCs und vorderen Pfoten im Versuchsschema B der CIA in HLA-DR4.AE $^{\circ}$ Mäusen .....	87
Abbildung 3.5:	Exemplarische Darstellung einer Typisierung von MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen .....	90
Abbildung 3.6:	MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäuse .....	91
Abbildung 3.7:	Relative Zunahme des Lymphknotengewichts bei MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen	91
Abbildung 3.8:	Lymphknotenschwellung (A) und Splenomegalie (B) in fünf Monate alten MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen.....	92
Abbildung 3.9:	Relative Gewichtszunahme der Milz von MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen bezogen auf Balb/c Mäuse in ähnlicher Altersspanne.....	92
Abbildung 3.10:	Analyse der mRNA Expression von S100A8 in zwei bis viereinhalb Monate alten Balb/c und MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen in PBMCs und der Milz	93
Abbildung 3.11:	Analyse der mRNA Expression in der Niere von zwei bis viereinhalb Monate alten Balb/c und MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen.....	94
Abbildung 3.12:	Analyse der mRNA Expression in der Niere von fünf bis acht Monate alten Balb/c und MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen .....	95
Abbildung 3.13:	Analyse der mRNA aus der Niere von männlichen und weiblichen MRL <i>Fas</i> <sup>lpr</sup> Mäusen im Alter von zwei bis viereinhalb Monaten.....	96

Abbildung 3.14:	Analyse der mRNA aus der Niere von männlichen und weiblichen MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen im Alter von fünf bis acht Monaten.....	97
Abbildung 3.15:	Analyse der mRNA Expression von S100A8 in PBMCs von Oxa-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	99
Abbildung 3.16:	qRT-PCR-Analysen proinflammatorischer Gene in der Milz von Oxa-behandelten, weiblichen MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	100
Abbildung 3.17:	mRNA Analyse inflammatorischer Gene in der Niere von Oxa-behandelten, weiblichen MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	101
Abbildung 3.18:	mRNA Analyse SLE- und LN-assoziiierter Gene in der Niere von Oxa-behandelten, weiblichen MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	102
Abbildung 3.19:	Analyse der Proteinexpression in Oxa-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen via Proteome Profiler von R&D Systems .....	104
Abbildung 3.20:	TNF $\alpha$ Expression in der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen nach Dex- und Oxa-Behandlung.....	105
Abbildung 3.21:	Proteinexpression von S100A8 in der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen und in RAW 264.7 Zellen unter Oxa-Behandlung.....	106
Abbildung 3.22:	Nachweis der Infiltration von Zellen in die Nieren von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen (PAS/HE-Färbung) .....	108
Abbildung 3.23:	Elastika van Gieson Färbung (nach Weigert) in Nierenschnittpräparaten von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	109
Abbildung 3.24:	Analyse der Niereninfiltrate in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen mittels immunhistochemischer Färbungen .....	110
Abbildung 3.25:	Durchflusszytometrische Analyse CD11b-positiver Zellen in der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	112
Abbildung 3.26:	Durchflusszytometrische Analysen CD4-positiver T-Zellen der Niere von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	113
Abbildung 3.27:	Immunhistochemische Färbung mit IL6 und FoxP3 an Nierenschnittpräparaten von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	114
Abbildung 3.28:	Analyse des Albumingehaltes im Urin mittels Urinteststreifen und ELISA ACR Analysen .....	116
Abbildung 3.29:	Analyse der Konzentration von IgG und IgG-Subklassen in Seren von Oxa-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	117
Abbildung 3.30:	ELISA-Analyse gegen dsDNA-Antikörper in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen unter Oxa-Behandlung .....	117
Abbildung 3.31:	Komplementfaktor C3 Nachweis mittels ELISA im Serum Oxa- und PBS/EtOH-behandelter MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäuse.....	118
Abbildung 3.32:	Nachweis von IgG und C3 im Zusammenhang mit Ablagerungen von Immunkomplexen in den Glomeruli von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	119

Abbildung 3.33:	Statistische Auswertung der DNA-Mikroarray-Analysen mittels WebarrayDB .....	121
Abbildung 3.34:	Zuordnung der signifikant regulierten Gene an molekularen und zellulären Prozessen durch die Ingenuity Software .....	122
Abbildung 3.35:	Analyse der mRNA Expression ausgewählter Gene in der Niere von Oxa-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen mittels DNA-Mikroarray.....	123
Abbildung 3.36:	Analyse der MOSPD1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen...	125
Abbildung 3.37:	Analyse der Osgin1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen...	126
Abbildung 3.38:	Analyse der Nxf1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen.....	127
Abbildung 3.39:	Analyse der Dcp1a mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen...	129
Abbildung 3.40:	Analyse der PTBP1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen...	130
Abbildung 3.41:	Analyse der KIM1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen...	131
Abbildung 3.42:	Detektion von KIM1 Protein in Nieren von Oxa-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	132
Abbildung 3.43:	Analyse des mRNA Abbaus in Oxa-behandelten RAW 264.7 Zellen	137
Abbildung 3.44:	Analyse des mRNA Abbaus unter der Behandlung mit Oxa in MM6 Zellen .....	138
Abbildung 3.45:	Analyse des mRNA Abbaus in Peritonealmakrophagen unter der Behandlung mit Oxa .....	139
Abbildung 3.46:	Überprüfung der Expression der microRNAs 9, 16, 19b und 340 in Nieren von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen, die mit PBS/EtOH oder Oxa behandelt wurden.....	142
Abbildung 3.47:	Analyse der Expression von microRNAs in Nieren von MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen, die mit PBS/EtOH oder Oxa behandelt wurden	143
Abbildung 3.48:	Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von p38 MAPK in Zytokin-stimulierten und Oxa-behandelten RAW 264.7 Zellen .....	144
Abbildung 3.49:	Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von p38 MAPK in Leber und Nieren von PBS/EtOH und Oxa-behandelten MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen .....	145
Abbildung 3.50:	Regulation der CYP3A4 Aktivität nach Inkubation mit Oxa, Ketoconazol und Testosteron.....	146



## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1:	ACRh-Kriterien zur Diagnose des systemischen Lupus erythematoses .....	5
Tabelle 2.1:	Zusammensetzung der Kulturmedien .....	42
Tabelle 2.2:	Zusammensetzung des Stimulations-Mixes für verwendete Zelllinien .....	43
Tabelle 2.3:	Zusammensetzung des FCS-freien Mediums .....	44
Tabelle 2.4:	Zusammensetzung des Mixes für die reverse Transkription von RNA in cDNA .....	49
Tabelle 2.5:	Ablauf der reverse Transkription von RNA in cDNA im Bio-Rad MyCycler .....	49
Tabelle 2.6:	Parameter und Ablauf eines PCR-Programms .....	50
Tabelle 2.7:	qRT-PCR Ansatz für Taq-Man <sup>®</sup> System .....	51
Tabelle 2.8:	Ablauf der qRT-PCR für das TaqMan <sup>®</sup> System im iCycler von Bio-Rad	51
Tabelle 2.9:	qRT-PCR Ansatz für das SYBR <sup>®</sup> Green System im iCycler von Bio-Rad .....	52
Tabelle 2.10:	Ablauf der qRT-PCR für das SYBR <sup>®</sup> Green System im iCycler von Bio-Rad .....	52
Tabelle 2.11:	Ansatz für reverse Transkription für microRNA PCR-Array .....	54
Tabelle 2.12:	qRT-PCR Reaktionsansatz für microRNA PCR-Array .....	54
Tabelle 2.13:	microRNA PCR-Array Reaktionsbedingungen für qRT-PCR .....	54
Tabelle 2.14:	Ansatz für die Polyadenylierung von microRNAs (qScript <sup>™</sup> microRNA cDNA Synthesis) .....	55
Tabelle 2.15:	Ansatz für die reverse Transkription von microRNAs (qScript <sup>™</sup> microRNA cDNA Synthesis) .....	55
Tabelle 2.16:	Reaktionsansatz für microRNAs für qRT-PCR mit dem PerfeC <sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix .....	56
Tabelle 2.17:	Reaktionsansatz für das Referenzgen für qRT-PCR mit dem PerfeC <sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix .....	56
Tabelle 2.18:	Reaktionsbedingungen für qRT-PCR mit PerfeC <sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix im iCycler .....	56
Tabelle 2.19:	Reaktionsansatz zum Markieren der RNA (SuperScript <sup>™</sup> Plus Direkt cDNA Labeling System) .....	58
Tabelle 2.20:	Ablauf der Hybridisierung im Lucidea Slide Pro Hybridizer .....	59
Tabelle 2.21:	Ansatz für die Kinase-Behandlung von Proben .....	63
Tabelle 2.22:	Ansatz für Bradford-Analyse mit Standardreihe .....	66
Tabelle 2.23:	Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE .....	68
Tabelle 2.24:	Evaluation der glomerulären Pathologie .....	75
Tabelle 2.25:	Charakterisierung der Zellen .....	76

---

Tabelle 2.26:	Reaktionsansatz für die HLA-DR4.AE° Typisierungs-PCR .....	78
Tabelle 2.27:	Reaktionsbedingungen im MyCycler für HLA-DR4.AE° Typisierung ....	78
Tabelle 2.28:	Reaktionsansatz für die MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> -Typisierungs-PCR .....	79
Tabelle 2.29:	Reaktionsbedingungen im MyCycler für die MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> -Typisierung ...	79
Tabelle 2.30:	Aufbau der Versuche zur Induktion einer Arthritis .....	80
Tabelle 2.31:	Bestimmung des Arthritisindex .....	81
Tabelle 3.1:	Identifizierung möglicher Upstream-Regulatoren durch die Analyse der DNA-Mikroarray-Daten mittels Ingenuity .....	135
Tabelle 3.2:	Halbwertzeiten der mRNA nach Inkubation mit Oxa- und DRB-Behandlung .....	140
Tabelle 3.3:	microRNA Expressionsänderung unter der Behandlung mit Oxa in MRL <i>Fas<sup>lpr</sup></i> Mäusen (miScript miRNA PCR Array) .....	141



## Abkürzungsverzeichnis

ACR	Albumin-Kreatinin-Verhältnis
ACRh	<i>American College of Rheumatology</i>
anti-dsDNA	Autoantikörper gegen dsDNA
anti-Smith	Autoantikörper gegen Kernproteine
AP-1	<i>activator protein-1</i>
APS	<i>Ammoniumperoxodisulfat</i>
ARE	AU-reiches Element
ATF2	<i>activating transcription factor 2</i>
AUF1	<i>AU-rich element RNA-binding protein 1</i>
BLyS	B-Lymphozyten-Stimulator
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
°C	Grad Celsius
c	Kollagen Typ II aus Hühnern
C3	Komplementfaktor 3
CII	Kollagen Typ II
CAM	<i>cell adhesion molecules</i>
CCL	<i>CC chemokine ligand</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFA	Komplettes Freund'sches Adjuvans
CIA	Kollagen-induzierte Arthritis
CIAP	<i>calf intestinal alkaline phosphatase</i>
CLIP	<i>RNA Crosslink and Immunoprecipitation</i>
CM	Stimulationsmix
CO	Kontrolle
Cox-2	<i>cyklooxygenase-2</i>
CSF-1	<i>colony stimulating factor 1</i>
C <sub>T</sub>	Schwellenwert bei qRT-PCR-Analysen
CXCL	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand</i>
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
Dcp1a	<i>Decapping enzyme homolog A</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
Dex	Dexamethason
CGAM	<i>Corner Grid Alignment Marks</i>
DGCR8	<i>DiGeorge syndrome critical region gene 8</i>

---

DMARDs	<i>disease modifying anti-rheumatic drugs</i>
DMEM	Dulbecco's modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotide
DRB	5,6-Dichlorobenzimidazole 1- $\beta$ -D-ribofuranoside
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
EMT	Epithelial-mesenchymale Transition
EtOH	Ethanol
FACS	Fluoreszenz aktiviertes Zell sortieren
Fc $\gamma$ R	Fc gamma Rezeptor
FCS	Fötale Kälberserum
FoxP3	<i>Forkhead-Box-Protein P3</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
gcs	Glomeruli-Querschnitt
GIT	Guanidiniumisothiocyanat
GK	Glukokortikoide
GM-CSF1	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HIF1 $\alpha$	<i>Hypoxia-inducible factor 1 alpha</i>
HLA-DR	humanes Leukozytenantigen
HO	Haut hinter Ohrmuschel
hpf	Hauptgesichtsfeld
hu	human
HuR	<i>human antigen R</i>
Hz	Hertz
ICAM	Intercellular adhesions molecule
IFN $\alpha$	Interferon Alpha
IFN $\gamma$	Interferon Gamma
Ig	Immunglobuline
IgG	Immunglobuline der Klasse G
IL	Interleukin
iNOS	<i>inducible nitric oxidase synthase</i>
i.p.	interperitoneal
i.d.	intradermal
JAK	Janus Kinase

kb	Kilobasen
kDa	Kilo Dalton
KG	Körpergewicht
KIM1	<i>Kidney Injury Molecule-1</i>
KSRP	<i>KH type-splicing regulatory protein</i>
LIMMA	eBayes-moderated t-Test
LN	Lupus Nephritis
lpr	lymphproliferative Erkrankung
LPS	Lipopolysaccharid
MAPKAP-Kinasen	<i>MAPK-activated protein kinases</i>
MCP-1	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
MEF2C	<i>myocyte enhance factor 2C</i>
MHC II	<i>major histocompatibility complex class II</i>
min	Minuten
Mip1 $\alpha$	<i>Macrophage inflammatory protein 1 alpha</i>
miRISC	microRNA-induced silencing complex
miRNA/miR	microRNA
MMF	Mycophenolate Mofetil
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MOSPD1	<i>Motile Sperm Domain Containing 1</i>
MP	Milchpulver
MRL	<i>Murphy Roths Large</i> Mausstamm
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MTX	Methotrexat
mu	<i>murin</i>
NADPH	reduzierte Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NF-AT	<i>nuclear factor of activated T-cells</i>
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
Nrf2	<i>nuclear factor (erythroid-derived)-like 2</i>
NS	normales Kaninchen Serum
NSAID	<i>non-steroidal anti-inflammatory drug</i>
Nxf1	<i>Nuclear RNA export factor 1</i>
OGAM	<i>Orientation Grid Alignment Mark</i>
Osgin1	<i>Oxidative Stress Induced Growth Inhibitor 1</i>
Oxa	Oxacyclododecindion
p	Kollagen Typ II aus Schweinen gewonnen
p38 MAPK	p38-mitogenaktivierte Proteinkinasen
p-p38 MAPK	phosphorylierte p38 MAPK
Pai-1	<i>plasminogen-activator inhibitor-1</i>
PAS	periodic acid-Schiff Reaktion

---

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PLB	<i>passive lysis buffer</i>
RNA-BP	RNA-bindende Proteine
POL2A	große Untereinheit der RNA-Polymerase II
pre-miRNA	<i>Precursor microRNA</i>
pri-miRNA	Primäre microRNA
PTBP1	<i>polypyrimidine tract binding protein 1</i>
PTEC	proximalen tubulären Epithelzellen
qRT-PCR	<i>quantitative real time Polymerase chain reaction</i>
RA	rheumatoide Arthritis
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
ROR $\gamma$ T	<i>RAR-related orphan receptor gamma</i>
RT	reverse Transkription
RUNX1	<i>runt-related transcription factor-1</i>
S	Schwanz
S100A8	<i>S100 calcium binding protein A8/Calgranulin-A</i>
SAM	Signifikanz-Analyse von Mikroarrays
SB	Schwanzbasis
SDS	Natriumlaurylsulfat
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamid-Gelelektrophorese
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SMAD	Sma/Mad-Gen Homolog
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAE	<i>Tris-Acetate-EDTA</i>
TAK1	TGF- $\beta$ aktivierende Kinase 1
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TBST	Tris-Borsäure-EDTA-Tween
TCR	T-Zellrezeptor
TE	Tris-EDTA
TEC	tubulären Epithelzellen
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor-<math>\beta</math></i>
Th-Zelle	T-Helferzelle
TIGR	Institut for Genomic Research
TIM-4	<i>T-cell Immunoglobulin Mucin protein 4</i>
TIMP	<i>tissue inhibitors of metalloproteinases</i>
TLR	<i>toll-like-receptor</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TMB	3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin

---

TNF $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TRBP	<i>HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein</i>
Treg	regulatorische T-Zelle
TTP	Tristetraprolin
U	Einheit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
VCAM	<i>vascular endothelial growth factor</i>
Verd.	Verdünnung
NZB/NZW	New Zealand Black/White Mausstamm



## Zusammenfassung

Die medikamentöse Standardtherapie entzündlich-rheumatischer Erkrankungen wie der rheumatoider Arthritis (RA) und des systemischen Lupus erythematoses (SLE) sind oft unzureichend und erlauben keine nebenwirkungsarme beziehungsweise -freie Behandlung. Daher ist es von großem Interesse für diese Indikationsgebiete, wirkungsvolle Substanzen zu entwickeln, die für eine Langzeittherapie geeignet sind. Naturstoffe wie Oxacyclododecindion (Oxa) können dabei als mögliche Leitstruktur dienen. Oxa wurde bereits in *in-vitro* Untersuchungen als ein potenter Inhibitor der Expression von proinflammatorischen und profibrotischen Genen identifiziert.

Ziel dieser Arbeit war es in *in-vivo* Modellen der RA und des SLEs das therapeutische Potential des Naturstoffes Oxa aufzuklären. Da eine Etablierung der Kollagen-induzierten Arthritis im untersuchten murinen RA-Modell, dem HLA-DR4.AE° Stamm, nicht möglich war, wurden die Untersuchungen ausschließlich im MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mausstamm, einem anerkannten SLE-Modell durchgeführt. MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse entwickeln wie SLE-Patienten unter anderem eine schwerwiegende Glomerulonephritis.

In den Nieren weiblicher MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse konnte die Oxa-Behandlung die Expression zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren beeinflussen, die in Zusammenhang mit der Pathogenese des humanen SLE gebracht werden. So reduziert der Naturstoff die Expression von Zytokinen wie TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  und IL6 als auch Chemokinen wie CCL2, CSF-1 und RANTES auf mRNA- und Proteinebene. Dabei war die Wirkung von Oxa in den *in-vivo* Analysen ähnlich gut wie die des potenten Glukokortikoids Dexamethason. Die Reduktion chemotaktischer Moleküle durch die Oxa-Behandlung führte nachweislich zu einer reduzierten Akkumulation von Immunzellen. Die anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Effekte von Oxa waren so ausgeprägt, dass klinisch-pathologische Marker der Glomerulonephritis, wie die Ablagerung von Immunkomplexen, die vermehrte Bildung von Kollagenfasern und die Ausscheidung von Proteinen im Urin gemildert wurden. Weiterführende Untersuchungen im SLE Modell konnten neue Zielmoleküle von Oxa identifizieren, wie KIM1 und zahlreiche SLE-assoziierte microRNAs (miR 19a, 29c und 369). Diese Befunde legen nahe, dass Oxa eine vielversprechende anti-entzündliche und -fibrotische Verbindung darstellt.

Die Entschlüsselung des Wirkmechanismus von Oxa steht erst am Anfang. Die Analysen im Rahmen dieser Arbeit zeigten jedoch, dass Oxa einen Einfluss auf die Phosphorylierung und somit Aktivierung der p38 MAPK sowie auf die mRNA-Stabilität von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF $\alpha$  zu haben scheint.





## Abstract (Englisch)

The standard therapies of inflammatory rheumatic diseases such as rheumatoid arthritis (RA) and systemic lupus erythematosus (SLE) are frequently inadequate and the treatment is often accompanied by side effects. Therefore, there is a great interest to develop effective substances that are suitable for long-term therapy for these indications. Natural substances such as Oxacyclododecindion (Oxa) may serve as potential lead compounds. Oxa was already identified in *in vitro* studies as a potent inhibitor of the expression of proinflammatory and profibrotic genes.

The aim of this study was to clarify the therapeutic potential of the natural product Oxa in *in vivo* models of RA and SLE. Since the establishment of the collagen-induced arthritis in the murine RA model, the HLA-DR4.AE<sup>o</sup> strain was not possible, the studies were performed exclusively in the MRL *Fas<sup>lpr</sup>* mouse strain, a distinguished SLE model. Like SLE patients, the MRL *Fas<sup>lpr</sup>* mice develop a severe glomerulonephritis.

In the kidneys of female MRL *Fas<sup>lpr</sup>* mice the Oxa-treatment affected the expression of numerous pro-inflammatory mediators that are implicated in the pathogenesis of human SLE. The natural compound reduced the expression of cytokines such as TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$  and IL6, and chemokines such as CCL2, CSF-1 and RANTES at mRNA expression- and protein level. The effect of Oxa in the *in vivo* analyses was comparable to the potent glucocorticoid dexamethasone used as positive control. The reduced expression of chemotactic molecules by Oxa-treatment resulted in a decreased accumulation of immune cells. The anti-inflammatory and immunomodulatory effects of Oxa were so pronounced that clinic-pathologic markers of glomerulonephritis, such as the deposition of immune complexes, the increased formation of collagen fibers and the excretion of proteins in urine were diminished.

Further studies in the SLE mouse model could identify new targets of Oxa such as Kim1 and numerous SLE-associated miRNAs (miR 19a, 29c and 369). These findings suggest that Oxa is a promising anti-inflammatory and anti-fibrotic compound.

Deciphering the molecular mechanism of the mode of action of Oxa is just at the beginning. The results of this thesis however showed, that Oxa may have an influence on the phosphorylation and thus activation of p38 MAPK as well as on the mRNA stability of pro-inflammatory cytokines such as TNF $\alpha$ .



# 1 Einleitung

## 1.1 Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises

Unter den Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises werden verschiedene Krankheitsbilder zusammengefasst, deren Ätiologie meist unklar ist. Als rheumatische Erkrankungen werden Erkrankungen des Bindegewebes mit schmerzhaften Störungen des Bewegungsapparates definiert (Miehle, 2003). Rund 5 % der Bevölkerung sind betroffen (Deane and El-Gabalawy, 2014). An der Manifestation und dem Verlauf der Krankheit sind neben Umweltfaktoren und Infektionen auch genetische Faktoren beteiligt (Miehle, 2003). Letzteres scheint auch eine Rolle in der oftmals überschießenden Reaktion des Immunsystems zu spielen, die mit einer chronischen Entzündung im Krankheitsbild einhergeht (Zeidler *et al.*, 2009). Rheumatische Erkrankungen lassen sich in drei Hauptgruppen klassifizieren: entzündliche sowie degenerative Gelenk- und Wirbelsäulenerkrankungen und in extraartikuläre Weichteilerkrankungen des Bewegungsapparats. Zu den entzündlich-autoimmunen, rheumatischen Erkrankungen zählen neben der rheumatoiden Arthritis auch Kollagenosen, wie der systemische Lupus erythematoses (Zeidler *et al.*, 2009).

## 1.2 Rheumatoide Arthritis

Die rheumatoide Arthritis (RA) ist eine der häufigsten systemischen, chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankungen mit progredientem Verlauf. Die Prävalenz der RA liegt je nach Population zwischen 0,5 - 6,8 % (Silman and Pearson, 2002), wobei allen gleich ist, dass Frauen schwerer und häufiger erkranken als Männer (Caliz *et al.*, 2013). Primär ist die RA durch eine Entzündung der Gelenke charakterisiert, welche vorwiegend die Phalangen, Metacarpalia und -tarsalia betrifft (Wehling and Diener, 2011). Durch das schubweise auftreten entzündlicher Prozesse kommt es zur Schädigung des Knorpels und zur Destruktion des Knochens (Visser *et al.*, 2002). Diese führen mit den einhergehenden schmerzhaften Hyperplasien unbehandelt zu einer starken funktionellen Einschränkung (Burmester *et al.*, 2014). Sekundär treten bei RA-Patienten vermehrt kardiovaskuläre Ereignisse auf, wahrscheinlich durch die chronische Entzündung verursacht, führen diese bei 49 – 53 % der RA-Patienten zum Tode (Maradit-Kremers *et al.*, 2005; Wallberg-Jonsson *et al.*, 1997; Gabriel, 2008). Diese erhöhte kardiovaskuläre Mortalität konnte bisher durch übliche Standardtherapie nicht gesenkt werden (Kelly and Hamilton, 2007). Durch die Entwicklung neuer Therapeutika, die aggressiv in die entzündlichen Vorgänge der RA eingreifen, soll eine Verbesserung der Erkrankung bewirkt werden (Gabriel, 2008).

### 1.2.1 Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die Ursache der RA-Erkrankung ist unbekannt, jedoch wird eine multifaktorielle Genese angenommen. Da eine familiäre Häufung als auch eine 15 – 21 %ige Konkordanz bei eineiigen Zwillingen (Silman *et al.*, 1993; Bellamy *et al.*, 1992) beobachtet wurde, scheinen genetische Faktoren eine wichtige Rolle zu spielen. Des Weiteren konnte bei zwei Drittel der betroffenen Patienten eine Assoziation mit Allelen des *major histocompatibility complex* (MHC) Klasse II, wie dem HLA-DR4, nachgewiesen werden (Stastny, 1978). Durch die biologische Funktion der MHC II Moleküle in der T-Zell-abhängigen Immunität konnte eine Verbindung zum autoimmunen Hintergrund der Erkrankung geschaffen werden (Klareskog *et al.*, 2011). Der initiale Auslöser der Immunantwort in der RA wurde bis jetzt nicht identifiziert. Jedoch wird angenommen, dass Antigen-präsentierende Zellen den T-Helferzellen (Th-Zellen) über das MHC II Molekül ein unbekanntes Autoantigen darbieten (Voulgari and Drosos, 2008). Dies führt in Anwesenheit von kostimulatorischen Molekülen zur Aktivierung und Proliferation der Th-Zellen, die dann eine Autoimmunreaktion auslösen. Die Abnormitäten in der zellulären Immunantwort, in Verbindung mit fehlregulierten Toleranzmechanismen, führen in den RA-Patienten zu einer T-Zell-vermittelten Aktivierung von B-Zellen (Burmester *et al.*, 2014). Diese bilden wiederum Immunglobuline (Ig) und Autoantikörper. So können in RA-Patienten Autoantikörper wie Rheumafaktoren und Antikörper gegen citrullinierte Peptide und/oder Proteine nachgewiesen werden (Schellekens *et al.*, 1998).

Unklar ist wie es über den Verlust der Toleranz zu einer inflammatorischen Reaktion in den Gelenken kommt. In dem Gelenk selbst produzieren die eingewanderten, aktivierten Th-Zellen Zytokine und Chemokine, die weitere Immunzellen aktivieren und chemotaktisch in das Gewebe leiten (Choy, 2012). Die im Zuge der T-Zell-vermittelten Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen gebildeten Autoantikörper tragen durch die Bildung von Immunkomplexen zur Aktivierung des Komplementsystems und zum einwandern der Immunzellen aus der Peripherie in den Knorpel bei (Mathsson *et al.*, 2006). Im Synovium kommt es daraufhin zu einer Akkumulation von Immunzellen, die wiederum selbst inflammatorische Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle und inflammatorische Enzyme produzieren (Firestein, 2003). Infolgedessen kommt es zur Aktivierung von synovialen Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten, die wiederum Kollagenasen, Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und destruktive Enzyme sekretieren, die einen Umbau der Knorpel und Knochenstruktur initiieren (McInnes and Schett, 2007). Dies führt in Verbindung mit Mechanismen der Angiogenese zur Ausbildung eines fibrösen Granulationsgewebes, auch Pannus genannt. Durch die andauernden inflammatorischen und immunologischen Prozesse innerhalb des Gelenkes kommt es dann zu einer vollständigen Zerstörung des Knorpels und der Knochen (Ritchlin, 2004).

## 1.2.2 Therapie der rheumatoiden Arthritis

Zugelassene Medikamente für die Behandlung der RA haben das Ziel der Remission. Durch Unterdrückung der inflammatorischen Prozesse sollen strukturelle Schäden minimiert werden, um die Gelenkfunktion aufrechtzuerhalten. Initial werden zur symptomatischen Behandlung nicht-steroidale Antiphlogistika, die NSAIDs, und Glukokortikoide (GK) verabreicht. Gemäß den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie (Krüger *et al.*, 2012) sollten GK in Kombination mit sogenannten DMARDs (*disease modifying antirheumatic drugs*) eingesetzt werden. Bei den DMARDs wie Methotrexat (MTX) handelt es sich um Medikamente mit einer immunsuppressiven Wirkung, die die Krankheitsaktivität reduzieren und das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen (Mutschler, 2013). Jedoch stellen die Nebenwirkungen von DMARDs oftmals ein schwerwiegendes Problem bei der Behandlung der Patienten dar.

Eine neuere Basistherapie stellt die Behandlung mit Biologicals dar. Diese richten sich in Form von Antikörpern, löslichen Rezeptoren oder als Antagonisten gegen inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*) oder Interleukin (IL) 6 und greifen somit gezielt in relevante Signaltransduktionswege ein, die eine Rolle in der Pathogenese der RA spielen. Die bisweilen noch teuren Biologicals weisen allerdings auch Nebenwirkungen auf. Als intensiv in immunologische Prozesse eingreifende Pharmaka steigern diese, wie für TNF $\alpha$  Inhibitoren gezeigt, das Risiko für bakterielle Infektionen wie Tuberkulose (Hamilton, 2004).

Trotz der Effektivität der zahlreichen, zugelassenen Therapeutika ist die Mortalität und Morbidität von RA-Patienten noch immer erhöht, was zum Teil auf die Nebenwirkungen der zugelassenen Medikamente zurückzuführen ist (Jastrzebska *et al.*, 2013). Aufgrund der Datenlage besteht für die Behandlung der RA ein signifikanter Bedarf neue Substanzen zu erforschen und zu entwickeln.

## 1.2.3 Modell zur Untersuchung der Pathogenese der rheumatoiden Arthritis

Die Pathogenese der RA ist durch chronisch-entzündliche Prozesse in den Gelenken gekennzeichnet, welche langfristig zu einer irreversiblen Zerstörung des Knorpel- und Knochengewebes führen (Ritchlin, 2004). Trotz dessen die Ätiologie der RA noch weitestgehend unverstanden ist, werden als potentieller Auslöser der Erkrankung Kollagenfasern des Typ II (CII) gehandelt (Kim *et al.*, 1999). CII wird von Chondrozyten synthetisiert und ist einer der Hauptbestandteile des Knorpelgewebes, dem Zentrum des Entzündungsgeschehens im Verlauf der RA. In Mausstämmen, die aufgrund ihres genetischen Hintergrundes suszeptibel für die Auslösung einer RA sind, löst eine Immunisierung mit CII eine B- und T-Zell-vermittelte Autoimmunantwort aus, die einer

humanen RA stark ähnelt (Courtenay *et al.*, 1980). So werden in den Tieren synoviale Hyperplasien (Holmdahl *et al.*, 1986), die Infiltration von mononukleären Zellen sowie Knorpelabbau (Brand *et al.*, 2007) infolge der pathogenen Überexpression von proinflammatorischen Genen wie S100A8 (*S100 calcium binding protein A8*) (Baillet *et al.*, 2010) oder TNF $\alpha$  beobachtet. In diesem Zusammenhang konnte in den Mäusen eine erhöhte Bindekapazität von Transkriptionsfaktoren wie AP-1 (*activator protein-1*) und NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Han *et al.*, 1998) sowie eine Regulation von RNA-bindenden Proteinen (RNA-BP) wie KSRP (*KH type-splicing regulatory protein*) nachgewiesen werden (Art, 2012). Mittlerweile ist die Kollagen-Typ-II-induzierte Arthritis (CIA) ein anerkanntes Modell zur Untersuchung der inflammatorischen und immunologischen Prozesse in der RA (Holmdahl *et al.*, 2002; Trentham, 1982) sowie zum Testen von neuen anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Therapien (Brand *et al.*, 2003).

Allen bisher etablierten Mausmodellen ist allerdings gleich, dass männliche wie weibliche Mäuse in nahezu gleichem Maße eine CIA entwickeln. Dies entspricht nicht der geschlechtsspezifischen Verteilung in der humanen RA, in der Frauen eine deutlich höhere Inzidenz als Männer haben (Alamanos and Drosos, 2005). Im DBA/1 Mausmodell, dem bisherigen „Goldstandard“ in der CIA, konnte sogar gezeigt werden, dass männliche Mäuse spontan Symptome einer Arthritis entwickeln (Holmdahl *et al.*, 1992; Nordling *et al.*, 1992).

Die Arbeitsgruppe von Veena Taneja berichtete 2007 von einem neuen Mausmodell. Die Tiere des HLA-DR4 $^{\circ}$ AE Stammes entwickelten in ihren Untersuchungen klassische Merkmale einer CIA, mit dem Unterschied zu bisherigen CIA-Modellen, dass Weibchen eine höhere Inzidenz zeigten als Männchen (Taneja *et al.*, 2007). Hierzu generierten Taneja *et al.* einen Mausstamm dem alle vier endogenen Klasse II Gene fehlen (AE $^{\circ}$ ) und der das humane HLA-DRB1\*0401 Allel trägt, welches mit der Entwicklung einer RA assoziiert ist (Singal *et al.*, 1999; Fugger and Svejgaard, 2000). Durch die geschlechtsspezifische Verteilung in der Inzidenz eine CIA zu entwickeln, spiegelt der HLA-DR4 $^{\circ}$ AE Mausstamm die beobachteten Geschlechtsunterschiede bei der humanen RA wieder. Untersuchungen an diesen Mäusen können zum Verständnis der autoimmunen Prozesse bei der frauenspezifischen Erkrankung beitragen und helfen neue Therapien zu entwickeln.

### 1.3 Systemischer Lupus erythematoses

Zu den klassischen systemischen Autoimmunerkrankungen zählt der systemische Lupus erythematoses (SLE). Die Prävalenz liegt bei 15 – 159 Neuerkrankungen pro 100000 Einwohner (Ortega *et al.*, 2010; Chakravarty *et al.*, 2007; Brinks *et al.*, 2014; Ju *et al.*, 2014; Ferucci *et al.*, 2014; Molina *et al.*, 2007), wobei höhere Prävalenzen in asiatischen, afro-amerikanischen und latein-amerikanischen Bevölkerungsgruppen vorkommen (Tikly and Navarra, 2008). Je nach Population sind Frauen 7 - 15mal häufiger betroffen als Männer, wobei die Frauen typischerweise im Alter von 20 bis 40 Jahren erkranken (Agrawaal and Dhakal, 2014; Murphy and Isenberg, 2013). Die Ätiologie des SLE ist unklar, da ein Netzwerk von genetischen, immunologischen, hormonellen und Umweltkomponenten in komplizierten und multifaktoriellen Interaktionen zum Krankheitsbild beitragen (Mok and Lau, 2003). Dadurch ist das Spektrum an klinischen Manifestationen des SLE sehr breit und betrifft fast alle Organsysteme. Neben den charakteristischen Hautmanifestationen (Schmetterlingserythemen) sind Gelenke, Herz, Lunge, Blutgefäße, Nervensystem und die Nieren betroffen (Tsokos, 2011). So können schubweise, in Verbindung mit inflammatorischen Prozessen, kardiovaskuläre Ereignisse und Symptome der Arthritis, Vaskulitis, Serositis und verschiedene Anämien des Blutes auftreten. Eines der gravierendsten Symptome ist jedoch die Lupus Nephritis (LN), eine Entzündung der Niere. Diese betrifft bis zu 55 % der SLE-Patienten und ist mit einer erhöhten Mortalität der Betroffenen assoziiert (Ortega *et al.*, 2010).

*Tabelle 1.1: ACRh-Kriterien zur Diagnose des systemischen Lupus erythematoses*

Kriterium	Definition/Symptome
1. Schmetterlingserythem	fixiertes Erythem im Bereich der Wangen
2. Discoide Hautveränderungen	erythematöse Veränderungen, Narbenbildung
3. Fotosensitivität	ungewöhnliche Reaktion auf Sonnenlicht
4. Orale Ulzeration	orale oder nasopharyngeale Ulzera
5. Arthritis	nicht-erosive Arthritis charakterisiert durch Steifigkeit, Schwellungen oder Gelenkerguss
6. Serositis	Pleuritis, Perikarditis
7. Nephropathie	persistierende Proteinurie, Harnzylinder Nachweis
8. Neurologische Erkrankungen	Krampfanfälle, Psychosen
9. Hämatologische Erkrankungen	Anämie, Leuko-, Lympho-, Thrombozytopenie
10. Immunologische Erkrankungen	anti-dsDNS-, anti-Sm-, anti-Phospholipid Antikörper
11. Anti-nukleäre Antikörper (ANA)	erhöhter ANA-Titer

(entnommen aus den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie e.V.)

Im Zuge der klinischen Heterogenität der Erkrankung wurden durch das *American College of Rheumatology* (ACR<sub>h</sub>) 11 Kriterien (Tabelle 1.1) für die Diagnose des SLE erstellt, von denen mindestens vier erfüllt sein müssen (Tan *et al.*, 1982; Hochberg, 1997)

Aufgrund der unbekanntenen Ätiologie der Erkrankung erfolgt die Behandlung der Patienten immer symptomatisch mit dem Ziel den Krankheitsverlauf zu mildern und Folgeschäden zu minimieren. Je nach Schwere und Aktivität der Erkrankung sowie Stärke der Beschwerden, erfolgt die medikamentöse Therapie oftmals ein Leben lang. Neben GK, NSAID und Biologicals werden immunsuppressive Medikamente, anti-Malariamittel und Zytostatika eingesetzt (Askanase *et al.*, 2012). Diese anti-inflammatorischen und immunmodulierenden Substanzen haben allerdings häufig Nebenwirkungen, die die Mortalität der Patienten nachweislich beeinflussen (Mok, 2014; Telles *et al.*, 2013). Daher ist die Entwicklung und Erforschung neuer pharmakologisch wirksamer Stoffe zur Behandlung des SLEs von besonderer Bedeutung.

### 1.3.1 Pathogenese des systemischen Lupus erythematoses

Wie auch bei der RA weist eine familiäre Häufung der SLE Inzidenzen sowie eine Konkordanz bei eineiigen Zwillingen von 25 – 50 % auf eine genetische Komponente in der SLE-Erkrankung hin (Klippel *et al.*, 2008). Demgemäß konnten neben hormonellen und Umweltfaktoren (z.B. UV-Licht und Infektionen) bis zu 140 Gene mit der Krankheit assoziiert werden (Rekvig and Van der Vlag, 2014). Darüber hinaus liegen Defekte in den Mechanismen zur Regulation des Immunsystems vor. Aufgrund der vielfältigen Assoziationen wurden mehrere Hypothesen zur Pathogenese der Erkrankung entwickelt, die die Manifestation der SLE-Erkrankung erklären könnten. Diese gehen zum einen von einer gestörten B-und/oder T-Zellaktivität, zum anderen von einem Defekt in der Apoptose oder einer Dysbalance im Zytokinnetzwerk aus (Rekvig and Van der Vlag, 2014).

Im Folgenden wird auf einzelne Faktoren eingegangen.

#### Autoantikörper

Die Detektion von Autoantikörpern in SLE-Patienten ist charakteristisch für die Erkrankung. Diese richten sich gegen Bestandteile des Zellkerns, des Zytoplasmas und RNA-BP, die vermutlich auf der Zelloberfläche von apoptotischen Zellen präsentiert werden, als auch gegen lösliche Moleküle wie Ig der Klasse G (IgG) und Koagulationsfaktoren (Mok and Lau, 2003). Bei nahezu 95 % der SLE-Patienten sind anti-nukleäre Antikörper (ANA) nachweisbar, wobei diese bereits bis zu 9 Jahre vor der Diagnose detektiert werden können (Arbuckle *et al.*, 2003). Dabei sind Autoantikörper gegen doppelsträngige DNA (anti-dsDNA) und Kernproteine (anti-Smith) hoch spezifisch für die SLE-Erkrankung (Davis *et al.*, 1977; Fisher *et al.*, 1985) und dienen daher als



ACR<sub>h</sub> Kriterium (Tabelle 1.1). Die hohe Konzentration an Autoantikörpern könnte auf eine erhöhte Apoptoserate in SLE-Patienten zurückzuführen sein (Emlen *et al.*, 1994). Durch einen vermehrten apoptotischen Zelluntergang würden somit höhere Konzentrationen an Autoantigenen vorliegen. In SLE-Patienten konnten als typische Abbauprodukte der Apoptose erhöhte Konzentrationen von zirkulierender DNA in Assoziation mit Nukleosomen detektiert werden (Cabrespines *et al.*, 1998). Diese könnten im Zuge eines Toleranzverlustes Ziel pathologischer Immunreaktionen werden. Zudem konnte für Makrophagen, die aus Blut und Keimzentren des Lymphknotens von SLE-Patienten isoliert wurden, eine eingeschränkte Phagozytose apoptotischer Zellen nachgewiesen werden (Shoshan *et al.*, 2001; Baumann *et al.*, 2002). Die Ursache des Defektes in der Beseitigung apoptotischen Materials ist noch unklar, könnte aber auf einen qualitativen oder quantitativen Defekt von Komplementproteinen wie C1q zurückzuführen sein (Mok and Lau, 2003).

### **T-Zellen**

In der Pathophysiologie des SLE besteht eine Dysfunktion der adaptiven Immunantwort unter anderem in Anomalien in der T-Zellfunktion (Moulton and Tsokos, 2011). So wird die Manifestation der Erkrankung in den SLE-Patienten auf autoreaktive T-Zellen zurückgeführt (Yasutomo, 2003). T-Zellen werden nach der Präsentation eines passenden Antigens aktiviert und können sich zum einen in verschiedene Effektor T-Zell-Subgruppen wie den T-Helferzellen (Th) Th1, Th2 und Th17 differenzieren (Martin and Resch, 2009). Durch die Sekretion von TNF $\alpha$ , Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) und IL2 regulieren Th1-Zellen zellvermittelte Immunreaktionen, wohingegen Th2-Zellen durch die Sezernierung von IL4, IL5 und IL10 mit der humoralen Immunantwort und somit mit der Bildung von Antikörpern assoziiert sind (Martin and Resch, 2009). In SLE-Patienten konnten Zytokine dieser Th-Subgruppen vermehrt detektiert werden (Gomez *et al.*, 2004). Diesem Befund folgend können auch vermehrt Antikörper detektiert werden, die im Zuge einer humoralen Immunantwort über eine erhöhte T-Zell-vermittelte Aktivierung von B-Zellen produziert werden (Linker-Israeli *et al.*, 1990). Darüber hinaus kann in den betroffenen Organen von SLE-Patienten eine hohe Akkumulation von Immunzellen nachgewiesen werden. Diese beruht zu Teilen auf einer erhöhten Präsenz von Th17-Zellen (Wong *et al.*, 2008). In SLE-Patienten wird die Expansion und Expression von Th17-Zellen (Wong *et al.*, 2008) durch IL23, welches von T-Zellen als auch Monozyten/Makrophagen gebildet wird, gefördert. Diese Stimulation führt in Th17-Zellen unter anderem auch zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ T (*RAR-related orphan receptor gamma*) der die Sekretion von Zytokinen wie IL17 initiiert (Summers *et al.*, 2009). Die Ausschüttung von IL17 stimuliert in verschiedenen Zellarten wie Epithelzellen und Fibroblasten die Produktion von Chemokinen und Zytokinen, die dadurch Makrophagen und Neutrophile zum Entzündungsherd rekrutieren (Shin *et al.*, 2011). Des Weiteren beeinflussen sie die

Proliferation und Reifung von Neutrophilen, Makrophagen und anderen Lymphozyten. Somit nehmen Th17-Zellen verschiedene Funktionen in der Regulation von inflammatorischen und immunologischen Prozessen ein (Chen *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2009) und tragen massiv zur Etablierung von chronisch-entzündlichen Prozessen bei (Onishi and Gaffen, 2010).

Da in SLE-Patienten die Funktion von regulatorischen T-Lymphozyten (Treg), die die Immunreaktion hemmen und das Ausmaß von immunologischen Prozessen begrenzen sollen, zusätzlich beeinträchtigt ist (Bonelli *et al.*, 2010; Lyssuk *et al.*, 2007; Valencia *et al.*, 2007), kommt es zu einem Ungleichgewicht in der Steuerung der inflammatorischen Immunantwort. Somit können auch autoreaktive Lymphozyten in ihrer Aktivität nicht mehr unterdrückt werden, was den Verlust der Toleranz verstärkt (Shevach, 2009).

### **B-Zellen**

Die pathogene Hyperaktivierung und Differenzierung von B-Zellen ist eine der treibenden Kräfte in der Progression des SLE. Die beobachteten B-Zell-Anomalien können durch Auswirkungen von genetischen Faktoren auf die intrinsische B-Zell Funktion zustande kommen als auch auf andere abnorme immunologischen Faktoren zurückzuführen sein. Dies führt zu einer Dysfunktion in der intrinsischen B-Zell Reifung, der negativ Selektion von B-Zellen, der Expression von Rezeptoren sowie in den Prozessen der somatischen Hypermutation und der Generierung von Effektorzellen (Dorner *et al.*, 2011). In diesem Zusammenhang kann in SLE-Patienten eine erhöhte Menge an B-Zell Subpopulation im Blut detektiert werden, die Autoantigen-erkennende B-Zell-Rezeptoren exprimieren (Dorner *et al.*, 2011; Sanz, 2014). Die Detektion von Autoantigenen in SLE-Patienten ist charakteristisch. Binden diese direkt oder über die T-Zell-vermittelte Immunantwort an die B-Zelle, wird diese aktiviert, kann sich zur Plasmazelle differenzieren und die für SLE-Patienten charakteristischen, nachweisbaren Autoantikörper bilden. Einige der aktivierten B-Zellen führen zudem einen Klassenwechsel von IgM- zu IgG-Antikörpern durch, um damit zellvermittelte Effektorfunktionen des angeborenen Immunsystems auszulösen (Martin and Resch, 2009).

Neben der vermehrten Antikörperproduktion fungieren aktivierte B-Zellen in der Pathogenese des SLE auch als Antigen-präsentierende Zellen und können so in Form eines positiven *feedback-loops* weitere autoreaktive T-Zellen aktivieren (Shlomchik *et al.*, 2001). Zusätzlich treiben B-Zellen durch die Produktion von Zytokinen die Progression der Erkrankung voran (Lund, 2008; Jost *et al.*, 2014).

## **Monozyten/Makrophagen**

Makrophagen sind eine der wichtigsten Effektorzellen im angeborenen Immunsystem und verbinden dies funktionell mit dem erworbenen Immunsystem (Beller *et al.*, 1978). Makrophagen haben nach ihrer Aktivierung ein breites Spektrum an Funktionen (Martin and Resch, 2009). So phagozytieren sie die im Rahmen der Erkrankung in hoher Konzentration vorliegenden Immunkomplexe und apoptotische Zellen. Zudem sekretieren sie viele Zytokine, Chemokine und Komplementfaktoren, die für die Etablierung einer akuten Entzündung wesentliche Faktoren sind (Martin and Resch, 2009). In diesen Prozessen spielen die aktivierenden und inhibierenden Fc-gamma Rezeptoren (FcγRs) eine wesentliche Rolle. Neben Polymorphismen in beiden Rezeptorarten (Pradhan *et al.*, 2008) ist auch die Anzahl der aktivierenden Rezeptoren (FcγRI) und weiteren kostimulatorischen Molekülen wie CD (*cluster of differentiation*) 40 und dessen Liganden auf Monozyten in SLE-Patienten erhöht (Hepburn *et al.*, 2004; Katsiari *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2009). In Kombination mit der erhöhten Konzentration von Immunkomplexen unterstützt dies die inflammatorischen Prozesse (Katsiari *et al.*, 2010; Kawai and Szegedi, 2007), die Proliferation von autoreaktiven Lymphozyten und die Produktion von Autoantikörpern (Li *et al.*, 2010). Hierfür werden auch von Monozyten/Makrophagen vermehrt immunmodulierende Moleküle sekretiert. So werden, wie bereits beschrieben, Th2-Zytokine wie IL10 und Stimulatoren für B-Zellen ausgeschüttet (Linker-Israeli *et al.*, 1991; Llorente *et al.*, 1993), die diese in Plasmazellen differenzieren und die IgG Produktion unterstützen (Jego *et al.*, 2003). Über dies konnte auch gezeigt werden, dass die Phagozytoseleistung von Makrophagen in SLE-Patienten verändert ist, was zum einem auf eine verringerte Expression des CD44 Oberflächenmarkers (Cairns *et al.*, 2001), der die Beseitigung von apoptotischen Neutrophilen vermittelt, zurückgeführt werden kann. Zum anderen könnte auch die Konzentration und Zusammenstellung an humoralen Mediatoren in SLE-Patienten zu diesem Effekt beitragen (Li *et al.*, 2010).

## **Zytokine und proinflammatorische Mediatoren**

In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass das Zytokinmilieu in SLE-Patienten bei der Aktivierung des Immunsystems und der Etablierung der Erkrankung eine wesentliche Rolle spielt. Wie bereits dargestellt, können in SLE-Patienten vermehrt Zytokin-Profile von Th1-, Th2- und Th17-Zellen durch die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie STAT (*signal transducer and activator of transcription*) und NF-κB detektiert werden (Gerondakis and Siebenlist, 2010; Kohanbash and Okada, 2012). Zudem kann im Plasma und Serum der Patienten eine erhöhte Konzentration von Zytokinen wie IL12, welches vornehmlich von Makrophagen für die Stimulation der Th1-Zytokinproduktion sezerniert wird, und Osteopontin (SPP1), dass eine Rolle in der Th1/Th2-Aktivierung und in der Apoptose von T-Zellen spielt, detektiert werden (Yu *et al.*, 2012; Kariuki *et al.*, 2009; Han

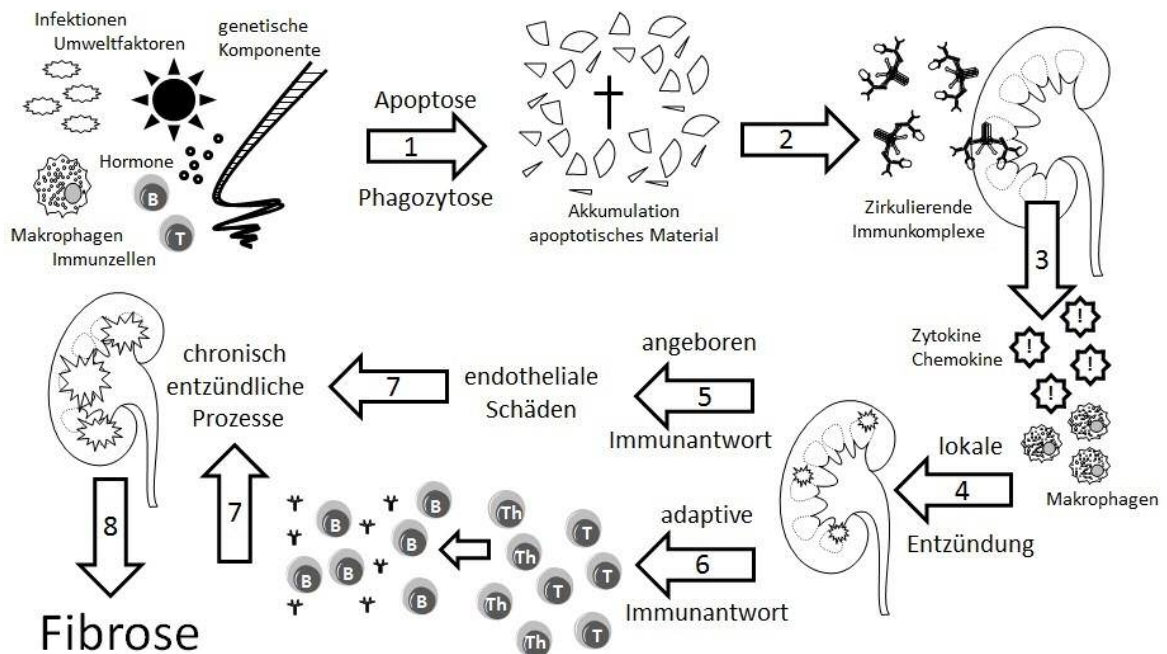
*et al.*, 2008; Tokano *et al.*, 1999). Im Zuge der vermehrten Produktion von Autoantikörpern konnten erhöhte Konzentrationen von IL6 in SLE-Patienten detektiert werden, welches die Proliferation von autoreaktiven B-Zellen fördert (Su *et al.*, 2012). Des Weiteren konnte eine Vielzahl an Typ 1 Interferonen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) in den Patienten nachgewiesen werden (Baechler *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2007). Diese sogenannte Interferonsignatur trägt unter anderem dazu bei, dass die FcγRI vermehrt auf Monozyten exprimiert werden (Li *et al.*, 2010) und der Janus Kinase (JAK)/STAT Signalweg aktiviert wird (Darnell *et al.*, 1994). Überdies korreliert auch die Expression des calciumbindenden Proteins A8 (S100A8) mit der Aktivität der SLE-Erkrankung (Tyden *et al.*, 2013).

Die Progression der SLE-Erkrankung ist somit von multiplen Faktoren beeinflusst. Für die Initialisierung der pathologischen, inflammatorischen und immunologischen Prozesse ist vor allem die abnormale Aktivität der T- und B-Zellen verantwortlich. Darüber hinaus scheinen auch eine veränderte Apoptoserate und die Beseitigung der apoptotischen Abbauprodukte eine Rolle zu spielen. Die Akkumulation von Antigenen/ Autoantikörpern und hyperaktiven Immunzellen in einem erhöhten Chemokin- und Zytokinmilieu führen zu den vielen klinischen Manifestationen wie der Lupus Nephritis.

### 1.3.2 Pathogenese der Lupus Nephritis

Die Lupus Nephritis (LN) ist eine der gravierendsten Komplikationen der SLE-Erkrankung und wird auf eine Formation von Immunkomplexen zurückgeführt, die sich in der Niere ablagern und dort inflammatorische Prozesse auslösen (Abbildung 1.1). Immunkomplexe, die sich aufgrund der geringen Phagozytoseleistung von Makrophagen im Serum von SLE-Patienten nachweisen lassen (Cano *et al.*, 1977), sind Aggregate aus apoptotischem Material und Autoantikörpern (Mok and Lau, 2003). Durch die Bildung der Immunkomplexe wird auch die Komplementkaskade aktiviert. Laut Nowling und Gilkeson (2011) ist die spontane und unkontrollierte Aktivierung des alternativen Komplementweges ein Schlüsselmechanismus für die Entstehung der Gewebeschäden in der LN. Dies wird durch Untersuchungen gestützt, die im Serum der SLE-Patienten einen erhöhten Verbrauch des Komplementfaktors (C) 3 nachweisen konnten (Levo and Pick, 1974). *In-situ* lagern sich die Immunkomplexe in den proximalen tubulären Epithelzellen (PTEC) im Mesangium, der Basalmembran und dem interstitiellen Gewebe des Glomerulus ab (de Zubiria Salgado and Herrera-Diaz, 2012). Die Affinität und die Menge an Ablagerungen korreliert dabei mit der Ausprägung der LN (Toong *et al.*, 2011). Die Immunkomplexe initiieren die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen wie MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein-1*) und Adhäsionsmolekülen wie CAMs (*cell adhesion molecules*) durch residierende Zellen und zirkulierende Immunzellen wie Monozyten/Makrophagen (Sчена, 1999). Diese phagozytieren im Zuge

der Reaktion des angeborenen Immunsystems die Immunkomplexe und apoptotischen Zellen. Aufgrund der Menge an Immunkomplexen ist die Kapazität der Makrophagen schnell erschöpft, daher sekretieren diese Komplementproteine, Proteasen, Zytokine als auch reaktive Sauerstoff und Stickstoffspezies (de Zubiria Salgado and Herrera-Diaz, 2012). Durch die erhöhte Aktivität der Monozyten/Makrophagen etabliert das angeborene Immunsystem einen akut-inflammatorischen Prozess, der im Laufe der Entzündung auch zur Ablagerung von Immunkomplexen im subendothelialen Raum in den Glomeruli führt (Tateno *et al.*, 1983). Dies etabliert weitreichende entzündliche Vorgänge in der Niere. Sekundär wird durch die Ablagerung der Immunkomplexe und der damit verbundenen Akkumulation von Monozyten/Makrophagen auch das adaptive Immunsystem aktiviert (de Zubiria Salgado and Herrera-Diaz, 2012).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Pathogenese der Lupus Nephritis**

Verschiedene individuelle Prädispositionen von SLE-Patienten und Umwelteinflüsse führen neben Anomalien in der Apoptose und Phagozytose von Makrophagen zur Akkumulation von apoptotischen Material (1). Es kommt zur Bildung von Autoantikörpern die sich zu zirkulierenden Immunkomplexen formieren und sich im endothelialen Gewebe der Niere ablagern (2), woraufhin residierende Nierenzellen Zytokine und Chemokine ausschütten (3). Die erhöhte Aktivität der Makrophagen löst lokal über das angeborene Immunsystem eine akute Entzündung hervor (4), wodurch Immunkomplexe auch im subendothelialen Raum abgelagert werden, dort endotheliale Schäden verursachen und zur Etablierung von chronisch-entzündlichen Prozessen beitragen (5 und 7). Durch die Präsenz von aktiven Makrophagen im Nierengewebe kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems (6). Aktivierte und differenzierte T-Helferzellen (Th) verstärken die B-Zellaktivität. Diese initiieren eine sekundäre Aktivierung von Makrophagen die wiederum weitere Effektorzellen aktivieren. Diese bewirken ein Ungleichgewicht zwischen Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix wodurch die Architektur des Nierengewebes zerstört wird (8). (abstrahiert nach de Zubiria Salgado and Herrera-Diaz (2012))

Durch die Sekretion von Typ 1 Interferonen und Th1-, Th2- und Th17-Zytokinen, unter anderem durch STAT- und NF- $\kappa$ B-vermittelte Signalwege, kommt es zur Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen. Diese verstärken massiv die B-Zellaktivität. Aufgrund der bereits beschriebenen pathologischen Veränderungen in der B-Zellantwort kommt es zu einer weiteren Aktivierung von Makrophagen und zu einer Einwanderung von weiteren Effektorzellen. Diese können ihrerseits Mesangiumzellen, Fibroblasten und tubuläre Epithelzellen (TEC) aktivieren sowie die vermehrte Bildung von Fibroblasten, durch die Epithelial-mesenchymale Transition (EMT), initiieren (Kalluri and Neilson, 2003). Diese Fibroblasten sind in der Lage extrazelluläre Matrixkomponenten zu produzieren, was ein Ungleichgewicht zwischen Degradation und Aufbau der extrazellulären Matrix bewirkt (Rastaldi 2002). Daraus folgen vermehrt fibrotische Läsionen, welche die Architektur des Nierengewebes zerstören und zum Verlust der Nierenfunktion führen. Die Auswirkungen machen sich durch eine verringerte Rückresorption von Proteinen bemerkbar. Diese können bei einer Schädigung der Niere in erhöhter Konzentration im Urin nachgewiesen werden (Weening *et al.*, 2004).

### 1.3.3 Therapie des systemischen Lupus erythematoses

Bei der SLE-Erkrankung tritt eine Vielzahl von Kombinationen der unterschiedlichsten Manifestationen (Tabelle 1.1) auf. Aufgrund der unbekanntes Ätiologie zielt die medikamentöse Therapie auf die vorliegenden Manifestationen ab und richtet sich nach dem Stadium der Krankheit. Die Therapie hat vornehmlich zum Ziel irreversible Schäden zu verhindern, um die Langzeitprognose der Erkrankten zu verbessern und die Patienten vor weiteren Krankheitsschüben zu bewahren. Dabei kommen unterschiedliche Pharmaka zum Einsatz. Initial werden zur symptomatischen Behandlung NSAIDs oder GK verabreicht. GK wie Prednisolon entfalten ihre Wirkung unter anderem über eine Hemmung von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und AP-1 (Auphan *et al.*, 1995). Dies führt zu einer Inhibierung der T- und B-Zellantwort sowie zu einer Hemmung von Effektorfunktionen der Monozyten/Makrophagen und Neutrophilen, was neben der anti-entzündlichen auch eine krankheitsmodifizierende Wirkung erklärt (Tait *et al.*, 2008). Durch ihre pleiotrope Wirkung haben GK allerdings viele Nebenwirkungen (Luijten *et al.*, 2013). Hoch dosiert in akuten Krankheitsschüben und in der Langzeittherapie in geringen Konzentrationen eingesetzt (Yildirim-Toruner and Diamond, 2011), können GK zu Stoffwechselstörungen (Cushing-Syndrom), Ulzera und zu Nierenschäden führen (Reichl, 2007). NSAIDs wie Ibuprofen hingegen wirken durch die Hemmung der Cox's (Cyclooxygenase) inhibierend auf die Prostaglandinsynthese (Mutschler, 2013). Diese werden bei einer milden Manifestation der SLE-Erkrankung in Kombination mit Antimalariamittel wie Hydroxychloroquin verabreicht. Über die funktionelle Inhibierung der Phagosomen in den Makrophagen unterbindet Hydroxychloroquin die Aktivierung des

*Toll-like receptor* (TLR). Hydroxychloroquin kann auch präventiv zum Vorbeugen eines akuten Schubes gegeben werden, um den Patienten langanhaltend in Remission zu halten. Des Weiteren stehen als immunsuppressive Medikamente Cyclophosphamid, Azathioprin oder das in der LN überlegenere Mycophenolate Mofetil (MMF) zur Verfügung (Ginzler *et al.*, 2005; Yildirim-Toruner and Diamond, 2011). Der aktive Metabolit von MMF hemmt die Purinbiosynthese wodurch die Proliferation von aktivierten T- und B-Zellen verhindert wird (Mutschler, 2013). Eine immunsuppressive Behandlung sollte nach van Vollenhoven *et al.* (2014) mindestens drei Jahre lang erfolgen, um nach dem initialen Effekt eine Remission aufzubauen und Rückfällen vorzubeugen. Nach 50 Jahren wurde 2011 ein neues Medikament für die Behandlung des SLE zugelassen. Belimumab ist ein monoklonaler Antikörper gegen den B-Lymphozyten-Stimulator (BLyS) und zielt somit auf die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen ab (Navarra *et al.*, 2011).

Trotz der medikamentösen Therapie kann nur bei 25 - 30 % der behandelten SLE-Patienten eine Remission erreicht werden (Mosca and van Vollenhoven, 2013). Zudem weisen alle Therapieformen zahlreiche Nebenwirkungen auf (Mutschler, 2013). Neben einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen treten gastrointestinale und kardiovaskuläre Komplikationen auf, die die Mortalität der SLE-Patienten beeinflusst (Telles *et al.*, 2013). So haben SLE-Patienten noch immer eine dreifach höhere Mortalitätsrate als entsprechende Kontrollgruppen (Mak *et al.*, 2012; Urowitz *et al.*, 2008).

### 1.3.4 Modell zur Untersuchung der Lupus Nephritis

Neben den New Zealand Black/White (NZB/NZW) und den B6.SLE123 Mäusen stellt der Murphy Roths Large (MRL) *Fas<sup>lpr</sup>* Mausstamm eines der klassischen Tiermodelle zur Erforschung der Pathogenese und Therapie des SLE dar. Die MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse entwickeln spontan Lupus-ähnliche Symptome (Andrews *et al.*, 1978; Murphy and Roths, 1978) aufgrund einer autosomal rezessiven Mutation auf dem Chromosom 19 die zu einer Inaktivierung des *Fas*-Gens führt (Watson *et al.*, 1992). Aufgrund dieser *Fas*-Mutation kommt es in den Mäusen zu einem Defekt in der Apoptose von Lymphozyten (Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992), was zu einer lymphproliferativen Erkrankung (lpr) führt. Angesichts der fehlenden *Fas*-vermittelten Apoptose kommt es zu einer Akkumulation von Lymphozyten in den Lymphknoten und der Milz, einer T-Zell-vermittelten Aktivierung von B-Zellen, die unter anderem die Produktion von IgG Autoantikörpern vorantreibt (Bullard *et al.*, 1997). Die Mäuse entwickeln neben einer Lymphadenopathie und Splenomegalie auch eine Vaskulitis und Arthritis (Hang *et al.*, 1982). Das gravierendste Symptom in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen ist jedoch die Entwicklung einer schweren Glomerulonephritis. Diese ist bei den Mäusen im Alter von drei Monaten bereits nachweisbar und führt bei den Tieren im Alter von fünf bis acht Monaten zum Tode (Andrews *et al.*, 1978; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992). Aufgrund funktioneller Defekte

in den T-Zellen (Theofilopoulos *et al.*, 1980) kommt es zu einer anhaltend verstärkten Aktivierung von autoreaktiven B-Zellen und zu einer erhöhten Produktion von pathogenen Autoantikörpern wie dsDNA-Antikörper (Li *et al.*, 2002), die sich vor allem als Immunkomplexe in der Niere ablagern können (Murphy and Roths, 1978). Durch diese Ablagerung kommt es zur Aktivierung des Komplements, was zu einer Einwanderung von Immunzellen in die Niere führt. Diese fördern durch die lokale Produktion von Chemokinen und Zytokinen entzündliche Prozesse, die, durch das Rekrutieren weiterer Immunzellen, chronisch aufrechterhalten werden (Fan *et al.*, 1997). Wie auch bei der humanen LN kommt es in der Niere der Mäuse zu fibrotischen Prozessen, die letztendlich zum Funktionsverlust des Organs führen. Messbar ist auch dies durch eine erhöhte Proteinausscheidung im Urin (Rose, 1978).

Mäuse, die nicht die Mutation im *Fas*-Gen tragen, erkranken auch an einer Glomerulonephritis. Jedoch ist die Progression deutlich langsamer und die Manifestation nicht so ausgeprägt wie die in homozygoten Träger der Mutation. Die Mäuse versterben mit einer 50 %igen Mortalität in einem Alter von 17 Monaten (Kelley and Roths, 1985). Folglich wird deutlich, dass der genetische Hintergrund der MRL Mäuse die autoimmunen Prozesse in der Niere fördert, die *Fas*-Mutation hingegen die Manifestation einer Nephritis unterstützt.

Aufgrund der bestehenden Grunderkrankung der MRL Mäuse ohne *Fas*-Mutation werden in Untersuchungen als gesunde Vergleichsgruppe für die MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäuse häufig Mäuse des Balb/c Stammes verwendet.

## 1.4 Regulation der Genexpression

Der Organismus muss sich ständig wechselnden endogenen und exogenen Bedingungen anpassen. Hierfür ist die Regulation der Genexpression von entscheidender Bedeutung. Anomalien in der Regulation der Genexpression können beim Menschen unter anderem zu schwerwiegenden chronisch-inflammatorischen Erkrankungen führen. Für die Kontrolle der Genexpression haben sich verschiedene Mechanismen entwickelt, die zu jedem Zeitpunkt in die Prozesse für die Bildung von funktionsfähigen Proteinen eingreifen können. Neben der mRNA-Prozessierung, -Reifung und dem Transport der mRNA in das Zytoplasma spielen vor allem die transkriptionellen und posttranskriptionellen Mechanismen für die Generierung funktionsfähiger Proteine eine Rolle. Im Folgenden wird auf die letzten zwei Aspekte der Regulation eingegangen sowie die Rolle der microRNAs in der Regulation der Genexpression betrachtet.



### 1.4.1 Transkriptionelle Mechanismen

Das Umschreiben genetischer Informationen von DNA in RNA durch Transkription im Zellkern, ist der erste Schritt zur Proteinsynthese und wird durch *cis*- und *trans*-wirkende Elemente beeinflusst. Durch die Bindung eines Transkriptions-Initiationskomplexes an den basalen Promotor, meist über eine TATA-Box, stromaufwärts der Transkriptionseinheit beginnt das Umschreiben (Klug *et al.*, 2007). Der Transkriptions-Initiationkomplex besteht dabei immer aus der RNA-Polymerase II und allgemeinen Transkriptionsfaktoren (TFIIA-H), die die Bindung der Polymerase und die Initiation der Transkription unterstützen (Klug *et al.*, 2007). Die Aktivität des basalen Promotors kann durch weitere DNA-Sequenzen (proximale Promotoren) wie Guanin-Cytosin-reiche Elemente, CpG-Inseln oder CAAT-Sequenzen gesteigert werden (Hughes, 2011). Zusätzlich können komplexe Promotorfragmente, die sogenannten *Enhancer* und *Silencer*, die mehrere kb stromauf beziehungsweise stromabwärts vom proximalen Promotor entfernt liegen können, einen Einfluss auf die Regulation der Transkription haben (Munk, 2010). Spezifische Transkriptionsfaktoren wie STAT, NF- $\kappa$ B und NF-AT (*nuclear factor of activated T-cells*), die meist durch Proteinkinasen phosphoryliert und somit aktiviert werden, können an diese Kontrollelemente binden und damit gezielt bestimmte Gene in einer Zelle aktivieren oder inhibieren. Hierfür binden die spezifischen Transkriptionsfaktoren an die Kontrollsequenz und, durch eine Schleifenbildung der DNA, direkt an die RNA-Polymerase oder an einen allgemeinen Transkriptionsfaktor (Alberts, 2008). Dies spielt eine besondere Rolle bei der Steuerung proinflammatorischer Prozesse in der Zelle, die durch eine Phosphorylierung der oben genannten Transkriptionsfaktoren die Transkription von entzündungsrelevanten Genen initiiert. Daher sind sie potentielle Ansatzpunkte bei der medikamentösen Therapie von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen wie dem SLE oder der RA (Ivanenkov *et al.*, 2011).

Bevor die mRNA in das Zytoplasma transloziert wird, unterliegt die transkribierte prä-mRNA weiteren Reifeprozessen. Diese beinhalten das Anfügen einer 7-Methyl-Guanosin Kappe am 5'-Ende und das Entfernen von Introns mittels des Spleißing-Prozesses. Zudem wird zumeist am 3'-Ende durch die Poly (A)-Polymerase ein Schwanz aus 100 - 250 Adenyl-Resten angehängt (Alberts, 2008).

### 1.4.2 Posttranskriptionelle Mechanismen

Nach dem Reifungsschritt der prä-mRNA besitzt die reife mRNA neben der kodierenden Sequenz zumeist eine 5'-untranslatierte Region (5'-UTR) und eine 3'-untranslatierte Region (3'-UTR), denen bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression eine besondere Bedeutung zukommt (Halbeisen *et al.*, 2008). Diese Strukturen können den Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Zytoplasma, die Effektivität der Translation der

mRNA sowie die Stabilität der mRNA beeinflussen (Bashirullah *et al.*, 2001; Jansen, 2001; van der Velden and Thomas, 1999). Die Modulation der mRNA-Stabilität ist dabei einer der entscheidenden Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation und wird durch die Interaktion mit microRNAs (Kapitel 1.4.3) und RNA-BP reguliert. Letztere beeinflussen die Halbwertszeit der mRNA durch die Bindung an sogenannte *cis*-Elemente in der 3'-UTR, wie Adenin- und Uridinreiche Elemente (ARE). AREs befinden sich Schätzungen zufolge in 5 – 8 % aller mRNAs, die für Zytokine, Wachstumsfaktoren, Transkriptionsfaktoren und Rezeptoren codieren (Bakheet *et al.*, 2006). Somit spielt die Regulation der mRNA-Stabilität in inflammatorischen und immunologischen Reaktionen, Transkription, Proliferation, RNA-Metabolismus und -Entwicklung eine wichtige Rolle (Khabar, 2010). In einer direkten oder indirekten Interaktion mit den AREs können RNA-BP wie KSRP, AUF1 (*AU-rich element RNA-binding protein 1*) oder Tristetraprolin (TTP) als *trans*-agierende Faktoren eine verstärkte Deadenylierung der mRNA vermitteln und über eine beschleunigte Hydrolyse der 5'-Kappe die mRNA degradieren (Khabar, 2010). Im Gegensatz zu den eben genannten RNA-BP scheint HuR (*human antigen R*) eine überwiegend stabilisierende Funktion einzunehmen (Meisner and Filipowicz, 2010). Die Relevanz der destabilisierenden Funktion von RNA-BP für Entzündungsprozesse konnte für TTP exemplarisch in einem Tiermodell dargestellt werden. So entwickeln TTP-defiziente Mäuse spontan schwere inflammatorische Prozesse, die zu einer Kachexie führen und sich in Form einer erosiven Arthritis und Dermatitis manifestieren (Taylor *et al.*, 1996). Der chronisch-entzündliche Vorgang in den TTP-defizienten Mäusen wurde auf die erhöhte mRNA-Stabilität von TNF $\alpha$ , GM-CSF1 (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) und IL6 zurückgeführt, welche als proinflammatorische Zytokine die Expression verschiedener entzündungsfördernder Mediatoren steuern können (Taylor *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 2011b). Aufgrund dieser Befunde ist es nicht auszuschließen, dass es im Verlauf der SLE-Erkrankung zu einer Dysregulation der Expression oder Aktivität von RNA-BP kommt (Sanduja *et al.*, 2012), da in der Progression der Erkrankung vermehrt Zytokine und Chemokine gebildet werden, die posttranskriptionell über die ARE-Elemente in der 3'-UTR reguliert werden können.

### 1.4.3 microRNAs als Regulatoren der Genexpression

MicroRNAs sind endogene, nichtcodierende RNAs, die aus 21 - 23 Basenpaaren (bp) bestehen und in der Lage sind posttranskriptionell die Expression von verschiedenen Genen zu modulieren (Filipowicz *et al.*, 2008). Hierfür bilden die muren microRNAs mit Argonauten-Proteinen einen *RNA-induced silencing complex* (RISC) und binden dann an die 3'-UTR der *cis*-Sequenzelemente der Ziel-mRNA (Cannell *et al.*, 2008). Dies kann zu einer Degradierung, Destabilisierung oder zur Unterdrückung der Translation der mRNA

führen (Ma and Liu, 2013). MicroRNAs können in Intron, Exons oder Genclustern codiert sein (Marco *et al.*, 2013).

Die Biogenese der microRNAs (Zusammengefasst aus Filipowicz *et al.* (2008)) wird im Zellkern durch die Transkription der microRNA-Sequenz mittels RNA Polymerase II oder III initiiert. Das Primärtranskript (pri-microRNA) ist zumeist mehrere hundert Basenpaar (bp) lang, besitzt eine 5'-Kappen-Struktur sowie einen 3'-Poly-A-Schwanz und liegt in einer Haarnadelstruktur vor. Mittels des *Microprocessor complex*, der aus der Endonuklease Drosha, einer RNase III und dem Protein DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) besteht, wird die pri-microRNA zu einer 70 - 100 bp langen pre-miRNA (*precursor microRNA*) gespalten. Anschließend wird sie mittels RAN-GTP und Exportin 5 in das Zytoplasma transportiert, entwunden und mit einem Dicer-TRBP (*HIV-1 transactivating response (TAR) RNA-binding protein*)-Komplex zu einem 21 - 23 Nukleotid langen RNA Doppelstrang geschnitten. Dabei wird einer der komplementären Stränge (microRNA\*) meist abgebaut. Der native microRNA Strang bildet dann zusammen mit einem Argonautenprotein den RISC. In diesem Komplex wird die microRNA zu ihrer Ziel-mRNA transportiert und kann dort deren Expression beeinflussen. In welcher Art die Ziel-mRNA von der microRNA reguliert wird, ist abhängig von dem Grad der Basenpaarbindung. Die Spezifität dafür liegt in der sogenannten Bindesequenz am 5'-Ende der microRNA („seed“-Region). Besteht in der Sequenz zwischen microRNA und Ziel-mRNA eine bis zu 95 %ige Homologie, wird die mRNA abgebaut (Liu *et al.*, 2005). Bei einer unvollständigen Basenpaarung kommt es zur Hemmung der Translation, wodurch die Proteinmenge der Ziel-mRNA reduziert wird, oder zur Deadeylierung der mRNA. Aufgrund der speziellen Bindung von microRNAs kann jede einzelne microRNA potentiell hunderte Ziel-mRNA regulieren, wobei sie zusätzlich mit ARE-RNA-bindenden Proteinen um die Zielsequenz konkurrieren, aber auch mit ihnen interagieren können (Halbeisen *et al.*, 2007).

Als posttranskriptionelle Regulatoren sind microRNAs in diverse biologische Prozesse involviert. In dieser Funktion sind sie unter anderem an der Differenzierung von Immunzellen und an der Regulation des adaptiven sowie des angeborenen Immunsystems beteiligt (Gracias and Katsikis, 2011). Eine Dysregulation der Expression dieser microRNAs im Zuge pathophysiologischer Prozesse kann zur Auslösung von Entzündungen und systemischen Autoimmunerkrankungen beitragen (Shen *et al.*, 2012). Eben dies konnte für SLE-Patienten und für verschiedene murine SLE-Modelle in mehreren Publikationen gezeigt werden (Dai *et al.*, 2010; Carlsen *et al.*, 2013; Miao *et al.*, 2013). Dabei scheint die differentielle Expression der microRNAs zur Pathogenese des SLE beizutragen, da sie in die Regulation des Typ I Interferon Signalweges, die Expression von inflammatorischen Zytokinen sowie bei T-Zellen in die Methylierung der DNA eingebunden sind (Shen *et al.*, 2012).

## 1.5 Bedeutung der p38 MAPK in inflammatorischen Prozessen

Über den Signalweg der *mitogen-activated protein Kinase* p38 (p38 MAPK) werden verschiedene Prozesse der Proliferation, der Zelldifferenzierung und der Apoptose reguliert. Die p38 MAPK kann in vier Isoformen (p38 MAPK $\alpha$ , - $\beta$ , - $\gamma$  und - $\delta$ ) vorliegen, wobei nur die p38 MAPK $\alpha$  und - $\beta$  ubiquitär exprimiert werden (Schett *et al.*, 2008). Neben externen Stimuli wie UV-Licht sind inflammatorische Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL1 $\beta$ , als auch Wachstumsfaktoren wie CSF-1 (*colony stimulating factor 1*) für die Induktion der p38 MAPK verantwortlich (Zarubin and Han, 2005). Die Signale der verschiedenen Induktoren werden dabei hauptsächlich über Kinasekaskaden weitergeleitet. Aktiviert wird die p38 MAPK durch vorgeschaltete Kinasen wie die MAP Kinase Kinase (MKK) 3 und MKK 6, die die p38 MAPK phosphorylieren (p-p38 MAPK).

Die so aktivierte p38 MAPK kann zum einen in den Zellkern translozieren, wo sie Transkriptionsfaktoren und Kinasen durch Phosphorylierung aktiviert, die wiederum die Produktion von proinflammatorischen Mediatoren initiieren (Iwata *et al.*, 2003). Diese Gene umfassen Zytokine, Rezeptoren auf der Zelloberfläche und vor allem Transkriptionsfaktoren (Zarubin and Han, 2005). Mit letzteren ist es offensichtlich, dass die p38 MAPK ihren Einfluss auf transkriptioneller Ebene der Genexpression verstärkt (Zarubin and Han, 2005). So aktiviert und phosphoryliert die p-p38 MAPK Transkriptionsfaktoren wie NF-AT (*Nuclear factor of activated T-cells*), welcher Einfluss auf die Interleukin Expression nehmen kann (Wu *et al.*, 2003), ATF-2 (*activating transcription factor 2*) der durch Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren der JUN Familie an typische AP-1 Sequenzen binden kann (Zhao *et al.*, 1999) und MEF2C (*myocyte enhance factor 2C*), welcher die Expression von c-Jun verstärken kann (Zhao *et al.*, 1999). Wie bereits erwähnt, führt die Phosphorylierung der p38 MAPK auch zur Aktivierung weiterer Proteinkinasen wie den *MAPK-activated protein kinases* (MAPKAP-Kinasen) 2, 3, 5, die wiederum Transkriptionsfaktoren phosphorylieren können (Laufer *et al.*, 2002).

In Studien konnte zudem gezeigt werden, dass der p38 MAPK Signalweg imstande ist die Expression von proinflammatorischen Genen durch die Regulation ihrer mRNA-Stabilität auch posttranskriptionell zu verändern (Kyriakis and Avruch, 2012). Im diesem Sinne führt die Aktivierung des p38 MAPK-Signalweges zur Phosphorylierung von TTP und KSRP. Dies vermindert die Affinität dieser RNA-BP an die AREs ihrer Ziel-mRNAs zu binden (Khabar, 2010). Das hat zur Folge, dass die Halbwertszeit dieser Ziel-mRNA im Zytosol verlängert wird, was eine erhöhte Proteinexpression dieser Gene bedingt. Somit kann die p-p38 MAPK durch verschiedene Mechanismen in die Regulation von entzündlichen Prozessen eingreifen (Hill *et al.*, 2008), mit weitreichenden Folgen für den Organismus.

In Zusammenhang mit der Etablierung einer LN konnte in SLE-Patienten und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen eine erhöhte Anzahl an p-p38 MAPK-positiven Zellen in der Niere nachgewiesen werden (Iwata *et al.*, 2003; Stambe *et al.*, 2004). Die Anzahl positiver Zellen korrelierte dabei mit den Läsionen im Nierengewebe und mit dem Versagen der Nieren. Eine Aktivierung der p38 MAPK scheint damit eine bedeutende Rolle in der Pathogenese der LN zu spielen, wobei entzündliche wie auch fibrotische Prozesse durch die Kinase gefördert werden (Stambe *et al.*, 2004).

## 1.6 Wirkstoffe aus Pilzen als Inhibitoren der Expression proinflammatorischer Gene

Chronisch-entzündliche Erkrankungen sind eines der wichtigsten Indikationsgebiete für Medikamente in der heutigen Zeit. Dabei ist der Bedarf an neuen, nebenwirkungsärmeren Wirkstoffen für die Behandlung der Patienten sehr hoch. Ein Großteil der heute eingesetzten Arzneimittel geht auf Naturstoffe und deren Derivate zurück (Estler *et al.*, 2007). Mit der Industrialisierung im 19. Jahrhundert war es möglich, chemisch reine Wirkstoffe zu isolieren und zu synthetisieren, wobei bekannte Naturstoffe als Leitstrukturen dienten (Fischer and Breitenbach, 2013). Seit Alexander Fleming 1928 die wachstumshemmende Wirkung des Schimmelpilzes *Penicillium notatum* auf Bakterien beobachtete, weiß man, dass auch Sekundärmetabolite, die von Pilzen produziert werden, als Arzneimittel genutzt werden können.

In der heutigen Zeit werden Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente identifiziert, indem gezielt das pharmakologische Potential dieser sekundären Stoffwechselprodukte auf pathologisch relevante Signalwege überprüft wird. So konnte bei der Suche nach anti-inflammatorischen Substanzen eine entzündungshemmende Wirkung des Sekundärmetabolit (S)-Curvularin, welcher aus einer *Penicillium*-Art isoliert wurde, nachgewiesen werden (Schmidt, 2009; Elzner *et al.*, 2008). In *in-vitro* und *in-vivo* Analysen im Modell der CIA konnte (S)-Curvularin in einer Konzentration von 10 µg pro g Körpergewicht die vermehrte Expression von inflammatorischen Mediatoren wie TNF- $\alpha$ , iNOS (*inducible nitric oxidase synthase*) und MCP-1 sowohl auf mRNA- als auch Proteinebene deutlich hemmen. Zudem konnten im Tiermodell die Symptome der RA wie die Schwellung der Gelenke und Knöchel durch die Behandlung mit der Verbindung deutlicher reduziert werden (Schmidt, 2009). Dabei war die Wirksamkeit der Substanz vergleichbar mit einer GK-Therapie.

In weiteren *in-vitro* Analysen konnte auch der (S)-Curvularin strukturverwandte Sekundärmetabolit Oxacyclododecindion (Oxa) als anti-inflammatorische, anti-fibrotische und anti-angiogenetische Substanz identifiziert werden (Rudolph *et al.*, 2013).

Das makrozyklische Lacton (Abbildung 1.1), welches aus Fermentationen des imperfekten Pilzes *Exsherohilum rostratum* isoliert werden konnte, wurde initial als Inhibitor der IL4 abhängigen Signaltransduktion charakterisiert (Erkel *et al.*, 2008). In weiteren Analysen mit der humanen Leberkarzinom-Zelllinie HepG2-Zellen zeigte sich, dass Oxa, ohne zytotoxische Effekte zu vermitteln, hoch potent neben der JAK/STAT- auch die TGF- $\beta$ - (*transforming growth factor- $\beta$* ) und HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor 1 alpha*) -abhängige Signaltransduktion hemmte (Serwe, 2007). Die Inhibition der Signaltransduktion war bei gleicher Konzentration durch Oxa bis zu 200-fach stärker auf die einzelnen Signalwege als die von (S)-Curvularin (Rudolph *et al.*, 2013).

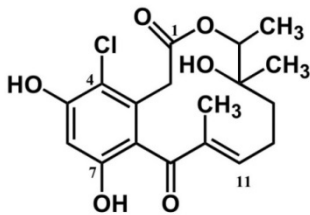


Abbildung 1.2: Chemische Strukturformel von Oxacyclododecindion (Oxa)

In Untersuchungen zur Hemmung der TGF- $\beta$ -induzierten Genexpression durch Oxa konnte gezeigt werden, dass Oxa keinen Einfluss auf die Phosphorylierung der Sma/Mad-Gen Homologe (SMAD) 2/3 hat, die als erste regulatorische Einheit in der TGF- $\beta$  Signalkaskade stehen (Abbildung 1.3). Weitere Analysen konnten jedoch eine Hemmung von Oxa auf die Bindung aktivierter SMAD-Komplexe an die DNA nachweisen (Serwe, 2007), wodurch der hemmende Effekt von Oxa auf die Expression von TGF- $\beta$ -induzierten profibrotischen und proangiogenen Zielgenen erklärt werden kann (Abbildung 1.3). Untersuchungen des STAT1-, STAT3- und STAT6-Signalweges zeigten, dass Oxa seine Wirkung nicht über die Hemmung der Phosphorylierung der STATs vermittelt, sondern auch hier die DNA-Bindungsaktivität der STATs durch die Substanz beeinflusst wird (Abbildung 1.3). Durch Hemmung der Bindung der aktivierten STAT-Transkriptionsfaktoren wird die Produktion von Zytokinen und Chemokinen verringert, womit Oxa einen anti-inflammatorischen Effekt vermitteln kann. Die hemmende Wirkung von Oxa auf die transkriptionelle Aktivierung inflammatorischer Signalwege ohne die Phosphorylierung der beteiligten Transkriptionsfaktoren zu modulieren, ließ Serwe (2007) vermuten, dass Oxa die Wechselwirkungen zwischen den aktivierten Transkriptionsfaktoren mit transkriptionellen Kofaktoren wie p300 inhibiert.

In microRNA und DNA-Mikroarray-Analysen wurden neue Zielstrukturen und weitere Angriffspunkte von Oxa identifiziert. Demnach konnte Anspach (2011) in *in-vitro* Untersuchungen zeigen, dass auch zahlreiche microRNAs (unter anderem microRNA 140, 216 und 34a) in ihrer Expression durch Oxa beeinflusst werden, die an der Regulation inflammatorischer Prozesse beteiligt sind. Darüber hinaus zeigten die Mikroarray-Analysen mit der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 eine Reduktion der Expression von zahlreichen Zytokinen, Chemokinen, Adhäsionsmolekülen und

Transkriptionsfaktoren. Weitere qRT-PCR (*quantitative real time Polymerase chain reaction*) Analysen in den MDA-AB-231 zeigten zudem, dass in induzierten Zellen eine reduzierte Expression der MMP-2, PAI-1 (*plasminogen-activator inhibitor-1*) und TGF- $\beta$  mRNA durch Oxa erfolgte. Aufgrund der Funktion dieser Gene in fibrotischen und entzündlichen Prozessen unterstützen diese Befunde erneut die Annahme, dass Oxa anti-fibrotische und anti-entzündliche Effekte vermittelt.

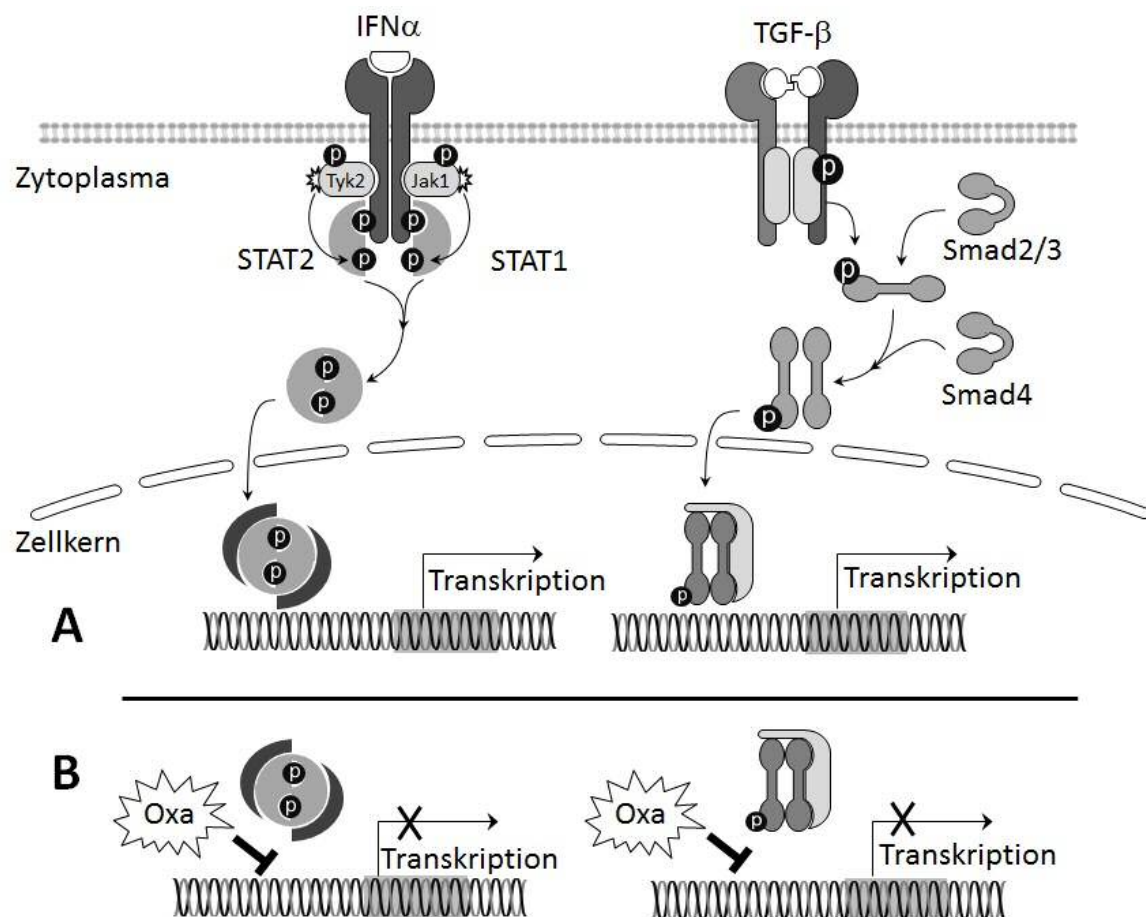


Abbildung 1.3: Die TGF- $\beta$  und JAK/STAT-Signaltransduktion (A) sowie hemmende Wirkung von Oxa auf die DNA-Bindekapazität der Komplexe (B)

In Voruntersuchungen testete Casper (2013) im Lipopolysaccharid (LPS)- induzierten Entzündungsmodell die *in-vivo* Wirkung von Oxa. Hierfür wurden die Mäuse zwei Stunden vor einer LPS (5  $\mu$ g/g) Injektion mit 1  $\mu$ g Oxa pro Gramm Körpergewicht oder mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH behandelt. Nach sechs Stunden wurden dann die Organe für die Untersuchung der Genexpression entnommen. Die qRT-PCR-Analysen wiesen erstmals eine hemmende Wirkung von Oxa auf proinflammatorische Mediatoren wie S100A8 und TNF $\alpha$  auch *in-vivo* nach (Casper, 2013).

Die Befunde der *in-vitro* und *in-vivo* Analysen legen nahe, dass Oxa als neue Leitstruktur für die Entwicklung neuer Medikamente in der Therapie von chronisch-entzündlichen und fibrotischen Erkrankungen dienen kann (Rudolph *et al.*, 2013).

## 1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die heutige medikamentöse Therapie von chronisch-entzündlichen Erkrankungen erlaubt keine langfristige, nebenwirkungsarme oder -freie Behandlung. Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises wie die rheumatoide Arthritis (RA) oder der systemische Lupus erythematodes (SLE) sind typische Vertreter chronisch-entzündlicher Autoimmunerkrankungen bei denen die Patienten oft ein Leben lang auf eine medikamentöse Therapie angewiesen sind. Naturstoffe wie der Sekundärmetabolit Oxacyclododecindion (Oxa) können als Leitstrukturen für die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung der Erkrankung dienen. Oxa wurde im Rahmen von Vorarbeiten als potenter Inhibitor der JAK/STAT-, TGF- $\beta$ - und HIF1 $\alpha$ -Signaltransduktion identifiziert und hemmte so die Expression von proinflammatorischen, -fibrotischen und -angiogenen Faktoren.

Ziel dieser Arbeit war es das therapeutische Potential von Oxa zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen aufzuklären. Hierfür sollten *in-vivo* Versuche mit Mäusen durchgeführt werden, die Symptome einer RA oder spontan eine Lupus-ähnliche Erkrankung (MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse) entwickeln. Zu diesem Zweck sollte die Methode der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) in einem Mausstamm etabliert werden, der die geschlechtsspezifische Verteilung der humanen Inzidenzen widerspiegelt (HLA-DR4-AE $^{\circ}$  Mäuse). Für das etablierte SLE-Modell der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse musste ein Zeitpunkt für die Behandlung mit dem Naturstoff definiert werden. Die Wirkung von Oxa sollte zuerst auf die Expression inflammatorischer und krankheitsrelevanter Gene in verschiedenen Organen auf mRNA- und Proteinebene untersucht werden. Im Anschluss sollten im SLE Modell die anti-inflammatorische und immunmodulierende Wirkung von Oxa in der Niere, dem Hauptzielorgan der Erkrankung, mittels klinischer Parameter, durchflusszytometrischen und histopathologischen Analysen aufgeklärt werden.

