
**Signaltransduktion von IgG Antiphospholipid
Antikörpern in plasmazytoiden Dendriten und
Monomac1 Zellen**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von
Nadine Prinz
geb. am 16.09.1984 in Bendorf

Mainz, 2011

(D77)

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2011

„DIE NEUGIER STEHT IMMER AN
ERSTER STELLE EINES PROBLEMS,
DAS GELÖST WERDEN WILL.“

(GALILEO GALILEI)

I Abstract

The antiphospholipid syndrome (APS) is an autoimmune disease characterized by thromboembolic events and/or abortions in the presence of antiphospholipid antibodies (aPL). The mechanisms underlying the pathogenicity of aPL are still poorly understood. Here we show that three human monoclonal aPL as well as IgG fractions from patients with the APS increase the mRNA expression of the intracellular toll-like receptor (TLR) 7 in plasmacytoid dendritic cells (pDC) and TLR8 in monocytes. Simultaneously they induce the translocation of TLR7 or TLR8 from the endoplasmic reticulum to the endosome. These effects depend on the uptake of aPL into the endosome, subsequent activation of endosomal NADPH oxidase, and generation of superoxide. As a consequence cells are dramatically sensitized to ligands for TLR7 and TLR8. This observation delineates a novel signal transduction pathway in innate immunity originating from the endosome. As the overexpression of TLR7 can also be detected in pDCs of patients with the APS *ex vivo* our results provide an explanation for the proinflammatory and procoagulant effects of aPL.

Furthermore, incubation of pDCs with aPL and TLR7 ligands significantly enhanced their ability to activate CD4⁺ Th-2 cells and to regulate B-cell differentiation and immunoglobulin (Ig) production. The presence of pDCs synergistically enhanced CD40/86 expression, proliferation and plasma cell differentiation of isolated human peripheral blood B cells stimulated through aPL and TLR ligation. This stimulation protocol was sufficient to turn purified naive B cells into IgM/IgG-producing plasma cells and to trigger IgG aPL synthesis in memory B cells. Thereby, pDCs contributed to B-cell activation *via* cytokine secretion and cell-cell contact. The presence of Th2-cells was not required but could enhance B-cell activation additionally. An upregulation of TLR7 or TLR9 in B cells was not involved.

This study is the first to show the relevance of pDC activation for the perpetuation of pathogenic activity in the APS. Since inappropriate expression of TLR7 has been implicated in the development of systemic autoimmunity, these findings may also be relevant for the general understanding of autoimmunity.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Immunsystem	1
1.1.1	Grundlagen des Immunsystems	1
1.1.2	Toll-like Rezeptoren	2
1.1.2.1	Humane TLRs	2
1.1.2.2	Signaltransduktion durch TLRs	3
1.1.3	Plasmazytoide dendritische Zellen	6
1.1.3.1	Phänotyp der pDCs	6
1.1.3.2	Aktivierung von pDCs	6
1.1.4	T-Zellen	8
1.1.4.1	Aktivierung von T-Zellen	9
1.1.4.2	Differenzierung von T-Zellen	9
1.1.5	B-Zellen	10
1.1.5.1	Entwicklung von B-Zellen	10
1.1.5.2	Aktivierung von B-Zellen	11
1.1.6	Autoimmunität	12
1.2	Antiphospholipid Syndrom	14
1.2.1	Antiphospholipid-Antikörper (aPL)	14
1.2.2	Kofaktoren für aPL	15
1.2.3	Lupus Antikoagulans (LA)	15
1.2.4	Klassifikationskriterien für das APS	16
1.2.5	Ätiologie / Pathogenese	18
1.3	Ziel der Arbeit	19
2	Material	20
2.1	Geräte	20
2.2	Verbrauchsmaterial	20
2.3	Chemikalien, Lösungen, Zellkulturmedien	21
2.4	Medien, Puffer	22
2.5	Vorgefertigte Systeme (Kits)	24
2.6	Primäre Antikörper	24
2.7	Sekundäre Antikörper, Isotypen-Kontrollen	25
2.8	Mausstämme	25
2.9	Primer	26
2.10	Softwaretools	26
3	Methoden	27
3.1	Zellbiologische Methoden	27
3.1.1	Aufreinigung von mononukleären Zellen aus „Buffy Coats“	27
3.1.2	Isolierung von PBMCs aus Patientenblut	27
3.1.3	Isolierung verschiedener Zellpopulationen mittels MACS	27

3.1.4	Isolierung muriner DCs	28
3.1.5	Zellzählung	28
3.1.6	Kultivierung der Zellen	28
3.1.7	Stimulationsversuche	29
3.1.8	Inhibitionsversuche	29
3.1.9	Konfokale Mikroskopie lebender Zellen	29
3.1.10	Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)	29
3.1.11	Nachweis der Superoxid Produktion <i>via</i> HPLC	30
3.1.12	MLR („mixed leucocyte reaction“)	31
3.1.13	Transwell-Experimente	31
3.2	Molekularbiologische Methoden	31
3.2.1	RNA Isolierung	31
3.2.2	Konzentrationsbestimmung im NanoDrop	32
3.2.3	Reverse Transkription	32
3.2.4	Fällung der cDNA	33
3.2.5	Quantitative PCR	33
3.3	Immunologische/proteinbiochemische Methoden	34
3.3.1	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)	34
3.3.1.1	IFN α ELISA	34
3.3.1.2	TNF α ELISA	35
3.3.1.3	LBPA ELISA	35
3.3.1.4	IgM / IgG ELISA	35
3.3.1.5	Cardiolipin ELISA	36
3.3.2	Westernblot	36
3.3.2.1	Probenvorbereitung	36
3.3.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	37
3.3.2.3	Transfer der Proteine auf eine Membran	37
3.3.2.4	Detektion mit spezifischen Antikörpern	38
3.3.3	Durchflusszytometrie	38
3.3.3.1	Oberflächenfärbung	39
3.3.3.2	Intrazelluläre Färbung	39
3.3.3.3	CFSE Färbung	39
3.3.4	FITC-Markierung von Antikörpern	40
3.3.5	Immunfluoreszenz	40
3.3.6	Präparation von IgG-Fractionen	40
3.4	Bestimmung der Endotoxin-Konzentration	41
4	Ergebnisse	42
4.1	TLR Hochregulierung durch aPL	42
4.2	Zytokin Sekretion nach aPL Stimulation	44
4.3	Korrelation von TLR und Zytokin Induktion	47
4.3.1	Abhängigkeit der TLR7 Induktion von IFN α und TNF α	47
4.3.2	Abhängigkeit der Zytokin Produktion von TLR7	48
4.4	Mechanismus der Zytokin Induktion	51
4.5	HL5B induzierte Aufnahme von RNA	53
4.6	NF- κ B vermittelte TLR7 Induktion	55
4.7	Endozytose und Akkumulation von aPL	56
4.8	Induktion von endosomalem Superoxid durch aPL	60

4.9	aPL induzieren die Translokation von TLR7/8	65
4.10	APS Patienten	68
4.10.1	Stimulationsversuche mit IgG Fraktionen	68
4.10.2	TLR7 Expressionsniveau in PBMCs von Patienten	70
4.11	Aktivierung humaner pDCs durch aPL	71
4.12	Aktivierung von T-Zellen durch aPL aktivierte pDCs	73
4.13	Aktivierung von B-Zellen	74
4.13.1	B-Zell Aktivierungsmarker	75
4.13.2	B-Zell Proliferation	76
4.13.3	Differenzierung von B-Zellen	78
4.13.4	Ig Sekretion durch B-Zellen	79
4.14	Bestätigung der Ergebnisse im Mausmodell	81
4.14.1	Tlr Knock-out Mäuse	81
4.14.2	Gp91 ^{phox} / p47 ^{phox} Knock-out Mäuse	83
4.14.3	Gpx Knock-out Mäuse	85
5	Diskussion	87
<hr/>		
5.1	Internalisierung von aPL	87
5.2	aPL induzieren endosomales Superoxid	89
5.3	aPL induzieren die Translokation von TLR7/8	90
5.4	Intrazelluläre TLRs und Autoimmunerkrankungen	92
5.5	Extrazelluläre TLRs und Autoimmunerkrankungen	95
5.6	pDC abhängige T- und B-Zell Aktivierung durch aPL	97
5.7	Relevanz der Ergebnisse in vivo	101
5.8	Ausblicke	101
6	Zusammenfassung	103
<hr/>		
7	Literaturverzeichnis	106
<hr/>		
8	Abkürzungsverzeichnis	120
<hr/>		
9	Danksagung	123
<hr/>		
10	Anhänge	124
<hr/>		
10.1	Veröffentlichungen	124
10.2	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
10.3	Erklärung	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

1.1.1 Grundlagen des Immunsystems

Multizelluläre Organismen haben verschiedenste Verteidigungsmöglichkeiten zur Abwehr von pathogenen Mikroorganismen sowie zur Eliminierung körpereigener entarteter Zellen entwickelt. Bei Vertebraten wird diese Aufgabe von einem Immunsystem übernommen, welches sich aus einer angeborenen (innaten) und einer erworbenen (adaptiven) Komponente zusammensetzt. Phylogenetisch betrachtet ist das angeborene Immunsystem der wesentlich ältere Teil und bildet die erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Pathogene. Neben physikalischen Barrieren (Epithelien der Haut) besteht es aus zellulären Komponenten (Granulozyten, natürliche Killerzellen, Mastzellen) sowie aus löslichen Komponenten wie Lysozym, Defensinen und dem Komplementsystem^{1,2}. Die innate Immunreaktion erfolgt unmittelbar jedoch auch relativ unspezifisch auf ein Pathogen, da die Immunerkennung auf einem beschränkten Satz in der Keimbahn festgelegter Rezeptoren beruht. Diese Rezeptoren werden als PRRs (pattern recognition receptors) bezeichnet und umfassen Mitglieder der Lektin-Rezeptoren³, der scavenger-Rezeptoren⁴ und der Toll-like Rezeptoren (TLRs)⁵. PRRs detektieren vor allem stark konservierte Strukturen der mikrobiellen Physiologie. Diese invarianten Strukturen, so genannte PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) werden nicht vom Wirt produziert und sind typisch für bestimmte Klassen von Mikroorganismen⁶. So wird eine einfache Unterscheidung zwischen körperfremd und körpereigen ermöglicht. Typische Vertreter von PAMPs sind Peptidoglykane, Lipoteichonsäuren, Glykane, bakterielle DNA sowie Lipopolysaccharide (LPS)^{7,8}.

In höheren Organismen wie den Säugetieren wird das angeborene Immunsystem von einem adaptiven Immunsystem unterstützt. Dadurch sind diese Organismen in der Lage, Pathogene, die sich der unmittelbaren Zerstörung durch das angeborene Immunsystem entziehen konnten, zu einem späteren Zeitpunkt spezifisch zu bekämpfen. Durch seine Gedächtnisfunktion ermöglicht die adaptive Immunantwort zusätzlich eine schnelle spezifische Eliminierung des Pathogens bei einem zweiten Kontakt. Die Grundlage dieser Immunantwort bilden B- und T-Lymphozyten sowie professionelle Antigen präsentierende Zellen (APCs).

Zu den professionellen APCs gehören vor allem die dendritischen Zellen (DCs) und Makrophagen, die bei der Auslösung der adaptiven Immunantwort eine wichtige Rolle spielen. Zudem können diese Zelltypen bereits in der Frühphase von Infektionen durch die Freisetzung von Interleukinen, Interferonen oder Chemokinen die angeborene Immunantwort wesentlich beeinflussen und verstärken. Aber auch B-Zellen zählen zu den APCs. B-Zellen reifen im Knochenmark (KM) und vermitteln die humorale Immunantwort.

1.1.2 Toll-like Rezeptoren

Das Protein Toll ist ein Typ I Transmembran Rezeptor welcher 1988 erstmals in der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt wurde. Toll ist maßgeblich an der Etablierung der dorso-ventralen Polarität während der embryonalen Entwicklung beteiligt⁹. Bereits früh verwies die Ähnlichkeit der Signaltransduktion durch Drosophila-Toll mit dem humanen Interleukin (IL)-1 Rezeptor auf eine mögliche Funktion von Toll in Immunprozessen¹⁰. Diese Annahme konnte 1996 durch eine Reihe von Experimenten in Knock-out Fliegen bestätigt werden¹¹. Ein Jahr später wurde ein humanes Homolog von Toll identifiziert¹², welches sich als Mitglied einer großen Familie von PRR erweisen sollte, die im Folgenden als Toll-like Rezeptoren (TLRs) bezeichnet wurden. Strukturell lässt sich diese Rezeptorfamilie durch eine extrazelluläre Domäne bestehend aus Leucin-reichen Motiven (LRR: leucin rich repeat) sowie eine intrazelluläre Toll-/IL-1-Rezeptor Domäne (TIR) charakterisieren¹³.

1.1.2.1 Humane TLRs

Bislang konnten elf humane TLRs mit ihren natürlichen Liganden identifiziert werden (vgl. Abb. 1.1). Lediglich der Agonist für TLR10 ist noch unbekannt¹⁴. Weiterhin wurde eine Kooperation verschiedener TLRs zur Erkennung bestimmter Liganden beschrieben. Dies dient vermutlich der Modulation der vermittelten Immunantwort. Gleichzeitig wird die Variabilität der erkannten Muster erhöht¹⁵. Die verschiedenen TLRs unterscheiden sich jedoch nicht nur in ihren Agonisten sondern auch in ihrer Lokalisation.

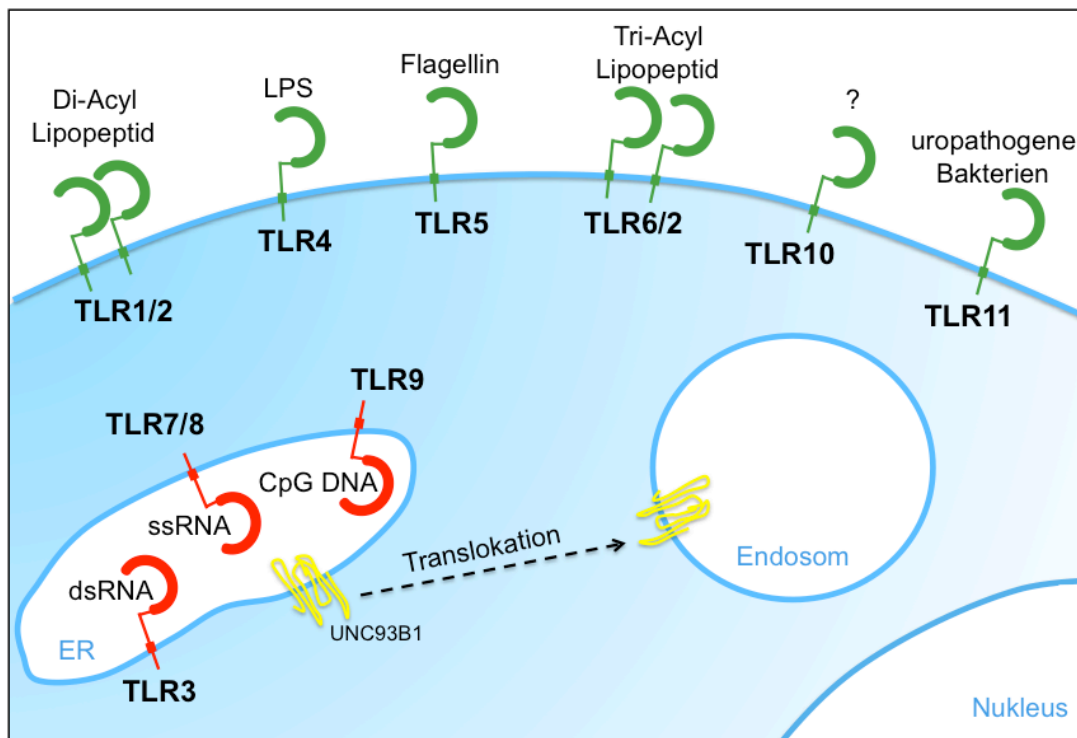


Abb. 1.1 TLRs und ihre Liganden (modifiziert nach¹⁶)

Während TLR1, -2, -4, -5, -6 und -10 an der Zelloberfläche lokalisiert sind, befinden sich TLR3, -7, -8 und -9 in unstimulierten Zellen im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Bei Kontakt mit einem entsprechenden Liganden erfolgt ihre UNC93B1 abhängige Translokation ins Endosom wo eine Aktivierung erfolgen kann¹⁷⁻²³. Die Protein-Expression von humanem TLR11 hingegen ist umstritten: die genomische Sequenz von TLR11 beinhaltet ein Stopp-Codon und kodiert somit nicht für ein vollständiges Protein. Es wird jedoch nicht ausgeschlossen, dass das Stopp-Codon in TLR11 eine Form von genetischem Polymorphismus repräsentiert, welcher bereits für TLR5 nachgewiesen werden konnte²⁴⁻²⁶.

1.1.2.2 Signaltransduktion durch TLRs

Die individuellen Signalpfade der TLRs unterscheiden sich voneinander. Man unterscheidet zwischen MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene 88)-abhängigen und MyD88-unabhängigen Signalwegen¹⁷.

MyD88-abhängige Signaltransduktion

Das Adaptorprotein MyD88 ist charakterisiert durch eine TIR Domäne, welche die Assoziation an TLR vermittelt, und eine death domain, über die IRAK4 (IL-1 receptor-associated kinase-4) und als Folge IRAK1 rekrutiert werden²⁷. Nach Phosphorylierung von IRAK1 durch IRAK4 lagert sich TRAF6 (TNFR associated factor) an IRAK1 und die beiden Moleküle dissoziieren vom Rezeptor ab um einen Komplex mit der Kinase TAK1 zu bilden. Die Assoziation mit zwei Ubiquitin-Ligasen führt zur Ubiquitylierung von TRAF6, welche die Aktivierung von TAK1 induziert. TAK1 phosphoryliert nun den IKK-Komplex was in einer Aktivierung von NF- κ B resultiert. Unter NF- κ B wird eine Gruppe von dimeren Transkriptionsfaktoren zusammengefasst, die konservierte DNA-Sequenzen erkennen. Im humanen System wurden bislang fünf Proteine identifiziert: p50, p52, c-Rel, RelA und RelB²⁸. Weiterhin phosphoryliert TAK1 MAP (mitogen activated protein) Kinasen die das Aktivator-Protein 1 (AP1) aktivieren. AP1 und NF- κ B initiieren als Transkriptionsfaktoren die Expression von inflammatorischen Zytokinen. In plasmazytoiden dendritischen Zellen aktiviert MyD88 zusätzlich IRF7 welches die Expression von Interferon (IFN) α/β induziert²⁹ (vgl. Abb. 1.2).

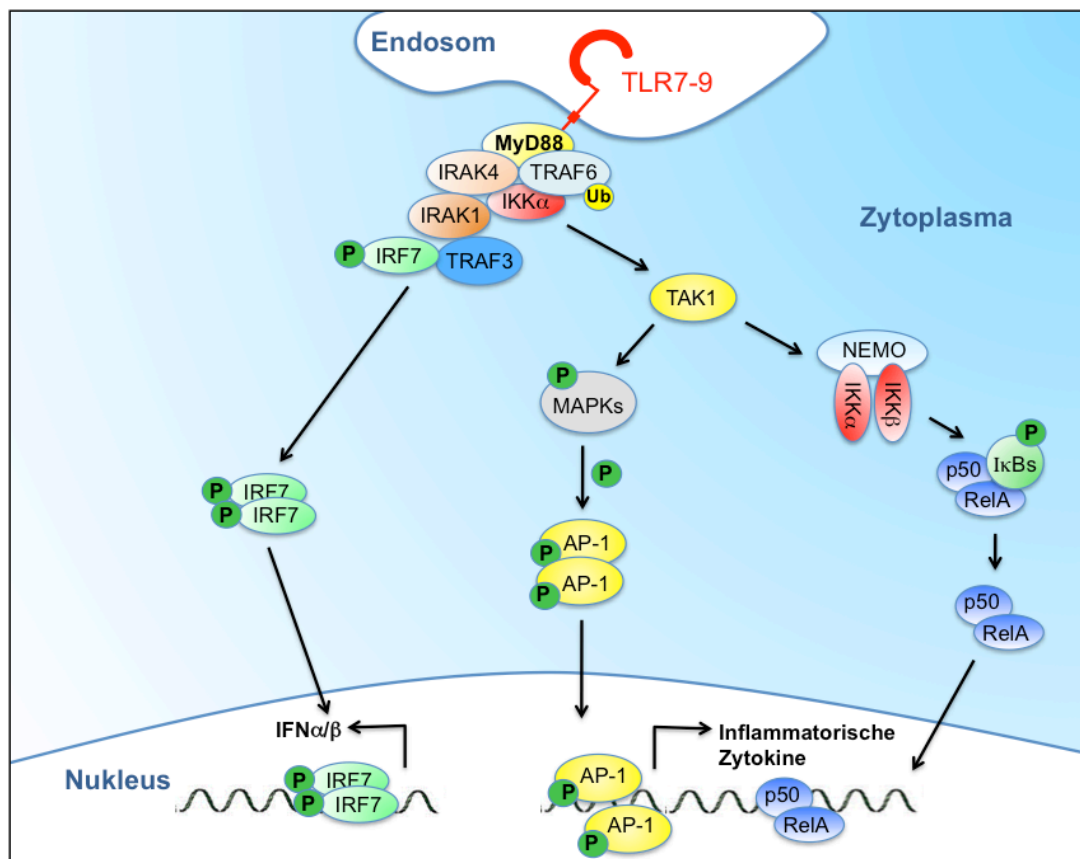


Abb. 1.2

TLR7 und TLR9 vermittelte Signaltransduktion (modifiziert nach³⁰).

MyD88-unabhängige Signaltransduktion

Yamamoto et al.³¹ sowie Oshiumi et al.³² konnten weitere Adaptermoleküle identifizieren, die von TLRs rekrutiert werden. Zu diesen Adaptermolekülen gehört neben dem TIR-domain-containing adaptor protein (TIRAP) auch das TIR-domain-containing adapter protein inducing IFN β (TRIF). TRIF vermittelt in MyD88-unabhängiger Weise nach Stimulation von TLR3 und TLR4 die Aktivierung von interferon regulatory factor-3 (IRF3) und somit die Produktion von IFN β ³¹. TLR4 bedient sich also nach Aktivierung sowohl MyD88- als auch TRIF-abhängiger Signaltransduktionswege (vgl. Abb. 1.3). Ein weiteres Adaptormolekül mit TIR-Domäne, das TRIF-related adaptor molecule (TRAM) konnte über Sequenzhomologien identifiziert werden³³. Experimente in Knock-out Mäusen verweisen auf eine wichtige Rolle von TRAM in der MyD88-unabhängigen, TRIF-abhängigen Signalkaskade nach Stimulation von TLR4. Die Signaltransduktion über TLR3 ist hingegen TRAM-unabhängig. Interessanterweise erfolgt die Induktion von Typ I IFN durch TLR3 und TLR4 über den MyD88-unabhängigen, TRIF-abhängigen Weg, während die TLR7 bzw. TLR9 vermittelte Induktion von IFN α und IFN β MyD88-abhängig erfolgt (vgl. Abb. 1.2 und 1.3).

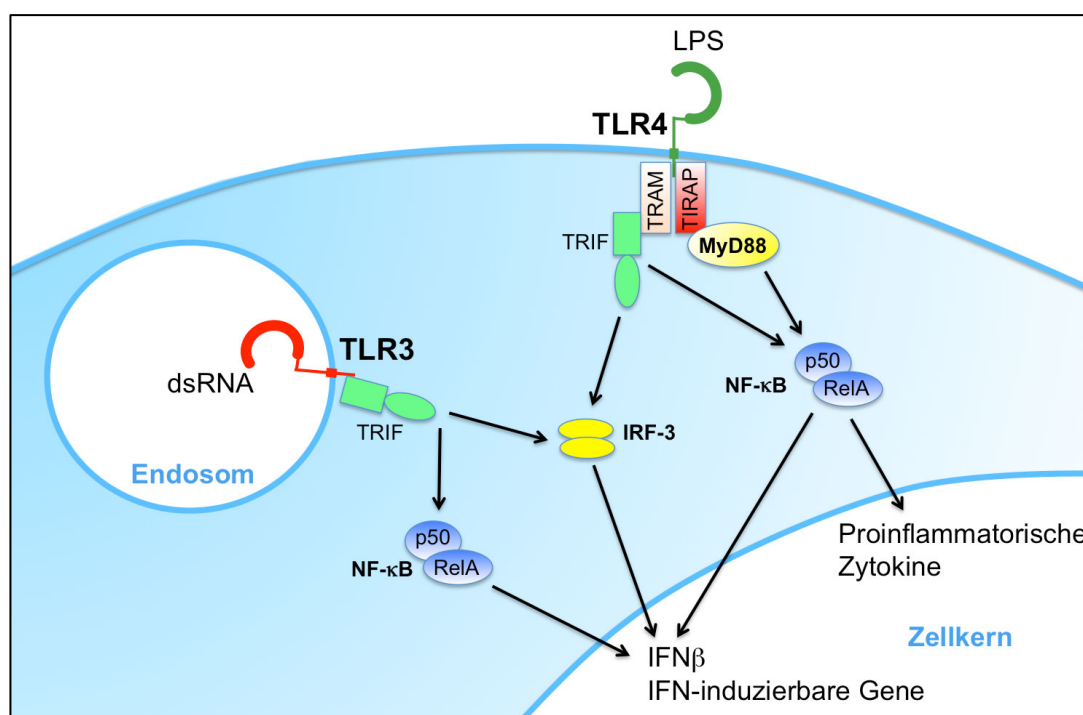


Abb. 1.3 TLR3 und TLR4 vermittelte Signaltransduktion

TLR4 bedient sich nach Stimulation sowohl MyD88-abhängiger als auch TRIF-abhängiger Signalwege. Signaltransduktion durch TLR3 erfolgt hingegen nur TRIF-abhängig (modifiziert nach³³).

1.1.3 Plasmazytoide dendritische Zellen

Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) verdanken ihren Namen ihrer Plasmazell-ähnlichen Morphologie, die von ihrer Erstbeschreibung im Jahr 1958 durch Lennert und Remmele bis 1998 angesichts fehlenden Wissens über die Funktion, einen der wichtigsten Anhaltspunkte für die Einordnung und Erforschung der neu entdeckten Zellart darstellte. Die Frage nach der Funktion der pDCs konnte 1998 durch den Beweis geklärt werden, dass es sich bei den pDCs und den IFN- α -produzierenden-Zellen, die seit den späten 70er Jahren als wichtigste IFN α -produzierende Zellen im peripheren Blut bekannt waren, um ein und denselben Zelltyp handelt³⁴.

1.1.3.1 Phänotyp der pDCs

pDCs gehen im Gegensatz zu myeloiden DCs (mDCs) aus einer lymphoiden Zelllinie hervor³⁶. Ihre Zelloberfläche zeichnet sich durch das Fehlen der Linien-spezifischen Oberflächenproteine wie Immunglobulin (Ig), CD19 (B-Zellen), T-Zell-Rezeptor, CD3 (T-Zellen), CD14 (Monozyten), CD16, CD56 (Natürliche-Killer-Zellen) und CD11c (humane mDCs) aus. Charakteristische Marker für pDCs sind BDCA (blood dendritic cell antigen)-2, BDCA-4, CD54R (B220) und CD123³⁷. Weiterhin sind pDCs mit intrazellulären TLRs (TLR7 und TLR9) ausgestattet. TLR7 und TLR9 dienen der Erkennung von einzelsträngiger RNA beziehungsweise CpG-DNA Motiven (vgl. Abb. 1.1). Diese Spezialisierung auf die Erkennung mikrobieller Nukleinsäuren verweist auf eine besondere Rolle der pDCs in der Abwehr von Viren. Im Gegensatz zu mDCs exprimieren pDCs kein TLR4 und sind somit nicht befähigt bakterielle Strukturen wie LPS zu erkennen.

1.1.3.2 Aktivierung von pDCs

Während fetale pDCs aus dem primären lymphatischen Organen Leber, Thymus und KM isoliert wurden, scheint im erwachsenen Organismus hauptsächlich das KM für die Neubildung verantwortlich zu sein³⁸. Im Laufe ihrer Entwicklung migrieren pDCs aus dem KM über das Blut in die peripheren Gewebe, wo sie zu einem Stadium differenzieren, in dem man sie als unreife DC bezeichnet.

In diesem unreifen Zustand können pDCs große Mengen an Antigenen aufnehmen besitzen jedoch nur eine geringe allostimulatorische Kapazität. Die MHC (major histocompatibility complex) Expression ist schwach, die von Fc-Rezeptoren zur antikörpervermittelten Proteinaufnahme dagegen stark. Ihr Repertoire zur Antigenaufnahme beinhaltet Phagozytose, Makropinozytose und adsorptive Endozytose³⁹⁻⁴³.

Kommen nun pDCs in Kontakt mit einem geeigneten Stimulus wie z.B. Viren oder TLR Liganden^{37,44} werden sie aktiviert und ihre Reifung setzt ein. Der Reifungsprozess einer DC ist mit Veränderungen des Phänotyps, der Morphologie und der Funktionen verbunden. Eine wichtige Rolle bei der ablaufenden Reifungskaskade spielen die TLRs⁴⁵. Letztendlich resultiert die Aktivierung der DCs in einer verminderten Expression der Moleküle, die die Antigenaufnahme ermöglichen, während die Expression von kostimulatorischen Molekülen, vor allem von CD40, CD80 und CD86, von MHC Molekülen und Adhäsionsmolekülen (CD48, CD58, ICAM-1) sowie die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen stark zunimmt⁴⁶⁻⁴⁸. Dabei ist die Zunahme der MHC Moleküle ein posttranslationaler Prozess. Nach der DC Aktivierung erfolgt ihre Translokation an die Zelloberfläche, wo sie zusammen mit dem Antigen in Form eines Antigen-MHC Komplexes präsentiert werden⁴⁹. Zusätzlich zur Translokation nimmt die Halbwertszeit der MHC Moleküle beider Klassen zu⁵⁰.