Gegenstand weiterer Untersuchungen war es Zielstrukturen und Angriffspunkte von Oxa mit Hilfe von DNA-Mikroarray-Analysen zu identifizieren. Diesbezüglich sollte auch die Wirkung von Oxa auf die Expression von microRNAs untersucht werden. Mit zusätzlich Software-gestützten Netzwerkanalysen und „*Upstream*“-Analysen sollten weitere Hinweise über mögliche Interaktionen erlangt werden.

Aufgrund der erhaltenen Befunde wurde des Weiteren gezielt der Effekt von Oxa auf die transkriptionelle und posttranskriptionelle Genregulation untersucht.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Geräteart	Gerät	Bezeichnung	Hersteller	
Elektrophorese	Gleichstromquelle für Agarosegelelektrophorese	GPS 200/400	Pharmacia	
	Gleichstromquelle für SDS-Gelelektrophorese/ Semi-Dry-Blotter	Power Pac 300, Power Pac HC	Bio-Rad	
	Kapillarelektrophorese	Experion	Bio-Rad	
	Vertikal-Gelelektrophorese-Kammer	Mini Protean II	Bio-Rad	
Kühlgeräte	-20°C Gefrierschrank	Öko Super, Comfort	Liebherr	
	-80°C Gefrierschrank	Herafreeze	Heraeus	
	+ 4°C Kühlschranks	Profi Line	Liebherr	
	Kühlbox für Kryokonservierung	Mr. Frosty Freezing Container	Thermo Scientific	
	Zellkulturtank	Cryo 200	Thermo Scientific	
Messgeräte	Luminometer	Centro LB 960	Berthold Techn.	
	Spektrometer	Sunrise	Tecan	
		FluoStar Optima	BMG	
	Spektrophotometer	Nanodrop ND-1000	PeqLab	
	pH-Meter	Wtw	InoLab	
	quantitatives realtime RT-PCR-Gerät	iCycler	Bio-Rad	
	Microarray Scanner	ScanArray Express Microarray Scanner	Perkin Elmer	
	Chemidoc XRS		Bio-Rad	
	Waagen	Analytic AC 120 S (0,1 mg – 121 g)		Satorius
		Ew (0,02 g – 120 g)		Kern
440-35 N (0,01 g – 400 g)			Kern	
PCB (0,1 g – 400 g)			Kern	

<b>Geräteart</b>	<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipetten	Einkanalpipetten	0,5 – 10 µl, 10 – 100 µl, 100 – 1000 µl	Brand
		2 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Gilson Pipetman
	Mehrkanalpipette	Research plus	Eppendorf
	Pipeteboy	Acu und comfort	IBS
Schüttler	Kreisschüttler	KS 250 Basic	IKA Labortechnik
	Reaktionsgefäßschüttler		VWR
	Wippschüttler	DRS-12	NeoLab
	Schüttelinkubator	Innova®40	NBS
	Überkopfschüttler	Intelli-Mixer	NeoLab
Zentrifugen	Kühlzentrifugen	Avanti J-30 I	Beckmann
		Biofuge fresco/ 13	Heraeus
		Megafuge 1.0R	Heraeus
		Micro Star 17 R	VWR
	Tischzentrifugen	Biofuge 12	Heraeus
		Perfect Spin P	PeqLab
		Galaxy Mini	Merck Eurolab
Sonstige	Autoklav	Labklav	VWR
	Brutschrank	HeraCell 150	Heraeus
		HeraCell 150i	Thermo Scientific
			Ziegla
	Eismaschine		Becton Dickinson
	FACSCalibur		PeqLab
	Heizblock		Janke & Kunkel
	Homogenisator	Ultra Turrax T25	Amersham Bioscience
	Hybridisierungsgerät	Lucidea Slide Pro Hybridizer	Binder
	Inkubationsschrank	B28	IKA Labortechnik
	Magnetrührer	Ikamag RCT, Ikacombimag, Big- Squid Ikamag	
	Mikroliterspritze	50 µl	Hamilton
	Mikroskop	Leica DMIL	Leica
	Mikrowelle		MDA
	PCR-Zykler	MyCycler	Bio-Rad
	Semi-Dry-Blotter	Trans-Blot SD	Bio-Rad
	Sterile Werkbank	Herasafe	Heraeus
	Sonifikator	Bioruptor plus	Diagenode
	TissueLyser	TissueLyser LT	Qiagen

<b>Geräteart</b>	<b>Gerät</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
	Vakuumpumpe	Vacusaft comfort	IBS
	Wasseraufbereitungsanlage	Milli-Q plus	Millipore
	Wasserbad	Julabo TW20	Julabo
		1092	GFL
	Hämozytometer	Neubauer Zählkammer	Labotec

### 2.1.2 Software

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
Flowjo Version 9.4.11	Tree Star
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software Inc.
Image Lab	Bio-Rad
Magellan 6	Tecan
Mikrowin 2000	Mikrotek Laborsysteme
miScript miRNA PCR Array data analysis	Qiagen
MyiQ5 Optical System Software Version 2.0	Bio-Rad
PPT Drawing Toolkits	MOTIFOLIO
QuantityOne	Bio-Rad
Webarray Database	Open Source

### 2.1.3 Chemikalien und Lösungen

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
ACK-Puffer	BioSource International
Agar-Agar	Roth
Agarose universal	PeqLab
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich
Ammoniumsulfat	AppliChem
ATP	AppliChem
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Borsäure	AppliChem
Bovines Serum Albumin, Fraktion V (BSA)	AppliChem
10x BSA (gelöst)	NEB
Bradford-Reagenz	Bio-Rad
Bromphenolblau	AppliChem
Calciumchlorid (CaCl <sub>2</sub> )	Roth

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Chloroform	AppliChem
Coenzym A	AppliChem
Coelentrerazin	PJK
Collagen Type II (Huhn)	Sigma-Aldrich
Schweine Typ II (Schwein)	Biomol
Komplettes Freund'sches Adjuvant (CFA)	Otto Nordwald
3'3'-Diaminobenzidin	Vector Laboratories
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
D-Luciferin	AppliChem
dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	PeqLab
DTT (1,4-Dithiothreitol)	AppliChem
Entwicklerflüssigkeit	Agfa
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Ethanol, vergällt	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	AppliChem
Ethidiumbromid	Serva
Fixierflüssigkeit	Agfa
GeneJuice <sup>®</sup>	Calbiochem
Glycerin	Roth
Glycin	AppliChem
Guanidiniumisothiocyanat (GIT)	Roth
Hefeextrakt	Roth
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropanol	AppliChem
Isofluran	Abbott
Kaliumbicarbonat (KHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich
Kaliumchlorid (KCl)	Roth
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich
Magermilchpulver	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) für Puffer	AppliChem
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) für PCR	PeqLab
Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> )	Roth
Methanol	AppliChem
Natriumacetat (NaAc)	Roth
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	Roth
Natriumchlorid (NaCl)	Roth

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Natriumcitrat	AppliChem
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth
Natriumhydroxid	Roth
Natriumnitrit	Sigma-Aldrich
N-Laurylsarcosine	AppliChem
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma-Aldrich
Normales Kanninchen Serum (NS)	Vector Laboratories
5x Passive Lysis Puffer (PLB)	Promega
Pepton aus Casein	Roth
Phenol, trisgesättigt	AppliChem
Phenol, wassergesättigt	AppliChem
Ponceau S	Roth
Propidiumiodid	Roth
Protaminsulfat	Roth
Rotiphorese <sup>®</sup> Gel 30	Roth
RotiSafe	Roth
Salzsäure (HCl)	Roth
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Sigma-Aldrich
SDS ultra pure	Roth
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED)	Roth
TissueTek <sup>®</sup> O.C.T	Sakura Finetek
TMB- Substrat	Zymed
Tricin	Sigma
Tris	AppliChem
4 % Trypanblau	Serva
Tween-20	Roth
Xylencyanol	AppliChem

### 2.1.4 weitere Lösungen und Puffer

#### ACK-Puffer

150 mM	NH <sub>4</sub> Cl
1 mM	KHCO <sub>3</sub>
0,1 mM	EDTA
Steril filtrieren	

**Base-Puffer, 50x**

5 M NaOH

0,5 M EDTA

Steril filtrieren

**Blockpuffer I für ELISA, pH 8,0**

50 mM Tris

0,14 M NaCl

1 % BSA

**Transfer-Puffer**

25 mM Tris-HCl, pH 8,3

960 mM Glycin

20 % Methanol

**DEPC-Wasser**

200 µl/l DEPC

**DNA Probenpuffer, 10x**

20 % Ficoll 500

0,1 % Bromphenolblau

0,1 % Xylencyanol

In 1x TBE-Puffer

**EDTA-Puffer**

30 mM EDTA

0,01 % NaN<sub>3</sub>

In 100 ml PBS

**FACS-Puffer**

5 % FCS

0,09 % NaN<sub>3</sub>

In PBS

**GIT-Puffer (pH 6,7)**

4 M GIT

25 mM Natriumcitrat, pH 7,0

0,5 % N-Laurylsarcosin

frisch hinzugeben:

0,1 M β-Mercaptoethanol

**Laemmli-Puffer, 5x**

312,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
5,0 mM	EDTA
15 %	SDS
0,015 %	Bromphenolblau
50 %	Glycerin
40 mM	DTT (vor Gebrauch frisch hinzugeben)

**Lauf-Puffer, 5x**

124 mM	Tris
960 mM	Glycin
17,3 mM	SDS

**Luciferase-Puffer, 2x**

60 mM	Tricine, pH 7,8
0,2 mM	EDTA
30 mM	MgSO <sub>4</sub>
20 mM	DTT

**Maniatis I**

50 mM	Glucose
25 mM	Tris-HCl, pH 8,8
10 mM	EDTA

**Maniatis II**

200 mM	NaOH
1 %	SDS

**Maniatis III**

3 M	KAc, pH 4,8
-----	-------------

**Neutralisations-Puffer, 50x**

2 M	Tris-HCl
Steril filtrieren	

**Ponceau S-Färbelösung**

0,5 %	Ponceau S
1 %	Eisessig

**Proteinase K-Puffer (20 mg/ml)**

20 mg/ml	Proteinase K
20 mM	Tris-HCl, pH 8
1 mM	CaCl <sub>2</sub>
50 %	Glycerin

**Prä-Hybridisierungspuffer**

5 x	SSPE
0,1 %	SDS
1 %	BSA

**Probenpuffer I für ELISA, pH 8,0**

50 mM	Tris
0,14 M	NaCl
1 %	BSA
0,05 %	Tween 20

**Renilla-Puffer**

0,1 M	NaCl
1 mM	CaCl <sub>2</sub>
25 mM	Tris, pH 7,5

**RIPA-Puffer**

50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
150 mM	NaCl
1 %	NP-40
2 mM	EDTA
10 %	Glycerin

Protease- & Phosphataseinhibitor nach Herstellerangaben frisch hinzugeben

**SSPE-Puffer, 20x**

3 M	NaCl
0,2 M	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
0,02 M	EDTA



**STE-Puffer**

1 M	Tris, pH 8
5 m	NaCl
10 %	SDS
0,5 M	EDTA
Steril filtrieren	

**TAE-Puffer, 10x**

400 mM	Tris/NaOH, pH 8
1,14 Vol.-%	Essigsäure
20 mM	EDTA

**0,8 x TAE-Puffer mit RotiSafe**

30 µl/l	RotiSafe
---------	----------

**Taq-Puffer, 2x**

40 mM	Tris-HCl, pH 8,7
20 mM	Ammoniumsulfat
8 mM	MgCl <sub>2</sub>
20 mM	KCl

**TBE, 10x**

890 mM	Tris-HCl, pH 8,0
890 mM	Borsäure
20 mM	EDTA

**TBS, 10x**

10 mM	Tris-HCl, pH 7,8
150 mM	NaCl

**TBST-Puffer**

0,1 %	Tween-20
10 %	TBS, 10x

**TE-Puffer, 10x**

100 mM	Tris-HCl, pH 7,5
10 mM	EDTA

**Trypanblau-Lösung, 0,4 %**

4 %	Trypanblaulösung in PBS
-----	-------------------------

**Waschpuffer I für ELISA, pH 9,6**

50 mM	Tris
0,14 M	NaCl
0,05 %	Tween 20

**Waschpuffer Mikroarray**

2 x SSPE + 0,1 % SDS
2 x SSPE
0,1 x SSPE + 0,1 % SDS
0,1 x SSPE

**2.1.5 Bakterienmedien****LB-Medium, pH 7,0**

10 g	Pepton aus Casein
10 g	NaCl
5 g	Hefeextrakt

**LB-Amp-Medium**

100 µg/ml	Ampicillin
in LB-Medium	

**LB-Amp-Platten**

15 g	Agar-Agar
1 l	LB-Amp-Medium

**2.1.6 Bakterienkultur**

Für die Klonierung wurden TOP 10 (Escherichia coli) der Firma BioLabs verwendet.

**2.1.7 Marker**

	Name	Hersteller
DNA Marker	pcDNAI-Amp <sup>r</sup> Hinf I (22 – 1058 bp)	AG Kleinert
	GeneRuler 1kb (250 – 10000 bp)	Thermo Scientific
Protein-Marker	Pager Ruler, Prestained (10 – 180 kDA)	Fermentas

## 2.1.8 Kits

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit	Qiagen
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories
ELISA Quanta Lite HA dsDNA	Inova
ELISA C3 (SEA861mu)	Cloude Clone Corporation
ELISA S100A8 (E91792mu)	USCN
ELISA Mouse Albumin Quantitation Set	Bethyl Laboratories
Experion™ RNA StdSens Analysis Kit	Bio-Rad
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
Infinity™ BUN Kit	Thermo Electron
Inflammatory Response & Autoimmunity miScript SYBR Green PCR Kit (MIMM-105Z)	Qiagen
Low Elution cDNA Purification Module	Invitrogen
Mouse OneArray® v2 Genchips	Phalanx Biotech
P450-Glo™ Cyp3A4 Assay (Luciferin-PFBE)	Promega
PerfeC <sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix	Quanta Biosciences
Plasmid Midi Kit	Invitrogen
Proteome Profiler™ Mouse Cytokine Array Panel A Kit	R&D Systems
qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit	Quanta Biosciences
qScript™ microRNA Quantification System	Quanta Biosciences
Red Taq Ready Mix R2523-100RXN	Sigma-Aldrich
RNeasy Midi Kit	Qiagen
Super Script Plus Direkt Labeling Kit	Invitrogen
TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems
TH17/Treg Phenotyping Kit	BD Pharmingen™
Western Lightning, Chemilumineszenz-Reagenz	PerkinElmer

## 2.1.9 Verbrauchsmaterialien

<b>Artikel</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Chemiluminescence Film	Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare
Einweg-Auslaufpipetten	5 ml; 10 ml; 25 ml	Greiner
Gewebekultur-Petrischalen	Durchmesser/Wachstumsfläche (cm/cm <sup>2</sup> ): 14,5/145; 9,4/58; 6,0/21	Greiner
Kanülen	Microlance 3 20xG, 25xG, 27xG	B.Braun
Kryoröhrchen	1,5 ml	Nalgene
Multistix® 10SG	100 Teststreifen	Siemens

<b>Artikel</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
Nitrozellulose-Membran	Protran BA83 (0,2 µm)	Whatman
Objektträger	SuperFrost®	Menzel-Gläser
Pasteurpipetten	150 mm, Glas	Roth
Plastikpipettenspitzen	0,5 – 10 µl	Greiner
	10 – 100 µl	Starlab
	100 – 1000 µl	Starlab
PS-Mikroplatten für Bradford-Analysen	96-Loch-Platte	Greiner
PS-Mikroplatte	Lumitrac 200	Greiner
PVDF-Membran	Roti PCDF 0,45 µm	Roth
PCR-Gefäße (0,2ml)	96-Lochplatte mit Deckel	Biozym Scientific
	8-Loch-Streifen mit Deckel	PeqLab
	0,2 ml Einzelgefäße	PeqLab
Reaktionsgefäße	1,5 ml; 2 ml	Sarstedt
Rundbodenröhrchen	14 ml	Greiner
Spritzen	Omnifix-F 1 ml	B.Braun
	Omnifix 5 ml	B.Braun
Steril-Filter	0,02 µm; 0,45 µm	VWR
Whatman-Papier	3mm Chr	Whatman
Zellkulturflaschen mit Filtertop	Kulturfläche/Volumen (cm <sup>2</sup> /ml): 75/250; 25/50	Greiner
Zellkulturplatten	6-Loch; Kulturfläche pro Loch 9,6 cm <sup>2</sup>	Greiner
	12-Loch; Kulturfläche pro Loch 3,8 cm <sup>2</sup>	Greiner
	24-Loch; Kulturfläche pro Loch 1,75 cm <sup>2</sup>	Greiner
Zellschaber	24 cm	NeoLabs
Zentrifugenröhrchen	15 ml; 50 ml	Greiner

### 2.1.10 Plasmide

<b>Plasmid</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Hersteller</b>
pCRScript	Vektor mit Ampicillin-Resistenz und unter Kontrolle des T7 und T3 Promotors	Stratagene

## 2.1.11 Antikörper

### Primäre Antikörper für Western Blot-Analysen

<b>Primär-antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Firma</b>	<b>Größe (kDa)</b>	<b>Verd.</b>	<b>Lösung für das Blocken und Verdünnen</b>
Anti-TNF- $\alpha$	Hase	Cell Signaling	17	1:1000	5 % MP / 5 % MP
Anti-GAPDH	Maus	Santa Cruz	37	1:300	5 % MP / 5 % MP
Anti-KIM1	Hase	AB Online	49	1:1500	5 % BSA / 5 % BSA
Anti-p38MAPK	Hase	Cell Signaling	38	1:1000	5 % BSA / 5 % MP
Anti-pp38MAPK	Hase	Cell Signaling	42	1:1000	5 % BSA / 5 % MP

MP = Milchpulver; BSA = Bovines Serum Albumin; Verd. = Verdünnung

### Sekundäre Antikörper für Western Blot-Analysen

<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verdünnungslösung</b>
Anti-Mause; Peroxidase gekoppelt	Sigma	1:5000	5 % MP
Anti-Hase; Peroxidase gekoppelt	Sigma	1:3000	5 % MP

MP = Milchpulver; BSA = Bovines Serum Albumin

### Primäre Antikörper für Immunfärbungen (Verdünnungen erfolgten in 1 % BSA in PBS)

<b>Antikörper</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verdünnungspuffer</b>
CD 4 (L3T4)	eBioscience	1:400	10 % NS, 10 % BSA in PBS
CD 20	eBioscience	1:100	5 % NS, 10 % BSA in PBS
CD 68	Serotec	1:500	10 % NS, 10 % BSA in PBS
FoxP3	eBioscience	1:50	5 % NS, 10 % BSA in PBS
IL-6	eBioscience	1:400	5 % NS, 10 % BSA in PBS

NS = normales Kanninchen Serum; BSA = Bovines Serum Albumin

### Sekundäre Antikörper für Immunfärbungen

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
Biotinyliert anti-Ratte	Hase		1:500 (CD 68, FoxP3, F4/80)
		Vector	1:400 (CD 4)
		Laboratories	1:200 (IL6)
Biotinyliert anti-Ziege	Hase		1:200 (CD 20)

## Antikörper für Immunfluoreszenzfärbung

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Firma</b>
FITC-Anti Maus IgG	Ziege	MP Biomedicals
FITC-Anti Maus C3	Ziege	MP Biomedicals

## Antikörper für ELISA-Analysen (stammen alle von der Firma Southern Biotechnology)

<b>Antikörper</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung in PBS</b>
IgG-HRP	Ziege	1:2500
IgM-HRP	Ziege	1:2500
IgG1-HRP	Ziege	1:2500
IgG2a-HRP	Ziege	1:2500
IgG2b-HRP	Ziege	1:2500
IgG3-HRP	Ziege	1:2500

## Antikörper für Durchflusszytometrie (alle von der Firma eBioscience bezogen)

<b>Antikörper</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Verdünnungspuffer</b>
FITC-conjugated anti-CD4 (L3T4)	1:200	FCS-Puffer
FITC-conjugated anti-IFN- $\gamma$	1:50	FCS-Puffer
Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD4	1:200	FCS-Puffer
Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-TNF- $\alpha$	1:50	FCS-Puffer
Phycoerythrin (PE)-conjugated anti-IL-6 (GL1)	1:50	FCS-Puffer
Allophycocyanin-conjugated anti-TNF- $\alpha$	1:50	FCS-Puffer
PerCP-Cy5.5 conjugated anti-CD4	1:200	FCS-Puffer

## 2.1.12 Inhibitoren

<b>Inhibitor</b>	<b>Inhibitor der/von</b>	<b>Lösungs- mittel</b>	<b>Hersteller/ Quelle</b>
Dexamethason	proinflammatorische Transkriptionsfaktoren	EtOH	Calbiochem
5,6-Dichloro-benzimidazole 1- $\beta$ -D-ribofuranoside	RNA-Polymerase II	DMSO	Sigma-Aldrich
Oxacyclododecindion	proinflammatorische Genexpression	EtOH	PD Dr. Erkel (TU KL)
phosSTOP	Phosphatasen	Tablette	Roche
Complete Mini EDTA frei	Proteinasen	Tablette	Roche

### 2.1.13 Zytokine

Zytokine	Exprimiert in	Konzentration Stammlösung	Konzentration Inkubationsmedium	Hersteller
humanes rekombinates TNF- $\alpha$	<i>Escherichia coli</i>	10 <sup>5</sup> U/ $\mu$ l	10 ng/ml	Miltenyi Biotec
humanes rekombinates IL-1 $\beta$	<i>Escherichia coli</i>	2000 U/ $\mu$ l	600 U/ml	Miltenyi Biotec
humanes rekombinates IFN- $\gamma$	<i>Escherichia coli</i>	1000 U/ $\mu$ l	300 U/ml	Miltenyi Biotec
murines rekombinates IFN- $\gamma$	<i>Escherichia coli</i>	1000 U/ $\mu$ l	300 U/ml	Miltenyi Biotec

### 2.1.14 Enzyme

Enzym	Beschreibung	Hersteller
Calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP)	alkalische Phosphatase die ein religieren des Vektors verhindert indem das 5'-Ende der DNA dephosphoryliert wird	Roche
DNase I, RNase frei, 10 U/ $\mu$ l	Doppelstrangspezifische Endonuklease	Roche
Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I von <i>E. coli</i>	zum auffüllen einzelsträngiger DNA nach Verdau mit 5'-überhängend schneidenden Enzymen	NEB
Proteinase K	Serinprotease die als Exo- und Endopeptidase fungiert	Roche
Restriktionsendonukleasen des Typ II:	erkennen und schneiden DNA innerhalb oder unmittelbar an palindromischen Sequenzen und können je nach Enzym glatte oder klebrige Enden hinterlassen	NEB
T4 DNA-Ligase	Ligation von DNA-Fragmenten	NEB
T4-PNK	phosphoryliert 5'-Ende von synthetisch hergestellter DNA	
Taq-DNA-Polymerase für qRT-PCR	DNA-Amplifikation bei PCR-Analysen	AG Kleinert/ AG Pautz

### 2.1.15 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Produkt	Hersteller
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 1g/l Glukose ohne L-Glutamin	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's modified Eagle Medium) mit 1g/l Glukose ohne L-Glutamin mit Phenolrot	Sigma-Aldrich
RPMI 1640	Sigma-Aldrich
RPMI 1640 AQmedia™	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> , FCS), hitzeinaktiviert	PAA
L-Glutamin (100x konzentriert, 200mM)	Sigma-Aldrich
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Sigma
„Dulbecco's Phosphat buffered Saline“ (DPBS), 1x	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (100x konzentriert, 10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Puromycin	InVivoGen
Pyruvat (100x konzentriert; 100 mM)	Roth
Trypsin/EDTA-Lösung (10x konzentriert; 2 % Verdünnung mit DPBS)	Sigma-Aldrich

### 2.1.16 Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Resistenz/ Antibiotikum	Hersteller
DLD-1	humane Kolon-Adenokarzinomzellen	Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	ATCC (CCL-221)
MM6	humane Monocyten isoliert aus Patient mit Monoblastischer Leukämie	Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	DSMZ (ACC 124)
RAW-264.7	murine makrophagenähnliche Zellen aus Tumor; isoliert aus BAB/14 Maus mit Abelson-Maus-Leukämie Virus	Penicillin (100 U/ml), Streptomycin (100 µg/ml)	ATCC (TIB-71)



## 2.1.17 Oligonukleotide

Alle Sonden sind am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein (FAM) als Reporterfluorophor und am 3'-Ende mit Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) als Quencher markiert

Name	Sequenz
hu_GAPDH for	CCCATGTTTCGTCATGGGTGT
hu_GAPDH rev	TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA
hu_GAPDH Sonde	TGCACCACCAACTGCTTAGCACCC
hu_IL8 for	GCCGTGGCTCTCTTGGC
hu_IL8 rev	TAACACTCCTTGGCAAACACTGC
hu_IL8 Sonde	CTTCCTGATTTCTGCAGCTCTGTGTGAAGG
hu_TNF $\alpha$ for	CAAGCCTGTAGCCCATGTTG
hu_TNF $\alpha$ rev	GGTTGACCTTGGTCTGGTAGG
hu_TNF $\alpha$ Sonde	CAAGGCTGCCCTCCAC
mu_CXCL1 for	CTTGAAGGTGTTGCCCTCAG
mu_CXCL1 rev	GTCAGAAGCCAGCGTTCAC
mu_CXCL1 Sonde	AAGACAGACTGCTCTGA
mu_Dcp1a for	ACTCATGGCTGATGTGGTAGAAG
mu_Dcp1a rev	ATGACCAGACGGAGCAGACT
mu_GAPDH for	TTCACCACCATGGAGAAGGC
mu_GAPDH rev	GGCATGGACTGTGGTCATGA
mu_GAPDH Sonde	TGCATCCTGCACCACCAACTGCTTAG
mu_IFN $\gamma$ for	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA
mu_IFN $\gamma$ rev	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG
mu_IFN $\gamma$ Sonde	TCACCATCCTTTTGCCAGTTCCTCCAG
mu_IL6 for	GAGGATACCACTCCCAACAGACC
mu_IL6 rev	AAGTGCATCATCGTTGTTCATAACA
mu_IL6 Sonde	CAGAATTGCCATTGCACAACCTTTTTCTCA
mu_IL12p40 for	GGAAGCACGGCAGCAGAATA
mu_IL12p40 rev	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG
mu_IL12p40 Sonde	CATCATCAAACCAGACCCGCCCAA
mu_IL23p19 for	ATAATGTGCCCGTATCCAG
mu_IL23p19 rev	CTGGAGGAGTTGGCTGAGTC
mu_IL23p19 Sonde	AAGGGGAGCCTGCTCTACTCCCTGAT
mu_iNOS for	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT
mu_iNOS rev	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG
mu_iNOS Sonde	CGGGCAGCCTGTGAGACCTTTGA
mu_KIM1 for	ATGCCATCTTCTGCTTGTC
mu_KIM1 rev	GTGTGGGAATCTCTGGTTTAACTT

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
mu_KSRP for	CCTGGGATCCGCAAGGAC
mu_KSRP rev	TCAGGAGTGTTGTTATTCACGGTG
mu_KSRP Sonde	CTTCGCCGACGCCGTGCAG
mu_MOSPD1 for	TAGACAAATTCCGCCTCCAG
mu_MOSPD1 rev	CCACACCCAGGAAGACAGTT
mu_Nxf1 for	TCCGGAAACGAATTGAAGAC
mu_Nxf1 rev	CCTTGCAGGGTGGTAACATT
mu_Osgin1 for	ACAGACTTTGGAGGCAGCAT
mu_Osgin1 rev	TTTCTTCCGCATCCAGTCTT
mu_PTBP1 for	TGCTCAGGATCATTGTGGAA
mu_PTBP1 rev	GAGCTTGGAGAAGTCGATGC
mu_RORyt for	CACGGCCCTGGTTCTCAT
mu_RORyt rev	CAGATGTTCCACTCTCCTTCTCT
mu_RORyt Sonde	ATGCCAACCGTCCTGGGCTCC
mu_S100A8 for	CTCCGTCTTCAAGACATCGTTTG
mu_S100A8 rev	TCATTCTTGTAGAGGGCATGGTG
mu_S100A8 Sonde	CAATGCCGTCTGAACTGGAGAAGGCC
mu_SPP1 for	GCTTGGCTTATGGACTGAGG
mu_SPP1 rev	CCTCATCTGTGGCATCAGG
mu_SPP1 Sonde	TCAAAGTCTAGGAGTTTCCAGGTTTCTGATGA
mu_TNF $\alpha$ for	CATCCTTCTCAAATTCGAGTGACAA
mu_TNF $\alpha$ rev	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
mu_TNF $\alpha$ Sonde	CACGTCGTAGCAAACCACCAAGTGGA
mmu_miRNA_let7f_5p	UGAGGUAGUAGAUUGUAUAGUU
mmu_miRNA_9_5p	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA
mmu_miRNA_16_5p	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
mmu_miRNA_19_3p	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA
mmu_miRNA_29c_3p	UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
mmu_miRNA_30e_5p	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAG
mmu_miRNA_140_5p	CAGUGGUUUUACCCUAUGGUAG
mmu_miRNA_301b_3p	CAGUGCAAUGGUUAUUGUCAAGC
mmu_miRNA_325_5p	CCUAGUAGGUGCUCAGUAAGUGU
mmu_miRNA_340_5p	UUAUAAAGCAAUGAGACUGAUU
mmu_miRNA_369_3p	AAUUGCACGGUAUCCAUCUGUA
mmu_miRNA_669k_3p	UAUGCAUAUACACGCAUGCAA

mu = murin, hu = human

Für die MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Typisierung

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
F1-fas (sense)	5'GTA AAT AAT TGT GCT TCG TCA G'3
R1-Fas/Etn (antisense)	5'TAG AAA GGT GCA CGG GTG TG '3
R2-Fas (antisense)	5'CAA ATC TAG GCA TTA ACA GTG'3

Für die HLA-DR4.AE° Typisierung

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>
DR4KIM-5'	5'TTT CTT GGA GCA GGT TAA ACA T'3
DR4KIM-3'	5'AGG TGT CCA CCG CGG CCC GCT T'3

### 2.1.18 Versuchstiere

<b>Mausstamm</b>	<b>Bezug</b>	<b>verwendete Organe</b>
HLA-DR4.AE°	Universität Aarhus	Pfoten, Milz
MRL/MPJ- <i>Fas<sup>lpr</sup></i>	The Jackson Laboratory 000485	Milz, Niere, Leber
Balb/c	Zentrale Versuchstiereinrichtung	Milz, Niere, Leber

## 2.2 Zellbiologische Methoden

Die Durchführung der zellbiologischen Standardtechniken, die in diesem Kapitel dargestellt werden, erfolgten weitestgehend, wenn nicht anders angegeben, nach Mather and Roberts (1998).

### 2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die für die Experimente benötigten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit Filter-Top bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Wasserdampfathmosphäre in Brutschränken kultiviert. Die Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien für die einzelnen Zelllinien (MM6, RAW 264.7, DLD1) können der Tabelle 2.1 entnommen werden. Waren die Zellen in der Kulturflasche zu 80 % konfluent, wurden sie passagiert, um eine Kontaktinhibition zu vermeiden. Um den Stress für die Zellen so gering wie möglich zu halten, wurden die jeweiligen Kulturmedien und Lösungen vor Gebrauch auf Raumtemperatur erwärmt.

Zum Ablösen adhärenter Zellen (DLD1 und RAW 264.7) vom Boden der Zellkulturflasche wurden diese zuerst mit 5 ml PBS gewaschen und dann mit einem Gemisch aus EDTA und Trypsin (2x) für drei Minuten (min) im Brutschrank inkubiert. Der enzymatische Verdau der extrazellulären Proteine wurde mit 4 ml Medium abgestoppt. Dieser Ablöseprozess ist bei Suspensionszellen (MM6) nicht notwendig.

Zum Erhalt der Stammkultur wurde ein Teil der Zellsuspension in der Kulturflasche belassen und mit frischem Medium auf 10 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Die restliche Zellsuspension wurde für anstehende Experimente ausgesät, eingefroren oder verworfen.

*Tabelle 2.1: Zusammensetzung der Kulturmedien*

Zelllinie	Zusammensetzung Medium
DLD1	RPMI 1640, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin; 1 % Pyruvat
MM6	RPMI 1640AQmedia™, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
RAW 264.7	DMEM, 10 % FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin
Primärzellen	DMEM, 3 % FCS

### 2.2.2 Kryokonservierung und Rekultivierung eukaryotischer Zellen

Für eine dauerhafte Erhaltung der Zelllinien wurde die jeweilige Zellsuspension bei 1200 Umdrehungen pro Minute (Upm) (Megafuge 1.0R; Heareus) für fünf Minuten bei 4°C

zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann im Einfriermedium (FCS + 10 % DMSO) resuspendiert und in ein 1,5 ml Kryo-Röhrchen aliquotiert. Diese Kryo-Röhrchen wurden im Anschluss langsam und kontrolliert ( $-1^{\circ}\text{C}$  pro Minute) auf  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer mit Isopropanol gefüllten Box abgekühlt und nach 24 Stunden für eine dauerhafte Lagerung bei  $-196^{\circ}\text{C}$  in flüssigen Stickstoff überführt. Zur Rekultivierung der Zellen wurden diese bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, in 5 ml Kulturmedium überführt und bei 1200 Upm (Megafuge 1.0R; Heareus) für fünf Minuten zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 5 ml Medium resuspendiert und in eine 50 ml Filter-Top Kulturflasche überführt. Nach einer 24 stündigen Kultivierung der Zellen erfolgte ein Mediumwechsel. Waren die Zellen 80 % konfluent, wurde die Kultur in eine große Zellkulturflasche überführt.

### 2.2.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für Zellkulturexperimente ist es wichtig die Lebendzellzahl der Zellsuspension zu ermitteln, da je nach Durchführung eine bestimmte Dichte der Zellen auf einer Untersuchungsschale nötig ist. Dabei spielen Faktoren wie Größe der Schale bzw. Lochplatte und Teilungszeit der Zelllinie eine Rolle. Für die Ermittlung der Lebendzellzahl wurde von der Zellsuspension ein Aliquot mit einer 0,4 %igen Trypanblau-Lösung 1:2 verdünnt, um lebende, farblose Zellen von blaugefärbten, toten Zellen zu unterscheiden. Mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer-Zählkammer) wurden die Zellen gezählt. Dabei wurden die lebenden Zellen aller vier Großquadrate (bestehend aus jeweils 16 Einzelquadraten) gezählt und der Mittelwert pro Großquadrat gebildet. Dieser Mittelwert wurde mit der Kammerkonstanten ( $10^4$ ) und dem Verdünnungsfaktor multipliziert, um die Anzahl der lebenden Zellen pro ml der Zellsuspension zu erhalten.

### 2.2.4 Stimulation und Behandlung eukaryotischer Zellen

Um in Zellen die Expression von proinflammatorischen Genen zu induzieren, wurden diese mit Zytokinen (Kapitel 2.1.12) und Substanzen behandelt. Für die jeweilige Zelllinie erfolgte die Stimulation gemäß der Tabelle 2.2.

*Tabelle 2.2: Zusammensetzung des Stimulations-Mixes für verwendete Zelllinien*

Zelllinie	Stimulation
DLD1	hu TNF $\alpha$ (10 ng/ml), hu IL-1 $\beta$ (600 U/ml), hu IFN- $\gamma$ (300 U/ml)
MM6	hu IFN- $\gamma$ (300 U/ml), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ )
RAW 264.7	mu IFN- $\gamma$ (100 U/ml), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ )
murine Primärzellen	mu IFN- $\gamma$ (100 U/ml), LPS (1 $\mu\text{g/ml}$ )

Auf den adhärenen Zellen (DLD1 und RAW 264.7) wurde 16 Stunden vor der Stimulation das Kulturmedium entfernt und durch FCS-freies Medium (Tabelle 2.3) ersetzt, damit sich alle Zellen zum Stimulationszeitpunkt in der G<sub>0</sub>- Phase des Zellzyklus befanden. Die Suspensionszellen wurden in einem Medium mit geringerem FCS Anteil ausgesät. Die Behandlungsdauer erfolgte wie in den Experimenten angegeben.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung des FCS-freien Mediums

Zelllinie	Zusammenstellung Medium
DLD1, RAW 264.7	DMEM; 1 % Pyruvat
MM6	RPMI 1640 AQmedia™; 1 % Pyruvat; 1 % Penicillin/ Streptomycin; 0,5 % FCS

Bei der Behandlung mit dem Naturstoff Oxacyclododecindion wurden die Zellen in den angegebenen Konzentrationen für 30 min mit der Substanz beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH vorbehandelt.

### 2.2.5 Behandlung der Zellen mit 5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside

Für mRNA-Stabilitätsanalysen wurden 5,6-Dichlorobenzimidazole 1-β-D-ribofuranoside (DRB) Experimente durchgeführt. Diese geben einen Rückschluss auf die Halbwertszeit von mRNA, einer der wichtigsten Regulationsprozesse für die Genregulation. Um den Abbau der bereits hergestellten mRNAs zu analysieren, wurde die Transkription in Zellen mittels DRB inhibiert. DRB ist ein Adenosin Homolog und unterbricht den Elongationsschritt in der Polymerase-II-vermittelten Transkription (Sehgal *et al.*, 1976). Die vorzeitige Beendigung der Transkription erfolgt wahrscheinlich durch die Fähigkeit von DRB mehrere Proteinkinasen, die die C-terminale Domäne an der großen Untereinheit von Polymerase II phosphorylieren, zu hemmen (Dubois *et al.*, 1994). Somit wird die Neusynthese von mRNA gestoppt. Der Abbau der vorhandenen mRNA kann dann durch unterschiedliche Messzeitpunkte verfolgt und daraus die Halbwertszeit ermittelt werden.

Die Zellen wurden wie in den Experimenten und im Kapitel 2.2.4 angegeben, behandelt und stimuliert. Anschließend erfolgte die DRB-Behandlung (25 µg/ml im Medium) für verschiedene Zeitpunkte. Für die mRNA Expressionsanalyse wurden die Zellen mit GIT-Puffer lysiert (Kapitel 2.3.1), cDNA hergestellt (Kapitel 2.3.7) und qRT-PCR-Analysen (Kapitel 2.3.9) mit einem Referenzgen, was bekanntermaßen eine hohe Stabilität aufweist, durchgeführt.

## 2.3 Molekularbiologische Methoden

Die Durchführung der molekularen Standardtechniken, die in diesem Kapitel dargestellt werden, erfolgten weitestgehend, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook (1989).

### 2.3.1 Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen und Gewebe wurde nach dem Prinzip der single-step Methode von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 1987) durchgeführt. Bei Zellen als Ausgangsmaterial wurde zuerst das Kulturmedium abgesaugt und dann die Zellen mit Guanidiniumisothiocyanat-Puffer (GIT-Puffer) (Kapitel 2.1.3) lysiert. Für die Isolation von RNA aus Gewebe wurde ein Teil vom tiefgefrorenen Gewebes abgeschlagen und in ein 2 ml Reaktionsgefäß mit 800 µl GIT-Puffer (pH 6,7) überführt. Für die Homogenisierung mit dem TissueLyser (Qiagen) wurden hierfür in das Reaktionsgefäß Stahlkugeln vorgelegt. Im tiefgekühlten (-20°C) Einsatz wurden die Proben vier Minuten bei 50 Hertz (Hz) zerkleinert und anschließend bei 850 x g, bei 4°C eine Minute zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Extrakte in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur verbesserten Lyse wurde das Zell- und Gewebematerial mindestens eine Stunde bei -20°C gelagert.

Das chaotrope Salz GIT bewirkt die Inaktivierung und Denaturierung von Proteinen, durch das teilweise Aufbrechen von geordneten Wasserstoffbrückenbindungen. Die Zugabe von 2 M Natriumacetat pH 4,0 (0,1 Volumen) senkt den pH-Wertes des Lysates, um die Löslichkeit der DNA zu verringern. Ein anschließendes Mischen mit einem Volumen saurem, wassergesättigtem Phenol (pH 4) auf dem Kreisschüttler führt zur weiteren Denaturierung von Proteinen und zwingt die DNA sich in der späteren organischen Phase anzureichern. Nachfolgend wurde 0,5 Volumen einer 24:1 Chloroform-Isoamylalkohol-Mischung hinzugegeben. Chloroform stabilisiert die Phasengrenzen von wässriger sowie organischer Phase und Isoamylalkohol vermindert ein Schäumen der oberen Schicht während des weiteren Mischens. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis erfolgte der Zentrifugationsschritt (20 min, 16200 x g, 4°C) durch den die Phasentrennung beschleunigt wird. In der untersten gelben organischen Phase (Phenol-Phase) befindet sich die DNA, in der Interphase die Proteine und in der oberen wässrigen Phase die RNA. Diese wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die enthaltende RNA mit einem Volumen eiskaltem Isopropanol für eine Stunde bei -20°C präzipitiert. Anschließend wurde zum Pelletieren der RNA die Fällung für 20 min bei 16200 x g und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und die RNA mit 80%igem Ethanol, zum Entfernen von mitgefällten Salzen, gewaschen. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (5 min, 16200 x g, 4°C) wurde das Pellet kopfüber getrocknet und dann in 50 µl DEPC-Wasser aufgenommen und gelöst.

### 2.3.2 Isolation von DNA aus Gewebe

DNA aus Schwanzspitzen von Mäusen wurde mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert (Chomczynski and Sacchi, 1987). Hierfür wurden 5 mm vom Schwanz der Maus abgeschnitten und in 250 µl STE-Puffer (Kapitel 2.1.4) gegeben. Anschließend wurde zum Verdau 12,5 µl Proteinase K hinzu gemischt und 16 Stunden bei 55°C im Wasserbad lysiert. Die Reaktionsgefäße mit den lysierten Schwanzspitzen wurden dann bei 16200 x g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,1 Vol einer 3 M Natriumacetat (pH = 4,8) sowie mit einem Vol einer 1:1 Phenol-Chloroform-Mischung versetzt. Im Anschluss wurde erneut gemischt und bei 16200 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. In einem neuen Reaktionsgefäß wurde der Überstand vorsichtig mit einem ml kalten EtOH (100 %) gemischt und wiederum bei 16200 x g für 20 min bei 4°C zentrifugiert. Mit dieser alkoholischen Fällung können verbleibende Phenolreste aus der Lösung entfernt werden. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt indem der Überstand einfach verworfen und zu dem Pellet 1 ml EtOH (70 %) gegeben wurde. Das Pellet wurde 15 min getrocknet, in 50 µl Millipore Wasser aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei + 4°C gelagert.

Eine weitere Methode ist die Isolation der DNA per *HotSHOT* (Truett *et al.*, 2000) aus Ohrstanzen. Hierfür wurde die Maus im Klammergriff fixiert und mit einer Ohrlochzange ein Loch in das Ohr geknipst. Das Gewebestück wurde dann in ein Reaktionsgefäß überführt und mit 75 µl des 1x Basepuffers (Kapitel 2.1.4) für die Lyse 30 min bei 95°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben über die Dauer einer Stunde auf 10°C runter gekühlt und mit 75 µl vom 1x Neutralisationspuffer (Kapitel 2.1.4) gemischt. Diese Lösung wurde direkt in die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) eingesetzt.

### 2.3.3 Isolation von microRNA aus Gewebe

Die Isolation von microRNA aus Gewebe erfolgte mit dem *AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit* nach Herstellerangaben von Qiagen (Kapitel 2.1.8).

### 2.3.4 RNA Quantifizierung und Detektion von Verunreinigungen

Für die Bestimmung der Konzentration einer RNA-Lösung kam ein Spektrophotometer vom Typ NanoDrop® ND-1000 zum Einsatz. Hierfür wurde die zu analysierende Probe (1 µl) auf das Ende eines optischen Kabels („*receiving fiber*“) pipettiert. Um die Probe zu analysieren wird Licht durch eine weitere optische Faser („*source fiber*“) geleitet, die ebenfalls in Kontakt mit der Probe gebracht wurde. Die Probe die einen definierten Zwischenraum der beiden faseroptischen Kabel schließt wird nacheinander mit definierten



Wellenlängen durchleuchtet. Nachdem das Licht die Probe passiert hat, wird es von einem CCD-Chip (photoelektrischer Sensor) aufgefangen und in einen messbaren, elektrischen Strom umgewandelt. Die gemessene Stromstärke verhält sich dabei analog zum Absorptionsgrad der Probe. Das mitgelieferte Programm stellt im Anschluss den ermittelten Absorptionsgrad gegenüber der Wellenlänge des Lichtes dar. Bei einer Wellenlänge von 260 nm wird über den Absorptionsgrad die RNA-Konzentration errechnet. Dabei entspricht der Extinktionskoeffizient von RNA 40 ng-cm/ $\mu$ l.

Des Weiteren kann aus der graphischen Darstellung des Absorptionsgrades über die Wellenlänge ein Rückschluss auf Rückstände, wie Phenol oder Proteinen, in der RNA-Probe gewonnen werden. So gibt ein Quotient der Absorptionsgrade der Wellenlängen 260 nm und 280 nm, der deutlich unter 2,0 liegt, den Hinweis, dass der gemessene Wert durch Kontaminationen, die einen ähnlichen Absorptionsbereich besitzen, verfälscht sein könnten.

### 2.3.5 Qualitative RNA-Analyse

Eine Qualitätsanalyse von RNA ist vor allem bei gesamtgenomischen Mikroarray-Experimenten unabdingbar. Daher wurde die isolierte RNA mit Hilfe des „*Experion Automated Electrophoresis*“ Chip-Systems nach Herstellerangaben von Bio-Rad auf ihre Integrität überprüft. Der verwendete „*mikrofluidic*“- Chip besitzt einen, mit mehreren Vertiefungen versehenen, Kunststoffaufsatz, welcher mit einer Glasplatte verbunden ist. Für jede Vertiefung im Kunststoff ist auf der Glasplatte ein Mikrokanal eingätzt, um die Proben bei einer angelegten Spannung, mit Hilfe einer vorher eingeleiteten und angefärbten Gellösung aufzutrennen, anzufärben, zu detektieren und zu analysieren.

Hierzu wurden alle Reagenzien aus dem *Experion RNA StdSens Analysis Kit*, die bei 4°C lagern, im Dunklen auf Raumtemperatur erwärmt und der RNA-Marker auf Eis aufgetaut. Vor der Analyse wurden die Elektroden der Elektrophorese Station mit einem Reinigungs-Chip, der mit 800  $\mu$ l eines speziellen Reinigers luftblasenfrei befüllt wurde, gesäubert. Anschließend wurden die Elektroden mit einem Wasch-Chip, welcher mit 800  $\mu$ l RNase-freiem Wasser gefüllt wurde, fünf Minuten gewaschen. Danach wurde das Wasser gewechselt, für weitere zwei Minuten gewaschen, um die Elektroden für eine Minute zu trocknen.

Bevor die Gellösung im Kapillarsystem des Chips verteilt wurde, musste diese bei 2800 x g für 10 min über den Spin-Filter filtriert werden. 65  $\mu$ l der frisch filtrierten Gellösung wurden dann mit 1  $\mu$ l der Färbelösung versetzt. Von diesem angefärbten Gel wurden 9  $\mu$ l in die dafür vorgesehene Kunststoffvertiefung des Chips eingebracht und mittels der „*Priming*“-Station in den Mikrokanälen verteilt. Für die Analyse der Proben

wurde in die entsprechenden Vertiefungen 5 µl Lade-Puffer pipettiert. Anschließend wurde 1 µl RNA-Probe bzw. 1 µl RNA-Marker, die zuvor für fünf Minuten bei 70°C denaturiert wurden, in die entsprechenden Vertiefungen eingebracht. Für die Leerwert-Analyse wurden zusätzlich je 9 µl gefärbte bzw. ungefärbte Gellösung in die Kontrollvertiefungen gegeben. Zum Mischen wurde der Chip für eine Minute in die Schüttel-Station eingespannt und dann in die Elektrophorese-Station eingesetzt. Per Experion Software wurde der Analyse-Lauf gestartet und ausgewertet.

Die Experion Software ermöglicht es mit Hilfe des RNA-Qualitätsindikators (RQI) den Grad der Degradation einer RNA-Probe zu schätzen. Dazu wird das Elektropherogramm der Probe mit einer Reihe von standardisiert abgebauten RNA-Proben verglichen und in eine Kategorie zwischen 1 (abgebaute RNA) und 10 (intakte RNA) zugeordnet.

Nach der Analyse wurde der Chip verworfen, die Elektroden erneut gereinigt und getrocknet.

### **2.3.6 Agarose-Gelelektrophorese**

Bei der Agarose-Gelelektrophorese kann man DNA-Fragmente der Größe nach auftrennen, um z.B. den Amplifikationserfolg einer PCR-Reaktion oder einen Restriktionsverdau zu überprüfen. Die Effizienz der Auftrennung ist dabei abhängig vom Anteil an eingesetzter Agarose. Agarose ist ein Polymer, welches sich zu einem Gel vernetzt. Je höher der Agaroseanteil im Gel, desto kleiner sind die Poren des Gels. Wird ein elektrisches Feld in einem Ionen-gepufferten System aufgebaut, wandern die Fragmente aufgrund ihrer negativen Ladung durch das Agarose-Gel zur Anode. Dabei können durch die Netzstruktur kleinere Moleküle schneller als größere Moleküle wandern, was zu einer Größenauftrennung der Produkte im Agarose-Gel führt. Die aufgetrennten Banden werden durch den Farbstoff Roti-Safe, der in die DNA interkaliert und im 1x TAE-Puffer (Kapitel 2.1.4) enthalten ist, auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht.

Für die Gelherstellung wurde die Agarose in 0,8 x TAE-Puffer (+ 30 µl Roti-Safe) in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde das Gel in eine horizontale Gelkammer gegossen und mit Taschenkämmen versehen bis es erstarrt war. Danach wurde das Gel mit 0,8 x TAE-Puffer in einer Elektrophoresekammer überschichtet und die Taschenkämme entfernt. Die Proben wurden vor dem Auftragen mit einem Probenpuffer (Kapitel 2.1.4) versetzt. Dieser erhöht die Dichte der Probe und verhindert, dass sie in den Laufpuffer diffundiert. Um die Produktlängen später abschätzen zu können, wurde zusätzlich ein Marker aufgetragen (Kapitel 2.1.6). Die Auftrennung an sich erfolgte bei einer konstanten Spannung von 80 V. Anschließend wurde das Agarose-Gel mit Hilfe eines UV-

Transilluminators und der Computersoftware Intas Gel Capture (Gel Jet Imager & Analyse, Intas) visualisiert und fotografiert.

### 2.3.7 Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Für die quantitative Analyse der Genexpression im Gewebe oder von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt mittels qRT-PCR, wurde die isolierte RNA mit Hilfe einer reversen Transkriptase und unter Verwendung von zufällig bindenden Oligonukleotiden (*Random Primer*) in einzelsträngige DNA (cDNA) umgeschrieben. Hierzu wurde das *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* von Applied Biosystems in folgender Zusammensetzung verwendet (Tabelle 2.4):

Tabelle 2.4: Zusammensetzung des Mixes für die reverse Transkription von RNA in cDNA

Volumen pro Probe	Komponenten
2 µl	10x RT Puffer
0,8 µl	25x dNTP Mix (100 mM)
2,0 µl	10x RT Random Primers
1,0 µl	MultiScribe® Reverse Transcriptase (50 U/µl)
4,2 µl	Nuklease-freies Wasser

Nach dem Mischen auf dem Kreisschüttler wurden der Reaktionsansatz und die RNA-Proben in die Reaktionsgefäße eingebracht und im MyCycler (Bio-Rad) wie folgt (Tabelle 2.5) inkubiert:

Tabelle 2.5: Ablauf der reverse Transkription von RNA in cDNA im Bio-Rad MyCycler

Dauer	Temperatur	Schritt
10 min	25°C	Oligonukleotide binden an RNA
120 min	37°C	Reverse Transkription
5 sec	85°C	Denaturierung der reversen Transkriptase
∞	4°C	Kühlung der Proben

### 2.3.8 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Um ein spezifisches Gen beziehungsweise Genabschnitt *in-vitro* exponentiell zu vervielfältigen, nutzt man die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Hierzu wird das zu amplifizierende DNA-Fragment auf den beiden einzelnen DNA-Strängen von komplementären Oligonukleotiden, die den jeweiligen Startpunkt der DNA-Synthese angeben, flankiert. Unter Beteiligung einer thermostabilen Polymerase und freier dNTPs, wird dann ausgehend von den Oligonukleotiden jeder einzelne DNA-Strang in

5' → 3' Richtung als Matrix für die Synthese eines komplementären DNA-Stranges genutzt.

Jeder neue Denaturierungszyklus beginnt mit dem Erhitzen der DNA zum Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den beiden DNA-Strängen, um diese zu trennen. Im nächsten Schritt wird je nach Sequenz und Länge der Oligonukleotide die Temperatur gesenkt, damit die Primer an die DNA hybridisieren (*Annealing*) können. Von den angelagerten Oligonukleotiden aus erfolgt der letzte Schritt - die Neusynthese des Fragmentes mit Hilfe der Polymerase (*Elongation*). Die Temperatur hängt dabei vom Optimum des verwendeten Enzyms ab und die Dauer des Zyklus von der Länge des zu amplifizierenden Fragmentes. Je nach Einsatz der Reagenzien kann der Zyklus beliebig oft wiederholt werden. In Tabelle 2.6 sind Parameter und der Ablauf einer PCR dargestellt.

Tabelle 2.6: Parameter und Ablauf eines PCR-Programms

Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl	Schritt
4 min	95°C	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
30 sec	94°C		Denaturierung
30 sec	$T_m - 5^\circ\text{C}$	40 Zyklen	Annealing
1 min/ kb sec min	72°C		Elongation
4 min	72°C	1 Zyklus	abschließende Elongation
$\infty$	10°C		Kühlung

$T_m$  = Schmelztemperatur der eingesetzten Primer

### 2.3.9 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR) beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR, ermöglicht jedoch gleichzeitig den Nachweis der Produktanreicherung in Echtzeit mit anschließender Quantifizierung der amplifizierten Produkte (Higuchi *et al.*, 1992). Somit ist es möglich, eine Aussage hinsichtlich der Expression eines zu untersuchenden Gens unter verschiedenen Bedingungen zu treffen. Diese Detektion der PCR-Produkte in Echtzeit wird durch das Einbringen eines Fluoreszenzfarbstoffes in das Reaktionsgemisch ermöglicht, welcher proportional mit dem Anstieg an DNA-Menge zunehmend fluoresziert.

In dieser Arbeit wurden zum einen Fluoreszenzfarbstoffe genutzt, die sequenzunspezifisch an die DNA binden (SYBR<sup>®</sup> Green) können, sowie das fluoreszenzmarkierte, sequenzspezifische TaqMan<sup>®</sup> System. Bei letzterem gibt es neben den sequenzspezifischen sense- und antisense-Oligonukleotiden auch eine sequenzspezifische Sonde, die am 5'-Ende ein Fluorophor (z.B. FAM) und am 3'-Ende ein Quencher-Molekül (z.B. TAMRA) besitzt. Dabei entspricht das Emissionsspektrum des Fluorophors dem

Absorbtionsspektrum des Quenchers. So wird die Emission des Fluorophors durch den Quencher absorbiert, wenn die Sonde intakt an die Sequenz gebunden ist. Spaltet die Taq-Polymerase in der Elongationsphase mit ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Sonde, wird der Reporterfarbstoff frei und durch Entfernen vom Quencher können die emittierten Fluoreszenzsignale detektiert werden. Diese Daten werden von der Software verarbeitet und in Amplifikationskurven umgewandelt. Dabei entsprechen hier die Freisetzung des Fluorophors und die damit emittierte Fluoreszenz proportional dem gebildeten PCR-Produkt.

Folgend ist der Ansatz und die Bedingungen im iCycler von Bio-Rad für eine auf dem TaqMan<sup>®</sup> System basierte qRT-PCR aufgeführt (Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8)

Tabelle 2.7: qRT-PCR Ansatz für Taq-Man<sup>®</sup> System

Volumen pro Probe	Komponenten
12,5 µl	2x Puffer
1,0 µl	dNTPs (25 mM)
2,0 µl	Primer for (10 pmol/µl)
2,0 µl	Primer rev (10 pmol/µl)
1,0 µl	Sonde (10 pmol/µl)
0,5 µl	Taq
4,0 µl	Wasser

Tabelle 2.8: Ablauf der qRT-PCR für das TaqMan<sup>®</sup> System im iCycler von Bio-Rad

Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl	Schritt
15 min	95°C	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
15 sec	94°C		Denaturierung
30 sec	60°C	40 Zyklen	Annealing
30 sec	60°C		Elongation & Fluoreszenzmessung
∞	10°C		Kühlung

Um das Problem der Effizienz der cDNA-Synthese und der Integrität der cDNA zu lösen, wurde eine relative Quantifizierung durchgeführt. Hierbei wurde die Expression des zu untersuchenden Gens auf die Expression eines Referenzgens (z.B. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) oder POL2A (große Untereinheit der RNA-Polymerase II)) bezogen, welches in den zu untersuchenden Ansätzen konstitutiv exprimiert wird.

Da das SYBR<sup>®</sup> Green fluoreszenzbasierte System eine geringe Spezifität besitzt, wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der PCR durchgeführt. Mit einem

kontinuierlichen Anstieg der Temperatur denaturiert der Doppelstrang zu zwei einzelsträngigen Molekülen, wobei der Fluoreszenzfarbstoff frei wird und die Fluoreszenz abnimmt. Je unterschiedlicher die Produkte in ihrer Länge sind, desto mehr unterscheiden sich ihre Schmelztemperaturen. Somit kann z.B. zwischen unspezifisch gebildeten Primerdimeren oder zusätzlich amplifizierten Produkten unterschieden werden.

Für die qRT-PCR mit dem SYBR<sup>®</sup> Green Analysesystem (PeqLab) wurde der Ansatz aus Tabelle 2.9 pipettiert. Das qRT-PCR Programm im iCycler von Bio-Rad ist in Tabelle 2.10 aufgeführt.

Tabelle 2.9: qRT-PCR Ansatz für das SYBR<sup>®</sup> Green System im iCycler von Bio-Rad

Volumen pro Probe	Komponenten
12,5 µl	2x KAPA <sup>™</sup> SYBR <sup>®</sup> FAST qPCR Master-Mix
0,4 µl	Primer for (10 pmol/µl)
0,4 µl	Primer rev (10 pmol/µl)
9,7 µl	Wasser

Tabelle 2.10: Ablauf der qRT-PCR für das SYBR<sup>®</sup> Green System im iCycler von Bio-Rad

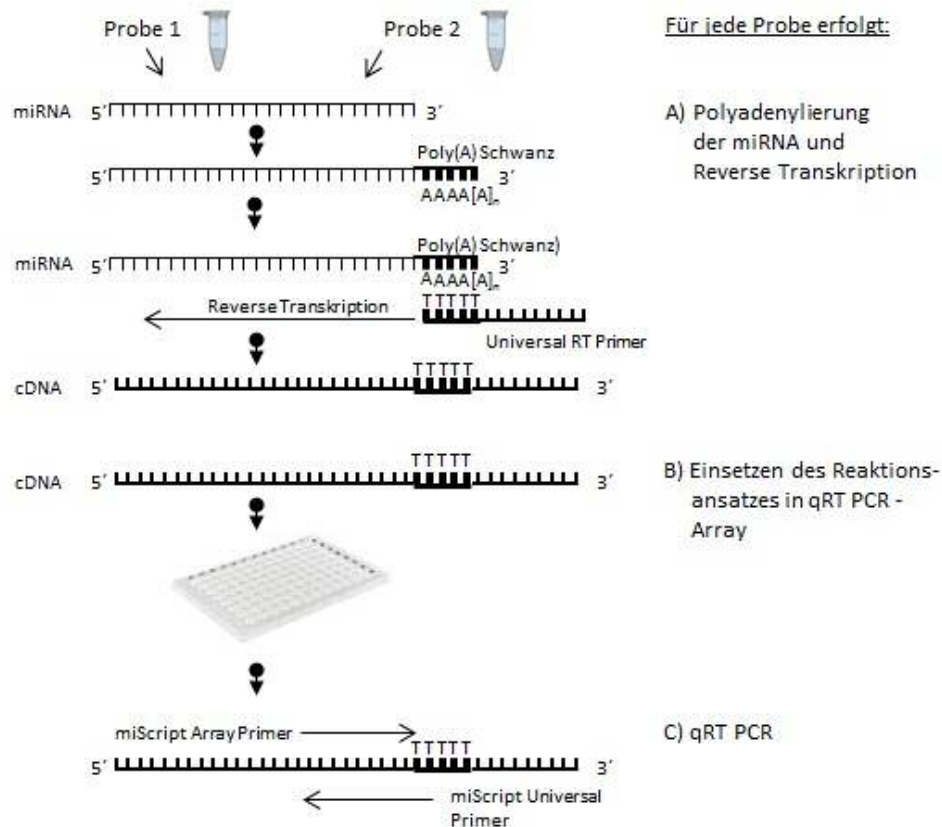
Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl	Schritt
2 min	95°C	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
15 sec	95°C		Denaturierung
30 sec	60°C	45 Zyklen	Annealing
30 sec	60°C		Elongation & Fluoreszenzmessung
30 sec	95°C	1 Zyklus	Abschließende Elongation
10 sec	Start 60°C	71 Zyklen	Schmelzkurve
∞	8°C		Kühlung

Auch beim SYBR<sup>®</sup> Green System erfolgte die Auswertung der relativen Expression durch die Quantifizierung eines Referenzgens. Wie auch beim TaqMan<sup>®</sup> System wurde mit Hilfe der  $2^{(-\Delta\Delta C(T))}$ -Methode nach Livak (Livak and Schmittgen, 2001) die relative Expression ausgewertet. Dazu wurde der Schwellenwert ( $C_T$ -Wert) jeder Probe auf den zugehörigen  $C_T$ -Wert des Referenzgens normiert.

### 2.3.10 microRNA PCR-Array

Das *Inflammatory Response & Autoimmunity miScript SYBR Green PCR Kit* (MIMM-105Z) der Firma Qiagen wurde verwendet, um das Expressionsprofil von 84 murenen microRNAs vorherzusagen. Bei diesen microRNAs handelt es sich um bekannte Regulatoren von entzündungsfördernden oder -hemmenden Genen. Die microRNA-Quantifizierung und Profilerstellung mit dem miScript PCR-System ist spezifisch und in

der Detektion sehr empfindlich. Dabei umfasst das Kit alle Komponenten, um die RNA in cDNA umzuwandeln und anschließend eine auf dem SYBR<sup>®</sup> Green System basierende qRT-PCR für die Echtzeitdetektion von microRNAs durchzuführen (Abbildung 2.1). Zusätzlich zu den zu untersuchenden microRNA-Primern, sind Kontrollen in der 96-Lochplatte vorgelegt. Dies ermöglicht zum einen die Datenanalyse mit der  $\Delta\Delta C_T$  Methode für eine relative Quantifikation, als auch eine Einschätzung wie effizient die reverse Transkription und die PCR-Durchführung waren.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der Durchführung des microRNA PCR-Arrays nach Angaben des Herstellers

Die microRNA der zu untersuchenden Proben wurden mit dem *AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit* (Qiagen) isoliert (Kapitel 2.3.3). Anschließend wurden die Konzentration der Proben mit Hilfe des NanoDrop<sup>®</sup> ND-1000 gemessen (Kapitel 2.3.4) und je drei Proben-Lysate pro Gruppe in gleichen Konzentrationen vereinigt.

Zuerst wurde die Polyadenylierung sowie die reverse Transkription durchgeführt. Dafür wurden der 5x miScript HiSpec Puffer und der 10x miScript Nucleics Mix aufgetaut und gemäß Tabelle 2.11 der Reaktionsansatz mit der RNA vorbereitet.

Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 60 min mit einer anschließenden Erhitzung auf 95°C für 5 min zum Inaktivieren der reversen Transkriptase. Die Proben wurden auf 4°C bis zur weiteren Verwendung gekühlt oder bei -20°C eingefroren.

Tabelle 2.11: Ansatz für reverse Transkription für microRNA PCR-Array

Volumen pro Probe	Komponenten
4 µl	5x miScript HiSpec Puffer
2 µl	10x miScript Nucleics Mix
2 µl	miScript RT Mix
variabel	RNase-freies Wasser
variabel (bis zu 12 µl)	Total RNA (125- 250 ng)

Im Anschluss an die reverse Transkription erfolgte die qRT-PCR. Dazu wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht und die jeweilige cDNA mit 200 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Der Reaktionsansatz wurde gemäß Tabelle 2.12 hergestellt.

Tabelle 2.12: qRT-PCR Reaktionsansatz für microRNA PCR-Array

Volumen pro Probe	Komponenten
1375 µl	2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix
275 µl	1x miScript Universal Primer
1000 µl	RNase-freies Wasser
100 µl	cDNA Ansatz

Von dem Reaktionsansatz wurden pro Loch je 25 µl in die 96-Lochplatte eingesetzt, diese dann versiegelt und anschließend bei 1000 x g für eine Minute zentrifugiert. Die Reaktionsbedingungen für die qRT-PCR im iCycler erfolgten wie in Tabelle 2.13 dargestellt.

Tabelle 2.13: microRNA PCR-Array Reaktionsbedingungen für qRT-PCR

Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl	Schritt
15 min	95°C	1 Zyklus	Aktivierungsschritt
15 Sec	94°C		Denaturierung
30 sec	55°C	40 Zyklen	Annealing
30 sec	70°C		Extension & Fluoreszenzmessung
∞	4°C		Kühlung

Die Daten wurden mit Hilfe der *miScript miRNA PCR Array data analysis*- Web-basierten Software ausgewertet. Unter der Internetadresse <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna> wurden die C<sub>T</sub>-Werte der einzelnen Untersuchungsgruppen eingegeben und eine automatische Quantifizierung auf Basis der ΔΔC<sub>T</sub> Methode durchgeführt und veranschaulicht.



### 2.3.11 microRNA qRT-PCR-System

Für die quantitative Analyse der maturen microRNA wurde das *qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit* (Kapitel 2.1.8) von Quanta Biosciences verwendet.

Die Analyse von microRNAs mit Hilfe des *qScript™ microRNA Quantification Systems* von Quanta Biosciences erfolgt nach einem ähnlichen Prinzip wie die microRNA PCR-Arrays. Der wesentliche Unterschied liegt darin, dass das Anhängen eines Poly (A)-Schwanzes getrennt von der cDNA Synthese erfolgt.

Bei dem *qScript™ microRNA cDNA Synthesis Kit* wurde zuerst die microRNA mit Hilfe einer Poly (A)-Polymerase am 3'-Ende polyadenyliert. In einem zweiten Schritt erfolgte mit Hilfe der reversen Transkriptase und unter Verwendung von Oligo-dT-Primern das Umschreiben der microRNAs, aus Richtung des Poly (A)-Schwanzes, in cDNA.

Die mit Hilfe des *AllPrep DNA/RNA/miRNA Kit* (Qiagen) isolierte RNA (Kapitel 2.3.3) wurde mit dem NanoDrop®ND-1000 gemessen und jede Probe auf 200 ng verdünnt. Anschließend wurde der Ansatz für die Polyadenylierung (Tabelle 2.14) zusammen pipettiert und sowohl die Proben als auch die Reaktionsansätze in 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäße eingebracht:

Tabelle 2.14: Ansatz für die Polyadenylierung von microRNAs (*qScript™ microRNA cDNA Synthesis*)

Volumen pro Probe	Komponenten
2 µl	5x Poly (A)-Tailing Puffer
1 µl	Poly (A) Polymerase
bis zu 7 µl	RNA (200 ng)
variabel	Nuclease-freies Wasser

Das Anhängen des Poly (A)-Schwanzes erfolgte bei 37°C für 60 min mit einer anschließenden Inaktivierung der Polymerase über eine Dauer von fünf Minuten bei 70°C. Bis zum Einbringen der Reagenzien für den cDNA Synthese Schritt (Tabelle 2.15), wurden die Proben auf Eis gelagert. Ein Master-Mix aus reverser Transkriptase und dem microRNA cDNA Reaktions-Mix wurde den polyadenylierten Proben zugegeben und anschließend für 20 min bei 42°C inkubiert. Zur Inaktivierung der Transkriptase wurden die Proben fünf Minuten auf 58°C temperiert.

Tabelle 2.15: Ansatz für die reverse Transkription von microRNAs (*qScript™ microRNA cDNA Synthesis*)

Volumen pro Probe	Komponenten
10 µl	Poly (A)-Tailing Reaktions Mix
9 µl	microRNA cDNA Reaktions Mix
1 µl	qScript Reverse Transkriptase

Im Anschluss erfolgte die qRT-PCR mit dem PerfeC<sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix (Kapitel 2.1.8) von Quantas. Folgend ist der Reaktionsansatz für die microRNAs (Tabelle 2.16) sowie für das Referenzgen (Tabelle 2.17) als auch die qRT-PCR Bedingungen (Tabelle 2.18) im iCycler aufgeführt. Wie zuvor erfolgt die Auswertung der relativen Expression der SYBR® Green qRT-PCR über die Quantifizierung mit einem Referenzgen (Kapitel 2.3.9).

*Tabelle 2.16: Reaktionsansatz für microRNAs für qRT-PCR mit dem PerfeC<sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix*

Volumen pro Probe	Komponenten
12,5 µl	2x PerfeC <sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix
0,5 µl	PerfeC <sub>TA</sub> micrRNA Assay Primer (10 µM)
0,5 µl	PerfeC <sub>TA</sub> Universal Primer (10 µM)
1,0 µl	cDNA
10,5 µl	Nuklease freies Wasser

*Tabelle 2.17: Reaktionsansatz für das Referenzgen für qRT-PCR mit dem PerfeC<sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix*

Volumen pro Probe	Komponenten
12,5 µl	2x PerfeC <sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix
0,5 µl	PerfeC <sub>TA</sub> Universal Primer (10 µM)
2,0 µl	Primer forward (10 pmol/µl)
2,0 µl	Primer reverse (10 pmol/µl)
1,0 µl	cDNA
7,0 µl	Nuklease-freies Wasser

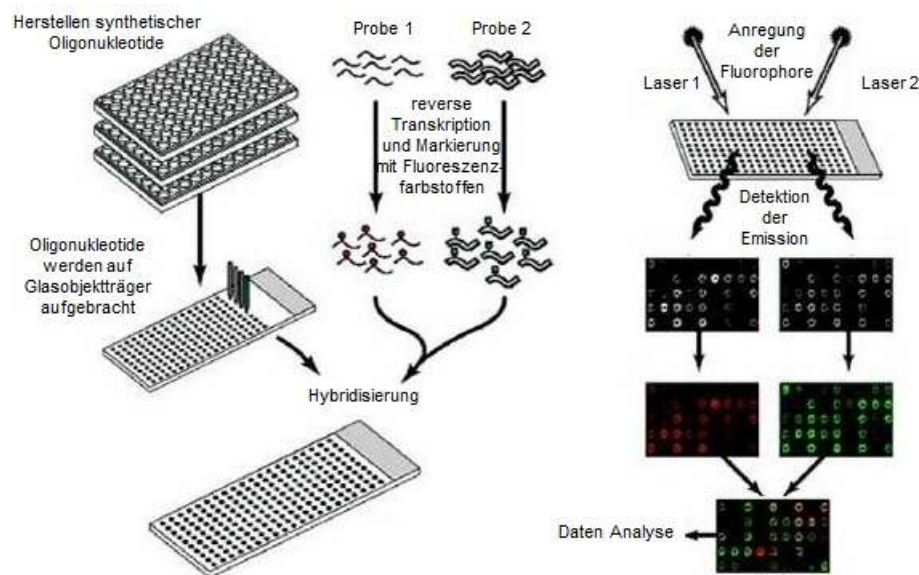
*Tabelle 2.18: Reaktionsbedingungen für qRT-PCR mit PerfeC<sub>TA</sub> SYBR Green Super Mix im iCycler*

Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl	Schritt
2 min	95°C	1 Zyklus	Initiale Denaturierung
5 sec	95°C		Denaturierung
15 sec	60°C	45 Zyklen	Annealing
15 sec	60°C		Elongation & Fluoreszenzmessung
30 sec	95°C	1 Zyklus	Abschließende Elongation
10 sec	Start 60°C	71 Zyklen	Schmelzkurve
∞	8°C		Kühlung

### 2.3.12 DNA-Mikroarray-Analysen

Die DNA-Mikroarray Technik ermöglicht es die Identität und Menge aller im Gewebe exprimierten mRNAs zu erfassen (Clarke *et al.*, 2001). Hierfür wird aus dem Gewebe RNA isoliert und unter Verwendung des Enzyms reverse Transkriptase (RT-Reaktion) in

cDNA umgeschrieben. In dieser RT-Reaktion werden die zu vergleichenden RNA-Proben (z.B. behandelt/unbehandelt) mit unterschiedlich fluoreszenzmarkierten dNTPs umgeschrieben. Somit erhält man zwei unterschiedlich markierte cDNAs, die zu allen in dem Gewebe vorhandenen mRNAs komplementär sind. Diese markierten cDNAs werden mit einem Glasträger (Chip), auf den DNA-Oligonukleotide (etwa 27.000) aufgebracht wurden, die jeweils zu einem Protein-kodierenden Gen des Organismus homolog sind, inkubiert (Hybridisierung). Somit erfasst dieser DNA-Chip das gesamte Protein kodierende Genom des Organismus. Der Chip wird nach der Hybridisierung durch Waschschritte von überflüssigen, nicht gebundenen cDNAs befreit und mit Hilfe eines „Mikroarray-Readers“ ausgelesen. Dieser „Mikroarray-Reader“ ist in der Lage die Fluoreszenz der beiden eingesetzten Farbstoffe anzuregen und die Intensität der Signale für jedes aufgebrachte Oligonukleotid (der „Spot“) zu bestimmen. Dieser Ablauf ist in Abbildung 2.2 dargestellt.



**Abbildung 2.2:** Der Ablauf einer DNA-Mikroarray-Analyse (schematisch dargestellt nach N. Schmidt)

Die Signale können durch bioinformatische Methoden normiert werden und verschiedene Experimente durch statistische Berechnungen verglichen werden. Somit erhält man schlussendlich eine Liste von Genen, deren mRNA-Expression sich zwischen den Proben durch die Behandlung ändert. Diese Liste kann durch weitere Softwarepakete, wie Ingenuity, analysiert werden

In dieser Arbeit wurden Proben mit dem Mouse OneArray<sup>®</sup>v2 von Phalanx Biotech analysiert. Jeder dieser Arrays besitzt 27295 Oligonukleotide die auf einen Objektträger aus Glas mittels eines Roboters an vordefinierte Positionen aufgebracht werden (Abbildung 2.2). Des Weiteren sind sogenannte „Orientation Grid Alignment Mark“ (OGAM), „Corner Grid Alignment Marks“ (CGAM) sowie Kontrollproben (insgesamt 872

gleichmäßig über den Array angeordnet. Diese dienen in der Auswertung Aussagen über Qualität der Proben, der cDNA Synthese und der Hybridisierung zu treffen.

### 2.3.12.1 Isolation und Markierung der RNA

Die Gesamt-RNA wurde aus murinen Gewebe mit dem *RNeasy Kit* von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert. Die Qualität und Quantität der isolierten RNA wurde mit dem Experion-System (Kapitel 2.3.5) überprüft. In die cDNA Synthese wurden 20 µg RNA eingesetzt. Für die cDNA-Synthese und -Markierung wurde das *SuperScript™ Plus Direkt cDNA Labeling System* von Invitrogen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Alexa Fluor®555 und Alexa Fluor®647 verwendet.

Im ersten Schritt wurde zu den 20 µg RNA 2 µl von den Anchored Oligo(dT)20 Primern (2,5 µg/µl) hinzugegeben, alles auf 15 µl Gesamtvolumen mit DEPC-Wasser aufgefüllt und zum Anlagern der Primer an die RNA für 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend kamen die Proben für eine Minute auf Eis, wo die weiteren Komponenten aus Tabelle 2.19 als fertiger Reaktionsansatz hinzu gemischt wurden.

Tabelle 2.19: Reaktionsansatz zum Markieren der RNA (*SuperScript™ Plus Direkt cDNA Labeling System*)

Volumen pro Ansatz	Komponenten
6,0 µl	5x First-Strand Puffer
3,0 µl	DTT (0,1 M)
3,0 µl	10x Nucleotide Mix mit Alexa Fluor®555-aha-dUTP oder Alexa Fluor®647- aha-dUTP
1,0 µl	RNaseOUT™ (40 U/µl)
2,0 µl	SuperScript™III RT (400 U/µl)

Die cDNA-Synthese und -Markierung erfolgte für drei Stunden bei 46°C. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden fand die Inkubation im Dunkeln statt.

Anschließend wurde jedem Reaktionsansatz 15 µl 0,1 M Natronlauge zugegeben und für 30 min bei 70°C inkubiert, um die Original-RNA zu hydrolysieren. Neutralisiert wurde der Ansatz mit 15 µl 0,1 M Salzsäure bevor die markierte cDNA mittels dem Low Elution cDNA Purification Modul (Kapitel 2.1.8) von überschüssigen Nukleotiden und anderen Kontaminationen befreit wurde.

Zum Aufreinigen der Proben mit dem Kit wurde zum Reaktionsansatz 700 µl Binde-Puffer gemischt, alles auf die Aufreinigungssäulen gegeben und für eine Minute bei 2800 x g zentrifugiert. Das Filtrat wurde erneut auf die Säulen gegeben und nach dem Zentrifugationsschritt verworfen. Die Säulen wurden mit 600 µl Waschpuffer durch Zentrifugation bei 16200 x g für 30 Sekunden gewaschen und durch einen erneuten

Zentrifugationsschritt getrocknet. Zum Eluieren der markierten cDNA wurden 20 µl DEPC-Wasser auf die Membran gegeben, bei Raumtemperatur eine Minute inkubiert und bei 16200 x g für eine Minute zentrifugiert. Um die Konzentration der cDNA zu erhöhen, wurde das Eluat erneut auf die Säule gegeben, inkubiert und zentrifugiert. Anschließend wurde die Effizienz der Markierung mit Hilfe des NanoDrop®ND-1000 überprüft und die gereinigte cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

### 2.3.12.2 Hybridisierung des Genchips

Die Hybridisierung der total-genomischen Mouse OneArray®v2 Genchips von Phalanx Biotech erfolgte im Lucidea Slide Pro Hybridizer (Amersham Bioscience). Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die Kammer mit Wasser, Isopropanol und 2 % Essigsäure mittels eines Waschprogrammes gereinigt. Zwischenzeitlich wurden die für die Hybridisierung benötigten Wasch- und Hybridisierungspuffer angesetzt (Kapitel 2.1.4) und der Array nach Herstellerangaben prä-hybridisiert.

Für den Hybridisierungsansatz wurden 100 µl vom 1,5x Hybridisierungspuffer mit 2,5 µl Salomon Sperm DNA Blocking Mix und gleichen Teilen an Alexa Fluor®555- und Alexa Fluor®647-markierter cDNA auf ein Gesamtvolumen von 150 µl mit Nuklease-freiem Wasser aufgefüllt. Dieser Reaktionsansatz wurde bei 16200 x g für fünf Minuten zentrifugiert, auf 95°C für fünf Minuten erhitzt und anschließend in die Hybridisierungskammer injiziert. Der Ablauf der Hybridisierung kann der Tabelle 2.20 entnommen werden. Nach dem Trocknen wurde der Chip aus der Kammer entnommen und bis zur Fluoreszenzmessung trocken und staubfrei gelagert.

*Tabelle 2.20: Ablauf der Hybridisierung im Lucidea Slide Pro Hybridizer*

Schritt	Lösungen und Zeit
Prä-Hybridisierung	5x SSPE; 0,1 % SDS; 1 % BSA 60 min, 42°C
Waschen	destilliertes Wasser
Spülen	Ethanol absolut
Trocknen	37°C
SSPE-Puffer	2x SSPE
Injizieren der markierten cDNA	150 µl
Hybridisieren	42°C für 16 Stunden
Waschen	2x SSPE; 0,1 % SDS
Abkühlen auf Raumtemperatur	
Waschen	0,1x SSPE; 0,1 % SDS
Waschen	0,1x SSPE
Trocknen	

### 2.3.12.3 Auswertung der Genchips

Die Detektion der Fluoreszenzsignale erfolgte mit dem Scan Array 4000 Express Laser-Scanner von Perkin Elmer™. Dieser fährt mit Lasern unterschiedlicher Wellenlänge den Array rasterförmig ab. Dabei wurde die Intensität des Lasers so eingestellt, dass die detektierte Fluoreszenz nicht im Sättigungsbereich lag. Die vom Programm Scan Array Express zusammengefassten und im „tif“-Format abgespeicherten Dateien für den Farbstoff Alexa Fluor®555 und Alexa Fluor®647 konnten anschließend im *Easy Quantification* Modus weiter bearbeitet und ausgewertet werden.

Für die Auswertung wurden beide Dateien im Scan Array Express Programm geöffnet. Im *Easy Quantification* Modus wurden die einzelnen Fluoreszenz-Signale dem zugehörigen Gen durch die mitgelieferte „gal“-Datei zugeordnet. Diese Datei beinhaltet alle notwendigen Informationen, für die Zuordnung aller Oligonukleotide (Gene, Kontrollproben, CGAM und OGAM) auf dem Array und ermöglicht somit ein Auswertungsgitter über die Scans zu legen. Nachdem die Positionierung kontrolliert und als Normalisierung die Total-Methode (Yang *et al.*, 2001) bestimmt wurde, konnte die Quantifizierung mit der „Fixed-circle“ Methode gestartet werden. Die Ergebnisse aus dieser Auswertung wurden als „csv“-Datei abgespeichert und beinhalten Daten für jedes einzelne gespottete Oligonukleotide (kurz Spots genannt) vom Array. In dieser Datei wurde zu jedem Spot die zugeordnete Intensität (Median der Intensität pro Pixel und Größe des Spots) sowie die Qualität des Signals erfasst. Die Qualität der Spots wird dabei durch sogenannte „Flags“ dargestellt. In die Flags geht die Intensität und die Größe der Spots sowie das Hintergrundrauschen in die Bewertung ein. Ein „schlechter“ Spot wurde mit dem Wert 1 versehen und ein „guter“ Spot mit dem Wert 3 (Spots mit intermediärer Qualität haben den Wert 2). Um die Daten zu Normieren und statistische Berechnungen durchführen zu können, wurde diese „csv“-Datei mit Hilfe des Programmes „Express Converter“ ([www.tm4.org](http://www.tm4.org)), welches am Institut for Genomic Research (TIGR) entwickelt wurde, in sogenannte „mev“-Dateien umgewandelt, wobei der Median der Spotintensität in die Gesamtintensität pro Spot umgewandelt wurde.

Im nächsten Schritt war das Ziel die Gene von den Kontrollspots und CGAM beziehungsweise OGAM zu separieren und die Qualität der Spots genauer zu beurteilen. Dazu wurden die Daten der „csv“-Datei sowie die Flags der zwei Farbkanäle aus der „csv“-Datei in ein Excel-Datenblatt kopiert. Dort wurde über eine Abfrage wurde geklärt, ob es sich bei dem Spot um ein Kontrollspot handelt. War des Spots positiv, wurde die Intensität des Spots auf den Wert 0 gesetzt. Handelte es sich um ein Gen, wurde die Qualität des Spots näher bestimmt. Nur wenn der Spot als „gut“ (3) bewertet wurde, wurde der Wert der Signalintensität übernommen. War der Spot von einer weniger guten Qualität (2 oder 1) wurden die Intensitätswerte auf den Wert 0 gesetzt.

Mit diese Umwandlungen wurde für weitere Analysen die Voraussetzung geschaffen nur mit tatsächlichen Genen und Spots von guter Qualität zu arbeiten.

Die „korrigierten“ Intensitäten wurden in eine „txt“-Datei abgespeichert und in die „WebArrayDB-Database and Cross-Platform Analysis“ ([www.webarraydb.org](http://www.webarraydb.org)) eingepflegt. Mit Hilfe dieser Plattform ist es möglich, die Daten mit verschiedenen statistischen Methoden zu analysieren (Xia *et al.*, 2009). In dieser Arbeit wurden die korrigierten Daten mit dem t-Test, der Signifikanz-Analyse von Mikroarrays (SAM) sowie dem eBayes-moderated t-Test (LIMMA) analysiert. Im Anschluss wurden alle drei Analysen miteinander abgeglichen und nur Gene berücksichtigt, die in allen drei statistischen Tests signifikant ( $p < 0,05$ ) reguliert waren.

Die Schnittmenge der signifikant regulierten Gene aus den drei statistischen Analysen wurden mit Hilfe der QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis Software (IPA, QIAGEN Redwood City, [www.qiagen.com/ingenuity](http://www.qiagen.com/ingenuity)) weiter analysiert. Ingenuity basiert auf der Ingenuity Knowledge Base, einem Publikationsarchiv von wissenschaftlichen Zeitschriften sowie öffentlichen und privaten Datenbanken, welches auf Inhalte und Aktualität ständig überprüft wird. Das einpflegen der eigenen Daten beinhaltet einem Abgleich der Gene mit dem Archive sowie eine Überprüfung der Signifikanz mit dem exakten Test nach Fisher ( $p < 0,05$ ). Die Gene die in der Datenbank mit Informationen hinterlegt sind, konnten dann biologischen Prozessen zugeordnet und für funktionelle Zusammenhänge analysiert werden.

### **2.3.13 Klonierung**

Bei einer Klonierung integriert man ein DNA-Fragment in einen Vektor, mit dem Ziel die eingebrachte DNA zu vermehren, zu analysieren oder die Expression des Fragmentes zu untersuchen. Hierfür wird mit geeigneten Restriktionsenzymen Vektor und Fragment verdaut (Kapitel 2.3.13.1) und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (Kapitel 2.3.13.2). Um eine Religation des Vektors zu verhindern, können die Enden dephosphoryliert werden (Kapitel 2.3.13.4). Für die erfolgreiche Ligation können auch überhängende Enden des Plasmids aufgefüllt werden (Kapitel 2.3.13.5). Nebenprodukte und Verunreinigungen werden von Fragment und Vektor mittels der Agarose-Gel-Elektrophorese getrennt (Kapitel 2.3.6). Fragment und Vektor werden anschließend aus der Agarose eluiert (Kapitel 2.3.13.6) und ligiert (Kapitel 2.3.13.7), in Bakterien transformiert (Kapitel 2.3.13.8) und vervielfältigt (Kapitel 2.3.13.9). Zum Schluss wird das durch die Klonierung erzeugte DNA-Konstrukt isoliert und zur Überprüfung verdaut und sequenziert.

### **2.3.13.1 Restriktion von DNA**

Für die Charakterisierung von Vektoren sowie bei der Präparation von DNA und Vektoren für die Klonierung werden Restriktionsendonukleasen benötigt. Diese erkennen bestimmte Sequenzmuster und schneiden innerhalb oder in unmittelbarer Nähe der Erkennungssequenz. Dabei können die Enzyme die doppelsträngige DNA glatt oder mit 3'- bzw. 5'- überhängenden Enden schneiden.

Für einen analytischen Verdau wurden 1 µg Vektor-DNA, 2 µl des entsprechendem Reaktionspuffers und 1 Einheit (U) Enzym gemischt und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 20 µl gebracht. War für die Stabilisierung des Enzyms BSA nötig, wurden zu dem Ansatz 2 µl 10 x BSA hinzu gemischt.

Sollte der Verdau für einen präparativen Ansatz erfolgen, wurden 30 µg DNA eingesetzt, mit 10 µl Puffer, 3 U Enzym und wenn erforderlich 10 µl 10 x BSA gemischt und auf 100 µl Gesamtvolumen mit Millipore Wasser aufgefüllt. Die Ansätze wurden je nach Restriktionsenzym bei dessen Temperaturoptimum innerhalb drei Stunden geschnitten.

### **2.3.13.2 Phenol-Chloroform-Extraktion**

Um die Proteine und weitere Verschmutzungen aus dem Restriktionsansatz zu entfernen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde der Ansatz mit 1/10 Vol einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 4,8) sowie einem Vol einer Tris gesättigten 1:1 Phenol-Chloroform-Mischung auf dem Kreisschüttler gemischt und für fünf Minuten bei 16200 x g und 4°C zentrifugiert. Verschmutzungen und Proteine sammeln sich dabei in der Inter- und unteren Phase. Die obere Phase mit den Nukleinsäuren wurde abgenommen und mit einer anschließenden Alkoholfällung (2 Vol 100 % Ethanol) für eine Stunden bei -20° C gefällt. Erneut wurde bei 16200 x g für 20 min bei 4° C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Millipore H<sub>2</sub>O gelöst.

### **2.3.13.3 Kinase-Behandlung**

Beim Einsatz synthetisch hergestellter Oligonukleotide in eine Ligation, ist eine Phosphorylierung am 5'-Ende durch einer Kinase-Behandlung notwendig. Dabei werden Phosphatgruppen durch die Polynukleotid-Kinase von ATP-Molekülen auf die 5'-Hydroxy-Gruppen der doppelsträngigen DNA übertragen. Der Reaktionsansatz kann der Tabelle 2.22 entnommen werden.

Der Ansatz wird bei 37°C für eine Stunde inkubiert und anschließend wird das Enzym durch eine 10 minütige Temperierung bei 65°C inaktiviert.



Tabelle 2.21: Ansatz für die Kinase-Behandlung von Proben

Volumen pro Probe	Komponenten
50,0 µl	Probe
10,0 µl	10x PNK-Puffer
10,0 µl	ATP-Lösung (10 mM)
2,0 µl	T4-PNK-Kinase
28,0 µl	Millipore Wasser

#### 2.3.13.4 Auffüllen überhängender 5'-Enden

Wurden Vektor und Fragment mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen geschnitten, die keine kompatiblen Enden erzeugten, konnte eine Ligation durch Auffüllen von überhängenden 5'-Enden ermöglicht werden. Hierfür wurden 3 U Klenow-Enzym, welches dem größeren Fragment der DNA-Polymerase I aus *Escheria coli* entspricht und eine 5'-3' Polymerase-Aktivität besitzt, mit 10 µl des mitgelieferten Puffer II und 1 mM dNTPs zur aufgereinigten DNA gegeben. Der Ansatz wurde mit Millipore Wasser auf ein Gesamtvolumen von 100 µl aufgefüllt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

#### 2.3.13.5 5'-Dephosphorylierung

Um eine Religation des Vektors bei der Ligation zu vermeiden, können am 5'-Ende der DNA die Phosphatreste nach der Restriktion entfernt werden. Hierfür wird eine aus Kälberdarm stammende alkalische Phosphatase (CIAP) verwendet. Es wurden 5 U CIAP nach der Restriktion dem Ansatz hinzu gegeben und für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

#### 2.3.13.6 Elution von DNA aus Agarose

Werden Vektor und Fragment mit mehreren Restriktionsenzymen geschnitten, müssen unspezifische DNA-Fragmente und nicht vollständig geschnittene Produkte vor der Ligation entfernt werden. Dazu wurde die gesamte, verdaute DNA mit 20 µl DNA-Ladepuffer versehen und auf ein niedrigprozentiges Agarosegel (Kapitel 2.3.6) aufgetragen. Anschließend wurde das entsprechende Fragment auf dem UV-Transilluminator über den Größenstandard (Kapitel 2.1.6) identifiziert und ausgeschnitten. Das Agarosestück mit der DNA wurde in einen Dialyseschlauch gegeben und mit 1,0 ml 1x TAE-Puffer (Kapitel 2.1.4) bedeckt. Nachdem der Dialyseschlauch verschlossen wurde, konnte die DNA für eine Stunde bei 100 Volt eluiert werden. Um die DNA vom Dialyseschlauch zu lösen, wurde im Anschluss für zwei Minuten die Laufrichtung umgepoolt. Das Eluat wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion (Kapitel 2.3.13.2) gefällt.

### **2.3.13.7 Ligation von DNA**

Hauptziel der Ligation ist die enzymatische Verbindung von Vektor und Fragment. Die Enden der DNA-Fragmente werden durch Einbindung einer Phosphodiesterbindung, zwischen der 3'-Hydroxy-Gruppe des einen Fragmentes und dem 5'-Phosphat-Ende des anderen Fragmentes, durch die Ligase verbunden. Kofaktor für die T4 DNA-Ligase ist in diesem Fall ATP.

Für die Ligation wurden Vektor und Fragment im Verhältnis 1:3 mit Ligasepuffer und 1 U T4 DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 20 µl 16 Stunden bei 18°C inkubiert. Als Negativkontrolle wurde der Ligationsansatz ohne Zugabe des Fragmentes angesetzt.

### **2.3.13.8 Transformation von Plasmid-DNA in Bakterien**

Zur Vervielfältigung der rekombinanten DNA wird diese in kompetente TOP10 Bakterienzellen (Kapitel 2.1.6) inseriert. Für diese Transformation wurden 10 µl des Ligationsansatzes bzw. der Negativkontrolle mit 100 µl kompetenter Bakterien 30 min auf Eis inkubiert, für 45 sec bei 42°C Hitzeschockbehandlung und anschließend noch einmal zwei Minuten auf Eis inkubiert. Der kurze Hitzeschock erhöht die Permeabilität der Zellwand der Bakterien, so dass die Plasmid-DNA verstärkt aufgenommen werden kann. Nachfolgend wurden dem Ansatz 400 µl LB-Medium hinzugegeben und eine Stunde bei 37°C zur Ausprägung der Antibiotikaresistenz in den Schüttelinkubator gestellt. Von diesem Ansatz wurden 100 µl steril auf antibiotikahaltige Agarplatten (Kapitel 2.1.5) ausplattiert und zum Wachsen der Bakterienkolonien für 16 Stunden bei 37°C inkubiert. Durch das Antibiotikum wurden nur Bakterien selektioniert, die ein Plasmid aufgenommen haben, das die entsprechende Resistenzgen enthält.