Klassischerweise werden exogen aufgenommene Antigene im sauren endosomalen Kompartiment in Peptidfragmente degradiert. Diese Peptide bilden Komplexe mit den MHC Molekülen der Klasse II und werden auf der Zelloberfläche exprimiert, wo sie vornehmlich eine Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen induzieren⁵¹. Endogen synthetisierte Proteine (zytosolische Antigene z.B. virale Proteine) werden im ER an das MHC Klasse I Protein gebunden und an die Oberfläche transportiert, wo sie CD8⁺ T-Zellen antigenspezifisch aktivieren⁵². Diese Dichotomie in der Aktivierung der T-Zell Subtypen existiert in dieser absoluten Form nicht für pDCs. pDCs sind zur so genannten „Cross-Präsentation“ befähigt. Sie können exogen aufgenommene Peptide an MHC I Komplexen gebunden präsentieren und damit entsprechende zytotoxische CD8⁺ T-Zellen induzieren⁵³.

Die ausreifenden pDCs exprimieren weiterhin verstärkt CCR7 mit MIP-3 β als Liganden⁵⁴. Der chemotaktische Reiz des MIP-3 β führt zusammen mit dem SLC (second lymphoid organ chemokine), einem zweiten Liganden des CCR7 die DC aus dem Ort der Aktivierung über die Lymphgefäße zu den parakortikalen Zonen der Lymphknoten⁵⁵. Naive T-Zellen werden ebenfalls durch MIP-3 β chemotaktisch angezogen. So wird das Zusammentreffen von APC und naiven T-Zellen im lymphatischen Gewebe ermöglicht.

1.1.4 T-Zellen

Der Thymus spielt bei der T-Zell Entwicklung eine entscheidende Rolle. Neben der Zellvermehrung kommt es zur Differenzierung der T-Lymphozyten, die dabei die Unterscheidung zwischen körpereigenen und körperfremd erlernen: T-Zellen, die eigene MHC Moleküle plus Peptide nicht als „selbst“ erkennen, sterben durch Apoptose (Positiv Selektion). Anschließend erfolgt die negative Selektion: Zellen, deren Rezeptoren eine zu hohe Affinität zu körpereigenen Strukturen zeigen, werden eliminiert. Störungen in diesem Prozess führen zu Autoimmunität und/oder Immundefizienz⁵⁶.

Nachdem T-Lymphozyten ihre Entwicklung im Thymus abgeschlossen haben, zirkulieren sie als naive T-Zellen zwischen den Blutgefäßen und den peripheren lymphatischen Organen. Aufgrund der Expression zweier Oberflächenstrukturen können T-Zellen in CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen unterteilt werden. CD4⁺ T-Zellen werden auch als T-Helferzellen bezeichnet (Th-Zellen), CD8⁺ T-Zellen sind für die zytotoxische T-Zellantwort verantwortlich und spielen bei der Bekämpfung virusinfizierter und entarteter Körperzellen eine wichtige Rolle. Beide Subpopulationen erkennen über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) Antigene, die von APCs präsentiert werden. Dabei erkennen naive CD8⁺ T-Zellen ihr Antigen auf MHC Klasse I-Molekülen, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden, wohingegen für CD4⁺ T-Zellen das Antigen an MHC Klasse II-Moleküle gebunden sein muss. MHC II Moleküle sind vor allem auf APCs zu finden⁵⁷.

1.1.4.1 Aktivierung von T-Zellen

Die T-Zell-Aktivierung findet in der T-Zell-Zone der sekundär-lymphatischen Organe statt. Dort erhalten sie ein Signal über den Antigen-spezifischen TCR. Für die Aktivierung der T-Zellen sind jedoch zwei Signale notwendig. Neben der spezifischen Antigenerkennung durch den TCR benötigt die T-Zelle obligat noch ein zweites, kostimulierendes Signal, das von derselben APC, auf der die T-Zelle ihr spezifisches Antigen erkennt, geliefert werden muss⁵⁶. Das am besten charakterisierte kostimulierende Molekül ist das Glykoprotein B7 (B7.1 = CD80 und B7.2 = CD86). Ein Rezeptor von B7 auf der T-Zelle ist das Molekül CD28. Eine Bindung von B7 an CD28 führt zur Kostimulierung naiver T-Zellen. Gleichzeitig kommt es zu einer Hochregulation von Signalmolekülen auf beiden Seiten. Es wird z.B. CD40L (CD154) von aktivierten CD4⁺ T-Zellen und zugleich CD40 auf APCs verstärkt exprimiert, was zu einem Anstieg der B7-Moleküle sowie der MHC-Moleküle führt.

1.1.4.2 Differenzierung von T-Zellen

Ein drittes Signal im Rahmen der T-Zell-Aktivierung ist die Sekretion von Zytokinen durch APCs, wodurch die Differenzierung der aktivierten antigen-spezifischen T-Zellen in Effektor T-Zell-Subtypen gesteuert wird. Die Konsequenz ist weitreichend, da die folgende Immunantwort entweder Zell-vermittelt (Th1-Zellen) oder humoral (Th2-Zellen) erfolgen kann⁵⁸.

Subtypen von DCs sezernieren unterschiedliche Zytokine wodurch sie die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu Th1- versus Th2-Zellen während einer Immunantwort determinieren³. Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass pDCs ein Th2-Zytokinprofil in naiven T-Zellen hervorrufen können⁵⁹. Das Ausmaß der T-Zell-Polarisierung durch pDCs scheint aber abhängig vom Differenzierungs- und Reifungsstadium der Zellen zu sein. CD11c⁻ Vorläufer-Zellen rufen eher ein Th0-Zytokinprofil hervor, während nach Reifung der pDCs Th2-Zellen induziert werden⁶⁰.

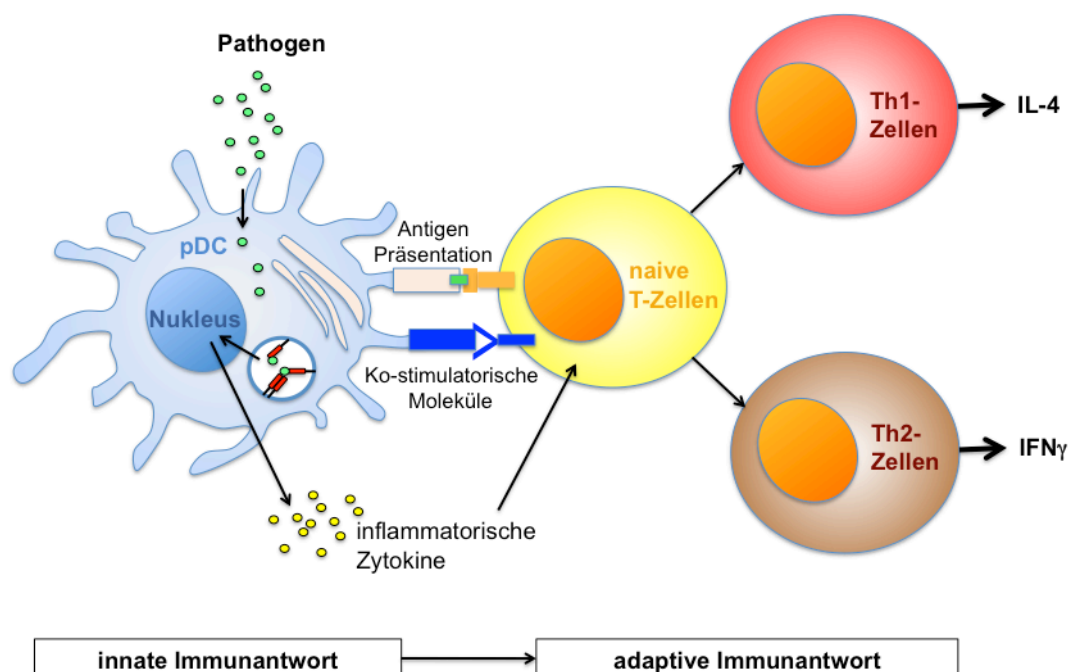


Abb. 1.4 T-Zell Aktivierung durch DCs

Dendritische Zellen präsentieren phagozytierte Pathogene an T-Zellen. Zusätzlich erkennen TLRs pathogene Strukturen und induzieren die Expression von kostimulatorischen Molekülen und inflammatorischen Zytokinen woraus die Aktivierung der adaptiven Immunantwort vornehmlich die Th1-Zell gesteuerte Immunreaktion resultiert (modifiziert nach¹⁷).

1.1.5 B-Zellen

B-Zellen vermitteln die humorale Immunantwort. Über den B-Zellrezeptor (BCR) können sie spezifisch Antigene binden, aufnehmen, prozessieren und die Peptidfragmente an T-Lymphozyten präsentieren. Nach Interaktion mit einer T-Zelle kommt es zur klonalen Expansion und zur Differenzierung in antikörpersezernierende Plasma- oder Gedächtniszellen. Der BCR stellt dabei eine membrangebundene Form des Antikörpers dar, welchen die B-Zelle nach ihrer Aktivierung und Differenzierung zur Plasmazelle sezerniert⁵⁶.

1.1.5.1 Entwicklung von B-Zellen

B-Zellen entwickeln sich in der fötalen Leber oder dem adulten KM⁶¹⁻⁶³. In Maus und Mensch verläuft die B-Zellentwicklung schrittweise und in unterschiedlichen hämatopoetischen Organen, dem KM und der Milz.

Die B-Zellen stammen von einer hämatopoetischen Vorläuferzelle im KM ab und differenzieren über das Pro-B- und Prä-B-Zellstadium zu unreifen und transitionalen B-Zellen. Die unreifen und transitionalen B-Zellen wandern zur Milz und entwickeln sich dort zu reifen B-Zellen⁵⁶. Jeder Schritt während der B-Zellentwicklung ist eng reguliert und kontrolliert durch die differentielle Expression bestimmter intrazellulärer oder membranständiger Proteine, durch die schrittweise Umordnung der für den BCR kodierenden Gensegmente und durch die Interaktion der Zelle mit ihrer Mikroumgebung. Einer der frühesten Oberflächenmarker der B-Zelllinie ist CD19, ein Mitglied der Ig-Superfamilie, Signaltransduktionsmolekül und Teil des B-Zell-Korezeptors. CD19 ist mit Ausnahme terminal differenzierter Plasmazellen während der gesamten B-Zellentwicklung (vgl. Abb. 1.5) vom Pro-/Prä-B- Zellstadium an exprimiert⁶⁴⁻⁶⁶.

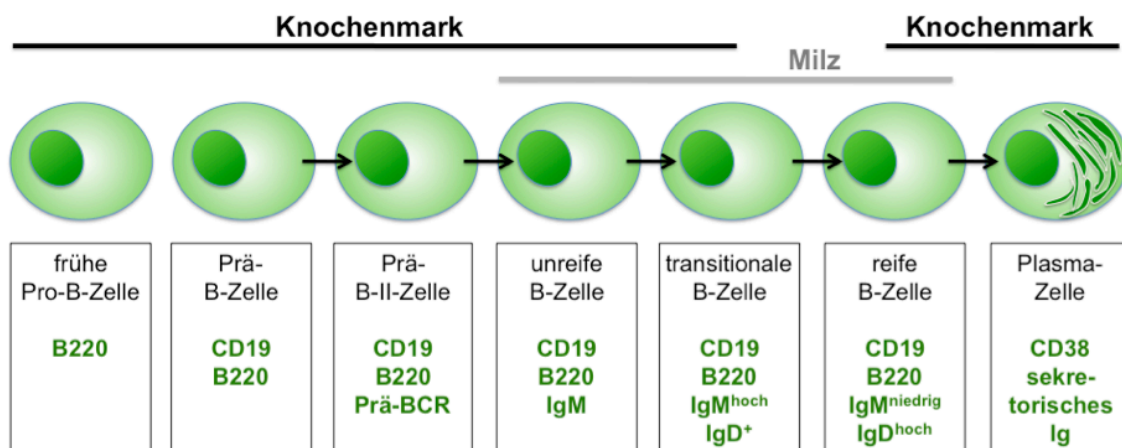


Abb. 1.5 B-Zell Entwicklung im Knochenmark und in der Milz

1.1.5.2 Aktivierung von B-Zellen

Reife naive B-Zellen zirkulieren durch das Blut, Gewebe und die Lymphe oder wandern zurück ins KM. Binden diese mit ihrem BCR ihr spezifisches Antigen werden sie aktiviert und differenzieren zu Plasmazellen⁶⁷. Der BCR erfüllt dabei zwei Funktionen: 1. Er überträgt bei Antigenerkennung ein Signal in das Zellinnere; 2. Er transportiert die Antigene in das Zellinnere, wo sie prozessiert werden und schließlich als an MHC-II Moleküle gebundene Peptide an die B-Zell-Oberfläche zurückkehren. Dieses Peptid kann von Antigen-spezifischen Th2-Zellen über den TCR erkannt werden^{56,67-69}.

Neben dieser Bindung des TCR brauchen B-Zellen ein zweites Signal, um aktiviert zu werden. Dieses zweite kostimulatorische Signal bekommen sie über die Bindung des CD40L (auf der Th2-Zelle) an CD40. B-Zellen exprimieren konstitutiv das kostimulatorische Molekül CD40. Durch beide Signale stimuliert, tritt die B-Zelle in die klonale Expansion ein⁵⁶. Zusätzlich zu dem direkten interzellulären B-Zell-T-Zell Kontakt haben andere Studien bewiesen, dass auch DCs einschließlich pDCs einen direkten regulatorischen Einfluss auf die B-Zell-Differenzierung nehmen können. Ferner beteiligen sich DCs an der Regulation des Ig-Klassenwechsels⁷⁰⁻⁷³.

Nach ihrer Aktivierung in peripheren Lymphknoten oder der Milz wandern die Prä-Plasmazellen ins KM oder an mukosale Oberflächen, wo sie vollständig zu Plasmazellen ausdifferenzieren^{74,75}. Plasmazellen exprimieren keine oberflächengebundenen Antikörper mehr und sind reich an ER da sie große Mengen des spezifischen Antikörpers sezernieren; zuerst vom Subtyp IgM und später nach dem Klassenwechsel auch vom Subtyp IgG, IgE oder IgA.