### **2.3.13.9 Plasmid-DNA-Präparation**

Die Plasmid-DNA-Präparation dient der Isolierung der vermehrten rekombinanten Plasmid-DNA aus den transformierten Bakterien. Zuerst wurde hierfür in einer Minipräparation der Erfolg der Klonierung und der Transformation kontrolliert. Dazu wurden die Bakterienkolonien mit einem sterilen Zahnstocher von der Agarplatte gepickt und zum Wachsen in 3 ml LB-Selektionsmedium für 16 Stunden bei 37°C auf den Schüttelinkubator gegeben.

Die Isolation der rekombinanten Plasmid-DNA wird durch alkalische Lyse (Birnboim and Doly, 1979) erreicht. Dafür wurde 1 ml der Bakteriensuspension für eine Minute bei 16200 x g und 4°C zentrifugiert, das LB-Medium verworfen, das Bakterienpellet in 100 µl Maniatis I (Kapitel 2.1.4) aufgenommen und für fünf Minuten bei 25°C inkubiert. Durch die Zugabe von 200 µl Maniatis II (Kapitel 2.1.4) zur Bakterienlösung werden die Zellen durch das enthaltene Detergens SDS lysiert und durch NaOH die Lipide durch alkalische Verseifung gespalten. Anschließend wurden, nach einer Inkubation von fünf Minuten auf

Eis, zur Neutralisation 150 µl Maniatis III (Kapitel 2.1.4) hinzu gegeben. Diese Kaliumacetat-Lösung fällt mit dem SDS aus der Bakterien-Lösung die Proteine und die genomische DNA aus. Nach einer weiteren Inkubation von fünf Minuten auf Eis wurde die sich im Überstand befindende rekombinante Plasmid-DNA von der genomischen DNA und den Proteinen durch Zentrifugation, 15 min bei 4°C und 16200 x g, abgetrennt und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dort wurde die Plasmid-DNA mit 600 µl Isopropanol für zwei Minuten bei 25°C gefällt und für 10 Minuten bei 16200 x g und 21°C pelletiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl Millipore Wasser aufgenommen. Die isolierte Plasmid-DNA wurde mit geeigneten Restriktionsenzymen verdaut (Kapitel 2.3.13.1) und die Produkte auf einem Agarosegel aufgetragen. Entsprachen die erhaltenen Fragmentgrößen der Erwartung wurden DNA-Midipräparationen durchgeführt. Dies ermöglicht größere Mengen des Plasmides herzustellen. Dazu wurde 100 ml LB-Selektionsmedium mit dem Bakterium aus der gewünschten Kolonie angeimpft. Die Bakteriensuspension wurde für 16 Stunden bei 37°C in den Schüttelinkubator gestellt und die DNA mit Hilfe des HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Kapitel 2.1.8) nach Herstellerangaben isoliert.

## 2.4 Proteinbiochemische Methoden

Die Durchführung der proteinbiochemischen Standardtechniken, die in diesem Kapitel dargestellt werden, erfolgten weitestgehend, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook (1989) und Wild (2013).

### 2.4.1 Gewinnen von Proteinextrakten aus Zellen und Gewebe

Für Expressionsanalysen von Proteinen wurden Zellen mit RIPA-Puffer (Kapitel 2.1.4) lysiert, von der Adhäsionsfläche der Lochplatte mit einer Pipette abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte, unter ständiger Kühlung auf Eis, eine Ultraschall-Lyse (fünf Pulsintervalle je 30 Sekunden mit 45 Sekunden Pause im Biorupter Plus von Diagenode) und eine Inkubation auf dem Überkopfschüttler für 10 min bei 4°C. Die Zelltrümmer und Lipide konnten dann durch Zentrifugation (16200 x g, 5 min 4°C) entfernen werden. Die flüssige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C aufbewahrt.

Um Protein aus Gewebe zu isolieren, wurde ein Teil des Gewebes abgeschlagen und in RIPA-Puffer gegeben. Die Homogenisierung erfolgte mit dem Tissue Lyser (Qiagen) oder mit einem Ultra Turrax (Kapitel 2.1.1). Anschließend wurde wie bei den Zellen sonifiziert, zentrifugiert und die flüssige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Für die Analyse von Reporter-Gen-Konstrukten wurden Zellen hingegen in einer 24-Loch-Platte mit 100  $\mu\text{l}$  1 x PLB (Kapitel 2.1.3) lysiert und für mindestens eine Stunde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.4.2 Quantifizierung von Proteinen

Für die Quantifizierung der Proteinkonzentration in den Proben wurde die Konzentrationsanalyse nach Bradford (1976) durchgeführt. Bei dieser photometrischen Methode kommt der Triphenylmethanfarbstoff Coomassie-Brillant-Blau G-250 zum Einsatz. Dieser rote Farbstoff hat in seiner ungebundenen Form ein Absorptionsspektrum bei 470 nm. Wird dieser Farbstoff zu einem sauren Proteingemisch gegeben, bildet dieser Komplexe mit den kationischen und unpolaren Seitenketten von Proteinen aus. Dadurch verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes, je nach Proteingehalt, in Richtung 595 nm. Um einen Rückschluss auf die Proteinkonzentration in der Probe zu erhalten, wurde parallel zu den Proben eine Standardreihe mit bekannter BSA-Konzentration (1 mg/ml BSA entspricht 1 OD) gemessen.

Für die Messung wurden die Ansätze für die Proben und der Standardreihe aus Tabelle 2.22 zusammen pipettiert. Um den Einfluss der Detergenz in den Proben zu berücksichtigen, wurde in die Standardreihe das gleiche Volumen an RIPA-Puffer eingesetzt wie in den Proben (10  $\mu\text{l}$ ). Zum Schluss wurde in alle Ansätze 200  $\mu\text{l}$  Bradfordreagenz gemischt. Für eine Doppelbestimmung wurden jeweils 200  $\mu\text{l}$  der Probe beziehungsweise des Standards in zwei Löcher einer 96er Flach-Loch-Platte gegeben. Mit Hilfe eines Spektrometers wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Tabelle 2.22: Ansatz für Bradford-Analyse mit Standardreihe

Standard	0	1	2	4	6	8
Wasser	790 $\mu\text{l}$	789 $\mu\text{l}$	788 $\mu\text{l}$	786 $\mu\text{l}$	784 $\mu\text{l}$	782 $\mu\text{l}$
BSA	0 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	2 $\mu\text{l}$	4 $\mu\text{l}$	6 $\mu\text{l}$	8 $\mu\text{l}$
Standard	10	12	14	16	18	20
Wasser	780 $\mu\text{l}$	778 $\mu\text{l}$	776 $\mu\text{l}$	774 $\mu\text{l}$	772 $\mu\text{l}$	770 $\mu\text{l}$
BSA	10 $\mu\text{l}$	12 $\mu\text{l}$	14 $\mu\text{l}$	16 $\mu\text{l}$	18 $\mu\text{l}$	20 $\mu\text{l}$
Probe	1 $\mu\text{l}$					
Wasser	790 $\mu\text{l}$					
RIPA	9 $\mu\text{l}$					

### 2.4.3 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Die Präzipitation von Proteinen aus einer Proteinlösung wurde nach Wessel und Flügge (1984) durchgeführt. Die gewünschte Proteinmenge wurde auf ein Gesamtvolumen von 200  $\mu\text{l}$  mit Millipore Wasser aufgefüllt und mit 800  $\mu\text{l}$  Methanol gemischt. Anschließend wurde mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform das Protein ausgefällt und zur verbesserten Phasentrennung 600  $\mu\text{l}$  Wasser zugegeben. Darauf folgend wurden die Proben für zehn Minuten bei 4°C und 16200 x g zentrifugiert, wobei sich die ausgefallten Proteine in der Interphase ansammeln. Die obere wässrige Phase wurde verworfen und die Proteine mit 600  $\mu\text{l}$  Methanol bei 16200 x g bei 4°C für fünf Minuten vollständig gefällt. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet unter einem Abzug luftgetrocknet. Zum Schluss wurde das Proteinpellet in 2x Laemmli-Puffer (Kapitel 2.1.4) aufgenommen, bei 95°C für acht Minuten denaturiert und bis zur Auftrennung mittels der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Kapitel 2.4.4) bei -20°C gelagert.

### 2.4.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann ein Proteingemisch dem Molekulargewicht nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden (Laemmli, 1970). Dafür werden die hydrophoben Gruppen der Proteine mit den lipophilen Kohlenwasserstoffketten der Seife Sodiumdodecylsulfat (SDS) zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen gebunden. Diese Komplexe weisen ein konstantes Ladung-zu-Masse-Verhältnis auf, wobei alle Proteine eine vergleichbare hydrodynamische Eigenschaft besitzen und sich demnach nur noch in ihrer Größe unterscheiden. Dabei reduziert das im Laemmli-Puffer enthaltene DTT die Disulfidbrücken, die bei der Faltung der Proteine beteiligt sind.

Das in dieser Arbeit verwendete diskontinuierliche SDS-System nach Laemmli besteht aus einem kurzen, niederprozentigen Sammelgel mit vorgeformten Probenaschen und einem langen, höherprozentigen Trenngel. Die in die Probenaschen eingetragene Proteinprobe konzentrierte sich nach Anlegen einer elektrischen Spannung an der Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel. Die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht erfolgte in dem feinporigen Trenngel.

Für alle SDS-PAGE Experimente wurde ausschließlich mit dem Mini-Protean-System 3 von Bio-Rad gearbeitet. Hierfür wurden die Glasplatten gereinigt und in die Halterung zum Gießen der Gele eingespannt. Dann wurde das Trenngel, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, nach der in Tabelle 2.23 aufgeführten Zusammensetzung zwischen die Glasplatten gegossen. Um eine gerade Grenze zwischen Sammel- und Trenngel zu erhalten, wurde das Trenngel mit EtOH überschichtet. Bei Raumtemperatur

konnte das Gel polymerisieren. Im Anschluss wurde das EtOH mit einem Filterpapier entfernt, das Sammelgel (Tabelle 2.23) auf das Trenngel gegossen und mit einem Kamm zum Ausformen der Probenaschen versehen. War das Gel auspolymerisiert, konnte der Kamm entfernt, das Gel in die Gelkammer eingespannt und diese mit 1x Laufpuffer gefüllt werden.

Tabelle 2.23: Zusammensetzung Trenn- und Sammelgel für SDS-PAGE

Komponenten	Trenngel 10 %	Trenngel 15 %	Sammelgel
Millipore Wasser	6,75 ml	3,75 ml	4,6 ml
1,5 M Tris pH 8,8	4,2 ml	4,2 ml	
0,5 M Tris pH 6,8			1,875 ml
10 % SDS	168 $\mu$ l	168 $\mu$ l	75 $\mu$ l
30 % Acrylamid	5,625 ml	8,25 ml	975 $\mu$ l
TEMED	11,25 $\mu$ l	11,25 $\mu$ l	9,75 $\mu$ l
10 % APS	112,5 $\mu$ l	112,5 $\mu$ l	49,5 $\mu$ l

Die mit Laemmli-Puffer versetzten Proben wurden erneut für fünf Minuten bei 95° C denaturiert, bei Raumtemperatur kurz zentrifugiert und in die Taschen des Sammelgels gegeben. Um am Ende der Proteinauftrennung die Proteingröße bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Molekulargewicht-Standard (Kapitel 2.1.6) auf das Gel aufgetragen. Dann wurde eine Spannung von 80 V angelegt.

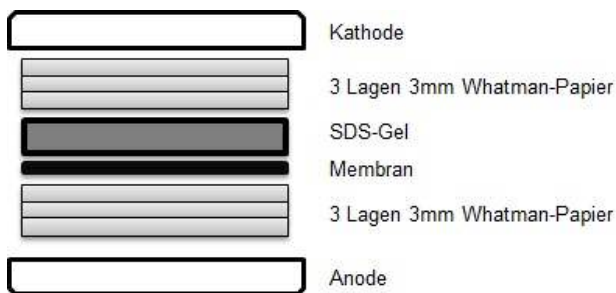
## 2.4.5 Immundetektion mittels Western Blot

Im Western Blot wird ein aufgetrenntes Proteingemisch (Kapitel 2.4.4) auf eine Membran übertragen, um anschließend mit Hilfe spezifischer Antikörper das zu analysierende Protein zu detektieren (Burnette, 1981; Towbin *et al.*, 1992; Dunn, 1986).

So werden die in einem SDS-Gel aufgetrennten Proteine mittels eines senkrecht angelegten elektrischen Feldes in Richtung einer Nitrozellulose- oder PVDF-Membran transferiert. Die Membranen binden die Proteine aufgrund hydrophober Wechselwirkungen, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten bleibt. Die transferierten Proteine können dann mit Antikörpern angefärbt werden. Dazu werden auf der Membran unspezifische Bindungsstellen abgesättigt und dann Proteine spezifisch durch eine Antigen-Antikörper Reaktion (primärer Antikörper) detektiert. Der auf der Membran entstandene Antigen-Antikörper-Komplex wird mit Hilfe eines Immunkonjugates nachgewiesen. Dabei bindet an die F<sub>c</sub>-Region des ersten Antikörpers ein sekundärer Antikörper mit einem Reporterenzym. Dieses Reporterenzym ist in den verwendeten

Antikörpern eine Meerrettich-Peroxidase, welche die Oxidation von Luminol in einem zugegebenen Zweikomponenten-Chemilumineszenz-Substrat (Western Lightning, von Perkin Elmer) katalysiert. Die ausgelöste Chemilumineszenz kann mit einem Positivfilm oder dem ChemiDoc™ (Kapitel 2.1.1) visualisiert werden.

Vor dem Transfer der aufgetrennten Proteine auf die Membran wurde das SDS-Gel für 15 Minuten im Transferpuffer (Kapitel 2.1.4) äquilibriert. Hierbei wird das vorhandene SDS ausgewaschen, um die Proteine in Teilen zu renaturieren. Auch die auf das Gel zugeschnittenen Whatman-Papiere sowie die Membran wurden im Transferpuffer geschwenkt. Bei der Membran dient diese Maßnahme der Aktivierung der Oberfläche, wobei eine PVDF-Membran zuvor in Methanol für zehn Sekunden quellen muss. Anschließend wurde der Blot wie in Abbildung 2.3 gestapelt. Bei dem Zusammenbau wurde darauf geachtet, dass sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten befinden, um einen gleichmäßigen Transfer zu gewährleisten.



**Abbildung 2.3: Schematischer Aufbau eines Western Blots**

In der dargestellten Reihenfolge wurde der Western Blot, für den Transfer von Proteinen aus einem SDS-Gel auf eine Membran, im Bio-Rad Semi-Dry-Blotter aufgebaut. (Abbildung in Anlehnung an Hersteller Bio-Rad)

Der Transfer richtete sich nach der Größe des zu analysierenden Proteins. Proteine bis zu einer Größe von 20 kDa wurden mit der Fläche (cm<sup>2</sup>) x 1,5 in konstant mA für 30 Minuten transferiert. Größere Proteine wurden bei konstanten 12 V übertragen. Die Zeit richtete sich dabei nach der Größe der zu analysierenden Proteine.

Die Transfereffizienz wurde mit einer Ponceau S-Lösung (Kapitel 2.1.4) überprüft, indem die Membran eine Minute in der Lösung angefärbt und danach mit Wasser wieder entfärbt wurde. Zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran bei Raumtemperatur für 60 Minuten in einer 5 % Milchpulver-TBST- oder 3 % BSA-TBST-Puffer (Kapitel 2.1.4) inkubiert. Darauf folgte die Inkubation unter ständigen Schwenken der Membran mit dem primären Antikörper, der in der Blockierlösung verdünnt wurde, für 16 Stunden bei 4° C. Um unspezifisch gebundene primäre Antikörper zu entfernen, wurde die Membran drei Mal je zehn Minuten in 1 x TBS + 1 % Tween 20 (Kapitel 2.1.4) gewaschen. Nachfolgend wurde die Membran mit dem Peroxidase-gekoppelten, sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und wieder

gewaschen. Das Protein konnte dann mit dem ECL-System via Film (Kapitel 2.1.8 und 2.1.3) oder ChemiDoc™ (Kapitel 2.1.1) detektiert und mit der Software Image Lab™ (Kapitel 2.1.2) quantifiziert werden.

#### **2.4.6 Immundetektion mittels Proteome Profiler™**

Für die gleichzeitige Erfassung von 40 verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen aus einem Mausgewebe-Lysat wurde das „*Mouse Cytokine Array Panel A*“-Kit von R&D Systems verwendet. Die gleichzeitige Detektion wird gewährleistet indem auf eine Nitrozellulosemembran vorab 40 spezifische Antikörper in Duplikaten aufgebracht werden.

Für die Herstellung der Gewebelysate wurde das Gewebe, wie im Abschnitt 2.4.1 beschrieben, mit Hilfe des Tissue Lyser (Qiagen) homogenisiert und auf einem Überkopfschüttler bei 4°C für 30 min inkubiert. Zum Entfernen von Zellrückständen wurden die Proben fünf Minuten bei 16200 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um von jeder Probe die gleiche Menge an Gesamtprotein in die Analysen einzusetzen, wurde die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt (Kapitel 2.4.2). Das weitere Vorgehen entsprach dem Protokoll des Herstellers.

#### **2.4.7 Enzymatische Immundetektion mittels ELISA**

Das Prinzip des *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assays* (ELISA) beruht auf einer antikörpergekoppelten, enzymatischen Farbreaktion. Mit diesem Verfahren kann man quantitativ das zu untersuchende Antigen nachweisen. Der Nachweis von S100A8, dsDNA und IFN  $\alpha$  wurden mit Standard-Kits durchgeführt.

In diesen Kits ist eine 96-Loch Mikrotiterplatte bereits mit dem Antikörper gegen das gesuchte Antigen vorbeschichtet. Gibt man nun den Standard (rekombinantes Protein in bekannter Konzentration) beziehungsweise die Probe in den Reaktionsraum wird das Antigen, wenn es vorliegt, durch den Antikörper gebunden. Nach einer entsprechenden Inkubationszeit wird zu dem Antikörper-Antigen-Komplex das Detection Reagent A hinzugegeben. Dabei handelt es sich um einen zweiten mit Biotin konjugierten polyklonalen Antikörper, der möglichst an andere Epitope des Antigens bindet als der erste Antikörper. Somit entsteht eine Art „Sandwich-Komplex“ aus primärem Antikörper, Antigen und sekundären Antikörper. Um die für die Farbreaktion benötigte Meerrettich-Peroxidase (HRP) an das „Sandwich“ zu binden, wird HRP konjugiertes Hühnereiweiß (Avidin im Detection Reagent B) nach einem Waschschrift zu den Reaktionsräumen gegeben. Dieses bindet dann am Biotin des sekundären Antikörpers. Nach einem erneuten Waschschrift wird durch die Zugabe von 3, 3', 5, 5'- Tetramethylbenzidin (TMB) die



enzymatische Farbreaktion induziert. Das farblose TMB nimmt in Gegenwart von der Meerrettich-Peroxidase eine blaue Färbung an. Wird nach einer bestimmten Reaktionszeit die Meerrettich-Peroxidase durch Zugabe von Schwefelsäure denaturiert, wird diese Farbreaktion abgestoppt. Mit der Veränderung des pH-Wertes schlägt die Farbe des TMBs von blau nach gelb um. Die Durchführung und Auswertung der ELISAs S100A8, dsDNA sowie C3 (Kapitel 2.1.8) erfolgte nach Herstellerangaben durch Jenny Henke oder durch das Zentrallabor der Uniklinik Mainz. Die Albumin (Kapitel 2.1.8) und Immunglobulin G (IgG)-Subklassen ELISAs (Kapitel 2.1.10) wurden ausschließlich durch Dr. Julia Weinmann-Menke etabliert und durchgeführt.

Für den Albuminnachweis wurde das Mouse Albumin ELISA Set von Bethyl Laboratories (Kapitel 2.1.8) verwendet. In diesem Set ist ein primärer Ziege-anti-Maus-Albumin Antikörper, ein Referenzserum sowie ein HRP konjugierter Ziege-anti-Maus-Albumin sekundär Antikörper enthalten. Zum Beschichten einer 96-Loch Mikrotiterplatte mit dem primären Antikörper wurde dieser 1:150 in 0,05 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH 9,6) (Kapitel 2.1.4) gelöst und je 100 µl in einen Reaktionsraum gegeben. Die Platte wurde mit einem Klebefilm versiegelt und 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde zwei Mal mit 200 µl Waschpuffer I (Kapitel 2.1.4) gewaschen. Unspezifische Bindungsstellen wurden mit 200 µl Blockpuffer I (Kapitel 2.1.4) innerhalb von 30 min abgesättigt. Anschließend wurden die Reaktionsräume erneut mit 200 µl Waschpuffer I zwei Mal gewaschen und der Standard aus dem Referenzserum nach Empfehlung des Herstellers sowie die Probenverdünnungen (1:300) mit dem Probenpuffer I angefertigt. 100 µl Standard oder Probe wurden in die Reaktionsräume gegeben, für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um dann nicht gebundene Proteine mit einem dreifach Waschschrift zu entfernen. Zum Inkubieren mit dem sekundären HRP-konjugierten Antikörper wurde dieser 1:80000 mit Probenpuffer I verdünnt und 100 µl in jeden Reaktionsraum für eine Stunde gegeben. Zum Schluss wurde vier Mal gewaschen, 100 µl TMB-Substrat (Kapitel 2.1.3) hinzugegeben und so lang inkubiert, bis der Standard mit der geringsten Konzentration eine Farbreaktion zeigte. Abgestoppt wurde die Reaktion mit 100 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Kapitel 2.1.4).

Die Detektion von IgG-Subklassen wurde mit Antikörpern durchgeführt die laut Hersteller für den Gebrauch in ELISA-Analysen geeignet sind (Kapitel 2.1.10). Für alle Subklassen wurde vom primären, unmarkierten Ziege anti-Maus IgG-UNLB Antikörper 5 µg/ml in PBS zum Beschichten der 96-Loch Mikrotiterplatte verdünnt. In die Mikrotiterplatte wurden dann je 100 µl Antikörperverdünnung pro Reaktionsraum eingesetzt, 16 Stunden bei 4°C inkubiert, mit 200 µl vom Waschpuffer II (Kapitel 2.1.4) dreimalig gewaschen und eine Stunde bei Raumtemperatur mit dem Blockpuffer II (Kapitel 2.1.4) abgesättigt. Anschließend wurde dreimalig gewaschen, die Standardverdünnungen bzw. die Proben hinzugegeben und 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Vom Standard wurde hierfür eine

2500 ng/ml Verdünnung mit PBS angesetzt und von dieser ausgehend eine geometrische Verdünnungsreihe angelegt. Die Proben wurden 1:2500 in PBS verdünnt. Nach 16 h wurde erneut drei Mal gewaschen, die sekundären IgG-Subklassen spezifischen Antikörper 1:5000 in dem Blockpuffer II gelöst und 100 µl pro Reaktionsraum eingesetzt. Eine Stunde wurde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und darauf folgend wurde fünfmalig mit dem Waschpuffer II gewaschen. Abschließend wurde je 100 µl TMB-Substrat in den Reaktionsraum gegeben, auch hier so lang inkubiert, bis der Standard mit der geringsten Konzentration eine Farbreaktion zeigte, welche mit 100 µl 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> abgestoppt wurde.

Die Extinktion wurde bei allen ELISAs mit Hilfe eines Photometers bei einem Absorptionsmaximum von 450 nm gemessen. Eine genaue Quantifizierung des Antigen-Antikörpers in der Probe wurde durch einen Extinktions-Vergleich mit der Standardreihe ermöglicht.

#### **2.4.8 Cyp3A4 Aktivitätsanalyse**

Für die Messung der Cyp3A4 Aktivität wurde das *P450-Glo Assay* der Firma Promega (Kapitel 2.1.8) verwendet. Der Nachweis der Aktivität des Enzyms basiert auf einem Lumineszenz-basierten Verfahren. In Anwesenheit von NADPH metabolisiert das rekombinante Cyp3A4 Enzym das Proluziferin (Luziferin-PFBE) in Luziferin. Dieses dient dem zugesetzten Luciferasereagenz als Substrat, welches das Luziferin unter Freisetzung von Licht umsetzt. Diese kann mittels eines Luminometers gemessen werden.

Die Durchführung der Aktivitätsanalyse erfolgte nach Herstellerangaben. Die Luciferaseaktivität wurde mit dem Luminometer (Kapitel 2.1.1) gemessen und mit der Software Mikrowin 2000 (Kapitel 2.1.2) ausgewertet. Für die Auswertung wurden die Hintergrundlumineszenz ohne aktives Cyp3A4 von allen Messwerten subtrahiert und diese dann durch die entsprechende Lösungsmittelkontrolle dividiert.

## 2.5 Immunhistochemische Untersuchungen

Die Durchführung der immunhistochemischen Standardtechniken, die in diesem Kapitel dargestellt werden, erfolgten weitestgehend, wenn nicht anders angegeben, nach Wild (2013).

### 2.5.1 Herstellung von Schnittpräparaten

Paraffinschnitte:

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die Organe in 4 % neutral gepuffertes Formaldehyd für 24 Stunden bei 4°C fixiert. Im Institut für Pathologie der Uniklinik Mainz wurden die Organe mittels Einbettautomaten gespült, dehydriert und in Paraffin eingebettet. Von den Paraffinblöcken wurden am Schlittenmikrotom 4 µm Schnitte angefertigt.

Kryostatschnitte:

Um an einem Kryostaten von den Organen Schnitte herzustellen, wurden diese in einer 4 x 4 cm Plastikschale luftblasenfrei mit TissueTek<sup>®</sup>O.C.T. umhüllt und im flüssigen Stickstoff tiefgefroren. Mittels Kryostat wurden dann Schnitte auf SuperFrost<sup>®</sup>Plus Objektträger aufgebracht, bei Raumtemperatur 30 min getrocknet und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.5.2 Immunfärbungen

Für die Quantifizierung von Antigenen in Schnittpräparaten wurde der in situ Nachweis basierend auf der ABC-Methode (Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex) (Hsu *et al.*, 1981) durchgeführt. Bei dieser Methode werden zuerst alle endogenen Peroxidasen und dann alles endogene Biotin, die Biotin-Rezeptoren und Avidin-Bindungsstellen im Gewebe blockiert. Nach einer Antigen-Antikörper-Reaktion wird ein sekundärer Biotin-markierter Antikörper gegen den ersten Antikörper eingesetzt. Darauf folgend wird mit einem Avidin-Biotin-Peroxidase Komplex inkubiert, der eine Art Gitterkomplex zwischen den Avidin und den Biotin-Peroxidase-markierten Molekülen bildet. Die Bindung dieses Peroxidase-Gitterkomplexes an die Biotingruppen des sekundären Antikörpers katalysiert lokal die Oxidation des Substrates 3'3'-Diaminobenzidin (DAB), die zu einer hohen Farbintensität (braun) führt.

Für die Färbung wurden Paraffin-Schnitte entparaffiniert bzw. die Kryoschnitte aufgetaut und fixiert. Nach dem Blocken mit Methanol wurden die Schnitte für fünf Minuten in Wasch-Puffer (0,1 % BSA in PBS) gewaschen, anschließend die endogenen Peroxidasen bei Kryoschnitten für 30 min in Methanol, mit 0,6 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (je nach Färbung mit

Natriumazid), und bei Paraffinschnitten für 15 min in Methanol, mit 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, geblockt. Die Schnitte wurden erneut gewaschen, mit 100 µl Avidin-Blockierlösung 20 min inkubiert, für fünf Minuten gewaschen und dann mit 100 µl Biotin-Blockierlösung 20 min inkubiert. Bevor es zum Blocken von unspezifischen Bindungsstellen (30 min) kam, wurden die Schnitte gewaschen, um danach mit dem ersten Antikörper bei 4°C für 16 Stunden inkubiert zu werden. Darauf folgend wurden die Schnitte für fünf Minuten gewaschen, mit dem sekundären, biotinylierten Antikörper für eine Stunde inkubiert und erneut gewaschen. Anschließend wurde für eine Stunde mit dem ABC-Komplex bei Raumtemperatur inkubiert und die Schnitte gewaschen. Zum Schluss wurde die DAB-Lösung für die Farbreaktion hinzugegeben. Die Intensität der Reaktion wurde unter dem Mikroskop verfolgt, abgestoppt und die Zellkerne mit Meyers Hämalaun 3 gefärbt. Für die Analyse und weitere Lagerung wurden die Schnitte dehydriert und eingedeckelt.

### **2.5.3 Elastika van Gieson Färbung**

Die Elastika van Gieson Färbung wurde von der Pathologie der Universität Mainz mit dem Pico Sirius Red Kit nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Es wurden Paraffinschnitte (4 µm) nach der Rehydrierung mit Picro Sirius Red Solution für eine Stunde inkubiert und anschließend zwei Mal mit angesäuertem Wasser gewaschen, dehydriert und eingedeckelt. In der Färbung stellt sich Kollagen Rot und Muskelgewebe sowie das Zytoplasma Gelb dar. Die Mikroskopaufnahmen wurden mit Hilfe der Adobe Photoshop CS4 Software von Dr. Julia Weinmann-Menke ausgewertet. Hierfür wurden 10 Hauptgesichtsfelder (hpf) eingestellt und mit Hilfe der CS4 Software die Intensität der Rotfärbung prozentual ermittelt.

### **2.5.4 Periodic acid-Schiff Reaktion (PAS)**

Für die histopathologische Analyse der Organe wurde eine Färbung mittels der periodic acid-Schiff Reaktion (PAS) durchgeführt. Bei dieser Technik kommt es zum Anfärben von Glykolgruppen, indem diese durch die Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert werden. Diese Aldehydgruppen reagieren mit dem farblosen Schiff-Reagenz zu einem Magenta-roten Produkt. Glykolgruppen findet man in Glykogen, Mucopolysacchariden, Glykoproteinen und -lipiden, die somit Bindegewebsfasern, Zellwände und Basalmembranen durch die Färbung sichtbar machen. Die Zellkerne können mittels Hämatoxylin gegen gefärbt werden. In dieser Arbeit wurden die PAS-Färbungen durch das Institut für Pathologie der Uniklinik Mainz mittels Färbeautomaten durchgeführt.

Die mit der PAS-Reaktion angefärbten Schnitte wurden für die Beurteilung der Schwere einer Glomerulonephritis genutzt. So können Veränderungen im Gewebe wie z.B. die

Verdickung der Basalmembran, Nekrosen, Sklerosen oder die Bildung von Crescents analysiert sowie Veränderungen im Tubulussystem erkannt werden.

Die glomeruläre Pathologie wurde für jede Niere anhand von 20 Glomeruli-Querschnitten (gcs) evaluiert. Dabei wurde jeder Glomerulus semiquantitativ nach Tabelle 2.24 bewertet.

*Tabelle 2.24: Evaluation der glomerulären Pathologie*

Bewertung	Kriterien
0 Normal	35 - 40 Zellen/gcs, keine periglomerulären Infiltrationen
1 Mild	Glomerulus mit wenigen Läsionen; leichte Proliferationsänderungen; milde Hyperzellularität 41 - 45 Zellen/gcs
2 Moderat	Glomerulus weist moderater Hyperzellularität (50-60 Zellen/ gcs) mit diffuser und/oder segmentären proliferativen Veränderungen auf, Hyalinosis, periglomeruläre Infiltrate 5 - 10 Zellschichten
3 Schwer	Glomerulus mit globaler oder segmentärer Sklerose und/oder schwerer Hyperzellularität (> 60 Zellen/gcs), Nekrosen, Crescents, periglomeruläre Infiltrate > 10 Zellschichten

Die interstitielle bzw. tubuläre Pathologie wurde anhand von 10 Hochleistungsfeldern, die nach dem Zufallsprinzip ausgewählt wurden, semiquantitativ auf einer Skala von 0 (normal) - 3 (schwer) bewertet. Zuerst wurden für die Adjustierung des Bewertungssystems das Größte Infiltrate und die durchschnittliche Anzahl der Infiltrate und beschädigten Tubuli ermittelt. Anhand der Anzahl von Zellschichten, die die Gefäßwände umschlossen, wurde die perivaskuläre Zellakkumulation semiquantitativ bestimmt. Dabei beinhaltet die Bewertung 0 = keine, 1 = weniger als fünf Zellschichten, 2 = fünf bis zehn Zellschichten und 3 = mehr als zehn Zellschichten. Die Auswertung erfolgte durch Dr. Julia Weinmann-Menke.

### **2.5.5 Immunfluoreszenzfärbung: Ablagerung von IgG und C3**

Für die Beurteilung von IgG- und C3-Ablagerungen in den Glomeruli der Niere wurden 4 µm Schnitte mittels Kryostat von in TissueTek<sup>®</sup>O.C.T eingebetteten Gewebe angefertigt und auf Objektträger aufgebracht. Per Titration wurde Fluorescein-conjugated Ziege anti-Maus IgG (1/3000 und 1/4500) oder C3 (1/6000 und 1/7500) in je zwei Verdünnungen auf die Schnitte gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Intensität der Fluoreszenz innerhalb der peripheren glomerulären Kapillarwände und dem Mesangium mit einem Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Häufigkeit und Schwere der Ablagerungen wurde anhand einer Skala (Ablagerung: 0 = keine, 1 = leichte, 2 = moderate; 3 = starke) an 20 Glomeruli pro Niere bewertet. Die Auswertung wurde in Kooperation mit Dr. Julia Weinmann-Menke durchgeführt.

## 2.5.6 Durchflusszytometrische Analysen

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie bzw. dem *fluorescens-activated-cell-sorting* (FACS) ist es möglich Zellen nach ihrer Größe, Struktur, Oberflächeneigenschaften sowie nach ihrer intrazellulären Zusammensetzung quantitativ zu bestimmen und zu analysieren (Darzynkiewicz, 1990). Für die spätere Messung werden, basierend auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion, die Zellen der zu untersuchenden Zellsuspension mit fluoreszenzgekoppelten-Antikörpern markiert. Diese markierten Zellen der Zellsuspension werden dann einzeln durch eine Kapillare gesaugt. Dabei passieren sie eine Durchflusszelle. Dort werden sie mit einem gebündelten Laserstrahl erfasst, welches die gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe absorbieren und Fluoreszenzlicht einer höheren Wellenlänge emittieren. Ein komplexes Spiegel-Filter-System bündelt und zerlegt die emittierten Strahlen der Fluorophore wieder. Somit kann bei geeigneter Kombination der einzelnen markierten Antikörper in einem Suspensionsansatz verschiedene Fluorophore und damit Subpopulationen der Zellsuspension unterschieden werden.

Eine Aussage über die Größe und Granularität wird mittels Streulicht getroffen und ist somit unabhängig vom Farbstoff. Dabei können zwei Arten von Streulicht detektiert werden. Zum einen das Vorwärtsstreulicht oder „*Forwardscatter*“, mit dem das Volumen der Zelle durch die Beugung des Lichts im flachen Winkel ermittelt werden kann. Das zweite Streulicht wird seitlich in einem Winkel von 90° detektiert. Es wird daher als Seitwärtsstreulicht oder „*Sidescatter*“ bezeichnet. Die Brechung des Lichts im rechten Winkel hängt von der Granularität der Zelle ab (Tabelle 2.25).

Tabelle 2.25: Charakterisierung der Zellen

Zelltyp	Beschreibung
Granulozyten	großes Volumen, hohe Plasma/Kern-Relation, Granula
Lymphozyten	geringes Volumen, hoher Kernanteil
Monozyten	intermediäres Verhalten

In dieser Arbeit wurden Einzelzellsuspensionen aus Organen hergestellt. Hierfür wurden die jeweiligen Gewebeteile in einen 70 µm Netz-Beutel gegeben, in 10 ml PBS getaucht und mit einem 1 ml Spritzenkolben die Zellen des Organs durch die Netzmaschen in das PBS gedrückt. Anschließend wurde die Suspension bei 1500 Upm für fünf Minuten zentrifugiert und die Erythrozyten im Pellet mit ACK-Puffer (Kapitel 2.1.4) 10 min lysiert. Anschließend wurden die verbleibenden Zellen zuerst mit 15 ml PBS zweifach dann mit 5 ml FACS-Puffer (Kapitel 2.1.4) einfach gewaschen. Danach wurden die Zellen in je 2 ml FACS-Puffer aufgenommen und bei 1500 Upm zentrifugiert. Diesem letzten Waschschrift folgend wurden die Zellen in 50 µl FACS-Färbepuffer (Kapitel 2.1.4) aufgenommen, in eine 96-Lochplatte mit Rundboden transferiert und mit Antikörpern, die extrazelluläre

Epitope erkennen, im Dunkeln für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 Upm für drei Minuten abzentrifugiert, mit FACS-Färbepuffer gewaschen, erneut abzentrifugiert und für die intrazelluläre Färbung im Fix/Perm-Puffer aufgenommen. Dieser Puffer ermöglicht zum einen die Fixierung der lebenden Zellen durch Quervernetzung von Proteinen, zum zweiten wird die Membran der Zelle permeabel, damit die Antikörper, die intrazelluläre Epitope erkennen, in die Zelle gelangen können. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen bei 3000 Upm für drei Minuten abzentrifugiert, mit Saponin-Puffer (Kapitel 2.1.4) gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 50  $\mu$ l Saponin-Puffer aufgenommen und mit den Antikörpern, die intrazelluläre Epitope erkennen, auf Eis für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert (3 min bei 300 Upm) und zweimal mit 200  $\mu$ l Saponin-Puffer gewaschen. Um die Poren wieder in der Zellmembran zu schließen, wurde zweimalig mit FACS-Puffer gewaschen. Zum Schluss wurden die Zellen in 100  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und in ein FACS-Gefäß, in dem 250  $\mu$ l FACS-Puffer vorgelegt waren, überführt. In den Analysen wurden  $0,5 \times 10^6$  bis  $1,0 \times 10^6$  Zellen im FACSCalibur (Kapitel 2.1.1) bestimmt und mit der Software Flowjo (Kapitel 2.1.2) durch Dr. Julia Weinmann-Menke ausgewertet.

Die Färbungen von IL-17 und FoxP3 (*Forkhead-Box-Protein P3*) wurden mit dem *TH17/Treg Phenotyping Kit* von BD Pharmingen™ (Kapitel 2.1.8) nach Herstellerangaben durchgeführt.

## 2.6 Mausmodelle und Tierexperimente

Für die verschiedenen Experimente wurden Mäuse aus Inzuchtstämmen in der zentralen Tierversuchsanlage der Johannes Gutenberg-Universität sowie im Tierstall der ersten medizinischen Abteilung der Universität Mainz gezüchtet. Alle Mausstämme wurden in Typ 2 Käfigen pathogenfrei bei 20 - 24°C Raumtemperatur gehalten. Futter und Wasser wurden ad libitum dargereicht. Der Licht-Dunkel-Rhythmus umfasste je 12 Stunden Helligkeitsphase bzw. Dunkelphase. Die Mausstämme, die für die Experimente verwendet wurden, können dem Kapitel 2.1.18 entnommen werden.

### 2.6.1 Typisierung von Mäusen

#### 2.6.1.1 HLA-DR4.AE° Mausstamm

Für das Gewinnen einer Gewebeprobe wurde die Maus mit Isofluran narkotisiert. Das Gewebestück für die DNA-Isolation wurde aus der Schwanzspitze gewonnen (Kapitel 2.3.2). Für die Typisierungs-PCR (Tabelle 2.27) wurden 400 µg DNA eingesetzt. Der PCR-Ansatz (Tabelle 2.26) und die Reaktionsbedingungen (Tabelle 2.27) war wie folgt:

*Tabelle 2.26: Reaktionsansatz für die HLA-DR4.AE° Typisierungs-PCR*

Volumen pro Probe	Komponenten
14,25 µl	Wasser
2,5 µl	Puffer S (10x) (PeqLab)
2,0 µl	MgCl 25 mM (PeqLab)
0,75 µl	dNTP (10 mM)
1,5 µl	DR4 Kim 5' (10 pmol/µl)
1,5 µl	DR4 Kim 3' (10 pmol/µl)
0,5 µl	Taq
2,0 µl	DNA

*Tabelle 2.27: Reaktionsbedingungen im MyCycler für HLA-DR4.AE° Typisierung*

Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl	Schritt
5 min	94°C	1 Zyklus	Aktivierungsschritt
1 min	94°C		Denaturierung
1 min	67°C	35 Zyklen	Annealing
1 min	72°C		Extension
7 min	72°C	1 Zyklus	Inaktivierungsschritt
∞	8°C		Kühlung

Die PCR- Produktlänge der positiven Mäuse betrug 215 bp.



### 2.6.1.2 MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mausstamm

Für die Typisierung der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse wurde die DNA aus Ohrstanzen von der Markierung der Mäuse verwendet (Kapitel 2.3.2). Für die Typisierungs-PCR (Tabelle 2.29) wurden 2,5 µl DNA-Lösung eingesetzt.

Mit Hilfe der von Arbeitsgruppe Schwarting (I. medizinische Abteilung der Uniklinik Mainz) etablierten Multiplex PCR konnte zwischen Wildtyp- und Knock-out-Mäusen sowie heterozygoten Mäusen unterschieden werden. Der genaue Reaktionsansatz kann der Tabelle 2.28 und die Reaktionsbedingungen der Tabelle 2.29 entnommen werden.

Tabelle 2.28: Reaktionsansatz für die MRL *Fas<sup>lpr</sup>*-Typisierungs-PCR

Volumen pro Probe	Komponenten
12 µl	Red Taq Ready Mix
1,25 µl	F1-fas Primer
1,25 µl	R1-Fas/Etn-Primer
1,25 µl	R2-Fas
2,5 µl	DNA
6,75 µl	Wasser

Tabelle 2.29: Reaktionsbedingungen im MyCycler für die MRL *Fas<sup>lpr</sup>*-Typisierung

Dauer	Temperatur	Zyklenanzahl	Schritt
4 min	95°C	1 Zyklus	Aktivierungsschritt
1 min	94°C		Denaturierung
1:30 min	60°C	35 Zyklen	Annealing
2 min	72°C		Extension
10 min	72°C	1 Zyklus	Inaktivierungsschritt
∞	10°C		Kühlung

Wurden die Proben auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt, zeigte der Wildtyp (MRL +/+) ein 184 bp Produkt (F1-R1). Die Knock-out Mäuse (MRL *lpr/lpr*) hingegen eine Bande bei 212 bp (F1-R2). Dem entsprechend hatten die heterozygoten Mäuse (MRL *lpr/+*) je eine Bande bei 184 bp und 212 bp.

### 2.6.2 Induktion einer Arthritis bei HLA-DR4.AE° Mäusen

Für die Induktion der Kollagen-Induzierten Arthritis (CIA) bei HLA-DR4.AE° Mäusen wurden unterschiedliche Protokolle getestet. Grundsätzlich wurde dabei die CII-Emulsion aus gleichen Teilen einer wässrigen CII-Lösung (4 mg/ml in 0,01 M Essigsäure, 1:1 mit 1x PBS verdünnt) und kompletter Freud'schen Adjuvanz (CFA) hergestellt. Mit Hilfe des Ultra Turrax wurden, unter ständiger Kühlung auf Eis, die beiden Lösungen miteinander

vermischt. Zu jeder initialen Immunisierung wurden zusätzliche Injektionen (Boost) verabreicht. Der Tabelle 2.30 kann entnommen werden in welchen Abständen, in welcher Konzentration und Form die Substanzen appliziert wurden.

Tabelle 2.30: Aufbau der Versuche zur Induktion einer Arthritis

	Tag	Konzentration Lösung	Verabreichte Lösung pro Maus	Applikation
<b>Versuch A</b>				
Immunisierung	1	1 mg/ml CII (c)	200 µg	i.d. 100 µl SB und je 50 µl HO
1. Boost	10	0,5 mg/ml CII (c)	100 µg	i.d. 200 µl SB
2. Boost	20	0,5 mg/ml CII (c)	100 µg	i.d. 200 µl SB
<b>Versuch B</b>				
Immunisierung	1	1 mg/ml CII (c)	200 µg	i.d. 100 µl SB und je 50 µl HO
1. Boost	7	0,5 mg/ml CII (c)	100 µg	i.d. 200 µl SB
2. Boost	17	0,5 mg/ml CII (c)	100 µg	i.d. 200 µl SB
3. Boost	27	0,5 mg/ml CII (c)	100 µg	i.d. 200 µl SB
<b>Versuch C</b>				
Immunisierung	1	2 mg/ml CII (c)	400 µg	i.d. 100 µl SB und je 50 µl HO
1. Boost	7	1 mg/ml CII (c)	200 µg	i.d. 200 µl SB
2. Boost	14	1 mg/ml CII (c)	200 µg	i.d. 200 µl SB
<b>Versuch D</b>				
Immunisierung	1	1 mg/ml CII (c)	50 µg	i.d. 50 µl S
1. Boost	7	0,5 mg/ml CII (c)	25 µg	i.d. 50 µl S
2. Boost	14	0,5 mg/ml CII (c)	25 µg	i.d. 50 µl S
<b>Versuch E</b>				
Immunisierung	1	1 mg/ml CII (c)	200 µg	i.d. 100 µl SB und je 50 µl HO
LPS-Boost	3		0,8 mg/g KG	i.p.
1. Boost	11	0,5 mg/ml CII (c)	100 µg	i.d. 200 µl SB
LPS-Boost	13		0,8 mg/g KG	i.p.
2. Boost	21	0,5 mg/ml CII (c)	100 µg	i.d. 200 µl SB
LPS-Boost	23		0,8 mg/g KG	i.p.
<b>Versuch F</b>				
Immunisierung	1	1 mg/ml CII (p)	200 µg	i.d. 100 µl SB und je 50 µl HO
1. Boost	10	0,5 mg/ml CII (p)	100 µg	i.d. 200 µl SB
2. Boost	20	0,5 mg/ml CII (p)	100 µg	i.d. 200 µl SB

Abk: c = Kollagen Typ II aus Hühnern gewonnen; HO = Haut hinter Ohrmuschel; i.d.= intradermal; i.p. = intraperitoneal; KG = Körpergewicht; p = Kollagen Typ II aus Schweinen gewonnen; S = Schwanz; SB = Schwanzbasis

### 2.6.3 Bestimmung des Arthritisindex

Parallel zur Behandlung mit CII, für die Induktion einer CIA, und darüber hinaus wurden die HLA-DR4.AE° Mäuse aus den CIA Versuchen auf sichtbare Veränderungen der Pfoten untersucht. Dabei wurden für jede Pfote erkennbare Schwellungen im Bereich der Knöchel und Gelenke, nach dem in Tabelle 2.31 aufgeführten Schlüssel, analysiert und für das Tier als Summe addiert. Somit liegt der maximal zu erreichende Arthritisindex für jedes Tier bei 16.

Tabelle 2.31: Bestimmung des Arthritisindexes

Index	Merkmale
0	keine Schwellung der Gelenke
1	Schwellung an einem Interphalangeal-Gelenk
2	Schwellung an 2 - 3 Interphalangeal-Gelenken
3	Schwellung des Knöchelbereichs und des Metatarsus/-carpus
4	Extensive Schwellung der gesamten Pfote, eingeschränkte Beweglichkeit

### 2.6.4 Oxacyclododecindion-Behandlung von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen

Im Alter von zwei bis zweieinhalb Monaten erfolgte die therapeutische Behandlung der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen. Vor der Behandlung wurde überprüft, ob die Mäuse bereits Krankheitssymptome wie geschwollene Lymphknoten oder eine Proteinurie zeigten. Jeden zweiten Tag wurden die Tiere aus den jeweiligen Versuchsgruppen mit Oxacyclododecindion, Dexamethason (Dex) oder dem Lösungsmittel für zwei beziehungsweise fünf Wochen behandelt.

### 2.6.5 Proteinmessung im Urin

Bei den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen wurde während der Behandlungsperiode jeden zweiten Morgen zur gleichen Uhrzeit Urin genommen. Von der Urinprobe jeder Maus wurde semi-quantitativ der Proteingehalt mit Albumin-Teststreifen (Multistix<sup>®</sup>10SG; Siemens) nach Herstellerangaben gemessen.

### 2.6.6 Isolation von Makrophagen

In der Peritonealflüssigkeit sowie in der Membran des Peritonealraumes befindet sich eine Vielzahl von Immunzellen. Die große Anzahl von naiven Makrophagen, die im Gewebe des Peritonealraumes angesiedelt sind, macht eine Isolation der Gleichen sehr lohnenswert. So können mittels einer Peritoneallavage aus einer unbehandelten Maus im Verhältnis ca.

30 % Makrophagen sowie 50-60 % B-Zellen und 5-10 % T-Zellen, ausgehend von allen lebenden Zellen, isoliert werden.

Für die Peritoneallavage erhielt die Maus eine überdosierte Isofluran-Inhalationsnarkose. Per zervikaler Dislokation wurde sie anschließend getötet und auf einen Präparationsblock rücklinks fixiert, um den Bauch mit 70 % Ethanol zu reinigen. Im nächsten Schritt wurde, die Außenhaut von der Bauchseite abgelöst, um die Innenhaut des Peritoneums freizulegen. Dann wurde mit einer 27xG Nadel 5 ml eiskaltes PBS (mit 3 % FCS) langsam in die Bauchhöhle injiziert. Dabei wurde darauf geachtet, dass weder Gefäße noch Organe punktiert wurden. Nach der Injektion wurde der Bauch vorsichtig massiert, um auch die Zellen, die sich an der Membran angesiedelt hatten, in der PBS/3 % FCS-Lösung zu lösen. Anschließend wurde mit einer 25xG Nadel die Flüssigkeit mit den Zellen aus dem Peritonealraum wieder in eine Spritze aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in ein auf Eis gekühltes Reaktionsgefäß überführt. Um die restliche Flüssigkeit aus dem Bauchraum mit Hilfe einer Pasteur-Pipette zu sammeln, wurde ein kleiner Einschnitt in die Innenhaut des Peritoneums getätigt.

Die gewonnene Zellsuspension wurde für acht Minuten bei 210 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in DMEM-Medium mit 3 % FCS (Tabelle 2.1) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen gezählt und auf die entsprechenden Zellkulturschalen ausgesät.

Um die Makrophagen aus der Zellsuspension zu isolieren, wurden die Zellkulturschalen für drei Stunden bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre in Brutschränken kultiviert. In dieser Zeit adhäreren die Makrophagen am Boden der Zellkulturschale, die B- und T- Zellen verbleiben in der Suspension. Wechselt man nach der Inkubation das Medium (DMEM-Medium mit 3 % FCS) befindet sich in der Zellkulturschale eine fast reine Makrophagenpopulation.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Induktion der CIA bei HLA-DR4.AE° Mäusen

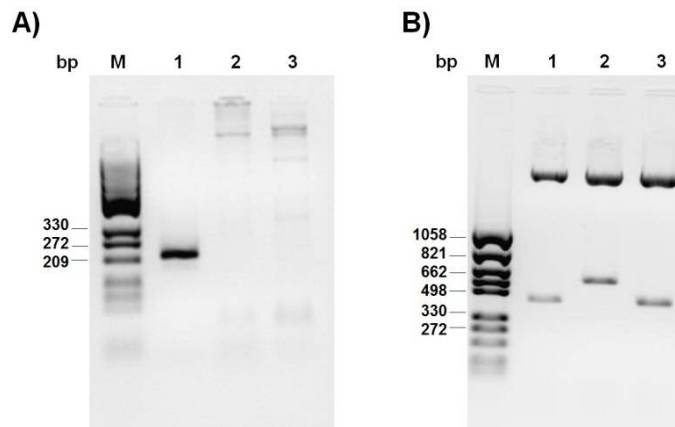
Die Wirksamkeit von Naturstoffen auf die proinflammatorische Genexpression sollte *in-vivo* an HLA-DR4.AE° Mäusen im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) untersucht werden (Kapitel 1.2.3).

Bedingt durch den genetischen Hintergrund der HLA-DR4.AE° Mäuse, war es vor der Induktion einer CIA notwendig die Tiere zu identifizieren, die das humane DRB1 Allel trugen. Daher wurde für die Charakterisierung der Tiere, wie im Kapitel 2.6.1.1 dargestellt, DNA isoliert und durch eine Typisierungs-PCR die transgenen Tiere ermittelt. Eigens für die PCR wurde eine Positivkontrolle mittels Klonierung (Kapitel 2.3.13) hergestellt, um den Nachweis des DRB1 Allels in der PCR bei der Typisierung der Tiere sicher zu stellen. Die eigentlichen CIA Versuche (Kapitel 2.6.2) wurden ausschließlich mit den Mäusen durchgeführt, bei denen das DRB1 Allel nachgewiesen wurde.

#### 3.1.1 Generierung einer Positivkontrolle für die Typisierung der HLA-DR4.AE° Mäuse

Zur Etablierung einer Positivkontrolle für die Typisierung der HLA-DR4.AE° Mäuse wurde aus humaner cDNA, die von einem Spender stammte, der Träger des DRB1 Allels ist, ein PCR-Produkt aus der Sequenz des Allels amplifiziert und in den Vektor pCRScript kloniert. Bei dem PCR-Produkt handelte es sich um genau das Fragment des DRB1 Allels, welches als Nachweis in der Typisierungs-PCR vervielfältigt wurde.

Hierfür wurde das Produkt der PCR (Tabelle 2.27) über ein präparatives Agarosegel (Kapitel 2.3.6) aufgetrennt (Abbildung 3.1 A, Spur 1). Mit dem *peqGOLD Gel Extraction Kit* wurde die DNA isoliert (Kapitel 2.3.13.6) und an das 5'-Ende des 237 bp langen Fragmentes Phosphatreste angehängt (Kapitel 2.3.13.3). Der Vektor pCRScript wurde mit *EcoRV* linearisiert (Kapitel 2.3.13.1) und, wie das Fragment, vor der Ligation (Kapitel 2.3.13.7) mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt (Kapitel 2.3.13.2). Die Überprüfung des neuen Plasmids pCRScriptDRB1 erfolgte nach der Transformation mit dem Restriktionsenzym *PvuII* (Abbildung 3.1 B). Ein positiver Klon zeigte nach dem enzymatischen Verdau ein 683 bp großes Produkt (Abbildung 3.1 B, Spur 2). Wohingegen ein Fragment des Klons, der nicht die Sequenz des Allels DRB1 enthielt, lediglich eine Größe von 446 bp aufwies (Abbildung 3.1 B, Spur 1 und 3).

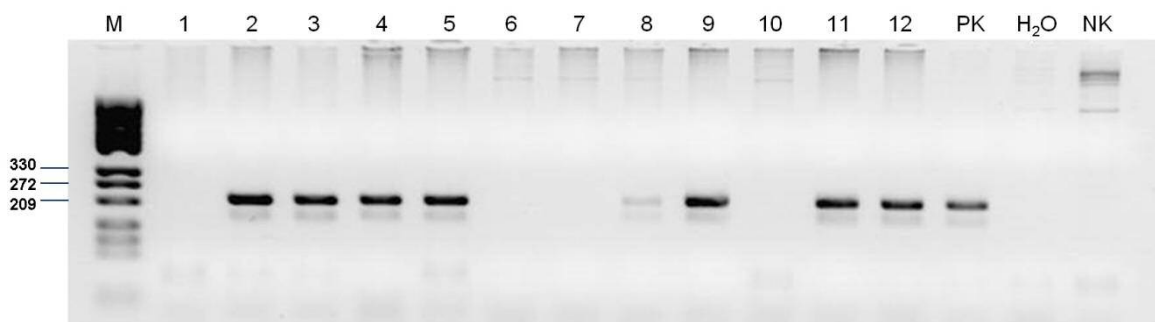


**Abbildung 3.1:** Klonierung der Positivkontrolle *pcRScriptDRB1*: Auftrennung des PCR Produktes und des Kontrollschnitts auf einem 2 %igen Agarosegel

A) Dargestellt ist das 237 bp große Amplifikationsprodukt vom DRB1 Allel (1), eine Negativkontrolle (2) aus einem Spender, der nicht Träger des DRB1 Allels ist, sowie einer Wasserkontrolle (3). B) Kontrolle des enzymatischen Verdaues mit PvuII zur Identifizierung positiver *pcRScriptDRB1* Klone (683 bp). Klon 1 und 3 konnten entsprechend ihrer Auftrennung als Klon ohne DRB1 Fragment bestimmt werden (446 bp). Klon 2 hingegen konnte aufgrund der Größe von 683 bp als *pcRScriptDRB1* Klon identifiziert werden, (M = Marker; bp = Basenpaare).

### 3.1.2 Typisierung der HLA-DR4.AE° Mäuse

Die Typisierung der HLA-DR4.AE° Mäuse erfolgte gemäß Kapitel 2.6.1.1 mit genomischer DNA, die aus den Schwanzspitzen der Tiere isoliert wurde. Der Verlauf der PCR und die Größe des zu erwartenden PCR Produktes wurden anhand der Positivkontrolle überprüft. Hierfür wurde in die PCR-Reaktion das eigens generierte Plasmid *pcRScriptDRB1* eingesetzt (Kapitel 3.1.1). In Abbildung 3.2 ist exemplarisch eine Typisierungs-PCR dargestellt. War eine Maus Träger des Allels DRB1 konnten die Primer beim Hybridisieren als Startpunkt der Synthese an diese DNA-Sequenz binden und ein 215 bp langes Produkt konnte amplifiziert werden, das sich dementsprechend in einer elektrophoretischen Auftrennung darstellte (Abbildung 3.2).



**Abbildung 3.2:** Exemplarische Darstellung einer Typisierung von HLA-DR4.AE° Mäusen

Nach der Typisierungs-PCR wurden die Produkte mit 3 µl DNA-Probenpuffer versetzt, auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. In den Proben 1, 6, 7 sowie 10 konnte das 215 bp lange Fragment des DRB1 Allels nicht nachgewiesen werden. Das PCR Fragment ist mit dem Produkt des Plasmids *pcRScriptDRB1* (PK) identisch. Negativkontrolle (NK) sowie Wasserkontrolle (H<sub>2</sub>O) waren negativ, (M = Marker).

Um potentielle Verschleppungen und Kontaminationen im Reaktionsansatz auszuschließen wurde, statt einer zu analysierenden Probe, Wasser in einem der Reaktionsansätze mitgeführt (H<sub>2</sub>O Kontrolle) und als Negativkontrolle (NK) in einem weiteren Ansatz die DNA einer Maus eines anderen Stammes eingesetzt, die nicht Träger des humanen DRB1 Allels war (Abbildung 3.2).

### 3.1.3 Etablierung einer CIA in HLA-DR4.AE° Mäusen

Ausnahmslos sind nur die HLA-DR4.AE° Mäuse für die Induktion einer CIA verwendet worden, die positiv als Träger des Allels DRB1 in der Typisierung-PCR identifiziert wurden. Um die geschlechtsspezifische Entwicklung der CIA bei den HLA-DR4.AE° Mäusen zu vergleichen, wurden gleichermaßen Behandlungsgruppen für Weibchen und Männchen erstellt. In allen Experimenten (Kapitel 2.6.2) wurde darauf geachtet, dass die Versuchsgruppen ein vergleichbares Alter besaßen. Für die Etablierung der CIA im Stamm der HLA-DR4.AE° Mäuse wurden verschiedene Protokolle in Anlehnung an den Versuchsaufbau von Taneja *et al.* (2007) getestet.

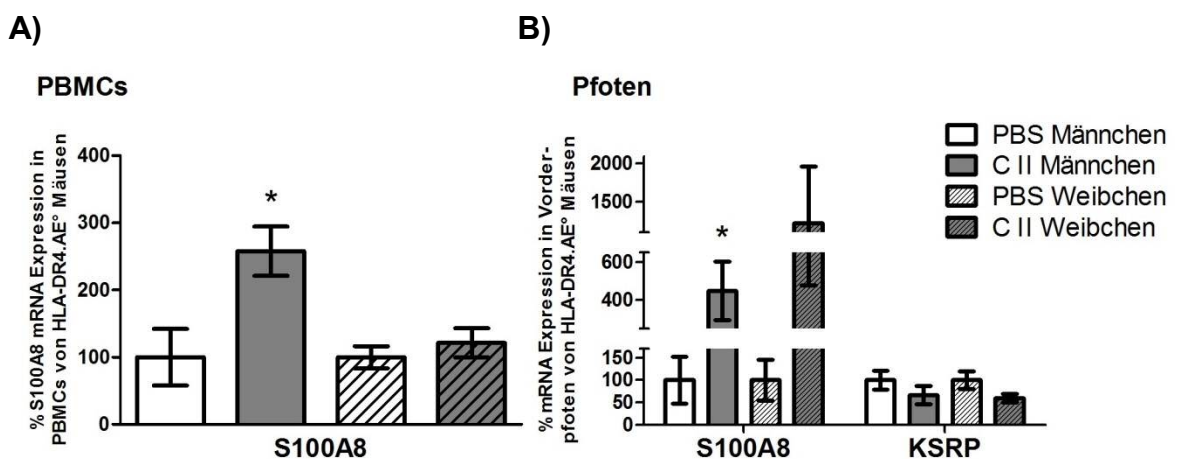
Für die Induktion einer CIA wurde im Versuch A eine Gruppe der HLA-DR4.AE° Mäuse hinter die Ohren und an der Schwanzbasis intradermal mit 200 µg CII-Emulsion in CFA (Kapitel 2.6.2) immunisiert und der Kontrollgruppe das Lösungsmittel PBS hinter die Ohren und an der Schwanzbasis intradermal verabreicht. 10 und 20 Tage nach der initialen Immunisierung erhielten die Mäuse der CII-Gruppe eine weitere Injektion (Boost) mit 100 µg CII-Emulsion in CFA an der Schwanzbasis während die Kontrollgruppe erneut das Lösungsmittel gespritzt bekam. Ab diesem Zeitpunkt wurden die Mäuse für acht Wochen beobachtet, um die Entwicklung klinischer Symptome einer Arthritis zu dokumentieren. Im Zuge dessen wurde jeden zweiten Tag der Arthritisindex (Kapitel 2.6.3) bestimmt.

Innerhalb der acht Wochen konnten in der Versuchsdurchführung A keine Symptome, wie geschwollene Fingerglieder oder Gelenke, bei den CII-behandelten Mäusen beobachtet werden (Arthritisindex = 0). Zur Überprüfung, ob sich im Organismus von CII-behandelten Tieren eine Entzündungsreaktion entwickelte, wurde die Expression von Genen untersucht, die mit der rheumatoider Arthritis und CIA assoziiert sind. Hierfür wurden vier Wochen nach der initialen Immunisierung je fünf Mäuse pro Geschlecht und Behandlungsgruppe getötet und die Expression zweier krankheitsassoziierter Gene untersucht. Der Analysezeitpunkt wurde gewählt, da bereits in anderen CIA Versuchen deutliche mRNA Expressionsunterschiede der untersuchten Gene in CII-behandelten Tieren detektiert werden konnten (Schmidt, 2009). Die RNA wurde aus den Pfoten und den mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) isoliert (Kapitel 2.3.1), in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.3.7) und qRT-PCR-Analysen (Kapitel 2.3.9) durchgeführt. Untersucht wurde die Expression des proinflammatorischen Gens

*Calgranulin-A* (S100A8) sowie des *KH-Type-Splicing Regulatory Protein* (KSRP), ein Gen welches in inflammatorischen Prozessen der CIA reguliert wird (Art, 2012; Schmidt, 2009).

Die Abbildung 3.3 zeigt die mRNA Expression von S100A8 und KSRP in den PBMCs (A) und Pfoten (B) in Weibchen und Männchen von CII-behandelten Tieren im Vergleich zur jeweiligen, mit PBS-behandelten Kontrollgruppe. Die Analyse der Mäuse zeigte eine signifikante Erhöhung der S100A8 mRNA Expression bei den CII-behandelten Männchen, jedoch nicht bei den Weibchen. In den PBMCs war die Expression von S100A8 in CII-behandelten männlichen Mäusen 2,5-fach höher als bei den männlichen Kontrolltieren (Abbildung 3.3 A). Ein stärkerer Effekt, auf S100A8 unter CII-Behandlung, konnte in den Pfoten nachgewiesen werden (Abbildung 3.3 B). Hier wurde die Expression bei den Männchen unter CII um den Faktor vier erhöht. Eine tendenziell erhöhte Expression von S100A8 unter CII konnte auch in den Pfoten der Weibchen detektiert werden. Eine Regulation von KSRP auf mRNA Ebene konnte unter CII-Behandlung weder bei den Männchen noch bei den Weibchen in den vorderen Pfoten nachgewiesen werden.

Die geringfügige Induktion der Entzündungsmarker und das Fehlen von geschwollenen Pfoten spricht dafür, dass durch die Immunisierung mit CII im Versuchsschema A keine Arthritis im Zuge einer chronischen Entzündung ausgelöst wurde.



**Abbildung 3.3:** Analyse der mRNA Expression von S100A8 und KSRP in PBMCs und vorderen Pfoten im Versuchsschema A der CIA in HLA-DR4.AE° Mäusen

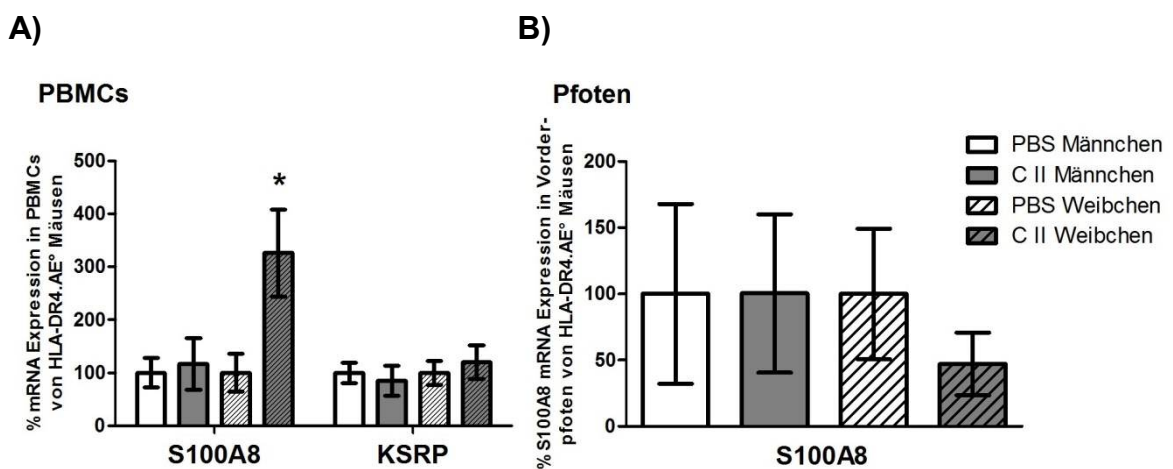
HLA-DR4.AE° Mäuse wurden mit 200 µg Hühner Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) immunisiert. Weitere Injektionen mit jeweils 100 µg CII in CFA folgten an Tag 10 und 20 nach der initialen Immunisierung. Die Kontrollgruppe erhielt nach selbigem Schema das Lösungsmittel PBS. Die Tiere wurden am Tag 33 getötet, die RNA aus PBMCs (A) und den vorderen Pfoten (B) isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängig durchgeführten qRT-PCR-Analysen mit mRNA isoliert aus PBMCs und den vorderen Pfoten der HLA-DR4.AE° Mäuse (n = 3-5 pro Gruppe) aus dem CIA Versuch nach dem Schema A. Die Mittelwerte mit ± SEM der relativen mRNA Expression von CII-immunisierten Mäusen wurden auf die relative mRNA Menge in PBS-behandelten Kontrolltieren bezogen, (\*: p<0,05).



Um die Ausbildung inflammatorischer Prozesse zu unterstützen, wurde das Protokoll A modifiziert. Das Versuchsschema B (Kapitel 2.6.2) beinhaltete nun einen weiteren Boost in die Schwanzbasis, zusätzlich wurden die Abstände der CII-Gabe verkürzt.

Somit erfolgte nach einer anfänglichen Immunisierung mit 200 µg CII-Emulsion in CFA am Tag 7, 17 und 27 ein Boost mit 100 µg CII-Emulsion in CFA. Die Kontrollgruppen erhielten nach demselben Schema das Lösungsmittel PBS intradermal. Ab dem Tag der ersten Immunisierung wurde für 12 Wochen der Gesundheitszustand der Versuchsgruppen beurteilt und jeden zweiten Tag der Arthritisindex bestimmt. Am Tag 49 wurden fünf Mäuse aus jeder Gruppe getötet, um die Regulation von Genen, die mit Entzündungsprozessen assoziiert sind, zu überprüfen.

Bei der Bestimmung des Arthritisindex über die 12 Wochen konnte in keiner der Versuchsgruppen Schwellungen der Fingergelenke oder der Knöchel beobachtet werden. Demnach lag auch hier der durchschnittliche Arthritisindex jeder Gruppe bei 0. Die Analysen der mRNA Expression von S100A8 und KSRP aus PBMCs und Pfoten von den Tieren, die am Tag 49 getötet wurden, ist in Abbildung 3.4 dargestellt. Erneut wurden die Werte der CII-behandelten Mäuse nach Geschlecht auf die entsprechende Lösungsmittel Kontrolle PBS bezogen.



**Abbildung 3.4:** mRNA Expressionsanalyse von S100A8 und KSRP in PBMCs und vorderen Pfoten im Versuchsschema B der CIA in HLA-DR4.AE° Mäusen

Mit 200 µg Hühner Kollagen Typ II (CII) in komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) wurden HLA-DR4.AE° Mäuse initial intradermal immunisiert. Boostinjektion mit jeweils 100 µg CII in CFA wurden am Tag 7, 17 und 27 durchgeführt. Die Kontrollgruppen erhielten das Lösungsmittel PBS. Für die mRNA Expressionsanalysen wurden die Tiere am Tag 49 getötet. RNA wurde aus den PBMCs (A) und den vorderen Pfoten (B) isoliert, in cDNA umgeschrieben und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dargestellt ist die Auswertung von zwei unabhängig durchgeführten qRT-PCR-Analysen (n = 5 pro Gruppe). Die Mittelwerte mit ± SEM der relativen mRNA Expression von CII-immunisierten Mäusen wurden auf die relative mRNA Menge von PBS-behandelten Tieren bezogen, (\*: p<0,05).

Anders als beim Versuchsschema A konnte im Schema B eine signifikant erhöhte Expression von S100A8 in PBMCs, jedoch nicht in den Pfoten der Weibchen mit CII-Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 3.4 A und B). Bei den mit CII-behandelten Männchen konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe keine Regulation von S100A8 und KSRP detektiert werden (Abbildung 3.4 B).

Eine zufriedenstellende Induktion einer CIA konnte unter den Versuchsschemen A und B nicht erreicht werden. Daher wurde im Versuchsschema C (Kapitel 2.6.2) die Konzentration von CII in CFA erhöht. Für die Immunisierung erhöhte sich der Einsatz von CII auf 400 µg und bei den Boosts auf 200 µg.

Parallel erfolgte die Immunisierung der HLA-DR4.AE<sup>o</sup> Mäuse im Versuch D (Kapitel 2.6.2) nach einem Protokoll, welches in der Fachzeitschrift „Nature“ publiziert wurde (Brand *et al.*, 2007), über intradermale Injektionen in den Schwanz. Wie im Protokoll angegeben, wurden 50 µg CII in CFA zur Immunisierung und 25 µg CII in CFA für die Boostinjektionen 1,5 cm distal der Schwanzbasis injiziert. Die zusätzlichen Injektionen in beiden Versuchen erfolgten am Tag 7 und 14 nach der initialen Immunisierung. Ab Versuchsbeginn wurden die Mäuse regelmäßig über acht Wochen für die Beurteilung des Arthritisindex untersucht. Über den Zeitraum der Datenaufnahme zur Bestimmung des Arthritisindex konnten weder im Versuch C noch D in keiner der Versuchsgruppen Schwellungen der Pfoten (Arthritisindex = 0) beobachtet werden. Im Versuch D wurden zahlreiche nekrotische Veränderungen des Schwanzes an den Injektionsstellen festgestellt. Daher wurde von weiteren Versuchen mit einer intradermalen Applikation in den Schwanz abgesehen.

Aufgrund des Ausbleibens von Schwellungen an Fingergliedern und Knöcheln im Zuge einer konventionell ausgelösten CIA, wurde im Versuchsansatz E (Kapitel 2.6.2) zwei Tage nach der CII-Gabe eine zusätzliche Dosis LPS von 0,8 mg pro Gramm Körpergewicht intraperitoneal verabreicht. Die zusätzliche Gabe von LPS bewirkt, dass von den Immunzellen eine Vielzahl von inflammatorischen Mediatoren ausgeschüttet werden, die die Entwicklung einer Immunreaktion in der CIA beschleunigen und verstärken (Caccese *et al.*, 1992).

Die initiale Immunisierung erfolgte mit 200 µg CII in CFA und die Boostinjektionen mit 100 µg am Tag 11 und 21. Die zusätzlichen LPS-Gaben wurden am Tag 3, 13 und 23 injiziert. Über einen Zeitraum von sechs Wochen wurden die Mäuse beobachtet, ihr Gesundheitszustand beurteilt und alle sieben Tage der Arthritisindex bestimmt. Bei keinem der Versuchstiere konnte eine Schwellung der Fingerglieder oder Gelenke über den Beobachtungszeitraum hinweg festgestellt werden (Arthritisindex = 0). Daher schied auch dieser Versuchsaufbau für die Induktion einer CIA bei HLA-DR4.AE<sup>o</sup> Mäusen aus.

Im Versuchsschema F (Kapitel 2.6.2) wurde zuletzt statt des Kollagens II, welches aus Hühner gewonnen wurde, Kollagen aus Schweinen, in der gleichen Dosierung und den gleichen Spritzabständen wie im Versuch A, injiziert. Gleicht man die Sequenzen von Kollagen II aus Schwein und Huhn mit dem humanen Kollagen II ab, findet man eine stärkere Homologie der Sequenz von Schwein und Mensch. Daher besteht die Möglichkeit, dass das Kollagen II, welches aus Schweinen gewonnen wurde, besser vom menschlichen HLA präsentiert werden kann, womit eine verbesserte Reaktion des Immunsystems erwartet werden könnte.

Erneut wurden die Mäuse über einen Zeitraum von sechs Wochen alle sieben Tage analysiert, um den Arthritisindex zu beurteilen. Jedoch konnten auch hier keine Symptome der CIA beobachtet werden.

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass keines der Versuchsprotokolle geeignet ist, bei HLA-DR4.AE° Mäusen eine CIA auszulösen. Die Daten über Inzidenz und geschlechtsspezifische Erkrankung die Taneja *et al.* 2007 veröffentlicht haben, können in dieser Arbeit mit dem Mausstamm nicht reproduziert werden. Aufgrund dieser Datenlage wurde von der Behandlung mit Naturstoffen in diesem Mausstamm abgesehen.

## **3.2 Typisierung und Charakterisierung von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen für die Wahl eines Behandlungszeitraumes mit Oxacyclododecindion**

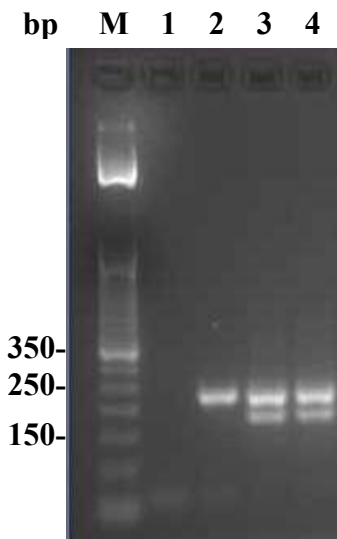
Im Stamm der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse sollte der therapeutische Effekt des Naturstoffes Oxacyclododecindion untersucht werden (Kapitel 2.6.4).

Hierfür wurden zuerst die Mäuse ermittelt, die homozygot für die spontane lymphoproliferative (*lpr*) Mutation im *Fas*-Gen sind (Kapitel 1.3.4). Für die Wahl eines geeigneten Behandlungszeitraumes der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse mit Oxacyclododecindion wurde der Krankheitsverlauf der Mäuse charakterisiert und dokumentiert.

### **3.2.1 Typisierung der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse**

Für die Typisierung von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen wurde die DNA aus den Ohrstanzen gemäß Kapitel 2.6.1.2 durch Frau Bettina Maar im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe Schwarting aus der I. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mainz isoliert. In Abbildung 3.5 ist exemplarisch eine Typisierungs-PCR dargestellt. War eine Maus Träger der *Fas*-Mutation, banden die Primer F1 und R1 und ein 212 bp langes Produkt wurde in der PCR amplifiziert (Abbildung 3.5, Spur 2). Hingegen banden bei einer Wildtypmaus die Primer F1 und R2, wobei das amplifizierte Produkt in dieser PCR 184 bp

lang war. Erscheinen in der elektrophoretischen Auftrennung beide Banden, war die Maus heterozygot für die *lpr*-Mutation im *Fas*-Gen (Abbildung 3.5, Spur 3 und 4).



**Abbildung 3.5: Exemplarische Darstellung einer Typisierung von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Nach der Typisierungs-PCR wurden die Produkte mit 3  $\mu$ l DNA-Probenpuffer versetzt, auf ein 2 %iges Agarosegel aufgetragen und bei 80 V elektrophoretisch aufgetrennt. Probe 2 ist homozygot für die *lpr*-Mutation im *Fas*-Gen (212 bp). Probe 3 und 4 sind heterozygot (212 bp und 184 bp). Die Wasserkontrolle (1) war negativ, (M = Marker, bp = Basenpaare).

### 3.2.2 Charakterisierung des Krankheitsverlaufes in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen

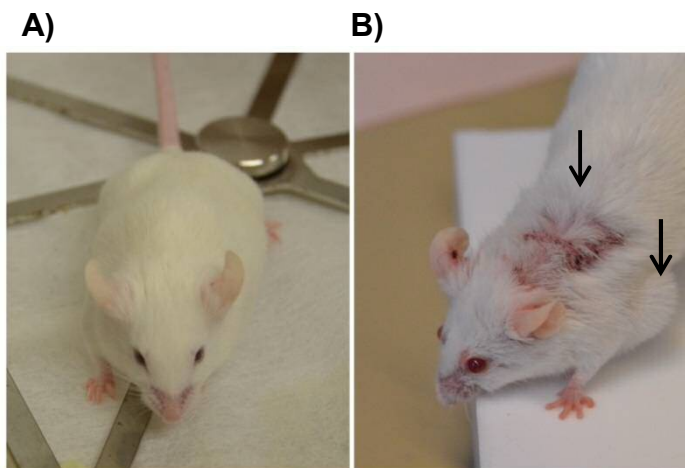
Sowohl pathologisch-anatomische Veränderungen als auch die erhöhte Expression von Entzündungsmarkern kennzeichnen den Verlauf der humanen SLE-Erkrankung. Veränderungen dieser Art sind auch charakteristisch in der Pathogenese der Lupus-ähnlichen Erkrankung in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen (Kapitel 1.3.4). Allerdings gibt es nur unzureichende Anhaltspunkte, um die Progression der Erkrankung frühzeitig zu beurteilen. Um jedoch einen optimalen Behandlungszeitraum für die MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse mit dem Naturstoff Oxacyclododecindion auszuwählen, war eine Analyse des murinen Krankheitsverlaufes notwendig. Hierfür wurden Mäuse im Alter von 1,5 bis 8 Monate angesichts krankheitsrelevanter Veränderungen charakterisiert. Neben einer allgemeinen Analyse hinsichtlich der Morphologie der Organe und der Messung der Proteinurie, wurden mRNA Expressionsanalysen in der Niere, Milz sowie in PBMCs durchgeführt. Dabei lag der Fokus auf Expressionsänderungen von inflammatorischen Genen sowie Genen, die laut Literatur in humanen SLE-Patienten reguliert sein sollen (Kapitel 1.3).

In den Analysen diente als gesunde Kontrollgruppe der Mausstamm Balb/c. Aufgrund der Tatsache, dass MRL Mäuse ohne die spontane Mutation im *Fas*-Gen ähnliche Krankheitssymptome wie MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse entwickeln, allerdings in abgeschwächter Form, war der MRL Stamm selbst als Kontrolle ungeeignet.

### 3.2.2.1 Anatomische Veränderung im Krankheitsverlauf der MRL $Fas^{lpr}$ Mäuse

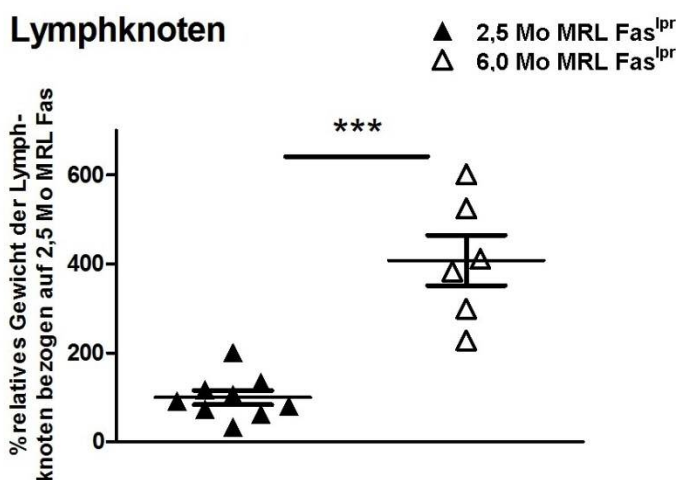
Wie bei humanen SLE-Patienten entwickeln MRL  $Fas^{lpr}$  Mäuse im Laufe ihrer Erkrankung typischerweise eine starke Lymphadenopathie und Splenomegalie sowie vermehrt krankheitstypische Hautläsionen (Andrews *et al.*, 1978; Reilly *et al.*, 2006).

In Abbildung 3.6 ist je eine weibliche MRL  $Fas^{lpr}$  Maus im Alter von zwei und sechs Monaten abgebildet. Bei dem sechs Monate alten Tier (B) waren im Vergleich zur zwei Monate alten Maus (A) deutlich die Symptome des Fellverlustes im Zusammenhang mit den nekrotischen Veränderungen der Haut zu erkennen. Darüber hinaus waren Lymphknotenschwellungen in den Achselhöhlen bei der sechs Monate alten Maus massiv ausgeprägt und deutlich sichtbar (Abbildung 3.6 B).



**Abbildung 3.6:** MRL  $Fas^{lpr}$  Mäuse  
Zwei Monate (A) im Vergleich zum sechs Monate (B) alten Weibchen. Rechts sind deutliche Hautläsionen und eine starke Lymphknotenschwellung durch Pfeile markiert.

Im Vergleich zu den gesunden Balb/c Kontrollmäusen hatten aber auch bereits zweieinhalb Monate alte MRL  $Fas^{lpr}$  Mäuse vergrößerte Lymphknoten. Die Schwellung der Lymphknoten in MRL  $Fas^{lpr}$  Mäusen und die damit einhergehende Gewichtszunahme wurde in Abbildung 3.7 dargestellt.



**Abbildung 3.7:** Relative Zunahme des Lymphknotengewichts bei MRL  $Fas^{lpr}$  Mäusen

Lymphknoten, die anterior des Kehlkopfes liegen, wurden isoliert und gewogen. Dargestellt ist der relative Anteil des Lymphknotengewichts (Mittelwert  $\pm$  SEM) vom Körpergewicht. Sechs Monate (Mo) alte Tiere wurden auf 2,5 Mo alte Tiere bezogen, (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Verglich man den relativen Anteil des Lymphknotengewichtes zum Gesamtkörpergewicht, unterschieden sich die sechs Monate alten MRL  $Fas^{lpr}$  Mäuse signifikant von den jüngeren Mäusen. Das Ausmaß der pathologischen Veränderung wird mit dem Foto einer fünf Monate alten Maus in Abbildung 3.8 (A) verdeutlicht.

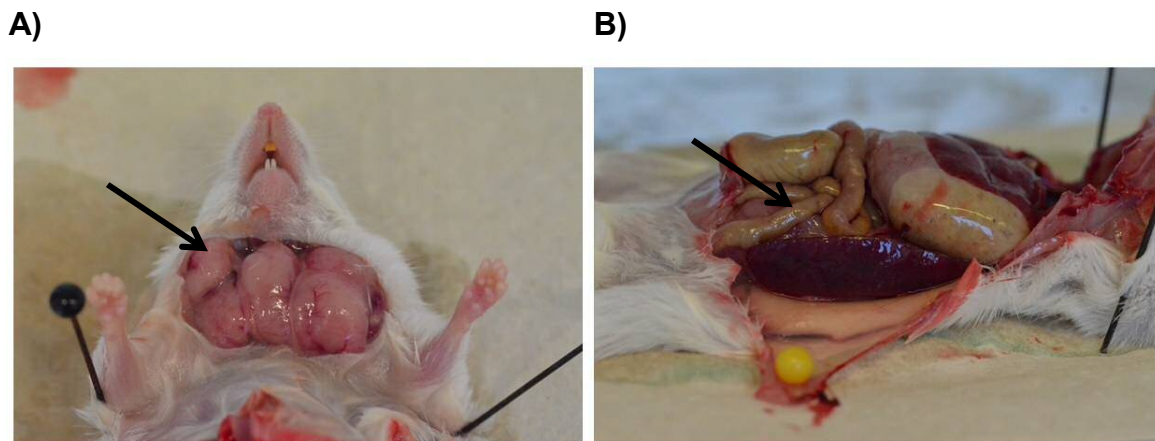


Abbildung 3.8: Lymphknotenschwellung (A) und Splenomegalie (B) in fünf Monate alten MRL  $Fas^{lpr}$  Mäusen

Ein weiteres Symptom der Erkrankung bei MRL  $Fas^{lpr}$  Mäusen war die Vergrößerung der Milz (Abbildung 3.8 B) Der Abbildung 3.9 kann entnommen werden, dass sich das Gewicht der Milz, relativ zum Körpergewicht, bereits bei zwei Monate alten MRL  $Fas^{lpr}$  Mäusen signifikant von dem der Kontrollmäuse unterschied. Gravierender war der Unterschied in der Altersgruppe von 5,5 Monate alten Mäusen. Bezog man hier das Milzgewicht auf das Körpergewicht und verglich Balb/c mit MRL  $Fas^{lpr}$  Mäusen, wiesen letztere 5,5-fach schwerere Milzen auf.

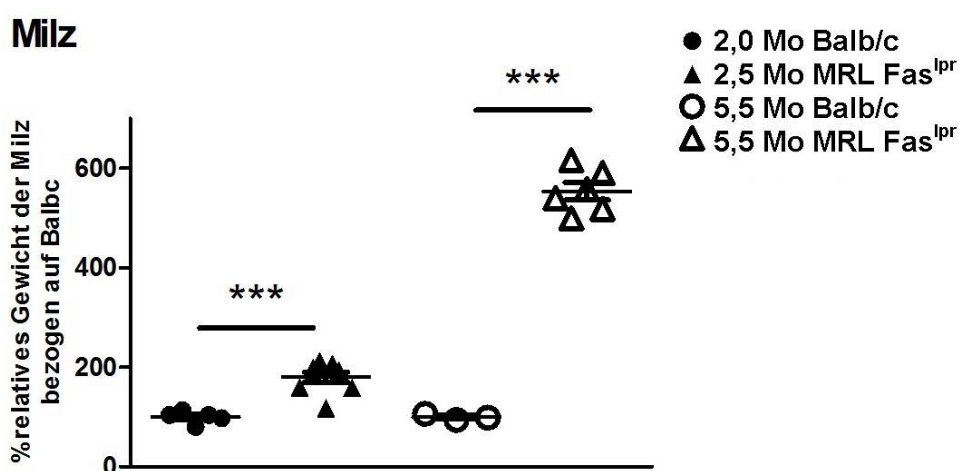


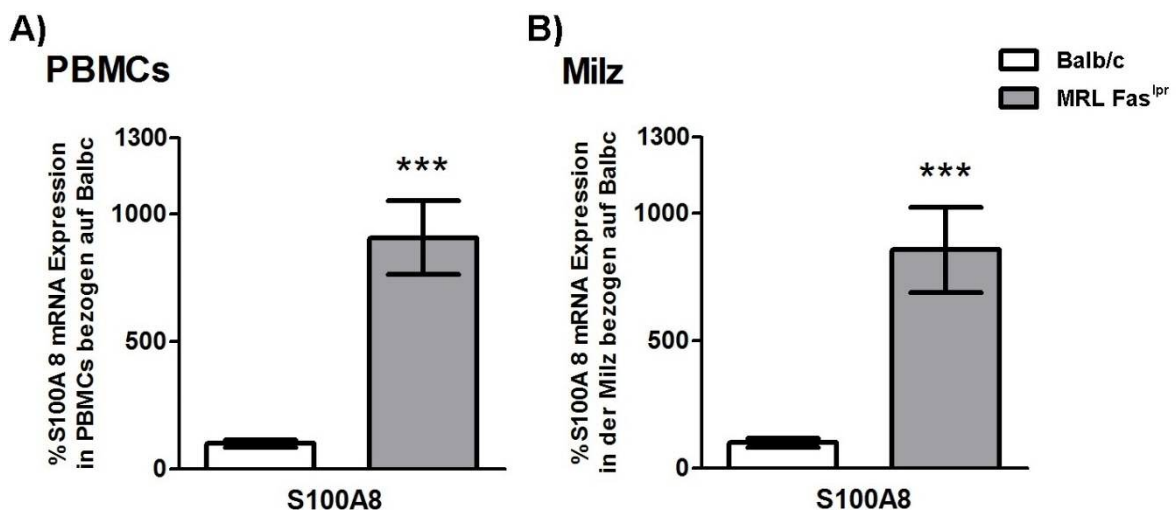
Abbildung 3.9: Relative Gewichtszunahme der Milz von MRL  $Fas^{lpr}$  Mäusen bezogen auf Balb/c Mäuse in ähnlicher Altersspanne

Milzen wurden isoliert und gewogen. Dargestellt ist der relative Anteil des Milzgewichtes (Mittelwert  $\pm$  SEM) zum Gesamtkörpergewicht prozentual bezogen auf Balb/c Mäuse im ähnlichen Alter, (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

### 3.2.2.2 mRNA Expressionsanalysen zwischen Balb/c und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zur Charakterisierung des Krankheitsverlaufes

Unterstützend zu den pathologisch-anatomischen Veränderungen der Organe und Gewebe durch inflammatorische Prozesse der SLE-Erkrankung, wurde die Expression proinflammatorischer Gene auf mRNA Ebene analysiert. Dies wurde zuerst in den PBMCs sowie in der Milz und den Nieren von zwei bis viereinhalb Monate alten Balb/c und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen untersucht. Anschließend erfolgte in fünf bis acht Monate alten Mäusen die Analyse der Nieren, dem Hauptzielorgan der Erkrankung. Bei dieser Untersuchung wurde nicht zwischen männlichen und weiblichen Mäusen differenziert.

Die RNA wurde wie im Kapitel 2.3.1 beschrieben isoliert, in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.3.7) und qRT-PCR-Analysen (Kapitel 2.3.9) durchgeführt. In allen folgenden qRT-PCR Experimenten wurden die  $C_T$ -Werte der zu untersuchenden Gene auf das Referenzgen GAPDH normiert.



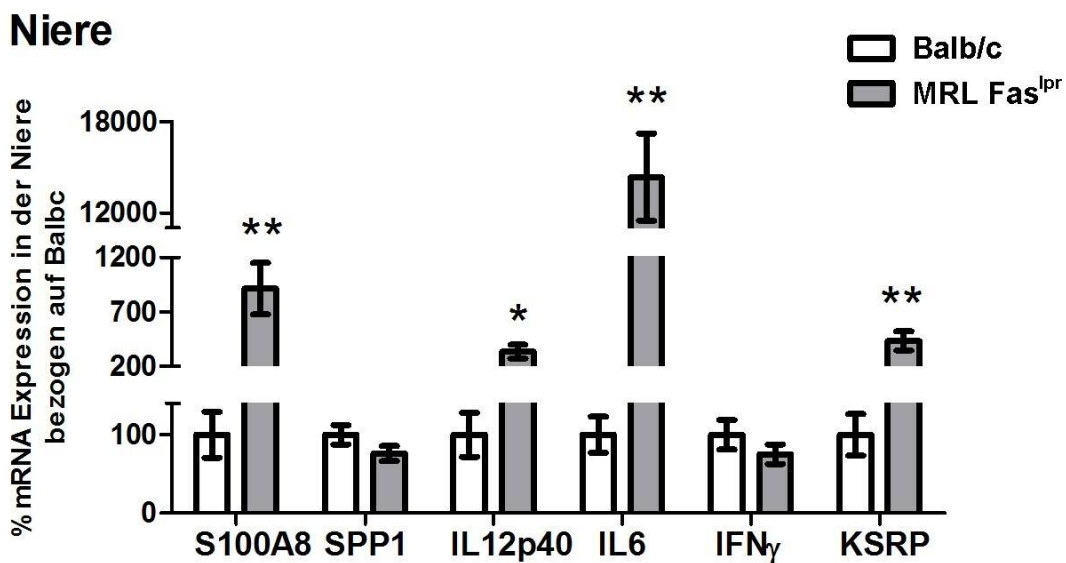
**Abbildung 3.10:** Analyse der mRNA Expression von S100A8 in zwei bis viereinhalb Monate alten Balb/c und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen in PBMCs und der Milz

Balb/c (n = 10) und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse (n = 21) wurden in einem Alter von zwei bis viereinhalb Monaten getötet, Blut und Organe entnommen und RNA aus PBMCs (A) und Milz (B) isoliert. Nach dem Umschreiben der RNA in cDNA wurden sechs unabhängige qRT-PCR-Analysen durchgeführt und ausgewertet. Gezeigt wird die relative mRNA-Menge in Bezug auf die relative mRNA Expression in Balb/c Mäusen (100 %). Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der relativen mRNA Expression von S100A8, (\*\*\*: p<0,001).

In Abbildung 3.10 wurde die relative Expressionsänderung der mRNA von S100A8, ein Marker für proinflammatorische Prozesse (Kapitel 1.3.1), in PBMCs und der Milz von zwei bis viereinhalb Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen gegenüber der von Balb/c Mäusen dargestellt. Die Analyse der mRNA von S100A8 zeigte eine signifikant erhöhte Expression in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* gegenüber Balb/c Mäusen sowohl in den PBMCs als auch in der Milz (Abbildung 3.10).

Die erhöhte Expression von S100A8 in den PBMCs und der Milz (Abbildung 3.10) von zwei bis viereinhalb Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnte auch für das Hauptzielorgan der Erkrankung, die Niere, gezeigt werden (Abbildung 3.11). Diese Befunde liefern erste Hinweise, dass sich in den zwei Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen im Vergleich zu den gesunden Balb/c Kontrollmäusen bereits entzündliche Prozesse entwickeln.

Neben S100A8 wurden weitere Gene wie Interferon Gamma ( $\text{IFN}\gamma$ ) und KSRP, die an der Regulation von Entzündungsprozessen beteiligt sind, sowie Gene, die in der SLE-Erkrankung dysreguliert sind (Kapitel 1.3), analysiert. Zu letzteren zählt Osteopontin (SPP1), Interleukin 6 (IL6) und Interleukin 12p40 (IL12p40), die ebenfalls in Abbildung 3.11 dargestellt wurden. Dieser Abbildung kann entnommen werden, dass bereits in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die jünger als fünf Monate sind, neben S100A8 auch signifikant erhöhte Mengen an mRNA von KSRP, IL12p40 und IL6 in den Nieren nachgewiesen wurden. Hingegen konnte eine abweichende Regulation der mRNA von SPP1 und  $\text{IFN}\gamma$  in dieser Altersgruppe im Vergleich zu dem Balb/c Stamm nicht belegt werden (Abbildung 3.11).

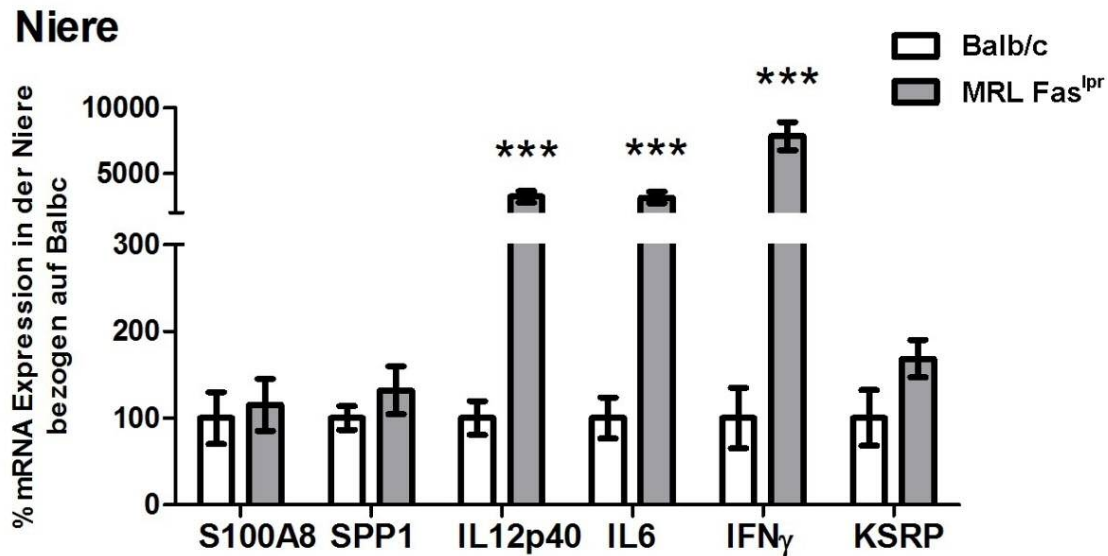


**Abbildung 3.11: Analyse der mRNA Expression in der Niere von zwei bis viereinhalb Monate alten Balb/c und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

RNA wurde aus den Nieren von zwei bis viereinhalb Monaten alten Mäusen isoliert, mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und in je zwei unabhängige qRT-PCR-Analysen eingesetzt. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der relativen mRNA von S100A8, SPP1, IL12p40, IL6,  $\text{IFN}\gamma$  und KSRP in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* (n = 19) wurde auf die relative mRNA-Menge in den Kontrollmäusen Balb/c (n = 10) bezogen, (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

In Abbildung 3.12 wurden die qRT-PCR-Analysen der Nieren von fünf bis acht Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, bezogen auf Balb/c Mäuse, dargestellt. Im Gegensatz zu den zwei bis viereinhalb Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnte kein signifikanter Unterschied bei der Expression von S100A8 und KSRP mehr detektiert werden.





**Abbildung 3.12:** Analyse der mRNA Expression in der Niere von fünf bis acht Monate alten Balb/c und MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen

RNA wurde aus den Nieren von fünf bis acht Monate alten Mäusen isoliert, mit Hilfe der reversen Transkription in cDNA umgeschrieben und in je sechs unabhängigen qRT-PCR-Analysen eingesetzt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression (Mittelwert  $\pm$  SEM) von S100A8, SPP1, IL12p40, IL6, IFN $\gamma$  und KSRP in MRL *Fas*<sup>lpr</sup> (n = 52) bezogen auf die relative mRNA Menge in den Kontrollmäusen Balb/c (n = 8), (\*\*\*: p<0,001).

Hingegen stieg in den fünf bis acht Monate alten MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen die mRNA Quantität von IL12p40 und IFN $\gamma$  stark an. Die Expression von IL12p40 war um das 32-fache und IFN $\gamma$  um das 78-fache höher als in den Balb/c Mäusen. Wie bereits bei den zwei bis viereinhalb Monate alten MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen, konnte auch in den älteren MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen eine höhere Expression von IL6 im Vergleich zu den Balb/c Mäusen detektiert werden (Abbildung 3.12). Allerdings lag der Mittelwert des Expressionsunterschiedes zu den Balb/c deutlich unter dem von jüngeren MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen (Abbildung 3.11).

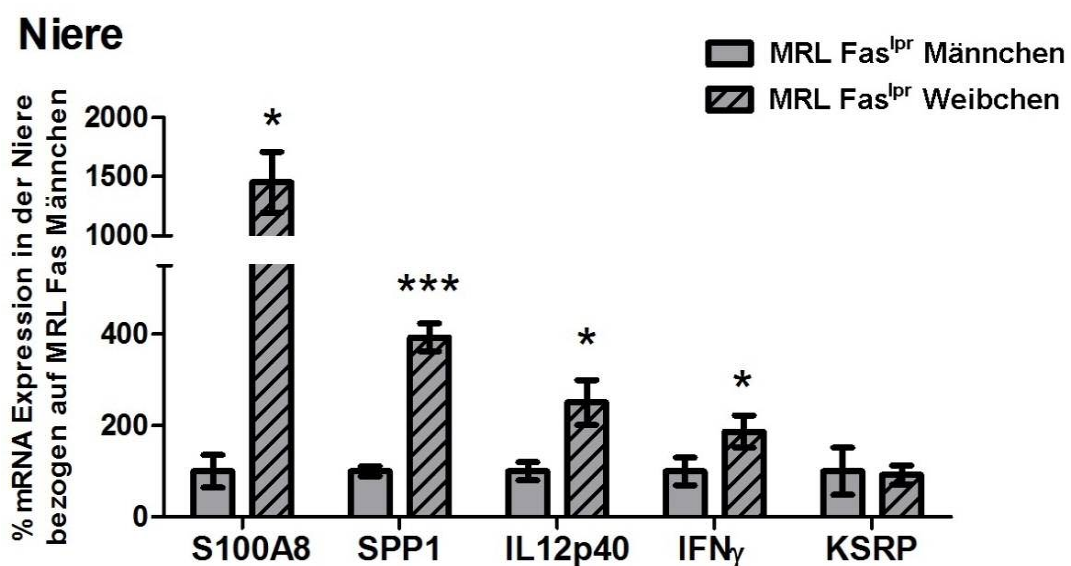
Zusammenfassend können Expressionsänderungen von inflammatorischen Genen sowie Genen, die laut Literatur in humanen SLE-Patienten reguliert sein sollten, vermehrt in MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen im Vergleich zu Balb/c Kontrollmäusen detektiert werden. Signifikante Veränderungen in der mRNA Expression können bereits in einem Alter von zwei Monaten nachgewiesen werden. Somit scheinen sich entzündliche Vorgänge bei den MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen bereits frühzeitig zu entwickeln. Im Laufe der Erkrankung kann zudem festgestellt werden, dass sich das Expressionsprofil der einzelnen Gene änderte. Jedoch bleibt grundlegend die Expression entzündungsfördernder Mediatoren in den MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen erhöht, was für eine Manifestation inflammatorischer Prozesse spricht.

### 3.2.2.3 Vergleichende mRNA Expressionsanalysen in MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen

Eigene Beobachtungen und Angaben in verschiedenen Publikationen zur Morbidität und Mortalität (Andrews *et al.*, 1978) gaben den Hinweis, dass in den MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen die

Erkrankung geschlechtsspezifisch verläuft. Daher wurden die Expressionsänderungen von inflammatorischen Genen sowie Genen, die laut Literatur in der Lupus-Erkrankung reguliert sein sollten, in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* und Balb/c Mäusen nach Geschlecht und Alter analysiert. Die getrenntgeschlechtliche Auswertung der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* und Balb/c Mäuse zeigt, dass es durchaus Unterschiede in der Stärke der mRNA Expression als auch im zeitlichen Verlauf der Regulation der proinflammatorischen und krankheitsassoziierten Gene zwischen den Geschlechtern gab (Daten nicht gezeigt). So war in weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen im Vergleich zu weiblichen Balb/c Mäusen die mRNA Expression proinflammatorischer Marker deutlich höher, als zwischen den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* und Balb/c Männchen. Im Zusammenhang mit dem frühzeitigen Versterben der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen legten die Untersuchungen einen Sexualdimorphismus im Krankheitsverlauf nahe. Aufgrund dieser Erkenntnisse erfolgte ein direkter Vergleich der mRNA Expression zwischen den Männchen und Weibchen des MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mausstammes.

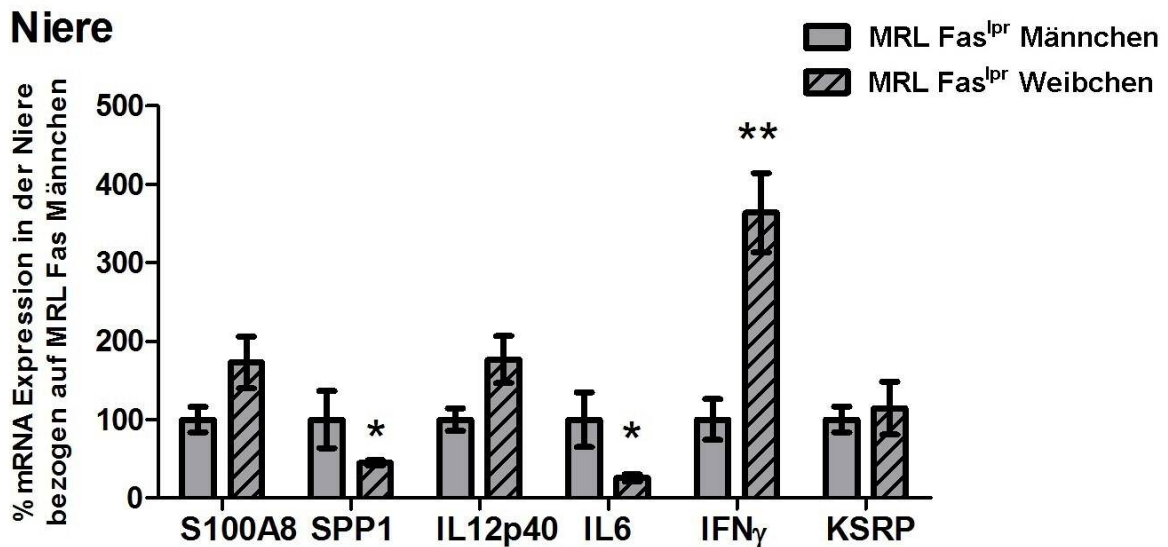
In Abbildung 3.13 wurden zuerst die weiblichen und männlichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse im Alter von zwei bis viereinhalb Monate untersucht. Im Vergleich der mRNA Expression von S100A8 zwischen Männchen und Weibchen, unterschieden sich diese, wie auch die Quantität der mRNA von IL12p40, SPP1 und IFN $\gamma$ , signifikant (Abbildung 3.13). Bezog man die relative mRNA Menge der Weibchen auf die der Männchen, konnte in den Weibchen eine höhere Expression der mRNA der jeweiligen Gene nachgewiesen werden. Dies deutet darauf hin, dass entzündliche Prozesse in den weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen bereits weiter fortgeschritten sind als in den Männchen.



**Abbildung 3.13:** Analyse der mRNA aus der Niere von männlichen und weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen im Alter von zwei bis viereinhalb Monaten

RNA wurde aus der Niere isoliert, in cDNA umgeschrieben und damit zwei unabhängige qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Die relative Expression der mRNA (Mittelwert  $\pm$  SEM) in Weibchen (n = 8) wurde auf die der Männchen (n = 3) bezogen, (\*: p<0,05; \*\*\*: p<0,0001).

In den Untersuchungen von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen im Alter von fünf bis acht Monaten konnten weitere signifikante Unterschiede in der Expression der mRNA detektiert werden (Abbildung 3.14). So ist der Abbildung 3.14 zu entnehmen, dass die mRNA Expression von SPP1 und IL6 bei den Weibchen um 50 % unter der der Männchen lag. Hingegen war die mRNA Menge von IFN $\gamma$  dreieinhalbfach erhöht bei den Weibchen (Abbildung 3.14). Signifikante Unterschiede auf mRNA Ebene von S100A8 und KSRP konnten nicht detektiert werden.



**Abbildung 3.14:** Analyse der mRNA aus der Niere von männlichen und weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen im Alter von fünf bis acht Monaten

RNA wurde aus der Niere isoliert, in cDNA umgeschrieben und damit zwei unabhängige qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Die Mittelwerte mit SEM der relativen mRNA Expression in Weibchen (n = 20) wurde auf die der Männchen (n = 10) bezogen, (\*: p<0,05; \*\*: p<0,01).

Der direkte Vergleich der mRNA Expressionen der Weibchen bezogen auf die Männchen der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse macht zum ersten Mal sehr deutlich, dass signifikante Unterschiede in der Expression zwischen den Männchen und Weibchen des MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mausstammes bestehen. Weibchen zeigen relativ frühzeitig im Lebensalter, im direkten Vergleich, eine Erhöhung proinflammatorischer Marker und Gene die mit der SLE-Erkrankung assoziiert sind. Hingegen exprimieren Männchen erst in der zweiten Lebenshälfte verstärkt entzündungsrelevante Marker.

Zusammenfassend zeigt die Charakterisierung der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse, im Vergleich zu den Balb/c Mäusen eine veränderte mRNA Expression von inflammatorischen und SLE-assoziierten Genen bereits im Alter von zwei Monaten. Im Einklang mit den mRNA Expressionsanalysen können bereits in zwei Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen pathologische Veränderungen der Milz und der Niere beobachtet sowie eine beginnende Proteinurie gemessen werden (Daten nicht gezeigt). Dabei entwickeln weibliche MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse früher krankheitstypische mRNA Expressionsprofile in der Niere, dem

Hauptzielorgan der Erkrankung, als Männchen, was für ein früheres Einsetzen der Erkrankung in weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen spricht. Fazit aus der Darlegung des Krankheitsverlaufes ist, dass der anti-inflammatorische Wirkstoff Oxacyclododecindion in zwei bis drei Monate alten weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen getestet wurde.

### **3.3 Behandlung weiblicher MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse mit Oxacyclododecindion**

Im systemischen Lupus erythematoses und im speziellen der Lupus Nephritis sind die Überexpression von inflammatorischen Genen sowie die Regulationen SLE-assoziiierter Gene maßgebend für die Aktivität und Aufrechterhaltung der Erkrankung (Kapitel 1.3). Eine Modulation der Expression dieser pathophysiologisch relevanten Gene stellt eine mögliche Therapie dar.

Im folgenden Experiment sollte das therapeutische Potential von Oxacyclododecindion (Oxa) (Kapitel 1.6) im *in-vivo* Modell des SLE, den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, ermittelt werden. Hierfür wurden zwei bis zweieinhalb Monate alte Weibchen jeden zweiten Tag intraperitoneal (i.p.) für fünf Wochen mit 1 µg Oxa pro g Körpergewicht behandelt (Kapitel 2.6.4). Als Positivkontrolle dienten 5 µg pro g Körpergewicht des Glukokortikoides Dexamethason (Dex), ein etabliertes Therapeutikum zur Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen (Kapitel 1.3.3). Alle Injektionslösungen wurden für eine bessere Applikation 1:10 mit PBS verdünnt. Dementsprechend wurde der Kontrollgruppe das Lösungsmittel der Substanzen, Ethanol, in gleicher Konzentration mit PBS verabreicht. Am Ende des Versuches wurden die Mäuse für die Blut und Organentnahme getötet.

Nach der Behandlung der Tiere mit Oxa erfolgten mRNA- und Proteinexpressionsanalysen von inflammatorischen und SLE-assoziierten Genen. Des Weiteren wurden histopathologische Untersuchungen an Gewebeschnitten der Niere durchgeführt, die Zusammensetzung zellulärer Infiltrate charakterisiert und die Auswirkung der Behandlung mit Oxa analysiert. Zusätzlich wurde unter dem Aspekt der Oxa-Behandlung die Veränderung klinisch relevanter Marker untersucht.

#### **3.3.1 mRNA Expressionsanalysen in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen unter der Oxacyclododecindion-Behandlung**

Um die Wirkung von Oxa auf die Regulation von inflammatorischen Genen sowie auf SLE-assoziiierter Gene zu untersuchen, wurden mRNA Expressionsanalysen durchgeführt.

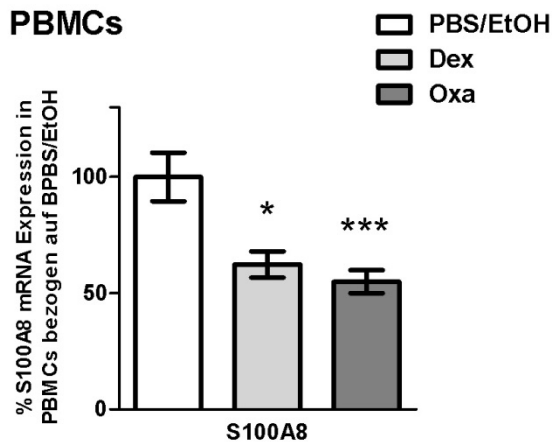
Der Fokus der Untersuchungen lag dabei hauptsächlich auf den PBMCs und der Milz sowie auf dem Hauptzielorgan der Erkrankung, der Niere (Kapitel 1.3).

Für die Analysen wurde aus den PBMCs sowie der Milz und Niere die RNA aufgearbeitet (Kapitel 2.3.1). Im Weiteren wurde die Konzentration der RNA gemessen (Kapitel 2.3.4) und für die cDNA Synthese (Kapitel 2.3.7) auf 50 µg/µl verdünnt. Die cDNA wurde dann in qRT-PCR-Analysen (Kapitel 2.3.9) eingesetzt. In allen folgenden qRT-PCR Experimenten wurden die  $C_T$ -Werte der zu untersuchenden Gene auf das Referenzgen GAPDH normiert.

### 3.3.1.1 mRNA Expressionsanalysen proinflammatorischer Marker in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen unter der Oxacyclododecindion-Behandlung

Zuerst wurde die Expression von S100A8 in den PBMCs der behandelten Tiere untersucht, da aus den Voruntersuchungen (Kapitel 3.2.2) bekannt war, dass eine erhöhte Expression des proinflammatorischen Gens bei MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen vorliegt.

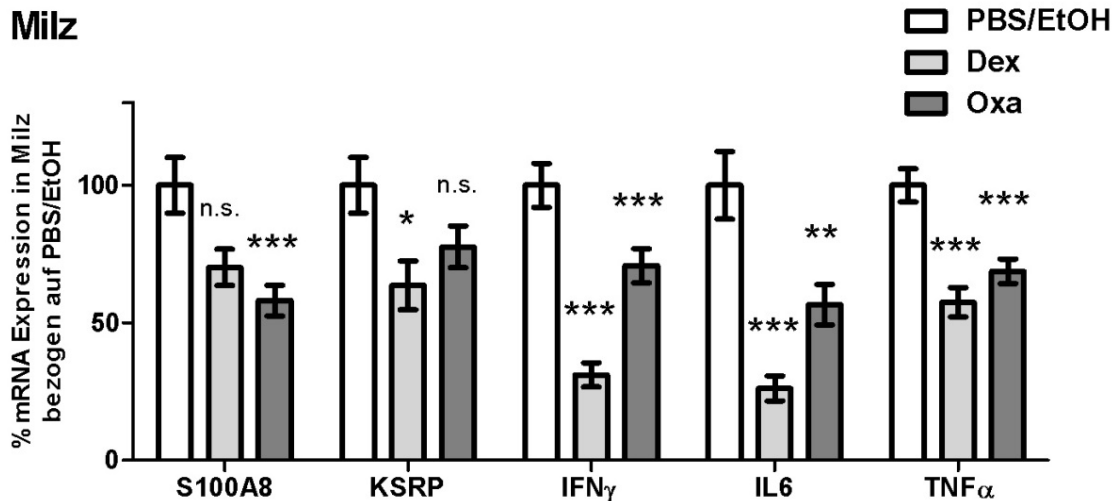
Der Darstellung in Abbildung 3.15 kann entnommen werden, dass die Behandlung mit Oxa zu einer signifikanten Reduktion der mRNA Expression von S100A8 führte. Dieser Effekt war vergleichbar mit dem der Positivkontrolle Dex.



**Abbildung 3.15: Analyse der mRNA Expression von S100A8 in PBMCs von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Zwei bis zweieinhalb Monate alte MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen wurden fünf Wochen jeden zweiten Tag i.p. mit 1 µg/g Oxacyclododecindion (Oxa), 5 µg/g Dexamethason (Dex) oder mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/Ethanol (PBS/EtOH) behandelt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression (Mittelwert ± SEM) von S100A8 in PBMCs bezogen auf die Kontrollgruppe PBS/EtOH. Die Ergebnisse fassen Daten aus vier unabhängigen Tierversuchen und acht verschiedenen qRT-PCR-Analysen zusammen, (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

In der Milz (Abbildung 3.16) wurde neben der mRNA Expression von S100A8 auch die von KSRP,  $IFN\gamma$ , IL6 und  $TNF\alpha$  untersucht. Ähnlich wie in den PBMCs wurde die Expression der S100A8 mRNA auch in der Milz durch Oxa signifikant um 45 % gesenkt. Unter der Behandlung mit Dex konnte nur eine leichte Abnahme der S100A8 mRNA Expression detektiert werden, die nicht signifikant war.



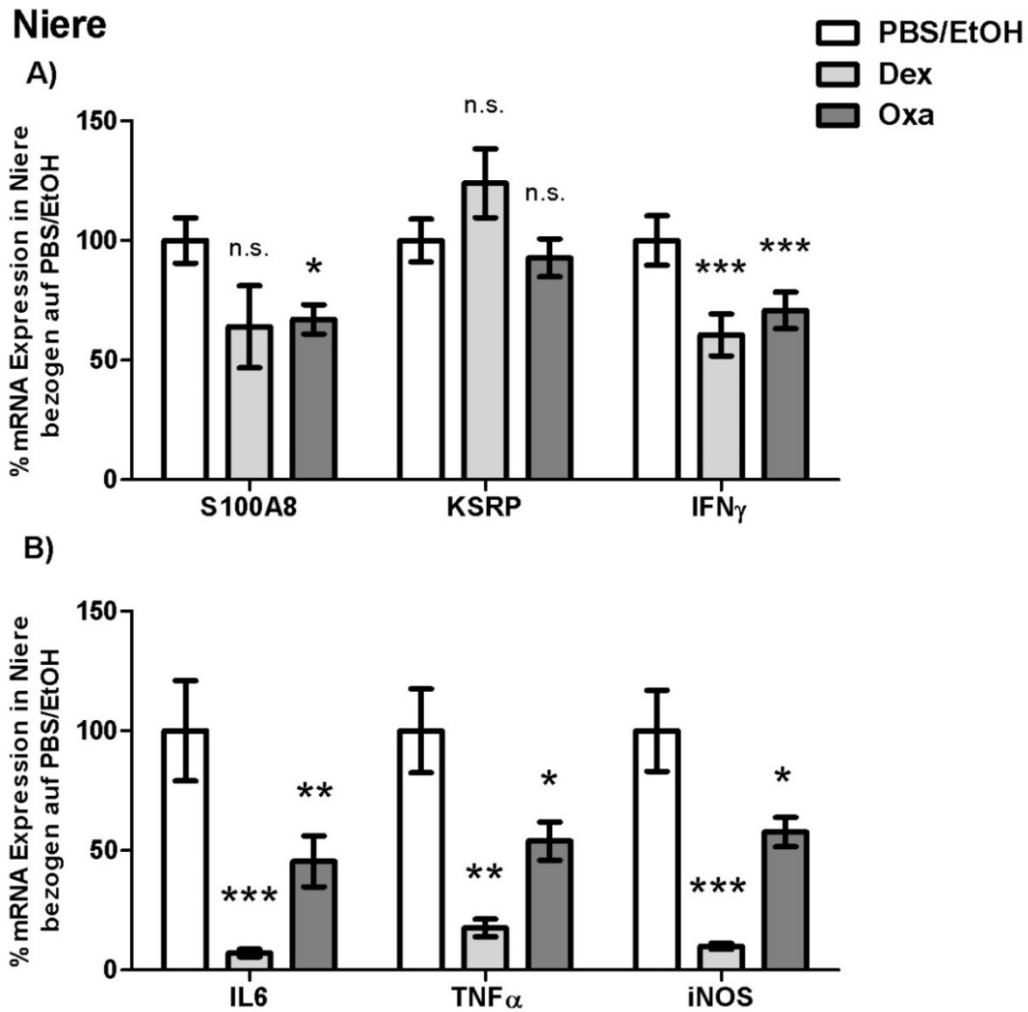
**Abbildung 3.16: qRT-PCR-Analysen proinflammatorischer Gene in der Milz von Oxa-behandelten, weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Fünf Wochen lang wurden zwei bis zweieinhalb Monate alte MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen jeden zweiten Tag i.p. mit 1  $\mu$ g/g Oxacyclododecindion (Oxa), 5  $\mu$ g/g Dexamethason (Dex) oder mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/Ethanol (PBS/EtOH) behandelt. Die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der relativen mRNA Expression von S100A8, KSRP, IFN $\gamma$ , IL6 und TNF $\alpha$  in der Milz wurden auf die Kontrollgruppe PBS/EtOH bezogen. Beruhend auf vier unabhängig durchgeführten Experimenten wurden acht verschiedene qRT-PCR-Analysen durchgeführt und zusammengefasst, (n.s.: nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Des Weiteren verminderte die Behandlung mit Oxa signifikant die mRNA Expression von IFN $\gamma$ , IL6 und TNF $\alpha$ . Bezogen auf die Kontrollgruppe, die mit PBS/EtOH behandelt wurde, lag die Reduktion in einem Bereich von 20 – 50 %. Der Effekt von Dex auf die Expression dieser mRNAs war mit einer Reduktion von 55 – 75 % etwas stärker ausgeprägt als der von Oxa. Die Analyse der KSRP mRNA Expression ergab eine tendenzielle Reduktion unter Oxa, die bei der Dex-Therapie signifikant war. In der Milz konnte somit nachweislich durch die Behandlung mit Oxa die mRNA Expression inflammatorischer Mediatoren reduziert werden.

In Abbildung 3.17 A und B wurde die Analyse von inflammatorischen Markern in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen dargestellt.

Hier war weder durch die Behandlung mit Dex noch durch Oxa eine Modulation der KSRP mRNA Expression ersichtlich (Abbildung 3.17 A). Hingegen wurde die Regulation von S100A8, IFN $\gamma$ , IL6, TNF $\alpha$  und iNOS auf mRNA Ebene durch beide Behandlungen, bezogen auf die Gruppe mit der Lösungsmittelkontrolle, signifikant reduziert (Abbildung 3.17 A und B). Dabei war jeweils der reprimierende Effekt von Dex stärker als der von Oxa. Eine Ausnahme bildete hier die Wirkung der Dex-Behandlung auf die S100A8 mRNA Expression, die durch die hohe Standardabweichung nicht signifikant war.



**Abbildung 3.17: mRNA Analyse inflammatorischer Gene in der Niere von Oxa-behandelten, weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Weibliche MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse im Alter von zwei bis zweieinhalb Monaten wurden fünf Wochen, jeden zweiten Tag i.p. mit 1  $\mu$ g/g Oxacyclododecindion (Oxa), 5  $\mu$ g/g Dexamethason (Dex) oder mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/Ethanol (PBS/EtOH) behandelt. Die relative mRNA Expression von S100A8, KSRP und IFN $\gamma$  (A) sowie IL6, TNF $\alpha$  und iNOS (B) in der Niere wurde auf die Kontrollgruppe PBS/EtOH bezogen. Die Analyse erfolgte an vier unabhängig durchgeführten Experimenten mit acht unabhängig durchgeführten qRT-PCRs. Dargestellt ist Mittelwert ( $\pm$  SEM) der relativen mRNA Expression, (n.s.: nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Zusammenfassend zeigen die mRNA Expressionsanalysen der PBMCs, der Milzen und der Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen eine starke Reduktion der Expression inflammatorischer Gene durch die Behandlung mit Oxa. Dieser Effekt ist vergleichbar mit dem der Behandlung von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mit dem Glukokortikoid Dex. Somit kann zum ersten Mal *in-vivo* ein modulierender Effekt von Oxa auf die Expression inflammatorischer Gene gezeigt werden.

### 3.3.1.2 mRNA Expressionsanalysen SLE-assoziiierter Marker in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen unter der Oxacyclododecindion-Behandlung

Zusätzlich zu der Untersuchung der Wirkung von Oxa auf inflammatorische Marker wurden auch Gene analysiert, die mit der Aktivität des SLE und der LN beziehungsweise mit der Aufrechterhaltung der Erkrankung assoziiert sind (Kapitel 1.3.1 und 1.3.2). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.18 dargestellt.

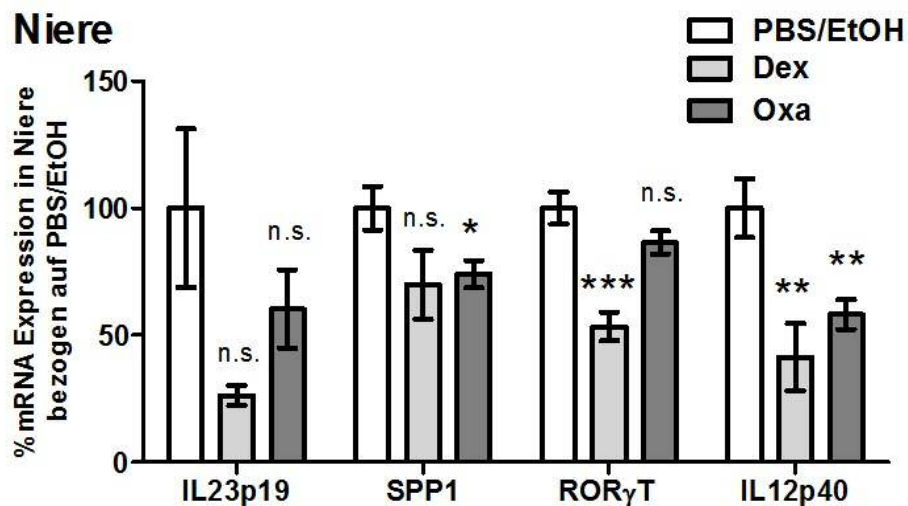


Abbildung 3.18: mRNA Analyse SLE- und LN-assoziiierter Gene in der Niere von Oxa-behandelten, weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen

Zwei bis zweieinhalb Monate alte MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen wurden fünf Wochen, jeden zweiten Tag i.p. mit 1  $\mu$ g/g Oxacyclododecindion (Oxa), 5  $\mu$ g/g Dexamethason (Dex) oder mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/Ethanol (PBS/EtOH) behandelt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression von IL23p19, SPP1, IL12p40 sowie ROR $\gamma$ T in der Niere bezogen auf die Kontrollgruppe PBS/EtOH. Acht verschiedene qRT-PCR-Analysen wurden beruhend auf vier unabhängigen Experimenten durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der mRNA Expression, (n.s.: nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

In den Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnte ein tendenziell repremierender Effekt von Oxa auf die mRNA Expression von IL23p19 detektiert werden. Signifikant wurde hingegen die Expression von SPP1 und IL12p40 unter der Behandlung mit Oxa reduziert. Mit Dex konnte im Vergleich dazu nur eine signifikante Abnahme der mRNA von IL12p40 nachgewiesen werden. Unter der Behandlung von Dex, jedoch nicht unter der Oxa-Behandlung, kam es in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu einer signifikanten Änderung der mRNA Expressionen des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ T (*RAR-related orphan receptor gamma*).

Zusammenfassend kann eine Regulation SLE- und LN-assoziiierter Gene durch Oxa nur für IL12p40 und SPP1 signifikant nachgewiesen werden. Bis auf die Regulation des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ T sind die tendenziell repremierenden Wirkungen auf die untersuchten Gene von Dex und Oxa vergleichbar.



Somit ist die Modulation von inflammatorischen Mediatoren durch Oxa stärker als auf die ausgewählten SLE- und LN-assoziierten Gene. Dabei sind die Oxa-vermittelten Effekte mit denen von Dex oftmals vergleichbar. Durch die Optimierung der Dosis oder des Behandlungszeitraumes könnten einige der erkennbaren Tendenzen eventuell bestätigt werden.

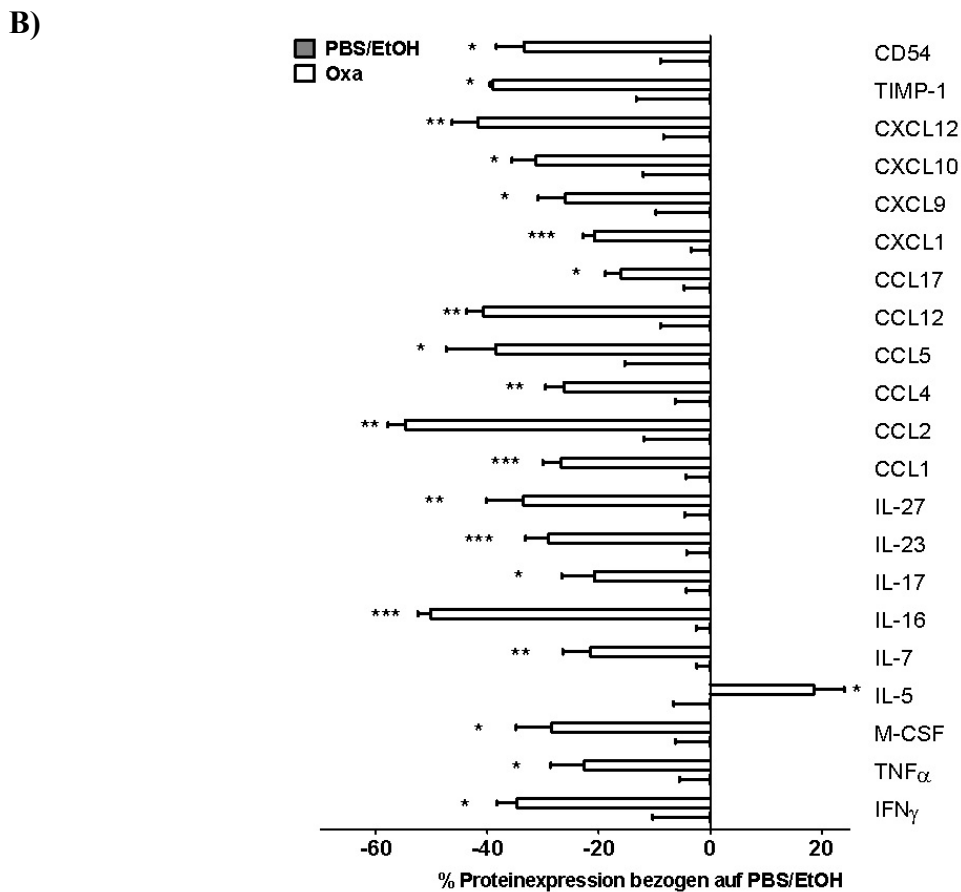
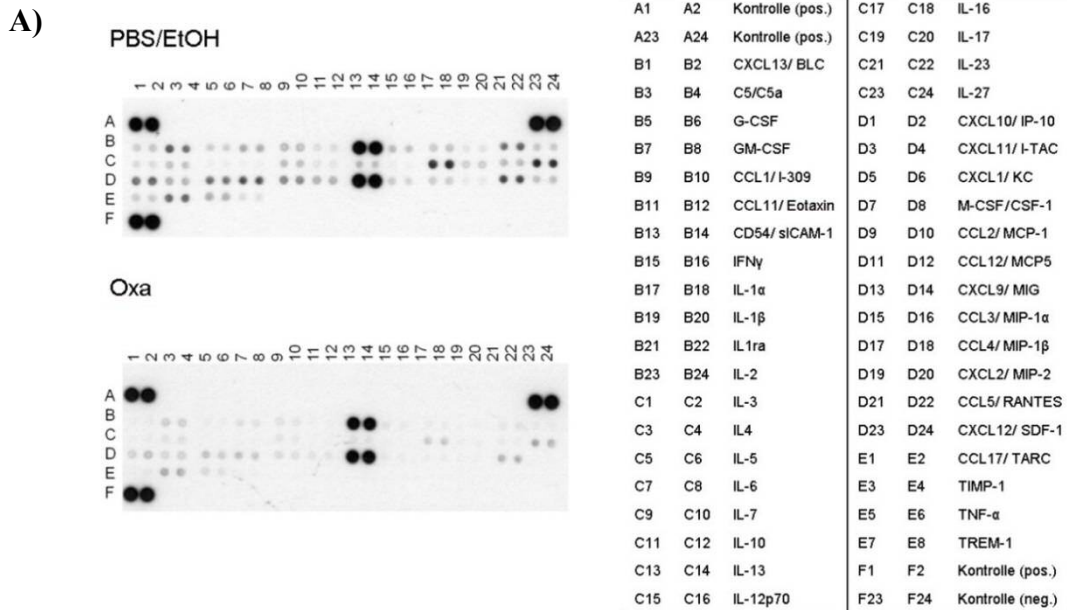
### 3.3.2 Proteinexpression in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen unter Oxacyclododecindion-Behandlung

Für die Bestätigung der vorangegangenen Analysen auf Proteinebene, erfolgte eine gleichzeitige Detektion von 40 verschiedenen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen aus Nierenlysaten mit dem „*Mouse Cytokine Array Panel A*“-Kit von R&D Systems (Kapitel 2.4.6). In die Analyse wurden pro Versuchstier 60 µg Protein eingesetzt und pro Behandlungsgruppe jeweils drei Versuchstiere zu einem Lysat vereinigt. Somit wurden pro Membran 180 µg Gesamtproteinlysate eingesetzt.

Die gebundenen Proteine auf der Membran wurden mit dem ECL-System im ChemiDoc™ (Kapitel 2.1.1) detektiert und mit der Software Image Lab™ (Kapitel 2.1.2) quantifiziert.

In Abbildung 3.19 (A) ist exemplarisch die Aufnahme einer Proteome Profiler-Analyse von PBS/EtOH und Oxa-behandelten Tieren mit dem dazugehörigen Koordinatensystem dargestellt.

Die Gesamtauswertung aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit zwei Proteome Profileranalysen wurde in Abbildung 3.19 (B) dargelegt. Von den 40 detektierten Proteinen wurden 21 unter der Behandlung mit Oxa in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen signifikant reguliert. Zytokine, die das Wachstum und die Proliferation sowie die Differenzierung von Zellen einleiten, konnten, bis auf IL5, unter der Behandlung mit Oxa signifikant reprimiert werden. So konnte zum Beispiel unter der Oxa-Behandlung signifikant weniger IL16, ein T-Zell Chemotraktant, welches von Leukozyten produziert und verstärkt in SLE-Patienten gebildet wird (Lee *et al.*, 1998), nachgewiesen werden. Selbiges gilt für M-CSF (CSF-1) und IL17, die beide mit der Krankheitsaktivität in SLE-Patienten korrelieren (Menke *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2008).



**Abbildung 3.19: Analyse der Proteinexpression in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen via Proteome Profiler von R&D Systems**

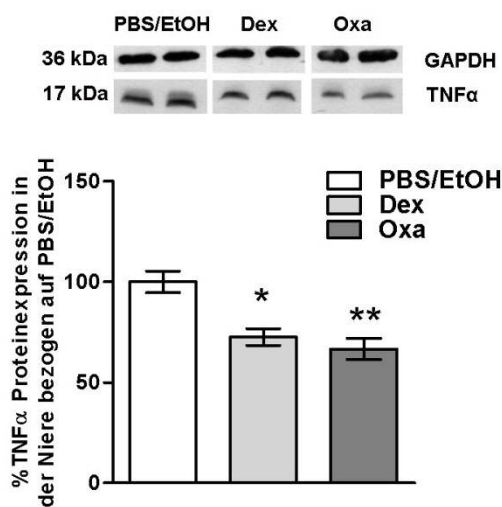
**A:** Abbildung einer Proteome Profiler-Analyse mit zugehöriger Matrix. **B:** Prozentual abweichende relative Proteinexpression (Mittelwert + SEM) in der Niere von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen im Vergleich zur PBS/EtOH-Behandlung aus der Proteome Profiler-Analyse. Tiere wurden im Alter von zwei bis zweieinhalb Monaten für fünf Wochen, jeden zweiten Tag i.p. mit 1  $\mu$ g/g Oxacyclododecindion (Oxa) oder mit PBS/Ethanol (PBS/EtOH) behandelt. Die Analyse erfolgte mit Proben aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten mit je drei Tieren pro Behandlungsgruppe. Mittelwert der Proteinexpression von PBS/EtOH wurde auf 0 (- SEM) gesetzt, der Mittelwert (- SEM) von Oxa entspricht der prozentualen Abweichung vom Mittelwert der PBS/EtOH Kontrollgruppe, (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten auch geringere Mengen von Chemokinen unter der Behandlung mit Oxa detektiert werden (Abbildung 3.19 B). Diese können als Signalproteine eine Chemotaxis auslösen und somit eine Migration von Immunzellen entlang eines Konzentrationsgradienten steuern. So konnte prozentual weniger Protein der Chemokine CCL (*CC chemokine ligand*) 5 (RANTES) und CCL2, die vor allem für das Rekrutieren von Makrophagen hin zum inflammatorischen Gewebe verantwortlich sind (Deshmane *et al.*, 2009), unter der Oxa-Behandlung ermittelt werden. Neben CCL2, welches in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mit Nierenschäden assoziiert ist (Nowling and Gilkeson, 2011), konnte auch weniger CXCL (*Chemokine (C-X-C motif) ligand*) 12 und CXCL9, welche erhöht in der Niere beziehungsweise im Serum von SLE-Patienten nachgewiesen werden können (Wang *et al.*, 2010; Bauer *et al.*, 2006), detektiert werden.

Auch eine verringerte Expression von inflammatorischen Mediatoren wie  $\text{IFN}\gamma$  und  $\text{TNF}\alpha$  konnten auf Proteinebene in den Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse in den Proteome Profiler-Analysen nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den bereits dargestellten mRNA Expressionsanalysen überein (Abbildung 3.17).

Mittels Western Blot Technik (Kapitel 2.4.5) konnte die verminderte Detektion von  $\text{TNF}\alpha$  in Nieren von Oxa-behandelten Mäusen reproduziert (Abbildung 3.20) und damit die Ergebnisse des Proteome Profilers bestätigt werden. In Abbildung 3.20 wurde die Proteinexpression von  $\text{TNF}\alpha$  in den Nieren von Oxa- und Dex-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen bezogen auf die Kontrollgruppe, die mit dem Lösungsmittel PBS/EtOH behandelt wurde, dargestellt.

## Niere

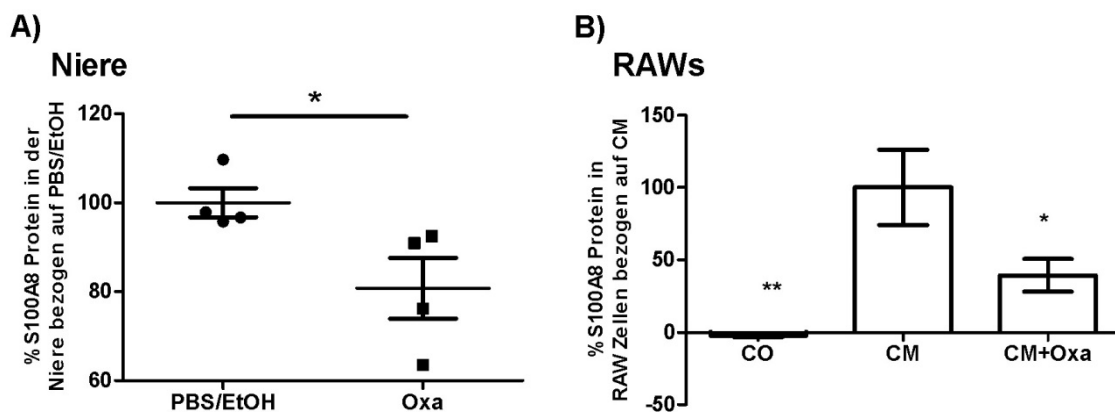


**Abbildung 3.20:  $\text{TNF}\alpha$  Expression in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nach Dex- und Oxa-Behandlung**  
 Repräsentativer Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen  $\text{TNF}\alpha$  und GAPDH. Analysiert wurden zwei Western Blots von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. 250  $\mu\text{g}$  Gesamtproteinextrakt wurde aus Nieren von Oxacyclododecindion- (Oxa) und Dexamethason- (Dex) behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen eingesetzt. Bezogen wurde auf die Kontrollgruppe PBS/EtOH (100 %). Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Proteinexpression, (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Die Analyse des proinflammatorischen Markers S100A8 ist im Proteome Profiler nicht inbegriffen und ist aufgrund der geringen Größe von 10 kDa schwer mit der Western Blot Technik nachzuweisen.

Um die Ergebnisse der mRNA Expressionsanalysen zu bestätigen, wurden daher ELISA Experimente (Kapitel 2.4.7) für die Quantifizierung der Proteinexpression von S100A8 in den Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen durchgeführt. Neben den Proben aus tierexperimentellen Studien wurden auch Analysen mit Lysaten aus *in-vitro* Experimenten mit der murinen, makrophagenähnlichen Zelllinie RAW 264.7 durchgeführt.

Für die ELISA-Analysen wurden Proteinlysate der Niere 1:10 mit PBS verdünnt und wie auch die Lysate aus der RAW 264.7-Stimulation nach Herstellerangaben in den ELISA eingesetzt (Kapitel 2.4.7). Mit Hilfe der Standardreihe wurde die Konzentration von S100A8 in der eingesetzten Probe ermittelt. Der prozentuale Anteil von S100A8 im Lysat wurde durch den Bezug auf die Gesamtproteinkonzentration, die durch eine Bradford-Analyse ermittelt wurde (Kapitel 2.4.2), errechnet. Verglichen wurde der prozentuale Anteil von S100A8 bezogen auf PBS/EtOH Kontrollgruppe beziehungsweise RAW 264.7 Zellen nach LPS/Zytokinstimulation (CM).



**Abbildung 3.21: Proteinexpression von S100A8 in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen und in RAW 264.7 Zellen unter Oxa-Behandlung**

**A:** Effekt von Oxacyclododecindion (Oxa) auf die Expression von S100A8 in Nierenlysaten (1:10 in PBS verdünnt) von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen die fünf Wochen jeden zweiten Tag i.p. mit 1 µg/g Oxacyclododecindion (Oxa) oder mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/Ethanol (PBS/EtOH) behandelt wurden. **B:** RAW 264.7 Zellen wurden in 12-Loch Platten ausgesät und nach 24 h das Medium gegen FCS-freies Medium ausgetauscht. Nach weiteren 16 Stunden wurden die Zellen 30 min mit Oxa (100 ng/ml) vorinkubiert, für 10 h mit LPS (1 µg/ml) und murinen IFN $\gamma$  (300 U/ml) stimuliert und anschließend die Zellen mit RIPA Puffer lysiert. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) mit Bezug auf PBS/EtOH (100 %) beziehungsweise CM (100 %), (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ).

Die reduzierte mRNA Expression von S100A8 unter der Behandlung mit Oxa (Abbildung 3.17 A) konnte in der Niere und unter inflammatorischen Stimulationsbedingungen (Kapitel 2.2.4) in RAW 264.7-Zellen auch auf Proteinebene detektiert werden (Abbildung 3.21 A und B). Somit konnten die Ergebnisse der mRNA Expressionsanalysen in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen (Abbildung 3.17) sowohl in *in-vitro* als auch *in-vivo* behandelten Oxa Proben auch auf Proteinebene bestätigt werden.

Zusammenfassend zeigen die Expressionsanalysen auf Proteinebene, dass neben proinflammatorischen Proteinen (S100A8, TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) auch essentielle chemotaktische Signalproteine (CCL2, CCL5, CXCL12) sowie Zytokine, die Zielzellen in ihrer Proliferation regulieren und ihre Differenzierung einleiten (CSF-1, IL6), durch die Behandlung mit Oxa signifikant reduziert werden. Mit diesen Analysen kann der Erweis erbracht werden, dass Oxa nicht nur *in-vitro* sondern auch *in-vivo* in der Lage ist, die Expression von inflammatorischen und immunregulatorischen Faktoren auf Proteinebene zu regulieren.

### **3.3.3 Histopathologische Untersuchungen der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nach Oxacyclododecindion-Behandlung**

In den Nieren der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse kommt es, wie bei SLE-Patienten, durch Ablagerungen von Immunkomplexen zu einer Einwanderung von Immunzellen. Diese können durch die lokale Produktion von Zytokinen und Chemokinen weitere Immunzellen rekrutieren. Dadurch tragen die zellulären Infiltrate zu einer chronischen Aufrechterhaltung der Entzündungsreaktion bei (Kapitel 1.3.2). Eine Progression der Glomerulonephritis korreliert daher mit der Infiltration von Immunzellen. Bei den Infiltraten handelt es sich vor allem um Makrophagen und Lymphozyten.

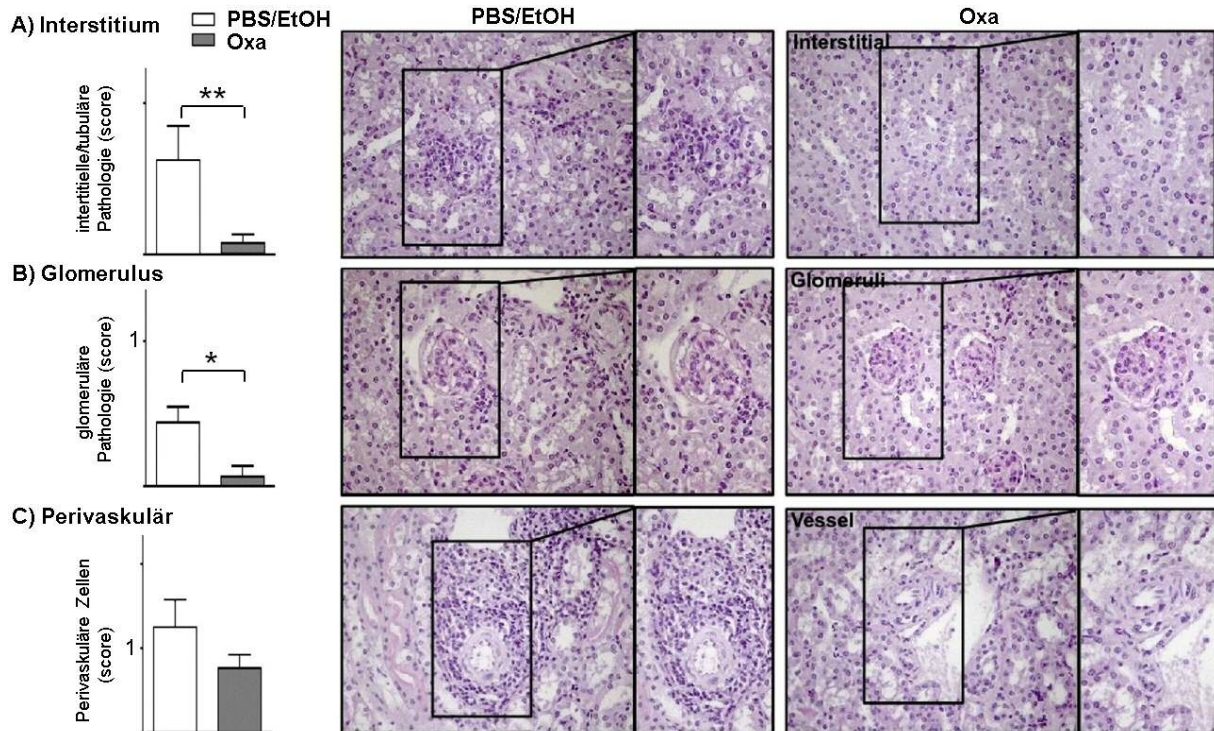
#### **3.3.3.1 Nachweis von Immunzellinfiltraten in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mittels periodic acid-Schiff Reaktion (PAS)**

Die Menge an zellulären Infiltraten wurde an histologischen Schnitten (Kapitel 2.5.1) mit Hilfe der PAS/HE-Färbung (Kapitel 2.5.4) in der Niere durch Frau Dr. Julia Weinmann-Menke bestimmt (Abbildung 3.22).

Wie in den repräsentativen Aufnahmen in Abbildung 3.22 (A - C) zu sehen, wurden die angefärbten Zellen (lila-blau) ausgezählt und die glomeruläre Pathologie mittels eines Scores evaluiert. 20 zufällig ausgewählte Glomeruli wurden anhand des Scores bewertet und dieser als Mittelwert (+ SEM) in einem Balkendiagramm dargestellt.

Die Färbung des Interstitiums (Abbildung 3.22 A) und der Glomeruli (Abbildung 3.22 B) zeigte eine verminderte Anzahl infiltrierender Zellen unter der Behandlung mit Oxa im Gegensatz zur EtOH Kontrollgruppe. Dies spiegelte sich ebenso in dem Score wieder, der

durch die Behandlung mit Oxa signifikant reduziert wurde. Auch im perivaskulären Gewebe (Abbildung 3.22 C) sind deutlich mehr Infiltrate in den Nieren von PBS/EtOH im Vergleich zu Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu finden (Abbildung 3.22 A-C sind bereits in Henke *et al.* (2014) veröffentlicht). Tendenziell wurde auch hier der Score durch Oxa verringert, allerdings ist dieses Ergebnis bisher noch nicht statistisch signifikant.



**Abbildung 3.22: Nachweis der Infiltration von Zellen in die Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen (PAS/HE-Färbung)**

Nachweis von Zellinfiltraten im interstitiellen Gewebe (A), Glomerulus (B) sowie im perivaskulären Gewebe (C) der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die fünf Wochen jeden zweiten Tag mit 1 µg Oxacyclododecindion (Oxa) pro g Körpergewicht (n = 7) oder dem Lösungsmittel PBS/EtOH (n = 8) behandelt wurden. Dargestellt ist der Mittelwert (+ SEM) des Scores. Repräsentative Aufnahme einer PAS-Färbung mit 20-facher Vergrößerung; Detailaufnahme 40-fache Vergrößerung, (\*: p<0,05; \*\*: p<0,01), (Aufnahme von Dr. J. Weinmann-Menke).

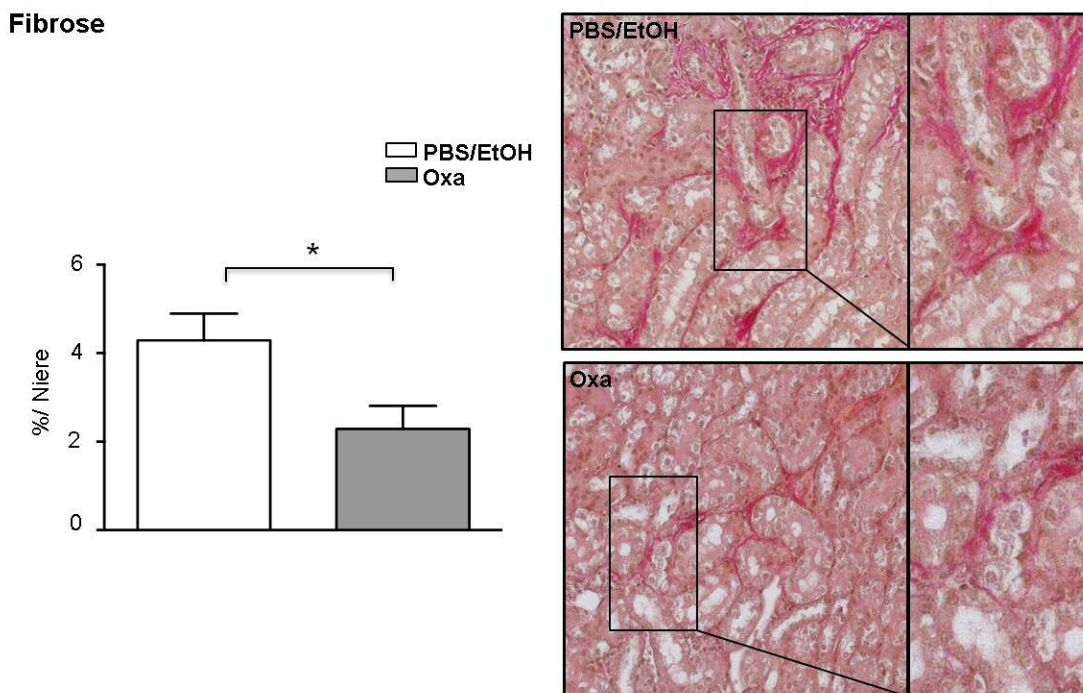
Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass zelluläre Infiltrate in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mit einer Oxa-Behandlung reduziert werden können sowie pathologische Prozesse im Glomerulus durch Oxa verlangsamt werden.

### 3.3.3.2 Nachweis fibrinogenen Materials in der Niere mittels Elastika van Gieson Färbung

Durch die andauernde Entzündungsreaktion kommt es im Verlauf der Glomerulonephritis unter anderem zu einer massiven Produktion fibrinogenen Materials in der extrazellulären Matrix. Dies führt zu einer Vernarbung des Nierengewebes. Dieser Prozess korreliert mit einer zunehmenden Funktionseinschränkung der Niere, was letztlich zum Nierenversagen führt (Kapitel 1.3.2).

Für Abbildung 3.23 wurden in Nierengewebschnitten von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen (Kapitel 2.5.1) Strukturen des Bindegewebes mit Hilfe der Elastika van Gieson Färbung (Kapitel 2.5.3) von der Pathologie der Universitätsmedizin Mainz angefärbt und durch Frau Dr. J. Weinmann-Menke ausgewertet.

Der repräsentativen Aufnahme in Abbildung 3.23 kann entnommen werden, dass die Färbung im Nierenschnittpräparat einer PBS/EtOH-behandelten Maus Kollagen (rot) nachweisen konnte. Die relativ geringe Menge an Kollagen, die detektiert wurde, entspricht einem frühen Stadium der Fibrose. Trotz dessen konnte in dem Schnittpräparat der Oxa-behandelten Maus nochmal deutlich weniger Kollagen nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.23: Elastika van Gieson Färbung (nach Weigert) in Nierenschnittpräparaten von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

In Paraffinschnitten (4  $\mu\text{m}$ ) von Nieren der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die fünf Wochen jeden zweiten Tag mit 1  $\mu\text{g}$  Oxacyclododecindion (Oxa) pro g Körpergewicht ( $n = 9$ ) oder dem Lösungsmittel PBS/EtOH ( $n = 9$ ) behandelt worden waren, erfolgte der Nachweis von Bindegewebsfasern der extrazellulären Matrix. Dargestellt ist der Mittelwert (+ SEM) des anteilig detektierten fibrinogenen Materials in der Niere sowie eine repräsentative Aufnahme einer Färbung in 40-facher Vergrößerung; (\*:  $p < 0,05$ ), (Aufnahme von Dr. J. Weinmann-Menke).

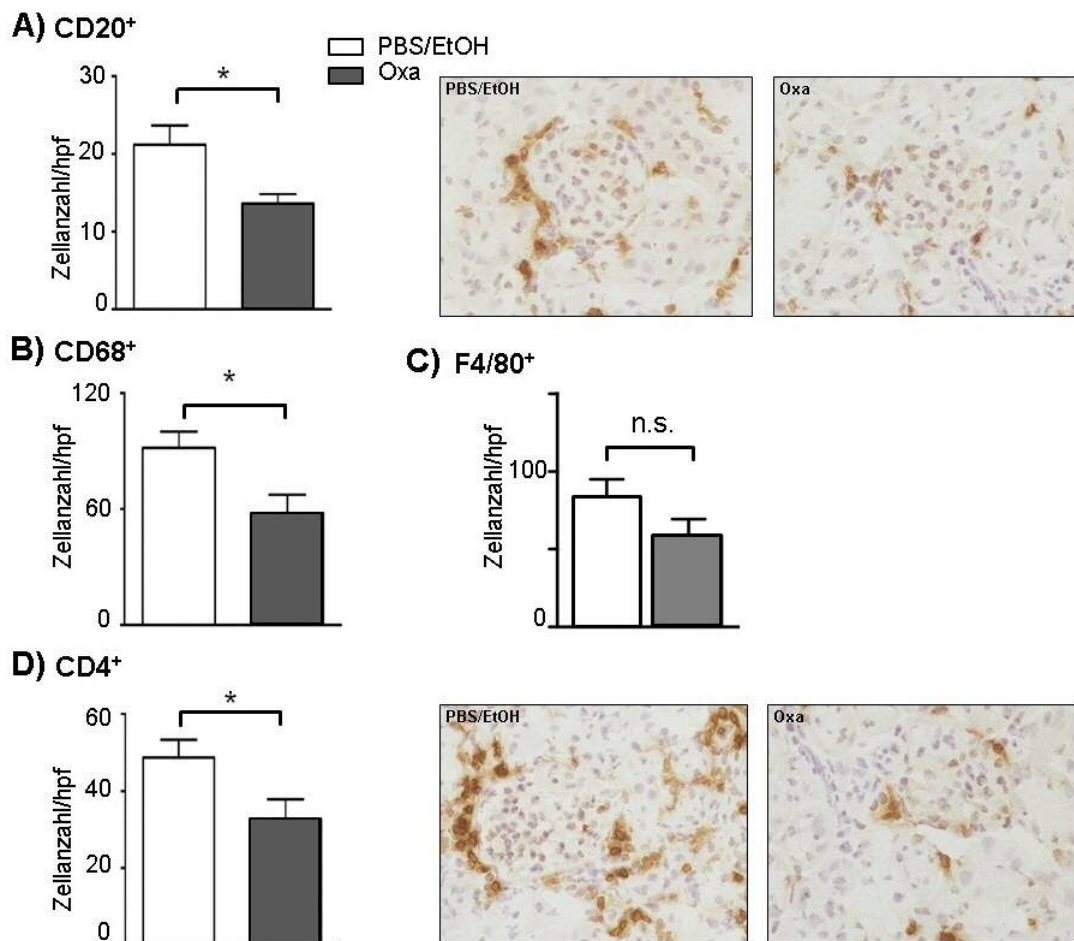
Daher führt die fünf wöchige Behandlung mit 1  $\mu\text{g}$  Oxa pro g Körpergewicht in der Niere der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse zu einer verringerten Bildung von Bindegewebsfasern (Abbildung 3.23) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abbildung 3.23 wurde bereits in Henke *et al.* (2014) veröffentlicht).

### 3.3.4 Charakterisierung der Immunzellinfiltrate in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nach Oxacyclododecindion-Behandlung

Die mit der PAS-Färbung nachgewiesenen Infiltrate (Abbildung 3.22), wurden im Rahmen der Arbeit durch immunhistochemische Färbungen und durchflusszytometrische Analysen durch Dr. J. Weinmann-Menke näher charakterisiert.

#### 3.3.4.1 Immunhistochemische Färbungen in Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen

Nach der fünf wöchigen Behandlung von weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mit 1 µg Oxa pro g Körpergewicht wurden die Tiere getötet und ein Teil der Niere für immunhistochemische Färbungen (Kapitel 2.5.2) eingebettet und Kryoschnitte angefertigt (Kapitel 2.5.1). Mit Antikörper, die Monozyten/Makrophagen (CD68), Makrophagen (F4/80), B-Zell- (CD20) und T-Zell- (CD4) spezifische Oberflächenmoleküle erkennen, wurden die Leukozyten näher charakterisiert.



**Abbildung 3.24:** Analyse der Niereninfiltrate in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mittels immunhistochemischer Färbungen

Repräsentativer Nachweis von CD20- (A), CD68- (B), F4/80- (C) sowie CD4- (D) positiven Zellen in Kryoschnitten von Nieren aus MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen. Diese wurden fünf Wochen jeden zweiten Tag mit 1 µg Oxacyclododecindion (Oxa) pro g Körpergewicht (n = 9) oder dem Lösungsmittel PBS/EtOH (n = 9) behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert (+ SEM) der Anzahl der positiven Zellen in der Niere sowie eine repräsentative Aufnahme einer Färbung in 40-facher Vergrößerung (Aufnahme von Dr. J. Weinmann-Menke); (n.s.: nicht signifikant; \*: p<0,05).



Wie in den repräsentativen immunhistochemischen Aufnahmen in Abbildung 3.24 für  $CD20^+$  und  $CD4^+$  Zellen gezeigt, wurden die mit dem spezifischen Antikörper gefärbten Zellen (braun) ausgezählt und von allen gezählten Hauptfeldern der Mittelwert (+ SEM) der Anzahl positiven Zellen in einem Balkendiagramm dargestellt.

Die Auszählung der Leukozytengruppen zeigte, dass Lymphozyten als auch Makrophagen unter der Behandlung mit Oxa vermindert in die Niere eingewandert waren (Abbildung 3.24). Die Reduktion der  $CD20^+$  (A),  $CD68^+$  (B) und  $CD4^+$  (D) Zellen konnte dabei signifikant nachgewiesen werden. Der Nachweis für  $F4/80^+$  (C) Infiltrate zeigte eine Reduktion in den Nieren von Oxa-behandelten Mäusen, die jedoch nicht signifikant war.

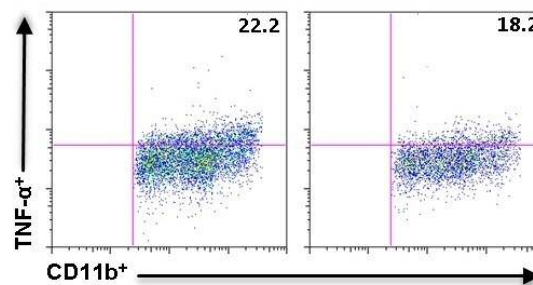
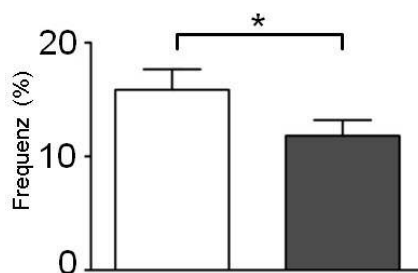
#### **3.3.4.2 Durchflusszytometrische Analysen von Nierenzellsuspensionen der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse**

Um die Wirkung von Oxa auf die Expression inflammatorischer Moleküle von Leukozyten zu untersuchen, wurden zusätzlich Einzelzellsuspensionen für durchflusszytometrische Analysen hergestellt (Kapitel 2.5.6). Durchflusszytometrische Voruntersuchungen zeigten erneut, dass in der Niere die Infiltration von allen hämatopoetischen Zellen, markiert durch das Oberflächenmolekül  $CD45$ , unter der Behandlung mit Oxa signifikant reduziert wurden (Daten nicht gezeigt).

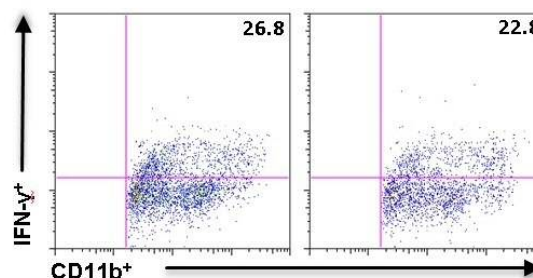
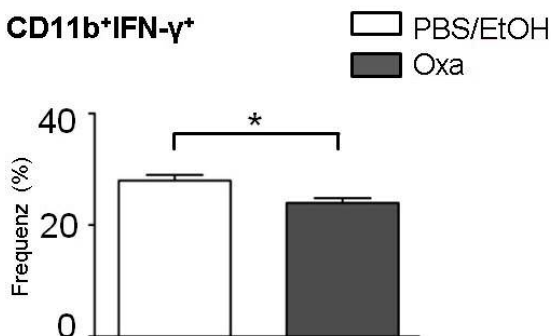
In einem weiteren Schritt wurde dann mit dem Antikörper gegen  $CD11b$  der Anteil von  $TNF\alpha$ - und  $IFN\gamma$ - produzierenden Makrophagen ermittelt (Abbildung 3.25). Wie in Abbildung 3.25 dargestellt, wurde die Anzahl von doppelt-positiven Zellen, die sich im rechten oberen Quadranten des 2D Scatterplots befanden, analysiert.

Anhand der durchflusszytometrischen Daten konnte gezeigt werden, dass Monozyten in Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die den Oberflächenmarker  $CD11b$  trugen, unter dem Einfluss von Oxa signifikant weniger der untersuchten Zytokine ( $TNF\alpha$  und  $IFN\gamma$ ) exprimierten. Durch die Behandlung mit Oxa konnte die Frequenz von  $CD11^+TNF\alpha^+$ - (Abbildung 3.25 A) und  $CD11^+IFN\gamma^+$ - (Abbildung 3.25 B) produzierenden Zellen bezogen auf die Kontrollgruppe um 20 % gesenkt werden.

### A) CD11b<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>



### B) CD11b<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>

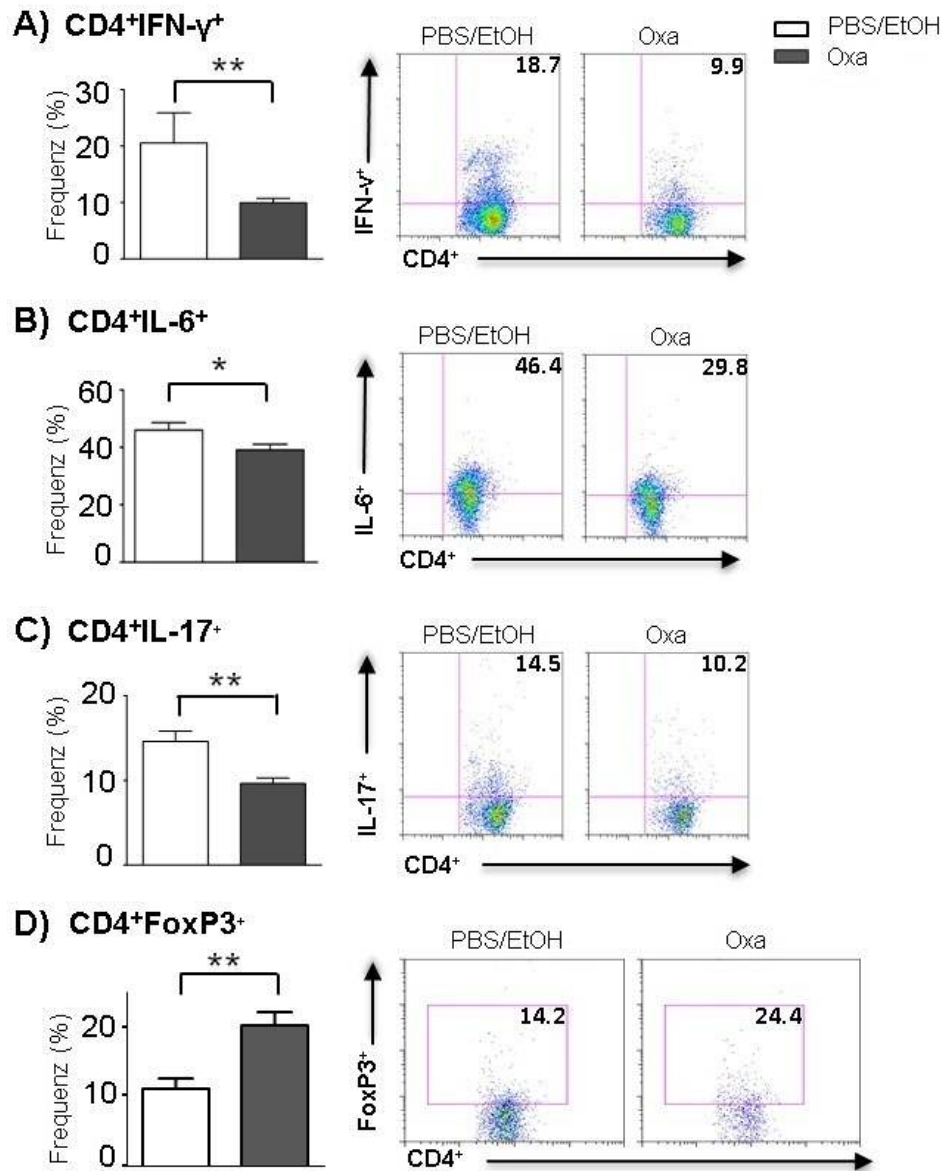


**Abbildung 3.25: Durchflusszytometrische Analyse CD11b-positiver Zellen in der Niere von MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen**

Aus Nieren von Oxa- (n = 7) und PBS/EtOH- (n = 8) behandelten MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen wurden Einzellsuspensionen hergestellt, mit Antikörper gegen das Oberflächenmolekül CD11b und intrazellulär mit Antikörper gegen TNF $\alpha$  (A) und IFN $\gamma$  (B) markiert und im FACSCalibur  $0,5 \times 10^6$  bis  $1,0 \times 10^6$  Gesamtzellen typisiert. Die Daten wurden mit der Flowjo Software analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert (+ SEM) der Frequenz von intra-renalen positiv detektierten Zellen (Analyse von Dr. J. Weinmann-Menke), (\*: p<0,05).

Aufgrund ihrer Schlüsselrolle bei der Immunregulation und des Entzündungsgeschehens, wurden im speziellen die CD4-positiven T-Helferzellen hinsichtlich ihrer sezernierenden Zytokine, mittels immunhistochemischen Färbungen und durchflusszytometrischen Analysen, untersucht (zu Teilen in Henke *et al.* (2014) bereits publiziert).

Aus der Abbildung 3.26 A ist ersichtlich, dass in den Nieren von Oxa-behandelten MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen eine verminderte Anzahl T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1), charakterisiert durch die Expression von IFN $\gamma$  (CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup>), nachweisbar waren. Die Reduktion der CD4<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen beträgt dabei 52 % im Vergleich zur PBS/EtOH Kontrollgruppe. Funktionell können Th1-Zellen Makrophagen aktivieren und differenzieren und sind damit an der Progression inflammatorischer Prozesse beteiligt (Madigan, 2012). Auch eine verringerte Anzahl an T-Zellen, die durch die Sezernierung von IL6 (CD4<sup>+</sup>IL6<sup>+</sup>) charakterisiert wurden, konnten in Nieren Oxa-behandelter Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abbildung 3.26 B).



**Abbildung 3.26: Durchflusszytometrische Analysen CD4-positiver T-Zellen der Niere von MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen**

Von Oxa- (n = 7) und PBS/EtOH- (n = 8) behandelten MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen wurden Einzelzellsuspensionen aus Nieren angefertigt und mit Antikörpern gegen das Oberflächenmolekül CD4 und intrazellulär mit Antikörpern gegen IFN $\gamma$  (A), IL6 (B), IL17 (C) und FoxP3 (D) gefärbt. Im FACSCalibur wurden  $0,5 \times 10^6$  bis  $1,0 \times 10^6$  Gesamtzellen typisiert und mit der Flowjo Software analysiert. Die Daten sind repräsentativ für Analysen aus zwei weiteren unabhängig durchgeführten Experimenten. Der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Frequenz positiv detektierter Zellen ist, bezogen auf PBS/EtOH, dargestellt (Analyse von Dr. J. Weinmann-Menke), (\*:  $p < 0,05$ ; \*\* $< 0,01$ ).

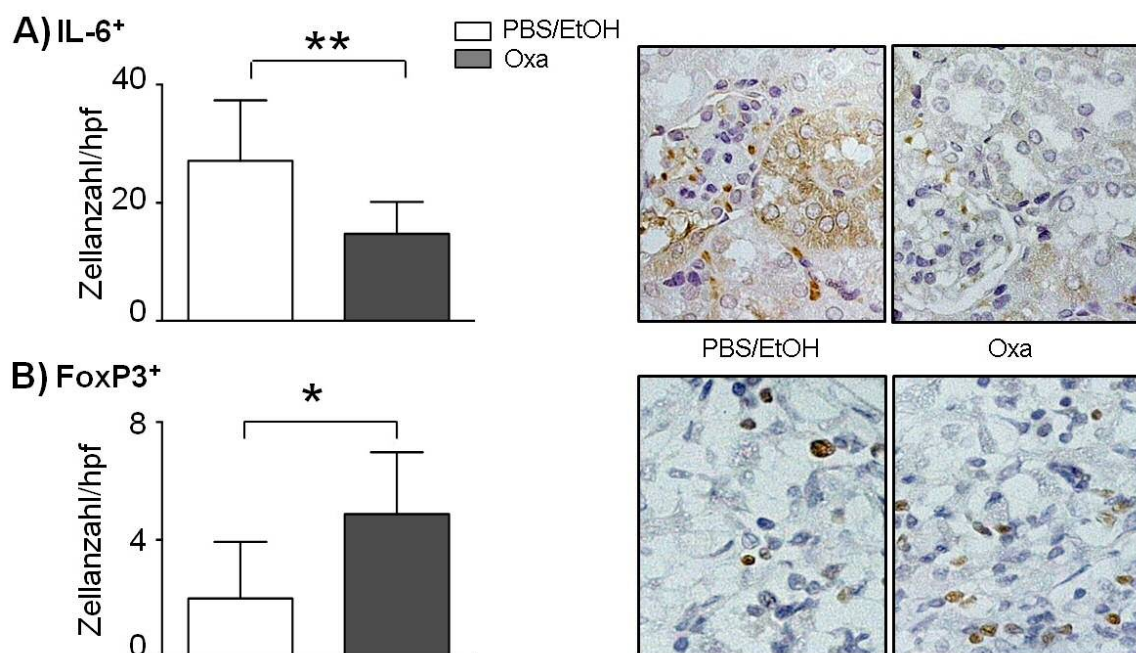
Weitere durchflusszytometrischen Analysen der Nierenzellen zeigten zudem unter Einfluss von Oxa eine reduzierte Infiltration von T-Helferzellen, die IL17 sezernierten (CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup>). Diese Zellen werden auch als Th17 bezeichnet und sind wie die Th1-Zellen an inflammatorischen Prozessen in der Glomerulonephritis beteiligt (Summers *et al.*, 2009). Der Effekt von Oxa auf die Generierung von Th17-positiven Zellen betrug dabei 70 %. Somit konnte mittels der durchflusszytometrischen Analysen nachgewiesen werden,

dass unter der Behandlung mit Oxa T-Zellsubpopulationen reduziert wurden, die im Rahmen einer Glomerulonephritis entzündliche Prozesse vermitteln.

Die Gesamtzahl der CD4-positiven Zellen, die in der Niere von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen einwanderten, war gegenüber der Kontrollgruppe vermindert (Abbildung 3.24). Wird dieser Umstand mit berücksichtigt, konnte auch eine verminderte Infiltration von CD4<sup>+</sup> Zellen, die den Entzündungsmediator IL12 beziehungsweise TNF $\alpha$  sezernieren, nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Gleichzeitig zur verminderten Infiltration von CD4<sup>+</sup> Zellen kam es unter der Behandlung mit Oxa zu einem 70 %igen Anstieg von T-regulatorischen Zellen (Treg). Diese CD4-positiven Zellen werden durch die Expression des Transkriptionsfaktor FoxP3 charakterisiert und sind in der Lage entzündliche als auch immunologische Reaktionen zu inhibieren.

Die vermehrten FoxP3<sup>+</sup> Zellen sowie die verminderte Infiltration IL6<sup>+</sup> Zellen in den Nieren von Oxa-behandelten Tieren konnte durch zusätzlich durchgeführte immunhistochemische Färbungen in allen Immunzellinfiltraten belegt werden (Abbildung 3.27 A und B).



**Abbildung 3.27: Immunhistochemische Färbung mit IL6 und FoxP3 an Nierenschnittpräparaten von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Nierenschnitte von Oxa- (n = 9) und PBS/EtOH- (n = 9) behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen wurden mit Antikörper gegen IL6 (A) und FoxP3 (B) gefärbt und Zellkerne mittels HE-Färbung sichtbar gemacht. Dargestellt ist der Mittelwert der positiv gefärbten Zellen (+ SEM) bezogen auf PBS/EtOH. Repräsentativ sind Abbildungen von Nierenschnitten dargestellt (40-fach vergrößert, Aufgenommen von Dr. J. Weinmann-Menke), (\*: p<0,05; \*\*<0,01).

Wie in den repräsentativen immunhistochemischen Aufnahmen in Abbildung 3.27 gezeigt, wurden die IL6<sup>+</sup> (A) und FoxP3<sup>+</sup> (B) gefärbten Zellen (braun) ausgezählt und von allen gezählten Hauptfeldern der Mittelwert (+ SEM) der Anzahl positiver Zellen in einem Balkendiagramm dargestellt.

Zusätzlich wurde die Auswertung auf IL6<sup>+</sup> tubuläre Epithelzellen beschränkt (Daten nicht gezeigt). Die Analyse, dieser an der Entwicklung einer Glomerulonephritis stark beteiligten Epithelzellen (Kapitel 1.3.2), zeigte mit Oxa eine signifikante Reduktion der Sezernierung von IL6 im Vergleich zur Kontrollgruppe (Henke *et al.*, 2014).

Zusammenfassend zeigt die Charakterisierung der Leukozyten eine deutliche Reduktion der Infiltration von Immunzellen in die Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen unter der Behandlung mit Oxa. Zudem kann in den Nieren Oxa-behandelter Mäuse eine verminderte Expression von Molekülen, die eine Rolle bei inflammatorischen und immunregulatorischen Prozessen spielen, nachgewiesen werden. Somit scheint Oxa die entzündlichen Prozesse der Glomerulonephritis deutlich zu vermindern, was durchaus einen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit der Niere haben kann. Hierfür wurden in weiteren Analysen klinische Marker der Lupus Nephritis untersucht.

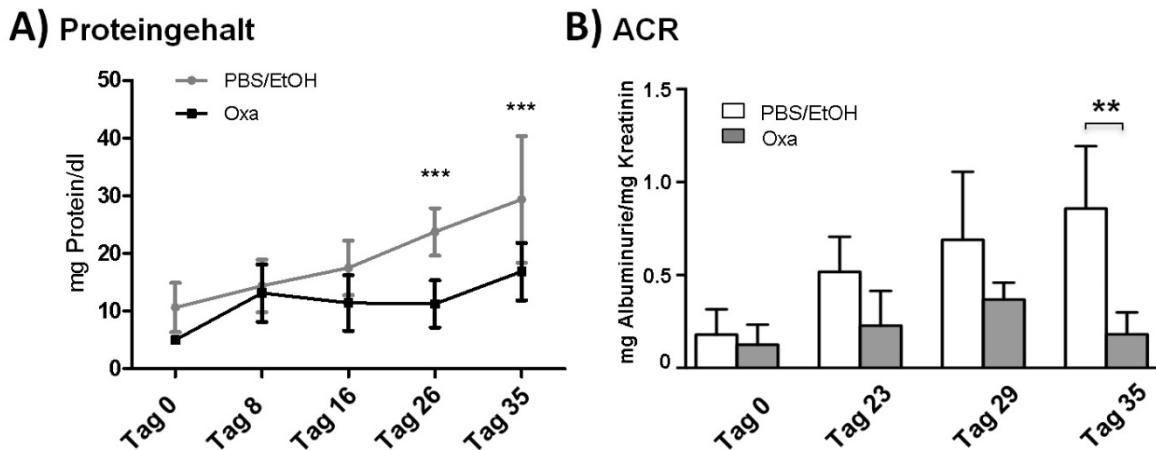
### **3.3.5 Analyse klinischer Marker der Lupus Nephritis in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nach Oxacyclododecindion-Behandlung**

Für die Analyse der Nierenfunktion unter der Behandlung mit Oxa wurden klinische Marker analysiert, die auch im Zuge einer Lupus Nephritis Progression bei SLE-Patienten analysiert und akzeptiert sind. Die Ergebnisse dieses Kapitel wurden bereits in Henke *et al.* (2014) vollständig veröffentlicht.

#### **3.3.5.1 Analyse der Nierenfunktion über Messung der Proteinausscheidung im Harn von Oxacyclododecindion-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Die Analyse der Proteinmenge im Harn ist eine etablierte Methode die Nierenfunktion zu überwachen und damit Verlauf und Schwere einer Glomerulonephritis zu untersuchen (Kapitel 1.3.2). Hierfür wurde im Laufe des Versuchs der Urin der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse gesammelt (Kapitel 2.6.5).

Mittels Urinteststreifen wurde die Konzentration der Proteine im Urin (Abbildung 3.28 A) während der Behandlung nachgewiesen (Kapitel 2.6.5). Am Ende des Behandlungszeitraumes wurde im gesammelten Spontanurin mittels ELISA Experimente (Kapitel 2.4.7) das Albumin-Kreatinin-Verhältnis (ACR) bestimmt (Abbildung 3.28 B).



**Abbildung 3.28: Analyse des Albumingehaltes im Urin mittels Urinteststreifen und ELISA ACR Analysen**  
 Urin wurde regelmäßig von Oxa- (n = 8) und PBS/EtOH- (n = 8) behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen gewonnen. Mit Urinteststreifen wurde semi-quantitativ der Albumingehalt im Urin gemessen (A), anschließend in ELISA-Analysen Kreatinin und Albuminmengen bestimmt und ins Verhältnis gesetzt (B). Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der Proteinkonzentration in mg/dl (A) beziehungsweise das Verhältnis von Albumin zu Kreatinin in mg (B), (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Im Verlauf der Behandlung mit Oxa konnte in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen durch Urinteststreifen semi-quantitativ ein verzögerter Anstieg der Proteinurie festgestellt werden (Abbildung 3.28 A). Der Albumingehalt im Urin unterschied sich zur Kontrollgruppe ab der vierten Behandlungswoche (Tag 26) signifikant (Abbildung 3.28 A). Durch den Vergleich der Albumin- mit der Kreatininmenge im Urin mittels ELISA-Analysen, kann der Effekt von Harnkonzentrationsschwankungen nivelliert werden. Hier konnten zum Ende des Experimentes, am Tag 35, signifikante Unterschiede zwischen den zwei Behandlungsgruppen detektiert werden (Abbildung 3.28 B).

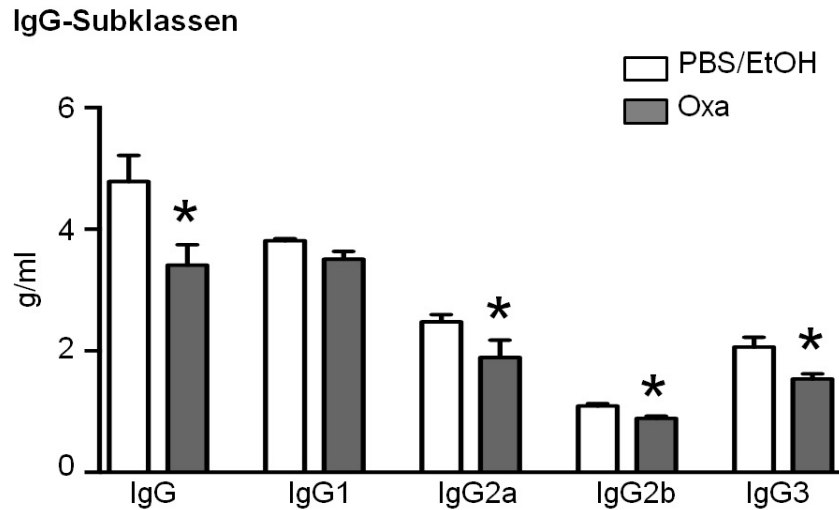
Zusammenfassend kann durch die Behandlung mit Oxa eine Verbesserung der Nierenfunktion in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen angenommen werden, da im Vergleich zur Kontrollgruppe in Oxa-behandelten Mäusen eine geringere Proteinausscheidungen im Urin detektiert werden konnte.

### 3.3.5.2 Analyse der IgG-Subklassen, dsDNA-Antikörper und C3-Konzentration in Seren von Oxacyclododecindion-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen

Ein medizinischer Parameter für die Analyse der Progression einer Glomerulonephritis ist die Konzentrationsmessung von IgG-Subklassen im Serum. Der Nachweis dieser Antikörperklasse gibt Aufschluss über die Aktivität von Immunglobulin bildenden Zellen, die im Rahmen der SLE-Erkrankung erhöht ist (Kapitel 1.3.1). Die Konzentration der IgG-Antikörper im Serum wurde zum Behandlungsende durch ELISA-Analysen (Kapitel 2.4.7) ermittelt.

Die Analysen belegten, dass eine geringere Gesamt-IgG-Konzentration unter der Behandlung mit Oxa im Serum von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen im Vergleich zu den von PBS/EtOH-behandelten Mäusen vorlag (Abbildung 3.29).

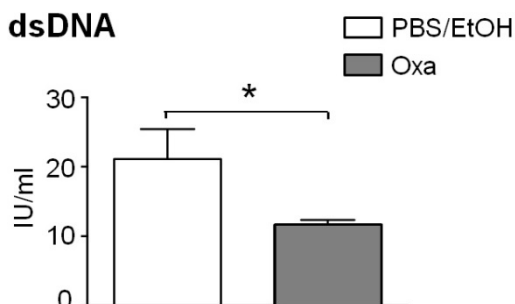
Die Auswertung der einzelnen Subklassen zeigte eine signifikante Reduktion der IgG-Subklassen IgG2a, IgG2b und IgG3 im Serum Oxa-behandelter Mäuse.



**Abbildung 3.29: Analyse der Konzentration von IgG und IgG-Subklassen in Seren von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

ELISA-Analyse von IgG und IgG-Subklassen aus Seren von Oxa- und PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen. Zwei bis zweieinhalb Monate alte MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen wurden fünf Wochen, jeden zweiten Tag i.p. mit 1 µg/g Oxacyclododecindion (Oxa) oder mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/Ethanol (PBS/EtOH) behandelt. Dargestellt ist der Mittelwert (+ SEM) der Konzentration (g/ml) mit n = 16, (\*: p<0,05).

Als ein weiteres Kriterium bei der Evaluation der Krankheitsaktivität wurden Antikörper gegen dsDNA analysiert, da die Konzentration dieser Antikörper der IgG Klasse in Korrelation mit der Aktivität von SLE steht (Kapitel 1.3.1).



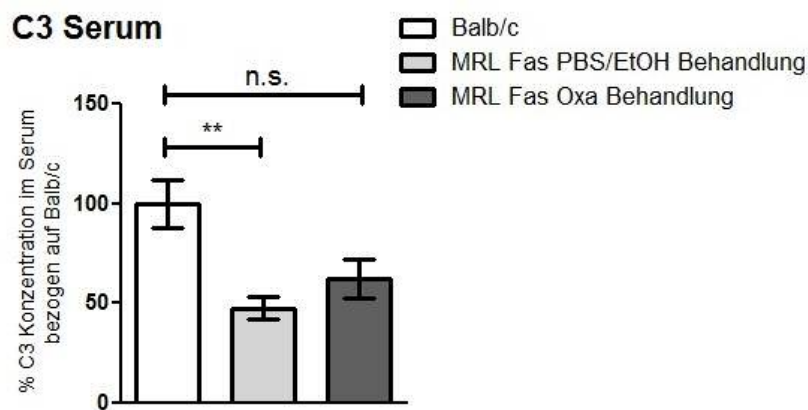
**Abbildung 3.30: ELISA-Analyse gegen dsDNA-Antikörper in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen unter Oxa-Behandlung**

Seren von Oxa- (1 µg/g) und PBS/EtOH-behandelten Mäusen wurden mittels ELISA auf Konzentration von dsDNA-Antikörpern untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert (+ SEM) der Konzentration von dsDNA-Antikörpern (IU/ml), (\*: p<0,05).

Die Evaluation der Konzentration der dsDNA-Antikörper, die mit Hilfe eines ELISAs (Kapitel 2.4.7) durch Dr. Julia Weinmann-Menke durchgeführt wurden, zeigte, dass Oxa die Bildung von Antikörper gegen dsDNA beeinflusste (Abbildung 3.30). In den Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnten nur halb so viele Antikörper detektiert werden

wie im Vergleich zu PBS/EtOH Mäusen. Da die Manifestation einer Glomerulonephritis mit den Titer von dsDNA-Antikörpern im Serum korreliert (Kapitel 1.3.1), legt eine Reduktion dieser Antikörper durch Oxa nahe, dass die Progression der Nephritis beeinflusst wird. Liegen weniger dsDNA-Antikörper im Serum vor, ist das ein erster Hinweis, dass sich weniger Immunkomplexe durch Oxa bilden könnten.