1.1.6 Autoimmunität

Die Entstehung von Autoimmunerkrankungen wird als multifaktoriell angesehen. Neben wichtigen Einflüssen wie der genetischen Disposition und Umweltfaktoren werden auch Infektionen in der Pathogenese als ursächlich angenommen. Bei Untersuchungen der Verbindung zwischen Infektionen und Autoimmunität wurden oftmals autoreaktive T-Zellen hervorgehoben. Ein sehr wesentlicher Faktor, welcher auf die Schlüsselrolle von T-Lymphozyten bei Autoimmunkrankheiten hindeutet, sind Transferexperimente, bei welchen aktivierte selbstreaktive CD4⁺ Zellen von einem erkranktem Tier auf ein gesundes Tier⁷⁶⁻⁷⁹ oder sogar von einem erkranktem Menschen auf eine immundefiziente Maus⁸⁰ übertragen werden. Ein solcher Transfer reicht bei vielen Tiermodellen aus, um Autoimmunkrankheiten hervorzurufen. Unklar ist jedoch wie T-Zellen, die im Thymus nicht negativ selektiert wurden, in der Peripherie aktiviert werden und eine Autoreaktivität entwickeln. Es gibt jedoch mehrere Hypothesen, die versuchen diesen Mechanismus zu erklären. Die wichtigsten werden im Folgenden erklärt:

Aktivierung durch Superantigene

Eine polyklonale B- oder T-Zellaktivierung kann Autoimmunität induzieren, ausgelöst z.B. durch sogenannte Superantigene wie das Toxische-Schock-Syndrom-Toxin-1 von *Staphylokokkus aureus*. Superantigene werden nicht von APCs prozessiert und gehen eine Bindung außerhalb der MHC-Bindungsstelle ein. Die Erkennung und Bindung des Komplexes aus MHC-Molekül und Superantigen durch den TCR erfolgt dann unabhängig von der Antigen-spezifität des TCR⁸¹. Krankheiten, die mit Superantigenen in Verbindung gebracht werden sind beispielsweise Multiple Sklerose oder Rheumatoide Arthritis⁸²⁻⁸⁵

Gewebezerstörung

Ein Beispiel für die Induktion von Autoimmunität durch virusbedingte Gewebszerstörung bietet die chronische Infektion von Mäusen mit Theilers Enzephalitis Virus. Bedingt durch zytopathische Effekte des Virus werden Autoantigene des zentralen Nervensystems, die normalerweise sequestriert sind, d.h. vom Immunsystem „ignoriert“ werden, freigesetzt. Dadurch können autoreaktive Lymphozyten aktiviert werden⁸⁶. Die Sequestrierung von Autoantigenen, die anderenfalls von autoreaktiven Lymphozyten erkannt werden könnten, ist ein wichtiger Mechanismus zur Aufrechterhaltung der immunologischen Toleranz gegen Selbstantigene⁸⁷. Die virusbedingte Freisetzung solcher normalerweise sequestrierten Selbstantigene kann ein wichtiger Faktor in der Pathogenese von Autoimmunität sein^{86,87}.

Bystander Aktivierung

Ein Mechanismus der Antigen-unspezifischen Aktivierung ist die sogenannte „Bystander-Aktivierung“, die beschreibt, wie normalerweise tolerante, auto-reaktive T-Lymphozyten in einem entzündlichen Milieu aktiviert werden können. Dies könnte zum einen durch sezernierte Zytokine zum anderen durch die vermehrte Präsenz von sogenannten kostimulatorischen Molekülen geschehen. In diesem Modell gibt es demnach kein spezifisches T-Zell Antigen. Als Beispiel sei die Aktivierung von CD8⁺-T-Zellen durch virus-induziertes IFN α genannt^{88,89}. Auch LPS⁹⁰ und Lipoproteine⁹¹ können als potente Immunmodulatoren wirken.

Molecular Mimicry

Bei „Molecular Mimicry“ handelt es sich um ein Phänomen, bei dem auf Grund von Sequenzhomologien zwischen einem Fremdantigen und einem Autoantigen durch Kreuzaktivierung eine Immunantwort gegen körpereigene Bestandteile initiiert wird⁹²⁻⁹⁴. Eine genetische Prädisposition einzelner Individuen durch die Expression bestimmter HLA (Human leukocyte antigen)-Moleküle⁹⁵ ist mit diesem Konzept vereinbar. In den letzten Jahren ist weiterhin deutlich geworden, dass eine spezifische T-Zelle viele verschiedene Antigene erkennen kann⁹⁶. Auf Grund dieser weitgehend degenerierten Antigenerkennung erweitern sich die Möglichkeiten einer Aktivierung autoreaktiver T-Zellen durch virale Erreger⁹⁷. Im Rahmen des Konzepts des „Molecular Mimicry“ wird unter anderem die Entstehung des insulin-abhängigen Diabetes Mellitus⁹⁸ und des Rheumatischen Fiebers⁹⁹ diskutiert.

1.2 Antiphospholipid Syndrom

Das Antiphospholipid Syndrom (APS) wurde 1983 erstmals von Graham Hughes als eigenständiges Krankheitsbild beschrieben¹⁰⁰. Das APS bei SLE (systemic lupus erythematosus)-Patienten wird als sekundäre Form von einer selteneren primären Form unterschieden, bei der die Patienten keine weitere zugrunde liegende Autoimmunerkrankung aufweisen¹⁰¹. Definiert ist das APS als eine Autoimmunerkrankung mit rezidivierenden arteriellen und venösen Thrombosen sowie Spontanaborten bei gleichzeitigem Nachweis von persistierenden, erhöhten Antiphospholipid-Antikörper (aPL)-Titern.

1.2.1 Antiphospholipid-Antikörper (aPL)

aPL zeichnen sich durch ihre Heterogenität aus. Zwar konnte nachgewiesen werden, dass ein Großteil der aPL als Antikörper gegen Phospholipide (z.B. Cardiolipin) wirkt, darüber hinaus wurden aber auch aPLs, die gegen Phosphatidylinositol und Phosphatidylserin gerichtet sind, charakterisiert¹⁰². Weiterhin wird die Komplexität der aPL durch kofaktorenabhängige und unabhängige Antikörper erhöht¹⁰³.

Zudem kommt es auch zu einer strukturellen Heterogenität, die unter anderem durch das Auftreten von unterschiedlichen Ig Klassen (IgG, IgA und IgM) gekennzeichnet ist¹⁰⁴. Die Entwicklung von aPL ist bislang ungeklärt, da bisher noch keine aPL-spezifischen T-Zellen beschrieben wurden. Somit bleibt unklar, ob es sich bei aPL um natürliche Antikörper handelt oder ob die B-Zelle erst auf Grund der passenden T-Zell-Hilfe zur Plasmazelle differenziert und aPL sezerniert¹⁰⁵.

1.2.2 Kofaktoren für aPL

Für manche aPL konnte eine Kofaktor Abhängigkeit nachgewiesen werden. Besonders im Vordergrund steht hier das Serum-Protein β 2-Glykoprotein I (β 2GPI), welches mit hoher Affinität an anionische Phospholipide¹⁰⁶. Erstmals nachgewiesen wurde die Bindung von Phospholipiden an aPL unter Beteiligung von β 2GPI von McNeil et al.¹⁰⁷. Neben β 2GPI sind auch Prothrombin, Annexin II und V, Protein S und Protein C als Kofaktoren für aPL bekannt¹⁰⁸⁻¹¹¹. Weit verbreitet ist die Theorie, dass vor allem Kofaktor abhängige aPL, insbesondere solche die β 2GPI als Kofaktor binden, pathogen sind^{112,113}. Jedoch konnten auch für Kofaktor unabhängige aPL pathogene Eigenschaften wie z.B. eine prokoagulante und proinflammatorische Aktivität nachgewiesen werden^{103,114}.

1.2.3 Lupus Antikoagulans (LA)

Bei dem Lupus Antikoagulans handelt es sich um ein laborchemisches Phänomen, durch welches mittels Gerinnungstests *indirekt* eine heterogene Gruppe von aPL nachgewiesen wird. Per Definition sind LA Igs der Klassen IgG, IgM, IgA oder Mischungen dieser, welche mit einem oder mehreren Phospholipid abhängigen *in vitro* Testen der Blutgerinnung interferieren. Das LA richtet sich gegen negativ geladene Phospholipide des Prothrombinaktivator-Komplexes, was zur Verlängerung der Phospholipid abhängigen Gerinnungsteste führt. Ein vermehrtes Auftreten von Thrombosen bei Patienten mit LA wurde in verschiedenen Arbeiten gezeigt¹¹⁵. Obwohl Thrombosen bei SLE Patienten ohne LA ebenfalls möglich sind, ist bei Gegenwart des LA das Thromboserisiko um ein Vielfaches vermehrt¹¹⁶.

1.2.4 Klassifikationskriterien für das APS

Das APS wird zu den rheumatischen Erkrankungen gerechnet und stützt sich auf die Erfüllung bestimmter Kriterien. Diese wurden im Rahmen einer Internationalen Konsensus Konferenz in Sapporo im Jahre 1999 festgelegt¹¹⁷. Je ein klinisches und ein laborchemisches Kriterium müssen hierbei für die Diagnosestellung erfüllt sein. Tabelle I zeigt die allgemein gültigen Sapporo- (oder auch Wilson-) Kriterien.

Klinische Kriterien des APS	Laborchemische Kriterien des APS
1. vaskuläre Thrombosen eine oder mehrere Episoden arterieller oder venöser Thrombosen in jeglichem Gewebe oder Organ	1. anti-Cardiolipin-Antikörper (aCL) Nachweis von IgG oder IgM Antikörpern in mittelhohem bis hohem Titer in einem standardisierten β 2GPI abhängigen ELISA
oder	oder
2. Schwangerschaftsmorbidität a) Ein- oder mehrmaliger Verlust eines Feten ab der 10. Schwangerschaftswoche (SSW) wenn anatomische, genetische und hormonale Ursachen ausgeschlossen sind b) Ein- oder mehrmalige vorzeitige Geburt eines morphologisch normalen Neonaten vor der 34. SSW aufgrund schwerer Eklampsie, Präeklampsie oder Plazenta-Insuffizienz c) drei oder mehr unerklärbare aufeinander folgende Aborte vor der 10. SSW ohne anatomische, genetische und hormonale Ursachen	2. Lupus Antikoagulans (LA)* a) 1. Screening: verlängerte Phospholipid-abhängige Gerinnung (z.B. aPTT) b) 2. Screening: verlängerte Gerinnungszeit ist nicht durch Mischen mit normalen plättchenarmen Plasma korrigierbar c) Verkürzung oder Korrektur der verlängerten Gerinnungszeit durch einen Überschuss an Phospholipiden d) Ausschluss anderer Koagulopathien

Tabelle 1.1 Sapporo-APS-Diagnosekriterien nach Wilson et al.¹¹⁷.

Bei zwei verschiedenen Messungen im Abstand von mindestens 6 Wochen müssen je ein klinisches und ein laborchemisches Kriterium erfüllt sein. (*) Der Nachweis von LA erfolgt nach den Richtlinien der Internationalen Gesellschaft für Thrombosen und Hämostase (ISTH)¹¹⁸.

Eine Revision der Sapporo-Kriterien erfolgte im Jahr 2006 (vgl. Tabelle II) in Sydney und beinhaltete im wesentlichen zwei Veränderungen. Die Kontrolluntersuchungen nach erstmaligem Nachweis der aCL-Antikörper sollten im Mindestabstand von 12 (anstatt bisher 6) Wochen erfolgen, wobei ein mindestens zweiter Nachweis mittlerer oder hoher Titer der aCL-Antikörper (>40 GPL oder MPL entsprechend oberhalb der 99. Perzentile) als laboranalytisches Kriterium für ein APS zu werten ist.

Zusätzlich wurde der positive mindestens zweimalige Nachweis mittels standardisierter ELISA von anti- β 2GPI-Antikörper vom IgG und/oder IgM Typ im Serum mit einer Titerhöhe oberhalb der 99. Perzentile als laboranalytisches Kriterium für APS eingestuft¹¹⁹.

Klinische Kriterien des APS	Laborchemische Kriterien des APS
1. vaskuläre Thrombosen ≥ 1 venöse und/oder arterielle Thrombose jedweder Lokalisation	1. aCL-Antikörper mittelhohe bis hohe IgG oder IgM Titer (> 40 GPL oder MPL, oder > 99. Perzentile)
oder	oder
2. Schwangerschaftsmorbidität a) ≥ 1 Abort in oder nach der 10. SSW b) ≥ 1 Frühgeburt in oder vor der 34. SSW c) ≥ 3 konsekutive Spontanaborte vor der 10. SSW	2. Lupusantikoagulans (LA) Lupus Antikoagulans im Plasma über mehr als 12 Wochen, Nachweis entsprechend der ISTH-Leitlinien ¹¹⁸
	oder
	3. anti-β2-GPI-Antikörper Titer von anti- β 2-GPI-Antikörpern vom IgG und/oder IgM Isotyps > 99. Perzentile

Tabelle 1.2 Sydney-APS-Diagnosekriterien¹¹⁹

Bei zwei verschiedenen Messungen im Abstand von mindestens 12 Wochen müssen je ein klinisches und ein laborchemisches Kriterium erfüllt sein.

Diese Revision der Sapporo-Kriterien wird kontrovers diskutiert. Dies liegt zum einen daran, dass die Entscheidung anti- β 2GPI-Antikörper in die Regeldiagnostik aufzunehmen, nicht auf einem Konsens (wie bisher üblich) sondern auf einer Mehrheitsentscheidung beruht und derzeit nicht ausreichend belegt scheint. Zum anderen führt die Ausweitung der Diagnosekriterien auf statistisch nicht gesicherte Parameter nicht unbedingt zu einer Verbesserung der APS Diagnostik und ist zusätzlich mit höheren Kosten verbunden¹²⁰. Hinzu kommt, dass aPL weltweit immer noch uneinheitlich detektiert werden. Bei Vergleichen zwischen 10 Laboren zeigte sich, dass die Konkordanz bezüglich der Resultate lediglich bei 55% lag¹²¹. Im Weiteren wird die Diagnose eines APS dadurch erschwert, dass auch in 5% der gesunden Normalbevölkerung aPL nachgewiesen werden können¹²².

1.2.5 Ätiologie / Pathogenese

Obwohl aus zahlreichen Tiermodellen hervorgeht, dass aPL mit hoher Wahrscheinlichkeit ursächlich an der Pathogenese des APS beteiligt sind, bleibt der zugrunde liegende Mechanismen unklar. So konnte zwar gezeigt werden, dass die Gabe von aPL-IgG Fraktionen aus Seren von APS oder SLE-Patienten oder auch von monoklonalen murinen und humanen aPL zu einer Entstehung von Thrombosen führt. Unklar bleibt jedoch warum eine große Zahl von Patienten trotz hoher aPL-Titer asymptomatisch bleiben. Einen Erklärungsversuch bietet die so genannte „Two-Hit-Hypothese“. aPL als „first hit“ erhöhen das thrombotische Risiko. Die Thrombose entsteht allerdings erst wenn ein „second hit“ hinzukommt¹²³. Im Zusammenhang mit APS wird eine Parvovirus Infektion als möglicher „second hit“ diskutiert¹²⁴.

Rezeptoren des angeborenen Immunsystems wie beispielsweise TLRs, die in die Erkennung mikrobieller Strukturen involviert sind, können die ausgelöste Gerinnungskaskade triggern^{125,126}. So werden unter Einbezug von MyD88, TRAF6, p38MAPK sowie der Aktivierung von NF- κ B intrazelluläre Signalwege ausgelöst, welche die Proteinexpression von Tissue factor (TF) auf Endothelzellen (EC) und Monozyten induzieren können¹²⁷⁻¹²⁹. Ein weiterer wesentlicher Mediator insbesondere im Hinblick auf Schwangerschaftskomplikationen, ist das Komplementsystem. Seine Aktivierung führt einerseits über direkte Zerstörung der Membran aber auch durch die Attraktion von Monozyten und neutrophilen Granulozyten mit Freisetzung toxischer Produkte (proteolytische Substanzen) zur Zellschädigung. Bisläng sind jedoch noch keine Daten vorhanden, die eine Beteiligung des Komplementsystems an vaskulären Manifestationen beschreiben¹³⁰⁻

132

1.3 Ziel der Arbeit

APL stellen nach bisherigen Erkenntnissen eine heterogene Gruppe von Autoantikörper dar, die vermutlich an der Pathogenese des APS maßgeblich beteiligt sind. Um die zugrunde liegenden Mechanismen aufklären zu können, eignen sich monoklonale aPL, die aus entsprechendem Patientenmaterial gewonnen wurden, da sie ein reproduzierbares und einheitliches Reagenz darstellen.

In unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass ein β 2GPI unabhängiger monoklonaler aPL (HL5B) in humanen Monozyten die Sekretion von $\text{TNF}\alpha$ sowie eine verstärkte Expression von TLR8 induziert. Ähnliche Ergebnisse konnten für TLR7 in humanen pDCs beobachtet werden. Da TLR7 und TLR8 sehr homolog sind (beide erkennen ssRNA und sind auf Aminosäure-Ebene zu 42% identisch) und als funktionell austauschbar betrachtet werden, gehen wir davon aus, dass in pDCs und Monozyten der gleiche Signalweg durch aPL ausgelöst wird

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der genaue zeitliche sowie kausale Zusammenhang zwischen TLR Hochregulierung und Zytokin Produktion näher untersucht werden. Weiterhin sollten der zugrunde liegende Signalweg aufgeschlüsselt werden. Die Experimente sollten soweit möglich an humanen pDCs durchgeführt werden, da pDCs im Gegensatz zu Monozyten kein TLR4 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. TLR4 wird vor allem von den Arbeitsgruppen um Meroni und Pierangeli als der zentrale Rezeptor in Signaltransduktion durch aPL angesehen. Bislang konnte die in Monozyten beobachtete Signaltransduktion nicht eindeutig als TLR4 unabhängig identifiziert werden. Versuche an humanen pDCs ermöglichen hingegen die Aufklärung TLR4 unabhängiger Mechanismen.

2 Material

2.1 Geräte

Material	Hersteller	Sitz
Brutschränke	Binder Nuaire	Tuttlingen Plymouth, USA
Chemilumineszenz Platten Reader	Berthold	Bad Wildbad
FACS Canto I	BD Bioscience	Heidelberg
Gefrierschrank -80°C	Forma Scientific-Thermo	Dreieich
Heizblock	HLC Biotech	Bovenden
Inverses Mikroskop	Leica	Wetzlar
konfokales Mikroskop LSM 710	Zeiss	Göttingen
Kühl- und Gefrierschränke	Liebherr	Ochsenhausen
Neubauer Zählkammer	Roth	Karlsruhe
PicoFuge	Stratagene	La Jolla, USA
Pipettierhilfen	Hirschmann Laborgeräte Eppendorf	Eberstadt Hamburg
iQ5 Real-time PCR Gerät	Bio-Rad	München
Spektrophotometer	Peqlab	Erlangen
Sterilwerkbänke	Heraeus Nuaire	Hanau Plymouth, USA
Tecan ELISA Reader	Tecan	Männedorf, Schweiz
Vortexer	VWR	Darmstadt
Wasserbad	Köttermann	Hänigsen
Zentrifugen	Heraeus Eppendorf	Hanau Hamburg

2.2 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Sitz
Combitipps	Eppendorf	Hamburg
Cryoröhrchen	Nunc	Wiesbaden
Einwegpipetten	Greiner Bio-One	Frickenhausen
Eppendorf Cups	Sarstedt	Nümbrecht
FACS Röhrchen	BD Bioscience	Heidelberg
Glaswaren	Schott	Mainz
LabTec Chamber Slide	Nunc	Wiesbaden
PCR-Reaktionsgefäße	Brand	Wertheim/Main
Pipettenspitzen	Sarstedt	Nümbrecht
Zellkulturplatten	Nunc	Wiesbaden
Zellsiebe	BD Biosciences	Franklin Lakes, USA

2.3 Chemikalien, Lösungen, Zellkulturmedien

Material	Hersteller	Sitz
Acrylamid	Bio-Rad	München
Allopurinol	Sigma-Aldrich	Steinheim
APDS	Sigma-Aldrich	Steinheim
Apocynin	Sigma-Aldrich	Steinheim
Aqua ad iniectabilia	B. Braun	Melsungen
Aqua B. Braun	B. Braun	Melsungen
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich	Steinheim
BSA	Invitrogen	Karlsruhe
Chelerythrine	Sigma-Aldrich	Steinheim
Coomassie-Blue	Bio-Rad	München
DHE	Invitrogen	Karlsruhe
DMSO	Sigma-Aldrich	Steinheim
DOTAP	Roche	Mannheim
D-PBS	Invitrogen	Karlsruhe
DTT	Sigma-Aldrich	Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich	Steinheim
Essigsäure	ROTH	Karlsruhe
Ethanol	Merck	Darmstadt
Ethidiumbromid	Invitrogen	Karlsruhe
FCS	PAA Laboratory GmbH	Pasching, Österreich
Glycerol	Sigma-Aldrich	Steinheim
Glyoxal	Sigma-Aldrich	Steinheim
IRS661, IRS869	IBA	Marburg
L-012	Sigma-Aldrich	Steinheim
L-Glutamin	Invitrogen	Karlsruhe
LPS (Lipopolysaccharid)	Alexis	Aldrich
Luminol	Sigma-Aldrich	Steinheim
Lymphozytenseperationsmedium	PAA Laboratory GmbH	Pasching, Österreich
Lyso-Tracker DND99	Invitrogen	Karlsruhe
Magermilchpulver	Merck	Darmstadt
Makrophagen-SFM	Invitrogen	Karlsruhe
Methyl- β -cyclodextrin	Sigma-Aldrich	Steinheim
NaCl	ROTH	Karlsruhe
N-Acetylcystein	Sigma-Aldrich	Steinheim
NaOH	Merck	Karlsruhe
NFA	Sigma-Aldrich	Steinheim
Nystatin	Sigma-Aldrich	Steinheim
OxyBURST H ₂ HFF-BSA	Invitrogen	Karlsruhe
PEG-SOD	Sigma-Aldrich	Steinheim
PVDF-Membran	Bio-Rad	München
R848	Invitrogen	Karlsruhe
RNase	Quiagen	Hilden
RPMI-1640 Medium	Invitrogen	Karlsruhe
Ro106-9920	Torcis	Bristol, UK
nicht-essentielle Aminosäuren	Invitrogen	Karlsruhe
Schwefelsäure	ROTH	Karlsruhe
SDS	ROTH	Karlsruhe
SlowFade Mounting Medium	Invitrogen	Karlsruhe
Sodium Pyruvat	Invitrogen	Karlsruhe
TEMED	ROTH	Karlsruhe
TMB Substrat	Sigma-Aldrich	Steinheim
Tris	Sigma-Aldrich	Steinheim
TritonX-100	Sigma-Aldrich	Steinheim
Trypanblau	Sigma-Aldrich	Steinheim
Tween20	Sigma-Aldrich	Steinheim

2.4 Medien, Puffer

· Zellkultur

RPMI komplett Medium:	10% (v/v) FCS / 1% Natrium-Pyruvat / 1mM nicht-essentielle Aminosäuren / 4 mM L-Glutamin in RPMI-1640, pH 7,2
MACS-Puffer	2 mM EDTA / 0,5% (v/v) FCS in PBS
KRP-Puffer:	1 mM Ca ² / 1 mM Mg ²⁺ in PBS

· ELISA

Wasch-Puffer:	0,1% (v/v) Tween20 in PBS
Block-Puffer:	1% (v/v) Tween20 in PBS

· Zellyse

Denaturierender Lysepuffer	1% SDS (w/v) / 50 mM TrisCl (pH 7,4) / 5 mM EDTA / 10 mM DTT / 1mM PMSF / DNAs in ddH ₂ O
----------------------------	--

· SDS-PAGE

6x Laemmli-Puffer:	1 M Tris-HCl (pH 6,8) / 10,28% (w/v) SDS / 36% (v/v) Glycerol / 5% (v/v) 2-Mercaptoethanol / 0,012% (w/v) Bromphenolblau in ddH ₂ O
Lauf-Puffer:	192 mM Glycin / 25 mM Tris / 0,1% (w/v) SDS

· Westernblot

Transfer-Puffer:	48 mM Tris / 39 mM Glycin / 1,3 mM SDS / 20% (v/v) Methanol in ddH ₂ O
TBST-Puffer:	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) / 150 mM NaCl / 0,05% (v/v) Tween20
Blocking-Puffer:	2,5 g Magermilchpulver in 50 ml TBST

· Durchflusszytometrie

Cellwash:	0,1% Natriumazid in PBS
Fixier-Puffer:	2% (w/v) Formalin in PBS
Permeabilisierungs-Puffer:	0,1% (v/v) TritonX-100 in PBS

· Immunfluoreszenz

Fixier-Puffer:	2% (w/v) Formalin in PBS
Block-Puffer:	1% (w/v) BSA / 0,2% (v/v) TritonX-100 / 5% (v/v) Goat-Serum in PBS
Färbe-Puffer:	1% (w/v) BSA / 0,05% (v/v) TritonX-100 in PBS

· Aufreinigung von humanem IgG über Protein G HP-Säulen

Bindungs-Puffer:	20 mM Natriumphosphat, pH 7,0 in PBS
Elutions-Puffer:	0,1 M Glycin-HCl, pH 2,7 in PBS
Neutralisierungs-Puffer:	2 M Tris-HCl, pH 9,0 in PBS

2.5 Vorgefertigte Systeme (Kits)

Material	Hersteller	Sitz
Cardiolipin ELISA	Aesku	Wendelsheim
CFSE Labeling Kit	Invitrogen	Karlsruhe
Duo Set ELISA Kit (IL-6, IL8)	R&D Bioscience	Minneapolis, USA
ECL-Plus-Detection Kit	GE Healthcare	München
FITC Antibody Labeling Kit	Thermo Fischer Scientific	Rockford, USA
IFN α Platinum ELISA	Bender MedSystems	Wien, Österreich
i-script, System für Reverse Transkription	Bio-Rad	München
Limulus-Amöbozyten-Lysat Test	Lonza	Basel, Schweiz
MicroBeads (CD3, CD19, CD304)	Miltenyi Biotec	Bergisch Gladbach
peqGOLD total RNA Kit	Peqlab	Erlangen
Sybr green PCR Kit	Bio-Rad	München
TNF α DuoSet ELISA	R&D Systems	Minneapolis, USA
Turbo-DNA-free	Ambion	Austen, USA

2.6 Primäre Antikörper

Antikörper,	Isotyp	Markierung	Hersteller	Verwendung
anti human β -Aktin	rabbit IgG polyklonal	keine	Epitomics	WB
anti human CD3	mouse IgG _{2a} , κ	PE	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD4	mouse IgG _{2a} , κ	APC-Cy7	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD8	mouse IgG ₁ , κ	PE-Cy7	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD19	mouse IgG ₁ , κ	Biotin, FITC, PE	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD20	mouse IgG ₁ , κ	Per-CP-Cy5.5	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD38	mouse IgG _{2a} , κ	APC	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD40	mouse IgG ₁ , κ	APC	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD80	mouse IgG ₁ , κ	FITC	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD86	mouse IgG ₁ , κ	Biotin	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD123	mouse IgG ₁ , κ	APC, FITC, PE	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD138	mouse IgG ₁ , κ	FITC	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD212	mouse IgG ₁ , κ	PE	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CD303	mouse IgG ₁ , κ	APC, FITC, PE	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human Calnexin	mouse IgG ₁ , κ	keine	Abcam	IF
anti human CCR7	rat IgG _{2a} , κ	PE-Cy7	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human CRTH2	rat IgG _{2a} , κ	AlexaFluor647	BD Bioscience	Flow-Cyt.
anti human EEA1	rabbit IgG polyklonal	keine	Abcam	IF
Humira	human IgG ₁	keine	Abbott	Zellkultur
HL5B	human IgG _{2b} , λ	keine, FITC	eigenes Labor	Zellkultur, IF
HL7G	human IgG _{2b} , λ	keine, FITC	eigenes Labor	Zellkultur, IF
anti human IFN α	mouse IgG ₁ , κ	FITC	ImmunoKontakt	Flow-Cyt.
JGG9	human IgM	keine	eigenes Labor	Zellkultur
RR7F	human IgG _{2b} , κ	keine	eigenes Labor	Zellkultur
TLR7	mouse IgG ₁ , κ	Per-CP-Cy5.5	R&D	Flow-Cyt
TLR7	mouse IgG ₁ , κ	keine	ThermoFischer	WB
TLR8	mouse IgG ₁ , κ	Biotin	Alexis	Flow-Cyt.
anti human TNF α	mouse IgG _{2a} , κ	Per-CP-Cy5.5	BD Bioscience	Flow-Cyt

2.7 Sekundäre Antikörper, Isotypen-Kontrollen

Antikörper	Markierung	Hersteller	Verwendung
goat anti mouse IgG	AlexaFluor488, Alexa Fluor 546, HRP	Abcam	IF, WB
goat anti rabbit IgG	AlexaFluor488, Alexa Fluor 546, HRP	Abcam	IF, WB
mouse IgG ₁ , κ	APC, Biotin, FITC, PE, PE-Cy7	BD Bioscience	Flow-Cyt
mouse IgG _{2a} , κ	APC, APC-Cy7, PerCP-Cy5.5	BD Bioscience	Flow-Cyt
rat IgG _{2a} , κ	AlexaFluor647, PE-Cy7	BD Bioscience	Flow-Cyt
Streptavidin	APC, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy7	BD Bioscience	Flow-Cyt, IF

2.8 Mausstämme

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche wurden entsprechend dem Tierschutzgesetz durchgeführt. Die dafür eingesetzten Tiere stammen aus der Zentralen Versuchstiereinrichtung der Universitätsmedizin Mainz. Es wurden ausschließlich weibliche Tiere verwendet, die zum Zeitpunkt des Experiments 2-5 Monate alt waren.

Bezeichnung	Eigenschaften
C57BL/6	Wildtyp-Kontrolle
tlr7 ^{-/-} , tlr9 ^{-/-} , MyD88 ^{-/-}	Knock-out Stamm bei dem das Gen für TLR7, TLR9 bzw. MyD88 inaktiviert wurde. Hintergrund ist C57BL/6.
C3H TLR2 ^{-/-}	Doppel-Knock-out. Einerseits trägt der Inzuchtstamm C3H/HeJ eine natürliche Mutation im Tlr4 Gen, die ihn unempfindlich gegenüber Endotoxin macht. Auf den C3H/HeJ genetischen Hintergrund wurde darüber hinaus der TLR2 (toll like receptor 2) Knock-out Defekt eingekreuzt. Der Stammhintergrund ist C3H/HeJ
Gp91 ^{phox^{-/-}}	Beim knock-out Mausstamm B6-gp91 wurde das Exon 3 des gp91-Gens durch eine Neomycin-Resistenzkassette ersetzt. Der genetische Hintergrund ist C57BL/6
Gpx1 ^{-/-}	Der Gpx1 Stamm trägt einen Knock-out Defekt des zellulären Glutathione peroxidase Gens (GSHPx-1). Der genetische Hintergrund ist C57BL/6
p47 ^{phox^{-/-}}	Beim p47phox ^{-/-} -Knockout-Mausstamm wurde das Exon 7 der p47 Untereinheit der NADPH Oxidase durch eine Neomycinresistenzkassette ersetzt. Der Stamm verfügt nicht über einen standardisierten genetischen Hintergrund.