Im Zuge dieser Hypothese war auch von Interesse den Komplementverbrauch in Seren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die mit Oxa oder PBS/EtOH behandelt wurden, zu bestimmen. Da infolge des vermehrten Abbaus von Immunkomplexen in der Niere auch der Komplementverbrauch im Serum mit der Krankheitsaktivität im Zusammenhang steht, wurde zum Behandlungsende in ELISA-Analysen (Kapitel 2.4.7) die Konzentration von C3 im Serum bestimmt.



**Abbildung 3.31: Komplementfaktor C3 Nachweis mittels ELISA im Serum Oxa- und PBS/EtOH-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse**

Analyse der C3-Konzentration im Serum von 18 PBS/EtOH- und 25 Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen bezogen auf 7 Balb/c Mäuse. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der C3-Konzentration dreier unabhängig durchgeführter Experimente bezogen auf Balb/c (100 %). (n.s.: nicht signifikant ( $p > 0,05$ ); \*\*:  $p < 0,01$ ).

Im Vergleich zu gesunden Balb/c Kontrollmäusen konnten in Oxa- und PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen reduzierte C3-Konzentrationen detektiert werden (Abbildung 3.31). Dies entspricht dem erwarteten erhöhten Komplementverbrauch in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen. Die Konzentration des Komplementfaktors C3 zwischen PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu Balb/c Mäusen war dabei signifikant verringert. Die C3-Konzentration in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen unter Oxa-Behandlung hingegen unterschied sich nicht signifikant von Balb/c Mäusen. Dies spricht für einen verminderten Komplementverbrauch in Oxa-behandelten Mäusen im Vergleich zur PBS/EtOH Gruppe.

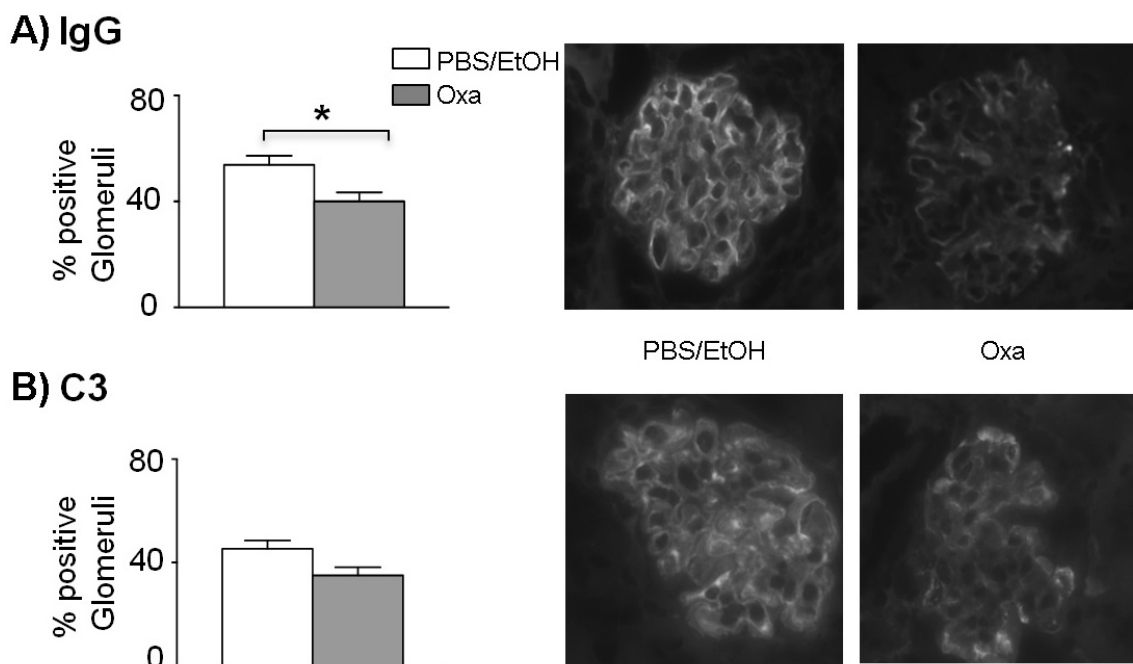
Zusammenfassend deutet der reduzierte Verbrauch des Komplementfaktors C3 im Serum von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen auf eine verminderte Bildung von Immunkomplexen hin. Daher wurde in weiteren Analysen die Ablagerung von IgG und C3 in histologischen Nierenschnitten überprüft.



### 3.3.5.3 Analyse der IgG- und C3-Ablagerungen in der Niere von Oxacyclododecindion-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen

Die vermehrte Bildung von Antigen-Antikörper Komplexen, ausgelöst durch dsDNA-Autoantikörper, führt zur Bildung von großen Immunkomplexen, die durch ihre geringe Löslichkeit ausfallen und sich in der Niere ablagern können (Kapitel 1.3.2). Diese Ablagerungen können über den Nachweis von IgG und C3 in den Glomeruli der Niere mit Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht werden (Kapitel 2.5.5).

Hierfür wurden Kryostatschnitte (Kapitel 2.5.1) von Nieren mit Fluorescein-konjugierten Antikörpern gegen IgG und C3 inkubiert (Kapitel 2.5.5) und die Fluoreszenz durch Dr. J. Weinmann-Menke analysiert.



**Abbildung 3.32: Nachweis von IgG und C3 im Zusammenhang mit Ablagerungen von Immunkomplexen in den Glomeruli von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Repräsentative Aufnahmen des Nachweises von IgG (A) und C3 (B) in den Glomeruli mit Hilfe Fluorescein-konjugierter Antikörper sowie Auswertung von Oxa- und PBS/EtOH-behandelter Nierenschnitte. Dargestellt ist der Mittelwert (+ SEM) der positiven Glomeruli, n = 16, (\*: p < 0,05).

Wie den repräsentativen Aufnahmen A und B in der Abbildung 3.32 entnommen werden kann, war die Intensität der Fluoreszenz in den Glomeruli Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse deutlich geringer. Die Auswertung von Häufigkeit und Schwere der Ablagerungen in der Niere anhand einer Skala ergab signifikant weniger IgG-positive Glomeruli im Zusammenhang von Immunkomplexablagerungen im Vergleich zu Kontrolle (Abbildung 3.32 A). Auch bei der Detektion von C3 konnten unter der Behandlung mit Oxa weniger positive Glomeruli nachgewiesen werden (Abbildung 3.32 B).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Oxa positive Effekte auf klinisch relevante Marker, wie die Ablagerung von IgG und C3 in den Glomeruli als auch auf die Konzentration von IgG- und dsDNA-Antikörpern im Serum hat. Im Einklang mit der Reduzierung proinflammatorischer Mediatoren scheint Oxa die Funktion der Niere zu verbessern und die Progression der Glomerulonephritis in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu verlangsamen.

## 3.4 Targetmoleküle von Oxacyclododecindion

Um weitere Informationen zu Veränderungen in der zellulären Genexpression durch Oxa zu erhalten, wurden Proben aus dem *in-vivo* Versuch für Genexpressionsuntersuchungen mit der DNA-Mikroarray Technik analysiert. Zudem wurde der Effekt von Oxa auf microRNAs untersucht, die in der posttranskriptionellen Genregulation von Entzündungsprozessen von Bedeutung sind (Kapitel 1.4.3). Diese Analysen sollten dazu dienen mögliche Zielgene und Angriffspunkte des Naturstoffes zu identifizieren.

### 3.4.1 Genexpressionsanalysen in der Niere via Mikroarray

Als diagnostisches Hilfsmittel für die Analyse differenzieller Genexpressionen, initiiert durch die Behandlung von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mit Oxa, wurden totalgenomische DNA-Mikroarray Untersuchungen durchgeführt (Kapitel 2.3.12). Hierfür wurden weibliche Mäuse im Alter von zwei bis zweieinhalb Monaten fünf Wochen lang, jeden zweiten Tag mit 1 µg Oxa pro g Körpergewicht behandelt. Die Kontrollgruppe erhielt das Lösungsmittel PBS/EtOH.

Für die Analysen wurde RNA aus den Nieren von drei Tieren pro Behandlungsgruppe isoliert (Kapitel 2.3.12.1), die Qualität der Proben bestimmt (Kapitel 2.3.5) und die Konzentration der Proben gemessen (Kapitel 2.3.4). Dann wurde die RNA in fluoreszenzmarkierte cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.3.12.1) und mit dem Genchip hybridisiert (Kapitel 2.3.12.2). Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten bestimmt und ausgewertet (Kapitel 2.3.12.3). Es wurden zwei DNA-Mikroarray-Analysen mit Proben aus zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mit der Onlineplattform WebArrayDB (Kapitel 2.3.12.3). Diese ermöglicht es große Datensätze zu verwalten und mit unterschiedlichen statistischen Methoden auszuwerten. Im Rahmen der Arbeit wurden drei unterschiedliche statistische Analysen (LIMMA, SAM und t-Test) durchgeführt.

In weiterführenden Analysen wurden dabei nur die Gene betrachtet, die in allen drei Auswertungen signifikant in ihrer Expression verändert waren.

Die Auswertung mit der LIMMA Analyse ergab eine signifikante Regulation ( $p < 0,05$ ) von 2685 Genen, wovon 1157 Gene unter der Behandlung mit Oxa im Vergleich zur Kontrollgruppe in ihrer Expression reduziert und 1528 Gene induziert wurden. Sowohl der t-Test als auch die SAM Analyse wiesen bei 474 Genen eine signifikante Regulation mit einer Wahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  aus. In beiden Analysen wurden 173 Gene in ihrer Expression reprimiert und 301 Gene induziert. Ein Abgleich der Gene ergab eine Schnittmenge von 371 Genen (Anhang 4.6A.2.1), die nach allen drei statistischen Analysen signifikant in ihrer Expression reguliert wurden (Abbildung 3.33).

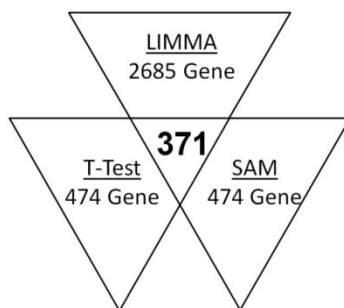


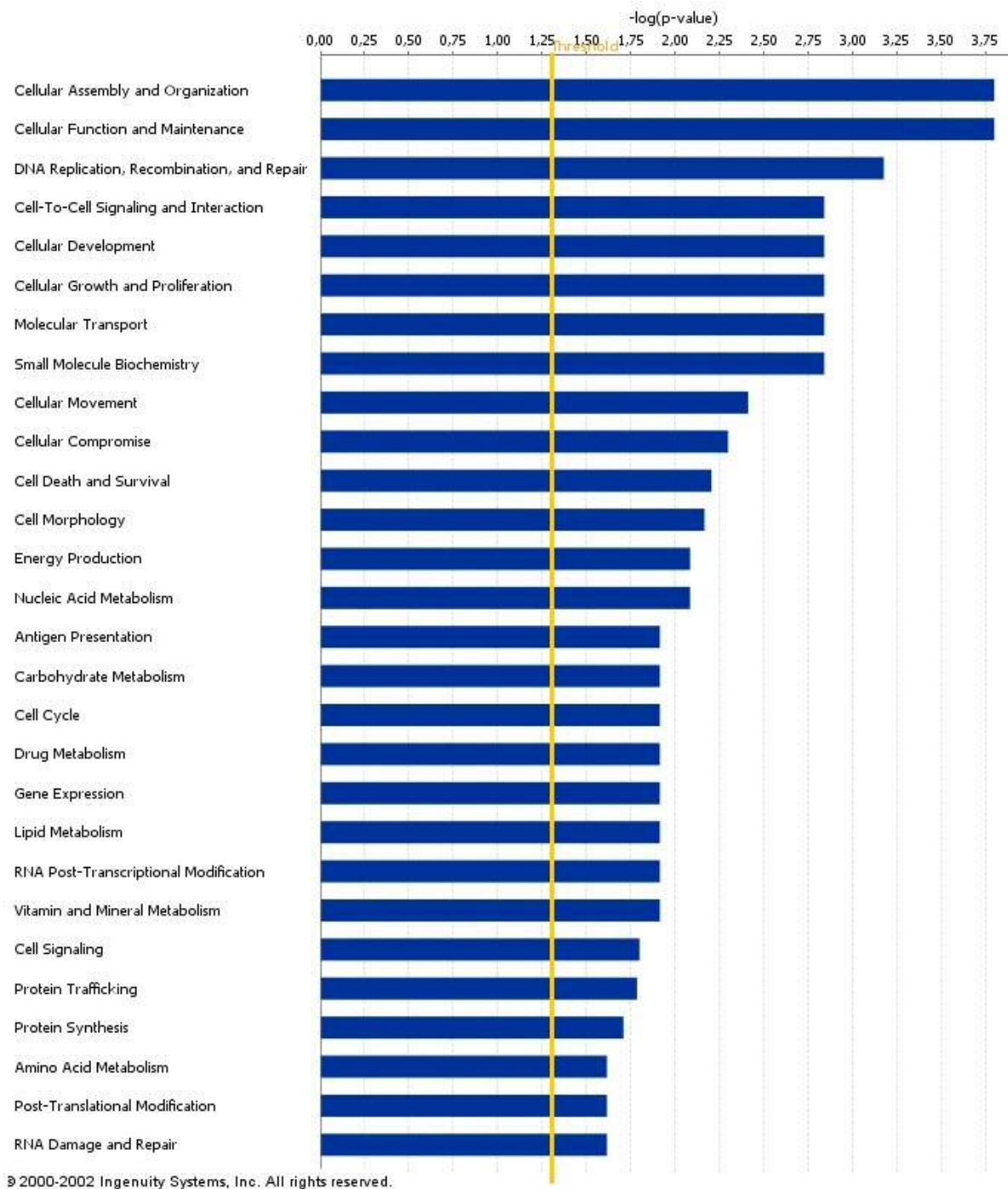
Abbildung 3.33: Statistische Auswertung der DNA-Mikroarray-Analysen mittels WebarrayDB

#### 3.4.1.1 Identifizierung zellulärer Signalwege an denen die signifikant durch Oxacyclododecindion regulierten Gene des DNA-Mikroarray beteiligt sind

Die 371 Gene, deren Expression nach allen drei statistischen Analysen signifikant durch Oxa reguliert waren, wurden mit Hilfe der Ingenuity Software ausgewertet (Kapitel 2.3.12.3). Mit der Ingenuity Knowledge Base konnten 320 Gene erfolgreich einem Archiveintrag zugeordnet werden. Die Ingenuity Software ermöglichte die Visualisierung und Aufklärung der molekularen Funktion der identifizierten Gene, ihre Beteiligung an Signalwegen und biologischen Prozessen sowie ihre Rolle in Erkrankungen.

Zuerst wurden die Gene in Anlehnung an das *Gene Ontology Project* in funktionelle Kategorien eingeteilt, um einen Einblick zu erhalten, an welchen molekularen und zellulären Prozessen die Moleküle, die durch Oxa reguliert wurden, involviert sind.

Aus den 35 Prozesskategorien konnten signifikant regulierte Moleküle in 28 Kategorien eingeordnet werden. So standen 30 Gene ( $p$ -Wert  $1,59 \times 10^{-4}$  -  $3,61 \times 10^{-2}$ ) im Zusammenhang mit der Kategorie „*Cellular Assembly and Organization*“. Oxa schien auch einen Einfluss auf Moleküle zu haben, die funktionell an der „*Cellular Function and Maintenance*“ beteiligt sind. Dieser Rubrik konnten 24 Gene ( $p$ -Wert  $1,59 \times 10^{-4}$  -  $3,42 \times 10^{-2}$ ) zugeordnet werden.



**Abbildung 3.34: Zuordnung der signifikant regulierten Gene an molekularen und zellulären Prozessen durch die Ingenuity Software**

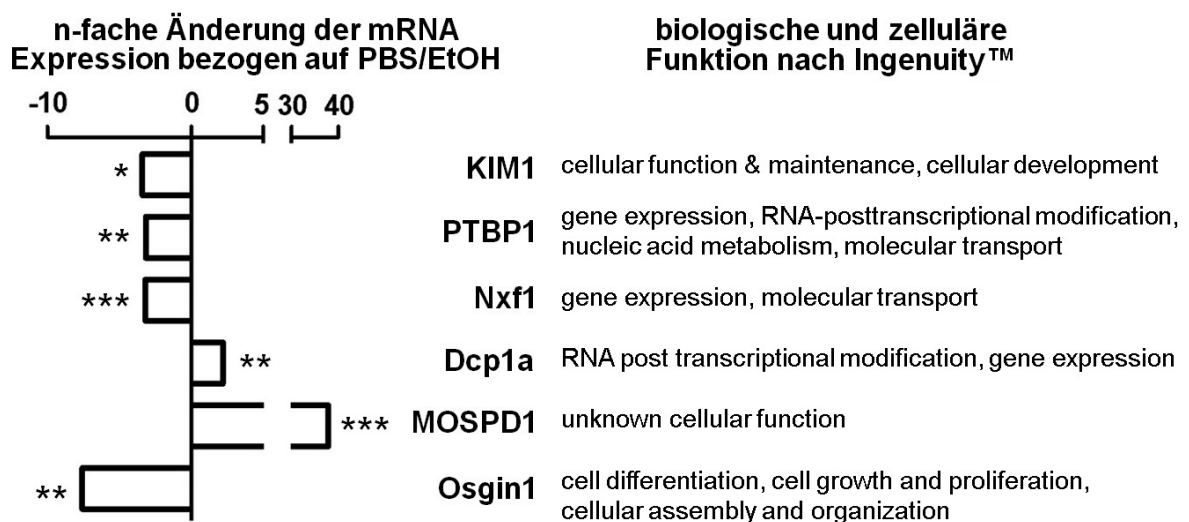
Einordnung der durch Oxa signifikant regulierten Gene nach der WebArrayDB Auswertung in molekulare und zelluläre Prozesse mittels der Ingenuity Software. Dabei wurden die Gene nach ihrer Bedeutung anhand des größten negativ logarithmischen p-Wertes aller beteiligten Genen der jeweiligen Kategorie in absteigender Reihenfolge 28 biologischen und zellulären Funktionen, zugeordnet. Der als gelbe Linie dargestellte Standardschwellenwert (Threshold) liegt bei  $-\log(p\text{-Wert})$  1,3.

Des Weiteren waren 10 Moleküle (p-Wert  $6,67 \times 10^{-4}$  -  $3,61 \times 10^{-2}$ ), die durch Oxa reguliert wurden, an der „DNA Replication, Recombination, and Repair“ beteiligt. Die Behandlung mit Oxa in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen führte darüber hinaus zu einer Regulation von Molekülen, die in den Kategorien „Cell-To-Cell Signaling and Interaction“ (14 Moleküle; p-Wert  $1,44 \times 10^{-3}$  -  $3,61 \times 10^{-2}$ ) und im „Cellular Development“ (31 Moleküle; p-Wert  $1,44 \times 10^{-3}$  -  $3,26 \times 10^{-2}$ ) beteiligt sind. Weitere Kategorien an den die signifikant regulierten Gene beteiligt waren, können der Abbildung 3.34 entnommen werden.

Die Beteiligung der signifikant durch Oxa regulierten Moleküle an molekularen und zellulären Prozessen steht im Einklang mit den bereits dargestellten Ergebnissen aus Kapitel 3.3. Bereits in diesen Abschnitten konnte Oxa durch eine verminderte Produktion von Chemokinen und Zytokinen in Zusammenhang mit Änderungen der zellulären Signaltransduktion und Zellbewegung gebracht werden.

### 3.4.1.2 Überprüfung der DNA-Mikroarray-Analyse mittels qRT-PCR

Die Ergebnisse der DNA-Mikroarray Experimente sollten im nächsten Schritt mit Hilfe von qRT-PCR-Analysen bestätigt werden. Hierfür wurden sieben Gene aus unterschiedlichen funktionellen Kategorien ausgewählt, deren Expression in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen durch die Oxa-Behandlung im DNA-Mikroarray signifikant reguliert detektiert wurden (Abbildung 3.29).



**Abbildung 3.35: Analyse der mRNA Expression ausgewählter Gene in der Niere von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mittels DNA-Mikroarray**

Dargestellt sind die Expressionsänderung von Kim1, PTBP1, Nxf1, Dcp1a, MOSPD1 und Osgin1 in den Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS/EtOH. Des Weiteren wird eine Übersicht über die biologischen und zellulären Funktionen der untersuchten Gene gegeben, (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Der Abbildung 3.35 ist zu entnehmen, dass laut der DNA-Mikroarray-Experimente die mRNA Expression sowohl von *Dcp1a* (*Decapping enzyme homolog A*) als auch *MOSPD1* (*Motile Sperm Domain Containing 1*) in der Niere Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse signifikant herauf reguliert wurde. Hingegen wurde die mRNA Expression von *KIM1* (*Kidney Injury Molecule-1*), *PTBP1* (*polypyrimidine tract binding protein 1*), *Nxf1* (*Nuclear RNA export factor 1*) und *Osgin1* (*Oxidative Stress Induced Growth Inhibitor 1*) durch die Oxa-Behandlung vermindert.

Für die Überprüfung dieser Daten wurde RNA aus den Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse aus drei unabhängig durchgeführten Behandlungsexperimenten verwendet. Zur weiteren Absicherung der Daten wurde *in-vivo* Zellkulturexperimente in LPS/Zytokin-stimulierten Peritonealzellen, die aus dem Bauchraum von sieben unbehandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen isoliert worden waren (Kapitel 2.6.6), durchgeführt und der Effekt von Oxa auf die Expression der oben genannten Gene untersucht.

Wie im Kapitel 2.6.6 beschrieben, wurden die Peritonealzellen in 12-Lochplatten ausgesät, nach dem Mediumwechsel mit 100 ng/ml Oxa 30 min lang inkubiert und anschließend mit einem Zytokin/LPS Ansatz (CM) stimuliert (Kapitel 2.2.4). Mit vier, zehn und 24 Stunden Stimulation wurden für die Peritonealmakrophagen drei Zeitpunkte für die Analyse der Genexpression festgelegt.

Die mRNA Expressionsanalysen in den primären Makrophagen und in den Fragmenten der Niere Oxa-behandelter Mäuse erfolgte mit Hilfe der qRT-PCR (Kapitel 2.3.9). Hierfür wurde RNA isoliert (Kapitel 2.3.1), quantifiziert (Kapitel 2.3.4), in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.3.7) und quantitativ die Genexpression, mit Bezug auf das Kontrollgen GAPDH, analysiert.

### **Osgin1 und MOSPD1**

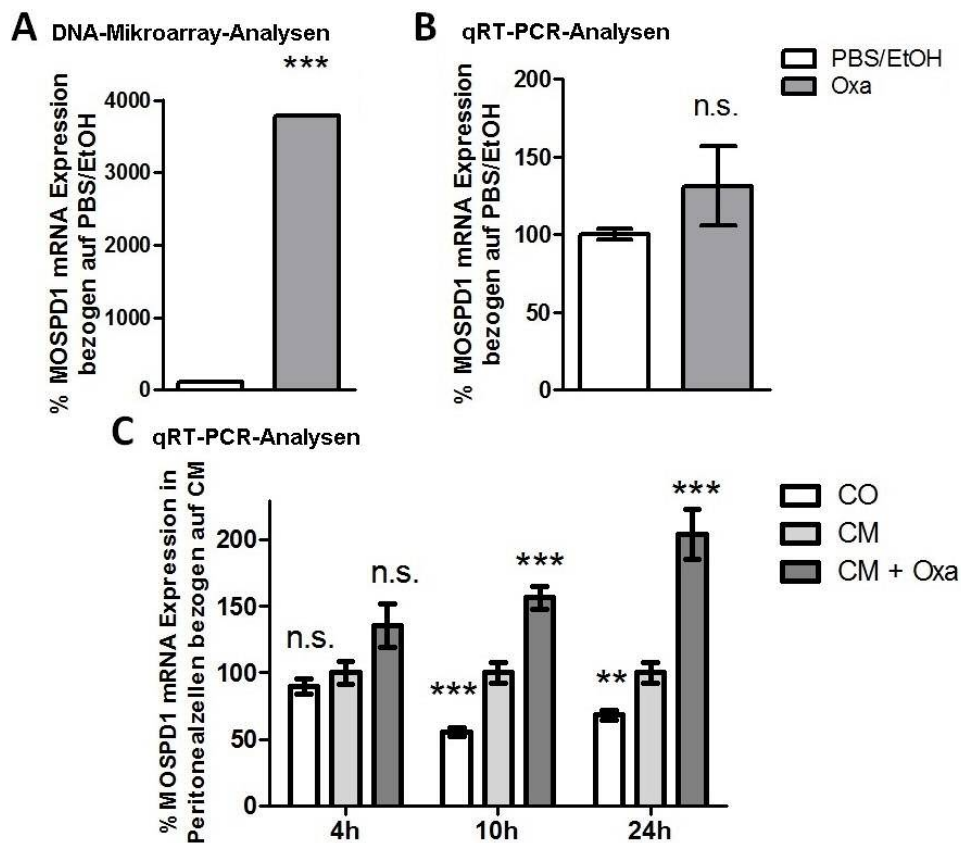
Für die Überprüfung der Ergebnisse aus den DNA-Mikroarray-Analysen wurden Gene ausgesucht die laut den statistischen Auswertungen besonders stark durch Oxa in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen reguliert wurden (4.6A.2.1), wie *MOSPD1* und *Osgin1*. Funktionell scheint das auf dem X Chromosom lozierte *MOSPD1* eine Rolle bei der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) zu spielen (Thaler *et al.*, 2011).

In den DNA-Mikroarray-Analysen konnte eine 37-fache Induktion der mRNA Expression von *MOSPD1* im DNA-Mikroarray unter Oxa-Behandlung nachgewiesen werden (Abbildung 3.36 A). Die darauf folgende Analyse der Nierenproben mittels qRT-PCR ergab einen tendenziellen Anstieg der mRNA Expression von *MOSPD1* bei Oxa-behandelten Tieren (Abbildung 3.36 B).

Die Auswertung der mRNA Expression von MOSPD1 in Makrophagen, die aus Peritonealzellen isoliert worden waren, zeigte 10 Stunden nach Beginn der Stimulation (CM) einen Anstieg der MOSPD1 mRNA Menge im Vergleich mit den Kontrollzellen (CO).

Durch die Behandlung der Zellen mit Oxa (CM + Oxa) konnte im Vergleich zu CM-stimulierten Zellen diese Expression noch um das 1,5-fache stärker induziert werden (Abbildung 3.36 C). Nach 24 Stunden wurde in diesen Zellen eine zweifach erhöhte Expression von MOSPD1 nachgewiesen werden.

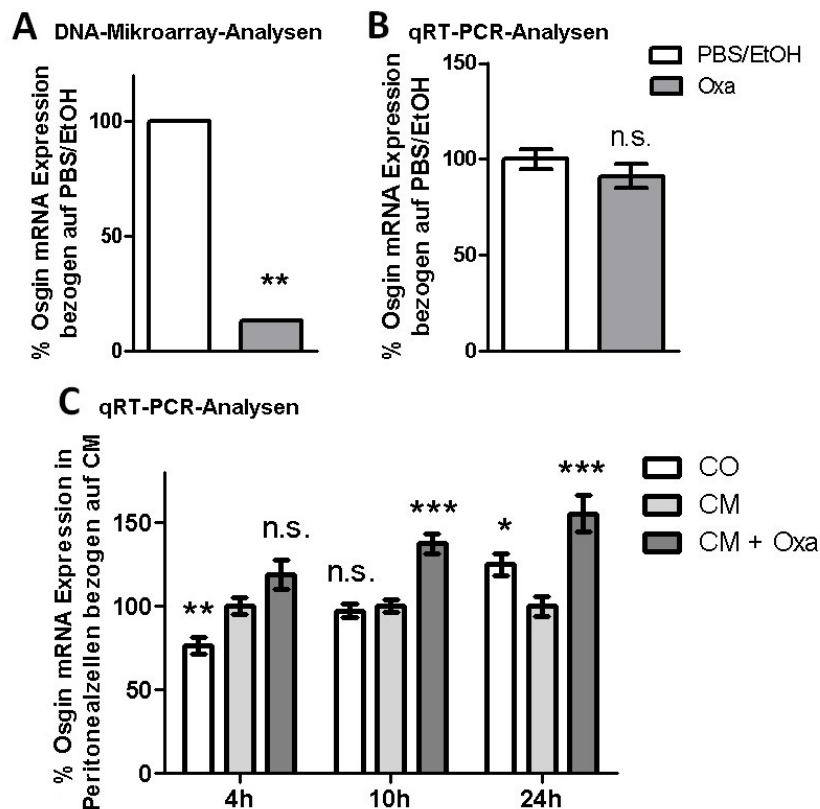
Somit wurde in den Nieren als auch in den Peritonealmakrophagen der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse die vermehrte Expression der mRNA von MOSPD1 aus den DNA-Mikroarray-Analysen zumindest in der Tendenz bestätigt.



**Abbildung 3.36: Analyse der MOSPD1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

In Abbildung A ist aus zwei unabhängig durchgeführten Mikroarray-Analysen die mRNA Expression von MOSPD1 in Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse (n = 6) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (n = 6) dargestellt. Die Expression von MOSPD1 wurde via qRT-PCR-Analysen (B) in den Nieren überprüft (n = 51). In Abbildung C ist die MOSPD1 mRNA Expression in primären Makrophagen dargestellt. Hierfür wurden Peritonealzellen aus sieben MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen isoliert, die Makrophagen aus selbigen selektioniert und 30 min mit 0,1 µg/ml Oxa beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH inkubiert. Anschließend erfolgte die inflammatorische Stimulation (CM) mit LPS (1 µg/ml) und murinen IFN $\gamma$  (300 U/ml) für 4, 10 und 24 h (n-Gesamt pro Zeitpunkt = 84). Dargestellt ist die relative mRNA Expression von MOSPD1 (Mittelwert  $\pm$  SEM) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (100 %) beziehungsweise auf CM (100 %), (n.s.: nicht signifikant; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).

Osgin1 kann als ein Regulator inflammatorischer und anti-inflammatorischer Moleküle (Romanoski *et al.*, 2011) gleich in mehreren funktionellen Kategorien eingeordnet werden. So wurde Osgin1 in Ingenuity Analysen in die Rubrik der Zelldifferenzierung sowie Zellwachstum und -proliferation eingeordnet (Abbildung 3.35). In den DNA-Mikroarray-Analysen konnte in den Nieren unter der Behandlung mit Oxa eine achtfach reduzierte mRNA Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe PBS/EtOH detektiert werden (Abbildung 3.37 A). In den Nierenproben von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnte in den mRNA Expressionsanalysen (Abbildung 3.37 B) die Ergebnisse der Mikroarray-Daten nicht bestätigt werden, da keine Regulation der Osgin1 mRNA nachweisbar war. Ebenfalls konträr zu den Ergebnissen der Abbildung 3.37 A wurde in den Zellkulturexperimenten mit Peritonealmakrophagen nach 24 Stunden CM Stimulation die Osgin1 mRNA Expression von CO und CM + Oxa-behandelten Zellen signifikant induziert, bezogen auf Zellen, die mit CM inkubiert wurden (Abbildung 3.37 C).



**Abbildung 3.37: Analyse der Osgin1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

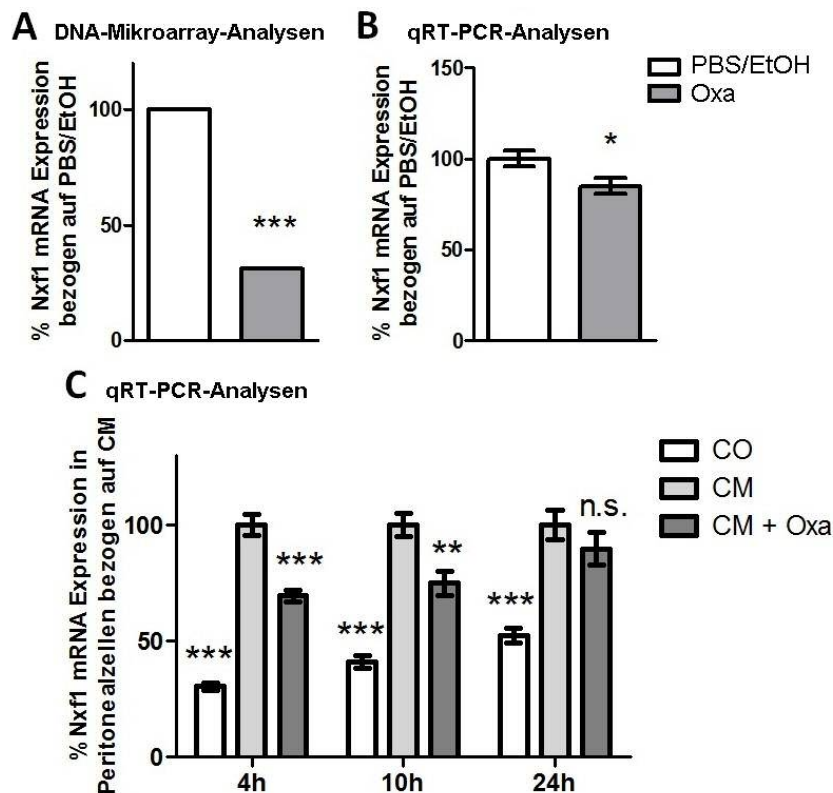
Zwei unabhängig durchgeführte Mikroarray-Analysen (A) wurden hinsichtlich der mRNA Expression von Osgin1, in Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse (n = 6) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (n = 6), dargestellt. Dieses Ergebnis wurde via qRT-PCR-Analysen (B) in den Nieren überprüft (n = 51). In Abbildung C ist die Osgin1 mRNA Expression mittels qRT-PCR in primären Makrophagen dargestellt. Hierfür wurden Peritonealzellen aus sieben MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen isoliert, die Makrophagen aus selbigen selektioniert und 30 min mit 0,1 µg/ml Oxa beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH inkubiert. Eine anschließende inflammatorische Stimulation (CM) mit LPS (1 µg/ml) und murinen IFN $\gamma$  (300 U/ml) erfolgte für 4, 10 und 24 h (n-Gesamt pro Zeitpunkt = 84). Dargestellt ist die relative mRNA Expression von Osgin1 (Mittelwert  $\pm$  SEM) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (100 %) beziehungsweise auf CM (100 %), (n.s.: nicht signifikant; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).



Zusammenfassend konnte der Nachweis für eine signifikante Regulation von Osgin1 in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nicht erbracht werden. Allerdings konnten qRT-PCR-Analysen in Makrophagen zeigen, dass eine langfristige inflammatorische Stimulation einen reprimierenden Effekt auf die mRNA Menge von Osgin1 hat. Die Behandlung der stimulierten Makrophagen mit Oxa kann diese Inhibition aufheben und führt zu einer vermehrten Expression von Osgin1

### **Nxf1, Dcp1a und PTBP1**

Eine weitere Gruppe von Genen, deren mRNA Expression zur Absicherung der DNA-Mikroarray-Analyse untersucht wurde, steht funktionell im Zusammenhang mit Veränderungen der Genexpression (Abbildung 3.38). Zu dieser Gruppe gehören *Nxf1*, *Dcp1* und *PTBP1*.



**Abbildung 3.38: Analyse der *Nxf1* mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

In Abbildung A ist die *Nxf1* mRNA Expression in der Niere von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen ( $n = 6$ ) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH ( $n = 6$ ) aus zwei unabhängig durchgeführten Mikroarray-Analysen dargestellt. Mittels qRT-PCR-Analysen (B) wurden die Ergebnisse in Nieren der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen verifiziert ( $n = 51$ ). In Abbildung C wurde die *Nxf1* mRNA Expression mittels qRT-PCR in primären Makrophagen dargestellt. Hierfür wurden Peritonealzellen aus sieben MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen isoliert, die Makrophagen aus selbigen selektioniert und 30 min mit 0,1  $\mu\text{g/ml}$  Oxa beziehungsweise mit EtOH inkubiert. Eine anschließende inflammatorische Stimulation (CM) mit LPS (1  $\mu\text{g/ml}$ ) und murinen IFN $\gamma$  (300 U/ml) erfolgte für 4, 10 und 24 h ( $n$ -Gesamt pro Zeitpunkt = 84). Dargestellt ist die relative mRNA Expression von *Nxf1* (Mittelwert  $\pm$  SEM) bezogen auf PBS/EtOH (100 %) beziehungsweise auf CM (100 %), (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

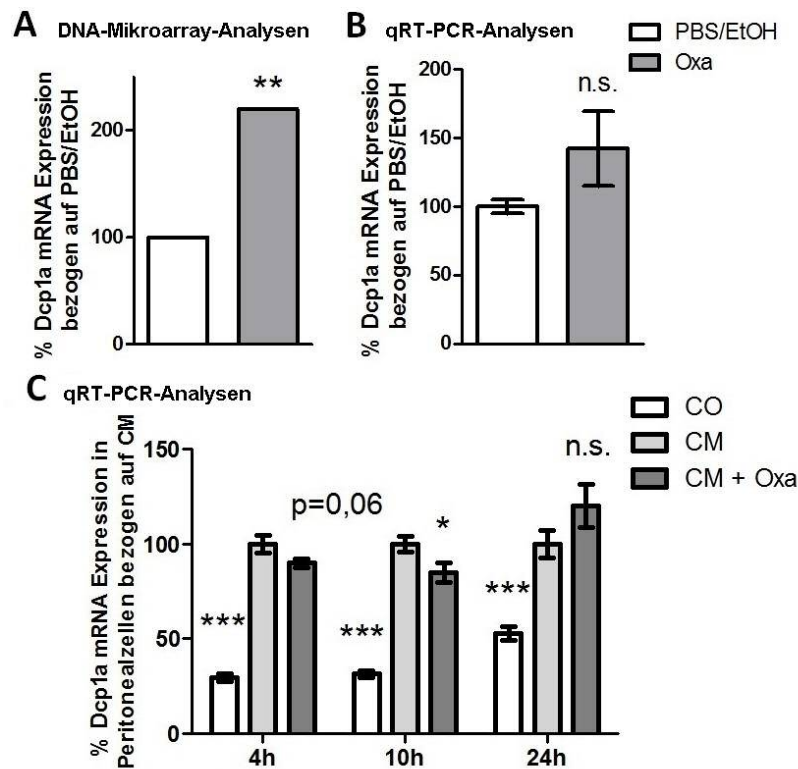
So zeigten die DNA-Mikroarray-Analysen eine deutliche Regulation der Expression von Nxf1, welcher Poly-(A)<sup>+</sup> RNA aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert (Erkman and Kutay, 2004).

Die Behandlung der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse mit Oxa führte in der Niere zu einer 3,2-fach reduzierten mRNA Expression von Nxf1 (Abbildung 3.38 A) im Vergleich zur PBS/EtOH Kontrollgruppe. Diese reduzierte Expression von Nxf1 in den Nieren von behandelten Mäusen (Abbildung 3.38 B) konnte durch qRT-PCR-Analysen bestätigt werden. In den Zellkulturexperimenten führte die LPS/Zytokinstimulation (CM) der Peritonealmakrophagen zu einer vermehrten mRNA Expression von Nxf1 (Abbildung 3.38 C). Im Vergleich zu den CM Zellen konnte in den frühen Endpunktanalysen (vier und zehn Stunden CM) in Oxa-behandelten Peritonealmakrophagen 20 - 30 % weniger der Nxf1 mRNA ermittelt werden (Abbildung 3.38 C). Zusammenfassend kann die durch Oxa reduzierte mRNA Expression von Nxf1, die in den DNA-Mikroarray-Analysen detektiert wurde, mit zusätzlichen *in-vitro* als auch *in-vivo* Untersuchungen bestätigt werden.

Dcp1a, nimmt durch seine Funktion als mRNA abbauendes Enzym einen erheblichen Einfluss auf die mRNA-Stabilität (Lapointe and Brakier-Gingras, 2003). In den DNA-Mikroarray-Analysen wurde im Vergleich zur PBS/EtOH Kontrollgruppe eine zweifache Induktion der mRNA Expression von Dcp1a unter Oxa-Behandlung detektiert (Abbildung 3.39 A).

Die qRT-PCR-Analyse der mRNA Expression zeigte in den Nierenproben Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse lediglich eine tendenziell vermehrte mRNA Expression von Dcp1a (Abbildung 3.39 B). In den Zellkulturexperimenten führte die LPS/Zytokinstimulation (CM) im Vergleich zur Kontrollgruppe (CO) in den Peritonealmakrophagen zu einer vermehrten Expression der Dcp1a mRNA (Abbildung 3.39 C). Die Behandlung der Peritonealmakrophagen mit Oxa hatte auf die Induktion der mRNA vier und 24 Stunden nach Beginn der CM Stimulation keinen signifikanten Effekt (Abbildung 3.39 C).

Lediglich die Endpunktanalyse 10 Stunden nach Beginn der Stimulation, zeigte in Oxa-behandelten Peritonealzellen eine 20 %ige Reduktion der mRNA Quantität von Dcp1a im Vergleich zur CM Kontrolle. Durch die zusätzlich durchgeführten qRT-PCR-Analysen in den Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen sowie in den Zellkulturexperimenten konnte die Induktion der Dcp1a mRNA Expression in den untersuchten Zeitpunkten nicht bestätigt werden.

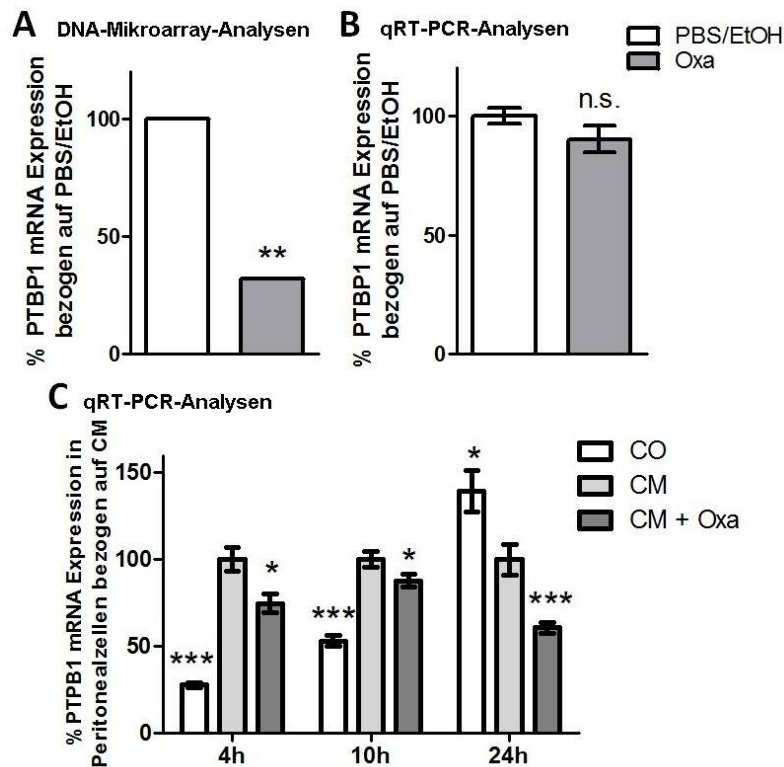


**Abbildung 3.39: Analyse der Dcp1a mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen**

In Abbildung A sind die Ergebnisse zur mRNA Expression von Dcp1a in den Nieren von Oxa-behandelten MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen (n = 6) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (n = 6) aus zwei unabhängig durchgeführten Mikroarray-Analysen dargestellt. Mittels qRT-PCR-Analysen (B) wurden diese Ergebnisse in den Nieren überprüft (n = 51). In Abbildung C ist die Dcp1a mRNA Expression mittels qRT-PCR in primären Makrophagen dargestellt. Hierfür wurden Peritonealzellen aus sieben MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen isoliert, Makrophagen aus selbigen selektioniert und 30 min mit 0,1 µg/ml Oxa oder Lösungsmittel EtOH inkubiert. Eine inflammatorische Stimulation (CM) mit LPS (1 µg/ml) und murinen IFN $\gamma$  (300 U/ml) erfolgte für 4, 10 und 24 h (n-Gesamt pro Zeitpunkt = 84). Dargestellt ist die relative mRNA Expression von Dcp1a (Mittelwert  $\pm$  SEM) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (100 %) beziehungsweise auf CM (100 %), (n.s.: nicht signifikant; \*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001).

Wie Dcp1a kann auch PTBP1 die Stabilität von RNAs beeinflussen (Romanelli *et al.*, 2013; Pautz *et al.*, 2006). In Abbildung 3.40 A wurde dargestellt, dass in den DNA-Mikroarray-Analysen ein signifikant reduzierender Effekt von Oxa auf die PTBP1 mRNA Expression detektiert werden konnte. Dies konnte bei der Überprüfung mittels qRT-PCR in weiteren Nierenproben von Oxa-behandelten MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen (Abbildung 3.40 B) nicht bestätigt werden.

Hingegen konnte in Peritonealmakrophagen unter inflammatorischen Bedingungen (CM) eine vermehrte Expression der mRNA von PTBP1 nach vier und zehn Stunden Inkubation gezeigt werden (Abbildung 3.40 C). 24 Stunden nach Beginn der CM Stimulation konnte allerdings eine verminderte mRNA Menge von PTBP1 im Vergleich zu unbehandelten Zellen (CO) nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.40: Analyse der PTBP1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

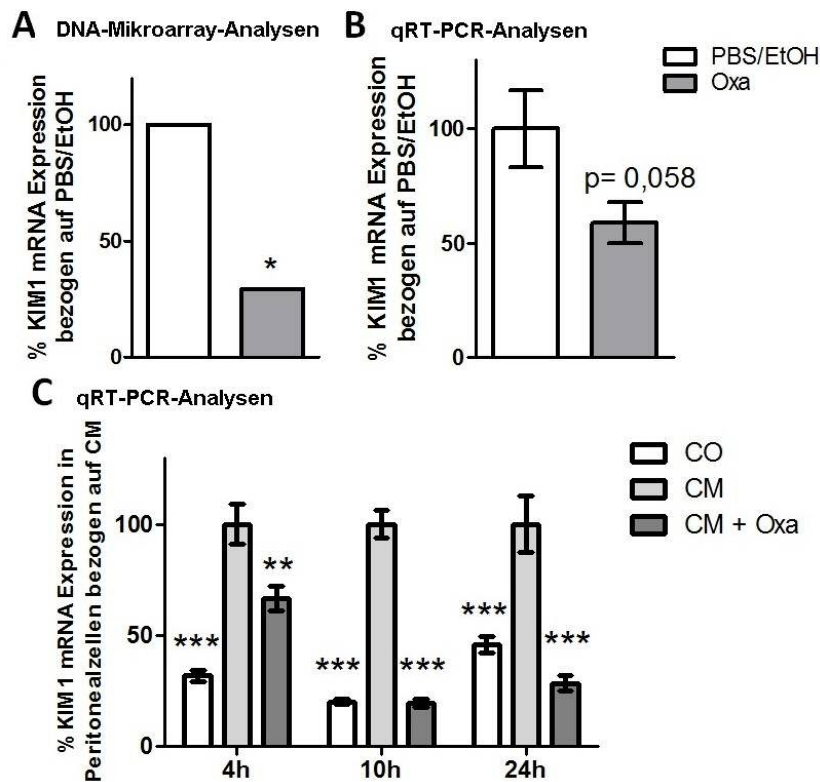
Zwei unabhängig durchgeführte Mikroarray-Analysen sind in **A** zusammengefasst und zeigen die mRNA Expression von PTBP1 in Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse (n = 6) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (n = 6). Die Expression von PTBP1 wurde mittels qRT-PCR-Analysen (**B**) in den Nieren der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse verifiziert (n = 51). In **Abbildung C** ist die PTBP1 mRNA Expression in primären Makrophagen dargestellt. Hierfür wurden Peritonealzellen aus sieben MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen isoliert, die Makrophagen aus selbigen selektiert und 30 min mit 0,1 µg/ml Oxa beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH inkubiert. Anschließend erfolgte die inflammatorische Stimulation (CM) mit LPS (1 µg/ml) und murinen IFN $\gamma$  (300 U/ml) für 4, 10 und 24 h (n-Gesamt pro Zeitpunkt = 84). Dargestellt ist die relative mRNA Expression von PTBP1 (Mittelwert  $\pm$  SEM) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (100 %) beziehungsweise auf CM (100 %), (n.s.: nicht signifikant; \*: p<0,05; \*\*\*: p<0,001).

Alle Endpunktanalysen in den Peritonealmakrophagen hatten jedoch im Vergleich zu den Kontrollzellen (CM) gemein, dass die Oxa-Behandlung zu einer signifikanten Reduktion der PTBP1 mRNA Expression führte (**Abbildung 3.40 C**).

Zusammenfassend kann eine Regulation der mRNA Expression von PTBP1 durch Oxa nicht vollständig bestätigt werden. In den primären Makrophagen konnten signifikante Regulationen der PTBP1 mRNA Menge durch CM und CM + Oxa-Behandlung festgestellt werden. Es bedarf jedoch weiterer Analysen um zu klären, welche Rolle dieser Effekt in inflammatorischen Prozessen, an den Makrophagen beteiligt sind, spielt.

## KIM1

In den Nierenproben von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnte in den DNA-Mikroarray-Analysen auch eine Regulation der mRNA Expression des *Kidney Injury Molecule-1* (KIM1) signifikant nachgewiesen werden. Unter der fünfwöchigen Behandlung mit Oxa kam es zu einer Reduktion der KIM1 mRNA Expression um den Faktor 3,4 (Abbildung 3.41 A). KIM1 wurde für die Überprüfung ausgewählt, da in LN-Patienten der Nachweis von KIM1 in Zusammenhang mit tubulointerstitiellen Entzündungen und der Manifestation einer Glomerulonephritis gebracht wurde (Nozaki *et al.*, 2014). Der reprimierende Effekt von Oxa auf die KIM1 mRNA-Expression konnte in den Nierenproben der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse tendenziell mittels qRT-PCR belegt werden (Abbildung 3.41 B).

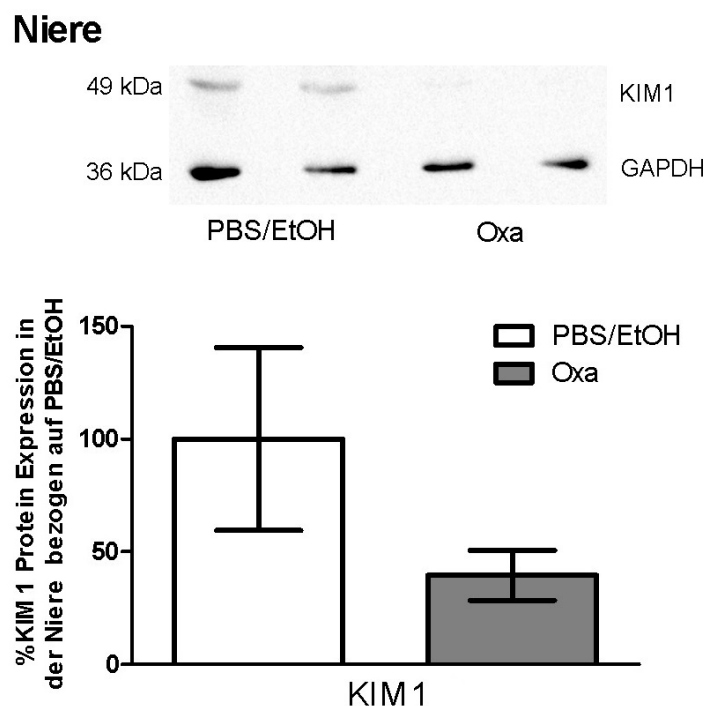


**Abbildung 3.41: Analyse der KIM1 mRNA Expression unter Oxa-Behandlung in der Niere und in Peritonealmakrophagen von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

In Abbildung A ist die KIM1 mRNA Expression in der Niere von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen (n = 6) im Vergleich zur Kontrolle PBS/EtOH (n = 6) aus zwei unabhängig durchgeführten Mikroarray-Analysen dargestellt. Mittels qRT-PCR-Analysen (B) wurden die Ergebnisse in weiteren Nierenproben überprüft (n = 51). In Abbildung C wurde die KIM1 mRNA Expression mittels qRT-PCR in primären Makrophagen dargestellt. Hierfür wurden Peritonealzellen isoliert, die Makrophagen aus selbigen selektiert und 30 min mit 0,1 µg/ml Oxa beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH inkubiert. Eine anschließende inflammatorische Stimulation (CM) mit LPS (1 µg/ml) und murinen IFN $\gamma$  (300 U/ml) erfolgte für 4, 10 und 24 h (n-Gesamt pro Zeitpunkt = 84). Dargestellt ist die relative mRNA Expression von KIM1 (Mittelwert  $\pm$  SEM) bezogen auf die Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (100 %) beziehungsweise auf CM (100 %), (n.s.: nicht signifikant; \*: p<0,05; \*\*: p<0,01; \*\*\*: p<0,001).

Die Zellkulturexperimente in primären Makrophagen (Abbildung 3.41 C) zeigten im Vergleich zu den Kontrollzellen (CO) eine Induktion der mRNA Expression von KIM1 unter inflammatorischen Bedingungen (CM). Die Oxa-Behandlung führte zu einer signifikanten Reduktion von KIM1 auf mRNA Ebene in allen analysierten Endpunkten (Abbildung 3.41C). Der modulierende Effekt von Oxa auf KIM1 wurde zusätzlich auf Proteinebene in Nieren von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen und PBS/EtOH Kontrolltieren analysiert.

Hierfür wurden Nierenfragmente der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen in RIPA-Puffer homogenisiert (Kapitel 2.4.1) und die Gesamtproteinmenge mittels Bradford-Analyse bestimmt (Kapitel 2.4.2). Aus jeder Probe wurden 250 µg Gesamtproteinlysat wie im Kapitel 2.4.3 angegeben gefällt, auf ein SDS-Polyarcylamidgel aufgetragen und aufgetrennt (Kapitel 2.4.4). Anschließend erfolgte die Immundetektion mit dem Western Blot Verfahren (Kapitel 2.4.5). Eingesetzt wurde ein polyklonaler Antikörper gegen KIM1 und ein monoklonaler Antikörper gegen GAPDH (Kapitel 2.1.10).



**Abbildung 3.42: Detektion von KIM1 Protein in Nieren von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen wurden im Alter von 2-2,5 Monaten für fünf Wochen jeden zweiten Tag mit Oxa (1 µg pro g Körpergewicht) oder mit dem Lösungsmittel PBS/EtOH i.p. behandelt. Für die Western Blot-Analysen wurden Nierenproben aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen eingesetzt. Dargestellt ist eine repräsentative Aufnahme eines Western Blot in dem 250 µg Proteinlysat aus Nieren von Oxa- und PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen aufgetrennt und KIM1 und GAPDH mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen wurden. Es wurden drei Western Blot-Analysen unabhängig voneinander durchgeführt und quantitativ mittels der Image Lab Software ausgewertet.

Dem repräsentativen Western Blot in Abbildung 3.42 ist zu entnehmen, dass in Nieren von PBS/EtOH-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen KIM1 auf Proteinebene nachweisbar war. Im ChemiDoc™ wurden die Proteinbanden detektiert und mit der Software Image Lab™ quantifiziert. In der quantitativen Auswertung konnte tendenziell eine verminderte Expression von KIM1 auch auf Proteinebene durch die Behandlung mit Oxa in den Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nachgewiesen werden.

#### **3.4.1.3 Netzwerk und Upstream-Analyse der DNA-Mikroarray-Daten mit Qiagens Ingenuity Software**

Mit Hilfe der Ingenuity Software konnten 320 der 371 Gene, die durch Oxa signifikant reguliert wurden, einem Archiveintrag der Ingenuity Knowledge Base zugeordnet werden. Neben der Visualisierung und Aufklärung der molekularen Funktion der identifizierten Gene, ermöglicht die Ingenuity Software auch die Gene in Netzwerke zu organisieren und mögliche Transkriptionsregulatoren zu identifizieren, die die beobachteten mRNA Expressionsänderungen durch eine Oxa-Behandlung erklären könnten.

Zuerst wurde eine Netzwerkanalyse durchgeführt, die die Gene aufgrund ihrer Interaktion gruppiert, um funktionelle Schnittstellen aufzuzeigen. In der Analyse wird ein numerischer Wert (Netzwerkscore) angegeben. Dieser Wert berücksichtigt zum einem die Gesamtzahl signifikant regulierter Gene aus dem Datensatz und die Anzahl signifikant regulierter Gene aus dem Datensatz, die in das Netzwerk passen, zum anderen auch die Anzahl aller Moleküle aus der Ingenuity Knowledge Base, die potentiell in das Netzwerk eingebaut werden könnten. Basierend auf der hypergeometrischen Verteilung wurde ein Netzwerkscore mittels Exakter-Test-nach-Fisher (right tailed) berechnet (Netzwerkscore =  $-\log(\text{Exakter-Test-nach-Fisher})$ ).

Für die Netzwerkanalyse wurde pro Netzwerk eine Maximalzahl von 35 Molekülen zugelassen. Aus dem Datensatz der 320 durch Oxa signifikant regulierten Gene konnte Ingenuity 18 Netzwerke generieren, wobei einige Moleküle in mehreren Netzwerken berücksichtigt wurden. Des Weiteren analysierte Ingenuity die am Netzwerk beteiligten Gene hinsichtlich ihrer Funktion und Beteiligung an Erkrankungen.

Im Anhang 4.6A.1 sind in der Tabelle 4.6A.1.2 die Netzwerke der signifikant regulierten Gene mit Molekülen aus der Ingenuity Knowledge Base unter Berücksichtigung des Netzwerkscore dargestellt. Des Weiteren befindet sich im Anhang 4.6A.1.1 für jedes Netzwerk die graphische Darstellung der Molekülinteraktionen. Insgesamt wurden 252 Gene von den 320 identifizierten Genen, die durch Oxa reguliert wurden, in die Netzwerkanalysen einbezogen. Im Folgenden wurde in den Netzwerken nach Genen gesucht, die aus der Ingenuity Knowledge Base integriert wurden und in starker Assoziation beziehungsweise Interaktion mit den integrierten Daten aus der DNA-

Mikroarray-Analyse standen. Hierbei zeigt sich zum einen eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B (Netzwerk 1), p38 MAPK (Netzwerk 7) und p53 (Netzwerk 15). Zum anderen wurden gehäuft Interaktionen mit Ubiquitin c (Netzwerk 2, 3, 10 und 11) und verschiedener microRNAs vorhergesagt. Diese könnten möglicherweise zentrale Angriffspunkte von Oxa sein, die in weiteren Untersuchungen analysiert werden sollten. Der Abgleich der an den Netzwerken beteiligten Gene zeigte des Weiteren, dass in drei Netzwerken die Interaktion der Gene mit den Funktionen „*Cell Death and Survival*“ und „*Organ Morphology*“ in Zusammenhang gebracht werden konnten. Insgesamt wurden 16 von 35 Funktionskategorien in Kontext mit molekularen und zellulären Prozessen gebracht.

In einem weiteren Schritt wurden die durch Oxa signifikant regulierten Gene aus den Nieren der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse als Basis für die Identifizierung möglicher Transkriptionsregulatoren genutzt, indem Ingenuity die Moleküle in regulatorische Kaskaden einordnet, um die beobachteten Expressionsänderungen im Datensatz zu erklären. In diesem Zusammenhang wird Auskunft gegeben über die biologische Aktivität der vorhergesagten Moleküle, ihre Beteiligung an regulatorischen Wegen und mit welchen Erkrankungen die Moleküle assoziiert sind. In dieser sogenannten „*Upstream Regulator Analytic*“ integriert Ingenuity die tatsächliche Genexpressionsänderung der signifikant regulierten Moleküle aus den DNA-Mikroarray-Daten, um eine Vorhersage mittels des *z-scores* über die Aktivierung oder Inhibition der Transkriptionsregulatoren zu treffen. Erneut können diese Daten als Netzwerke dargestellt werden, um die Interaktion der Moleküle zu visualisieren. Mit diesen Aussagen können neue Arbeitshypothesen entwickelt werden wie Oxa die Genexpression in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen ändert. Diese Hypothesen sollten dann in weiterführenden Experimenten analysiert werden.

Mit Hilfe der „*Upstream Regulator*“-Analyse wurden 434 Moleküle identifiziert, die im Zusammenhang mit den durch Oxa signifikant regulierten Genen aus dem Mikroarray stehen und an einer möglichen Regulation dieser Gene beteiligt sein könnten. Wie der Tabelle 3.1 entnommen werden kann, wurden für 47 Moleküle eine Inhibierung durch Oxa vorhergesagt und für 12 *Upstream*-Regulatoren eine Aktivierung durch Oxa. Bei den identifizierten Molekülen handelt es sich hauptsächlich um microRNAs.



Tabelle 3.1: Identifizierung möglicher Upstream-Regulatoren durch die Analyse der DNA-Mikroarray-Daten mittels Ingenuity

Upstream-Regulator	z-score	Moleküle	Upstream-Regulator	z-score	Moleküle
miR-3152-5p	-2.813 (Inhibiert)	8	miR-2355-3p	-2.166 (Inhibiert)	12
miR-3145-3p	-2.630 (Inhibiert)	7	miR-3691-5p	-2.157 (Inhibiert)	8
D-glucose	-2.596 (Inhibiert)	7	miR-379-5p	-2.155 (Inhibiert)	9
miR-376a-3p	-2.570 (Inhibiert)	10	miR-4724-3p	-2.138 (Inhibiert)	8
miR-4674	-2.547 (Inhibiert)	14	miR-204-5p	-2.132 (Inhibiert)	20
TP53	-2.535 (Inhibiert)	22	miR-4311	-2.128 (Inhibiert)	8
miR-760-3p	-2.524 (Inhibiert)	17	miR-647	-2.095 (Inhibiert)	14
miR-4733-5p	-2.407 (Inhibiert)	6	miR-4425	-2.071 (Inhibiert)	11
miR-3064-5p	-2.395 (Inhibiert)	14	miR-3192-5p	-2.069 (Inhibiert)	12
hydrogen peroxide	-2.390 (Inhibiert)	7	miR-1587	-2.067 (Inhibiert)	18
miR-4796-5p	-2.376 (Inhibiert)	9	miR-4768-3p	-2.057 (Inhibiert)	15
miR-30c-5p	-2.373 (Inhibiert)	23	miR-3913-3p	-2.039 (Inhibiert)	10
miR-149-5p	-2.369 (Inhibiert)	14	miR-21-5p	-2.025 (Inhibiert)	10
miR-4720-5p	-2.287 (Inhibiert)	10	miR-4513	-2.016 (Inhibiert)	7
miR-539-5p	-2.251 (Inhibiert)	20	miR-3681-5p	-2.000 (Inhibiert)	4
miR-1231	-2.236 (Inhibiert)	5	miR-3917	-2.000 (Inhibiert)	4
GDF2	-2.219 (Inhibiert)	5	miR-521	-2.000 (Inhibiert)	4
miR-202-3p	-2.219 (Inhibiert)	22	miR-4636	2.000 (Aktiviert)	4
miR-2116-5p	-2.219 (Inhibiert)	5	miR-610	2.008 (Aktiviert)	7
miR-4635	-2.219 (Inhibiert)	5	NFE2L2	2.016 (Aktiviert)	8
miR-489-3p	-2.219 (Inhibiert)	5	miR-3673	2.025 (Aktiviert)	7
miR-3131	-2.207 (Inhibiert)	5	miR-615-5p	2.050 (Aktiviert)	16
miR-4712-3p	-2.207 (Inhibiert)	5	miR-3960	2.107 (Aktiviert)	14
miR-3569-3p	-2.204 (Inhibiert)	8	miR-4721	2.119 (Aktiviert)	16
miR-548h-5p	-2.200 (Inhibiert)	5	miR-324-5p	2.150 (Aktiviert)	19
miR-4675	-2.185 (Inhibiert)	13	miR-4759	2.208 (Aktiviert)	13
miR-219a-5p	-2.184 (Inhibiert)	12	miR-4781-3p	2.219 (Aktiviert)	5
miR-513c-5p	-2.178 (Inhibiert)	9	miR-4677-3p	2.240 (Aktiviert)	8
miR-4720-3p	-2.177 (Inhibiert)	5	miR-4736	2.530 (Aktiviert)	20
miR-4487	-2.170 (Inhibiert)	11			

### 3.4.2 mRNA-Stabilitätsuntersuchungen in Oxacyclododecindion-behandelten Zellen mit 5,6-Dichlorobenzimidazole 1- $\beta$ -D-ribofuranoside

Wie in Kapitel 3.3 dargestellt, konnte Oxa die Expression proinflammatorischer Gene in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen signifikant reduzieren. Die Regulation der Genexpression dieser Mediatoren durch Oxa kann auf einer Vielzahl von verschiedenen Mechanismen beruhen (Kapitel 1.4). Eine wesentliche Ebene bei der Genregulation von inflammatorischen Mediatoren ist die Modulation der mRNA-Stabilität, einer der wichtigsten posttranskriptionellen Regulationsmechanismen (Kapitel 1.4.2). Je stabiler eine mRNA ist, desto langsamer wird sie abgebaut und kann dementsprechend häufiger translatiert werden. Daher wurde im Folgenden untersucht, ob Oxa die Stabilität proinflammatorischer mRNA reguliert. Die Transkription und der Abbau von mRNA stehen im Gleichgewicht, aus

diesem Grund wurde für die Analyse eines veränderten mRNA Abbaus die mRNA-Neusynthese durch den Transkriptioninhibitor DRB gehemmt (Kapitel 2.2.5).

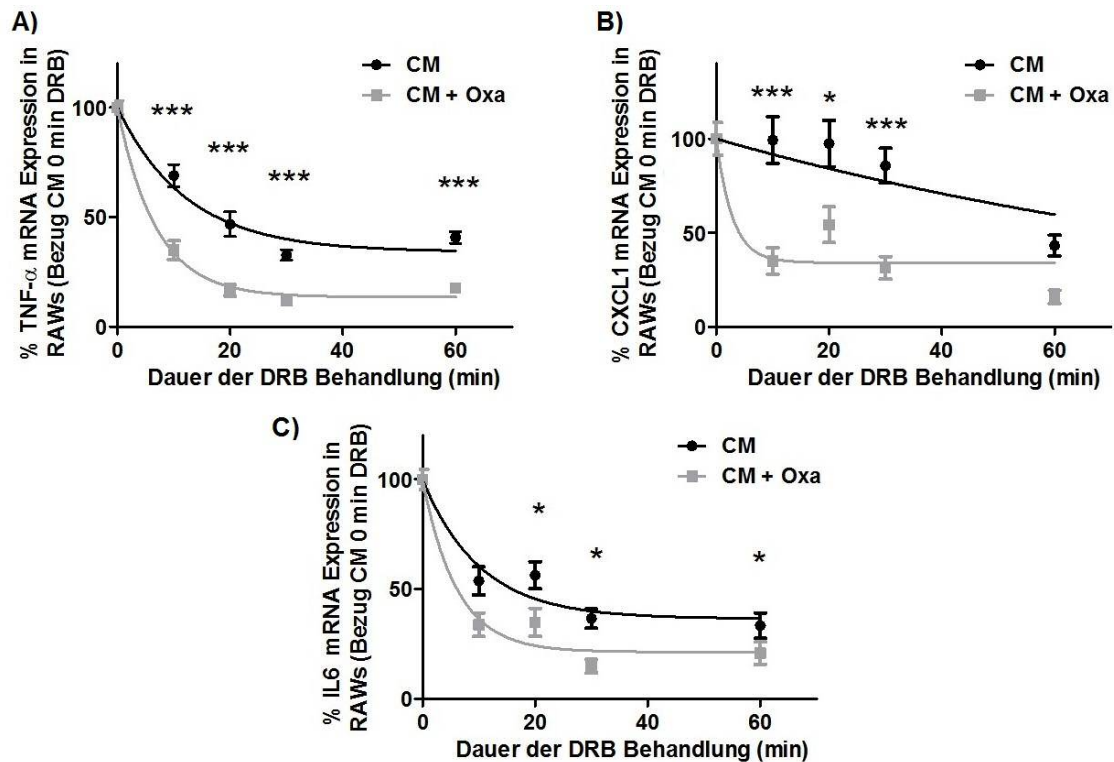
Da Makrophagen in der Pathogenese der Glomerulonephritis eine wichtige Rolle spielen, wurden die Experimente in immortalisierten makrophagenähnlichen Zellen (murine RAW 264.7-Zellen und humane MM6) als auch in primären Makrophagen, die aus MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen isoliert wurden, durchgeführt.

Die RAW 264.7-Zellen wurden in 12-Loch Platten ausgesät und nach 24 Stunden ein Wechsel auf FCS-freies Medium durchgeführt. MM6 Zellen wurden in 12-Loch Platten direkt in FCS-reduziertes Medium ausgesät und wie auch die RAW 264.7 nach 16 Stunden in den Reaktionsgefäßen mit LPS (1 µg/ml) und IFN $\gamma$  (300 U/ml) vier Stunden lang stimuliert (Kapitel 2.2.4). Anschließend wurden beide Zelllinien 30 Minuten lang mit Oxa (100 ng/ml) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH (0,1 %) inkubiert.

Die primären Zellen wurden mittels Peritoneallavage gewonnen und die Makrophagen selektioniert (Kapitel 2.6.6). Die Inkubation und Stimulation erfolgte wie bei den immortalisierten Zelllinien. Die anschließende DRB-Behandlung und mRNA Isolation wurde bei allen Zellen gleich durchgeführt.

Alle CM-stimulierten Zellen wurden mit 25 µg/ml DRB für 0, 10, 20, 30 und 60 Minuten behandelt (Kapitel 2.2.5), anschließend mit GIT-Puffer lysiert und die RNA isoliert (Kapitel 2.3.1). Darauf folgend wurde die Konzentration der Proben gemessen und verdünnt (Kapitel 2.3.4) sowie die mRNA mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.3.7). Diese cDNA wurde dann in qRT-PCR-Analysen eingesetzt (Kapitel 2.3.9).

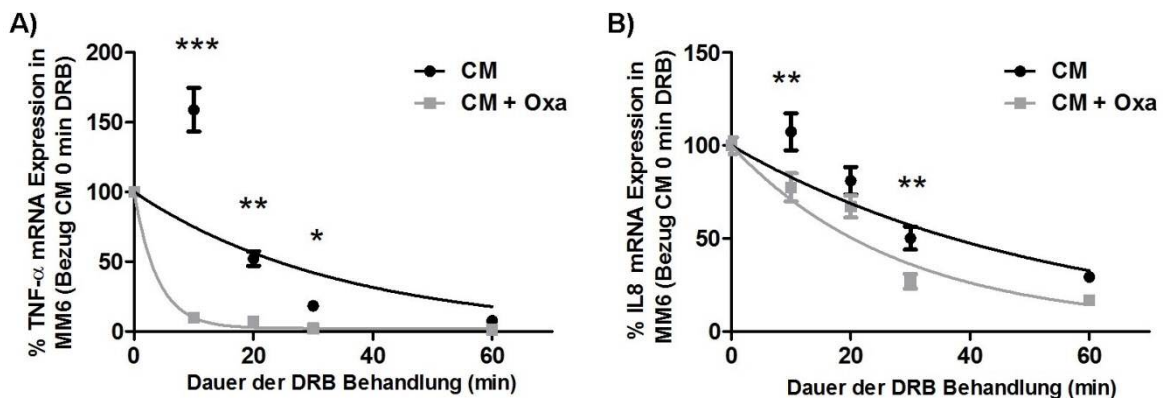
In allen folgenden qRT-PCR Experimenten wurden die  $C_T$ -Werte der zu untersuchenden Gene auf das Referenzgen GAPDH normiert. Die Expression zum Zeitpunkt 0 min DRB-Behandlung wurde in Zytokin- und LPS/Zytokin-stimulierten Zellen (CM) und CM Zellen, die zusätzlich mit Oxa inkubiert wurden (CM + Oxa), auf 100 % gesetzt und galt als Bezug für alle weiteren DRB-behandelten Zellen der jeweiligen Versuchsgruppen. Die Berechnung der Zeitkurven für den Abbau der mRNA sowie der Halbwertszeit erfolgte mittels der Graph Pad Prism 5 Software unter Verwendung der Analyse für einen *one Phase*-exponentiellen Decay. In den murinen Zellen wurde TNF $\alpha$ , IL6 als auch CXCL1, das das murine Analog zum humanen IL8 ist, analysiert. In den humanen Zellen wurden neben TNF $\alpha$  und IL6 auch IL8 untersucht.



**Abbildung 3.43: Analyse des mRNA Abbaus in Oxa-behandelten RAW 264.7 Zellen**

RAW 264.7 Zellen wurden mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS und 300 U/ml  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert und 30 min mit 100 ng/ml Oxa (CM +Oxa) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH (CM) inkubiert. Anschließend erfolgte die Behandlung mit DRB (25  $\mu\text{g/ml}$ ) für null, 10, 20, 30 und 60 Minuten (min). Zellen wurden mit GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression (Mittelwert  $\pm$  SEM) von TNF $\alpha$  (A), CXCL1 (B) und IL6 (C) von 5 unabhängig durchgeführten Zellversuchen. Bezogen wurde auf CM bzw. CM + Oxa mit null Minuten DRB-Behandlung (100 %). Die statistische Auswertung bezieht sich hingegen auf CM vs. CM + Oxa zum jeweiligen Zeitpunkt, (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Der Abbau der mRNA von TNF $\alpha$ , CXCL1 und IL6 erfolgte in den RAW 264.7 Zellen (Abbildung 3.43), die mit CM + Oxa behandelt wurden deutlich schneller, als in den Kontrollzellen (Halbwertszeiten siehe Tabelle 3.2). So konnte bereits nach 10 min DRB-Behandlung eine signifikant geringere mRNA Menge von IL6 und TNF $\alpha$  in Oxa-inkubierten RAW 264.7 Zellen detektiert werden (Abbildung 3.43 A und C).

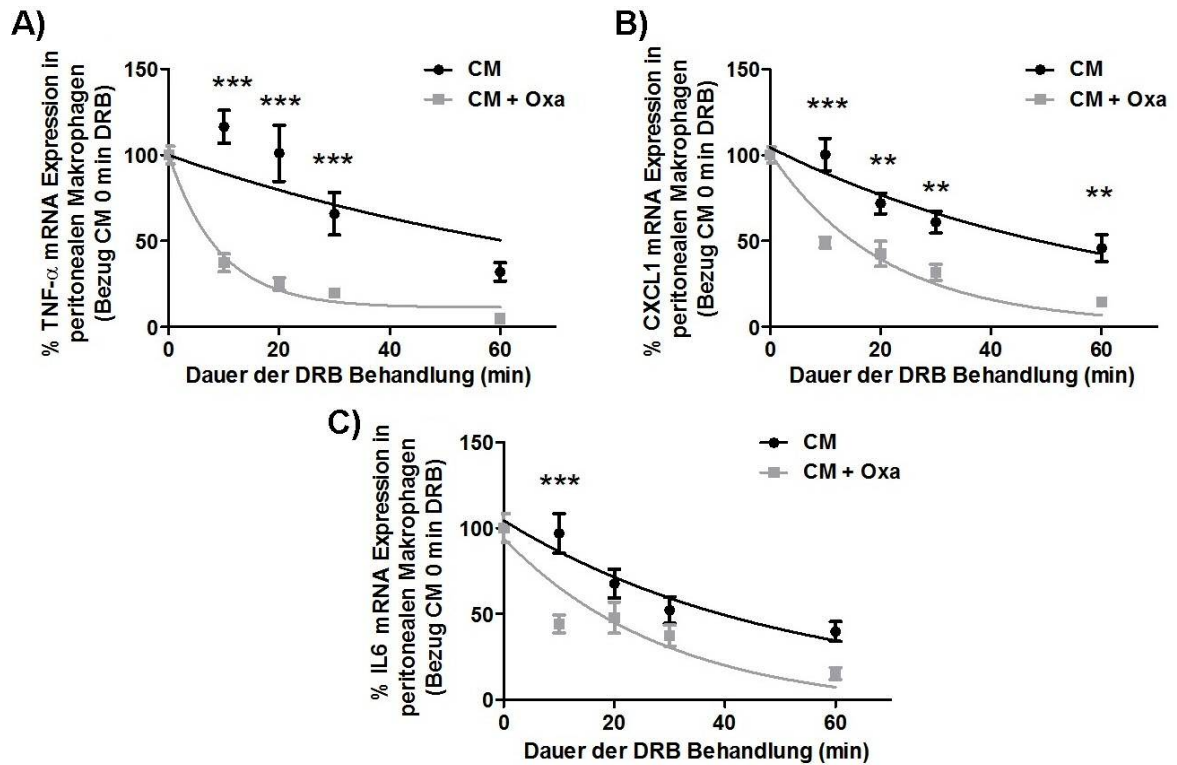


**Abbildung 3.44: Analyse des mRNA Abbaus unter der Behandlung mit Oxa in MM6 Zellen**

Mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS und 300 U/ml IFN $\gamma$  wurden MM6 Zellen stimuliert und anschließend 30 min lang mit 100 ng/ml Oxa (CM + Oxa) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH (CM) inkubiert. Darauf folgte die Behandlung mit DRB (25  $\mu\text{g/ml}$ ) für null, 10, 20, 30 und 60 Minuten (min). Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression (Mittelwert  $\pm$  SEM) von TNF $\alpha$  (A) und IL8 (B) von 4 unabhängig durchgeführten Zellversuchen. Bezogen wurde auf null Minuten DRB-Behandlung (100 %). Die statistische Auswertung bezieht sich hingegen auf die Expression von CM vs. CM + Oxa zum jeweiligen Zeitpunkt, (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Selbiges galt für den mRNA Abbau von TNF $\alpha$  und IL8 in den humanen MM6 Zellen (Abbildung 3.44 A und B). Die Analyse der mRNA Menge in den MM6 Zellen zeigte bereits nach 10 min DRB-Behandlung einen massiven Abbau (94 %) der mRNA von TNF $\alpha$  unter der Behandlung mit Oxa. Der mRNA Abbau von TNF $\alpha$  in CM-stimulierten Zellen hingegen lag erst nach 30 min unter 90 % und verlief damit deutlich langsamer. Die Halbwertszeit (Tabelle 3.2) für TNF $\alpha$  entsprach für CM 24,11 Minuten und für CM + Oxa 2,723 Minuten. Für IL8 betrug die Halbwertszeit in CM-stimulierten MM6 Zellen 37,2 Minuten und in CM + Oxa stimulierten MM6 Zellen 19,49 Minuten.

Zuletzt wurde der Effekt von Oxa auf den mRNA Abbau in Peritonealmakrophagen aus MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen untersucht. Hierfür wurde, wie bereits bei den RAW 264.7 Zellen mittels qRT-PCR, der Abbau der mRNA von TNF $\alpha$ , CXCL1 und IL6 nach null, 10, 20, 30 und 60 Minuten DRB-Behandlung untersucht.



**Abbildung 3.45: Analyse des mRNA Abbaus in Peritonealmakrophagen unter der Behandlung mit Oxa**

Peritonealzellen wurden aus dem Bauchraum von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen isoliert und drei Stunden lang zum Atterieren der Makrophagen mit FCS haltigem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{g/ml}$  LPS und 300 U/ml  $\text{IFN}\gamma$  stimuliert und darauf folgend 30 Minuten (min) lang mit 100 ng/ml Oxa (CM + Oxa) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH (CM) inkubiert. Die Behandlung mit DRB (25  $\mu\text{g/ml}$ ) erfolgte für null, 10, 20, 30 und 60 min. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen in GIT-Puffer lysiert, die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und qRT-PCR-Analysen durchgeführt. Dargestellt ist die relative mRNA Expression (Mittelwert  $\pm$  SEM) von TNF $\alpha$  (A), CXCL1 (B) und IL6 (C) in Makrophagen isoliert aus 5 MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen. Bezogen wurde auf null Minuten DRB-Behandlung (100 %). Die statistische Auswertung bezieht sich hingegen auf die Expression von CM vs. CM + Oxa zum jeweiligen Zeitpunkt, (\*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Der Abbildung 3.45 kann entnommen werden, dass bereits nach 10 min DRB-Behandlung die mRNA Menge von TNF $\alpha$ , CXCL1 und IL6 in Oxa-inkubierten Zellen, verglichen mit den Kontrollzellen, unter 50 % lag. Für den Abbau der IL6 mRNA konnten allerdings für spätere Zeitpunkte (Abbildung 3.45 C) keine weiteren signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden (Halbwertszeit Tabelle 3.2). Hingegen ist der Abbau der CXCL1 und der TNF $\alpha$  mRNA bis zum Schluss bei CM-stimulierten Zellen signifikant geringer als bei CM + Oxa-behandelten Zellen (Halbwertszeit siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: Halbwertszeiten der mRNA nach Inkubation mit Oxa- und DRB-Behandlung

Zellen	Gen	Halbwertszeit CM (min)	Halbwertszeit CM + Oxa (min)
RAWs	TNF $\alpha$	8,586	4,754
	CXCL1	80,53	1,989
	IL6	7,125	4,215
MM6	TNF $\alpha$	24,11	2,723
	IL8	37,2	19,49
Peritoneale Makrophagen	TNF $\alpha$	60,99	6,377
	CXCL1	50,66	8,74
	IL6	35,12	7,326

Zusammenfassend konnte in den Untersuchungen des mRNA Abbaus festgestellt werden, dass es unter der Behandlung mit Oxa in den RAW 264.7, den MM6 Zellen und den primären Makrophagen zu einem schnelleren Abbau der mRNA von inflammatorischen Genen kommt. Somit konnte nachgewiesen werden, dass Oxa in der Lage ist posttranskriptionell die mRNA-Stabilität inflammatorische Mediatoren zu regulieren.

### 3.4.3 microRNA Expressionsanalysen in Nieren Oxacyclododecindion-behandelter MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäuse

MicroRNAs können gezielt die Proteinsynthese durch die direkte Bindung an ihre Ziel mRNA hemmen (Morris, 2008). Somit kommt es durch die Interaktion zu einer Regulation der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene. Im Folgenden wurde in Nieren von Oxa-behandelten MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen die Expression verschiedener microRNAs analysiert, die an allgemeinen Entzündungsprozessen beteiligt sind (Kapitel 2.3.10 und 2.3.11). Dies sollte zum einem Aufschluss darüber geben, ob Oxa *in-vivo* einen regulatorischen Effekt auf microRNAs hat, da *in-vitro* Analysen bereits einen modulierenden Effekt von Oxa auf die Expression von verschiedenen microRNAs zeigten (Kapitel 1.6). Ein Fokus bei der Analyse lag auf microRNAs, die durch Oxa reguliert wurden und die in unterschiedlichsten Untersuchungen bei SLE-Patienten als dysreguliert detektiert wurden (Kapitel 1.4.3). Des Weiteren wurden auch microRNAs analysiert, die in der *Upstream*-Analyse mit Ingenuity als mögliche Regulatoren von Oxa identifiziert wurden (Kapitel 3.4.1.3).

Mittels des *Inflammatory Response & Autoimmunity miScript SYBR Green PCR Kit* von Qiagen wurden 84 microRNAs, bekannt aus verschiedenen inflammatorischen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen, initial analysiert. Hierfür wurden die microRNAs aus Nierenfragmenten von Oxa- und PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen isoliert (Kapitel 2.3.3) und wie im Kapitel 2.3.10 beschrieben in den SYBR<sup>®</sup> Green PCR-Array eingesetzt und ausgewertet.

Die Auswertung mit der Onlinesoftware „*miScript miRNA PCR Array data analysis*“ von Qiagen ergab eine vermehrte Expression von 39 microRNAs und eine verminderte Expression von 3 microRNAs (Tabelle 3.3) in Nieren von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen.

Tabelle 3.3: *microRNA Expressionsänderung unter der Behandlung mit Oxa in MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen (miScript miRNA PCR Array)*

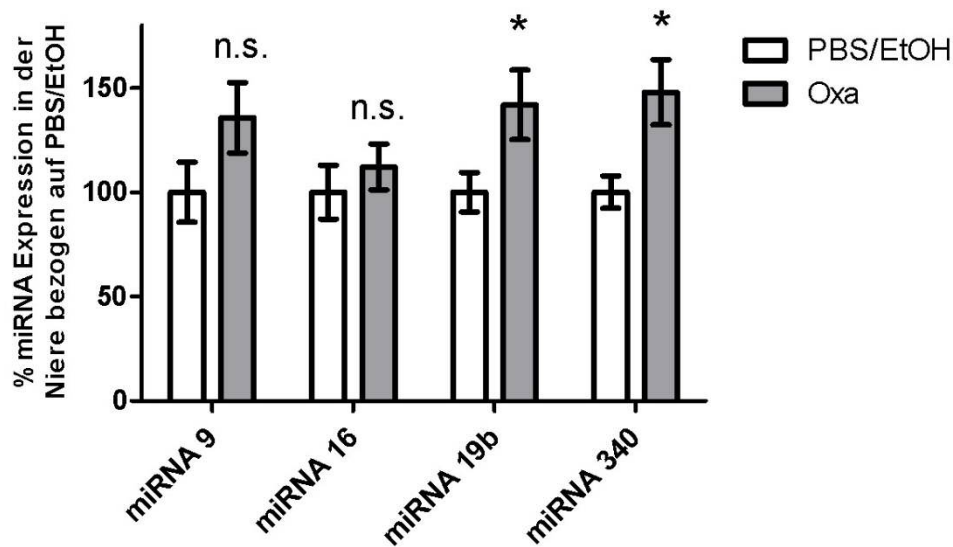
vermehrte Expression			verminderte Expression
mmu-let-7c-5p	mmu-miR-15a-5p	mmu-miR-16-5p	mmu-let-7f-5p
mmu-miR-19a-3p	mmu-miR-19b-3p	mmu-miR-23a-3p	mmu-miR-9-5p
mmu-miR-29b-3p	mmu-miR-29c-3p	mmu-miR-30a-5p	mmu-miR-126-5p
mmu-miR-30e-5p	mmu-miR-135a-5p	mmu-miR-140-5p	
mmu-miR-144-3p	mmu-miR-291a-3p	mmu-miR-294-3p	
mmu-miR-295-3p	mmu-miR-301a-3p	mmu-miR-301b-3p	
mmu-miR-302b-3p	mmu-miR-302d-3p	mmu-miR-325-3p	
mmu-miR-338-5p	mmu-miR-340-5p	mmu-miR-369-3p	
mmu-miR-384-5p	mmu-miR-410-3p	mmu-miR-466k	
mmu-miR-495-3p	mmu-miR-568	mmu-miR-590-3p	
mmu-miR-669h-3p	mmu-miR-669k-3p	mmu-miR-694	
mmu-miR-712-5p	mmu-miR-721	mmu-miR-743a-3p	
mmu-miR-743b-3p	mmu-miR-876-3p	mmu-miR-1192	

Auf dem *miScript miRNA PCR Array* befanden sich 18 microRNAs, die auch in der „*Upstream Regulator*“-Analyse von Ingenuity (Kapitel 3.4.1.3) als potentielle Regulatoren angegeben wurden. Der Abgleich dieser Daten mit den 434 Molekülen aus der Ingenuity „*Upstream Regulator*“-Analyse ergab, dass 9 microRNAs (miR-16, miR-19, miR-29b, miR-291a, miR-340, miR-495, miR-590, miR-876, miR-9) in beiden Analysen reguliert wurden.

Um die Ergebnisse aus dem microRNA Array mit einer weiteren Methode zu verifizieren, wurden microRNA Analysen mit dem SYBR<sup>®</sup> Green basierten qRT-PCR-Systemen von Quanta Biosciences und Applied Biosystems durchgeführt (Kapitel 2.3.11). Hierfür wurden erneut microRNAs aus Nierenproben mit dem *AllPrep DNA/RNA/miRNA-Kit* (Qiagen) isoliert (Kapitel 2.3.3) und wie im Kapitel 2.3.11 beschrieben in die cDNA Synthese und qRT-PCR eingesetzt.

Zur Überprüfung wurden die microRNAs 9, 16, 19b und 340 mittels qRT-PCR Experimenten analysiert und die C<sub>T</sub>-Werte der zu untersuchten microRNAs auf das Referenzgen U6 normiert. Wie der Abbildung 3.46 entnommen werden kann, konnte die Regulation von microRNA 19b und microRNA 340 bestätigt werden.

Durch die Behandlung mit Oxa konnte eine signifikant vermehrte Expression dieser zwei microRNAs detektiert werden.



**Abbildung 3.46:** Überprüfung der Expression der microRNAs 9, 16, 19b und 340 in Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die mit PBS/EtOH oder Oxa behandelt wurden

Aus den Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die fünf Wochen mit 1 µg/g Oxa oder der Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH jeden zweiten Tag behandelt wurden, wurde die microRNA (miRNA) isoliert und nach dem Umschreiben in cDNA mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert (± SEM) der relativen miRNA Expression von miRNA 9, 16, 19b und 340 aus drei unabhängigen durchgeführten Experimenten, (n.s.: nicht signifikant; \*: p<0,05).

Die Regulation der microRNAs 9 und 16 wurden hingegen nicht bestätigt, da im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Änderungen in den Nieren Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse detektiert werden konnten.

Somit konnten zum einem die Ergebnisse aus den microRNA Array Analysen teilweise bestätigt werden und zum anderen zwei microRNAs, microRNA 19b und 340, identifiziert werden, die in den *Upstream*-Analysen von Ingenuity als Zielstrukturen von Oxa vorhergesagt wurden.

Des Weiteren wurden die Expression der microRNAs let-7f, 29c, 30e, 140, 301b, 325, 369 und 669k in den Nieren von Oxa- und PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mit dem qRT-PCR-System von Quanta Biosciences untersucht, mit dem Ziel die Ergebnisse aus den microRNA Array Analysen in davon unabhängigen Proben zu verifizieren.

Wie der Abbildung 3.47 zu entnehmen ist, konnten signifikante Regulationen der microRNAs durch die Behandlung mit Oxa, bis auf microRNA 30e, bestätigt werden. Jedoch wurde bei der microRNA let-7f, die eine verminderte Expression im Array unter der Behandlung mit Oxa aufwies, hier eine vermehrte Expression detektiert. Die signifikant erhöhte Expression der microRNAs 29c, 140, 301b, 325, 369 und 669k hingegen entsprach den Ergebnissen der Array Analysen.



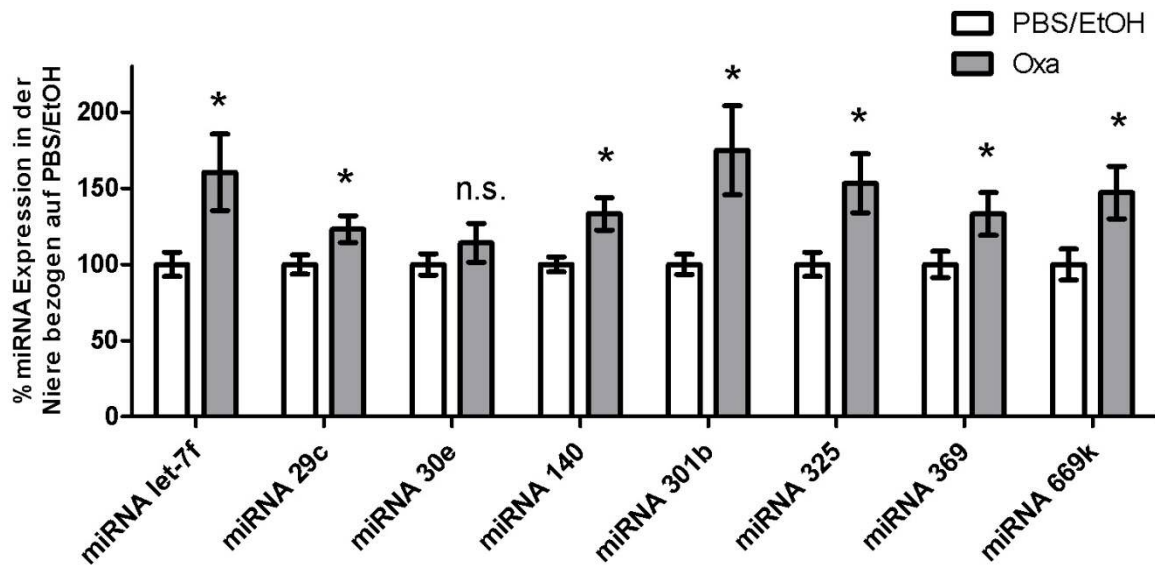


Abbildung 3.47: Analyse der Expression von microRNAs in Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, die mit PBS/EtOH oder Oxa behandelt wurden

Aus den Nieren von Oxa- und PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen wurde die microRNA (miRNA) isoliert und nach dem Umschreiben in cDNA mittels qRT-PCR analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert ( $\pm$  SEM) der relativen miRNA Expression von miRNA let-7f, 29c, 30e, 140, 301b, 325, 369 und 669k aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten, (n.s.: nicht signifikant; \*:  $p < 0,05$ ).