2.9 Primer

Alle verwendeten Primer wurden bei Invitrogen (Karlsruhe) bestellt. Vor der Verwendung wurden die Primer auf 5 pmol/ μ l verdünnt.

Primer	Sequenz	
β -Aktin	Fwd	GGCATCCTCACCCCTGAAGTA
	Rev	GGGGTGTGGAAGGTCTCAAA
IFN α	Fwd	GCAAGCCCAGAAGTATCTGC
	Rev	ACTGGTTGCCA TCAAACCTCC
Ifn α (Maus)	Fwd	TCCATCAGCAGCTCAATGAC
	Rev	GCAACTTGGCTGAGGAAGAC
TLR7	Fwd	CTGTGTGGTTTGTCTGGTGG
	Rev	AGA TCACACTTTGGCCCTTG
Tlr7 (Maus)	Fwd	CAGCCATAACCAGCTGACAA
	Rev	TTGCAAAGAAAGCGATTGTC
TLR8	Fwd	TTTTCTTCATTGGGCCAAAC
	Rev	GAATGGCTGAAAATTCAGTTCC
TLR9	Fwd	ATTCTGACTTTGCCACCTG
	Rev	GCTGAGGGACAGGGATATGA
TNF α	Fwd	AGGGACCTCTCTAATCAGCC
	Rev	GGGCTACAGGCTTGTCCTC
Tnf α (Maus)	Fwd	CGTCAGCCGATTTGCTATCT
	Rev	CGGACTCCGCAAAGTCTAAG

2.10 Softwaretools

Software	Hersteller
DIVA Software	BD Bioscience, Franklin Lakes, USA
FlowJo	Treestar, Ashland, USA
IQ5	Bio-Rad, München
Magellan V5.03	Tecan, Männedorf, Schweiz
QuantityOne V4.5.0	Bio-Rad, München
Sigmaplot	Systat, Chicago, USA

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Aufreinigung von mononukleären Zellen aus „Buffy Coats“

Als Ausgangsmaterial für die Aufreinigung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC = peripheral blood mononuclear cells) dienten „Buffy Coats“ aus der Blutbank der Universitätsmedizin Mainz. Dieses Lymphozytenkonzentrat, welches man nach dem Abzentrifugieren von Vollblut erhält, wurde 1:3 mit PBS verdünnt und anschließend über einen Ficoll Gradienten (Dichte 1,077 g/ml) zentrifugiert (350 g, 30 min, RT, ohne Bremse); die Erythrozyten und Granulozyten sedimentierten, Thrombozyten verblieben in der wässrigen Phase, während Lymphozyten, Monozyten, Dendriten und NK-Zellen sich in der Interphase ansammelten. Die Interphase wurde abgenommen und mehrmals mit PBS gewaschen.

3.1.2 Isolierung von PBMCs aus Patientenblut

Periphere venöse Blutproben (10ml) von APS Patienten (Diagnose Kriterien nach Wilson ¹¹⁷) sowie von RA-Patienten wurden in sterilen EDTA-Röhrchen aus der Hämatologie der Uniklinik Mainz geliefert. Das Blut wurde in ein PP Röhrchen überführt und auf 30 ml mit 1x PBS verdünnt. Anschließend erfolgte die Überschichtung auf einen Ficoll Gradienten sowie alle folgenden Schritte analog zu der in 3.1.1 beschriebenen Methode.

3.1.3 Isolierung verschiedener Zellpopulationen mittels MACS

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellpopulationen (pDC, B-Zellen, T-Zellen) wurden aus PBMCs über Positiv-Selektion isoliert. Diese Methode basiert auf der Verwendung von Magnet-Bead-markierten Antikörpern die gegen jeweils spezifische Marker gerichtet sind (CD304 für pDCs, CD19 für B-Zellen und CD3 für T-Zellen). Die Zellsuspension wurde zunächst mit 15 ml MACS-Puffer gewaschen und anschließend in 300 µl MACS-Puffer sowie 100 µl der jeweiligen Beads aufgenommen. Bei der Isolierung von pDCs wurden zusätzlich 100 µl FcR-Block-Reagenz zugefügt.

Die Inkubation erfolgte für 20 min bei 4°C. Anschließend wurde die Suspension über eine Säule gegeben, die in einem Magnetständer fixiert ist. Die Antikörper-markierten Zellen verbleiben in der Säule die übrigen Zellpopulationen der PBMCs durchlaufen diese. Mehrmaliges Waschen mit MACS-Puffer erhöhte die Homogenität der Zellpopulation. Zur Elution der Zellen wurde die Säule aus dem Magnet entnommen und unter Verwendung eines Kolbens mit 5 ml MACS-Puffer gespült.

3.1.4 Isolierung muriner DCs

Die Mäuse wurden mittels zervikaler Dislokation getötet. Unmittelbar danach wurde die Milz entnommen und mechanisch über einem Zellsieb zerkleinert. Die Isolierung der murinen DCs erfolgte wie in 3.1.3 beschrieben mit Magnet-Bead-markierten Antikörpern gegen CD11c.

3.1.5 Zellzählung

Die Zählung der Zellen erfolgte mit der Neubauer Zählkammer. Die Zellsuspension wurde mit 0,4% Trypanblau verdünnt. Da Trypanblau nur durch poröse Zellmembranen in die Zellen eindringen kann, erscheinen lebende Zellen im Mikroskop hell. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt und der Mittelwert bestimmt. Für die Berechnung der Zellzahl pro ml wurde mit dem Faktor 10.000 und dem Verdünnungsfaktor multipliziert. War nun die Gesamtzahl der lebenden Zellen bekannt, so konnte darüber das Verdünnungsvolumen bestimmt werden, welches zur Einstellung der gewünschten Zellzahl (Zellen / ml) benötigt wurde.

3.1.6 Kultivierung der Zellen

Die isolierten pDCs, murinen DCs bzw. PBMCs aus Patientenblut wurden in einer Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml in serumfreien SFM Medium auf 48-Well Platten ausplattiert (je 1ml pro Well).

Monomac1 Zellen wurden in RPMI komplett Medium kultiviert und 16 h vor der Stimulation in serumfreies SFM Medium ungesetzt. Die Inkubation bis zur Stimulation erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank.

3.1.7 Stimmulationsversuche

Die Stimulation wurde frühestens 2 h (in der Regel am nächsten Morgen) nach dem Ausplattieren der Zellen durchgeführt. Die verschiedenen Stimuli wurden in den angegebenen Konzentrationen direkt ins Medium zugegeben.

3.1.8 Inhibitionsversuche

Die TLR Inhibitoren (IRS661 und IRS869) wurden wie bei Barrat et al.¹³³ beschrieben zunächst für 10min mit DOTAP vorinkubiert. Gleiches wurde für den NF-κB Inhibitor Ro106-9920 angewendet. Die übrigen inhibitorischen Reagenzien konnten direkt ins Medium zugegeben werden. Die Inhibitoren erfolgte 30 min vor der Stimulation.

3.1.9 Konfokale Mikroskopie lebender Zellen

Humane pDCs oder Monomac1 Zellen wurden für 2 h in RPMI w/o Phenol-Rot mithilfe des Lab-Tek™ Chamber Slide™ Systems direkt auf dem Objektträger kultiviert. Der LysoTracker bzw. die fluoreszenzmarkierten Antikörper wurden ins Medium zugegeben. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen am Zeiss LSM 710 NLO konfokalen Mikroskop visualisiert.

3.1.10 Messung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Für den Nachweis einer intrazellulären ROS Produktion wurden Monomac1 Zellen (10⁶/ml) in KRP-Puffer mit 100 μM L-012 für 20 min bei 37°C mit IgG oder HL5B stimuliert.

Zur Identifizierung der ROS Quelle wurden Inhibitoren gegen die NADPH Oxidase (Apocynin), die Protein Kinase C (Chelerythrin) und die Xanthin Oxidase (Allopurinol) sowie ROS-Scavenger (PEG-SOD, N-Acetylcystein) zugegeben. Die extrazelluläre ROS Produktion wurden die Zellen wie oben beschrieben stimuliert und dann für 20 min in KRP-Puffer mit 100 μM Luminol / 0,1 μM HRP inkubiert. Die Reaktion mit ROS führte zu einer Strukturänderung der Detektionsreagenzien, die daraufhin Chemilumineszenz oder veränderte Exzitations- oder Emissionswellenlängen zeigten. Diese Veränderungen wurden mit einem 96-well Mikrotiterplatten Lesegerät für Chemilumineszenz bzw. Fluoreszenz detektiert. Der Nachweis einer endosomalen ROS Produktion wurde mithilfe des Reagenzes OxyBURST Green H₂HFF-BSA durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 2 min in KRP-Puffer und 10 $\mu\text{g/ml}$ H₂HFF-BSA inkubiert und anschließend mit HL5B oder IgG stimuliert. Die durch die ROS Produktion verursachte Fluoreszenz wurde am konfokalen Mikroskop oder am Durchflusszytometer detektiert.

3.1.11 Nachweis der Superoxid Produktion via HPLC

Die spezifische Messung von Superoxid erfolgte mit dem DNA-Interkalationsfarbstoff Dihydroethidium (DHE), welcher durch Superoxid das spezifische Produkt 2-Hydroxyethidium (2-HE) bildet, mit anderen ROS hingegen ein Ethidiumkation (E⁺). Durch die Auftrennung der unterschiedlichen Produkte mittels HPLC können die entstandenen Produkte differenziert detektiert werden. Zur Messung wurden die Zellen zunächst für 20 Minuten mit DHE (500 μM) in PBS (1mM Ca²⁺/Mg²⁺) vorinkubiert, gewaschen und anschließend für zwei Stunden mit DHE (50 μM) und DMNQ (100 μM) in KRP-Puffer behandelt. Zur Lyse wurde das Medium abgenommen und die Zellen mit Acetonitril überdeckt. Nach Überführung der Zellsuspension in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß, erfolgte die eigentliche Lyse durch Ultraschall. Die Zellsuspension wurde mit dem gleichen Volumen KRP-Puffer verdünnt und die DHE-Oxidationsprodukte durch zehninütiges Vortexen extrahiert. Anschließend wurden die festen Zellstandteile abzentrifugiert und 200 μl des Überstands in die HPLC eingeschleust. Ein Hochdruckgradient wurde mittels Acetonitril und 25 mM Citrat-Puffer, pH 2.2 bei folgenden Anteilen des organischen Lösungsmittels erzielt: 0min, 36%; 7min, 40%; 8-12min, 95%; 13min, 36%.

DHE wurde über seine Absorption bei 354 nm detektiert während 2-Hydrodroxyethidium und Ethidium über die Fluoreszenz nachgewiesen wurden (Ex. 480nm/ Em. 580nm). Das Signal wurde gegen die Zellzahl normalisiert.

3.1.12 MLR („mixed leucocyte reaction“)

Die MLR wurde in 96-Well-Platten durchgeführt. Pro Well wurden 5×10^4 pDCs vorgelegt und wie in 3.1.7 stimuliert. Anschließend wurden 5×10^5 allogene T-Zellen sowie (je nach Versuchansatz) 5×10^5 B-Zellen pro Well zugegeben. Die Kokultur erfolgte für 5-8 Tage in RPMI komplett Medium.

3.1.13 Transwell-Experimente

In einigen Experimenten wurde ein Transwell-Kokultursystem verwendet, in dem die untere Zellkammer von der oberen durch eine $0,2 \mu\text{m}$ Anapore-Membran getrennt ist. Durch die $0,2 \mu\text{m}$ -Membran ist ein Austausch löslicher Faktoren möglich, nicht jedoch direkter Zell-Zell-Kontakt. Isolierte B-Zellen (5×10^5 CD19+CD20+ B-Zellen) wurden in 500 μl RPMI komplett Medium aufgenommen und in die obere Kammer gegeben während 5×10^4 pDCs und 5×10^5 T-Zellen in der unteren Kammer mit den entsprechenden Stimuli inkubiert wurden.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 RNA Isolierung

Die RNA-Isolierung wurde mit dem peqGOLD Total RNA Kits durchgeführt. Das Kit basiert auf einem zwei Säulen-System. Über eine genomische DNA-Säule erfolgte die Elimination genomischer DNA vor der eigentlichen RNA-Isolierung. Die RNA-Säule nutzt die selektive Bindungseigenschaft einer Silikagel-Membran und die Mikrosäulen-Zentrifugationstechnik in Kombination.

Durch Zugabe von Ethanol wurden Wasserstoffbrückenbindungen zwischen RNA-Molekülen und OH-Silikat-Atomen ausgebildet und die RNA wurde selektiv an die Silikagel-Membran gebunden. Die Elution erfolgte mit RNase freiem Wasser. Es wurde entsprechend der Herstellerangaben gearbeitet. Die im Wasser gelöste RNA wurde bei -80°C bis zur reversen Transkription gelagert.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung im NanoDrop

Nach der RNA-Isolierung (siehe 3.2.1) wurde die Konzentration jeder Probe in einem Nano-Drop Spektralphotometer bestimmt. Für die Messung wurde in Doppelbestimmung mit je $2\ \mu\text{l}$ Probe durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde durch Absorptionsmessung bei der Wellenlänge $260\ \text{nm}$ ermittelt. Durch die Beurteilung des Verhältnisses der Extinktionen bei 230nm , 260nm und 280nm konnte zusätzlich eine Klassifizierung der Probenreinheit vorgenommen werden. Der Absorptionsquotient $A_{260}/280$ für reine RNA liegt zwischen $1,8$ und $2,0$. Maximale Extinktionen bei 230 und 280nm weisen auf Verunreinigungen durch Salze bzw. Proteine hin. Verunreinigte Proben wurden von weiteren Versuchen ausgeschlossen.

3.2.3 Reverse Transkription

Die reverse Transkription von Gesamt-RNA in cDNA wurde mit dem iScript™cDNA Synthesis Kit von Bio-Rad durchgeführt. Der Mastermix dieses Kits enthält neben Desoxyribonukleosidtriphosphaten, Random-Hexamer-Primer sowie Oligo-dT-Primer. Pro Ansatz wurden $15\ \mu\text{l}$ RNA mit einer Gesamtkonzentration von 100ng sowie $4\ \mu\text{l}$ 5x iScript Mastermix und $1\ \mu\text{l}$ iScript Reverse Transkriptase eingesetzt. In einem Thermocycler wurde die reverse Transkription nach $5\ \text{min}$ Inkubation bei 25°C durch $30\ \text{min}$ Inkubation bei 42°C vorgenommen. Die RNA-abhängige DNA Polymerase wurde im Anschluss durch 5-minütige Inkubation bei 85°C inaktiviert.