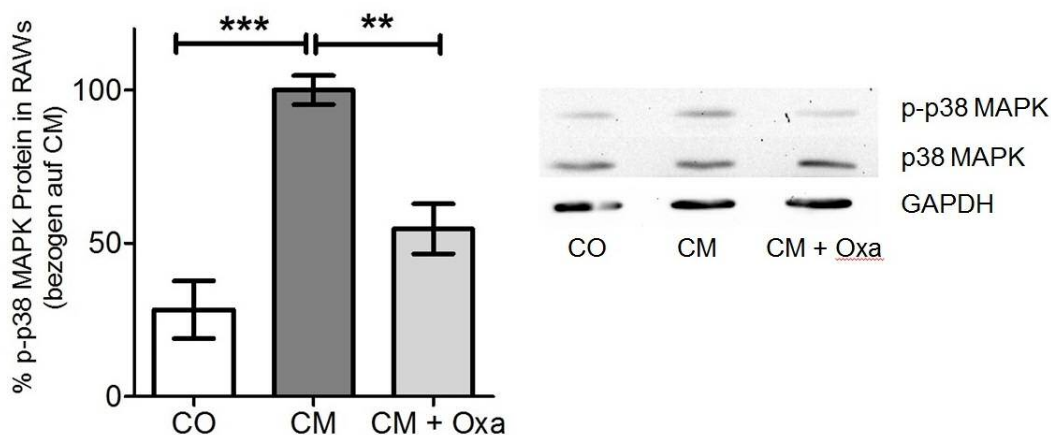
Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen Oxa in der Lage ist die Expression von microRNAs zu modulieren. Einige dieser microRNAs, deren Regulation durch Oxa bestätigt werden konnte, werden auch in SLE-Patienten verändert exprimiert. Hierzu gehören unter anderem die microRNA 19b und 340. Inwieweit die Regulation der microRNAs durch Oxa einen Einfluss auf Zielstrukturen der microRNAs hat, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

### 3.4.4 Einfluss von Oxacyclododecindion auf die Aktivierung der p38 MAPK

Die Aktivierung der p38 MAPK durch Phosphorylierung, führt zur Produktion von Chemokinen und Zytokinen und ist mit der Etablierung einer LN assoziiert (Kapitel 1.5). Aufgrund der verminderten Expression von Chemokinen und Zytokinen (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) sowie Wachstumsfaktoren (Kapitel 3.3.2) wurde der Einfluss von Oxa auf die Phosphorylierung der p38 MAPK untersucht. In Zusammenarbeit mit Lisa Schmidtke erfolgte der Nachweis der Phosphorylierung der p38 MAPK mittels Western Blot in RAW 264.7 Zellen sowie in Leber- und Nierenproben Oxa-behandelter MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse.

Zuerst wurde der Effekt von Oxa auf die p38 MAPK in RAW 264.7 Zellen analysiert. Hierfür wurden RAW 264.7 Zellen in 6-Loch Platten ausgesät (Kapitel 2.2.4) und nach 24 Stunden das Medium durch FCS-freies Medium ersetzt. 16 Stunden später erfolgte die Inkubation mit Oxa (100 ng/ml) beziehungsweise mit dem Lösungsmittel EtOH für 30 Minuten, darauf folgend eine 15 minütige Stimulation mit 1 µg/ml LPS und 100 U/ml murinen IFN $\gamma$ . Die Lyse der Zellen erfolgte mit kochenden Laemmli-Puffer sowie einer zusätzlichen Sonifizierung des Zelllysates. Je 40 µl der Proben wurden anschließend auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen und aufgetrennt (Kapitel 2.4.4).

### RAW264.7



**Abbildung 3.48: Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von p38 MAPK in Zytokin-stimulierten und Oxa-behandelten RAW 264.7 Zellen**

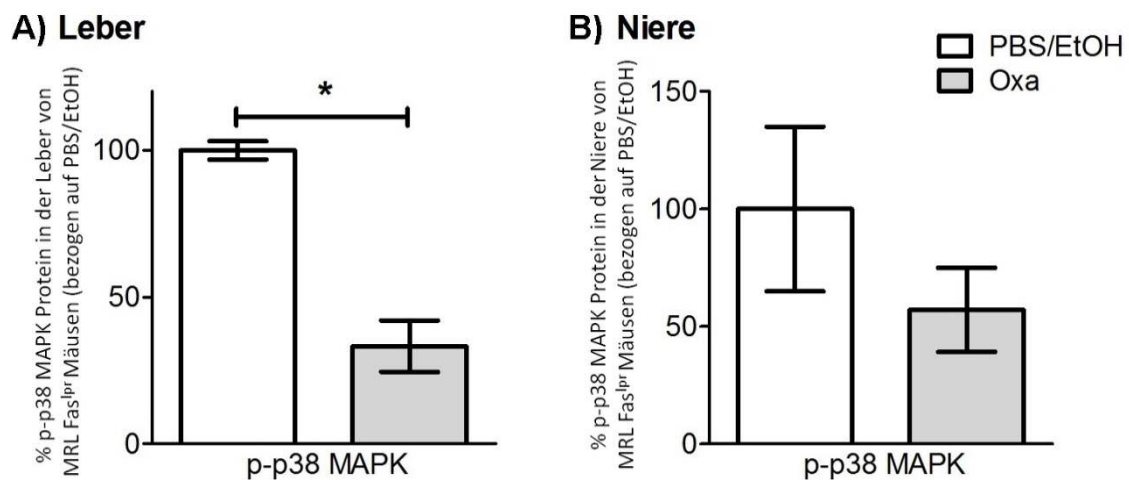
RAW 264.7 Zellen wurden 30 Minuten mit 100 ng/ml Oxa oder dem Lösungsmittel von Oxa (EtOH) inkubiert und anschließend für 15 Minuten mit 1 µg LPS und 100 U/ml IFN $\gamma$  stimuliert. Abgebildet ist ein repräsentativer Western Blot in dem p-p38 MAPK, p38 MAPK und GAPDH mit spezifischen Antikörpern, in unstimulierten (CO), stimulierten (CM) sowie mit Oxa vorinkubierten und stimulierten (CM + Oxa) Zellen detektiert wurden. Es wurden drei Western Blot-Analysen unabhängig voneinander durchgeführt und quantitativ mittels der Image Lab Software ausgewertet. In der Auswertung erfolgte zuerst die p38- und p-p38 MAPK Normalisierung mittels der GAPDH-Werte. Anschließend erfolgte die Normierung der normalisierten p-p38 MAPK auf die p38 MAPK Werte. Bezogen wurden die Mittelwerte der drei Analysen auf CM (100 %), (\*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

Die Detektion der p38 MAPK, der phosphorylierten p38 MAPK (p-p38 MAPK) sowie des Kontrollproteins GAPDH erfolgte mit spezifischen Antikörpern (Kapitel 2.1.10) im Western Blot Verfahren (Kapitel 2.4.5).

Die Hemmung von Oxa auf die Phosphorylierung der p38 MAPK sollte auch *in-vivo* nachgewiesen werden. Daher wurden Proben aus Leber- und Nierenfragmenten von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen in RIPA-Puffer homogenisiert (Kapitel 2.4.1), die Proteinkonzentration des Lysates quantifiziert (Kapitel 2.4.2) und 250 µg Gesamtprotein gefällt (Kapitel 2.4.3). Die Proben wurden dann auf einem SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 2.4.4) und wie zuvor bei den RAW 264.7 Zellen die Proteine (p38 MAPK, p-p38 MAPK

und GAPDH) mittels spezifischen Antikörpern (Kapitel 2.1.10) im Western Blot Verfahren detektiert (Kapitel 2.4.5).

Der Vergleich von Oxa-behandelten Tieren mit Tieren, die das Lösungsmittel PBS/EtOH injiziert bekamen, zeigt, dass in der Leber und auch in der Niere deutlich weniger p-p38 MAPK detektiert werden konnte, wenn die Tiere mit Oxa behandelt wurden (Abbildung 3.49). In der Leber kam es zu einer signifikant verringerten Phosphorylierung der p38 MAPK um 60 %. In der Niere konnte der Nachweis nicht signifikant erbracht werden, jedoch verringert sich auch hier die Phosphorylierung der p38 MAPK um 50 %.



**Abbildung 3.49: Western Blot-Analyse der Phosphorylierung von p38 MAPK in Leber und Nieren von PBS/EtOH und Oxa-behandelten MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen**

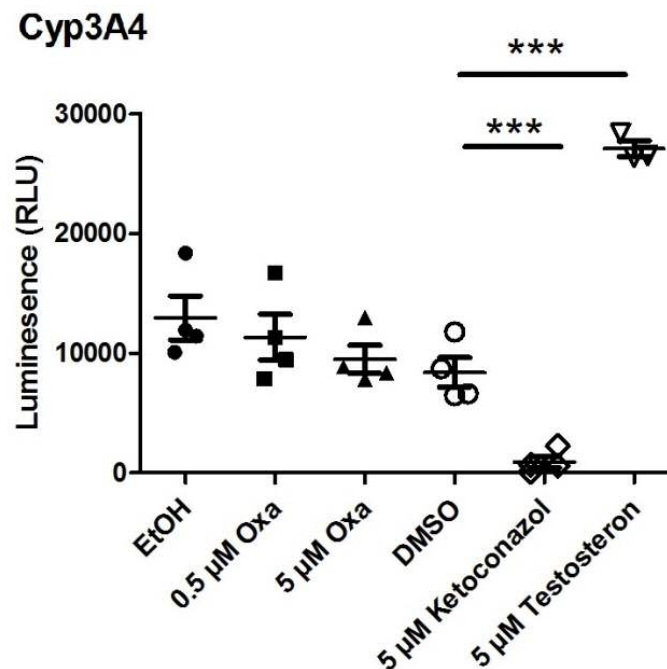
MRL Fas<sup>lpr</sup> Weibchen wurden im Alter von 2-2,5 Monaten für fünf Wochen jeden zweiten Tag mit Oxa (1 µg pro g Körpergewicht) oder mit dem Lösungsmittel PBS/EtOH i.p. behandelt. Für die Western Blot-Analysen wurden Leber- und Nierenproben aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen eingesetzt. Dargestellt ist die relative Phosphorylierung der p38 MAPK, in Leber und Nierenproben aus PBS/EtOH- und Oxa-behandelten MRL Fas<sup>lpr</sup> Mäusen, aus drei voneinander unabhängig durchgeführten Analysen. In der Auswertung erfolgte zuerst die p38 und p-p38 MAPK Normalisierung jeder Probe mittels der GAPDH-Werte die als Ladekontrolle zusätzlich detektiert wurden. Anschließend erfolgte die Normierung der normalisierten p-p38 MAPK auf die p38 MAPK Werte. Bezogen wurden die Mittelwerte der drei Analysen auf PBS/EtOH-behandelte Tiere (100 %), (\*: p<0,05).

Somit konnten die Analysen der *in-vitro* Daten mit den *in-vivo* Daten aus MRL Fas<sup>lpr</sup> behandelten Mäusen bestätigt werden. Oxa hemmt zu Teilen die Phosphorylierung der p38 MAPK, was zu einer verminderten Aktivierung der Kinase führt. Diese Inhibition der p38 MAPK Aktivität könnte eine Erklärung für die entzündungshemmende Wirkung von Oxa sein.

### 3.4.5 Analyse der Cyp3A4 Aktivierung durch Oxacyclododecindion

Bei der Entstehung von Arzneimittelinteraktionen ist die Metabolisierung von Medikamenten über die Cytochrom P450 Familie (Lynch and Price, 2007) ein wichtiger Faktor. Daher ist es von zunehmender Bedeutung den Einfluss neuer potentieller Arzneimittel, wie Oxa, auf die Cyp3A4 Aktivierung zu untersuchen. Dementsprechend wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe des P450-Glo™ Assay (Promega) der Effekt von Oxa auf die Cyp3A4 Enzymaktivität analysiert (Kapitel 2.4.8).

Dabei wird die Aktivität des rekombinant exprimierten CYP3A4 Enzyms, durch die Umsetzung von Luziferin-PFBE zu Luziferin, als Biolumineszenz gemessen. Für die Analysen wurden zwei verschiedene Endkonzentrationen von Oxa getestet, 0,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ . Als positive Kontrollen diente zum einen Testosteron (5  $\mu\text{M}$ ), was die Cyp3A4 Aktivität steigert, und zum anderen Ketoconazol (5  $\mu\text{M}$ ), welches die Aktivität des Cyp-Enzyms hemmt. Da beide Substanzen in DMSO gelöst wurden, wurde neben der Lösungsmittelkontrolle (EtOH) für Oxa auch DMSO gemessen. Wie im Kapitel 2.4.8 beschrieben erfolgte die Inkubation nach Herstellerangaben.



**Abbildung 3.50: Regulation der CYP3A4 Aktivität nach Inkubation mit Oxa, Ketoconazol und Testosteron**

In Anwesenheit von Oxa (0,5  $\mu\text{M}$  und 5  $\mu\text{M}$ ), Testosteron (5  $\mu\text{M}$ ) und Ketoconazol (5  $\mu\text{M}$ ) wurde die Luciferaseaktivität durch die Umsetzung von Luziferin-PFBE zu Luziferin durch Cyp3A4 gemessen. Zusätzlich wurde zur Kontrolle der Einfluss der Lösungsmittel EtOH und DMSO gemessen und diese in die Auswertung eingebunden. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM der mit dem Leerwert normalisierten Luminescence (RLU) aus 3 - 4 voneinander unabhängig durchgeführten Experimenten, (\*\*\*:  $p < 0,001$ ).

Der Abbildung 3.50 kann entnommen werden, dass sowohl Ketoconazol (5  $\mu\text{M}$ ) als auch Testosteron (5  $\mu\text{M}$ ) den erwarteten Einfluss auf die Aktivität des Cyp3A4 Enzyms hatte. Testosteron, ein bekannter Induktor der Cyp3A4 Enzymaktivität (Sobol *et al.*, 2006), konnte nachweislich auch in diesem Experiment die Aktivität von Cyp3A4 signifikant steigern. Hingegen verminderte die Inkubation des Cyp3A4 Enzyms mit Ketoconazol die Aktivität von Cyp3A4 signifikant.

Mit der Analyse der zwei Kontrollsubstanzen konnte die Funktionalität des P450-Glo™ Assays bestätigt werden und anschließend der Einfluss von Oxa auf die Aktivität des Enzyms untersucht werden. Die Auswertung der Messung ergab, dass Oxa in einer Konzentration von 0,5  $\mu\text{M}$  keinen Einfluss auf die Aktivität von Cyp3A4 hat, jedoch in der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine leichte Hemmung des Enzyms erzielte.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass Oxa in den getesteten Konzentrationen keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von Cyp3A4 nimmt.



## 4 Diskussion

### 4.1 Etablierung einer CIA im Stamm der HLA-DR4.AE° Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das therapeutische Potential von Naturstoffen im Modell der Kollagen-induzierten Arthritis (CIA) getestet werden. In einer CIA wird eine Immunantwort ausgelöst, die der Pathogenese einer humanen rheumatoiden Arthritis (RA) entspricht. Die RA ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung, die unter anderem durch eine erhöhte Expression von inflammatorischen Mediatoren wie Zytokinen, Chemokinen, inflammatorischen Enzymen und Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet ist (Kapitel 1.2.1). Diese Proteine sind oftmals Zielstrukturen der heutigen Standardtherapien der RA. Die Expression inflammatorischer Moleküle wird zwar durch die Medikamente effektiv gehemmt, jedoch geht die Behandlung mit zahlreichen Nebenwirkungen einher (Kapitel 1.2.2). Daher ist es von großem Interesse neue Wirkstoffe zu entwickeln, die mit geringen Nebenwirkungen die Morbidität und Mortalität der RA-Patienten senken. Dabei ist das Feld der Naturstoffe in den letzten Jahren in den Fokus des Interesses gerückt. So konnten Bi *et al.* (2005) zeigen, dass Resveratrol, ein von Weintrauben und Beeren produziertes Stilbenoid, anti-inflammatorische Eigenschaften aufweist. In darauf folgenden Studien mit Fibroblasten, die aus RA-Patienten isoliert wurden, konnte ein inhibitorischer Effekt von Resveratrol auf die Expression inflammatorischer und RA-assoziiierter Mediatoren gezeigt werden (Tian *et al.*, 2013). Darüber hinaus konnte Schmidt (2009) zeigen, dass der Sekundärmetabolit (S)-Curvularin, extrahiert aus einer *Penicillium*-Art, *in-vitro* und *in-vivo* die Expression inflammatorischer und RA-assoziiierter Zielgene sowie klinische Symptome der RA senken kann.

In vielen *in-vivo* Untersuchungen zur RA, wie auch bei Schmidt (2009), wurden CIA Modelle verwendet in denen männliche Mäuse häufiger oder in gleichem Maße wie Weibchen eine CIA entwickelten. Dies entspricht nicht dem humanen, geschlechtsspezifischen Verteilungsmuster der RA (Kapitel 1.2). In Rahmen dieser Arbeit sollte daher die Wirksamkeit von Naturstoffen in einem weiter humanisierten CIA Mausmodell, den HLA-DR4.AE° Mäusen, getestet werden. Der Vorteil dieses Stammes soll in der geschlechtsspezifischen Induktion und Progression der CIA liegen, die der humanen RA eher entspricht (Kapitel 1.2.3). HLA-DR4.AE° Mäusen fehlen alle endogenen Klasse II (AE°) Gene und sie exprimieren nur durch Kreuzung mit dem MHCII<sup>ΔΔ</sup> Mausstamm das humane HLA-DRB1\*0401 Allel (Taneja *et al.*, 2007). Laut Taneja *et al.* (2007) sollten die HLA-DR4.AE° Mäuse nach der Immunisierung mit naivem Kollagen II aus Hühnern, gelöst in CFA, mit einer Inzidenz von 39 % eine Arthritis

entwickeln. Geschlechtsspezifisch analysiert, entwickelten 52 % der Weibchen in dieser Studie eine Arthritis, hingegen nur 15 % der Männchen. Zudem konnten die ersten Arthritissymptome bei den Weibchen in der dritten Woche nach der zweiten Immunisierung beobachtet werden. Die Männchen hingegen entwickelten die ersten Symptome erst in Woche sechs nach der zweiten Immunisierung. Die weitere Charakterisierung der HLA-DR4.E° Mäuse durch Taneja ließen den Schluss zu, dass dieses Mausmodell für die Untersuchung der RA gut geeignet sein könnte, da es die wichtigsten pathologischen Merkmale der humanen RA scheinbar imitierte.

Im Rahmen der Untersuchungen wurden die transgenen Tiere, die das humane DRB1\*0401 Allel tragen, unter der Verwendung der generierten Positivkontrolle (Kapitel 3.1.1) identifiziert (Kapitel 3.1.2). Anschließend wurde mit verschiedenen Protokollen (Versuche A-F, Kapitel 3.1.3) versucht in den positiv transgenen Mäusen eine Kollagen-induzierte Arthritis auszulösen. In keinem der Versuche konnte allerdings die Inzidenz von Taneja erreicht werden. Im Versuch B sollte durch eine erhöhte Anzahl an CII-Injektionen bei gleichzeitiger Verkürzung der Immunisierungsintervalle eine CIA ausgelöst werden. Jedoch zeigte der Vergleich der mRNA Expressionsanalysen der CII-behandelten Mäuse im Versuchsschema B (Abbildung 3.4) eine geringere Expression der proinflammatorischen Marker als im Versuchsschema A (Abbildung 3.3). Klinische Symptome der RA konnten über den Beobachtungszeitraum weder in diesem Versuch noch durch eine Steigerung der Dosis von CII (Versuch C) beobachtet werden. Das Versuchsschema D wurde auf Basis des in *Nature Protocols* publizierten Protokolls von Brand *et al.* (2007) durchgeführt. In diesem Protokoll konnte in B10.M-DR4 Mäusen, die auch Träger des Allels DRB1\*0401 sind, jedoch ein chimeres HLA-DR4 Molekül besitzen, eine CIA mit einer Inzidenz von 50 – 80 % ausgelöst werden. Erste Symptome traten dabei am Tag 21 nach CII-Gabe auf. Trotz dieser vielversprechenden Inzidenzen konnte mit diesem Protokoll, das für Mausstämme etabliert wurde in denen nur schwer eine Arthritis induziert werden kann, keine CIA in den HLA-DR4.AE° Mäusen ausgelöst werden.

Ein weiterer Ansatz wurde mit der zusätzlichen Gabe von LPS im Versuch E verfolgt. Die Arbeitsgruppe um Townes zeigte, dass die intraartikuläre Injektion von TNF $\alpha$  oder TGF- $\beta$  den Beginn einer CIA beschleunigen kann (Cooper *et al.*, 1992). Des Weiteren zeigte van der Berg (1994), dass die Injektion von anti-IL1 vor dem Beginn einer CIA den Ausbruch der Arthritis verhindern kann. Sowohl IL1 als auch TNF $\alpha$  werden neben IL12 durch eine LPS Injektion verstärkt ausgeschüttet (Stevenson *et al.*, 2006). So konnten sowohl Caccese (1992) mit einer subkutanen und einer i.p. Injektion von 20 - 40  $\mu$ g LPS als auch Stevenson *et al.* (2006) mit der Injektion von 10 - 40  $\mu$ g LPS in ihren Versuchen eine verstärkte Arthritis auslösen. Nebenbei konnte Stevenson mit der LPS-Gabe die Expression der Symptome innerhalb der Gruppe synchronisieren und die Anzahl der



betroffenen Gelenke innerhalb eines Tieres erhöhen. Trotz der hohen Dosis LPS von 0,8 mg pro g Körpergewicht, die jeweils zwei Tage nach einer CII-Applikation injiziert wurden, entwickelten weder Weibchen noch Männchen sichtbare Symptome einer Arthritis. Selbiges Resultat stand am Ende des Versuchs F. Hier wurde statt des im Versuch A verwendeten Kollagens II aus Hühnern Kollagen II verwendet, welches aus Schweinen isoliert wurde.

Aufgrund der Erkenntnisse aus den Versuchsdurchführungen A-F kann darauf geschlossen werden, dass der Mausstamm HLA-DR4.AE° des Institutes für Pharmakologie Mainz für die Etablierung einer CIA nicht geeignet ist. Somit wurden die HLA-DR4.AE° Mäuse als ein Modell der CIA mit einem humanen geschlechtsspezifischen Verteilungsmuster für die Analysen von Naturstoffen ausgeschlossen. Um Naturstoffe in einem chronisch-entzündlichen Modell zu testen, wurde daher auf den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mausstamm zurückgegriffen, der mit SLE spontan eine andere systemische Autoimmunerkrankung des rheumatischen Formenkreises entwickelt.

## 4.2 Analyse des Krankheitsverlaufes der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse

Um einen geeigneten Behandlungszeitraum für den Naturstoff Oxacyclododecindion (Oxa) im Modell der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse festzulegen, wurde der Verlauf der Lupus-Erkrankung in den Mäusen charakterisiert.

In den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, einem klassischen Modell zur Untersuchung des humanen Lupus, konnte im Vergleich zu den Balb/c Kontrollmäusen bereits in einem Lebensalter von zwei Monaten eine Vergrößerung der Lymphknoten und der Milz nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.2.1). Die Entwicklung dieser Splenomegalie und Lymphadenopathie sind typische Symptome der Lupus-Erkrankung, die durch die immense Akkumulation von autoreaktiven T-Zellen in den lymphatischen Geweben vorangetrieben werden (Craft *et al.*, 1999). Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass die MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse bereits in einem sehr frühen Lebensalter sichtbare Anzeichen der Erkrankung entwickeln. Im Einklang mit der frühzeitigen Etablierung von phänotypischen Krankheitssymptomen, konnte in den Nieren, einem weiteren Hauptzielorgan der Erkrankung, zum selben Zeitpunkt eine erhöhte Expression inflammatorischer und LN-assoziiertes Gene detektiert werden (Kapitel 3.2.2.2).

So konnte in den Nieren eine Überexpression von S100A8, einem typischen Marker in Autoimmunerkrankungen (Loser *et al.*, 2010), und IL6, welches maßgeblich die Progression der LN fördert (Cash *et al.*, 2010), nachgewiesen werden (Kapitel 3.2.2.2). Darüber hinaus konnte eine vermehrte Expression der IL12 mRNA in den Nieren der zwei

bis viereinhalb Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse detektiert werden (Abbildung 3.11). IL12 ist im Rahmen der Lupus-Erkrankung hauptsächlich dafür verantwortlich, dass die Sekretion von IFN $\gamma$  in T-Zellen angeregt wird (Schwartz *et al.*, 1999). Dieser Nachweis entzündungsrelevanter Gene belegt, dass MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse schon im Alter von 2 Monaten eine erhöhte inflammatorische Aktivität aufweisen.

IFN $\gamma$ , welches wie IL6 an der Progression der Erkrankung sowie an den autoimmunen Schädigungen der Niere beteiligt ist (Schwartz *et al.*, 1998), konnte in den fünf bis acht Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, im Vergleich zu den Balb/c Mäusen, signifikant erhöht nachgewiesen werden (Abbildung 3.12). In diesem späteren Krankheitsstadium wurden ausschließlich Marker wie IL12 und IL6 vermehrt exprimiert, die im Zusammenhang mit der Progression der Glomerulonephritis stehen.

Somit konnte auf mRNA Ebene, durch die Analyse proinflammatorischer und krankheitsassoziiertes Marker, der Krankheitsverlauf der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse im Vergleich zu dem der gesunden Balb/c Kontrollmäuse charakterisiert werden. Mit einem Alter von zwei Monaten konnten vor allem eine erhöhte Expression von proinflammatorischen Mediatoren in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen ermittelt werden, die im Verlauf der Erkrankung vermehrt die Produktion von LN-assoziierten Marker fördern. Dieses Resultat verdeutlicht, dass bereits in den frühen Lebensmonaten entzündliche Prozesse in der Niere stattfinden, die im weiteren Verlauf zur Manifestation der Glomerulonephritis führen. Als Folge treten schwerwiegenden Schäden der Niere auf die letztendlich zum funktionellen Versagen selbiger führen.

Durch den Abgleich der mRNA Expression in männlichen und weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen (Kapitel 3.2.2.3) konnte des Weiteren ein geschlechtsspezifischer Verlauf der Erkrankung nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Männchen exprimierten die Weibchen deutlich mehr S100A8, IL12p40 und IFN $\gamma$  (Abbildung 3.14) im frühen Krankheitsstadium (zwei bis viereinhalb Monate). Dies deutet auf einen früheren Beginn der Erkrankung bei den weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen hin. Faktisch wird dies durch eine erhöhte Anzahl anti-nukleärer Antikörper (ANA) in den Weibchen im Alter von 2-3 Monaten (Andrews *et al.*, 1978), das differente mittlere Sterbealter von weiblichen (17. Woche) und männlichen (22. Woche) MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen (Murphy and Roths, 1978) sowie durch Beobachtungen von Zeller *et al.* (2006), die bei den Weibchen eine schwerere und schnellere Erkrankung bemerkten als bei den Männchen, unterstützt.

Ziel der Charakterisierung der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse war es einen Zeitpunkt für die Behandlung der Tiere mit Oxa festzulegen. Da Oxa in *in-vitro* Analysen als ein hochpotenter Inhibitor der Expression proinflammatorischer Gene identifiziert wurde (Serwe, 2007), war für die *in-vivo* Analyse entscheidend, dass die zu behandelnden Tiere

entzündungsrelevante Moleküle, die maßgeblich die Progression der LN fördern, exprimierten. Die Expression dieser inflammatorischen Gene konnte bereits in zwei Monate alten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nachgewiesen werden, wobei in weiblichen Tieren eine deutlich höhere inflammatorische Aktivität vorlag. Für die initialen *in-vivo* Analysen zur Wirksamkeit von Oxa in diesem chronisch-inflammatorischen Mausmodell, wurden daher zwei bis zweieinhalb Monate alte MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Weibchen ausgewählt.

### **4.3 *In-vivo* Wirkung von Oxacyclododecindion auf den Krankheitsverlauf der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse**

Das makrozyklische Lacton Oxa, welches in *in-vitro* Analysen die Expression von inflammatorischen, fibrotischen und angiogenen Faktoren inhibierte (Serwe, 2007), zeigte bereits auch eine anti-entzündliche Wirkung in einem *in-vivo* Modell der akuten LPS-induzierten Entzündung (Casper, 2013).

In weiterführenden Analysen wurde im SLE Modell der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse der anti-inflammatorische als auch anti-fibrotische Effekt von Oxa untersucht, um das therapeutische Potential des Naturstoffes zur Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen aufzuklären. Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse (Kapitel 4.2) wurden weibliche MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse ab einem Alter von zwei bis zweieinhalb Monaten behandelt. Die Behandlung der Tiere erfolgte für fünf Wochen mit Oxa oder der Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH (Kapitel 3.3). Um den Effekt von Oxa auf die Expression inflammatorischer Mediatoren beurteilen zu können, wurden zusätzliche Tiere mit dem Glukokortikoid Dexamethason (Dex) behandelt. Glukokortikoide werden aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkung als Standardtherapie bei SLE-Patienten eingesetzt (Kapitel 1.3.3) und stellen somit in diesen Untersuchungen eine geeignete Positivkontrolle dar.

#### **4.3.1 Oxacyclododecindion reduziert die Expression von inflammatorischen und SLE-assoziierten Mediatoren in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen**

Die Auswertung der mRNA und Protein Expressionsanalysen zeigte in den Nieren, dem Hauptzielorgan der Erkrankung in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, eine deutlich verminderte Expression von inflammatorischen und SLE-assoziierten Mediatoren durch die Gabe von Oxa. Diese Effekte waren mit der Positivkontrolle Dex vergleichbar (Kapitel 3.3.1). Die Wirkung von Dex steht dabei im Einklang mit anderen Untersuchungen in Lupus Mausmodellen sowie mit Studien in SLE-Patienten. Diese zeigten, dass eine Behandlung

mit Glukokortikoiden zu einer verminderten Progression der Autoimmunerkrankung führte (Mosca *et al.*, 2011; Song *et al.*, 2013).

Im Zuge der Charakterisierung von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnte im Alter von zwei Monaten eine vermehrte Expression von S100A8 in den PBMCs, der Milz und der Niere detektiert werden (Abbildung 3.10 und 3.11). Übereinstimmend konnte 2010 Loser *et al.* eine erhöhte Expression von S100A8 auch in histologischen Nierenschnitten von SLE-Patienten nachweisen. Aus diesem Grund wurde der Effekt von Oxa und Dex auf die Expression von S100A8 in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen untersucht. In den PBMCs, der Milz als auch in den Nieren von Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen konnte eine geringere mRNA- und Proteinexpression von S100A8 im Vergleich zu den Tieren, die mit der Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH behandelt wurden, detektiert werden (Kapitel 3.3.1). Dex hatte hingegen nur in den peripheren Blutzellen einen Effekt auf die mRNA Expression von S100A8. Dies steht mit Befunden von Schmidt (2009) im Einklang die mittels qRT-PCR-Analysen in Dex-behandelten CIA Mäusen im Vergleich zu (S)-Curvularin nur eine schwache Reduktion der S100A8 Expression nachweisen konnte. S100A8 gehört wie S100A9 zu der S100 Protein Familie. *In-vivo* Analysen von Manitz *et al.* (2003) konnten zeigen, dass eine Regulation der S100A8 Expression analog zur Expression von S100A9 erfolgte. Daher kann angenommen werden, dass Oxa auch modulierende Effekte auf die mRNA Expression von S100A9 hat. Zusammen können S100A8 und S100A9 einen heterodimeren Komplex bilden, der auch Calprotectin genannt wird (Steinbakk *et al.*, 1990). Dieser Komplex wird von Neutrophilen, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert (Pepper *et al.*, 2013; Haga *et al.*, 1993). Signifikant erhöhte Konzentrationen von Calprotectin konnten im Serum von SLE-Patienten belegt werden, wobei die Quantität des S100A8/A9 Komplexes in Assoziation mit dem positiven Nachweis von dsDNA-Antikörpern stand (Haga *et al.*, 1993). Zudem konnte in weiteren Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises gezeigt werden, dass das Heterodimer in Makrophagen die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL1 $\beta$ , IL6 und IL8) durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B und p38 MAPK verstärkt (Sunahori *et al.*, 2006).

Überdies konnte von Loser *et al.* (2010) belegen, dass S100A8 als Homodimer die Expression von ROR $\gamma$ t, RUNX1 (*runt-related transcription factor-1*) und vor allem von IL17 verstärkt. Dabei bindet das Protein als *Toll-like receptor-4* (TLR4) Ligand an CD8<sup>+</sup> T-Zellen, wodurch der vermehrten S100A8 Produktion eine Schlüsselrolle in der autoimmunen Inflammation zugesprochen wird (Loser *et al.*, 2010). In diesem Zusammenhang konnte Heather Brown *et al.* (2007) zeigen, dass für eine glomeruläre Entzündung, in Folge einer Antikörperablagerung, eine Aktivierung von TLR4 erforderlich ist. Sie konnte in *in-situ* Hybridisierungen nachweisen, dass TLR4 mRNA in mesangialen und Epithelzellen innerhalb des Glomerulus exprimiert wird. In weiteren

Zellkulturexperimenten mit Mesangiumzellen führte eine Liganden-induzierte Aktivierung von TLR4 zur Produktion von CXC Chemokinen, die verantwortlich für die Chemotaxis von Neutrophilen sind (Brown *et al.*, 2007). Die reduzierte Expression von S100A8 gibt somit erste Hinweise auf eine weitreichende Modulation inflammatorischer und immunologischer Prozesse durch Oxa.

Als Weiteres wurde die Expression der inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$ , IL6 und TNF $\alpha$  untersucht. mRNA Expressionsanalysen wiesen sowohl in der Milz (Abbildung 3.16) als auch in der Niere (Abbildung 3.17) durch Oxa und Dex eine verminderte Expression der drei Marker nach. Für TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  konnten diese Daten in den Proteome Profiler- und zum Teil in Western Blot-Analysen (Kapitel 3.3.2) bestätigt werden. Alle drei inflammatorischen Zytokine sind in Seren von SLE-Patienten, im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen, erhöht (Funauchi *et al.*, 1991; Robak *et al.*, 1998), was mit der Aktivität der Erkrankung assoziiert wird. In inflammatorischen Prozessen fördert IFN $\gamma$  vor allem die Aktivierung von Makrophagen und beeinflusst in diesen Zellen die Produktion von Entzündungsmediatoren wie TNF $\alpha$  (Mak and Saunders, 2006). Im Rahmen einer adaptierten Immunantwort führt IFN $\gamma$  zur Differenzierung von Th1 CD4<sup>+</sup> T Helferzellen, welche selbst vermehrt IFN $\gamma$  ausschütten (Zhu *et al.*, 2010a). Dies fördert zum einen die Entzündungsreaktion weiter (Pollard *et al.*, 2013) und zum anderen den B-Zell-vermittelten IgG Klassenwechsel zu den Subtypen IgG2a und IgG3 (Baudino *et al.*, 2006). Seery konnte in transgenen Mäusen zeigen, dass eine vermehrte Expression von IFN $\gamma$  in der Dermis bei Weibchen zu einer erhöhten Produktion von Autoantikörpern führt, was letztendlich eine Immunkomplex-vermittelte Glomerulonephritis auslöste (Seery, 2000). Übereinstimmend konnte Haas bereits 1997 in MRL Mäusen zeigen, dass das Fehlen eines funktionellen IFN $\gamma$  Signalweges die Tiere vor einer Glomerulonephritis schützt (Haas *et al.*, 1997).

Auch die Blockade von TNF $\alpha$  führt in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu einer Verbesserung der Lupus Nephritis. Das immunregulatorische und proinflammatorische Zytokin konnte in mehreren Untersuchungen in den Glomeruli von Lupus Nephritis-Patienten nachgewiesen werden (Takemura *et al.*, 1994; Herrera-Esparza *et al.*, 1998; Aringer and Smolen, 2004). Dort wird es hauptsächlich von infiltrierten Makrophagen exprimiert und spielt bei der Initiierung von lokalen Entzündungsprozessen und Gewebeschädigungen eine wichtige Rolle. An der Spitze der Entzündungskaskade stehend kann es dort durch die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Transkription weiterer proinflammatorischer Zielgene wie IL1 $\beta$ , IL6 und IL8 initiieren (Zhu *et al.*, 2010b). Dabei führt die erhöhte Expression von IL6 im entzündeten Gewebe zu einer verstärkten Rekrutierung von Leukozyten sowie zu einer erweiterten Stimulation der Makrophagenmigration (Cash *et al.*, 2010; Romano *et al.*, 1997). In der Lupus Nephritis sind diese infiltrierenden Makrophagen und Monozyten die wichtigste Quelle der IL6 Produktion (Takemura *et al.*, 1994). In MRL *Fas<sup>lpr</sup>* IL6-

defizienten Mäusen konnte der Verlauf der Lupus Nephritis verlangsamt werden sowie eine verringerte Infiltration von Immunzellen und eine geringere Ablagerung von Immunkomplexen (IgG und C3) detektiert werden (Cash *et al.*, 2010). Die Reduktion der drei inflammatorischen Zytokine ermöglicht erneut einen Rückschluss auf eine anti-entzündliche Wirkung von Oxa. Es liegt daher nahe, dass der Naturstoff in der Lage ist immunologische Prozesse, die für die Progression der SLE-Erkrankung von entscheidender Bedeutung sind, zu inhibieren.

Im Rahmen der mRNA Expressionsanalysen und Proteome Profiler-Analysen konnten in den Nieren der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse weitere Zytokine identifiziert werden, deren Expression durch die Gabe von Oxa reguliert wurden. So wurde die mRNA beziehungsweise die Protein Expression von zwei Mitgliedern der IL12-Familie, IL12p40 und IL23p19, die von Makrophagen und dendritischen Zellen produziert werden, reduziert (Abbildung 3.18). Die Wirkung von Oxa auf IL12p40 war auf mRNA Ebene mit der von Dex vergleichbar. Da ELISA-Analysen in SLE-Patienten eine erhöhte Expression beider Zytokine zeigten (Tokano *et al.*, 1999; Wong *et al.*, 2008), unterstützen auch diese Ergebnisse eine anti-inflammatorische Wirkung von Oxa. IL12 ist neben IFN $\gamma$  ein zentraler Regulator der Th1-Zellantwort (Langrish *et al.*, 2004) und beeinflusst durch diese Interaktion die vermehrte Ausschüttung von IFN $\gamma$ .

Mittels des Proteome Profiler konnte die verringerte Expression von IL23 durch Oxa auf Proteinebene bestätigt sowie eine verringerte Proteinmenge von IL17 unter Oxa nachgewiesen werden (Abbildung 3.19). IL23 ist entscheidend an der Expansion der pathogenen CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation, die durch die Produktion von IL17 (Th17) gekennzeichnet ist, beteiligt (Aggarwal *et al.*, 2003). Das sezernierte IL17 erhöht die T-Zellantwort im Zuge einer Immunantwort und stimuliert Epithelzellen, Endothelzellen sowie Fibroblasten, die daraufhin verschiedene proinflammatorische Mediatoren z.B. IL6, TNF $\alpha$  und mehrere Chemokine (Bosteen *et al.*, 2013) ausschütten. Des Weiteren erhöht IL17 die Expression von iNOS und ICAM-1 (Iwakura *et al.*, 2008), die ebenfalls eine wichtige Rolle in der Lupus-Erkrankung spielen und deren Expression auf mRNA beziehungsweise Protein Ebene durch Oxa reduziert wurden (Kapitel 3.3). Die reduzierte Expression dieses Zytokins könnte auf eine mögliche Hemmung von Oxa auf die STAT3-Signaltransduktion zurückzuführen sein (Kapitel 1.6), da eine Aktivierung von STAT3 zur Produktion von IL17 führt (Yang *et al.*, 2007).

Gleichermaßen konnte mittels der Proteome Profiler-Analysen eine Expressionsänderung von IL16 detektiert werden. Innerhalb der untersuchten Zytokine wurde IL16 am stärksten durch Oxa auf Proteinebene herab reguliert (Abbildung 3.19). IL16 ist ein chemotaktischer Faktor für CD4<sup>+</sup> T-Zellen, Monozyten und Eosinophilen und fungiert in der T-Zellaktivierung als Modulator (Lard *et al.*, 2002). In SLE-Patienten, die eine

funktionelle Dysregulation der T-Zellen aufweisen, konnten erhöhte Mengen an IL16 detektiert werden (Lee *et al.*, 1998).

Nicht nur eine Dysregulation von T-Zellen spielt bei der Pathogenese der Lupus Nephritis eine wichtige Rolle, sondern, wie bereits dargestellt (Kapitel 1.3.1), auch die massive Einwanderung von Makrophagen in das entzündete Gewebe. Dabei ist CSF-1 einer der wesentlichen Faktoren für die Proliferation und Differenzierung sowie für das Überleben von Makrophagen (Iwata *et al.*, 2012). Da in Proteome Profiler-Analysen eine Oxa-Behandlung nachweislich zu einer verminderten CSF-1 Produktion führte (Abbildung 3.19), scheint Oxa auch über die Regulation von CSF-1 einen Einfluss auf immunologische Prozesse zu nehmen. In MRL *Fas<sup>lpr</sup>* CSF-1-defizienten Mäusen konnte gezeigt werden, dass durch das Ausbleiben einer Chemotaxis kaum infiltrierende Makrophagen in der Niere nachweisbar waren und die Mäuse keine Lupus Nephritis entwickelten (Lenda *et al.*, 2004). Übereinstimmend konnte in SLE-Patienten eine erhöhte CSF-1 Konzentration im Serum detektiert werden, die mit der Aktivität der Erkrankung korrelierte (Menke *et al.*, 2009).

Neben CSF-1 konnte auch eine dysregulierte Expression von ROR $\gamma$ t, FoxP3 und SPP1 mit SLE assoziiert werden (Wong *et al.*, 2005; Bonelli *et al.*, 2008; Crispin *et al.*, 2008). SPP1, welches von T-Zellen sekretiert und durch Matrix-Metalloproteinasen (MMP) wie MMP-7 und MMP-9 gespalten wird, kann verstärkend auf die proinflammatorische Th1-Zellantwort und inhibierend auf die Th2-Antwort wirken (Han *et al.*, 2008). Eine Infiltration von Th1-Zellen in die Niere kann dabei Gewebeschäden in der Niere initiieren beziehungsweise weiter fördern (Kitching *et al.*, 2000). In den mRNA Expressionsanalysen konnte in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen signifikant weniger SPP1 mRNA detektiert werden (Abbildung 3.18). Eine Reduktion von SPP1, das in SLE-Patienten und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen vermehrt nachgewiesen wurde (Katagiri *et al.*, 1995), durch Oxa ist daher ein weiterer Indikator dafür, dass die Substanz einen Effekt auf die Progression der Erkrankung hat.

Das einzige Zytokin, welches durch die Behandlung mit Oxa vermehrt gebildet wurde, ist IL5 (Abbildung 3.19). Bis zum jetzigen Zeitpunkt ist die Rolle des Zytokins im SLE nicht klar. Jedoch konnten Wen *et al.* (2004) zeigen, dass eine Hyperexpression von IL5 in einem weiteren murinen SLE Modell zu einer Suppression der autoimmunen Erkrankung führen kann.

Zusammenfassend konnte die Behandlung von weiblichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen mit Oxa die Expression zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren beeinflussen, die in Zusammenhang mit der Pathogenese des humanen SLE gebracht werden können. Die Wirkung von Oxa in den *in-vivo* Analysen war ähnlich gut wie bei der Positivkontrolle Dex. Eine mögliche Regulation der Expression der Zytokine könnte über eine Oxa-

vermittelte Hemmung der JAK/STAT-Signaltransduktion erklärt werden, die Serwe (2007) als Wirkmechanismus für Oxa in HepG2 Zellen zeigen konnte (Kapitel 1.6). Die frühzeitige Reduktion der Expression der untersuchten Entzündungsmarker im Krankheitsverlauf kann die Progression verlangsamen und eine Schädigungen der Niere aufhalten. Die Oxa-vermittelten Effekte geben zudem Hinweise darauf, dass Oxa auch immunmodulierende Eigenschaften aufweist. Ob die beobachteten Effekte durch eine Erhöhung der Dosis von Oxa optimiert werden können, muss in zukünftigen Experimenten untersucht werden.

#### **4.3.2 Immuzellinfiltrate in der Niere von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen werden durch Oxacyclododecindion-Behandlung reduziert**

Eine massive Invasion von Monozyten und Lymphozyten in die Nieren, im Zuge der vermehrten Ablagerung von Immunkomplexen, kann in SLE-Patienten als auch MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen eine schwere Glomerulonephritis initiieren (Kapitel 1.3.4). Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zellinfiltrationen in Nieren von Oxa-behandelten Mäusen mit denen der Lösungsmittelkontrolle PBS/EtOH verglichen und die Infiltrate näher charakterisiert. Die Auswertung histopathologischer PAS Färbungen zeigte in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen bereits eine signifikant reduzierte Infiltration von Immunzellen in interstitiellen und glomerulären Nierengewebe (Abbildung 3.22). Antikörperspezifische Färbungen belegten die Reduzierung von Monozyten/Makrophagen (CD68), Makrophagen (F4/80), B-Zellen (CD20) und T-Zellen (CD4) in Nierenschnitten nach der Behandlung mit Oxa (Abbildung 3.24). Diese verminderte Infiltration von Immunzellen könnte auf die reduzierte Expression von Chemokinen zurückzuführen sein. Die Daten aus den Proteome Profiler-Analysen unterstützen diese Hypothese. So konnte eine verminderte Expression von CCL1, CCL2, CCL4, CCL5, CCL12 und CCL17 sowie CXCL1, CXCL9, CXCL10 und CXCL12 in Nieren Oxa-behandelter Mäuse detektiert werden.

CCL2 (MCP-1) wirkt vor allem chemotaktisch auf Monozyten und T-Zellen. Ein Anstieg dieses Chemokins in SLE-Patienten korreliert mit der Schädigung der Niere (Chan *et al.*, 2007). Passend führt ein Knockout von CCL2 in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu einer reduzierten Infiltration von Makrophagen und T-Zellen (Tesch *et al.*, 1999). T-Zellen werden auch, neben Monozyten und Eosinophilen, durch CCL5 (RANTES) zum Entzündungsherd rekrutiert (Lu *et al.*, 2012). So konnten auch erhöhte Konzentrationen von RANTES, in Korrelation mit dem Aktivitätsindex, in SLE-Patienten detektiert werden (Lit *et al.*, 2006; Hrycek *et al.*, 2013). In den Analysen, die Hrycek (2013) und Lit (2006) in Seren und Plasmen von SLE-Patienten durchführten, konnte des Weiteren auch eine vermehrte Expression von CXCL12, CXCL10, CXCL9 und CXCL1 detektiert werden. Die Reduktion von verschiedenen chemotaktischen Molekülen sowie die verminderte



Infiltration von Immunzellen in die Nieren deutet an, dass Oxa die Akkumulation von Leukozyten inhibiert.

Zusätzlich zu den histopathologischen Untersuchungen wurden durchflusszytometrische Analysen mit Nierenlysaten der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen durchgeführt, um die zellulären Infiltrate näher zu charakterisieren.

Die Analysen in Abbildung 3.25 zeigten, dass die Frequenz von myeloiden und lymphatischen Zellen, die TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$  produzierten, nach Behandlung mit Oxa signifikant geringer war. In Einklang mit den Proteome Profiler-Analysen konnte in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen eine verringerte Anzahl von CD4<sup>+</sup> Zellen detektiert werden, die IFN $\gamma$ , IL6 oder IL17 sekretieren. Wie bereits im Kapitel 4.3.1 dargestellt, werden durch eine vermehrte Ausschüttung dieser Zytokine inflammatorische Prozesse in dem betroffenen Gewebe vorangetrieben. Somit kann für Oxa ein anti-inflammatorischer Effekt in diesem SLE- Mausmodell nachgewiesen werden.

In Kongruenz konnte gleichzeitig zu der verminderten Frequenz von inflammatorischen CD4<sup>+</sup> Zellen in immunhistochemischen Färbungen als auch in durchflusszytometrischen Analysen gezeigt werden, dass die Behandlung mit Oxa zu einer Zunahme von Tregs führt (Kapitel 3.3.4), die durch die Expression von FoxP3 charakterisiert sind (Scheinecker *et al.*, 2010). Diese Zellen unterbinden autoimmune Prozesse und halten das Immunsystem in einem homöostatischen Gleichgewicht. Funktionell steuert FoxP3 als Transkriptionsfaktor zum einen die Differenzierung von Tregs (Horwitz, 2008). Zum anderen kommt es durch eine erhöhte Expression von FoxP3 zu einer Suppression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ Ts, der hauptsächlich für die Differenzierung von Th17-Zellen verantwortlich ist (Ichiyama *et al.*, 2008). Durch diese Interaktion wird die Bildung von proinflammatorischen Th17-Effektorzellen verhindert. Bei Lupus Nephritis-Patienten ergaben durchflusszytometrische Analysen von PBMCs eine verminderte Frequenz von FoxP3-positiven Tregs bei einer gleichzeitig erhöhten Frequenz von Th17-Zellen (Xing *et al.*, 2012). Diese Inbalance von autoreaktiven Th17-Zellen und regulatorischen T-Zellen ist jedoch nur ein Teil der abnormalen immunologischen Veränderungen in SLE-Patienten (Kapitel 1.3.1).

Neben dysregulierten T-Zellen sind auch B-Zellen und dendritische Zellen in SLE-Patienten in ihrer Differenzierung und Aktivität verändert (Kapitel 1.3.1). B-Zellen sind neben T-Zellen ein entscheidender Bestandteil des adaptiven Immunsystems und sind für die Produktion von Antikörpern verantwortlich. Eine Hyperreaktivität von B-Zellen in Verbindung mit der vermehrten Produktion von autoreaktiven IgG-Antikörpern ist einer der wesentlichen pathologischen Vorgänge in SLE-Patienten (Dorner *et al.*, 2011). Wie in diesem Kapitel und im Kapitel 4.3.3 dargelegt, wurde in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen durch Oxa die Anzahl von B-Zellen in der Niere und die Konzentration von IgGs im Serum

verringert. Dies deutet in Verbindung mit der reduzierten Anzahl von CD4-positiven Zellen, die die B-Zellen aktivieren können, auf eine verminderte humorale Immunantwort in den Mäusen, die mit Oxa behandelt wurden, hin.

Zusammenfassend konnte in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen eine anti-inflammatorische Wirkung von Oxa durch die Oxa-vermittelte Reduktion der Proteinexpression verschiedener Zytokine und Chemokine gezeigt werden. Diese werden hauptsächlich von Monozyten und Lymphozyten produziert und tragen maßgeblich zur Progression der Lupus Nephritis bei. Die geringere Expression der chemotaktischen und inflammatorischen Moleküle könnte wie bereits erwähnt auf einen hemmenden Effekt von Oxa auf die JAK/STAT-Signaltransduktion zurückzuführen sein. Dabei stellt die Hemmung der STAT-Signaltransduktion einen vielversprechenden Mechanismus dar inflammatorische Prozesse entgegenzuwirken und ist daher seit einigen Jahren im Mittelpunkt des Interesses der Pharmaindustrie. Bereits erfolgreich konnte Tofacitinib als JAK-Inhibitor in der Therapie der RA in den USA zugelassen werden und steht zurzeit in SLE-Patienten zu Erprobung.

Letztendlich führt die Reduktion von chemotaktischen Molekülen durch die Oxa-Behandlung nachweislich zu einer reduzierten Akkumulation von Immunzellen. Die Wirkung von Oxa auf immunologische Prozesse, die die Progression der Erkrankung fördern, legt nahe, dass eine Verbesserung der Nierenfunktion zum Teil auf diesen Aspekt zurückzuführen ist.

Perspektivisch sollte der Einfluss von Oxa auch auf dendritische Zellen im Fokus weiterer Untersuchungen stehen. Dendritische Zellen stellen funktionell die Verbindung zwischen angeborener und adaptiver Immunität her, indem sie Antigene lysosomal verdauen, die Peptide auf ihrer Oberfläche naiven T-Zellen präsentieren und diese somit spezifisch aktivieren. Des Weiteren sind dendritische Zellen eine der hauptsächlichen Produzenten von Interferon alpha (IFN $\alpha$ ) (Siegal *et al.*, 1999). In mehreren Studien wird IFN $\alpha$  als Typ I Interferon in der Pathogenese des SLE als eines der Schlüsselmoleküle gehandelt, da in SLE-Patienten häufig eine gesteigerte Transkription von Typ I Interferon regulierten Genen detektiert werden kann (Obermoser and Pascual, 2010).

### **4.3.3 Wirkung von Oxacyclododecindion auf die Nierenfunktion**

Die Ablagerung von zirkulierenden Immunkomplexen initiiert glomeruläre Entzündungsprozesse und aktiviert zudem das klassische Komplementsystem. Der inflammatorische Prozess führt letztendlich in der Niere zu einem Umbau und zum Auflösen der Gewebestruktur, was eine Verschlechterung der Nierenfunktion zur Folge hat.

#### 4.3.3.1 Oxacyclododecindion stabilisiert die Funktionsfähigkeit der Niere

Aufgrund der reduzierten Expression inflammatorischer Mediatoren (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) sowie der verminderten Infiltration von Immunzellen in die Nieren unter der Behandlung mit Oxa (Kapitel 3.3.3 und 3.3.4), wurden klinische Parameter untersucht, die Aufschluss über die Funktionsfähigkeit und den Grad der Glomerulonephritis geben sollten (Kapitel 3.3.5). Diese sollten sich in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen angesichts der vorrangigen Befunde im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Oxa verbessert haben. Über den fünfwöchigen Behandlungszeitraum konnte ein verminderter Anstieg der Proteinurie in Oxa-behandelten Mäusen semi-quantitativ nachgewiesen werden (Abbildung 3.28 A). Um auszuschließen, dass die Messung durch Diskrepanzen in der Konzentration des Spontanurin beeinflusst wurde, wurde zusätzlich quantitativ das Albumin-Kreatinin-Verhältnis (ACR) bestimmt (Abbildung 3.28 B). Da Kreatinin als Abbauprodukt der Kreatinsäure im Muskel konstant über den Urin ausgeschieden wird, kann die Kreatininkonzentration mit der Harnkonzentration gleichgesetzt werden (Vieten, 2009). Die Bestimmung des ACR im Urin der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse unterstützt die Aussage der semi-quantitativen Analyse, dass durch die Gabe von Oxa die Rückresorption von Proteinen verbessert wurde, obgleich erst am letzten Analysetag signifikante Unterschiede detektiert wurden.

Infolge massiver Schäden des Nierengewebes durch anhaltende inflammatorische Prozesse, sinkt die Rückresorption von Proteinen, die demzufolge vermehrt ausgeschieden werden (Remuzzi *et al.*, 1997). Die geringe Ausscheidung von Protein, die unter dem Einfluss von Oxa detektiert werden kann, ist daher vereinbar mit der anti-entzündlichen und immunmodulierenden Wirkung der Substanz und gibt den ersten Hinweis auf eine Stabilisierung der Nierenfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe.

#### 4.3.3.2 Mechanismen, die die Funktionsfähigkeit der Niere bedingen, werden durch Oxacyclododecindion positiv beeinflusst

Wie bereits im Kapitel 4.3.2 dargelegt, führt die Behandlung mit Oxa zu einer Reduktion von Immunzellinfiltraten in den Nieren der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse. Dabei legt die geringere Anzahl der detektierten B-Zellen den Schluss nahe (Abbildung 3.24), dass die humorale Immunantwort durch die Gabe von Oxa gedrosselt wird. Aus diesem Grund wurden am Ende der Behandlung die IgG-Subklassen im Serum der Tiere bestimmt. In der Oxa-behandelten Gruppe konnte unter anderem eine Reduktion der Subklassen IgG2a und IgG3 detektiert werden (Abbildung 3.29). Zum einen kann diese verringerte humorale Immunantwort ein Effekt der Oxa-vermittelten Reduktion des Th1-Zytokins IFN $\gamma$  sein (Baudino *et al.*, 2006). Dies wurde bereits in Kapitel 4.3.1 beschrieben. Zum anderen kann diese Wirkung auf eine verminderte IL6 Expression durch die Gabe von Oxa zurückzuführen sein, da auch dieses Zytokin an der Induktion der IgG Produktion beteiligt ist (Kawano *et al.*, 1995). IgGs gegen dsDNA nehmen in der Progression der SLE-

Erkrankung eine Schlüsselfunktion ein (Kapitel 1.3.1). Da diese bei 70 – 96 % der SLE-Patienten nachweisbar sind, spielen sie auch bei der Diagnose von SLE eine besondere Rolle (Yung and Chan, 2012). In Oxa-behandelten Mäusen konnten im Vergleich zur Kontrollgruppe weniger Antikörper gegen dsDNA detektiert werden (Abbildung 3.30). Liegen vermehrt dsDNA-Autoantikörper vor, kann es zu einer vermehrten Bildung von Antigen-Antikörper Komplexen kommen, die durch ihre geringe Löslichkeit ausfallen und sich in der Niere ablagern können (Toong *et al.*, 2011). In Übereinstimmung mit diesen Daten konnte eine signifikant verringerte Ablagerung von IgG in den Glomeruli nachgewiesen werden (Abbildung 3.32 A).

Im Zuge der Bildung von Immunkomplexen wird auch das Komplementsystem aktiviert. Daher korrelieren oft IgG-Ablagerungen mit Ablagerung von Plasmaproteinen des Komplementsystems (Ma *et al.*, 2014). In den Untersuchungen konnte kolokalisiert zu den IgG-Ablagerungen auch tendenziell weniger C3-Ablagerungen in den Glomeruli der Oxa-behandelten Gruppe detektiert werden (Abbildung 3.32). Dies lässt vermuten, dass in den Oxa-behandelten Tieren als sekundärer Effekt das Komplementsystem geringer aktiviert wurde. Um dies zu untersuchen, wurde mittels ELISA die C3-Konzentration im Serum bestimmt. Im Vergleich zu den gesunden Balb/c Mäusen konnte eine verminderte Menge an C3 im Serum beider Behandlungsgruppen nachgewiesen werden (Abbildung 3.31), was allerdings eher für eine erhöhte Aktivität des Komplementsystems spricht. Im Gegensatz zu PBS/EtOH-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen war jedoch der Unterschied von Balb/c zu Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen nicht signifikant. Dieser Befund unterstützt somit die Hypothese, dass es in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu einer geringeren Aktivierung des Komplementsystems durch die Gabe von Oxa kommt. Die Bedeutung des Komplementsystems für die Progression der Erkrankung konnte bereits die Arbeitsgruppe von Tomlinson mit einem Inhibitor des alternativen Komplementwegs in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zeigen. Die Behandlung der Mäuse führte zu einer verminderten Proteinurie und zu geringeren IgG- und C3-Ablagerung in den Nieren. Zum anderen führte der Einsatz des Inhibitors, CR2-fH, zu einer Reduktion zirkulierender Immunkomplexe. Ebenfalls konnte durch den Inhibitor die Expression von anti-dsDNA-Antikörpern verringert werden (Sekine *et al.*, 2011).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten histopathologischen Untersuchungen konnten in Nieren Oxa-behandelter Weibchen im Vergleich zur PBS/EtOH Kontrollgruppe eine geringere Bildung von fibrinogenen Matrixkomponenten belegen (Abbildung 3.23). Eine Degradation der extrazellulären Matrix wird durch MMP gesteuert. Die Aktivität dieser MMPs wird dabei durch inflammatorische Zytokine, Wachstumsfaktoren (TGF- $\beta$ ), Hormone sowie Zell-Zell- und Zell-Matrix Interaktionen initiiert (Nagase *et al.*, 2006). Somit konnte die Induktion der MMP Expression mit der Aktivität der Erkrankung und mit der Einwanderung von inflammatorischen Zellen ins Gewebe assoziiert werden.

Die erhöhte Exposition und Konzentration der MMPs bestimmen dabei über die glomerulären Strukturschäden in der Fibrose (Lenz *et al.*, 2000). Daher sollte der Effekt von Oxa auf die Expression der MMPs in weiterführenden Untersuchungen analysiert werden.

Eines der Schlüsselmoleküle in der Progression der Nierenfibrose ist TGF- $\beta$ . Lan (2003) konnte zeigen, dass TGF- $\beta$ 1 durch EMT die Bildung von Fibroblasten aus TEC induziert. Durch die Funktion die Produktion von Komponenten der extrazellulären Matrix zu stimulieren und gleichzeitig die Degradation der extrazellulären Matrix zu inhibieren, nimmt die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion eine zentrale Rolle in der Pathogenese der Fibrose ein. Serwe (2007) und Rudolph *et al.* (2013) konnten in HepG2 Zellen zeigen, dass Oxa die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion durch die direkte Inhibition von aktivierten SMAD Transkriptionsfaktoren blockierte. Des Weiteren konnte in *in-vitro* Zellenversuchen durch die Behandlung mit Oxa eine Hemmung der Transkription von TGF- $\beta$ -induzierten Genen nachgewiesen werden. Bei diesen Genen handelte es sich unter anderem um die Gelatinasen MMP-2 und MMP-9, die zum Teil in immunhistochemischen Färbungen vermehrt in den Glomeruli von Lupus Nephritis-Patienten nachgewiesen werden konnten (Urushihara *et al.*, 2002). Daher sollte in weiteren Untersuchungen nicht nur die Expression der MMPs analysiert werden, sondern auch, ob Oxa *in-vivo* einen Effekt auf die TGF- $\beta$ -vermittelte Signaltransduktion vermittelt.

MMPs können auch durch die sterische Bindung von Gewebeinhibitoren, den „*tissue inhibitors of metalloproteinases*“ (TIMP), an das katalytische Zentrum von MMPs inhibiert werden (Zhang *et al.*, 2006; Radisky and Radisky, 2010). Somit ist eine Inbalance der Aktivität von MMPs und TIMPs ein weiterer entscheidender Faktor bei der Entwicklung der Lupus Nephritis (Jiang *et al.*, 2010). In den Proteome Profiler-Analysen konnte auf Proteinebene eine Abnahme der TIMP1 Expression durch Oxa detektiert werden (Abbildung 3.19). Inwieweit dies mit den fibrotischen Prozessen in MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen im Zusammenhang gebracht werden kann, muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden. Jiang *et al.* (2010) konnten jedoch zeigen, dass in LN-Patienten das Verhältnis von MMP-9 und TIMP1 negativ mit dem dsDNA-Antikörpertiter korreliert. In den MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen konnte übereinstimmend zu der geringeren TIMP1 Expression auch eine geringere Konzentration von dsDNA-Antikörpern im Serum von Oxa-behandelten Mäusen detektiert werden (Abbildung 3.30).

Zusammenfassend kann die verbesserte Nierenfunktion auf Oxa-vermittelte anti-inflammatorische und anti-fibrotische Effekte zurückgeführt werden. Durch die verminderte Expression von inflammatorischen Mediatoren, dem Einfluss auf Regulatoren fibrotischer Prozesse sowie der Beeinflussung immunmodulierender Faktoren kann Oxa im Modell des SLE den Verlauf der Glomerulonephritis im beobachteten Zeitraum mildern.

## 4.4 Genexpressionsanalysen zur Identifizierung weiterer Zielmoleküle von Oxacyclododecindion

Mit Nierengewebe aus MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen wurden totalgenomische DNA-Mikroarray-Analysen durchgeführt (Kapitel 3.4.1), um weitere Gene zu identifizieren die durch Oxa in ihrer Expression reguliert werden. Mit Hilfe der Onlineplattform WebarryDB wurden die Daten statistisch analysiert (Kapitel 3.4.1.1), um im Anschluss kongruent signifikant regulierte Gene weiter zu untersuchen. 371 Gene die durch Oxa in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen signifikant moduliert wurden, konnten somit identifiziert werden.

### 4.4.1 Zielmoleküle von Oxacyclododecindion die mittels der DNA-Mikroarray-Analyse identifiziert werden konnten

Um die Ergebnisse aus den Mikroarray-Analysen zu verifizieren und somit neue Zielmoleküle von Oxa zu identifizieren, wurden qRT-PCR-Analysen mit Proben aus Nierengewebe der MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen und primären Makrophagen durchgeführt (Kapitel 3.4.1.2). Der Fokus bei der Auswahl der Gene die im Zuge der Überprüfung untersucht wurden lag zum einen auf deren Funktion in biologischen und zellulären Prozessen. Andere Moleküle wurden aufgrund ihrer starken Expressionsänderung durch die Behandlung mit Oxa ausgewählt. Zu diesen Genen gehört auch MOSPD1 (*Motile Sperm Domain Containing 1*), welches in den Mikroarray-Analysen und in den Peritonealmakrophagen nach einer Behandlung mit Oxa vermehrt exprimiert wurde (Abbildung 3.36). Die Funktion des auf dem X-Chromosom liegenden Gens ist bis heute nicht bekannt. Hinweise geben nur die Analysen von Thaler *et al.* (2011), die MOSPD1 als einen potentiellen Regulator der Epithelial-mesenchymalen Transition (EMT) identifizieren konnten. Im Zusammenhang mit Untersuchungen in Monozyten von aktiven, unbehandelten SLE-Patienten konnte Patel (2008) eine verringerte Expression von MOSPD1 detektieren. Wurden zudem die Monozyten, mit dem Ziel diese zu dendritischen Zellen zu differenzieren, unter den Einfluss von Typ I Interferonen kultiviert, konnte eine weitere signifikante Abnahme der mRNA Expression festgestellt werden (Patel, 2008). Diese Beobachtung erscheint unter dem Gesichtspunkt, dass in vielen Patienten eine Interferon Signatur nachgewiesen werden konnte, sehr interessant. Falls MOSPD1 unter dem Einfluss von Typ I Interferonen wie IFN $\alpha$  oder  $\beta$  reguliert wird, kann eine Modulation der Expression auf diese durch Oxa nicht ausgeschlossen werden. Ob MOSPD1 letztlich auch eine Rolle in der Pathogenese des SLE spielt und welchen Einfluss die vermehrte Expression der mRNA durch Oxa auf die Progression der SLE-Erkrankung hat ist unklar, soll jedoch in weiterführenden Untersuchungen im Fokus stehen.

Im Gegensatz zur vermehrten Detektion der MOSPD1 mRNA in den Mikroarray-Analysen konnte in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen eine reduzierte mRNA Expression von

KIM1 (*kidney injury molecule-1*) nachgewiesen werden. Dieser Befund konnte in qRT-PCR-Analysen mit weiteren Nierenproben der Mäuse und in den primären Makrophagen (Abbildung 3.41) als auch mittels Western Blot-Analysen auf Proteinebene (Abbildung 3.42) abgesichert werden. KIM1 ist in der Niere mit einer interstitiellen Fibrose sowie mit entzündlichen Prozessen assoziiert (Lim *et al.*, 2013) und avancierte über den Nachweis im Urin zu einem Biomarker für Nierenschädigungen (Han *et al.*, 2002). Eine erhöhte Konzentration von KIM1 im Urin konnte auch für LN-Patienten gezeigt werden, wobei die Konzentration im Urin mit dem Nachweis von KIM1-positiven Zellen in histologischen Nierenbiopsien korrelierte (Nozaki *et al.*, 2014). In Untersuchungen von Umetsu *et al.* (2005) und de Souza *et al.* (2005) konnte zudem festgestellt werden, dass KIM1 auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und vermutlich dort als kostimulatorisches Molekül wirkt, um T-Zellen zu aktivieren und zu differenzieren sowie die Produktion von Zytokinen zu steigern. Beide Arbeitsgruppen kamen zu dem Schluss, dass KIM1 als membranständiger Rezeptor von Immunzellen eine essentielle Rolle in der Regulation des Immunsystems spielt. Ob KIM1 in Assoziation mit dendritischen Zellen und aktivierten B-Zellen gebracht werden kann, ist jedoch weiterhin fragwürdig, da in verschiedenen Studien widersprüchliche Ergebnisse präsentieren werden (Rennert, 2011).

Der Effekt der Hemmung von KIM1 durch den Inhibitor RMT1-10 auf die Progression der Lupus-Erkrankung wurde bereits in MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen untersucht (Nozaki *et al.*, 2014). Die Behandlung mit dem Antikörper führte zu einer erhöhten Überlebensrate der Mäuse und Lymphknotenschwellungen und Hautläsionen entwickelten sich nur eingeschränkt. Über den Nachweis einer verringerten Proteinurie konnte festgestellt werden, dass die Nierenfunktion erhalten blieb. Des Weiteren wurden weniger dsDNA-Antikörper im Serum nachgewiesen und reduzierte Ig- und C3-Ablagerungen sowie eine geringere Akkumulation von Leukozyten in der Niere detektiert. Überdies wurden mit dem KIM1-Antikörper die systemischen und intrarenalen Th1- und Th17-Zellantworten reduziert, gleichzeitig eine erhöhte Frequenz von T- und B-regulatorischen Zellen nachgewiesen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Oxa-vermittelten Effekten in den MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen die im Rahmen dieser Arbeit detektiert wurden. Ob Oxa *in-vivo* durch die Interaktion mit KIM1 oder durch Modulation der Signalwege die für die KIM1 Expression verantwortlich sind, den Krankheitsverlauf beeinflusst muss in weiteren Untersuchungen analysiert werden. Dabei sollte auch die Interaktion mit TIM-4 (*T-cell Immunoglobulin Mucin protein 4*), als ein Ligand von KIM1 (Meyers *et al.*, 2005), im Fokus stehen, da dieser für die Aktivierung von T- Zellen und Makrophagen verantwortlich sein soll (Nozaki *et al.*, 2014).

Eine Gruppe von Genen die funktionell im Zusammenhang mit Veränderungen der Genexpression stehen, war ein weiterer Schwerpunkt der Untersuchungen. So konnte eine Regulation von Nxf1 (*Nuclear RNA export factor 1*) mittels Mikroarray- und qRT-PCR-Analysen im Nierengewebe Oxa-behandelter MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäuse und in Oxa-behandelten

Primärmakrophagen nachgewiesen werden. Da Nxf1 Poly (A)<sup>+</sup> RNA aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert, wäre hier von Interesse, ob eine Regulation der Expression auch auf Proteinebene nachweisbar ist. Sollte Nxf1 vermindert exprimiert werden, würde durch die ubiquitäre Expression des Proteins (Sasaki *et al.*, 2005) jedoch die Signaltransduktion des Organismus generell reduziert werden, da geringere Mengen an vollständig prozessierter mRNA zur Translation ins Zytoplasma gelangen würden.

Durch die Oxa-Behandlung konnte auch eine verminderte mRNA Expression des RNA-bindenden Proteins PTBP1 (*polypyrimidine tract binding protein1*) in primären Makrophagen wie auch in den Mikroarray-Analysen in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen detektiert werden. PTBP1, das ubiquitär exprimiert wird, greift über verschiedene Mechanismen in die Reifung und Translation der mRNA ein und ist daher an der Regulation von vielen biologischen Prozessen beteiligt. Im Zusammenhang mit der beobachteten Wirkung von Oxa, erscheint die Funktion von PTBP1 an die 3'-UTR von Ziel-mRNAs zu binden und so den Transport und die Stabilität der gebundenen mRNA zu regulieren (Sawicka *et al.*, 2008) interessant für den Wirkmechanismus von Oxa. Unter dem Aspekt der Bindung an die 3'-UTR, konnten Engels *et al.* (2012) auch eine Funktion von PTBP1 in der microRNA-vermittelten Genregulation aufzeigen, was für weitere Analysen von Oxa-vermittelten Effekten durchaus eine Rolle spielen könnte. Im Zuge der Untersuchung konnte in den primären Makrophagen auch ein CM-vermittelter Effekt auf die Expression von PTBP1 detektiert werden. Die vermehrte mRNA Expression nach CM Stimulation konnte bisher in immortalisierten Zelllinien, wie den humanen DLD1 (Pautz *et al.*, 2006) und murinen RAW 264.7 Zellen (Daten nicht gezeigt), nicht nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu KIM1, Nxf1 und PTBP1 konnte eine Regulation von Dcp1a (*Decapping enzyme homolog A*) und Osgin1 (*Oxidative Stress Induced Growth Inhibitor 1*) in den qRT-PCR-Analysen nicht bestätigt werden. Dies kann zum einem auf eine hohe Standardabweichung im Fall der qRT-PCR-Analysen von Dcp1a in den Nierenproben zurückgeführt werden. Zum anderen können in Mikroarray-Analysen falsch-positive Ergebnisse aufgrund des Aufbaues des Chips, zum Beispiel durch sogenannte „*chip artifact*“, generiert werden (Yu *et al.*, 2007). In Studien von Yu *et al.* konnte gezeigt werden, dass Spots die sich in unmittelbarer Nähe auf dem Glaträger befinden eine höhere Korrelation in ihren Expressionsprofilen aufweisen können als weiter entfernt liegende. Des Weiteren kann auch die Wahl der Primer ein Problem darstellen. Diese sollten für eine Mikroarray-Analyse dieser Art eher genspezifisch sein, das heißt die Mehrheit aller Splicevarianten abdecken. Daher ist für die spätere Verifizierung die Wahl des Transkriptes wichtig, da eine transkriptspezifische Wahl der Primersequenz ein von dem Mikroarray abweichendes Ergebnis hervorbringen kann. Nicht zuletzt spielt auch die Länge und die genaue Sequenz des Primers der auf den Glaträger sitzt eine Rolle, wie in der Publikation von Draghici *et al.* (2006) zusammengefasst wurde.



#### 4.4.2 Analyse der DNA-Mikroarray-Daten mittels Ingenuity Software führte zur Identifizierung weiterer putativer Zielmoleküle

Mittels der statistischen Auswertung von WebArrayDB konnten aus den Daten der DNA-Mikroarray-Analysen 371 Gene identifiziert werden, die in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen different von PBS/EtOH-behandelten Mäusen exprimiert waren (Kapitel 3.4.1.1) und somit potentielle Zielgene von Oxa darstellen. Die Auswertung und Einordnung der signifikant regulierten Gene in zelluläre Signalwege erfolgte mit der Ingenuity Software. Die Ergebnisse dieser Analysen unterstützen die Aussage aus den Proteinanalysen sowie den durchflusszytometrischen und histopathologischen Untersuchungen. So scheinen weitere Moleküle, als die bereits identifizierten, eine Rolle bei der „*Cellular Assembly and Organization*“, „*Cellular Function and Maintenance*“, „*Cellular Development*“, „*Cellular Movement*“ und beim „*Cell-To-Cell Signaling and Interaction*“ zu spielen. Eine Identifizierung und Verifizierung dieser Gene kann einen weiteren Aufschluss über den Wirkmechanismus von Oxa geben.

##### 4.4.2.1 Netzwerkanalysen

Mit Hilfe der Ingenuity Knowledge Base wurden in den Netzwerkanalysen Moleküle integriert die mit den signifikant regulierten Genen aus den DNA-Mikroarray-Analysen assoziiert sind. Diese prognostizierten Moleküle wurden im Rahmen dieser Arbeit auf ihre Relevanz hin überprüft (Kapitel 3.4.1.1 und 3.4.1.3).

Im Netzwerk 1 (4.6A.1.1) ist der NF- $\kappa$ B Komplex eines der Moleküle mit den meisten Interaktionen in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen. Bereits die mRNA Expressionsanalysen der S100A8, TNF $\alpha$  und SPP1 Expression legten eine Regulation der Aktivierung dieses Komplexes durch Oxa nahe. Der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B reguliert die Expression einer Vielzahl von Genen die eine Schlüsselfunktion in der Entzündung und in der Nierenschädigung einnehmen. Dies beinhaltet die Aktivierung und die Entwicklung von Lymphozyten und dendritischen Zellen. So kommt es bei einer fehlgeleiteten Regulation von NF- $\kappa$ B unter anderem zu einer Freisetzung von autoreaktiven B- und T-Zellen in der Peripherie (Zubair and Frieri, 2013). SLE ist eine prototypische Autoimmunerkrankung die durch Entzündungs- und gewebescheidigende Prozesse charakterisiert ist, angetrieben durch die Aktivierung von autoreaktiven T- und B-Zellen (Engler *et al.*, 2011). Eine Regulation von NF- $\kappa$ B ist aufgrund der hemmenden Wirkung von Oxa auf die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion denkbar. So konnten Freudlsperger *et al.* (2013) in *in-vitro* Analysen zeigen, dass es durch die Aktivierung von TGF- $\beta$  zu einer TAK1 (TGF- $\beta$  aktivierende Kinase 1) verstärkten Aktivierung des NF- $\kappa$ B Signalweges kam.

Ebenso wurde die p38 MAPK (Netzwerk 7 in 4.6A.1.1) als regulatorische Einheit von Oxa vorhergesagt. Auch die p38 MAPK wird über eine TGF- $\beta$ -vermittelte Aktivierung von TAK1 reguliert (Kim *et al.*, 2007). Eine reduzierte Aktivität durch eine verminderte Phosphorylierung der p38 MAPK durch Oxa konnte bereits in Western Blot-Analysen bestätigt werden. Eine Reduktion der Aktivität steht dabei im Einklang zum einen mit dem Nachweis der verringerten Expression von Zytokinen und Chemokinen (Kapitel 3.3.1 und 3.3.2) und zum anderen mit dem Nachweis einer verminderten Ig-Produktion (Abbildung 3.29) (Iwata *et al.*, 2003). Als Folge einer Modulation der Aktivität der p38 MAPK wurde auch eine Regulation des Transkriptionsfaktors AP-1 (Netzwerk 6) vermutet, dessen Aktivität über den MAPK-Signalweg reguliert wird (Whitmarsh and Davis, 1996).

Ein weiteres Zielmolekül, welches als zentraler Angriffspunkt von Oxa vorstellbar wäre, ist Ubiquitin (Netzwerke 2, 3, 10 und 11 in 4.6A.1.1). Eine Ubiquitinierung kann mehrere Konsequenzen für die Signaltransduktion haben. Neben der Markierung für den proteasomalen Abbau von Proteinen wie STAT3 (Perry *et al.*, 2004) können durch verschiedene Enzyme vereinzelte Ubiquitin Moleküle oder mehrere Ubiquitin Addukte an ein Substratprotein angehängt werden (Hershko and Ciechanover, 1998) und zur Aktivierung von Kinasen führen. Diese wiederum sind an der NF- $\kappa$ B- oder MAPK-Signaltransduktion beteiligt (Corn and Vucic, 2014). Somit können entzündliche Prozesse durch die Interaktion und Aktivität des Ubiquitin-vermittelten Signalsystems unterschiedlich reguliert werden. Daher wäre je nach Prozess eine Hemmung als auch Aktivierung des Ubiquitin-Systems durch Oxa denkbar.

Das microRNAs in der Pathogenese des SLEs und in der Regulation inflammatorischen Prozessen eine entscheidende Rolle spielen ist seit längerem Untersuchungsschwerpunkt vieler Forschungsgruppen. Aufgrund der Fähigkeit von microRNAs mit zahlreichen mRNAs zu interagieren wurde auch in der Netzwerkanalyse microRNAs als denkbare Zielstrukturen vorgestellt. So konnte die microRNA 92 in den Analysen von Netzwerk 3 als mögliches Netzwerk-molekül identifiziert werden. Der Abgleich mit möglichen Interaktionspartnern zeigte eine theoretische Bindung von microRNA 92 an Ubiquitin und MAPK Zielgene ([www.miRDB.org](http://www.miRDB.org)). Weitere microRNAs die aufgrund der anteilmäßig hohen Interaktion mit Molekülen aus dem Mikroarray-Daten von Bedeutung sein könnten, wären die microRNA 4640 (Netzwerk 3), die bei Patienten mit akuter Nierenentzündung im Urin nachgewiesen wurde (Ramachandran *et al.*, 2013) sowie die microRNAs 486 und 4651 (Netzwerk 5).

Weitere Schlüsselmoleküle, die bereits in Assoziation mit SLE gebracht wurden und damit für den Wirkmechanismus von Oxa in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen interessant erscheinen, wären Beta-Estradiol (Netzwerk 13 und 14), NF-AT (Netzwerk 7), INF $\alpha$  (Netzwerk 7) sowie ERK (Netzwerk 5, 6, 8) (Lahita, 2011). Des Weiteren, wie bereits mehrmals

beschrieben, spielt die Signalvermittlung von  $\text{IFN}\gamma$  und der Einfluss von IgG eine wesentlich Rolle in der Pathogenese des SLE. Im Netzwerk 15 beziehungsweise 6 wurden  $\text{IFN}\gamma$  und Immunglobuline als wesentliche Zielstrukturen von Oxa vorhergesagt. Dies konnte bereits durch mRNA-, Protein-, histopathologische und durchflusszytometrische Analysen bestätigt werden. So konnte in MRL *Fas*<sup>lpr</sup> Mäusen die mit Oxa behandelt wurden, eine verminderte Expression von  $\text{IFN}\gamma$ , geringere Ablagerungen von IgG in den Glomeruli sowie weniger zirkulierende IgG-Subklassen im Serum nachgewiesen werden. Dementsprechend konnten Teile der theoretischen Interaktionen in den Ingenuity Netzwerkanalysen bestätigt werden. Weitere Zielstrukturen die möglicherweise in Assoziation mit der Wirkung von Oxa stehen, müssen jedoch erst in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden.

#### 4.4.2.2 „Upstream Regulator“-Analyse

Eine weitere Hilfestellung, die die Ingenuity Software bei der Identifizierung von Zielmolekülen gibt, ist die „Upstream Regulator Analytic“. In dieser Analyse (Kapitel 3.4.1.3) integrierte Ingenuity die tatsächliche Genexpressionsänderung der signifikant regulierten Moleküle aus den Mikroarray-Daten mittels des *z-scores*, um eine Vorhersage über die Aktivierung oder Inhibition derer Transkriptionsregulatoren zu treffen. Dies ermöglicht in zukünftigen Analysen, nach einer Verifizierung der Moleküle, die bereits vorhandenen Daten zu interpretieren und in einer Theorie zu bündeln. Mittels der *Upstream*-Analyse konnten 434 Moleküle identifiziert werden, die in einer möglichen Interaktion mit den durch Oxa regulierten Genen stehen. Von diesen wurde für 47 Moleküle, unter Einbeziehung der Expression der Gene aus dem Mikroarray, eine Inhibierung und für 12 Moleküle eine Aktivierung vorhergesagt.

Unter den möglicherweise aktivierten Molekülen befindet sich neben zahlreichen microRNAs auch der *nuclear factor (erythroid-derived)-like 2* (Nrf2). Eine putative Regulation dieses Transkriptionsfaktors durch Oxa wäre für die zukünftigen Analysen interessant, da bereits in der Literatur ein Zusammenhang von Nrf2 und SLE formuliert wurde. So entwickelten Mäusen mit einem Nrf2-Defizit Lupus-ähnliche Symptome wie eine starke Nephritis, die durch eine erhöhte Proliferation sowie Ablagerungen von IgG, IgM und C3 charakterisiert ist (Yoh *et al.*, 2001). Im Serum der Mäuse konnten zudem erhöhte IgG- und dsDNA-Antikörper nachgewiesen werden. Ein Einfluss auf die Nrf2 Expression durch Oxa könnte daher ein weiterer Hinweis auf den Wirkmechanismus und mögliche Zielstrukturen von Oxa im SLE Modell geben.

In der Gruppe der möglicherweise inhibierten Moleküle wird neben zahlreichen microRNAs auch das Molekül p53 aufgezeigt. In B6 Mäusen die als Doppelmutanten einen Defekt im p53- und *Fas*-Signalweg aufweisen konnten deutlich weniger Autoantikörper nachgewiesen werden, als in der Mutante die nur ein Defizit im *Fas*-Gen

aufwies (Kuan and Cohen, 2005). Dies fügt sich mit dem Befund aus SLE-Patienten die eine erhöhte Proteinkonzentration von p53 aufweisen (Miret *et al.*, 2003) Somit wäre eine Analyse, ob Oxa im SLE Model die Aktivität oder Expression von p53 reguliert von Interesse und könnte zur Klärung des Wirkmechanismus von Oxa beitragen.

Wie bereits erwähnt, sind die meisten der von der Ingenuity Software vorgeschlagenen *Upstream*-Moleküle microRNAs. Die Bewertung der microRNAs als Zielstrukturen durch die Ingenuity Software sollte jedoch in diesem Fall durchaus kritisch betrachtet werden, da die Vorhersage einer microRNA als Interaktionspartner in dieser Modelldarstellung selten auf experimentellen Ergebnissen basiert. Der Abgleich und die Bewertung einer möglichen microRNA-mRNA Wechselwirkung, im Zuge einer „*Upstream Regulator*“-Analyse durch die Ingenuity Software, erfolgt hauptsächlich durch den Zusammenschluss mit Datenbanken wie TarBase, miRecords oder Targetscan, die eine mögliche Interaktion durch programmgesteuerte Rechenalgorithmen vorhersagen.

Trotz alledem, wie im Kapitel 4.5.2 dargestellt, konnte ein Einfluss von Oxa auf die Expression zahlreicher microRNAs bestätigt werden. Der Abgleich der Liste aller 434 Moleküle aus der „*Upstream Regulator*“-Analyse mit den 84 microRNAs des microRNA Array zeigte, dass es neun gemeinsame microRNAs gab (miR-9, miR-16, miR-19b, miR-29b, miR-291a, miR-340, miR-495, miR-590, miR-876), auf die Oxa einen regulatorischen Effekt hatte (Kapitel 3.4.2). Die microRNAs 19b und 340 konnten als Zielstrukturen von Oxa experimentell bestätigt werden (Abbildung 3.46). Wie unter dem Kapitel 4.5.2 beschrieben, sollten in weiterführenden Untersuchungen Ziel-mRNAs der microRNAs identifiziert werden, um deren Funktion in der Progression der Erkrankung zu klären und weitere Erkenntnisse zum Wirkmechanismus von Oxa zu erhalten. Dabei sollten auch Wechselwirkungen mit dem JAK/STAT-Signalweg analysiert werden, da bereits gezeigt werden konnte, dass Transkriptionsfaktoren wie STAT einen direkten als auch indirekten Einfluss auf die Expression von microRNAs und deren Zielgene haben (Nazarov *et al.*, 2013).

Des Weiteren könnte eine mögliche Regulation der Expression der microRNA 21 durch Oxa von Interesse sein. In der *Upstream*-Analyse wurde ausgehend von 10 regulierten Molekülen aus dem DNA-Mikroarray einer verminderte Expression der microRNA 21 durch die Gabe von Oxa vorhergesagt. Eine Verifizierung dieses Ergebnisses wäre für die Behandlung des Lupus von Vorteil, da bekanntlich in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen als auch in SLE-Patienten die microRNA 21 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen überexprimiert ist (Pan *et al.*, 2010; Stagakis *et al.*, 2011). Eine Inhibierung der Expression der microRNA 21 konnte bereits in B6.123 Mäusen, einem weiteren Lupus-Modell, die Splenomegalie der Mäuse verbessern. Daher sollte im Fokus zukünftiger Untersuchungen auch die Analyse des Einfluss von Oxa auf diese microRNA stehen.

Zusammenfassend konnten die Netzwerk- und „Upstream-Regulator“-Analysen vielversprechende Moleküle aufzeigen die durch eine Oxa-Behandlung in ihrer Expression in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen reguliert sein könnten und die in Assoziation mit der Pathogenese des SLE und im speziellen der Lupus Nephritis stehen. Bei einigen der potentiellen Zielgene konnte bereits der Effekt der Oxa-Behandlung auf ihre Expression nachgewiesen werden, wie zum Beispiel die microRNA 19b, microRNA 340, IFN $\gamma$ , TNF, verschiedene Immunglobuline und die p38 MAPK. Die Analyse weiterer Zielgene von Oxa steht allerdings erst am Anfang, daher kann ein klares Bild über den Wirkmechanismus noch nicht gezeigt werden. Die Literaturbasierten Recherchen mittels der Ingenuity Software geben jedoch viele Ansatzpunkte die in der Zukunft näher untersucht werden sollten. Dabei darf jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass 51 signifikant regulierte Gene aus den statistischen Untersuchungen der DNA-Mikroarray-Daten in die Ingenuity Analysen nicht integriert wurden. Grund hierfür ist eine unzureichende Literatur über die Funktion der jeweiligen Gene in der Ingenuity Knowledge Base. Daher war es zum Beispiel nicht möglich Ansätze für die Rolle und Funktion von MOSPD1, eines der am stärksten regulierten Gene unter der Behandlung mit Oxa, in diesem Datensatz zu finden. Somit wird auch klar, dass durch die unvollständige Analyse die Daten umso mehr mit Sorgfalt geprüft und verifiziert werden müssen.

## **4.5 Wirkmechanismus von Oxacyclododecindion im MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mausmodell**

### **4.5.1 Oxacyclododecindion hat einen destabilisierenden Effekt auf die mRNA proinflammatorischer Gene**

SLE ist eine chronisch-entzündliche Autoimmunerkrankung. Die veränderte Genexpression im frühen Krankheitsstadium führt vor allem zu einer vermehrten Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Eine Behandlung mit Oxa konnte nachweislich die mRNA Menge an entzündungsrelevanten Molekülen im murinen Modell des SLE, den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, reduzieren was zu einer verbesserten Funktionsfähigkeit der Niere im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

Neben der Hemmung der Transkription ist die posttranskriptionelle Kontrolle ein weiterer Mechanismus der Regulation der Genexpression. Die Regulation der mRNA-Stabilität durch extrazelluläre Stimuli ist neben dem Transport der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma eines der wichtigen posttranskriptionellen Modulationen und scheint bei vielen inflammatorischen Mechanismen eine Rolle zu spielen (Kapitel 1.4). Um zu überprüfen, ob Oxa auch einen Einfluss auf die Stabilität von proinflammatorischen mRNAs nimmt, wurden mit Makrophagen DRB-Experimente durchgeführt. In allen *in-vitro* Zellversuchen

mit DRB konnte durch die Behandlung mit Oxa eine reduzierte mRNA Menge von proinflammatorischen Mediatoren im Vergleich zur Kontrolle detektiert werden (Kapitel 3.4.2). Die Halbwertszeiten der untersuchten mRNAs war in den Zellen, die mit Oxa behandelt wurden, drastisch verkürzt (Tabelle 3.2). Dies spricht für einen destabilisierenden Effekt von Oxa auf die mRNA der untersuchten Gene. Über die sogenannten *cis*-Sequenzelemente in der 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTR), wie Adenin- und Uridinreiche Elemente (ARE), wird die Halbwertszeit der RNAs moduliert. Um eine Regulation der mRNA-Stabilität durch Oxa über einen ARE-vermittelten mRNA Abbau zu untersuchen, wurde bereits ein Reportergenkonstrukt hergestellt, in dem die humane TNF $\alpha$  3'-UTR in einen Luciferasereporter-Vektor integriert wurde. Mittels transienter Transfektion sollte dann untersucht werden, ob die destabilisierende Wirkung von Oxa über die 3'-UTR Sequenz der TNF $\alpha$  mRNA vermittelt wird.

Die Regulation der mRNA-Stabilität proinflammatorischer Gene erfolgt unter Beteiligung von RNA-BP und microRNAs (Kapitel 1.4). Ob etwaige Regulatoren durch die Behandlung mit Oxa beeinflusst werden, muss in weiteren Untersuchungen, die die Interaktion zwischen RNA und Proteinen nachweisen können, geklärt werden. Jedoch konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits gezeigt werden, dass Oxa in der Lage ist die Expression von microRNAs in den Nieren von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen zu modulieren (Kapitel 3.4.2). Somit könnte dies ein potentieller Mechanismus für den gezielten Abbau der mRNAs durch Oxa darstellen.

#### **4.5.2 Oxacyclododecindion reguliert *in-vivo* die Expression von microRNAs**

Als posttranskriptionelle Regulatoren sind microRNAs in diverse biologische Prozesse involviert. Eine differentielle Expression von microRNAs scheint auch zur Pathogenese der SLE-Erkrankung beizutragen (Kapitel 1.4.3).

Ziel der Arbeit war es, zu überprüfen, ob Oxa die Expression von microRNAs moduliert. Daher wurden mit Nierenfragmenten der behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäuse microRNA Array Analysen durchgeführt. Die Auswertung ergab, dass in den Oxa-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen 39 microRNAs vermehrt und drei microRNAs vermindert exprimiert wurden (Tabelle 3.3). Die Überprüfung der Expression von 12 ausgewählten microRNAs in weiteren Nierenfragmenten mit dem Quanta qRT-PCR-System ergab, dass die Expressionsänderungen aus dem microRNA Array für die microRNAs 19b, 29c, 30e, 140, 301b, 325, 340, 369 und 669k bestätigt werden konnten (Kapitel 3.4.2). Die Expressionsänderungen der microRNAs let-7f, 9 und 16 hingegen nicht. Da für den Array und für die Einzelnachweise die microRNA identisch isoliert wurden, könnte die fehlgeschlagene Verifizierung auf die unterschiedlichen

Analysetechniken zurückzuführen sein. Die Generierung der cDNA beim Array erfolgt microRNA spezifisch, wodurch das System in der Detektion von Expressionsänderungen sensibler gemacht wird. Leshkowitz *et al.* (2013) konnten bereits zeigen, dass die von ihnen detektierten Expressionen von microRNAs nicht konsistent zwischen verschiedenen Analyse-Plattformen waren.

In Folge der Untersuchung, welche Rolle die von Oxa regulierten microRNAs in der Pathogenese des SLEs spielen, konnten Übereinstimmungen mit den Ergebnissen von Dai *et al.* (2010) gefunden werden. Dieser hatte in Mikroarray Untersuchungen von Lymphozyten, isoliert aus der Milz von MRL und MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen, eine verminderte Expression der microRNAs 29b, 29c und 340 in den Mäusen detektiert. Aus diesem Grunde wäre es auch von Interesse diese microRNAs in Zukunft auch in der Milz Oxa-behandelter Mäuse zu analysieren, da bereits in der Niere eine vermehrte Expression durch die Behandlung mit Oxa nachgewiesen werden konnte. Darüber hinaus werden die microRNAs 29b und 29c als neue Urinmarker betrachtet, da ihre verringerte Konzentrationen mit einer erhöhten Proteinurie, der Fibrose sowie mit der Konzentration von SMAD3 im Urin negativ korrelieren (Wang *et al.*, 2012). In Nieren Oxa-behandelter Mäuse konnte eine erhöhte Expression der beiden microRNAs, sowie für die microRNAs 340, nachgewiesen werden. Für die microRNA 340 konnte bereits das Zielgen c-Met durch Wu *et al.* (2011) identifiziert werden. C-Met ist eine Rezeptor Tyrosin Kinase, die durch die Bindung mit dem Liganden „*hepatocyte growth factor*“ (HGF) eine Vielzahl von Signalwegen in der Zelle aktiviert. Funktionell steuert c-Met die Proliferation, Mortalität, Migration und Invasion von Zellen (Organ and Tsao, 2011). Durch die Inhibition der c-Met Expression durch die microRNA 340, konnte darüber hinaus die Expression von MMP-2 und MMP-9 gehemmt werden (Wu *et al.*, 2011). Eine Hemmung von MMP-9 im Modell der Nierenfibrose konnte nachweislich zu einer Reduzierung von fibrotischen Prozessen führen (Tan *et al.*, 2013). Dies schrieben die Autoren der Funktion von MMP-9 in der EMT zu.

Bereits in Kapitel 4.3.3 wurde der mögliche Einfluss von Oxa auf die EMT beschrieben. Die Regulation der microRNA würde einen weiteren mechanistischen Ansatz bieten, wie Oxa die fibrotischen Prozesse in der Niere unterbindet. Um diese Hypothese zu überprüfen sollte zusätzlich zu den Analysen zur MMP Aktivität auch der Einfluss von Oxa auf c-Met und dessen Liganden HGF untersucht werden.

Des Weiteren konnte in den microRNA Analysen eine erhöhte Expression der microRNAs 410 und 495 sowie 30a und 19b in Nierenfragmenten von Oxa-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollmäusen detektiert werden. Eine Dysregulation dieser microRNAs konnte in Zusammenhang mit SLE gebracht werden. So konnte Liu *et al.* (2014) deutlich geringere Mengen der microRNAs 410 und 495 in PBMCs von

SLE-Patienten detektieren. Selbiges galt für die microRNAs 30a und 19b, die in PBMCs sowohl von 18 Lupus Nephritis-Patienten als auch in Teilen von MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen vermindert exprimiert nachgewiesen wurden (Zhu *et al.*, 2012; Teruel *et al.*, 2011). Konträr konnten Dai *et al.* (2009) jedoch in Nierenbiopsien von fünf Lupus Nephritis-Patienten eine vermehrte Expression der microRNA 30a detektieren. Auch wenn die Analyse der Präparate aus der Nierenbiopsie enger im Zusammenhang mit Nierenschädigungen gebracht werden können als die Untersuchung der PBMCs, die eher eine Reaktion des Immunsystems widerspiegeln, sollte ein Vergleich nach erfolgter Bestätigung der Ergebnisse in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen kritisch betrachtet werden. Die Kontrollpräparate für die Analysen von Dai *et al.* wurden aus drei Tumorpatienten gewonnen, womit eine Dysregulation einiger microRNAs in diesen Patienten nicht ausgeschlossen werden kann. Welche Rolle letztendlich die microRNA 30a in der Etablierung und Progression einer Lupus Nephritis spielt, muss zudem mit weiteren Zielstrukturanalysen überprüft werden.

Eine microRNA die im Zusammenhang mit autoreaktiven T-Zellen in SLE-Patienten untersucht werden sollte ist die microRNA 126. Die Expression dieser microRNA wurde in den Nieren der mit Oxa-behandelten Mäuse reduziert detektiert. Eine Überexpression der microRNA 126 in CD4<sup>+</sup> T-Zellen korreliert mit einer T- und B-Zell Hyperaktivität. Zum anderen kam es durch die Überexpression der microRNA zu einer Demethylierung der DNA in T-Zellen (Zhao *et al.*, 2011a). Die Behandlung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit DNA-demethylierenden Substanzen führen zu Lupus-ähnlichen Symptomen in Tiermodellen, was vermuten lässt, dass Veränderungen der DNA-Methylierung in T-Zellen zur Pathogenese des SLE beitragen (Li *et al.*, 2014).

Zhou *et al.* führten im Rahmen von microRNA Untersuchungen Mikroarray-Analysen durch, die zeigten, dass in Lupus Nephritis-Patienten mit einem hohen chronischen Index, d.h. mit einer starken Narbenbildung im Nierengewebe, eine verminderte Expression von der microRNA 369 im Vergleich zu Lupus Nephritis-Patienten mit geringen chronischen Index vorliegt. Dies würde im Einklang mit den Ergebnissen stehen die durch die Gabe von Oxa in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen erzielt wurden. Im Vergleich zu den Kontrolltieren, konnte in Oxa-behandelten Tieren eine erhöhte Expression der microRNA 369 detektiert werden.

Zusammenfassend kann anhand der Befunde belegt werden, dass Oxa die Expression von microRNAs beeinflusst. Einige dieser microRNAs konnte zudem in funktionellen Zusammenhang mit der Lupus-Erkrankung gebracht werden. In weiteren Analysen sollte untersucht werden, welche Zielmoleküle die regulierten microRNAs besitzen. Hinweise geben bereits einige wissenschaftliche Veröffentlichungen. So konnten unter anderem



CXCL12 (Nicolas *et al.*, 2008) und SMAD3 (Pais *et al.*, 2010) als Zielstrukturen der microRNA 140 nachgewiesen werden.

Die Identifizierung von microRNA-Zielgenen per se ist eine große Herausforderung, jedoch können programmgesteuerte Rechenalgorithmen bei der Vorhersage möglicher Zielgene helfen. Dabei wird die microRNA Sequenz mit der 3'-UTR von Genen abgeglichen, um eine mögliche Interaktion vorherzusagen. Wobei berücksichtigt wird, dass eine Bindung von microRNAs an Zielstrukturen auch in Form einer Haarnadelstruktur erfolgen kann. In einem Abgleich mit der Software Targetscan ([www.targetscan.org](http://www.targetscan.org)) konnte so in der humanen und murinen TNF 3'-UTR eine konservierte Bindestelle für die microRNA 19 a und b identifiziert werden. Des Weiteren konnte für die humane IL8 3'-UTR eine putative Bindestelle für die microRNA 302b und d identifiziert werden. Die murine IL6 3'-UTR hingegen trägt einen Sequenzabschnitt der mit der „seed“-Region der microRNA let 7 c und f übereinstimmt. Da in mRNA-Stabilitätsanalysen bereits gezeigt werden konnte, dass Oxa die Stabilität dieser inflammatorischen Gene beeinflusst (Kapitel 3.4.2), wäre es von Interesse, ob die Modulation der Halbwertszeit der mRNA auf die durch Oxa regulierten microRNAs zurückzuführen ist. In weiteren Analysen sollte dies Gegenstand der Untersuchungen sein. Ein experimenteller Nachweis für eine Interaktion könnte mit Hilfe von CLIP (*RNA Crosslink and Immunoprecipitation*) oder Reportergenkonstrukten erfolgen (Badal and Danesh, 2014). Für letzteres wird die 3'-UTR eines putativen Zielgenes in einen Luciferasereporter-Vektor integriert wird, in ein Zellsystem transfiziert und mit sogenannten *miRNA Mimics* inkubiert, die als doppelsträngige RNAs die endogene, mature microRNAs imitieren (Aldred *et al.*, 2011). Des Weiteren können in *in-vitro* als auch *in-vivo* Analysen AntagomiRs eingesetzt werden (van Rooij, 2011). Diese microRNA-Antisense-Konstrukte sind in der Lage zelleigene microRNAs zu inhibieren. Eventuelle Genexpressionsänderungen können dann auf diese microRNA zurückgeführt werden.

### 4.5.3 Oxacyclododecindion reguliert die Aktivität der p38 MAPK

Die Aktivierung der p38 MAPK hat weitreichenden Einfluss auf inflammatorische Prozesse. Auch in der Pathogenese der LN scheint dies eine Rolle zu spielen. Da Makrophagen eine zentrale Rolle in der Progression der LN einnehmen wurde in Zusammenarbeit mit L. Schmidtke in *in-vitro* Untersuchungen der Effekt von Oxa in einer immortalisierten Makrophagenzelllinie untersucht. Die Analysen zeigten, dass Oxa die Aktivierung der p38 MAPK in den Zellen inhibieren konnte (Abbildung 3.48). Eine verminderte Aktivität der p38 MAPK hätte weitreichende Folgen zum einem für die Transkription proinflammatorischer Mediatoren (wie TNF- $\alpha$ ) beziehungsweise Adhäsionsmolekülen. Zum anderen könnte durch die Modulation der Phosphorylierung von RNA-BP auch Einfluss auf die Stabilität von mRNAs genommen werden, was die im

Kapitel 4.5.1 beschriebenen Effekte von Oxa auf die Halbwertszeiten proinflammatorischer mRNAs erklären könnte.

Im chronisch-entzündlichen MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mausmodell konnten Iwata *et al.* (2003) in den Nieren der Mäuse eine erhöhte Anzahl positiver Zellen mit aktivierter p38 MAPK nachweisen. Analysen auf Proteinebene in den MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen die mit Oxa behandelt wurden zeigten, dass eine Behandlung mit dem Naturstoff zu einer geringeren Phosphorylierung der p38 MAPK im Vergleich zur Kontrollgruppe führte (Kapitel 3.4.4). Somit konnten die Ergebnisse aus den *in-vitro* Untersuchungen mit *in-vivo* Analysen bestätigt werden.

Eine Inhibition der p38 MAPK wurde bereits in MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen getestet (Iwata *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2011). Dabei führte die Behandlung mit selektiven Inhibitoren zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes. So wurden in der Niere unter anderem geringere C3- und Ig-Ablagerungen nachgewiesen sowie eine geringere Einwanderung und Proliferation von Leukozyten detektiert (Iwata *et al.*, 2003; Jin *et al.*, 2011). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den Analysen in Oxa-behandelten MRL *Fas<sup>lpr</sup>* Mäusen. Auch hier konnte unter der Behandlung mit Oxa eine verminderte Ablagerung von IgG und C3 (Kapitel 3.3.5.3) nachgewiesen werden sowie eine geringere Infiltration von Immunzellen in die Nieren beobachtet werden (Kapitel 3.3.4). In diesem Zusammenhang konnten auch Effekte des p38 MAPK Signalweges auf CD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> Zellen sowie auf Tregs detektiert werden (Lourenco *et al.*, 2009; Noubade *et al.*, 2011). Da eine verminderte Anzahl beider Zelltypen in Oxa-behandelten Mäusen nachgewiesen werden konnte, könnte dieser Befund auf die Inhibition der p38 MAPK Aktivität zurückzuführen sein.

In Kongruenz mit diesen Ergebnissen steht auch die Beobachtung, dass in Oxa-behandelten Mäusen eine verminderte Expression von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF $\alpha$  und IL6, detektiert werden konnte (Abbildung 3.17). Übereinstimmend mit diesen Befunden führt eine Phosphorylierung der p38 MAPK zu einer Induktion der NF- $\kappa$ B Aktivität, was eine vermehrte Expression von verschiedenen proinflammatorischen Genen, wie IL1 $\beta$ , IL6, IL8 und TNF $\alpha$ , zur Folge hat (Yougbare *et al.*, 2013). Zudem könnte die Regulation der entzündungsfördernden Mediatoren eventuell durch Interaktion mit RNA-BP erfolgen. So reguliert die p38 MAPK durch eine direkte Phosphorylierung die Aktivität von RNA-BP, wie zum Beispiel von TTP und KSRP (Carballo *et al.*, 2001; Zhu *et al.*, 2001; Briata *et al.*, 2011). Funktionell vermag TTP wie auch KSRP die mRNA-Stabilität von verschiedenen proinflammatorischen mRNAs, wie TNF $\alpha$ , IL6 oder IL8 zu regulieren (Hitti *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2011b; Winzen *et al.*, 2007; Nguyen-Chi and Morello, 2008). Durch eine Phosphorylierung werden KSRP und TTP inaktiviert. Dieser Mechanismus führt zu einer Hemmung des TTP- und KSRP-abhängigen Abbaus von ARE-tragenden Transkripten, wie dies für TNF $\alpha$  und IL6 (Mahtani *et al.*, 2001; Hitti *et al.*,

2006; Zhao *et al.*, 2011b; Briata *et al.*, 2011) gezeigt werden konnte. Folge ist eine verlängerte Halbwertszeit der mRNA die dementsprechend häufiger translatiert werden kann. Wird nun die Aktivität der p38 MAPK durch Oxa vermindert ist davon auszugehen, dass die Hemmung, durch die Phosphorylierung, von TTP und KSRP reduziert wird. Somit sollte die Halbwertszeiten der proinflammatorischen Gene wie IL6 oder TNF $\alpha$  verkürzt werden. Wie aus Kapitel 4.5.1 zu entnehmen ist, konnte bereits ein destabilisierender Effekt von Oxa auf die mRNA von TNF $\alpha$ , IL6 und IL8 gezeigt werden. Die Halbwertszeit von TNF $\alpha$  verkürzte sich in den verschiedenen Zelllinien drastisch. Ob dieser Effekt allein über die Modulation der p38 MAPK Aktivität vermittelt wird ist in weiterführenden Untersuchungen abzuklären. Die verminderte Aktivierung der p38 MAPK selbst könnte durch einen Oxa-vermittelten Effekt auf TGF- $\beta$  erklärt werden. Serwe (2007) konnte in ihren Untersuchungen einen inhibitorischen Effekt von Oxa auf die TGF- $\beta$ -Signaltransduktion feststellen. Zudem konnte bereits gezeigt werden, dass TGF- $\beta$  eine Phosphorylierung und damit Aktivierung der p38 MAPK induziert (Sapkota, 2013). In weiteren Untersuchungen konnte je nach Zelltyp eine schnelle als auch anhaltende Aktivierung der p38 MAPK durch TGF- $\beta$  nachgewiesen werden. Dabei wurde eine zügige und vorübergehende p38 MAPK Aktivierung, unter anderem in Neutrophilen, durch die Induktion von TAK1 beschrieben (Gui *et al.*, 2012).

Die Befunde weisen darauf hin, dass Oxa seine eine anti-inflammatorische Wirkung unter anderem über die Hemmung der Phosphorylierung der p38 MAPK vermitteln könnte.

## **4.6 Cyp3A4 Aktivität wird durch Oxacyclododecindion nicht beeinflusst**

Die Cytochrom P450 Familie ist für die Biotransformation vieler Medikamente zuständig. Rund 60 % der zugelassenen Medikamente, aber auch Inhaltsstoffe von Lebensmitteln, werden dabei über P450 Enzyme metabolisiert (Bertz and Granneman, 1997). Davon werden 40 - 50 % über das Isoenzym Cyp3A4 verstoffwechselt (Peer *et al.*, 2011). Eine Hemmung oder Aktivierung dieses Enzyms kann vor allem bei multimorbiden Patienten, die häufig mehrere Medikamente zur gleichen Zeit einnehmen, zu lebensbedrohlichen Wechselwirkungen führen. Dabei kann eine Arzneimittelinteraktionen dazu führen, dass die Medikamente in ihrer pharmakologischen Wirkung reduziert werden oder die Medikamente die toxische Schwelle überschreiten und vermehrt Nebenwirkungen auftreten (Ogu and Maxa, 2000). Auch für SLE-Patienten spielt die Modulation der P450 Enzyme eine bedeutende Rolle, zum Beispiel, wenn sie im Zuge einer Nierentransplantation als immunsuppressive Therapie Ciclosporin erhalten. In einer Studie von Hollander *et al.* (1995) konnte gezeigt werden, dass Grapefruitsaft die Metabolisierung von Ciclosporin inhibierte, was auf eine Hemmung von Cytochrome P450 Enzymen

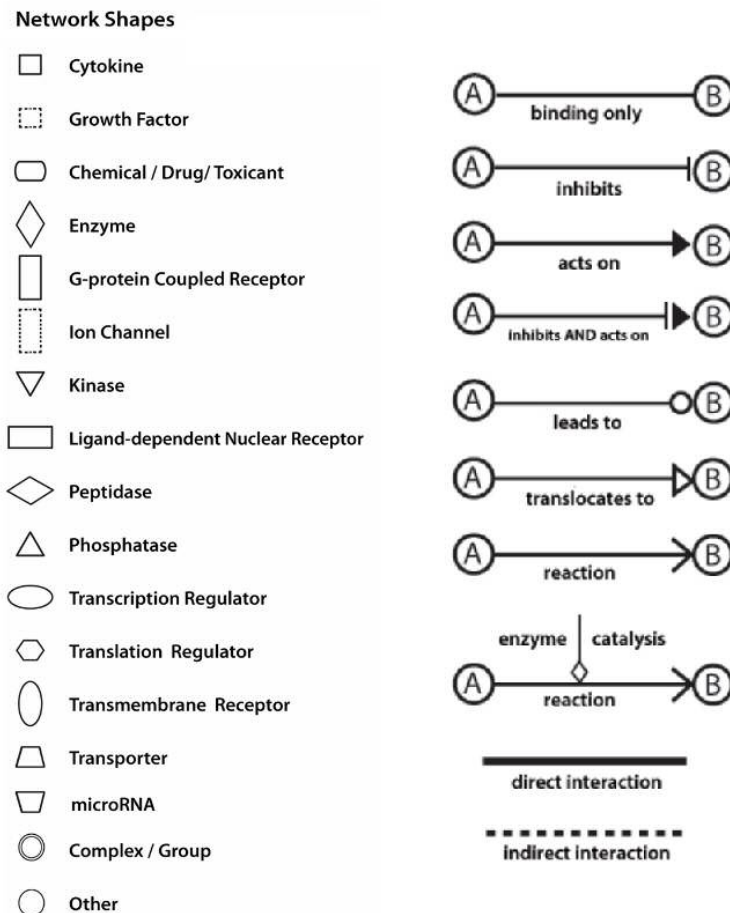
zurückgeführt wurde. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Oxa als potentiellies Arzneimittel die Aktivität des Cyp3A4 Enzym beeinflusst. Um die Funktionalität des P450-Glo™ Assays zu bestätigen und eventuelle Effekte von Oxa einschätzen zu können, wurde als Aktivator des Enzyms Testosteron und zur Hemmung Ketoconazol in den Analysen mitgeführt. Im Vergleich konnte keine der getesteten Konzentrationen (0,5 und 5  $\mu\text{M}$ ) von Oxa die Aktivität des Enzyms beeinflussen (Abbildung 3.50).

Jedoch werden Medikamente nicht nur über das Cyp3A4 Enzym verstoffwechselt. Circa 30 % der Arzneimittel werden über Cyp2D6 (Shen *et al.*, 2007) und 10 - 14 % über Cyp2C9/19 (Evans and Relling, 1999) metabolisiert. Daher sollte in zukünftigen Untersuchungen auch die Interaktion von Oxa mit diesen P450 Enzymen untersucht werden.

## A Anhang

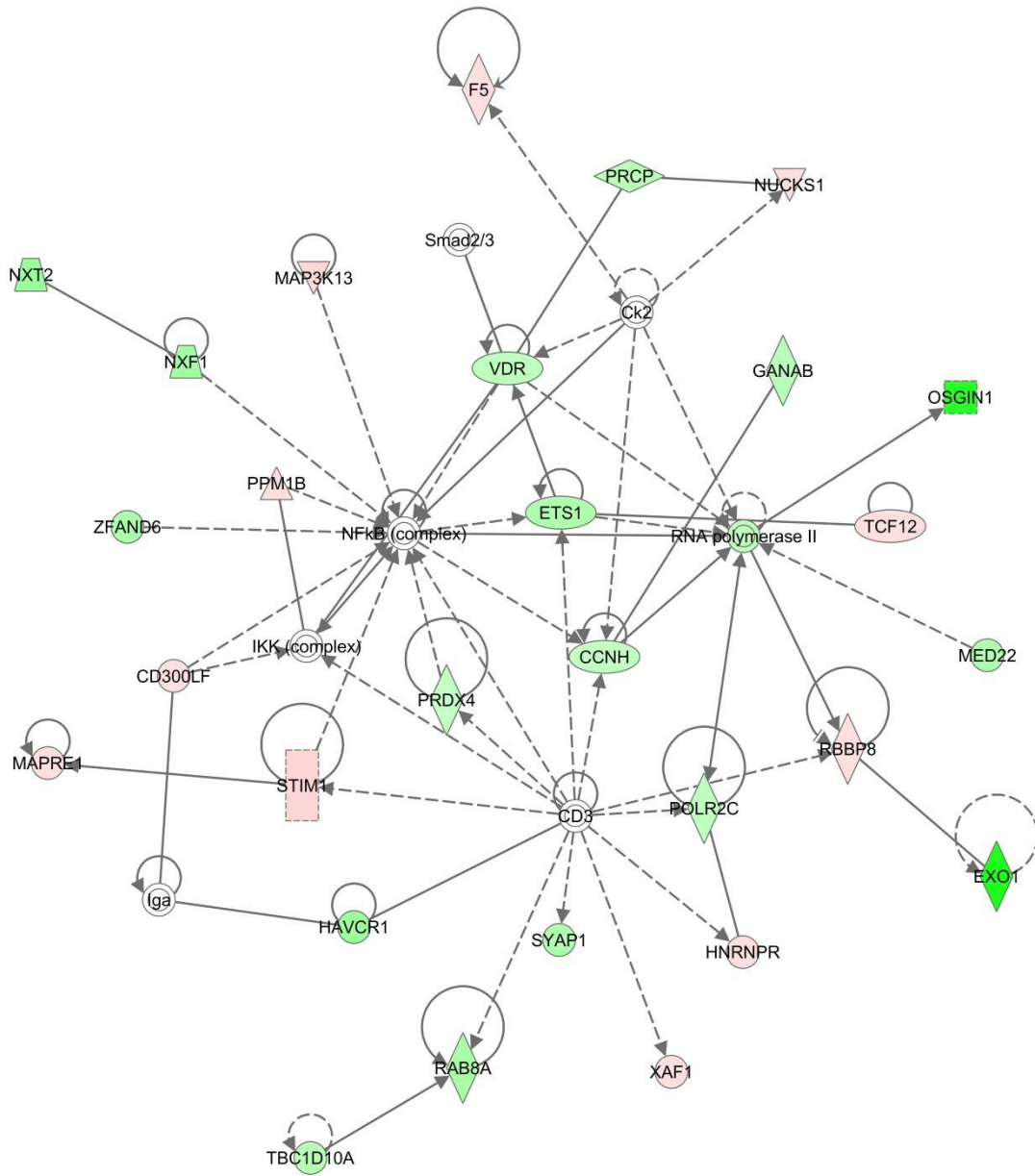
### A.1 Ingenuity Netzwerkanalysen

#### A.1.1 Grafische Darstellung der Netzwerke

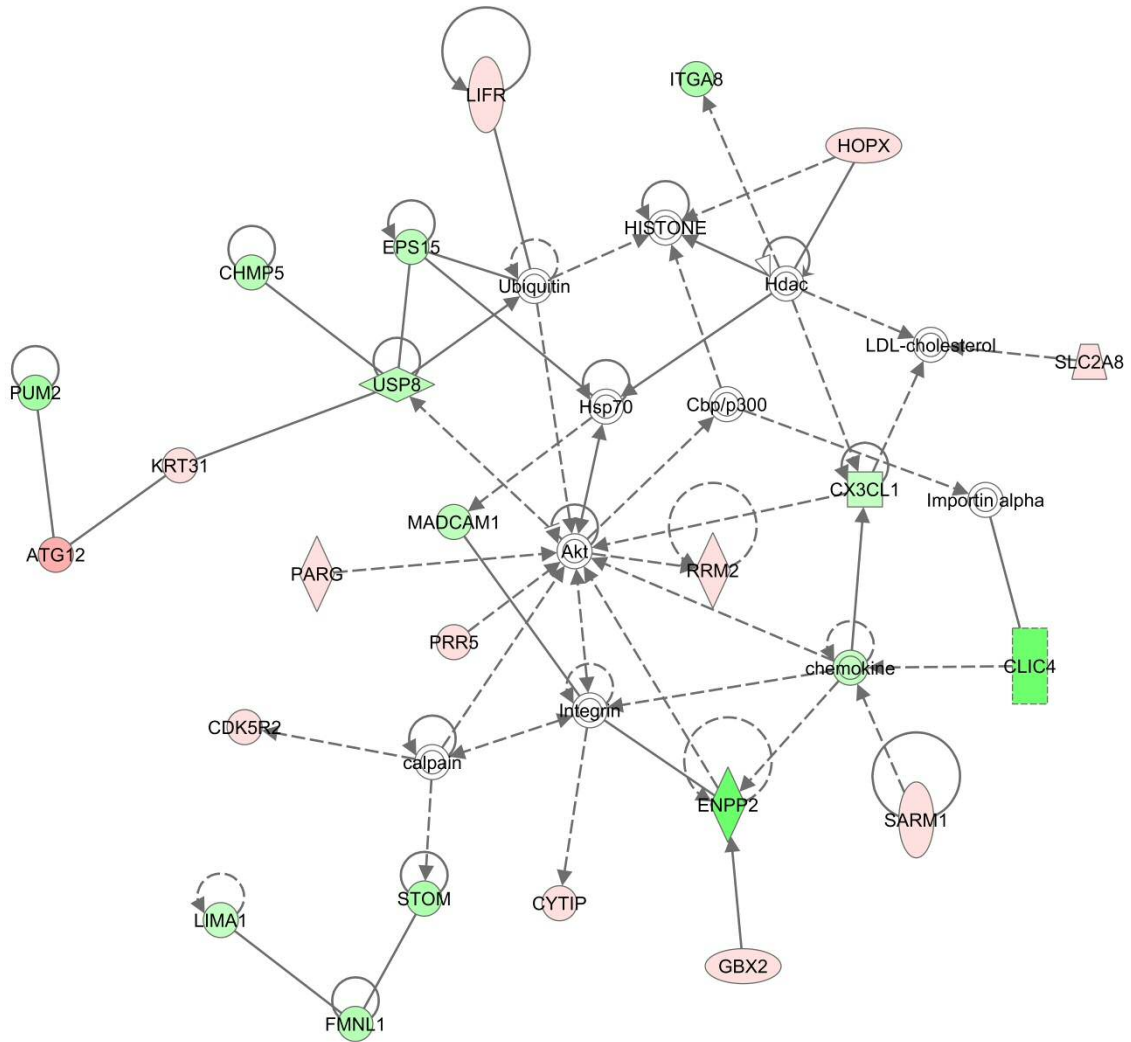


Die rot gefärbten Symbole sind Moleküle aus eigenen DNA-Mikroarray-Analysen, welche hochreguliert detektiert wurden. Grün eingefärbte Symbole sind hingegen Moleküle aus den DNA-Mikroarray-Analysen die als herunterreguliert detektiert wurden. Die Intensität der Rot- beziehungsweise Grün-Färbung gibt dabei an, wie stark die Regulation ist. Weiß hinterlegte Symbole sind wiederum Moleküle die nicht durch den Benutzer eingegeben wurden, sondern durch Beziehungen mit anderen Molekülen durch den Abgleich mit der Ingenuity Knowledge Base eingebaut wurden.

### Netzwerk 1



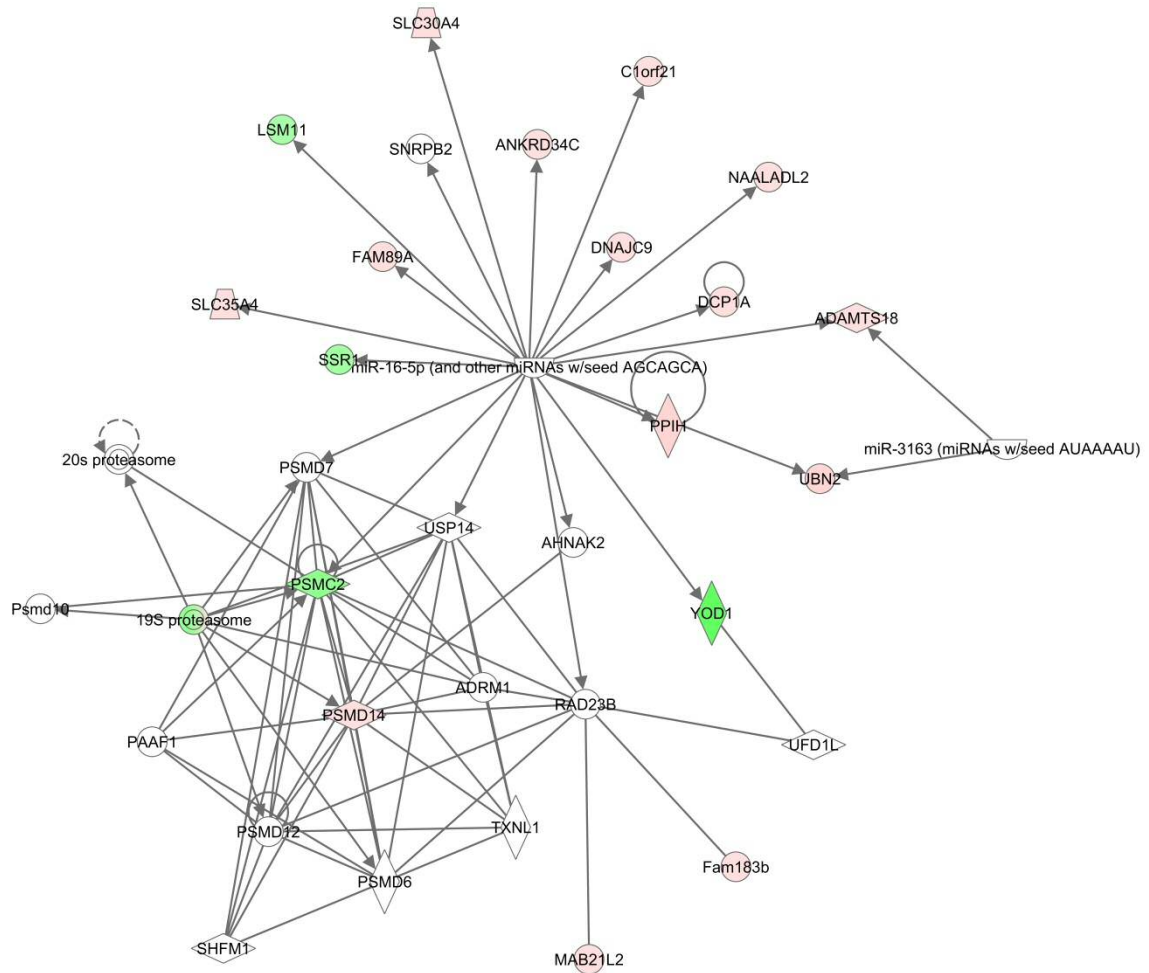
**Netzwerk 2**





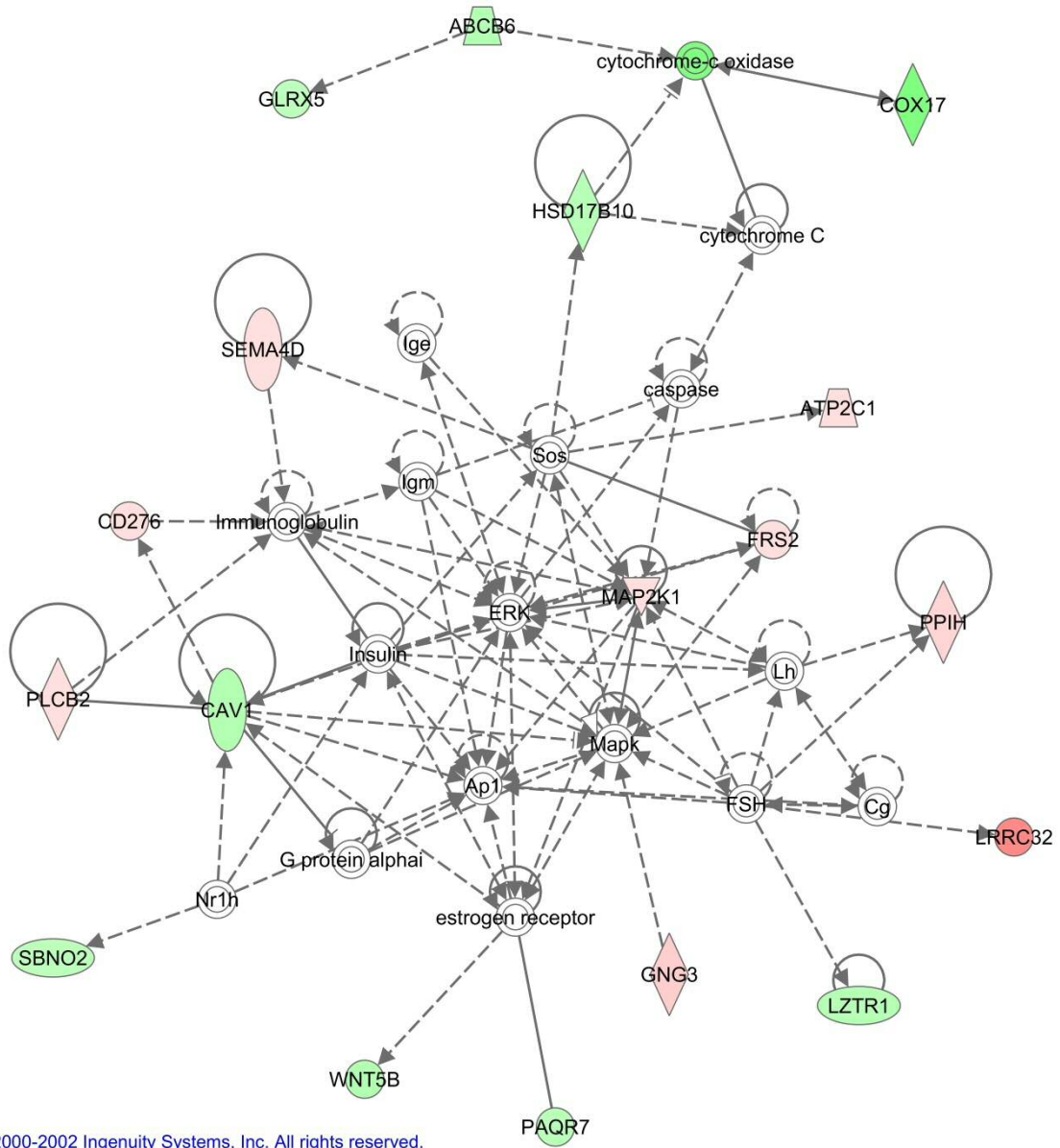


### Netzwerk 4

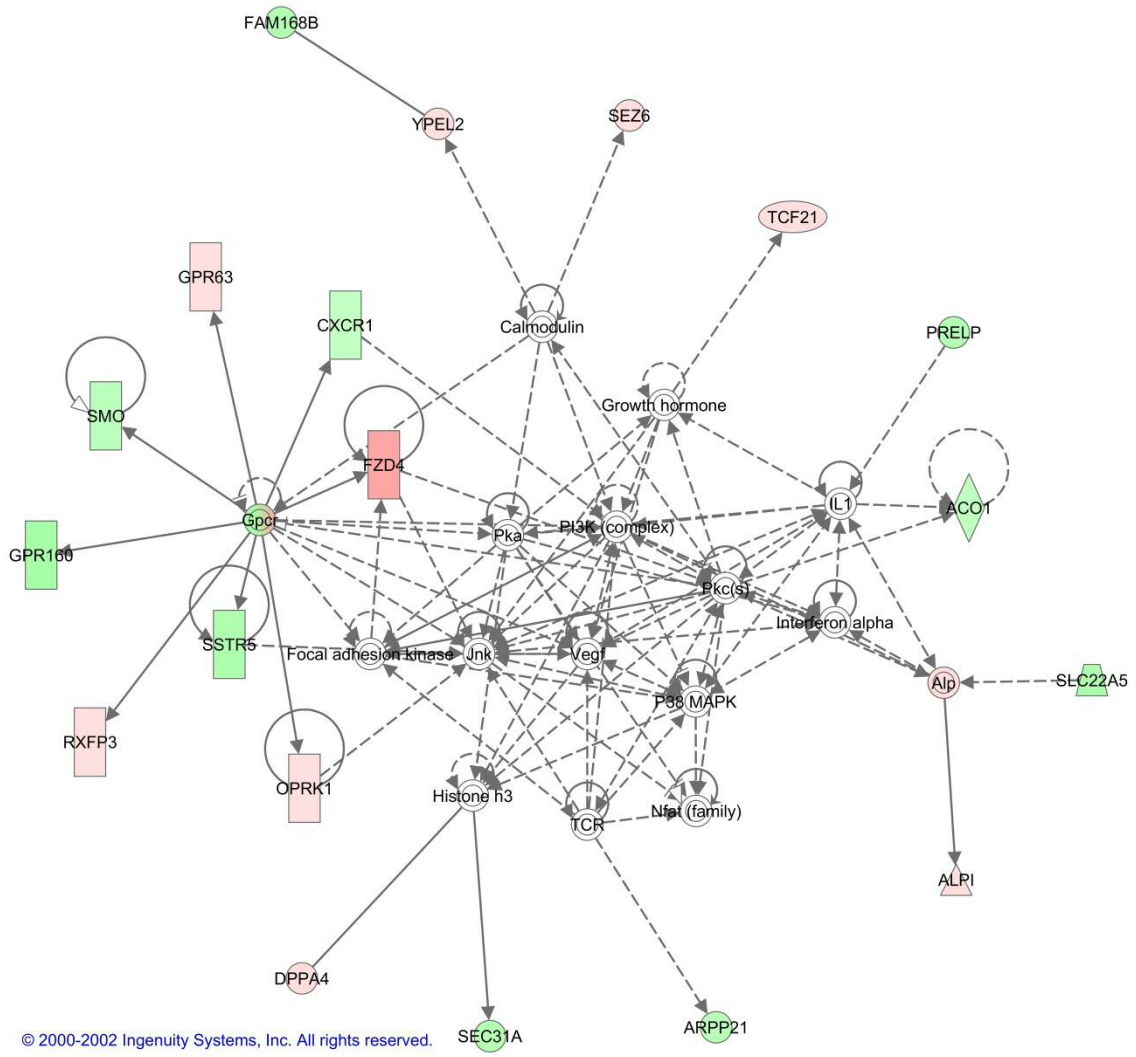




**Netzwerk 6**

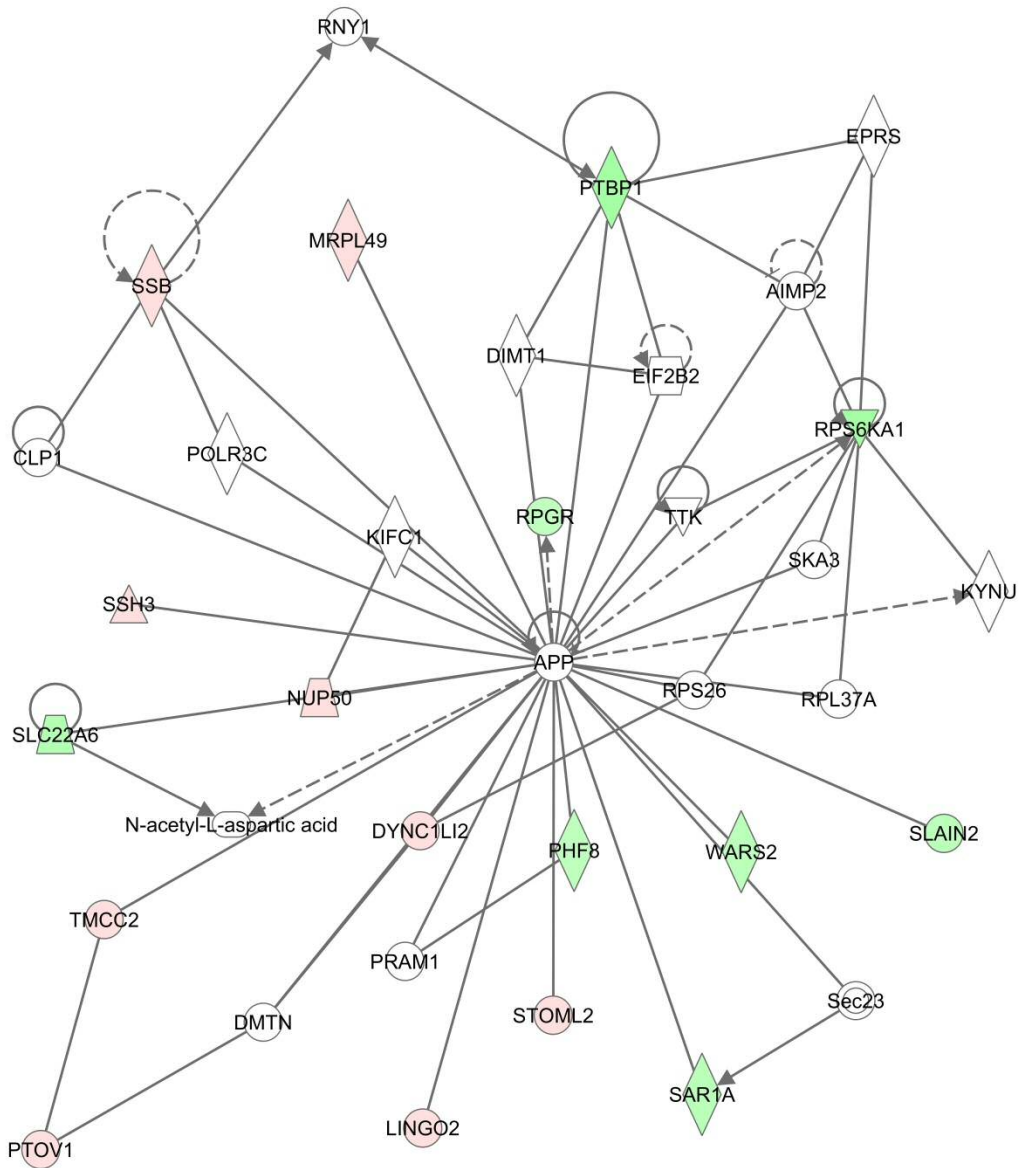


**Netzwerk 7**

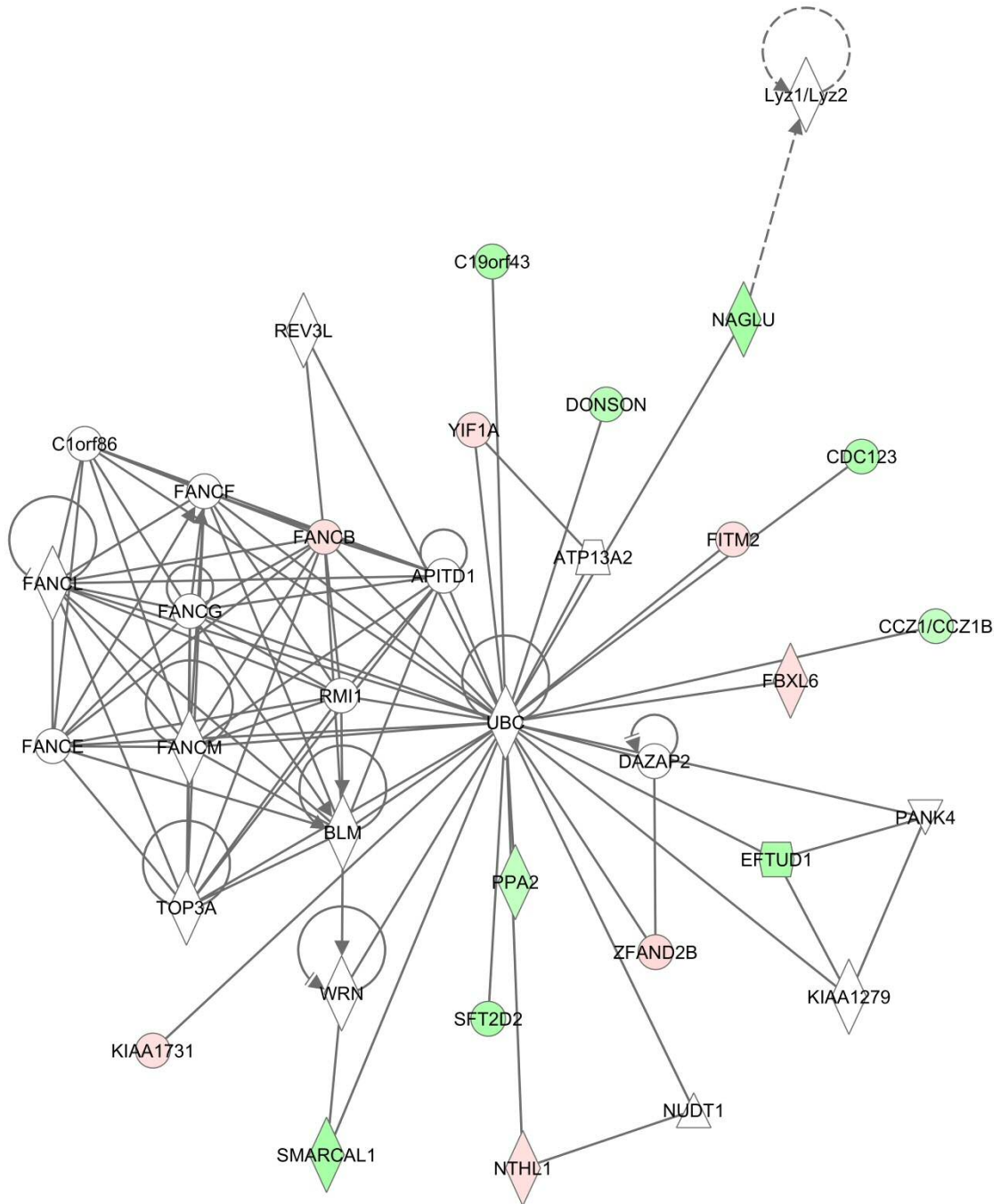




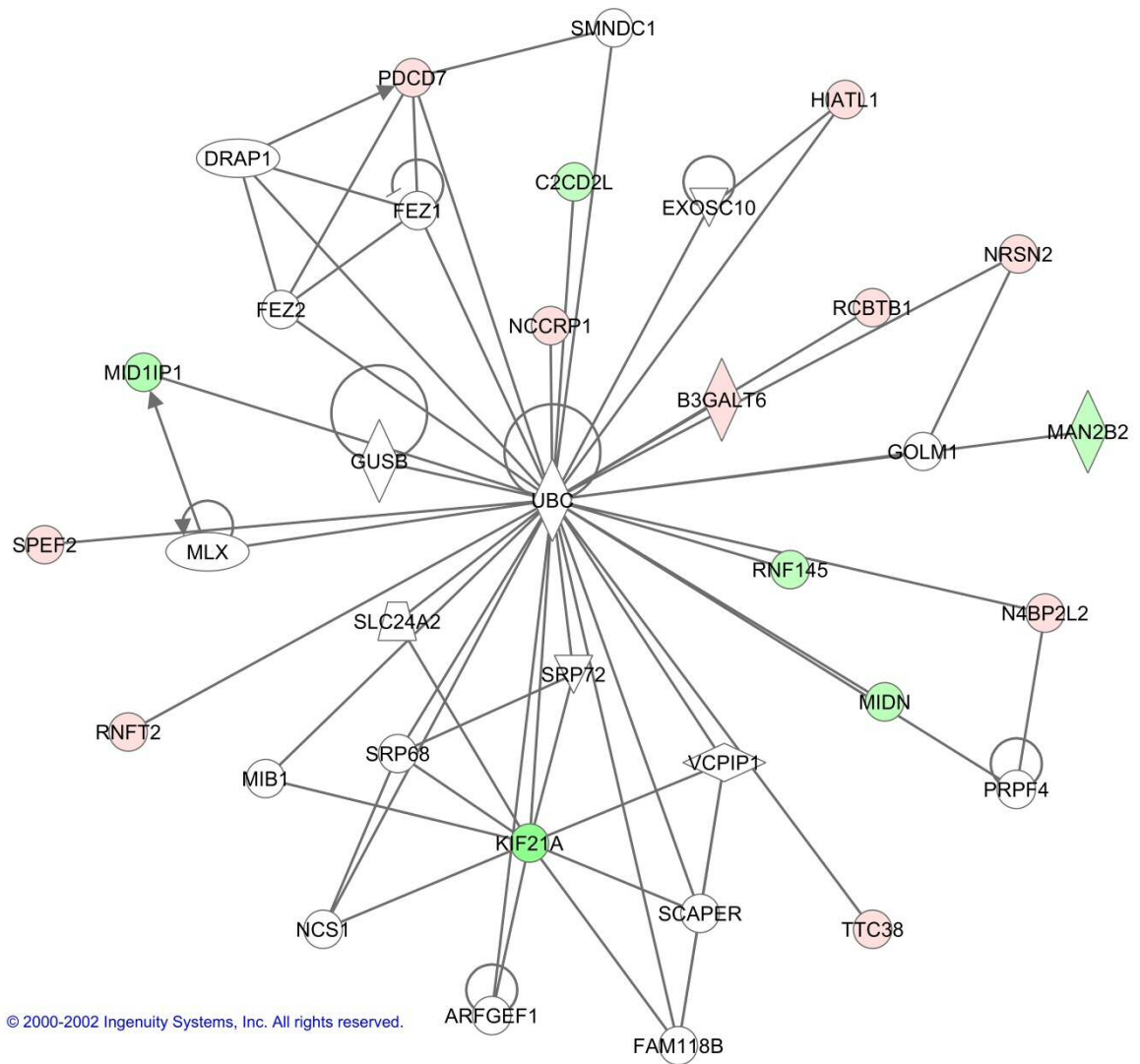
**Netzwerk 9**



**Netzwerk 10**



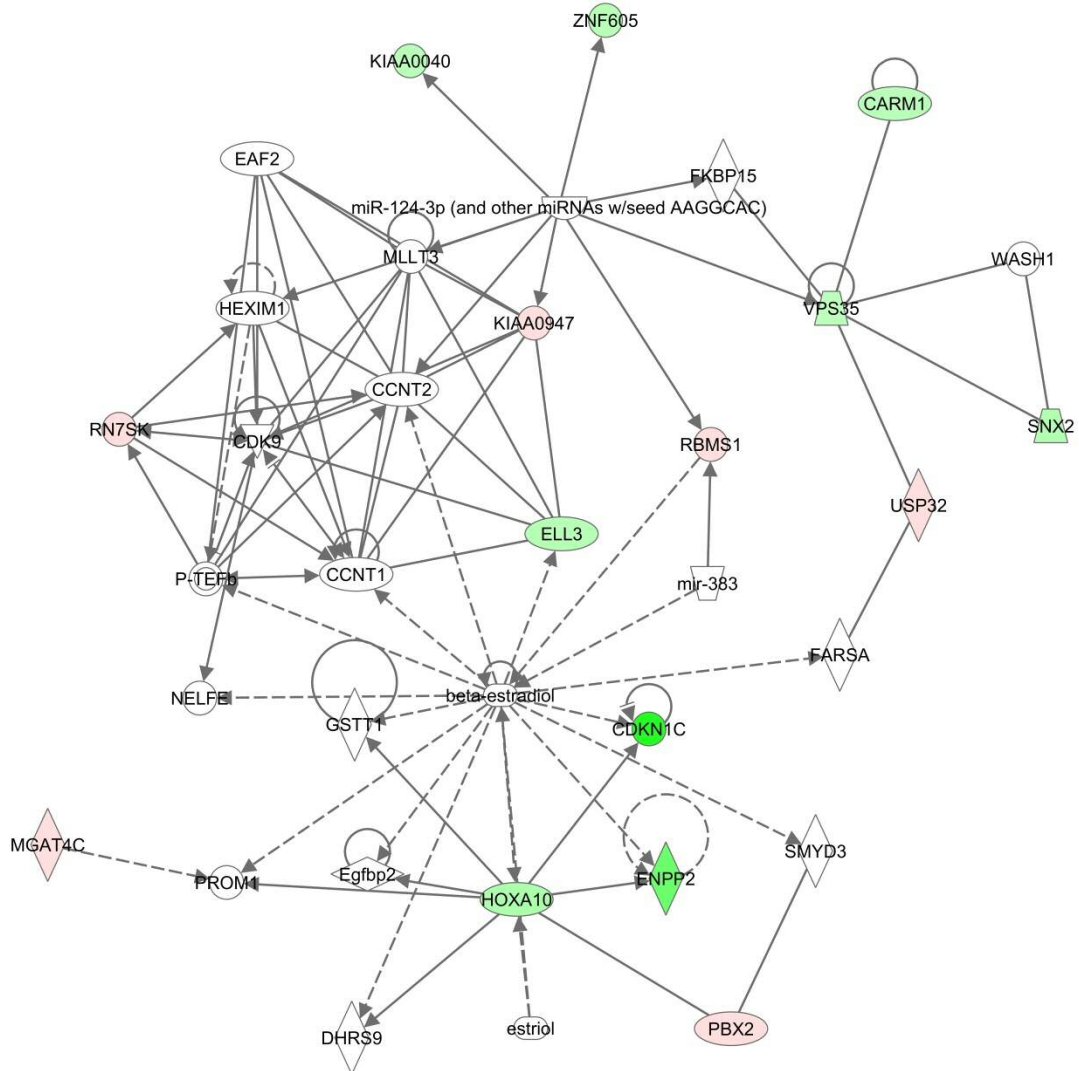
### Netzwerk 11



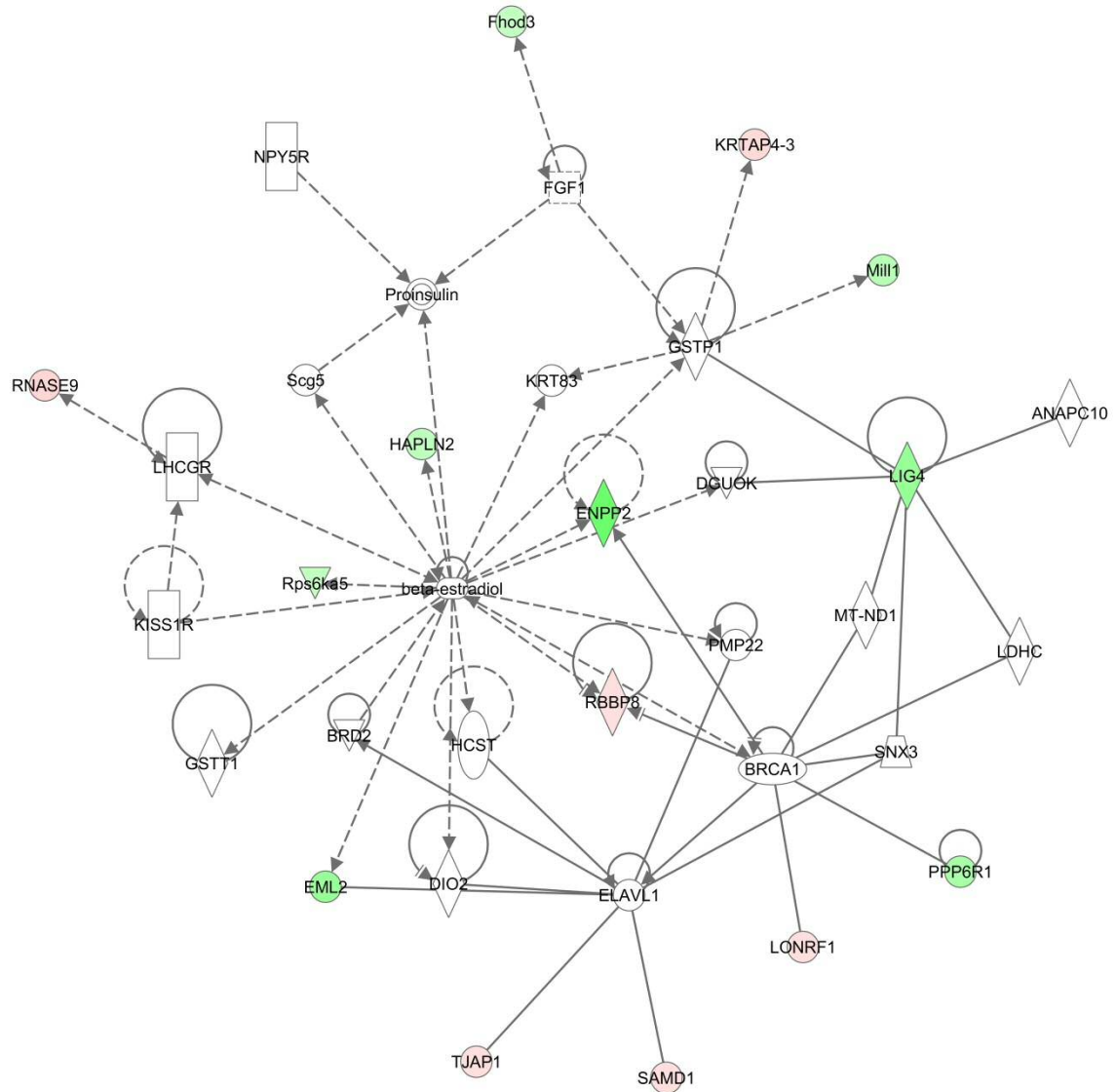




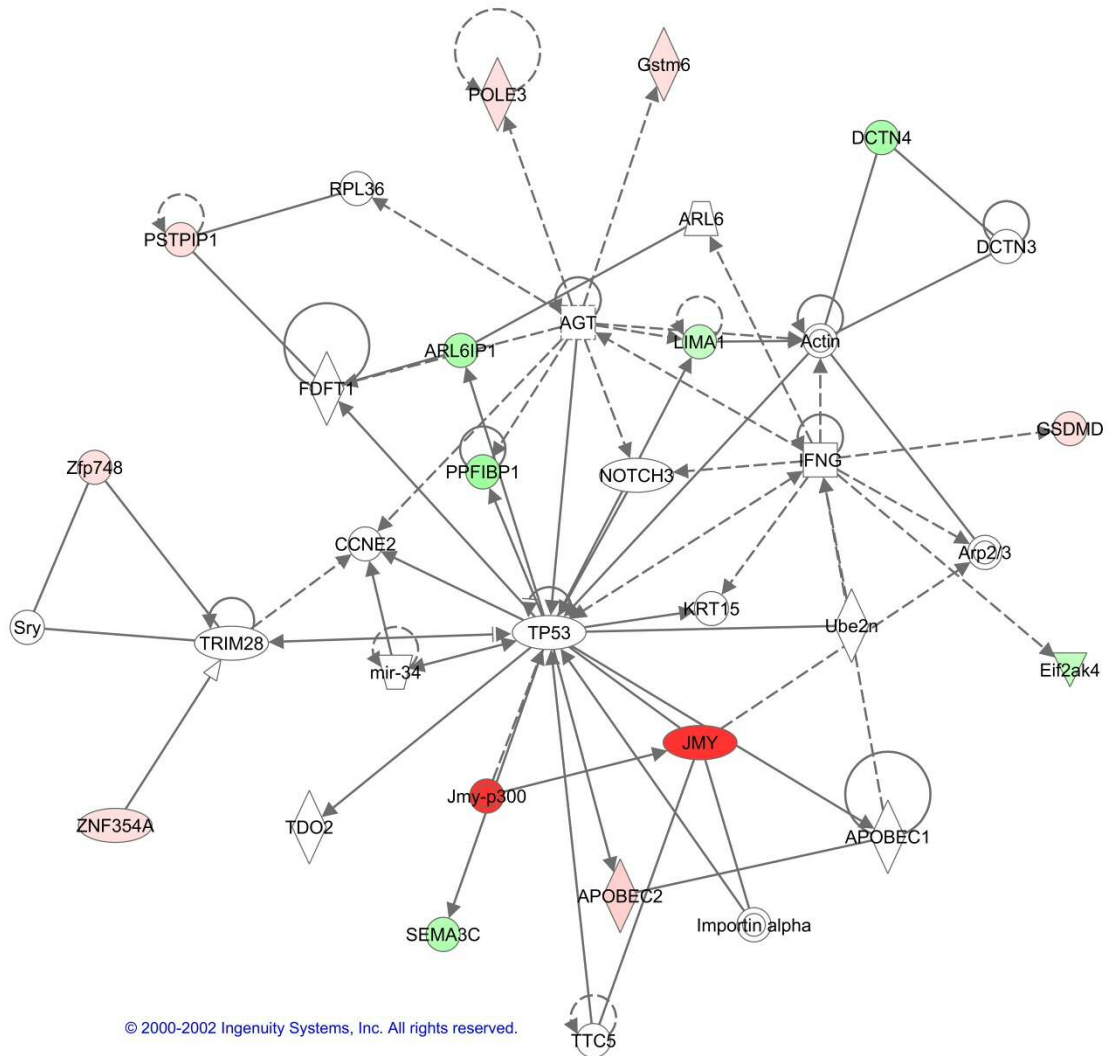
### Netzwerk 13



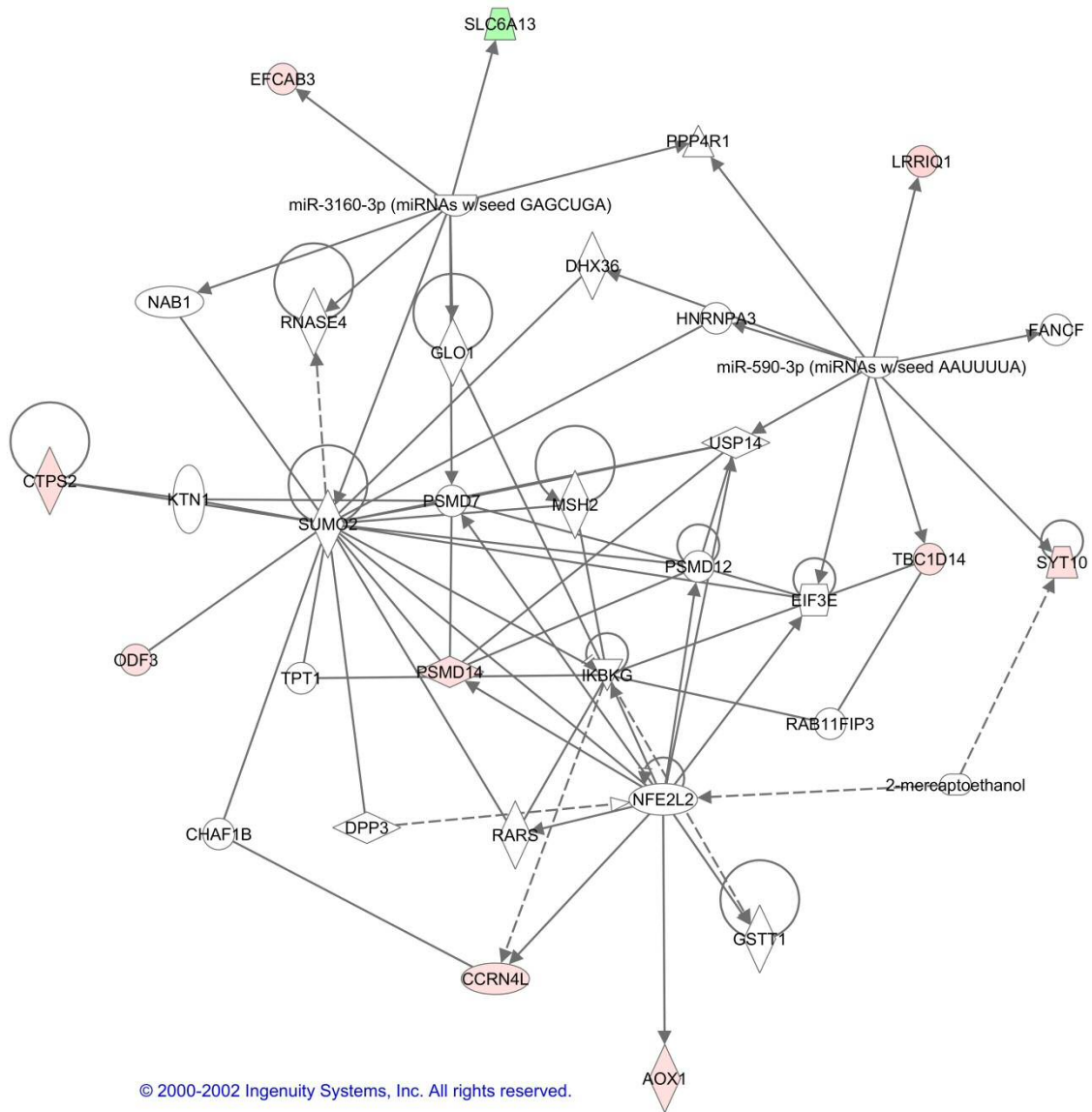
**Netzwerk 14**



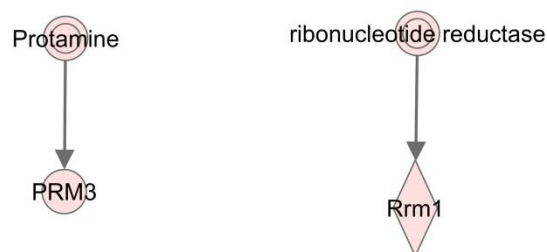
### Netzwerk 15



**Netzwerk 16**



**Netzwerk 17 und 18**



## A.1.2 Tabellarische Darstellung der Netzwerke

Netzwerk	Moleküle im Netzwerk	Score	Focus Molekül	Top Krankheit & Funktion
1	<b>CCNH</b> , <i>CD3</i> , <i>CD300LF</i> , <i>Ck2</i> , <b>ETS1</b> , <b>EXO1</b> , <i>F5</i> , <b>GANAB</b> , <b>HAVCR1</b> , <i>HNRNPR</i> , <i>Iga</i> , <i>IKK (complex)</i> , <i>MAP3K13</i> , <i>MAPRE1</i> , <b>MED22</b> , <i>NFkB (complex)</i> , <i>NUCKS1</i> , <b>NXF1</b> , <b>NXT2</b> , <b>OSGIN1</b> , <b>POLR2C</b> , <i>PPM1B</i> , <b>PRCP</b> , <b>PRDX4</b> , <b>RAB8A</b> , <i>RBBP8</i> , <i>RNA polymerase II</i> , <i>Smad2/3</i> , <i>STIM1</i> , <b>SYAP1</b> , <b>TBC1D10A</b> , <i>TCF12</i> , <b>VDR</b> , <i>XAF1</i> , <b>ZFAND6</b>	50	28	Cellular Assembly and Organization, Cellular Function and Maintenance, Hematological System Development and Function
2	<i>Akt</i> , <i>ATG12</i> , <i>calpain</i> , <i>Cbp/p300</i> , <i>CDK5R2</i> , <i>chemokine</i> , <b>CHMP5</b> , <b>CLIC4</b> , <b>CX3CL1</b> , <i>CYTIP</i> , <b>ENPP2</b> , <b>EPS15</b> , <b>FMNL1</b> , <i>GBX2</i> , <i>Hdac</i> , <i>HISTONE</i> , <i>HOPX</i> , <i>Hsp70</i> , <i>Importin alpha</i> , <i>Integrin</i> , <b>ITGA8</b> , <i>KRT31</i> , <i>LDL-cholesterol</i> , <i>LIFR</i> , <b>LIMA1</b> , <b>MADCAM1</b> , <i>PARG</i> , <i>PRR5</i> , <b>PUM2</b> , <i>RRM2</i> , <i>SARM1</i> , <i>SLC2A8</i> , <b>STOM</b> , <i>Ubiquitin</i> , <b>USP8</b>	40	24	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Cell-mediated Immune Response, Cellular Movement
3	<i>ANXA7</i> , <i>ARL6IP4</i> , <b>ARTN</b> , <b>ATP5B</b> , <i>ATP5E</i> , <i>ATXN10</i> , <i>CCDC54</i> , <i>CCDC42B</i> , <i>CDKL4</i> , <i>DOCK9</i> , <i>EXOC2</i> , <i>FBXL4</i> , <i>GAST</i> , <i>HCN2</i> , <i>HNF1A</i> , <i>INIP</i> , <i>JMY</i> , <b>LMAN2</b> , <i>LRP5</i> , <i>miR-1227-3p (miRNAs w/seed GUGCCAC)</i> , <i>miR-4640-5p (and other miRNAs w/seed GGGCCAG)</i> , <i>miR-92a-3p (and other miRNAs w/seed AUUGCAC)</i> , <i>MS4A7</i> , <b>NEK7</b> , <b>Nkx6-3</b> , <i>PPCS</i> , <i>PPIH</i> , <i>RHBDD2</i> , <i>SLC38A10</i> , <i>TGM3</i> , <b>TM2D2</b> , <i>TMED6</i> , <b>TNKS2</b> , <i>UBC</i> , <b>WDR73</b>	30	19	Cell Morphology, Digestive System Development and Function, Organ Morphology
4	<i>19S proteasome</i> , <i>20s proteasome</i> , <i>ADAMTS18</i> , <i>ADRM1</i> , <i>AHNAK2</i> , <i>ANKRD34C</i> , <i>C1orf21</i> , <i>DCP1A</i> , <i>DNAJC9</i> , <i>Fam183b</i> , <i>FAM89A</i> , <b>LSM11</b> , <i>MAB21L2</i> , <i>miR-16-5p (and other miRNAs w/seed AGCAGCA)</i> , <i>miR-3163 (miRNAs w/seed AUAAAAU)</i> , <i>NAALADL2</i> , <i>PAAF1</i> , <i>PPIH</i> , <b>PSMC2</b> , <i>PSMD6</i> , <i>PSMD7</i> , <i>Psmid10</i> , <i>PSMD12</i> , <i>PSMD14</i> , <i>RAD23B</i> , <i>SHFM1</i> , <i>SLC30A4</i> , <i>SLC35A4</i> , <i>SNRBP2</i> , <b>SSR1</b> , <i>TXNL1</i> , <i>UBN2</i> , <i>UFD1L</i> , <i>USP14</i> , <b>YOD1</b>	28	18	Protein Degradation, Protein Synthesis, Cell Death and Survival
5	<i>Bysl</i> , <i>CCDC120</i> , <i>CLEC9A</i> , <i>CNFN</i> , <i>CNP</i> , <i>CYTH2</i> , <i>FCHO1</i> , <i>FOXE3</i> , <i>GFRA3</i> , <i>KISS1R</i> , <b>LOXHD1</b> , <i>LRRC32</i> , <i>MAL</i> , <i>MAPK3</i> , <i>MDFI</i> , <i>MEX3A</i> , <i>miR-4651 (and other miRNAs w/seed GGGGUGG)</i> , <i>miR-486-3p (and other miRNAs w/seed GGGGCAG)</i> , <i>MOV10</i> , <i>NAA50</i> , <i>NOTCH3</i> , <b>NPAS4</b> , <i>PAX8</i> , <i>PCBP3</i> , <i>RXFP3</i> , <i>SHISA7</i> , <i>SIPA1</i> , <i>SLC25A39</i> , <i>SLC46A1</i> , <i>STIM1</i> , <i>TMCC2</i> , <i>TSTD1</i> , <b>TTYH3</b> , <b>XIRP1</b> , <b>ZC3H7B</b>	28	18	Hematological System Development and Function, Hematopoiesis, Tissue Development
6	<b>WNT5B</b> , <b>LZTR1</b> , <b>PAQR7</b> , <b>SBNO2</b> , <b>COX17</b> , <b>CAV1</b> , <b>ABCB6</b> , <b>HSD17B10</b> , <b>GLRX5</b> , <i>ATP2C1</i> , <i>MAP2K1</i> , <i>PPIH</i> , <i>GNG3</i> , <i>LRRC32</i> , <i>FRS2</i> , <i>CD276</i> , <i>PLCB2</i> , <i>SEMA4D</i> , <i>Ap1</i> , <i>caspase</i> , <i>Cg. cytochrome C</i> , <i>cytochrome-c oxidase</i> , <i>ERK</i> , <i>estrogen receptor</i> , <i>FSH</i> , <i>G protein alpha</i> , <i>Ige</i> , <i>Igm</i> , <i>Immunoglobulin</i> , <i>Insulin</i> , <i>Lh</i> , <i>Mapk</i> , <i>Nr1h</i> , <i>Sos</i>	28	18	Cancer, Cellular Development, Cellular Growth and Proliferation
7	<b>ACO1</b> , <i>Alp</i> , <i>ALPI</i> , <b>ARPP21</b> , <i>Calmodulin</i> , <b>CXCR1</b> , <i>DPPA4</i> , <b>FAM168B</b> , <i>Focal adhesion kinase</i> , <i>FZD4</i> , <i>Gpcr</i> , <i>GPR63</i> , <b>GPR160</b> , <i>Growth hormone</i> , <i>Histone h3</i> , <i>IL1</i> , <i>Interferon alpha</i> , <i>Jnk</i> , <i>Nfat (family)</i> , <i>OPRK1</i> , <i>P38 MAPK</i> , <i>PI3K (complex)</i> , <i>Pka</i> , <i>Pkc(s)</i> , <b>PRELP</b> , <i>RXFP3</i> , <b>SEC31A</b> , <i>SEZ6</i> , <b>SLC22A5</b> , <b>SMO</b> , <b>SSTR5</b> , <i>TCF21</i> , <i>TCR</i> , <i>Vegf</i> , <i>YPEL2</i>	26	19	Cellular Assembly and Organization, Carbohydrate Metabolism, Lipid Metabolism
8	<i>ADRB</i> , <b>ASAH1</b> , <b>CACYBP</b> , <i>CaMKII</i> , <b>CDKN1C</b> , <i>Creb</i> , <i>Cyclin A</i> , <i>Cyclin D</i> , <i>Cyclin E</i> , <b>DCN</b> , <i>E2f</i> , <i>ELOVL7</i> , <i>ERK1/2</i> , <b>KCTD17</b> , <i>KIAA1524</i> , <i>KLF13</i> , <i>KLHL6</i> , <i>Mek</i> , <i>Mic</i> , <i>NEK2</i> , <b>NUDT18</b> , <b>PCBD1</b> , <i>Pdgf (complex)</i> , <i>PDGF BB</i> , <b>PIM3</b> , <i>PP1 protein complex group</i> , <i>PP1-C</i> , <i>PP2A</i> , <b>PPP1R11</b> , <i>Rb</i> , <b>SLC8A1</b> , <i>TCF</i> , <b>TMEM126A</b> , <b>TMEM176B</b> , <i>Zfp932 (includes others)</i>	25	18	Tissue Morphology, Antigen Presentation, Cancer
9	<i>AIMP2</i> , <i>APP</i> , <i>CLP1</i> , <i>DIMT1</i> , <i>DMTN</i> , <i>DYNC1LI2</i> , <i>EIF2B2</i> , <i>EPRS</i> , <i>KIFC1</i> , <i>KYNU</i> , <i>LINGO2</i> , <i>MIRPL49</i> , <i>N-acetyl-L-aspartic acid</i> , <i>NUP50</i> , <b>PHF8</b> , <i>POLR3C</i> , <i>PRAM1</i> , <b>PTBP1</b> , <i>PTOV1</i> , <i>RNY1</i> , <b>RPGR</b> , <i>RPL37A</i> , <i>RPS26</i> , <b>RPS6KA1</b> , <b>SAR1A</b> , <i>Sec23</i> , <i>SKA3</i> , <b>SLAIN2</b> , <b>SLC22A6</b> , <i>SSB</i> , <i>SSH3</i> , <i>STOML2</i> , <i>TMCC2</i> , <i>TTK</i> , <b>WARS2</b>	25	17	Protein Synthesis, Cell Cycle, Neurological Disease

Netzwerk	Moleküle im Netzwerk	Score	Focus Molekül	Top Krankheit & Funktion
10	<b>NAGLU, SMARCAL1, SFT2D2, C19orf43, CDC123, DONSON, EFTUD1, PPA2, CCZ1/CCZ1B, NTHL1, YIF1A, ZFAND2B, FITM2, KIAA1731, FBXL6, FANCB, APITD1, ATP13A2, BLM, C1orf86, DAZAP2, FANCE, FANCF, FANCG, FANCL, FANCM, KIAA1279, Lyz1/Lyz2, NUDT1, PANK4, REV3L, RMI1, TOP3A, UBC, WRN</b>	24	16	Developmental Disorder, Hematological Disease, Hereditary Disorder
11	<b>MIDN, MAN2B2, C2CD2L, KIF21A, MID1IP1, RNF145, NRSN2, NCCRP1, N4BP2L2, RCBTB1, B3GALT6, TTC38, HIATL1, SPEF2, RNFT2, PDCD7, ARFGF1, DRAP1, EXOSC10, FAM118B, FEZ1, FEZ2, GOLM1, GUSB, MIB1, MLX, NCS1, PRPF4, SCAPER, SLC24A2, SMNDC1, SRP68, SRP72, UBC, VCIPI1</b>	24	16	Developmental Disorder, Hereditary Disorder, Ophthalmic Disease
12	<b>SURF4, POU3F1, AIPL1, TMEM82, PJA2, NTHL1, KIFC2, TRAPPC6A, OR10H3, HCN2, CACNG8, EIF5, ARX, EPS8L3, HCN1, APOC2, C1QA, Calbindin, CYTH2, DIO2, EFS, HNF4A, MAG, mir-124, mir-133, mir-135, mir-139, miR-4723-5p (and other miRNAs w/seed GGGGGAG), MPZ, PRPF31, RAB33B, RARRES3, REST, TRAPPC4, tretinoin</b>	22	15	Cell Morphology, Cellular Function and Maintenance, Neurological Disease
13	<b>HOXA10, SNX2, ELL3, ZNF605, KIAA0040, CDKN1C, ENPP2, CARM1, VPS35, RN7SK, PBX2, USP32, RBMS1, KIAA0947, MGAT4C, beta-estradiol, CCNT1, CCNT2, CDK9, DHRS9, EAF2, Egfbp2, estriol, FARSA, FKBP15, GSTT1, HEXIM1, miR-124-3p (and other miRNAs w/seed AAGGCAC), mir-383, MLLT3, NELFE, P-TEFb, PROM1, SMYD3, WASH1</b>	22	15	Drug Metabolism, Lipid Metabolism, Molecular Transport
14	<b>LIG4, EML2, Rps6ka5, Fhod3, ENPP2, PPP6R1, Miil1, HAPLN2, KRTAP4-3, RNASE9, RBBP8, SAMD1, LONRF1, ANAPC10, beta-estradiol, BRCA1, BRD2, DGUOK, DIO2, ELAVL1, FGF1, GSTP1, GSTT1, HCST, KISS1R, KRT83, LDHC, LHCGR, MT-ND1, NPY5R, PMP22, Proinsulin, Scg5, SNX3, TJAP1</b>	20	14	Cell Death and Survival, Organ Morphology, Organismal Development
15	<b>PPFIBP1, DCTN4, ARL6IP1, SEMA3C, Eif2ak4, LIMA1, POLE3, Gstm6, Zfp748, GSDMD, ZNF354A, APOBEC2, PSTPIP1, JMY, Actin, AGT, APOBEC1, ARL6, Arp2/3, CCNE2, DCTN3, FDFT1, IFNG, Importin alpha, Jmy-p300, KRT15, mir-34, NOTCH3, RPL36, Sry, TDO2, TP53, TRIM28, TTC5, Ube2n</b>	18	14	Cell Death and Survival, Cardiovascular System Development and Function, Organ Morphology
16	<b>SLC6A13, PSMD14, EFCAB3, AOX1, ODF3, CTPS2, LRR1Q1, SYT10, CCRN4L, TBC1D14, 2-mercaptoethanol, CHAF1B, DHX36, DPP3, EIF3E, FANCF, GLO1, GSTT1, HNRNPA3, IKBKG, KTN1, miR-3160-3p (miRNAs w/seed GAGCUGA), miR-590-3p (miRNAs w/seed AAUUUUUA), MSH2, NAB1, NFE2L2, PPP4R1, PSMD12, PSMD7, RAB11FIP3, RARS, RNASE4, SUMO2, TPT1, USP14</b>	13	10	Amino Acid Metabolism, Small Molecule Biochemistry, Dermatological Diseases and Conditions
17	<b>PMR3, Protamine</b>	2	1	Cellular Movement, Reproductive System Development and Function
18	<b>Rrm1, ribonucleotide reductase</b>	2	1	unknown

Nomenklatur: **Fett** gedruckt: Gen ist in Oxa-behandelten Mäusen als herunter reguliert detektiert worden; **Normal** gedruckt: Die Expression des Genes ist in Oxa-behandelten Mäusen erhöht; *Kursiv* gedruckt: Moleküle die anhand bekannter Interaktionen aus der Ingenuity Knowledge Base in das Netzwerk eingebaut wurden.

## A.2 DNA-Mikroarray-Analyse

Die 372 Gene die in den DNA-Mikroarray-Analysen mittels der WebArrayDB in allen drei statistischen Analysen signifikant reguliert wurden sind in Abschnitt A.2.1 tabellarisch dargestellt.

### A.2.1 Tabellarische Darstellung der signifikant regulierten Gene aus den DNA-Mikroarray-Analysen

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
Mospd1	37.85290047	6.47E-07	ENSMUSG00000023074
Ccdc120	27.09315526	0.0019695	ENSMUSG00000031150
Jmy	26.99032927	5.52E-08	ENSMUSG00000021690
NA	16.08763345	2.67E-05	ENSMUSG00000075400
Lrrc32	15.41657946	0.00038437	NA
Fzd4	11.76436722	0.01218807	NA
4930430D24Rik	11.45310368	1.11E-06	ENSMUSG00000068046
Hcn2	11.14043057	0.00104318	ENSMUSG00000020331
Atg12	10.52065135	0.00231842	ENSMUSG00000032905
Osta	10.12853388	0.00499697	ENSMUSG00000035699
Fam165b	7.519074982	0.00261526	ENSMUSG00000051989
Gng3	6.348450576	0.02889077	ENSMUSG00000071658
Apobec2	6.167765151	0.01663357	ENSMUSG00000040694
Defb46	5.955836416	0.02155305	ENSMUSG00000071169
Gm4881	5.647234879	0.00100031	NA
Ppih	5.359908181	0.00633585	NA
Stim1	5.356132232	2.35E-06	ENSMUSG00000030987
Lrriq1	5.287183262	0.03275389	ENSMUSG00000019892
Ubn2	5.220174167	0.02742964	ENSMUSG00000038538
Rnase9	5.215448668	0.03091002	ENSMUSG00000052382
Cnfn	5.161699919	7.49E-05	ENSMUSG00000063651
Map3k13	5.126164463	0.00770458	ENSMUSG00000033618
LOC100047676	5.026749665	0.00534644	NA
Tmed6	5.021435181	0.00987968	ENSMUSG00000031919
Zfand2b	4.893253984	0.0028739	ENSMUSG00000026197
Krtap4-16	4.765151011	0.0105671	ENSMUSG00000046474
Klhl6	4.609625743	9.61E-05	ENSMUSG00000043008
LOC639826	4.581636537	0.00881168	NA
Olfr63	4.505653436	0.02565839	ENSMUSG00000054666
BC030870	4.49348164	9.99E-05	ENSMUSG00000074300
Ctps2	4.408088261	0.01098876	ENSMUSG00000031360
Eif4e2	4.393643343	0.0281662	ENSMUSG00000026254
NA	4.383851796	0.00185736	ENSMUSG00000072852
Trappc6a	4.331950404	0.00019421	ENSMUSG00000002043
Gm6744	4.319105193	0.00782377	ENSMUSG00000081216



Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
Dppa4	4.268340381	0.00187784	ENSMUSG00000058550
Pbx2	4.168145706	0.00160913	ENSMUSG00000034673
Rn7sk	4.135607456	0.00309306	NA
1700025G04Rik	4.097726988	0.00482583	ENSMUSG00000073540
Slc46a1	4.086279021	0.00038064	ENSMUSG00000020829
Psm14	4.056033025	0.03805433	ENSMUSG00000026914
Gm10616	4.050678887	0.00022114	ENSMUSG00000074057
Mgat4c	4.042748967	0.01806364	ENSMUSG00000019888
Mab2112	4.00486967	0.00309159	NA
Fancb	3.922118746	0.01284717	ENSMUSG00000047757
4933409K07Rik	3.91087024	0.00881811	ENSMUSG00000044712
Zfp354a	3.890768188	0.00091889	ENSMUSG00000020364
BC018507	3.888910102	0.00074771	ENSMUSG00000034525
6330409D20Rik	3.88288113	0.00026234	ENSMUSG00000009551
NA	3.880429298	0.01900332	ENSMUSG00000078306
Akp3	3.87430659	0.00155324	ENSMUSG00000036500
Cdk5r2	3.743831557	0.00367394	ENSMUSG00000090071
Nucks1	3.73111256	0.03068069	ENSMUSG00000026434
NA	3.689899019	0.00115343	ENSMUSG00000053957
LOC665635	3.68186687	0.02864871	NA
2010002N04Rik	3.67249029	0.01929152	ENSMUSG00000038059
Sarm1	3.661909855	0.03436388	NA
D10627	3.590104105	0.0246	NA
Ypel2	3.581373848	0.01047411	ENSMUSG00000018427
Tstd1	3.574973167	0.00194796	NA
Zfp831	3.553014452	0.00719116	ENSMUSG00000050600
Tjap1	3.515899813	0.00022689	ENSMUSG00000012296
Chtf8	3.505718399	0.00742588	ENSMUSG00000046691
Tbc1d14	3.505153831	0.00382003	ENSMUSG00000029192
NA	3.447940319	0.00053911	ENSMUSG00000028760
Gsdmd	3.447490302	0.0179718	ENSMUSG00000022575
Zfp748	3.424845534	0.00071171	ENSMUSG00000069204
NA	3.409283623	0.00365841	ENSMUSG00000079568
Gstm6	3.387621071	0.00788215	ENSMUSG00000068762
Kifc2	3.385794893	0.00351049	ENSMUSG00000004187
Evx2	3.384954605	0.01395668	ENSMUSG00000001815
1300018J18Rik	3.379351481	0.00592364	ENSMUSG00000035757
NA	3.360242543	0.02143805	ENSMUSG00000024608
Lifr	3.339680296	0.02970004	NA
Tubb3 LOC100502903	3.323869246	0.01692117	ENSMUSG00000062380
Plekha2	3.282883969	0.00314206	ENSMUSG00000031557
Nlrp4d	3.261835453	0.00565505	ENSMUSG00000034122
Alpl2	3.261491954	0.00019536	ENSMUSG00000026246
Pdcd7	3.252699504	0.00100908	ENSMUSG00000041837
Stoml3	3.251090522	0.00347283	ENSMUSG00000027744
Gm5546	3.238253762	7.08E-05	ENSMUSG00000022187

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
Odf3	3.219687285	0.01186397	ENSMUSG00000025482
NA	3.217071787	2.63E-08	ENSMUSG00000054404
Ppip5k2	3.174984235	0.00776425	ENSMUSG00000040648
Map2k1	3.171328966	0.02201912	ENSMUSG00000004936
Rbms1	3.161546949	0.00450086	ENSMUSG00000026970
Cphx Gm2135 Gm2104	3.160703797	0.00333847	ENSMUSG00000072678
Usp32	3.139804041	0.03432656	ENSMUSG00000000804
Gm10876	3.133821757	0.02493787	ENSMUSG00000075607
Krt31	3.112336805	0.01608172	ENSMUSG00000048981
LOC100504963 Trappc1			
0	3.09614373	0.00447816	ENSMUSG00000000374
NA	3.082426656	6.30E-06	ENSMUSG00000075272
NA	3.081644141	0.01922542	ENSMUSG00000079449
Slc35a4	3.078927377	0.0028503	ENSMUSG00000033272
Ccdc42b	3.073585399	0.00338297	NA
1700042G15Rik	3.065857	0.00821528	NA
Lingo2	3.038338144	0.0071866	ENSMUSG00000045083
LOC100502985	3.021101137	0.00015252	ENSMUSG00000075230
Fbxl6	3.014365886	0.00320681	ENSMUSG00000022559
Ms4a7	3.003558813	0.0137616	ENSMUSG00000024672
Ccrn4l	2.994617953	0.01273582	ENSMUSG00000023087
Zfp58	2.99382879	0.02199785	ENSMUSG00000071291
Naa50	2.977401991	0.0119504	ENSMUSG00000022698
Olfr1010	2.967069209	0.01150218	ENSMUSG00000044228
Hcn1	2.899865312	0.01345543	ENSMUSG00000021730
Gpr63	2.891413619	0.00180675	ENSMUSG00000040372
Fam89a	2.882228087	0.02778118	ENSMUSG00000043068
5830418K08Rik	2.871954202	0.00040143	ENSMUSG00000046111
NA	2.865912748	0.030858	ENSMUSG00000074273
Dync1li2	2.863805433	0.0131373	NA
Slc38a10	2.859096479	0.00485429	ENSMUSG00000061306
Nup50	2.858518619	0.00078867	ENSMUSG00000016619
Ssh3	2.801350154	0.005718	ENSMUSG00000034616
Xaf1	2.799738621	1.95E-05	ENSMUSG00000040483
Elovl7	2.794622096	0.00062343	ENSMUSG00000021696
Gm8066	2.749015508	0.01697454	NA
Parg	2.731721112	0.00506498	ENSMUSG00000021911
Dnahc9	2.727371863	0.02174487	ENSMUSG00000056752
Shisa7	2.711793568	0.04480791	ENSMUSG00000053550
Clec9a	2.700275456	0.00346442	NA
Aox1	2.693896041	0.00983029	ENSMUSG00000063558
Yif1a	2.682141944	0.00119401	NA
Ppm1b	2.680652242	0.01916459	ENSMUSG00000061130
Lonrf1	2.679753261	0.01103696	ENSMUSG00000039633
NA	2.671366373	0.00824779	ENSMUSG00000053588
Efcab3	2.662117786	3.27E-05	ENSMUSG00000020690

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
C330027C09Rik	2.657207671	0.00682594	ENSMUSG00000033031
Stoml2	2.653768259	6.47E-05	ENSMUSG00000028455
Nccrp1	2.651501485	0.00466458	ENSMUSG00000047586
NA	2.640051979	0.0016861	ENSMUSG00000087228
NA	2.63921769	0.02776478	ENSMUSG00000074106
Naaladl2	2.636461041	0.00432667	ENSMUSG00000074667
Eps8l3	2.63329334	0.00117606	ENSMUSG00000040600
Rcbtb1	2.616908463	0.00455884	ENSMUSG00000035469
Gbx2	2.612719112	0.00623075	ENSMUSG00000034486
Olfrl8	2.595816582	0.00685289	ENSMUSG00000066896
Arx	2.594987521	0.01967751	ENSMUSG00000035277
Sez6	2.591551178	0.00106578	ENSMUSG00000000632
Gm9999	2.576438673	0.02354041	ENSMUSG00000056509
Ppcs	2.574632839	0.03601258	ENSMUSG00000028636
NA	2.563316448	0.00401021	ENSMUSG00000055254
Ptov1	2.545102889	0.007484	ENSMUSG00000038502
Pstpip1	2.544177118	0.04462079	ENSMUSG00000032322
Samd1	2.534092941	0.04467085	ENSMUSG00000079003
Rxfp3	2.531530588	0.00565725	ENSMUSG00000060735
Nrsn2	2.524475132	0.00799865	ENSMUSG00000059361
NA	2.507678363	0.02241094	ENSMUSG00000051554
Rnft2	2.504006806	0.0284929	ENSMUSG00000032850
Hnrnpr	2.491147624	0.02389951	ENSMUSG00000066037
Rrm1	2.484020095	0.00074099	NA
Prm3	2.480108669	2.63E-05	ENSMUSG00000050058
Mrps27	2.476023035	0.00041761	ENSMUSG00000041632
Ankrd34c	2.470438421	0.00583779	ENSMUSG00000047606
NA	2.4696805	0.00860852	ENSMUSG00000057440
NA	2.456745969	0.02332771	ENSMUSG00000085363
Gm10624	2.456291191	0.01436568	ENSMUSG00000074080
Mapre1	2.455036714	0.0008322	ENSMUSG00000027479
Rbbp8	2.453161134	0.00407385	ENSMUSG00000041238
Tcf21	2.44528561	6.12E-06	ENSMUSG00000045680
Nthl1	2.44267056	0.01313378	ENSMUSG00000041429
Klf13	2.431886452	0.01572974	ENSMUSG00000052040
NA	2.429729012	0.03408876	ENSMUSG00000078814
Ccdc54	2.419940762	0.01373358	NA
Spef2	2.412820979	0.01515269	ENSMUSG00000072663
Mex3a	2.404187702	0.01037813	ENSMUSG00000074480
Gm10440	2.400956185	0.00391757	NA
Hopx	2.396906193	0.00188863	ENSMUSG00000059325
Ssb	2.396497401	0.00249399	ENSMUSG00000068882
Pja2	2.392184146	0.00043432	NA
Dnajc9	2.392020838	0.00975406	ENSMUSG00000021811
4930570E03Rik	2.358862761	0.02086775	NA
NA	2.351345329	0.01083955	ENSMUSG00000056717

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
Tmcc2	2.341859784	0.02143445	ENSMUSG00000042066
Sema4d	2.335946354	0.00622694	ENSMUSG00000021451
Zfp773	2.335795684	0.00779868	ENSMUSG00000063535
4930518l15Rik	2.331728663	0.01990136	ENSMUSG00000074629
Bysl	2.331555071	0.01365166	NA
Adam21	2.313687143	0.00548512	ENSMUSG00000008438
NA	2.306772005	0.00897357	ENSMUSG00000086477
Tas2r113	2.300638549	0.00039291	ENSMUSG00000056926
NA	2.295887848	0.01291865	ENSMUSG00000076571
Syt10	2.293579078	0.03911064	ENSMUSG00000063260
Hiatl1	2.249886994	0.00439332	ENSMUSG00000038212
Lcn9	2.243138374	1.70E-05	ENSMUSG00000023210
Plcb2	2.240867593	0.0141827	ENSMUSG00000040061
Fbxl20	2.216492634	0.04176086	ENSMUSG00000020883
Oprk1	2.206491006	0.01927403	ENSMUSG00000025905
Cd276	2.205901896	0.01876004	ENSMUSG00000035914
Atp2c1	2.197953272	0.03742303	ENSMUSG00000032570
Dcp1a	2.197252499	0.00509515	ENSMUSG00000021962
LOC100503467	2.19494928	0.00265329	ENSMUSG00000073548
Frs2	2.185020115	0.03164293	ENSMUSG00000020170
Olfr1311	2.178762898	0.03645004	ENSMUSG00000074948
Fitm2	2.176207845	0.01046915	NA
N4bp2l2	2.175627234	0.00046694	ENSMUSG00000029655
Gm9951	2.16973253	0.00026729	ENSMUSG00000054618
Pole3	2.166573001	0.02918648	ENSMUSG00000028394
AW011738	2.164640432	0.00568622	ENSMUSG00000078349
NA	2.153217543	0.00481469	ENSMUSG00000078691
Eif5	2.142577098	0.0045263	NA
Fam183b	2.130931629	0.00283403	ENSMUSG00000049154
Rrm2	2.128652649	0.00938822	ENSMUSG00000020649
Tcf12	2.124768633	0.00286444	ENSMUSG00000032228
Mrpl49	2.122621482	0.00018251	ENSMUSG00000007338
Psmb3 LOC100505005	2.116255276	0.0013182	ENSMUSG00000069744
Slc2a8	2.108753681	0.0426867	ENSMUSG00000026791
Slc30a4	2.107163647	0.01310516	ENSMUSG00000005802
Serpinb1c	2.095201631	0.00672377	ENSMUSG00000079049
Prr5	2.07808275	0.01126327	ENSMUSG00000036106
Ttc38	2.070894954	9.38E-05	ENSMUSG00000035944
Snrpg Gm8186	2.066493396	0.02129562	ENSMUSG00000057278
Odz3	2.064819048	0.00066412	NA
Nek2	2.06137962	0.00560516	ENSMUSG00000026622
B3galt6	2.059749513	0.00502517	ENSMUSG00000050796
Med7	2.059666256	0.00946436	ENSMUSG00000020397
Atxn10	2.044344224	0.00114222	NA
Cacng8	2.04261195	0.01769187	ENSMUSG00000053395
Cytip	2.037223552	0.02811487	ENSMUSG00000026832