3.2.4 Fällung der cDNA

Um Störungen der PCR (polymerase chain reaction) durch Komponenten der reversen Transkription zu vermeiden, wurde die cDNA gefällt, bevor sie in die PCR eingesetzt wurde. Dazu wurde zu der cDNA das 3,5fache Volumen an 100% Ethanol zugeben und über Nacht bei -20°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 1 h bei 13.000 x g wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 100 µl 75% Ethanol aufgenommen. Nach einer weiteren Zentrifugation (15 min, 13000g) wurde der Überstand abgenommen und das Pellet bei 45°C vollständig getrocknet. Abschließend wurde die getrocknete cDNA entsprechend des Ausgangsvolumens in RNase-freiem Wasser aufgenommen und bei 45°C für 1h renaturiert. Die gefällte cDNA wurde nach erneuter Konzentrationsbestimmung im NanoDrop (vgl. 3.2.2) bei -20°C eingefroren oder direkt in die PCR eingesetzt.

3.2.5 Quantitative PCR

Die quantitative *real time* PCR Reaktion, die auf die reverse Transkription folgt (qRT PCR = quantitative reverse transcription PCR) wurde mit dem iQ5 real-time PCR Detektion System durchgeführt. Bei der *real time* PCR wird dem PCR-Ansatz der Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green zugesetzt, der mit Doppelstrang-DNA einen charakteristisch fluoreszierenden Komplex eingeht. Somit lässt sich bei jedem Temperaturzyklus der PCR der Anstieg der Fluoreszenz als Maß für die Produktentstehung verfolgen (daher „Echtzeit“- PCR). Zudem kann am Ende der Reaktion eine Schmelzkurve des Produktes aufgenommen werden. Dadurch ist überprüfbar, ob mehrere Produkte entstanden sind. Der Anstieg der Fluoreszenz bei der PCR-Reaktion lässt auf die Ausgangsmenge der amplifizierten Sequenz schließen. Dazu wird die Anzahl der Temperaturzyklen (Ct-Wert) bestimmt, ab der die Fluoreszenz einen fixen Wert innerhalb der exponentiellen Phase der Reaktion erreicht. Je höher der Ct-Wert ist desto geringer war die Ausgangsmenge der amplifizierten DNA.

Der relative Expressionsunterschied einer Probe zwischen der Behandlung und der Kontrolle, normalisiert zu einem Referenzgen und bezogen auf eine Standardprobe, ergibt sich aus der arithmetischen Formel $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$$\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ Behandlung} - \Delta Ct \text{ Kontrolle}$$

Die Reaktionen wurden in 96-well Multititerplatten in einem Gesamtvolumen von 20 μ l durchgeführt. Ein Reaktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Sybr-green Mastermix	10 μ l
ddH ₂ O	4 μ l
<i>forward</i> -Primer	0,5 μ l
<i>reverse</i> -Primer	0,5 μ l
cDNA (2 ng/ μ l)	5 μ l
Endkonzentration	20 μl

3.3 Immunologische/proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Beim ELISA handelt es sich um einen sowohl quantitativen als auch qualitativen Immunoassay. Eingesetzt werden ELISA zum ausgewählter Moleküle auf der Grundlage einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Ein Reaktionspartner ist dabei jeweils markiert, so dass eine messbare Nachweisreaktion ablaufen kann. Die Intensität der Nachweisreaktion ermöglicht final eine Quantifizierung der betreffenden Proteine im Vergleich zu einem Standard.

3.3.1.1 IFN α ELISA

Die IFN α Konzentration im Zellkulturüberstand wurde mit kommerziell erhältlichen direkten ELISA-Kits bestimmt. In diesen Kits ist die Mikrotiterplatte bereits mit anti-IFN α -Antikörpern beschichtet und blockiert. Die Inkubation der Zellkulturüberstände erfolgte entsprechend der Herstellerangaben.

3.3.1.2 TNF α ELISA

Die Bestimmung der TNF α Konzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen Sandwich-ELISA entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.1.3 LBPA ELISA

Die Mikrotiterplatte wurde mit 50 $\mu\text{g/ml}$ LBPA in 98% Ethanol und 2% Chloroform über Nacht bei 4°C beschichtet. Danach wurde die Platte für 2 h bei RT mit 10% FCS blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Probe in der angegebenen Verdünnung (Endvolumen 100 μl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 μl Konjugat in einer 1:10.000 Verdünnung zugegeben. Auf ein erneutes Waschen folgte die Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB). Nach 30 min wurde die Reaktion mit je 100 μl H₂SO₄ gestoppt und die Adsorption bei 450 im ELISA Reader detektiert.

3.3.1.4 IgM / IgG ELISA

Die Bestimmung der IgM bzw. IgG Konzentration in Zellkulturüberständen erfolgte nach dem Sandwich-Prinzip. Als Fang-Antikörper wurde ein muriner Antikörper verwendet, der an den Fc-Teil des humanen IgM- bzw. IgG-Moleküls bindet. Als Konjugat diente ein Peroxidase (POD)-markierter muriner Antikörper der den Fab-Teil des IgG oder IgM erkennt.

Die Mikrotiterplatte wurde mit 2 $\mu\text{g/ml}$ Fangantikörper in PBS über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit 200 μl Wasch-Puffer erfolgte die Blockierung mit Block-Puffer. Anschließend wurde erneut dreimal mit Wasch-Puffer gewaschen. Die Probe wurde in einer geeigneten Verdünnung (Endvolumen 100 μl) für 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Quantifizierung der IgM bzw. IgG Menge wurde mit Hilfe von geeignetem humanen IgM (IgG) eine Standardkurve (6,26 ng/ml – 100 ng/ml) erstellt, die auf jeder ELISA-Platte mitgeführt wurde. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100 μl Konjugat in einer 1:10.000 Verdünnung zugegeben. Auf ein erneutes Waschen folgte die Zugabe des Substrates Tetramethylbenzidin (TMB).

Durch die Umsetzung des Substrates entsteht ein blauer Farbstoff. Durch Zugabe von Schwefelsäure (H₂SO₄) nach 30 min wurde die Reaktion gestoppt und der Farbstoff von blau in gelb überführt. Die Messung der Adsorption erfolgte bei 450 nm am ELISA-Reader.

3.3.1.5 Cardiolipin ELISA

Die Konzentration von anti-Cardiolipin Antikörpern des IgM bzw. IgG Isotyps wurde im Zellkulturüberstand mit kommerziell erhältlichen direkten ELISA-Kits bestimmt. In diesen Kits ist die Mikrotiterplatte bereits mit Antigen beschichtet und blockiert.

Die Inkubation der antikörperhaltigen Probe und der Nachweise von gebundenem IgM oder IgG wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

3.3.2 Westernblot

Beim Westernblot-Verfahren werden Proteine mit immunochemischen Methoden detektiert. Dazu werden die Zellen nach der Stimulation zunächst lysiert und das Gesamtprotein mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend transferiert man die Proteine mit Blotting-Verfahren auf eine Membran. Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgt mit Hilfe spezifischer Antikörper.

3.3.2.1 Probenvorbereitung

Die Zellen wurden direkt auf der Kulturplatte lysiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, 500 µl Lyse-Puffer pro Well zugegeben und die Platte über Nacht bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde die Zellmembran durch Ultraschallbehandlung (10 sec) vollständig zerstört. Anschließend wurden die löslichen zellulären Bestandteile von den Membranbestandteilen durch Zentrifugation (12.00 x g, 30 min, 4°C) abgetrennt. Die Konzentration der im Überstand befindlichen löslichen Proteine wurde mithilfe des NanoDrops bestimmt. Als Referenzwert diente der verwendete Lyse-Puffer.

3.3.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt¹³⁴. Die Auftragung des Proteingemischs erfolgte im Sammelgel und die anschließende Auftrennung in 10%igen Trenngel. Die Zusammensetzungen der Gele sind Tabelle 3.1 zu entnehmen. Die vertikalen Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammern wurden mit Lauf-Puffer gefüllt. Vor dem Auftragen werden alle Proben für 5 min auf 95°C in Laemmli-Puffer erhitzt. Zur Bestimmung der relativen Molmassen wurden entsprechende Marker-Proteingemische eingesetzt. Die SDS-PAGE wurde bei 110 V für ca. 1,5 h durchgeführt. Im Anschluss wurden die Proteine im Gel mit Coomassie-Färbelösung gefärbt und das Gel mit 10 %iger Essigsäure entfärbt, oder das ungefärbte Gel zur weiteren Analytik (Blotting) verwendet.

Substanz	Trenngel (10%)	Sammelgel (5%)
Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1) 40 %	2,12 ml	683 µl
1 M Tris-HCl, pH 8,9	3,15 ml	
1M Tris-HCl, pH 6,8		700 µl
ddH ₂ O	2,93 ml	4,1 ml
20 % (w/v) SDS-Lösung	42 µl	28 µl
TEMED	7 µl	7 µl
10% APDS	35 µl	35 µl

Tabelle 3.1 Übersicht über die Zusammensetzung der SDS-Gele

3.3.2.3 Transfer der Proteine auf eine Membran

Im Rahmen dieser Arbeit wurden hydrophobe PVDF-Membranen verwendet, die vor dem Äquilibrieren in Transferpuffer kurz in Methanol gelegt wurde und anschließend gründlich in ddH₂O gespült wurde. Das Blotting erfolgte mit der „Wet-Blot“-Technik in Mini Trans-Blot Systemen. Das Gel sowie die Membran und die Filterpapiere wurden dafür zuerst kurz in einer Wanne mit Transfer-Puffer äquilibriert. Auf das Gel wurde dann die Membran gelegt und zusammen mit 2 Filterpapieren und 2 Fiber-Pads so in die Gelhalter-Kassette eingespannt, dass das Gel in Richtung der Kathode und die Membran in Richtung der Anode wies. Die Kassette wurde dann in das Trans-Blot-Modul eingesetzt und in den mit Transfer-Puffer gefüllten Tank umgesetzt. Da sich das System aufgrund der hohen Stromstärke mit der Zeit stark erwärmte, wurde in den Tank zusätzlich ein Kühl-Akku eingesetzt. Die Transferzeit betrug bei 60 mA 1 h.

3.3.2.4 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Nach dem Transfer wurden die Membranen zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für eine Stunde bei Raumtemperatur mit Blockier-Puffer. Anschließend folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper entsprechend der Herstellerangaben in TBST bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen mit TBST (3x 20 min) wurde der Sekundärantikörper entsprechend der Herstellerangaben in TBST verdünnt. Die Inkubation erfolgte für 1 h unter Schütteln bei RT. Nach einem abschließenden Waschschrift (3x 20min in TBST) konnten die Banden auf der Membran detektiert werden.

Zur Visualisierung des gebundenen Sekundärantikörpers wurde das ECL-Plus-Detektions-Kit eingesetzt. Die Peroxidase oxidiert das Substrat Lumigen PS-3 zu einem Acridiniumester. Durch Reaktion mit Peroxiden entsteht eine intensive Chemilumineszenz mit einem Emissionsmaximum bei 430 nm. Diese kann durch die Exposition eines Autoradiographiefilms mit der Membran nachgewiesen werden. Die Expositionszeit lag bei 1-10 Minuten. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms *Quantity One Basic* (Bio-Rad, USA) durchgeführt.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie passieren suspendierte Zellen infolge einer hydrodynamischen Fokussierung einzeln einen Laserstrahl und senden dabei ein optisches Signal aus, welches mittels Photomultiplier gemessen wird. Dieses optische Signal ist abhängig von der Größe, Gestalt und der spezifischen Anfärbung der Zelle. Von jeder gemessenen Zelle werden folgende Daten aufgezeichnet: Intensität des Vorwärtsstreulichtes (FSC = forward scatter), Intensität des Seitwärtsstreulichtes (SSC = side scatter) sowie Intensitäten der Fluoreszenzen. Vorwärtsstreulichtparameter werden vor allem von der Zellgröße beeinflusst, während Seitwärtsstreulichtparameter von der Granularität (Größe und Struktur des Zellkerns etc.) sowie der Membranfaltung der Zelle abhängen. Durch die gezielte Verwendung von Fluorochrom-konjugierten Antikörpern ist es möglich, ganz bestimmte Zelltypen oder Zytokine zu visualisieren und zu analysieren.

3.3.3.1 Oberflächenfärbung

Die Färbung auf spezifische Oberflächenmarker (z.B. CD303, CD123, CD86 etc.) wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Dazu wurden 10^6 Zellen dreimal mit Cellwash gewaschen und anschließend in 100 μ l Cellwash aufgenommen. 2 μ l der jeweiligen Antikörper wurden zugegeben und für 20 min lichtgeschützt bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit MACS-Puffer erfolgte die Messung am FACS Canto I.

3.3.3.2 Intrazelluläre Färbung

Nach der Oberflächenfärbung wurden die Zellen in 1 ml Fixier-Puffer fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran wurde nach 15 min 1 ml Permeabilisierung-Puffer zugegeben. Nach weiteren 15 min wurde die Fixierung durch 3x Waschen mit PBS abgestoppt. Die Färbung von intrazellulären Molekülen wurde für 30 min in Permeabilisierung-Puffer durchgeführt. Abschließend wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen bevor sie in Cellwash aufgenommen und im FACS Canto I analysiert wurden. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mithilfe von FlowJo.

3.3.3.3 CFSE Färbung

Je 10^7 Zellen wurden in 1 ml PBS resuspendiert und mit 1 μ M CFSE (5-(und-6)-Carboxyfluorescein diacetat succinimidyl Ester) für 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal in 10 ml RPMI komplett Medium gewaschen bevor die gewünschte Zellkonzentration eingestellt und die Zellen in Kokultur gegeben wurden. Bei jeder Zellteilung wird jeweils die Hälfte des fluoreszierenden Farbstoffs auf die Tochterzellen verteilt wird. Über diese Abnahme des Fluoreszenzsignals kann somit in der Durchflusszytometrie indirekt auf Anzahl der Zellteilungen geschlossen werden

3.3.4 FITC-Markierung von Antikörpern

Die Bindung von FITC an Proteine erfolgte mit dem FITC Labeling Kit von Pierce. Dazu wurden 2 mg/ml IgG in 0,05 M Natrium-Borat-Puffer aufgenommen und für 1 h mit dem FITC Reagenz bei RT inkubiert. Die Proteinaufreinigung wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Nach der Konzentrationsbestimmung (vgl. 3.3.3) wurden die mit FITC gekoppelten Antikörper aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.3.5 Immunfluoreszenz

Je 10^6 Zellen wurden nach der Stimulation in 1 ml Fixier-Puffer überführt und für 15 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in Block-Lösung aufgenommen und für 1h inkubiert. Der primäre Antikörper wurde entsprechend der Hersteller-Angaben in Färbe-Puffer verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 4°C über Nacht. Nach 3 Mal waschen in PBS wurde der sekundär Antikörper verdünnt in Färbe-Puffer zugegeben. Im Anschluss an einen abschließenden Waschschrift (3x PBS) wurden die Zellen in SlowFade Mounting Medium aufgenommen (ca. 100 μ l), auf den Objektträger gegeben und eingedeckelt. Die Visualisierung erfolgte am konfokalen Mikroskop.