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
NA	2.03584636	0.0472946	ENSMUSG00000079274
Prssl1	2.016714434	0.00469134	ENSMUSG00000020323
Adamts18	2.014155654	0.03768708	ENSMUSG00000053399
Cd300lf	2.007720766	0.02588846	ENSMUSG00000047798
F5	2.006029115	2.91E-05	ENSMUSG00000026579
Cdkl4	2.002718334	0.00678	NA
LOC100505117 Ttyh2	-2.002290555	0.00906824	ENSMUSG00000034714
Lima1	-2.008078774	0.00021345	ENSMUSG00000023022
Artn	-2.01077862	0.04459852	ENSMUSG00000028539
Ccnh	-2.01579321	0.00217875	ENSMUSG00000021548
Fhod3	-2.02182177	0.04105077	ENSMUSG00000034295
Wdr73	-2.028524228	0.00323577	ENSMUSG00000025722
Asah1	-2.029594584	0.00510408	ENSMUSG00000031591
C2cd2l	-2.03220454	0.01158681	ENSMUSG00000032120
Cacybp	-2.038050333	6.06E-05	ENSMUSG00000014226
1110065P20Rik	-2.042161724	0.00141153	ENSMUSG00000078570
Cx3cl1	-2.048289066	0.00782491	ENSMUSG00000031778
Tmem126a	-2.052215887	0.01698432	ENSMUSG00000030615
Prdx4	-2.057086686	0.0083982	ENSMUSG00000025289
Dcn	-2.059551731	0.0121753	ENSMUSG00000019929
Man2b2	-2.059765745	0.01696316	ENSMUSG00000029119
AU022870	-2.063061302	0.01154587	ENSMUSG00000029617
Kctd17	-2.068285053	0.01438813	ENSMUSG00000033287
Loxhd1	-2.087144964	0.04331284	ENSMUSG00000032818
Tmem82	-2.088345705	0.00899357	ENSMUSG00000043085
Rps6ka5	-2.090157252	0.0013909	ENSMUSG00000021180
Cxcr1	-2.092121706	0.00144638	ENSMUSG00000048480
Nek7	-2.097344071	0.00768887	ENSMUSG00000026393
Rnf145	-2.097668431	0.01262641	ENSMUSG00000019189
Nudt18	-2.099778172	0.00159761	ENSMUSG00000045211
NA	-2.124079774	0.00112606	ENSMUSG00000073139
Rpgr	-2.128301291	0.00038121	ENSMUSG00000031174
Ppa2	-2.13233119	6.67E-07	ENSMUSG00000028013
Aco1	-2.135582859	0.00802036	ENSMUSG00000028405
Aipl1	-2.150281767	0.01923131	ENSMUSG00000040554
4930583K01Rik	-2.167595286	0.00030464	ENSMUSG00000055159
Tnks2	-2.171647744	0.00224793	NA
Prosapip1	-2.180021172	0.00460207	ENSMUSG00000037703
B430319G15Rik	-2.189612766	0.01238401	NA
Defb26	-2.194395348	0.04168618	ENSMUSG00000074680
Hapln2	-2.200533817	0.00155487	ENSMUSG00000004894
Polr2c	-2.203788557	0.0450879	ENSMUSG00000031783
Eif2ak4	-2.206419657	0.01495129	ENSMUSG00000005102
Phf8	-2.222226185	0.02505499	ENSMUSG00000041229
Surf4	-2.231672599	0.00900799	ENSMUSG00000014867
Madcam1	-2.232344108	0.04617622	ENSMUSG00000020310

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
Vps35	-2.244760989	0.00838675	ENSMUSG00000031696
Vdr	-2.250290928	0.00169398	ENSMUSG00000022479
NA	-2.260039433	0.0169752	ENSMUSG00000055109
Glrx5	-2.26905465	0.00330162	ENSMUSG00000021102
Midn	-2.29371832	0.03153409	ENSMUSG00000035621
Eps15	-2.297114311	0.00195658	ENSMUSG00000028552
1810006K21Rik	-2.298234155	0.00748718	ENSMUSG00000036372
Sbno2	-2.3086027	0.00449391	ENSMUSG00000035673
Wars2	-2.324386575	0.01151166	ENSMUSG00000004233
Slain2	-2.331346444	0.00437684	ENSMUSG00000036087
Ppp6r3	-2.336409136	3.52E-07	ENSMUSG00000024908
Smo	-2.339237081	0.00021009	ENSMUSG00000001761
Ppp1r11	-2.365312692	0.0157996	NA
Carm1	-2.367133908	0.00017848	ENSMUSG00000032185
Paqr7	-2.373250886	9.64E-06	ENSMUSG00000037348
4930523C07Rik	-2.377011496	0.02064164	NA
Sar1a	-2.377396911	0.02554299	NA
Donson	-2.386153819	0.00485791	ENSMUSG00000022960
Usp8	-2.388361305	0.00493788	ENSMUSG00000027363
4732471D19Rik	-2.408327085	0.01255125	ENSMUSG00000043183
Chmp5	-2.41099283	0.00874433	ENSMUSG00000028419
Prcp	-2.417248196	2.81E-06	ENSMUSG00000061119
Arpp21	-2.422798593	0.02810771	NA
Zfp605	-2.441103305	0.00482533	ENSMUSG00000023284
Mill1	-2.453110612	0.01195492	ENSMUSG00000054005
Lman2	-2.45374606	0.0090096	NA
Ganab	-2.457284104	0.00182788	ENSMUSG00000071650
Tbc1d10a	-2.461255032	0.00141206	ENSMUSG00000034412
Tmem176b	-2.46608234	0.00946702	ENSMUSG00000029810
Hsd17b10	-2.484904349	0.00212518	ENSMUSG00000025260
Ell3	-2.504394019	0.00949382	ENSMUSG00000046110
Lztr1	-2.509052022	0.00065394	ENSMUSG00000022761
Sec31a	-2.524820185	0.00556711	ENSMUSG00000035325
Fmnl1	-2.550260247	0.00170151	ENSMUSG00000055805
Zc3h7b	-2.552842502	0.00741579	ENSMUSG00000022390
Abcb6	-2.567910654	0.03125994	ENSMUSG00000026198
Prep	-2.569613789	0.0211247	ENSMUSG00000041577
Mid1ip1	-2.578340391	0.00010215	ENSMUSG00000008035
Slc22a6	-2.593136372	0.01205383	ENSMUSG00000024650
Gm6498	-2.595352758	0.04128216	ENSMUSG00000063885
Sema3c	-2.622687837	0.02018384	ENSMUSG00000028780
Fam168b	-2.628377507	0.00484432	ENSMUSG00000037503
Atp5b	-2.637184607	0.01891006	ENSMUSG00000025393
Wnt5b	-2.642349205	0.01260735	ENSMUSG00000030170
Hoxc6	-2.650742952	0.01763823	ENSMUSG00000001661
Snx2	-2.658736447	0.00283222	ENSMUSG00000034484

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
2510012J08Rik	-2.663923246	0.00126093	ENSMUSG00000034889
Cav1	-2.663970022	0.00317681	ENSMUSG00000007655
Cdc123	-2.692945745	0.01691217	ENSMUSG00000039128
Tm2d2	-2.700890305	0.01684788	ENSMUSG00000031556
Syap1	-2.750481707	0.00023869	ENSMUSG00000031357
Med22	-2.754910627	0.01718793	ENSMUSG00000015776
Ets1	-2.770726585	0.0006693	ENSMUSG00000032035
Zfp871	-2.781988364	0.00221091	NA
Ankfy1	-2.785942954	0.0013281	ENSMUSG00000020790
Itga8	-2.788436717	0.02547755	ENSMUSG00000026768
Stom	-2.789209637	0.00457553	ENSMUSG00000026880
Sstr5	-2.792158495	0.04162562	ENSMUSG00000050824
NA	-2.796271321	0.00092529	ENSMUSG00000074153
Slc6a13	-2.808418899	2.09E-07	ENSMUSG00000030108
2310036O22Rik	-2.82909772	0.00417005	ENSMUSG00000041203
Slc22a5	-2.854029474	0.00029991	ENSMUSG00000018900
Arl6ip1	-2.867173367	0.00881753	ENSMUSG00000030654
Hoxa10	-2.874904411	0.02850775	ENSMUSG00000000938
Eftud1	-2.899705313	0.01049406	ENSMUSG00000038563
Zfand6	-2.905069297	0.00035677	ENSMUSG00000030629
Dctn4	-2.920602862	0.00084036	ENSMUSG00000024603
Sft2d2	-2.924875123	0.01590554	NA
Xirp1	-2.926116297	0.02372498	ENSMUSG00000079243
Pcbd1	-2.940256777	0.00654813	ENSMUSG00000020098
Rab8a	-2.951245271	0.00409606	NA
Pim3	-2.95245006	0.00584416	ENSMUSG00000035828
Ppp6r1	-2.965478072	0.00509727	ENSMUSG00000052296
Lsm11	-2.993271681	0.0231457	ENSMUSG00000044847
Smarcal1	-3.029037312	0.01536851	NA
Gpr160	-3.03821638	0.01009156	ENSMUSG00000037661
Naglu	-3.058657001	0.00214682	ENSMUSG00000001751
Pum2	-3.118530181	0.04640683	ENSMUSG00000020594
Slc8a1	-3.136107081	0.04804747	ENSMUSG00000054640
4930455F23Rik	-3.153485678	0.00030431	ENSMUSG00000026578
Rps6ka1	-3.160445473	0.01124471	ENSMUSG00000003644
Ptbp1	-3.162448857	0.00943223	ENSMUSG00000006498
Ssr1	-3.166891159	0.02856693	NA
Nxf1	-3.212196043	6.58E-06	ENSMUSG00000010097
Ppfibp1	-3.274646794	0.03305921	ENSMUSG00000016487
Ttyh3	-3.360134946	0.00305695	ENSMUSG00000036565
4933407C03Rik	-3.375313612	0.00985457	NA
Havcr1	-3.406563119	0.0216651	ENSMUSG00000040405
Nxt2	-3.415976227	0.00171526	ENSMUSG00000042271
Npas4	-3.428844613	0.01490892	ENSMUSG00000045903
Eml2	-3.573192616	0.00939512	ENSMUSG00000040811
Lig4	-3.599477502	0.0005401	NA

Gen	Fold Change	p-Wert	Ensembl ID
Gm6422	-3.79478414	0.03621412	NA
Psmc2	-3.833638962	0.01161116	ENSMUSG00000028932
Kif21a	-3.893469497	0.04602321	ENSMUSG00000022629
Rp1l1	-3.910144955	0.00242706	ENSMUSG00000046049
Nkx6-3	-4.173103408	0.00039505	ENSMUSG00000063672
Cox17	-4.433940782	0.02828119	ENSMUSG00000046516
Clic4	-5.090280848	7.35E-05	ENSMUSG00000037242
Enpp2	-5.18252247	0.01145107	ENSMUSG00000022425
Yod1	-5.441421563	0.0057258	ENSMUSG00000046404
Gm4362	-6.039843094	0.00664443	NA
Pou3f1	-6.345959932	0.00253521	ENSMUSG00000078236
Osgin1	-7.572908897	0.00348498	ENSMUSG00000074063
Cdkn1c	-7.68476128	0.02429465	ENSMUSG00000037664
Exo1	-7.927930585	0.00114288	NA
Iqcf5	-10.44541976	0.00058939	ENSMUSG00000066382



## Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S., Ghilardi, N., Xie, M. H., de Sauvage, F. J. and Gurney, A. L. (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *The Journal of biological chemistry*, 278, 1910-1914.
- Agrawaal, K. K. and Dhakal, S. S. (2014) Systemic lupus erythematosus in males: a case series. *Saudi journal of kidney diseases and transplantation : an official publication of the Saudi Center for Organ Transplantation, Saudi Arabia*, 25, 638-642.
- Alamanos, Y. and Drosos, A. A. (2005) Epidemiology of adult rheumatoid arthritis. *Autoimmunity reviews*, 4, 130-136.
- Alberts, B. (2008) *Molecular biology of the cell*. Garland Science, New York, NY.
- Aldred, S. F., Collins, P. and Trinklein, N. (2011) Identifying targets of human micromRNAs with the LightSwitch Luciferase Assay System using 3'UTR-reporter constructs and a microRNA mimic in adherent cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*.
- Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N., Izui, S., Wilson, C. B., McConahey, P. J., Murphy, E. D., Roths, J. B. and Dixon, F. J. (1978) Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *The Journal of experimental medicine*, 148, 1198-1215.
- Anspach, L. A. (2011) Suche nach Inhibitoren der STAT3-abhängigen Signaltransduktion aus Pilzen und Einfluss von Oxacyclododecandion auf die miRNA-Expression in der humanen immortalisierten Chondrocyten-Zelllinie C28/I2. In *Biotechnologie*, Vol. Diplomarbeit Technischen Universität Kaiserslautern, Kaiserslautern, pp. 133.
- Arbuckle, M. R., McClain, M. T., Rubertone, M. V., Scofield, R. H., Dennis, G. J., James, J. A. and Harley, J. B. (2003) Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 349, 1526-1533.
- Aringer, M. and Smolen, J. S. (2004) Tumour necrosis factor and other proinflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus: a rationale for therapeutic intervention. *Lupus*, 13, 344-347.
- Art, J. (2012) Die Bedeutung von KSRP für die pro-inflammatorische Genexpression in Autoimmunerkrankungen - Einfluss des Naturstoffes Resveratrol auf KSRP-vermittelte Regulationsmechanismen.
- Askanase, A., Shum, K. and Mitnick, H. (2012) Systemic lupus erythematosus: an overview. *Social work in health care*, 51, 576-586.
- Auphan, N., DiDonato, J. A., Rosette, C., Helmberg, A. and Karin, M. (1995) Immunosuppression by glucocorticoids: inhibition of NF-kappa B activity through induction of I kappa B synthesis. *Science*, 270, 286-290.
- Badal, S. S. and Danesh, F. R. (2014) MicroRNAs and their applications in kidney diseases. *Pediatric nephrology*.
- Baechler, E. C., Batliwalla, F. M., Karypis, G., Gaffney, P. M., Ortmann, W. A., Espe, K. J., Shark, K. B., Grande, W. J., Hughes, K. M., Kapur, V., Gregersen, P. K. and Behrens, T. W. (2003) Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 2610-2615.
- Baillet, A., Trocme, C., Berthier, S., Arlotto, M., Grange, L., Chenau, J., Quetant, S., Seve, M., Berger, F., Juvin, R., Morel, F. and Gaudin, P. (2010) Synovial fluid proteomic fingerprint: S100A8, S100A9 and S100A12 proteins discriminate rheumatoid arthritis from other inflammatory joint diseases. *Rheumatology*, 49, 671-682.
- Bakheet, T., Williams, B. R. and Khabar, K. S. (2006) ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res*, 34, D111-114.
- Bashirullah, A., Cooperstock, R. L. and Lipshitz, H. D. (2001) Spatial and temporal control of RNA stability. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7025-7028.
- Baudino, L., Azeredo da Silveira, S., Nakata, M. and Izui, S. (2006) Molecular and cellular basis for pathogenicity of autoantibodies: lessons from murine monoclonal autoantibodies. *Springer seminars in immunopathology*, 28, 175-184.
- Bauer, J. W., Baechler, E. C., Petri, M., Batliwalla, F. M., Crawford, D., Ortmann, W. A., Espe, K. J., Li, W., Patel, D. D., Gregersen, P. K. and Behrens, T. W. (2006) Elevated serum levels

- of interferon-regulated chemokines are biomarkers for active human systemic lupus erythematosus. *PLoS medicine*, 3, e491.
- Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R. E., Manger, B., Gaipf, U., Neuhuber, W. L., Kirchner, T., Kalden, J. R. and Herrmann, M. (2002) Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 46, 191-201.
- Bellamy, N., Duffy, D., Martin, N. and Mathews, J. (1992) Rheumatoid arthritis in twins: a study of aetiopathogenesis based on the Australian Twin Registry. *Annals of the rheumatic diseases*, 51, 588-593.
- Beller, D. I., Farr, A. G. and Unanue, E. R. (1978) Regulation of lymphocyte proliferation and differentiation by macrophages. *Federation proceedings*, 37, 91-96.
- Bennett, L., Palucka, A. K., Arce, E., Cantrell, V., Borvak, J., Banchereau, J. and Pascual, V. (2003) Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *The Journal of experimental medicine*, 197, 711-723.
- Bertz, R. J. and Granneman, G. R. (1997) Use of in vitro and in vivo data to estimate the likelihood of metabolic pharmacokinetic interactions. *Clinical pharmacokinetics*, 32, 210-258.
- Bi, X. L., Yang, J. Y., Dong, Y. X., Wang, J. M., Cui, Y. H., Ikeshima, T., Zhao, Y. Q. and Wu, C. F. (2005) Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. *International immunopharmacology*, 5, 185-193.
- Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7, 1513-1523.
- Bonelli, M., Smolen, J. S. and Scheinecker, C. (2010) Treg and lupus. *Annals of the rheumatic diseases*, 69 Suppl 1, i65-66.
- Bonelli, M., von Dalwigk, K., Savitskaya, A., Smolen, J. S. and Scheinecker, C. (2008) Foxp3 expression in CD4+ T cells of patients with systemic lupus erythematosus: a comparative phenotypic analysis. *Annals of the rheumatic diseases*, 67, 664-671.
- Bosteen, M. H., Tritsaris, K., Hansen, A. J. and Dissing, S. (2013) IL-17A potentiates TNFalpha-induced secretion from human endothelial cells and alters barrier functions controlling neutrophils rights of passage. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brand, D. D., Kang, A. H. and Rosloniec, E. F. (2003) Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer seminars in immunopathology*, 25, 3-18.
- Brand, D. D., Latham, K. A. and Rosloniec, E. F. (2007) Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc*, 2, 1269-1275.
- Briata, P., Chen, C. Y., Giovarelli, M., Pasero, M., Trabucchi, M., Ramos, A. and Gherzi, R. (2011) KSRP, many functions for a single protein. *Frontiers in bioscience*, 16, 1787-1796.
- Brinks, R., Fischer-Betz, R., Sander, O., Richter, J., Chehab, G. and Schneider, M. (2014) Age-specific prevalence of diagnosed systemic lupus erythematosus in Germany 2002 and projection to 2030. *Lupus*.
- Brown, H. J., Lock, H. R., Wolfs, T. G., Buurman, W. A., Sacks, S. H. and Robson, M. G. (2007) Toll-like receptor 4 ligation on intrinsic renal cells contributes to the induction of antibody-mediated glomerulonephritis via CXCL1 and CXCL2. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 18, 1732-1739.
- Bullard, D. C., King, P. D., Hicks, M. J., Dupont, B., Beaudet, A. L. and Elkon, K. B. (1997) Intercellular adhesion molecule-1 deficiency protects MRL/MpJ-Fas(lpr) mice from early lethality. *Journal of immunology*, 159, 2058-2067.
- Burmester, G. R., Feist, E. and Dorner, T. (2014) Emerging cell and cytokine targets in rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Rheumatology*, 10, 77-88.
- Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 112, 195-203.
- Cabrespines, A., Laderach, D., Lebosse, C., Bach, J. F. and Koutouzov, S. (1998) Isolation and characterization of apoptotic nucleosomes, free and complexed with lupus autoantibody generated during hybridoma B-cell apoptosis. *Journal of autoimmunity*, 11, 19-27.
- Caccese, R. G., Zimmerman, J. L. and Carlson, R. P. (1992) Bacterial lipopolysaccharide potentiates type II collagen-induced arthritis in mice. *Mediators of inflammation*, 1, 273-279.

- Cairns, A. P., Crockard, A. D., McConnell, J. R., Courtney, P. A. and Bell, A. L. (2001) Reduced expression of CD44 on monocytes and neutrophils in systemic lupus erythematosus: relations with apoptotic neutrophils and disease activity. *Annals of the rheumatic diseases*, 60, 950-955.
- Caliz, R., Canet, L. M., Lupianez, C. B., Canhao, H., Escudero, A., Filipescu, I., Segura-Catena, J., Soto-Pino, M. J., Exposito-Ruiz, M., Ferrer, M. A., Garcia, A., Romani, L., Gonzalez-Utrilla, A., Vallejo, T., Perez-Pampin, E., Hemminki, K., Forsti, A., Collantes, E., Fonseca, J. E. and Sainz, J. (2013) Gender-specific effects of genetic variants within Th1 and Th17 cell-mediated immune response genes on the risk of developing rheumatoid arthritis. *PLoS one*, 8, e72732.
- Cannell, I. G., Kong, Y. W. and Bushell, M. (2008) How do microRNAs regulate gene expression? *Biochemical Society transactions*, 36, 1224-1231.
- Cano, P. O., Jerry, L. M., Sladowski, J. P. and Osterland, C. K. (1977) Circulating immune complexes in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental immunology*, 29, 197-204.
- Carballo, E., Cao, H., Lai, W. S., Kennington, E. A., Campbell, D. and Blackshear, P. J. (2001) Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway. *The Journal of biological chemistry*, 276, 42580-42587.
- Carlsen, A. L., Schetter, A. J., Nielsen, C. T., Lood, C., Knudsen, S., Voss, A., Harris, C. C., Hellmark, T., Segelmark, M., Jacobsen, S., Bengtsson, A. A. and Heegaard, N. H. (2013) Circulating microRNA expression profiles associated with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 65, 1324-1334.
- Cash, H., Relle, M., Menke, J., Brochhausen, C., Jones, S. A., Topley, N., Galle, P. R. and Schwarting, A. (2010) Interleukin 6 (IL-6) deficiency delays lupus nephritis in MRL-Faslpr mice: the IL-6 pathway as a new therapeutic target in treatment of autoimmune kidney disease in systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 37, 60-70.
- Casper, I. (2013) Analysen zur Expression proinflammatorischer Mediatoren in humanen Zellkulturmodellen und murinen Tiermodellen chronisch-inflammatorischer Erkrankungen.
- Chakravarty, E. F., Bush, T. M., Manzi, S., Clarke, A. E. and Ward, M. M. (2007) Prevalence of adult systemic lupus erythematosus in California and Pennsylvania in 2000: estimates obtained using hospitalization data. *Arthritis and rheumatism*, 56, 2092-2094.
- Chan, R. W., Lai, F. M., Li, E. K., Tam, L. S., Chow, K. M., Lai, K. B., Li, P. K. and Szeto, C. C. (2007) Intrarenal cytokine gene expression in lupus nephritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 66, 886-892.
- Chen, Z., Lin, F., Gao, Y., Li, Z., Zhang, J., Xing, Y., Deng, Z., Yao, Z., Tsun, A. and Li, B. (2011) FOXP3 and ROR $\gamma$  transcriptional regulation of Treg and Th17. *International immunopharmacology*, 11, 536-542.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*, 162, 156-159.
- Choy, E. (2012) Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 51 Suppl 5, v3-11.
- Clarke, P. A., te Poele, R., Wooster, R. and Workman, P. (2001) Gene expression microarray analysis in cancer biology, pharmacology, and drug development: progress and potential. *Biochemical pharmacology*, 62, 1311-1336.
- Cooper, W. O., Fava, R. A., Gates, C. A., Cremer, M. A. and Townes, A. S. (1992) Acceleration of onset of collagen-induced arthritis by intra-articular injection of tumour necrosis factor or transforming growth factor-beta. *Clinical and experimental immunology*, 89, 244-250.
- Corn, J. E. and Vucic, D. (2014) Ubiquitin in inflammation: the right linkage makes all the difference. *Nature structural & molecular biology*, 21, 297-300.
- Courtenay, J. S., Dallman, M. J., Dayan, A. D., Martin, A. and Mosedale, B. (1980) Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. *Nature*, 283, 666-668.
- Craft, J., Peng, S., Fujii, T., Okada, M. and Fatenejad, S. (1999) Autoreactive T cells in murine lupus: origins and roles in autoantibody production. *Immunologic research*, 19, 245-257.
- Crispin, J. C., Oukka, M., Bayliss, G., Cohen, R. A., Van Beek, C. A., Stillman, I. E., Kytтарыs, V. C., Juang, Y. T. and Tsokos, G. C. (2008) Expanded double negative T cells in patients with systemic lupus erythematosus produce IL-17 and infiltrate the kidneys. *Journal of immunology*, 181, 8761-8766.

- Dai, R., Zhang, Y., Khan, D., Heid, B., Caudell, D., Crasta, O. and Ahmed, S. A. (2010) Identification of a common lupus disease-associated microRNA expression pattern in three different murine models of lupus. *PloS one*, 5, e14302.
- Dai, Y., Sui, W., Lan, H., Yan, Q., Huang, H. and Huang, Y. (2009) Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in renal biopsies of lupus nephritis patients. *Rheumatology international*, 29, 749-754.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. and Stark, G. R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264, 1415-1421.
- Darzynkiewicz, Z. (1990) *Flow cytometry*, Academic Press, San Diego.
- Davis, P., Percy, J. S. and Russell, A. S. (1977) Correlation between levels of DNA antibodies and clinical disease activity in SLE. *Annals of the rheumatic diseases*, 36, 157-159.
- de Souza, A. J., Oriss, T. B., O'Malley K, J., Ray, A. and Kane, L. P. (2005) T cell Ig and mucin 1 (TIM-1) is expressed on in vivo-activated T cells and provides a costimulatory signal for T cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 17113-17118.
- de Zubiria Salgado, A. and Herrera-Diaz, C. (2012) Lupus nephritis: an overview of recent findings. *Autoimmune diseases*, 2012, 849684.
- Deane, K. D. and El-Gabalawy, H. (2014) Pathogenesis and prevention of rheumatic disease: focus on preclinical RA and SLE. *Nature reviews. Rheumatology*, 10, 212-228.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. and Sawaya, B. E. (2009) Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 29, 313-326.
- Dorner, T., Giesecke, C. and Lipsky, P. E. (2011) Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis research & therapy*, 13, 243.
- Draghici, S., Khatri, P., Eklund, A. C. and Szallasi, Z. (2006) Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends in genetics : TIG*, 22, 101-109.
- Dubois, M. F., Nguyen, V. T., Bellier, S. and Bensaude, O. (1994) Inhibitors of transcription such as 5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole and isoquinoline sulfonamide derivatives (H-8 and H-7) promote dephosphorylation of the carboxyl-terminal domain of RNA polymerase II largest subunit. *The Journal of biological chemistry*, 269, 13331-13336.
- Dunn, M. J. *e. a.* (1986) *Electrophoresis '86: proceedings of the 5. Meeting of the International Electrophoresis Society, London 1986*, VCH, Weinheim
- Elzner, S., Schmidt, D., Schollmeyer, D., Erkel, G., Anke, T., Kleinert, H., Forstermann, U. and Kunz, H. (2008) Inhibitors of inducible NO synthase expression: total synthesis of (S)-curvularin and its ring homologues. *ChemMedChem*, 3, 924-939.
- Emlen, W., Niebur, J. and Kadera, R. (1994) Accelerated in vitro apoptosis of lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*, 152, 3685-3692.
- Engels, B., Jannot, G., Remenyi, J., Simard, M. J. and Hutvagner, G. (2012) Polypyrimidine tract binding protein (hnRNP I) is possibly a conserved modulator of miRNA-mediated gene regulation. *PloS one*, 7, e33144.
- Engler, J. B., Undeutsch, R., Kloke, L., Rosenberger, S., Backhaus, M., Schneider, U., Egerer, K., Dragun, D., Hofmann, J., Huscher, D., Burmester, G. R., Humrich, J. Y., Enghard, P. and Riemekasten, G. (2011) Unmasking of autoreactive CD4 T cells by depletion of CD25 regulatory T cells in systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*, 70, 2176-2183.
- Erkel, G., Belahmer, H., Serwe, A., Anke, T., Kunz, H., Kolshorn, H., Liermann, J. and Opatz, T. (2008) Oxacyclododecindione, a novel inhibitor of IL-4 signaling from *Exserohilum rostratum*. *The Journal of antibiotics*, 61, 285-290.
- Erkmann, J. A. and Kutay, U. (2004) Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Experimental cell research*, 296, 12-20.
- Estler, C.-J., Schmidt, H. and Allendörfer, J. (2007) *Pharmakologie und Toxikologie für Studium und Praxis ; mit 281 Tabellen*, Schattauer, Stuttgart.
- Evans, W. E. and Relling, M. V. (1999) Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*, 286, 487-491.
- Fan, X., Oertli, B. and Wuthrich, R. P. (1997) Up-regulation of tubular epithelial interleukin-12 in autoimmune MRL-Fas(lpr) mice with renal injury. *Kidney international*, 51, 79-86.
- Ferucci, E. D., Johnston, J. M., Gaddy, J. R., Sumner, L., Posever, J. O., Choromanski, T. L., Gordon, C., Lim, S. S. and Helmick, C. G. (2014) Prevalence and incidence of systemic

- lupus erythematosus in a population-based registry of American Indian and Alaska Native people, 2007-2009. *Arthritis & rheumatology*.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N. and Sonenberg, N. (2008) Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*, 9, 102-114.
- Firestein, G. S. (2003) Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, 423, 356-361.
- Fischer, D. and Breitenbach, J. (2013) *Die Pharmaindustrie Einblick; Durchblick; Perspektiven*, Imprint: Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Fisher, D. E., Reeves, W. H., Wisniewolski, R., Lahita, R. G. and Chiorazzi, N. (1985) Temporal shifts from Sm to ribonucleoprotein reactivity in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 28, 1348-1355.
- Freudlsperger, C., Bian, Y., Contag Wise, S., Burnett, J., Coupar, J., Yang, X., Chen, Z. and Van Waes, C. (2013) TGF-beta and NF-kappaB signal pathway cross-talk is mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers. *Oncogene*, 32, 1549-1559.
- Fugger, L. and Svejgaard, A. (2000) Association of MHC and rheumatoid arthritis. HLA-DR4 and rheumatoid arthritis: studies in mice and men. *Arthritis research*, 2, 208-211.
- Funauchi, M., Sugishima, H., Minoda, M. and Horiuchi, A. (1991) Serum level of interferon-gamma in autoimmune diseases. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 164, 259-267.
- Gabriel, S. E. (2008) Cardiovascular morbidity and mortality in rheumatoid arthritis. *The American journal of medicine*, 121, S9-14.
- Gerondakis, S. and Siebenlist, U. (2010) Roles of the NF-kappaB pathway in lymphocyte development and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2, a000182.
- Ginzler, E. M., Dooley, M. A., Aranow, C., Kim, M. Y., Buyon, J., Merrill, J. T., Petri, M., Gilkeson, G. S., Wallace, D. J., Weisman, M. H. and Appel, G. B. (2005) Mycophenolate mofetil or intravenous cyclophosphamide for lupus nephritis. *The New England journal of medicine*, 353, 2219-2228.
- Gomez, D., Correa, P. A., Gomez, L. M., Cadena, J., Molina, J. F. and Anaya, J. M. (2004) Th1/Th2 cytokines in patients with systemic lupus erythematosus: is tumor necrosis factor alpha protective? *Seminars in arthritis and rheumatism*, 33, 404-413.
- Gracias, D. T. and Katsikis, P. D. (2011) MicroRNAs: key components of immune regulation. *Adv Exp Med Biol*, 780, 15-26.
- Gui, T., Sun, Y., Shimokado, A. and Muragaki, Y. (2012) The Roles of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in TGF-beta-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Journal of signal transduction*, 2012, 289243.
- Haas, C., Ryffel, B. and Le Hir, M. (1997) IFN-gamma is essential for the development of autoimmune glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *Journal of immunology*, 158, 5484-5491.
- Haga, H. J., Brun, J. G., Berntzen, H. B., Cervera, R., Khamashta, M. and Hughes, G. R. (1993) Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus*, 2, 47-50.
- Halbeisen, R. E., Galgano, A., Scherrer, T. and Gerber, A. P. (2007) Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 798-813.
- Halbeisen, R. E., Galgano, A., Scherrer, T. and Gerber, A. P. (2008) Post-transcriptional gene regulation: from genome-wide studies to principles. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 65, 798-813.
- Hamilton, C. D. (2004) Infectious complications of treatment with biologic agents. *Current opinion in rheumatology*, 16, 393-398.
- Han, S., Guthridge, J. M., Harley, I. T., Sestak, A. L., Kim-Howard, X., Kaufman, K. M., Namjou, B., Deshmukh, H., Bruner, G., Espinoza, L. R., Gilkeson, G. S., Harley, J. B., James, J. A. and Nath, S. K. (2008) Osteopontin and systemic lupus erythematosus association: a probable gene-gender interaction. *PloS one*, 3, e0001757.
- Han, W. K., Bailly, V., Abichandani, R., Thadhani, R. and Bonventre, J. V. (2002) Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney international*, 62, 237-244.
- Han, Z., Boyle, D. L., Manning, A. M. and Firestein, G. S. (1998) AP-1 and NF-kappaB regulation in rheumatoid arthritis and murine collagen-induced arthritis. *Autoimmunity*, 28, 197-208.
- Hang, L., Theofilopoulos, A. N. and Dixon, F. J. (1982) A spontaneous rheumatoid arthritis-like disease in MRL/l mice. *The Journal of experimental medicine*, 155, 1690-1701.

- Henke, J., Erkel, G., Brochhausen, C., Kleinert, H., Schwarting, A., Menke, J. and Pautz, A. (2014) The fungal lactone oxacyclododecindione is a potential new therapeutic substance in the treatment of lupus-associated kidney disease. *Kidney international*.
- Hepburn, A. L., Mason, J. C. and Davies, K. A. (2004) Expression of Fcγ and complement receptors on peripheral blood monocytes in systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 43, 547-554.
- Herrera-Esparza, R., Barbosa-Cisneros, O., Villalobos-Hurtado, R. and Avalos-Diaz, E. (1998) Renal expression of IL-6 and TNFα genes in lupus nephritis. *Lupus*, 7, 154-158.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) The ubiquitin system. *Annual review of biochemistry*, 67, 425-479.
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. and Griffith, R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/technology*, 10, 413-417.
- Hill, R. J., Dabbagh, K., Phippard, D., Li, C., Suttman, R. T., Welch, M., Papp, E., Song, K. W., Chang, K. C., Leaffer, D., Kim, Y. N., Roberts, R. T., Zabka, T. S., Aud, D., Dal Porto, J., Manning, A. M., Peng, S. L., Goldstein, D. M. and Wong, B. R. (2008) Pamapimod, a novel p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor: preclinical analysis of efficacy and selectivity. *J Pharmacol Exp Ther*, 327, 610-619.
- Hitti, E., Iakovleva, T., Brook, M., Deppenmeier, S., Gruber, A. D., Radzioch, D., Clark, A. R., Blackshear, P. J., Kotlyarov, A. and Gaestel, M. (2006) Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2 regulates tumor necrosis factor mRNA stability and translation mainly by altering tristetraprolin expression, stability, and binding to adenine/uridine-rich element. *Molecular and cellular biology*, 26, 2399-2407.
- Hochberg, M. C. (1997) Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 40, 1725.
- Hollander, A. A., van Rooij, J., Lentjes, G. W., Arbouw, F., van Bree, J. B., Schoemaker, R. C., van Es, L. A., van der Woude, F. J. and Cohen, A. F. (1995) The effect of grapefruit juice on cyclosporine and prednisone metabolism in transplant patients. *Clinical pharmacology and therapeutics*, 57, 318-324.
- Holmdahl, R., Bockermann, R., Backlund, J. and Yamada, H. (2002) The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice--a model for rheumatoid arthritis. *Ageing research reviews*, 1, 135-147.
- Holmdahl, R., Jansson, L., Andersson, M. and Jonsson, R. (1992) Genetic, hormonal and behavioural influence on spontaneously developing arthritis in normal mice. *Clinical and experimental immunology*, 88, 467-472.
- Holmdahl, R., Jansson, L., Larsson, E., Rubin, K. and Klareskog, L. (1986) Homologous type II collagen induces chronic and progressive arthritis in mice. *Arthritis and rheumatism*, 29, 106-113.
- Horwitz, D. A. (2008) Regulatory T cells in systemic lupus erythematosus: past, present and future. *Arthritis research & therapy*, 10, 227.
- Hrycek, E., Franek, A., Blaszcak, E., Dworak, J. and Hrycek, A. (2013) Serum levels of selected chemokines in systemic lupus erythematosus patients. *Rheumatology international*, 33, 2423-2427.
- Hsu, S. M., Raine, L. and Fanger, H. (1981) Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem*, 29, 577-580.
- Hughes, T. R. (2011) *A handbook of transcription factors*, Springer, Dordrecht [u.a.].
- Ichiyama, K., Yoshida, H., Wakabayashi, Y., Chinen, T., Saeki, K., Nakaya, M., Takaesu, G., Hori, S., Yoshimura, A. and Kobayashi, T. (2008) Foxp3 inhibits RORγ-mediated IL-17A mRNA transcription through direct interaction with RORγ. *The Journal of biological chemistry*, 283, 17003-17008.
- Ivanenkov, Y. A., Balakin, K. V. and Lavrovsky, Y. (2011) Small molecule inhibitors of NF-κB and JAK/STAT signal transduction pathways as promising anti-inflammatory therapeutics. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 11, 55-78.
- Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S. and Ishigame, H. (2008) The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunological reviews*, 226, 57-79.
- Iwata, Y., Bostrom, E. A., Menke, J., Rabacal, W. A., Morel, L., Wada, T. and Kelley, V. R. (2012) Aberrant macrophages mediate defective kidney repair that triggers nephritis in lupus-susceptible mice. *Journal of immunology*, 188, 4568-4580.

- Iwata, Y., Wada, T., Furuichi, K., Sakai, N., Matsushima, K., Yokoyama, H. and Kobayashi, K. (2003) p38 Mitogen-activated protein kinase contributes to autoimmune renal injury in MRL-Fas lpr mice. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 14, 57-67.
- Jansen, R. P. (2001) mRNA localization: message on the move. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 2, 247-256.
- Jastrzebska, M., Czok, M. E. and Guzik, P. (2013) Autoimmune diseases, their pharmacological treatment and the cardiovascular system. *Cardiology journal*, 20, 569-576.
- Jego, G., Palucka, A. K., Blanck, J. P., Chalouni, C., Pascual, V. and Banchereau, J. (2003) Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, 19, 225-234.
- Jiang, Z., Sui, T. and Wang, B. (2010) Relationships between MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels and their pathogenesis in patients with lupus nephritis. *Rheumatology international*, 30, 1219-1226.
- Jin, N., Wang, Q., Zhang, X., Jiang, D., Cheng, H. and Zhu, K. (2011) The selective p38 mitogen-activated protein kinase inhibitor, SB203580, improves renal disease in MRL/lpr mouse model of systemic lupus. *International immunopharmacology*, 11, 1319-1326.
- Jost, S. A., Tseng, L. C., Matthews, L. A., Vasquez, R., Zhang, S., Yancey, K. B. and Chong, B. F. (2014) IgG, IgM, and IgA antinuclear antibodies in discoid and systemic lupus erythematosus patients. *TheScientificWorldJournal*, 2014, 171028.
- Ju, J. H., Yoon, S. H., Kang, K. Y., Kim, I. J., Kwok, S. K., Park, S. H., Kim, H. Y., Lee, W. C. and Cho, C. S. (2014) Prevalence of Systemic Lupus Erythematosus in South Korea: An Administrative Database Study. *Journal of epidemiology / Japan Epidemiological Association*.
- Kalluri, R. and Neilson, E. G. (2003) Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *The Journal of clinical investigation*, 112, 1776-1784.
- Kariuki, S. N., Moore, J. G., Kirou, K. A., Crow, M. K., Utset, T. O. and Niewold, T. B. (2009) Age- and gender-specific modulation of serum osteopontin and interferon-alpha by osteopontin genotype in systemic lupus erythematosus. *Genes and immunity*, 10, 487-494.
- Katagiri, Y., Mori, K., Hara, T., Tanaka, K., Murakami, M. and Uede, T. (1995) Functional analysis of the osteopontin molecule. *Ann N Y Acad Sci*, 760, 371-374.
- Katsiari, C. G., Liossis, S. N., Dimopoulos, A. M., Charalambopoulo, D. V., Mavrikakis, M. and Sfikakis, P. P. (2002) CD40L overexpression on T cells and monocytes from patients with systemic lupus erythematosus is resistant to calcineurin inhibition. *Lupus*, 11, 370-378.
- Katsiari, C. G., Liossis, S. N. and Sfikakis, P. P. (2010) The pathophysiologic role of monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus: a reappraisal. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 39, 491-503.
- Kavai, M. and Szegedi, G. (2007) Immune complex clearance by monocytes and macrophages in systemic lupus erythematosus. *Autoimmunity reviews*, 6, 497-502.
- Kawano, Y., Noma, T., Kou, K., Yoshizawa, I. and Yata, J. (1995) Regulation of human IgG subclass production by cytokines: human IgG subclass production enhanced differentially by interleukin-6. *Immunology*, 84, 278-284.
- Kelley, V. E. and Roths, J. B. (1985) Interaction of mutant lpr gene with background strain influences renal disease. *Clinical immunology and immunopathology*, 37, 220-229.
- Kelly, C. and Hamilton, J. (2007) What kills patients with rheumatoid arthritis? *Rheumatology*, 46, 183-184.
- Khabar, K. S. (2010) Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67, 2937-2955.
- Kim, H. Y., Kim, W. U., Cho, M. L., Lee, S. K., Youn, J., Kim, S. I., Yoo, W. H., Park, J. H., Min, J. K., Lee, S. H., Park, S. H. and Cho, C. S. (1999) Enhanced T cell proliferative response to type II collagen and synthetic peptide CII (255-274) in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 42, 2085-2093.
- Kim, S. I., Kwak, J. H., Zachariah, M., He, Y., Wang, L. and Choi, M. E. (2007) TGF-beta-activated kinase 1 and TAK1-binding protein 1 cooperate to mediate TGF-beta1-induced MKK3-p38 MAPK activation and stimulation of type I collagen. *American journal of physiology. Renal physiology*, 292, F1471-1478.
- Kitching, A. R., Holdsworth, S. R. and Tipping, P. G. (2000) Crescentic glomerulonephritis-a manifestation of a nephritogenic Th1 response? *Histology and histopathology*, 15, 993-1003.

- Klareskog, L., Malmstrom, V., Lundberg, K., Padyukov, L. and Alfredsson, L. (2011) Smoking, citrullination and genetic variability in the immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Seminars in immunology*, 23, 92-98.
- Klippel, J. H., Crofford, L. J., Stone, J. H., White, P. H. and Stone, J. H. (2008) *Primer on the Rheumatic Diseases*, Springer New York, New York, NY.
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A. and Thomm, M. (2007) *Genetik*, Pearson Studium, München [u.a.].
- Kohanbash, G. and Okada, H. (2012) MicroRNAs and STAT interplay. *Seminars in cancer biology*, 22, 70-75.
- Krüger, K., Wollenhaupt, J., Albrecht, K., Alten, R., Backhaus, M., Baerwald, C., Bolten, W., Braun, J., Burkhardt, H., Burmester, G., Gaubitz, M., Gause, A., Gromnica-Ihle, E., Kellner, H., Kuipers, J., Krause, A., Lorenz, H.-M., Manger, B., Nüßlein, H., Pott, H.-G., Rubbert-Roth, A., Schneider, M., Specker, C., Schulze-Koops, H., Tony, H.-P., Wassenberg, S. and U., M.-L. (2012) S1-Leitlinie der DGRh zur sequenziellen medikamentösen Therapie der rheumatoiden Arthritis 2012- Adaptierte EULAR-Empfehlungen und aktualisierter Therapiealgorithmus. *Zeitschrift für Rheumatologie* 71, 592-603.
- Kuan, A. P. and Cohen, P. L. (2005) p53 is required for spontaneous autoantibody production in B6/lpr lupus mice. *European journal of immunology*, 35, 1653-1660.
- Kyriakis, J. M. and Avruch, J. (2012) Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiological reviews*, 92, 689-737.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
- Lahita, R. G. (2011) *Systemic lupus erythematosus*, Academic Press Inc, San Diego.
- Lan, H. Y. (2003) Tubular epithelial-myofibroblast transdifferentiation mechanisms in proximal tubule cells. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 12, 25-29.
- Langrish, C. L., McKenzie, B. S., Wilson, N. J., de Waal Malefyt, R., Kastelein, R. A. and Cua, D. J. (2004) IL-12 and IL-23: master regulators of innate and adaptive immunity. *Immunological reviews*, 202, 96-105.
- Lapointe, J. and Brakier-Gingras, L. (2003) *Translation mechanisms*, Eurekah.com : Landes Bioscience ; Kluwer Academic/Plenum Publishers, Georgetown, Tex. New York.
- Lard, L. R., Roep, B. O., Verburgh, C. A., Zwinderman, A. H. and Huizinga, T. W. (2002) Elevated IL-16 levels in patients with systemic lupus erythematosus are associated with disease severity but not with genetic susceptibility to lupus. *Lupus*, 11, 181-185.
- Laufer, S., Gay, S. and Brune, K. (2002) *Rheumatische Erkrankungen und Entzündung von den molekularen Grundlagen zur medikamentösen Therapie ; 26 Tabellen*, Thieme, Stuttgart.
- Lee, P. Y., Li, Y., Richards, H. B., Chan, F. S., Zhuang, H., Narain, S., Butfiloski, E. J., Sobel, E. S., Reeves, W. H. and Segal, M. S. (2007) Type I interferon as a novel risk factor for endothelial progenitor cell depletion and endothelial dysfunction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 56, 3759-3769.
- Lee, S., Kaneko, H., Sekigawa, I., Tokano, Y., Takasaki, Y. and Hashimoto, H. (1998) Circulating interleukin-16 in systemic lupus erythematosus. *British journal of rheumatology*, 37, 1334-1337.
- Lenda, D. M., Stanley, E. R. and Kelley, V. R. (2004) Negative role of colony-stimulating factor-1 in macrophage, T cell, and B cell mediated autoimmune disease in MRL-Fas(lpr) mice. *Journal of immunology*, 173, 4744-4754.
- Lenz, O., Elliot, S. J. and Stetler-Stevenson, W. G. (2000) Matrix metalloproteinases in renal development and disease. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 11, 574-581.
- Leshkowitz, D., Horn-Saban, S., Parmet, Y. and Feldmesser, E. (2013) Differences in microRNA detection levels are technology and sequence dependent. *Rna*, 19, 527-538.
- Levo, Y. and Pick, A. I. (1974) The significance of C3 and C4 complement levels in lupus nephritis. *International urology and nephrology*, 6, 233-238.
- Li, Y., Gorelik, G., Strickland, F. M. and Richardson, B. C. (2014) Oxidative Stress, T Cell DNA Methylation and Lupus. *Arthritis & rheumatology*.
- Li, Y., Lee, P. Y. and Reeves, W. H. (2010) Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 58, 355-364.



- Li, Y., Lee, P. Y., Sobel, E. S., Narain, S., Satoh, M., Segal, M. S., Reeves, W. H. and Richards, H. B. (2009) Increased expression of FcγRI/CD64 on circulating monocytes parallels ongoing inflammation and nephritis in lupus. *Arthritis research & therapy*, 11, R6.
- Li, Y., Li, H., Ni, D. and Weigert, M. (2002) Anti-DNA B cells in MRL/lpr mice show altered differentiation and editing pattern. *The Journal of experimental medicine*, 196, 1543-1552.
- Lim, A. I., Tang, S. C., Lai, K. N. and Leung, J. C. (2013) Kidney injury molecule-1: more than just an injury marker of tubular epithelial cells? *Journal of cellular physiology*, 228, 917-924.
- Linker-Israeli, M., Deans, R. J., Wallace, D. J., Prehn, J., Ozeri-Chen, T. and Klinenberg, J. R. (1991) Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis. *Journal of immunology*, 147, 117-123.
- Linker-Israeli, M., Quismorio, F. P., Jr. and Horwitz, D. A. (1990) CD8+ lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus sustain, rather than suppress, spontaneous polyclonal IgG production and synergize with CD4+ cells to support autoantibody synthesis. *Arthritis and rheumatism*, 33, 1216-1225.
- Lit, L. C., Wong, C. K., Tam, L. S., Li, E. K. and Lam, C. W. (2006) Raised plasma concentration and ex vivo production of inflammatory chemokines in patients with systemic lupus erythematosus. *Annals of the rheumatic diseases*, 65, 209-215.
- Liu, D., Zhao, H., Zhao, S. and Wang, X. (2014) MicroRNA expression profiles of peripheral blood mononuclear cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Acta histochemica*.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. and Parker, R. (2005) MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature cell biology*, 7, 719-723.
- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-ΔΔC<sub>T</sub></sup> Method. *Methods*, 25, 402-408.
- Llorente, L., Richaud-Patin, Y., Wijdenes, J., Alcocer-Varela, J., Maillot, M. C., Durand-Gasselin, I., Fourrier, B. M., Galanaud, P. and Emilie, D. (1993) Spontaneous production of interleukin-10 by B lymphocytes and monocytes in systemic lupus erythematosus. *European cytokine network*, 4, 421-427.
- Loser, K., Vogl, T., Voskort, M., Lueken, A., Kupas, V., Nacken, W., Klenner, L., Kuhn, A., Foell, D., Sorokin, L., Luger, T. A., Roth, J. and Beissert, S. (2010) The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nature medicine*, 16, 713-717.
- Lourenco, E. V., Procaccini, C., Ferrera, F., Iikuni, N., Singh, R. P., Filaci, G., Matarese, G., Shi, F. D., Brahn, E., Hahn, B. H. and La Cava, A. (2009) Modulation of p38 MAPK activity in regulatory T cells after tolerance with anti-DNA Ig peptide in (NZB x NZW)F1 lupus mice. *Journal of immunology*, 182, 7415-7421.
- Lu, M. M., Wang, J., Pan, H. F., Chen, G. M., Li, J., Cen, H., Feng, C. C. and Ye, D. Q. (2012) Increased serum RANTES in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology international*, 32, 1231-1233.
- Luijten, R. K., Fritsch-Stork, R. D., Bijlsma, J. W. and Derksen, R. H. (2013) The use of glucocorticoids in systemic lupus erythematosus. After 60 years still more an art than science. *Autoimmunity reviews*, 12, 617-628.
- Lund, F. E. (2008) Cytokine-producing B lymphocytes-key regulators of immunity. *Current opinion in immunology*, 20, 332-338.
- Lynch, T. and Price, A. (2007) The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. *American family physician*, 76, 391-396.
- Lyssuk, E. Y., Torgashina, A. V., Soloviev, S. K., Nassonov, E. L. and Bykovskaia, S. N. (2007) Reduced number and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FoxP3<sup>+</sup> regulatory T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Adv Exp Med Biol*, 601, 113-119.
- Ma, R., Cui, Z., Hu, S. Y., Jia, X. Y., Yang, R., Zheng, X., Ao, J., Liu, G., Liao, Y. H. and Zhao, M. H. (2014) The alternative pathway of complement activation may be involved in the renal damage of human anti-glomerular basement membrane disease. *PloS one*, 9, e91250.
- Ma, X. and Liu, Q. (2013) MicroRNAs in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *International journal of rheumatic diseases*, 16, 115-121.
- Madigan, M. T. (2012) *Brock biology of microorganisms*, Pearson, Boston, Mass. .
- Mahtani, K. R., Brook, M., Dean, J. L., Sully, G., Saklatvala, J. and Clark, A. R. (2001) Mitogen-activated protein kinase p38 controls the expression and posttranslational modification of tristetraprolin, a regulator of tumor necrosis factor alpha mRNA stability. *Molecular and cellular biology*, 21, 6461-6469.

- Mak, A., Cheung, M. W., Chiew, H. J., Liu, Y. and Ho, R. C. (2012) Global trend of survival and damage of systemic lupus erythematosus: meta-analysis and meta-regression of observational studies from the 1950s to 2000s. *Seminars in arthritis and rheumatism*, 41, 830-839.
- Mak, T. W. and Saunders, M. E. (2006) *The immune response: basic and clinical principles*. Elsevier, Amsterdam pp. XX, 1194 S.
- Manitz, M. P., Horst, B., Seeliger, S., Strey, A., Skryabin, B. V., Gunzer, M., Frings, W., Schonlau, F., Roth, J., Sorg, C. and Nacken, W. (2003) Loss of S100A9 (MRP14) results in reduced interleukin-8-induced CD11b surface expression, a polarized microfilament system, and diminished responsiveness to chemoattractants in vitro. *Molecular and cellular biology*, 23, 1034-1043.
- Maradit-Kremers, H., Nicola, P. J., Crowson, C. S., Ballman, K. V. and Gabriel, S. E. (2005) Cardiovascular death in rheumatoid arthritis: a population-based study. *Arthritis and rheumatism*, 52, 722-732.
- Marco, A., Ninova, M. and Griffiths-Jones, S. (2013) Multiple products from microRNA transcripts. *Biochemical Society transactions*, 41, 850-854.
- Martin, M. U. and Resch, K. (2009) *Immunologie [mit] 26 Tabellen*, Ulmer, Stuttgart.
- Mather, J. P. and Roberts, P. E. (1998) *Introduction to cell and tissue culture theory and technique*, Plenum Press, New York [u.a.].
- Mathsson, L., Lampa, J., Mullazehi, M. and Ronnelid, J. (2006) Immune complexes from rheumatoid arthritis synovial fluid induce FcγRIIa dependent and rheumatoid factor correlated production of tumour necrosis factor-α by peripheral blood mononuclear cells. *Arthritis research & therapy*, 8, R64.
- McInnes, I. B. and Schett, G. (2007) Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature reviews. Immunology*, 7, 429-442.
- Meisner, N. C. and Filipowicz, W. (2010) Properties of the regulatory RNA-binding protein HuR and its role in controlling miRNA repression. *Adv Exp Med Biol*, 700, 106-123.
- Menke, J., Rabacal, W. A., Byrne, K. T., Iwata, Y., Schwartz, M. M., Stanley, E. R., Schwarting, A. and Kelley, V. R. (2009) Circulating CSF-1 promotes monocyte and macrophage phenotypes that enhance lupus nephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20, 2581-2592.
- Meyers, J. H., Chakravarti, S., Schlesinger, D., Illes, Z., Waldner, H., Umetsu, S. E., Kenny, J., Zheng, X. X., Umetsu, D. T., DeKruyff, R. H., Strom, T. B. and Kuchroo, V. K. (2005) TIM-4 is the ligand for TIM-1, and the TIM-1-TIM-4 interaction regulates T cell proliferation. *Nature immunology*, 6, 455-464.
- Miao, C. G., Yang, Y. Y., He, X., Huang, C., Huang, Y., Zhang, L., Lv, X. W., Jin, Y. and Li, J. (2013) The emerging role of microRNAs in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Cellular signalling*, 25, 1828-1836.
- Miehle, W. (2003) *Medikamentöse Therapie rheumatischer Erkrankungen 112 Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Miret, C., Molina, R., Filella, X., Garcia-Carrasco, M., Claver, G., Ingelmo, M., Ballesta, A. and Font, J. (2003) Relationship of p53 with other oncogenes, cytokines and systemic lupus erythematosus activity. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 24, 185-188.
- Mok, C. C. (2014) Emerging biological therapies for systemic lupus erythematosus. *Expert opinion on emerging drugs*, 19, 303-322.
- Mok, C. C. and Lau, C. S. (2003) Pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Journal of clinical pathology*, 56, 481-490.
- Molina, M. J., Mayor, A. M., Franco, A. E., Morell, C. A., Lopez, M. A. and Vila, L. M. (2007) Prevalence of systemic lupus erythematosus and associated comorbidities in Puerto Rico. *Journal of clinical rheumatology : practical reports on rheumatic & musculoskeletal diseases*, 13, 202-204.
- Morris, K. V. (2008) *RNA and the regulation of gene expression a hidden layer of complexity*, Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- Mosca, M., Tani, C., Carli, L. and Bombardieri, S. (2011) Glucocorticoids in systemic lupus erythematosus. *Clinical and experimental rheumatology*, 29, S126-129.
- Mosca, M. and van Vollenhoven, R. (2013) New drugs in systemic lupus erythematosus: when to start and when to stop. *Clinical and experimental rheumatology*, 31, S82-85.

- Moulton, V. R. and Tsokos, G. C. (2011) Abnormalities of T cell signaling in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research & therapy*, 13, 207.
- Munk, K. (2010) Taschenlehrbuch Biologie: Genetik, Thieme, Stuttgart.
- Murphy, E. D. and Roths, J. B. (1978) A new congenic inbred strain, MRL/Mp. *Mouse News Letter*, 58, 51.
- Murphy, G. and Isenberg, D. (2013) Effect of gender on clinical presentation in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 52, 2108-2115.
- Mutschler, E. (2013) Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie, der klinischen Pharmakologie und Toxikologie ; mit einführenden Kapiteln in die Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie ; mit 257 Tabellen, Wiss. Verl.-Ges., Stuttgart.
- Nagase, H., Visse, R. and Murphy, G. (2006) Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular research*, 69, 562-573.
- Navarra, S. V., Guzman, R. M., Gallacher, A. E., Hall, S., Levy, R. A., Jimenez, R. E., Li, E. K., Thomas, M., Kim, H. Y., Leon, M. G., Tanasescu, C., Nasonov, E., Lan, J. L., Pineda, L., Zhong, Z. J., Freimuth, W., Petri, M. A. and Group, B.-S. (2011) Efficacy and safety of belimumab in patients with active systemic lupus erythematosus: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 377, 721-731.
- Nazarov, P. V., Reinsbach, S. E., Muller, A., Nicot, N., Philippidou, D., Vallar, L. and Kreis, S. (2013) Interplay of microRNAs, transcription factors and target genes: linking dynamic expression changes to function. *Nucleic Acids Res*, 41, 2817-2831.
- Nguyen-Chi, M. and Morello, D. (2008) [Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation]. *Medecine sciences : M/S*, 24, 290-296.
- Nicolas, F. E., Pais, H., Schwach, F., Lindow, M., Kauppinen, S., Moulton, V. and Dalmay, T. (2008) Experimental identification of microRNA-140 targets by silencing and overexpressing miR-140. *Rna*, 14, 2513-2520.
- Nordling, C., Karlsson-Parra, A., Jansson, L., Holmdahl, R. and Klareskog, L. (1992) Characterization of a spontaneously occurring arthritis in male DBA/1 mice. *Arthritis and rheumatism*, 35, 717-722.
- Noubade, R., Kremontsov, D. N., Del Rio, R., Thornton, T., Nagaleekar, V., Saligrama, N., Spitzack, A., Spach, K., Sabio, G., Davis, R. J., Rincon, M. and Teuscher, C. (2011) Activation of p38 MAPK in CD4 T cells controls IL-17 production and autoimmune encephalomyelitis. *Blood*, 118, 3290-3300.
- Nowling, T. K. and Gilkeson, G. S. (2011) Mechanisms of tissue injury in lupus nephritis. *Arthritis research & therapy*, 13, 250.
- Nozaki, Y., Kinoshita, K., Yano, T., Shiga, T., Hino, S., Niki, K., Kishimoto, K., Funauchi, M. and Matsumura, I. (2014) Estimation of kidney injury molecule-1 (Kim-1) in patients with lupus nephritis. *Lupus*.
- Obermoser, G. and Pascual, V. (2010) The interferon-alpha signature of systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 19, 1012-1019.
- Ogu, C. C. and Maxa, J. L. (2000) Drug interactions due to cytochrome P450. *Proceedings*, 13, 421-423.
- Onishi, R. M. and Gaffen, S. L. (2010) Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 129, 311-321.
- Organ, S. L. and Tsao, M. S. (2011) An overview of the c-MET signaling pathway. *Therapeutic advances in medical oncology*, 3, S7-S19.
- Ortega, L. M., Schultz, D. R., Lenz, O., Pardo, V. and Contreras, G. N. (2010) Review: Lupus nephritis: pathologic features, epidemiology and a guide to therapeutic decisions. *Lupus*, 19, 557-574.
- Pais, H., Nicolas, F. E., Soond, S. M., Swingler, T. E., Clark, I. M., Chantry, A., Moulton, V. and Dalmay, T. (2010) Analyzing mRNA expression identifies Smad3 as a microRNA-140 target regulated only at protein level. *Rna*, 16, 489-494.
- Pan, W., Zhu, S., Yuan, M., Cui, H., Wang, L., Luo, X., Li, J., Zhou, H., Tang, Y. and Shen, N. (2010) MicroRNA-21 and microRNA-148a contribute to DNA hypomethylation in lupus CD4+ T cells by directly and indirectly targeting DNA methyltransferase 1. *Journal of immunology*, 184, 6773-6781.
- Patel, P. S. (2008) Gene Expression Profiling to Understand the Alterations in the Monocyte Compartment of Pediatric Systemic Lupus Erythematosus In Department of Biomedical Studies Vol. Doctor of Philosophy Baylor University.

- Pautz, A., Linker, K., Hubrich, T., Korhonen, R., Altenhofer, S. and Kleinert, H. (2006) The polypyrimidine tract-binding protein (PTB) is involved in the post-transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase expression. *The Journal of biological chemistry*, 281, 32294-32302.
- Peer, C. J., Sissung, T. M. and Figg, W. D. (2011) CHIP and gp78-mediated ubiquitination of CYP3A4: Implications for the pharmacology of anticancer agents. *Cancer biology & therapy*, 11, 549-551.
- Pepper, R. J., Hamour, S., Chavele, K. M., Todd, S. K., Rasmussen, N., Flint, S., Lyons, P. A., Smith, K. G., Pusey, C. D., Cook, H. T. and Salama, A. D. (2013) Leukocyte and serum S100A8/S100A9 expression reflects disease activity in ANCA-associated vasculitis and glomerulonephritis. *Kidney international*, 83, 1150-1158.
- Perry, E., Tsruya, R., Levitsky, P., Pomp, O., Taller, M., Weisberg, S., Parris, W., Kulkarni, S., Malovani, H., Pawson, T., Shpungin, S. and Nir, U. (2004) TMF/ARA160 is a BC-box-containing protein that mediates the degradation of Stat3. *Oncogene*, 23, 8908-8919.
- Pollard, K. M., Cauvi, D. M., Toomey, C. B., Morris, K. V. and Kono, D. H. (2013) Interferon-gamma and systemic autoimmunity. *Discovery medicine*, 16, 123-131.
- Pradhan, V., Patwardhan, M. and Ghosh, K. (2008) Fc gamma receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus and their correlation with the clinical severity of the disease. *Indian journal of human genetics*, 14, 77-81.
- Radisky, E. S. and Radisky, D. C. (2010) Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Journal of mammary gland biology and neoplasia*, 15, 201-212.
- Ramachandran, K., Saikumar, J., Bijol, V., Koyner, J. L., Qian, J., Betensky, R. A., Waikar, S. S. and Vaidya, V. S. (2013) Human miRNome profiling identifies microRNAs differentially present in the urine after kidney injury. *Clinical chemistry*, 59, 1742-1752.
- Reichl, F.-X. (2007) *Taschenatlas der Pharmakologie und Toxikologie für Zahnmediziner*, Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Reilly, C. M., Olgun, S., Goodwin, D., Gogal, R. M., Jr., Santo, A., Romesburg, J. W., Ahmed, S. A. and Gilkeson, G. S. (2006) Interferon regulatory factor-1 gene deletion decreases glomerulonephritis in MRL/lpr mice. *European journal of immunology*, 36, 1296-1308.
- Rekvig, O. P. and Van der Vlag, J. (2014) The pathogenesis and diagnosis of systemic lupus erythematosus: still not resolved. *Seminars in immunopathology*, 36, 301-311.
- Remuzzi, G., Ruggenenti, P. and Benigni, A. (1997) Understanding the nature of renal disease progression. *Kidney international*, 51, 2-15.
- Rennert, P. D. (2011) Novel roles for TIM-1 in immunity and infection. *Immunology letters*, 141, 28-35.
- Ritchlin, C. T. (2004) Mechanisms of erosion in rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 31, 1229-1237.
- Robak, E., Sysa-Jedrzejewska, A., Dziankowska, B., Torzecka, D., Chojnowski, K. and Robak, T. (1998) Association of interferon gamma, tumor necrosis factor alpha and interleukin 6 serum levels with systemic lupus erythematosus activity. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*, 46, 375-380.
- Romanelli, M. G., Diani, E. and Lievens, P. M. (2013) New insights into functional roles of the polypyrimidine tract-binding protein. *International journal of molecular sciences*, 14, 22906-22932.
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G. and Mantovani, A. (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, 6, 315-325.
- Romanoski, C. E., Che, N., Yin, F., Mai, N., Pouldar, D., Civelek, M., Pan, C., Lee, S., Vakili, L., Yang, W. P., Kayne, P., Mungrue, I. N., Araujo, J. A., Berliner, J. A. and Lusis, A. J. (2011) Network for activation of human endothelial cells by oxidized phospholipids: a critical role of heme oxygenase 1. *Circulation research*, 109, e27-41.
- Rose, N. R. (1978) Genetic control of autoimmune disease proceedings of the Workshop on Genetic Control of Autoimmune Disease held in Bloomfield Hills, Michigan, U.S.A. on July 10 - 12, 1978, Elsevier/North-Holland, New York [u.a.].
- Rudolph, K., Serwe, A. and Erkel, G. (2013) Inhibition of TGF-beta signaling by the fungal lactones (S)-curvularin, dehydrocurvularin, oxacyclododecindione and galiellalactone. *Cytokine*, 61, 285-296.

- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning : a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Sanduja, S., Blanco, F. F., Young, L. E., Kaza, V. and Dixon, D. A. (2012) The role of tristetraprolin in cancer and inflammation. *Frontiers in bioscience*, 17, 174-188.
- Sanz, I. (2014) Rationale for B cell targeting in SLE. *Seminars in immunopathology*, 36, 365-375.
- Sapkota, G. P. (2013) The TGFbeta-induced phosphorylation and activation of p38 mitogen-activated protein kinase is mediated by MAP3K4 and MAP3K10 but not TAK1. *Open biology*, 3, 130067.
- Sasaki, M., Takeda, E., Takano, K., Yomogida, K., Katahira, J. and Yoneda, Y. (2005) Molecular cloning and functional characterization of mouse Nxf family gene products. *Genomics*, 85, 641-653.
- Sawicka, K., Bushell, M., Spriggs, K. A. and Willis, A. E. (2008) Polypyrimidine-tract-binding protein: a multifunctional RNA-binding protein. *Biochemical Society transactions*, 36, 641-647.
- Scheinecker, C., Bonelli, M. and Smolen, J. S. (2010) Pathogenetic aspects of systemic lupus erythematosus with an emphasis on regulatory T cells. *Journal of autoimmunity*, 35, 269-275.
- Schellekens, G. A., de Jong, B. A., van den Hoogen, F. H., van de Putte, L. B. and van Venrooij, W. J. (1998) Citrulline is an essential constituent of antigenic determinants recognized by rheumatoid arthritis-specific autoantibodies. *The Journal of clinical investigation*, 101, 273-281.
- Schena, F. P. (1999) Cytokine network and resident renal cells in glomerular diseases. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 14 Suppl 1, 22-26.
- Schett, G., Zwerina, J. and Firestein, G. (2008) The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis. *Annals of the rheumatic diseases*, 67, 909-916.
- Schmidt, N. (2009) Analyse des anti-inflammatorischen Pilzmetaboliten S-Curvularin in verschiedenen Modellen der rheumatoiden Arthritis.
- Schwartz, A., Moore, K., Wada, T., Tesch, G., Yoon, H. J. and Kelley, V. R. (1998) IFN-gamma limits macrophage expansion in MRL-Fas(lpr) autoimmune interstitial nephritis: a negative regulatory pathway. *Journal of immunology*, 160, 4074-4081.
- Schwartz, A., Tesch, G., Kinoshita, K., Maron, R., Weiner, H. L. and Kelley, V. R. (1999) IL-12 drives IFN-gamma-dependent autoimmune kidney disease in MRL-Fas(lpr) mice. *Journal of immunology*, 163, 6884-6891.
- Seery, J. P. (2000) IFN-gamma transgenic mice: clues to the pathogenesis of systemic lupus erythematosus? *Arthritis research*, 2, 437-440.
- Sehgal, P. B., Darnell, J. E., Jr. and Tamm, I. (1976) The inhibition by DRB (5,6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole) of hnRNA and mRNA production in HeLa cells. *Cell*, 9, 473-480.
- Sekine, H., Kinser, T. T., Qiao, F., Martinez, E., Paulling, E., Ruiz, P., Gilkeson, G. S. and Tomlinson, S. (2011) The benefit of targeted and selective inhibition of the alternative complement pathway for modulating autoimmunity and renal disease in MRL/lpr mice. *Arthritis and rheumatism*, 63, 1076-1085.
- Serwe, A. (2007) *Hemmung der Angiogenese und Tumorprogression durch Blockierung der TGF-beta-Signaltransduktion durch neue Wirkstoffe isoliert aus Pilzen*, WiKu-Verlag für Wissenschaft und Kultur.
- Shen, H., He, M. M., Liu, H., Wrighton, S. A., Wang, L., Guo, B. and Li, C. (2007) Comparative metabolic capabilities and inhibitory profiles of CYP2D6.1, CYP2D6.10, and CYP2D6.17. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals*, 35, 1292-1300.
- Shen, N., Liang, D., Tang, Y., de Vries, N. and Tak, P. P. (2012) MicroRNAs-novel regulators of systemic lupus erythematosus pathogenesis. *Nature reviews. Rheumatology*, 8, 701-709.
- Shevach, E. M. (2009) Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity*, 30, 636-645.
- Shin, M. S., Lee, N. and Kang, I. (2011) Effector T-cell subsets in systemic lupus erythematosus: update focusing on Th17 cells. *Current opinion in rheumatology*, 23, 444-448.

- Shlomchik, M. J., Craft, J. E. and Mamula, M. J. (2001) From T to B and back again: positive feedback in systemic autoimmune disease. *Nature reviews. Immunology*, 1, 147-153.
- Shoshan, Y., Shapira, I., Toubi, E., Frolkis, I., Yaron, M. and Mevorach, D. (2001) Accelerated Fas-mediated apoptosis of monocytes and maturing macrophages from patients with systemic lupus erythematosus: relevance to in vitro impairment of interaction with iC3b-opsionized apoptotic cells. *Journal of immunology*, 167, 5963-5969.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (1999) The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 284, 1835-1837.
- Silman, A. J., MacGregor, A. J., Thomson, W., Holligan, S., Carthy, D., Farhan, A. and Ollier, W. E. (1993) Twin concordance rates for rheumatoid arthritis: results from a nationwide study. *British journal of rheumatology*, 32, 903-907.
- Silman, A. J. and Pearson, J. E. (2002) Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis research*, 4 Suppl 3, S265-272.
- Singal, D. P., Li, J. and Lei, K. (1999) Genetics of rheumatoid arthritis (RA): two separate regions in the major histocompatibility complex contribute to susceptibility to RA. *Immunology letters*, 69, 301-306.
- Sobol, M., Cali, J. J., Yeager, T., Ma, D., Good, T. and Liu, D. (2006) Novel bioluminescent substrates to measure CYP3A4 activity in cell-based and microsome assays. *Drug Metab Rev*, 38, 60-60.
- Song, L. J., Liu, W. W., Fan, Y. C., Qiu, F., Chen, Q. L., Li, X. F. and Ding, F. (2013) The positive correlations of apolipoprotein E with disease activity and related cytokines in systemic lupus erythematosus. *Diagnostic pathology*, 8, 175.
- Stagakis, E., Bertias, G., Verginis, P., Nakou, M., HatziaPOSTOLOU, M., Kritikos, H., Iliopoulos, D. and Boumpas, D. T. (2011) Identification of novel microRNA signatures linked to human lupus disease activity and pathogenesis: miR-21 regulates aberrant T cell responses through regulation of PDCD4 expression. *Annals of the rheumatic diseases*, 70, 1496-1506.
- Stambe, C., Nikolic-Paterson, D. J., Hill, P. A., Dowling, J. and Atkins, R. C. (2004) p38 Mitogen-activated protein kinase activation and cell localization in human glomerulonephritis: correlation with renal injury. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15, 326-336.
- Stastny, P. (1978) Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. *The New England journal of medicine*, 298, 869-871.
- Steinbakk, M., Naess-Andresen, C. F., Lingaas, E., Dale, I., Brandtzaeg, P. and Fagerhol, M. K. (1990) Antimicrobial actions of calcium binding leucocyte L1 protein, calprotectin. *Lancet*, 336, 763-765.
- Stevenson, C. S., Marshall, L. A. and Morgan, D. W. (2006) *In Vivo Models of Inflammation Volume I*, Birkhäuser Basel, Basel.
- Su, D. L., Lu, Z. M., Shen, M. N., Li, X. and Sun, L. Y. (2012) Roles of pro- and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of SLE. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, 347141.
- Summers, S. A., Steinmetz, O. M., Li, M., Kausman, J. Y., Semple, T., Edgton, K. L., Borza, D. B., Braley, H., Holdsworth, S. R. and Kitching, A. R. (2009) Th1 and Th17 cells induce proliferative glomerulonephritis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20, 2518-2524.
- Sunahori, K., Yamamura, M., Yamana, J., Takasugi, K., Kawashima, M., Yamamoto, H., Chazin, W. J., Nakatani, Y., Yui, S. and Makino, H. (2006) The S100A8/A9 heterodimer amplifies proinflammatory cytokine production by macrophages via activation of nuclear factor kappa B and p38 mitogen-activated protein kinase in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*, 8, R69.
- Tait, A. S., Butts, C. L. and Sternberg, E. M. (2008) The role of glucocorticoids and progestins in inflammatory, autoimmune, and infectious disease. *Journal of leukocyte biology*, 84, 924-931.
- Takemura, T., Yoshioka, K., Murakami, K., Akano, N., Okada, M., Aya, N. and Maki, S. (1994) Cellular localization of inflammatory cytokines in human glomerulonephritis. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 424, 459-464.

- Tan, E. M., Cohen, A. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. and Winchester, R. J. (1982) The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 25, 1271-1277.
- Tan, T. K., Zheng, G., Hsu, T. T., Lee, S. R., Zhang, J., Zhao, Y., Tian, X., Wang, Y., Wang, Y. M., Cao, Q., Wang, Y., Lee, V. W., Wang, C., Zheng, D., Alexander, S. I., Thompson, E. and Harris, D. C. (2013) Matrix metalloproteinase-9 of tubular and macrophage origin contributes to the pathogenesis of renal fibrosis via macrophage recruitment through osteopontin cleavage. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 93, 434-449.
- Taneja, V., Behrens, M., Mangalam, A., Griffiths, M. M., Luthra, H. S. and David, C. S. (2007) New humanized HLA-DR4-transgenic mice that mimic the sex bias of rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 56, 69-78.
- Tateno, S., Kobayashi, Y., Shigematsu, H. and Hiki, Y. (1983) Study of lupus nephritis: its classification and the significance of subendothelial deposits. *The Quarterly journal of medicine*, 52, 311-331.
- Taylor, G. A., Carballo, E., Lee, D. M., Lai, W. S., Thompson, M. J., Patel, D. D., Schenkman, D. I., Gilkeson, G. S., Broxmeyer, H. E., Haynes, B. F. and Blackshear, P. J. (1996) A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency. *Immunity*, 4, 445-454.
- Telles, R. W., Lanna, C. C., Souza, F. L., Rodrigues, L. A., Reis, R. C. and Ribeiro, A. L. (2013) Causes and predictors of death in Brazilian lupus patients. *Rheumatology international*, 33, 467-473.
- Teruel, R., Perez-Sanchez, C., Corral, J., Herranz, M. T., Perez-Andreu, V., Saiz, E., Garcia-Barbera, N., Martinez-Martinez, I., Roldan, V., Vicente, V., Lopez-Pedreria, C. and Martinez, C. (2011) Identification of miRNAs as potential modulators of tissue factor expression in patients with systemic lupus erythematosus and antiphospholipid syndrome. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*, 9, 1985-1992.
- Tesch, G. H., Schwarting, A., Kinoshita, K., Lan, H. Y., Rollins, B. J. and Kelley, V. R. (1999) Monocyte chemoattractant protein-1 promotes macrophage-mediated tubular injury, but not glomerular injury, in nephrotoxic serum nephritis. *The Journal of clinical investigation*, 103, 73-80.
- Thaler, R., Rumpler, M., Spitzer, S., Klaushofer, K. and Varga, F. (2011) Mospd1, a new player in mesenchymal versus epidermal cell differentiation. *Journal of cellular physiology*, 226, 2505-2515.
- Theofilopoulos, A. N., Shawler, D. L., Eisenberg, R. A. and Dixon, F. J. (1980) Splenic immunoglobulin-secreting cells and their regulation in autoimmune mice. *The Journal of experimental medicine*, 151, 446-466.
- Tian, J., Chen, J. W., Gao, J. S., Li, L. and Xie, X. (2013) Resveratrol inhibits TNF-alpha-induced IL-1beta, MMP-3 production in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes via modulation of PI3kinase/Akt pathway. *Rheumatology international*, 33, 1829-1835.
- Tikly, M. and Navarra, S. V. (2008) Lupus in the developing world-is it any different? Best practice & research. *Clinical rheumatology*, 22, 643-655.
- Tokano, Y., Morimoto, S., Kaneko, H., Amano, H., Nozawa, K., Takasaki, Y. and Hashimoto, H. (1999) Levels of IL-12 in the sera of patients with systemic lupus erythematosus (SLE)-relation to Th1- and Th2-derived cytokines. *Clinical and experimental immunology*, 116, 169-173.
- Toong, C., Adelstein, S. and Phan, T. G. (2011) Clearing the complexity: immune complexes and their treatment in lupus nephritis. *International journal of nephrology and renovascular disease*, 4, 17-28.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1992) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*, 24, 145-149.
- Trentham, D. E. (1982) Collagen arthritis as a relevant model for rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 25, 911-916.
- Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A. and Warman, M. L. (2000) Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). *Biotechniques*, 29, 52, 54.
- Tsokos, G. C. (2011) Systemic lupus erythematosus. *The New England journal of medicine*, 365, 2110-2121.

- Tyden, H., Lood, C., Gullstrand, B., Jonsen, A., Nived, O., Sturfelt, G., Truedsson, L., Ivars, F., Leanderson, T. and Bengtsson, A. A. (2013) Increased serum levels of S100A8/A9 and S100A12 are associated with cardiovascular disease in patients with inactive systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 52, 2048-2055.
- Umetsu, S. E., Lee, W. L., McIntire, J. J., Downey, L., Sanjanwala, B., Akbari, O., Berry, G. J., Nagumo, H., Freeman, G. J., Umetsu, D. T. and DeKruyff, R. H. (2005) TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. *Nature immunology*, 6, 447-454.
- Urowitz, M. B., Gladman, D. D., Tom, B. D., Ibanez, D. and Farewell, V. T. (2008) Changing patterns in mortality and disease outcomes for patients with systemic lupus erythematosus. *The Journal of rheumatology*, 35, 2152-2158.
- Urushihara, M., Kagami, S., Kuhara, T., Tamaki, T. and Kuroda, Y. (2002) Glomerular distribution and gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases in human glomerulonephritis. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association*, 17, 1189-1196.
- Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G. and Lipsky, P. E. (2007) Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus. *Journal of immunology*, 178, 2579-2588.
- van den Berg, W. B., Joosten, L. A., Helsen, M. and van de Loo, F. A. (1994) Amelioration of established murine collagen-induced arthritis with anti-IL-1 treatment. *Clinical and experimental immunology*, 95, 237-243.
- van der Velden, A. W. and Thomas, A. A. (1999) The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 31, 87-106.
- van Rooij, E. (2011) The art of microRNA research. *Circulation research*, 108, 219-234.
- van Vollenhoven, R. F., Mosca, M., Bertias, G., Isenberg, D., Kuhn, A., Lerstrom, K., Aringer, M., Bootsma, H., Boumpas, D., Bruce, I. N., Cervera, R., Clarke, A., Costedoat-Chalumeau, N., Czirjak, L., Derksen, R., Dorner, T., Gordon, C., Graninger, W., Houssiau, F., Inanc, M., Jacobsen, S., Jayne, D., Jedryka-Goral, A., Levitsky, A., Levy, R., Mariette, X., Morand, E., Navarra, S., Neumann, I., Rahman, A., Rovinsky, J., Smolen, J., Vasconcelos, C., Voskuyl, A., Voss, A., Zakharova, H., Zoma, A. and Schneider, M. (2014) Treat-to-target in systemic lupus erythematosus: recommendations from an international task force. *Annals of the rheumatic diseases*, 73, 958-967.
- Vieten, M. (2009) Laborwerte verstehen leicht gemacht alle wichtigen Werte von A - Z ; Labordiagnostik der häufigsten Erkrankungen, TRIAS, Stuttgart.
- Visser, H., le Cessie, S., Vos, K., Breedveld, F. C. and Hazes, J. M. (2002) How to diagnose rheumatoid arthritis early: a prediction model for persistent (erosive) arthritis. *Arthritis and rheumatism*, 46, 357-365.
- Voulgari, P. V. and Drosos, A. A. (2008) Catastrophic rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 35, 2062-2063.
- Wallberg-Jonsson, S., Ohman, M. L. and Dahlqvist, S. R. (1997) Cardiovascular morbidity and mortality in patients with seropositive rheumatoid arthritis in Northern Sweden. *The Journal of rheumatology*, 24, 445-451.
- Wang, A., Guilpain, P., Chong, B. F., Chouzenoux, S., Guillevin, L., Du, Y., Zhou, X. J., Lin, F., Fairhurst, A. M., Boudreaux, C., Roux, C., Wakeland, E. K., Davis, L. S., Batteux, F. and Mohan, C. (2010) Dysregulated expression of CXCR4/CXCL12 in subsets of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 62, 3436-3446.
- Wang, G., Kwan, B. C., Lai, F. M., Chow, K. M., Li, P. K. and Szeto, C. C. (2012) Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel biomarkers of fibrosis. *American journal of nephrology*, 36, 412-418.
- Watanabe-Fukunaga, R., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Jenkins, N. A. and Nagata, S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature*, 356, 314-317.
- Watson, M. L., Rao, J. K., Gilkeson, G. S., Ruiz, P., Eicher, E. M., Pisetsky, D. S., Matsuzawa, A., Rochelle, J. M. and Seldin, M. F. (1992) Genetic analysis of MRL-lpr mice: relationship of the Fas apoptosis gene to disease manifestations and renal disease-modifying loci. *The Journal of experimental medicine*, 176, 1645-1656.
- Weening, J. J., D'Agati, V. D., Schwartz, M. M., Seshan, S. V., Alpers, C. E., Appel, G. B., Balow, J. E., Bruijn, J. A., Cook, T., Ferrario, F., Fogo, A. B., Ginzler, E. M., Hebert, L., Hill, G.,



- Hill, P., Jennette, J. C., Kong, N. C., Lesavre, P., Lockshin, M., Looi, L. M., Makino, H., Moura, L. A. and Nagata, M. (2004) The classification of glomerulonephritis in systemic lupus erythematosus revisited. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 15, 241-250.
- Wehling, M. and Diener, H.-C. (2011) *Klinische Pharmakologie 256 Tabellen*, Thieme, Stuttgart [u.a.].
- Wen, X., Zhang, D., Kikuchi, Y., Jiang, Y., Nakamura, K., Xiu, Y., Tsurui, H., Takahashi, K., Abe, M., Ohtsuji, M., Nishimura, H., Takatsu, K., Shirai, T. and Hirose, S. (2004) Transgene-mediated hyper-expression of IL-5 inhibits autoimmune disease but increases the risk of B cell chronic lymphocytic leukemia in a model of murine lupus. *European journal of immunology*, 34, 2740-2749.
- Wessel, D. and Flugge, U. I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, 138, 141-143.
- Whitmarsh, A. J. and Davis, R. J. (1996) Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *Journal of molecular medicine*, 74, 589-607.
- Wild, D. (2013) *The immunoassay handbook theory and applications of ligand binding, ELISA and related techniques*, Elsevier, Amsterdam [u.a.].
- Winzen, R., Thakur, B. K., Dittrich-Breiholz, O., Shah, M., Redich, N., Dhamija, S., Kracht, M. and Holtmann, H. (2007) Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets. *Molecular and cellular biology*, 27, 8388-8400.
- Wong, C. K., Lit, L. C., Tam, L. S., Li, E. K. and Lam, C. W. (2005) Elevation of plasma osteopontin concentration is correlated with disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 44, 602-606.
- Wong, C. K., Lit, L. C., Tam, L. S., Li, E. K., Wong, P. T. and Lam, C. W. (2008) Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clinical immunology*, 127, 385-393.
- Wu, C. C., Hsu, S. C., Shih, H. M. and Lai, M. Z. (2003) Nuclear factor of activated T cells c is a target of p38 mitogen-activated protein kinase in T cells. *Molecular and cellular biology*, 23, 6442-6454.
- Wu, Z. S., Wu, Q., Wang, C. Q., Wang, X. N., Huang, J., Zhao, J. J., Mao, S. S., Zhang, G. H., Xu, X. C. and Zhang, N. (2011) miR-340 inhibition of breast cancer cell migration and invasion through targeting of oncoprotein c-Met. *Cancer*, 117, 2842-2852.
- Xia, X. Q., McClelland, M., Porwollik, S., Song, W., Cong, X. and Wang, Y. (2009) WebArrayDB: cross-platform microarray data analysis and public data repository. *Bioinformatics*, 25, 2425-2429.
- Xing, Q., Wang, B., Su, H., Cui, J. and Li, J. (2012) Elevated Th17 cells are accompanied by FoxP3<sup>+</sup> Treg cells decrease in patients with lupus nephritis. *Rheumatology international*, 32, 949-958.
- Yang, J., Chu, Y., Yang, X., Gao, D., Zhu, L., Yang, X., Wan, L. and Li, M. (2009) Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 60, 1472-1483.
- Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S. and Dong, C. (2007) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells. *The Journal of biological chemistry*, 282, 9358-9363.
- Yang, Y. H., Buckley, M. J. and Speed, T. P. (2001) Analysis of cDNA microarray images. *Briefings in bioinformatics*, 2, 341-349.
- Yasutomo, K. (2003) Pathological lymphocyte activation by defective clearance of self-ligands in systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 42, 214-222.
- Yildirim-Toruner, C. and Diamond, B. (2011) Current and novel therapeutics in the treatment of systemic lupus erythematosus. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127, 303-312; quiz 313-304.
- Yoh, K., Itoh, K., Enomoto, A., Hirayama, A., Yamaguchi, N., Kobayashi, M., Morito, N., Koyama, A., Yamamoto, M. and Takahashi, S. (2001) Nrf2-deficient female mice develop lupus-like autoimmune nephritis. *Kidney international*, 60, 1343-1353.
- Youbare, I., Boire, G., Roy, M., Lugnier, C. and Rouseau, E. (2013) NCS 613 exhibits anti-inflammatory effects on PBMCs from lupus patients by inhibiting p38 MAPK and NF-

- kappaB signalling pathways while reducing proinflammatory cytokine production. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 91, 353-361.
- Yu, H., Nguyen, K., Royce, T., Qian, J., Nelson, K., Snyder, M. and Gerstein, M. (2007) Positional artifacts in microarrays: experimental verification and construction of COP, an automated detection tool. *Nucleic Acids Res*, 35, e8.
- Yu, S. L., Kuan, W. P., Wong, C. K., Li, E. K. and Tam, L. S. (2012) Immunopathological roles of cytokines, chemokines, signaling molecules, and pattern-recognition receptors in systemic lupus erythematosus. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 715190.
- Yung, S. and Chan, T. M. (2012) Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: getting to know the unknown. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 139365.
- Zarubin, T. and Han, J. (2005) Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research*, 15, 11-18.
- Zeidler, H., Michel, B. A., Michel, B., Müller, W., Schilling, F. and Büchi, S. (2009) *Differenzialdiagnose rheumatischer Erkrankungen*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg.
- Zeller, G. C., Hirahashi, J., Schwarting, A., Sharpe, A. H. and Kelley, V. R. (2006) Inducible co-stimulator null MRL-Fas<sup>lpr</sup> mice: uncoupling of autoantibodies and T cell responses in lupus. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 17, 122-130.
- Zhang, X., Chen, X., Hong, Q., Lin, H., Zhu, H., Liu, Q., Wang, J., Xie, Y., Shang, X., Shi, S., Lu, Y. and Yin, Z. (2006) TIMP-1 promotes age-related renal fibrosis through upregulating ICAM-1 in human TIMP-1 transgenic mice. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 61, 1130-1143.
- Zhao, M., New, L., Kravchenko, V. V., Kato, Y., Gram, H., di Padova, F., Olson, E. N., Ulevitch, R. J. and Han, J. (1999) Regulation of the MEF2 family of transcription factors by p38. *Molecular and cellular biology*, 19, 21-30.
- Zhao, S., Wang, Y., Liang, Y., Zhao, M., Long, H., Ding, S., Yin, H. and Lu, Q. (2011a) MicroRNA-126 regulates DNA methylation in CD4<sup>+</sup> T cells and contributes to systemic lupus erythematosus by targeting DNA methyltransferase 1. *Arthritis and rheumatism*, 63, 1376-1386.
- Zhao, W., Liu, M., D'Silva, N. J. and Kirkwood, K. L. (2011b) Tristetraprolin regulates interleukin-6 expression through p38 MAPK-dependent affinity changes with mRNA 3' untranslated region. *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, 31, 629-637.
- Zhu, J., Yamane, H. and Paul, W. E. (2010a) Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*). *Annual review of immunology*, 28, 445-489.
- Zhu, L. J., Yang, X. and Yu, X. Q. (2010b) Anti-TNF-alpha therapies in systemic lupus erythematosus. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 465898.
- Zhu, S., Pan, W., Song, X., Liu, Y., Shao, X., Tang, Y., Liang, D., He, D., Wang, H., Liu, W., Shi, Y., Harley, J. B., Shen, N. and Qian, Y. (2012) The microRNA miR-23b suppresses IL-17-associated autoimmune inflammation by targeting TAB2, TAB3 and IKK-alpha. *Nature medicine*, 18, 1077-1086.
- Zhu, W., Brauchle, M. A., Di Padova, F., Gram, H., New, L., Ono, K., Downey, J. S. and Han, J. (2001) Gene suppression by tristetraprolin and release by the p38 pathway. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 281, L499-508.
- Zubair, A. and Frieri, M. (2013) NF-kappaB and systemic lupus erythematosus: examining the link. *Journal of nephrology*, 26, 953-959.

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden nur die in der Arbeit ausdrücklich benannten Quellen und Hilfsmittel benutzt. Wörtlich oder sinngemäß übernommenes Gedankengut habe ich als solches kenntlich gemacht.

\_\_\_\_\_  
Datum, Ort

\_\_\_\_\_  
Unterschrift

## Publikationen

### Originalarbeiten

- 2014 Bollmann F, Wu Z, Oelze M, Siuda D, Xia N, **Henke J**, Daiber A, Li H, Stumpo DJ, Blackshear PJ, Kleinert H, Pautz A; Endothelial Dysfunction in Tristetraprolin-deficient Mice Is Not Caused by Enhanced Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Expression; *The Journal of biological chemistry*, 289: 15653-15665
- 2014 **Henke J**, Erkel G, Brochhausen C, Kleinert H, Schwarting A, Menke J, Pautz A; The fungal lactone oxacyclododecindione is a potential new therapeutic substance in the treatment of lupus-associated kidney disease; *Kidney International*
- 2013 Casper I, Nowag S, Koch K, Hubrich T, Bollmann F, **Henke J**, Schmitz K, Kleinert H, Pautz A; Posttranscriptional regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression by the cytosolic poly(A)-binding protein (PABP); *Nitric Oxide*, 33:6-17
- 2012 **Henke J**, Bollmann F, Casper I (contributed equally), Pautz A; qRT-PCR: a method and its difficulties; *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, Vol 385, Issue 10, pp 949-951
- 2007 in Herrmann, B. Mumien aus dem Museum für Völkerkunde Hamburg. Mitteilung aus dem Museum für Völkerkunde Hamburg NF Bd 38 : 710

### Abstracts

- 2014 **Henke J**, Menke J, Erkel G, Kleinert H, Pautz A; Oxacyclododecindione – new promising results in the treatment of SLE; 42. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie
- 2014 **Henke J**, Menke J, Erkel G, Kleinert H, Pautz A; Oxacyclododecindione – a new promising substance in SLE treatment; *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 387 (Supplement 1): S16
- 2013 **Henke J**, Menke J, Erkel G, Kleinert H, Pautz A; The fungal compound Oxacyclododecindione has anti inflammatory effects in a model of chronic inflammation; *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 386 (Supplement 1): S61
- 2012 **Henke J**, Menke J, Erkel G, Kleinert H, Pautz A; Oxacyclododecindion – a new promising substance in SLE treatment?; 40. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie
- 2011 Pautz A, Art J, **Henke J**, Menke J, Bollmann F, Schmidt N, Forsch I, Kleinert H; Regulation of S100A8 expression in models of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus; 39. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Jenny Henke

Geburtsdatum:

Geburtsort:

Nationalität:

## Akademische Ausbildung

- 

## Schulische Ausbildung

# Danksagung