3.3.6 Präparation von IgG-Fractionen

Die Aufreinigung von IgG erfolgte mittels Affinitätschromatographie *via* FPLC (Fast protein liquid chromatography) über fertig gepackte HiTrapTM Protein G HP-Säulen. Zunächst wurden Proben aus der Ammoniumsulfatfällung über Vivaspin Konzentratoren auf den Bindungs-Puffer umgepuffert. Verwendet wurden Zentrifugaleinheiten mit einem Cut-Off von 10 kDa. Die G HP-Säule wurde mit 10 Volumen Bindungs-Puffer gespült bevor die Proben aufgetragen wurden. Nach Spülen mit Bindungs-Puffer erfolgte die Elution mit 5 Volumen Elutions-Puffer. Hierbei wurden 1 ml-Fractionen aufgefangen. In den Auffanggefäßen wurden jeweils 60 μ l Neutralisations-Puffer vorgelegt, um die Säure-lablen IgGs für nur sehr kurze Zeit dem sauren Milieu des Elutions-Puffers auszusetzen.

Der IgG-Gehalt wurde im IgG-ELISA (vgl. 3.3.1.1) ermittelt. Die Reinheit der IgG-Präparation wurde mittels SDS-PAGE überprüft. IgG-haltige Fraktionen wurden vereinigt und mit Hilfe von Vivaspin-Konzentratoren auf die gewünschte Konzentration gebracht.

3.4 Bestimmung der Endotoxin-Konzentration

Der Endotoxin-Gehalt in den Antikörper Präparationen wurde mit einem chromogenen Limulus-Amöbozyten-Lysat (LAL) -Test bestimmt. Dabei wird das Amöbozytenlysat von *Limulus polyphemus* durch Endotoxin zum Gelieren gebracht. Diese Reaktion beruht darauf, dass LPS eine Serinprotease aktiviert, die lösliches Protein (gekoppelt mit einem Farbstoff) in einen unlöslichen Komplex umwandelt, wodurch eine Gelbfärbung verursacht wird. Diese Gelbfärbung wurde photometrisch bei 405 – 410 nm im ELISA Reader bestimmt. Die Korrelation zwischen Absorption und Endotoxin-Konzentration ist zwischen 0,1 und 1,0 EU/ml linear, so dass anhand einer Standardkurve die Endotoxin-Konzentration der Proben ermittelt wurde. Das mitgelieferte E.coli-Endotoxin wurde als Standard auf folgende Konzentrationen verdünnt: 1,0 EU/ml, 0,5 EU/ml, 0,25 EU/ml und 0,1 EU/ml. Die zu untersuchenden Proben wurden in Verdünnungen zwischen 1:100 und 1:10⁶ eingesetzt. Der Test wurde entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Antikörper-Präparationen mit einem Endotoxin-Gehalt > 0,1 EU/ml wurden verworfen.

4 Ergebnisse

4.1 TLR Hochregulierung durch aPL

Zur Bestimmung des genauen zeitlichen Verlaufs der TLR Induktion durch aPL wurde die relative TLR7 Expression in humanen pDCs nach verschiedenen Zeitpunkten bestimmt. Um auszuschließen, dass es sich bei der Hochregulierung nicht um einen Effekt eines einzelnen aPL handelt, wurden insgesamt drei aPL vom IgG Isotyp (HL5B, HL7G und RR7F) sowie ein IgM-aPL (JGG9) verwendet. HL5B und HL7G stammen aus dem selben Patient mit primärem APS und sind eng verwandt. HL7G ist jedoch im Gegensatz zu HL5B in der Lage β 2GPI zu binden. RR7F sowie JGG9 wurden hingegen aus dem Blut zweier Patientinnen mit sekundärem APS generiert.

Abb. 4.1A zeigt, dass nur die aPL vom IgG Isotyp eine Hochregulierung von TLR7 induzierten. Schon nach 15 min konnte ein deutlicher Anstieg der relativen TLR7 Expression beobachtet werden. Das Maximum wurde nach 1 h erreicht. Der Effekt von HL5B, HL7G und RR7F war dabei Dosis-abhängig. RR7F musste jedoch in einer etwa 20fach höheren Konzentration eingesetzt werden, um ein ähnliches Ergebnis wie HL5B oder HL7G zu erzielen. JGG9 konnte hingegen zu keinem Zeitpunkt mit keiner Konzentration TLR7 induzieren. Die TLR7 Hochregulierung konnte weiterhin auf Protein-Ebene mittels Westernblot bzw. Durchflusszytometrie bestätigt werden (Abb. 4.1C+D).

Der soeben beschriebene Zeitverlauf charakterisiert die TLR Hochregulierung als ein sehr frühes Ereignis. Die bislang durchgeführten Experimente an Monozyten wurden jedoch nur mit minimalen Stimulationszeiten von 2 h durchgeführt¹¹⁴. Daher sollte auch für monozytäre Zellen ein vergleichbarer Zeitverlauf erstellt werden. Dazu wurden Monomac1 Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um eine monozytäre Zelllinie, die die Verfügbarkeit über eine nahezu unbegrenzte Zellzahl ermöglicht. Abb. 4.2 zeigt, dass IgG-aPL TLR8 in einem ähnlichen zeitlichen Verlauf wie TLR7 induzieren. So konnte auch für TLR8 die maximale Hochregulierung nach 1 h sowie eine deutlich erhöhte TLR8 Proteinkonzentration nach 4 h beobachtet werden. JGG9 zeigte erneut keinen Effekt und war nicht in der Lage TLR8 zu stimulieren.

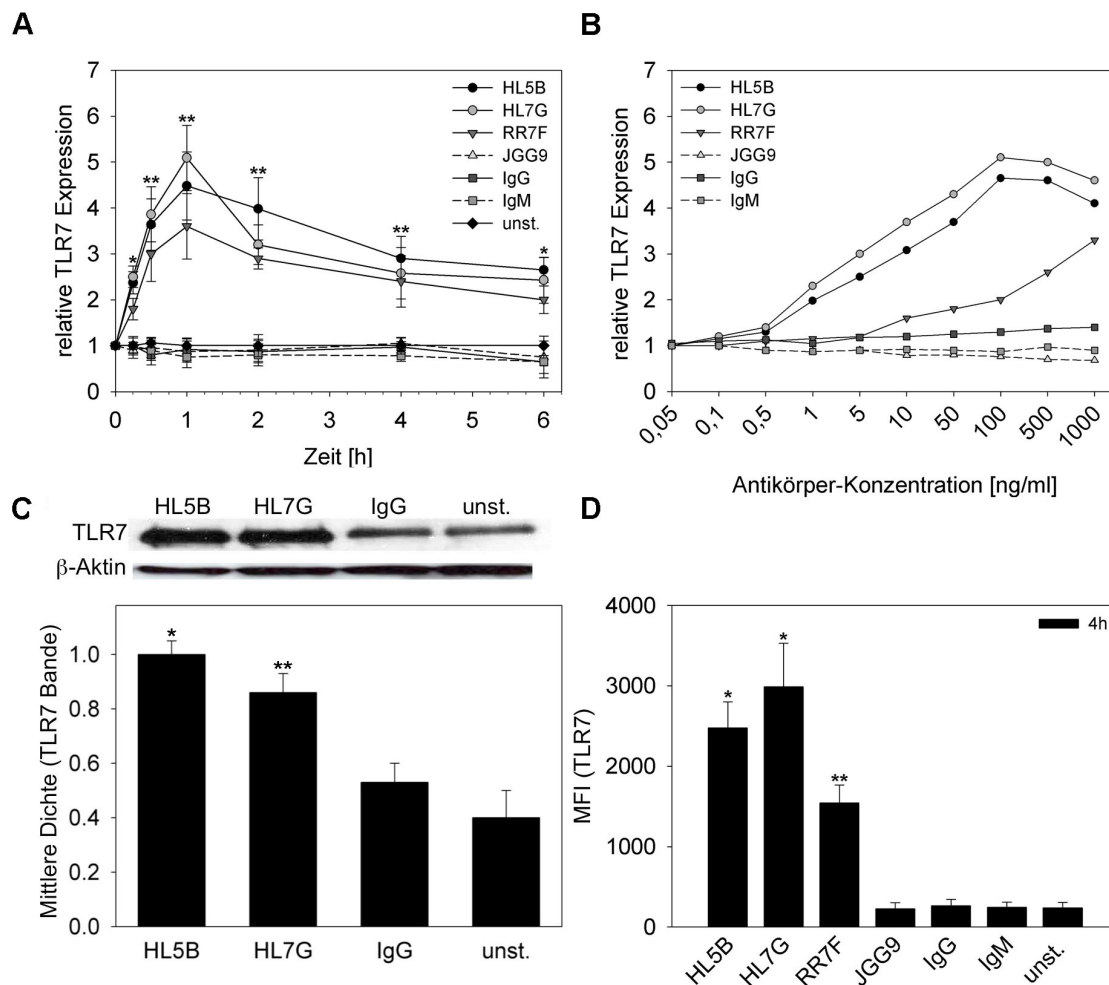


Fig. 4.1 TLR7 Induktion in pDCs durch aPL.

Humane pDCs wurden mit HL5B, HL7G, JGG9, IgG bzw. IgM Kontroll-Antikörper (je 100 ng/ml), oder RR7F (1 μ g/ml) über verschiedene Zeiträume von 15 min bis 6 h stimuliert (unst. = unstimulierte Kontrolle). (A) Die relative TLR7 mRNA Expression wurde mittels qRT PCR ermittelt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen aPL vs. IgG: * $p < 0,02$; ** $p < 0,001$. (B) Dosis-Wirkungs-Kurve für die aPL Stimulation. Die Hochregulierung der TLR7 mRNA Expression wurde nach 1h bestimmt. (C) Westernblot Analyse von lysierten pDCs nach 4 h Stimulation. Der Blot ist repräsentativ für mindestens 3 unabhängige Experimente. Das Säulendiagramm zeigt den Mittelwert der densitometrischen Messungen dieser 3 Experimente. Die P Werte entsprechen dem Vergleich zwischen der aPL Stimulation und unstimulierten Zellen. * $p = 0,015$; ** $p = 0,035$. (D) Durchflusszytometrische Analyse der TLR7 Expression in humanen pDC nach 4 h Stimulation dargestellt als mittlere Fluoreszenz Intensitäten (MFI). Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm Standardabweichung von 5 unabhängigen Experimenten. Die entsprechenden MFI der Isotypen Kontrollen wurden subtrahiert. Signifikanzen aPL vs. IgG: * $p < 0,001$; ** $p < 0,005$.

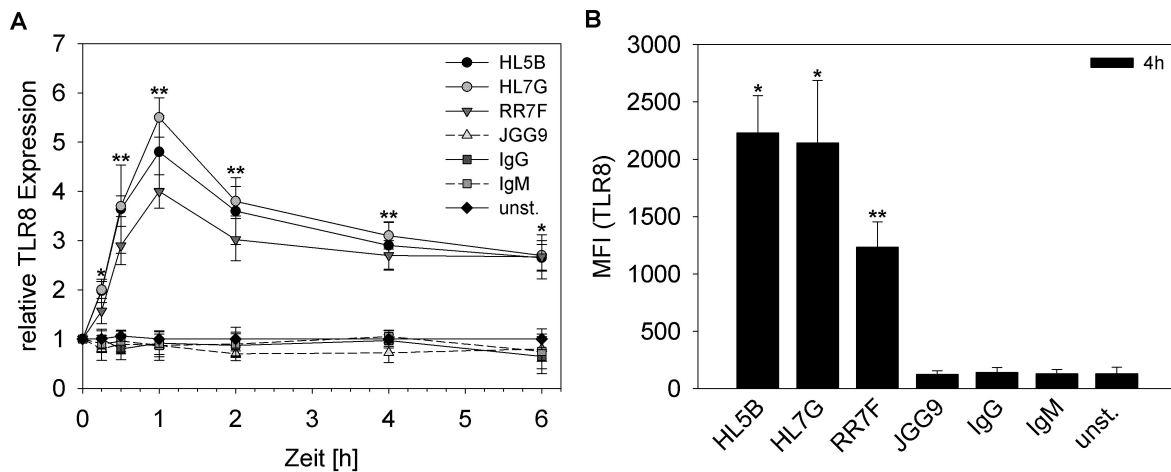


Fig. 4.2 TLR8 Induktion in Monomac1 Zellen durch aPL.

Monomac1 Zellen wurden mit HL5B, HL7G, JGG9, IgG bzw. IgM Kontroll-Antikörper (je 100 ng/ml), oder RR7F (1 µg/ml) über verschiedene Zeiträume von 15 min bis 6 h stimuliert (unst. = unstimulierte Kontrolle). (A) Die relative TLR8 mRNA Expression wurde mittels qRT PCR ermittelt und gegen die Expression von β-Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen aPL vs. IgG: * p < 0,05; ** p < 0,005. (B) Durchflusszytometrische Analyse der TLR8 Expression nach 4 h Stimulation dargestellt als mittlere Fluoreszenz Intensitäten (MFI). Die Daten entsprechen Mittelwerten +/- SD von 5 unabhängigen Experimenten. Die entsprechenden MFI der Isotypen Kontrollen wurden subtrahiert. Signifikanzen aPL vs. IgG: * p < 0,005; ** p < 0,01.

Gleiche Untersuchungen wurden für TLR9 durchgeführt. Aber weder in pDCs noch in Monomac1 Zellen konnten aPL die TLR9 mRNA Expression sowie die Protein Expression induzieren (Daten nicht gezeigt). Im Folgenden werden aus Übersichtsgründen nur die Daten für HL5B gezeigt. HL7G bzw. RR7F erzielten in allen Experimenten vergleichbare Ergebnisse.

4.2 Zytokin Sekretion nach aPL Stimulation

In Monozyten konnte bereits gezeigt werden, dass die TLR8 Induktion von einer verstärkten TNFα Sekretion begleitet wird. Dies sollte mit einem genauen zeitlichen Verlauf in pDCs bestätigt werden. Weiterhin wurde die Expression von IFNα, IL-6 und IL-8 untersucht. Abb. 4.3 zeigt die relative IFNα und TNFα mRNA Expression. Die Sekretion beider Zytokine wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mittels ELISA ermittelt.

Während die IFN α mRNA Expression bereits nach 30 min erhöht war und nach 2 h ihr Maximum erreichte, wurde die maximale Hochregulation der TNF α mRNA Expression nach 4 h ermittelt. Ein deutlicher Anstieg konnte erst nach 2 h detektiert werden. Die verstärkte mRNA Expression beider Zytokine war mit einer vermehrten, kontinuierlich ansteigenden IFN α bzw. TNF α Sekretion verbunden. Dabei fiel auf, dass die IFN α Produktion nahezu zeitgleich mit der mRNA Induktion erfolgte. Schon nach 1 h konnte eine Zytokin Sekretion nachgewiesen werden. Die TNF α Produktion setzte hingegen deutlich verspätet ein. Hier konnte erst nach 4 h ein signifikanter Anstieg der TNF α Sekretion detektiert werden.

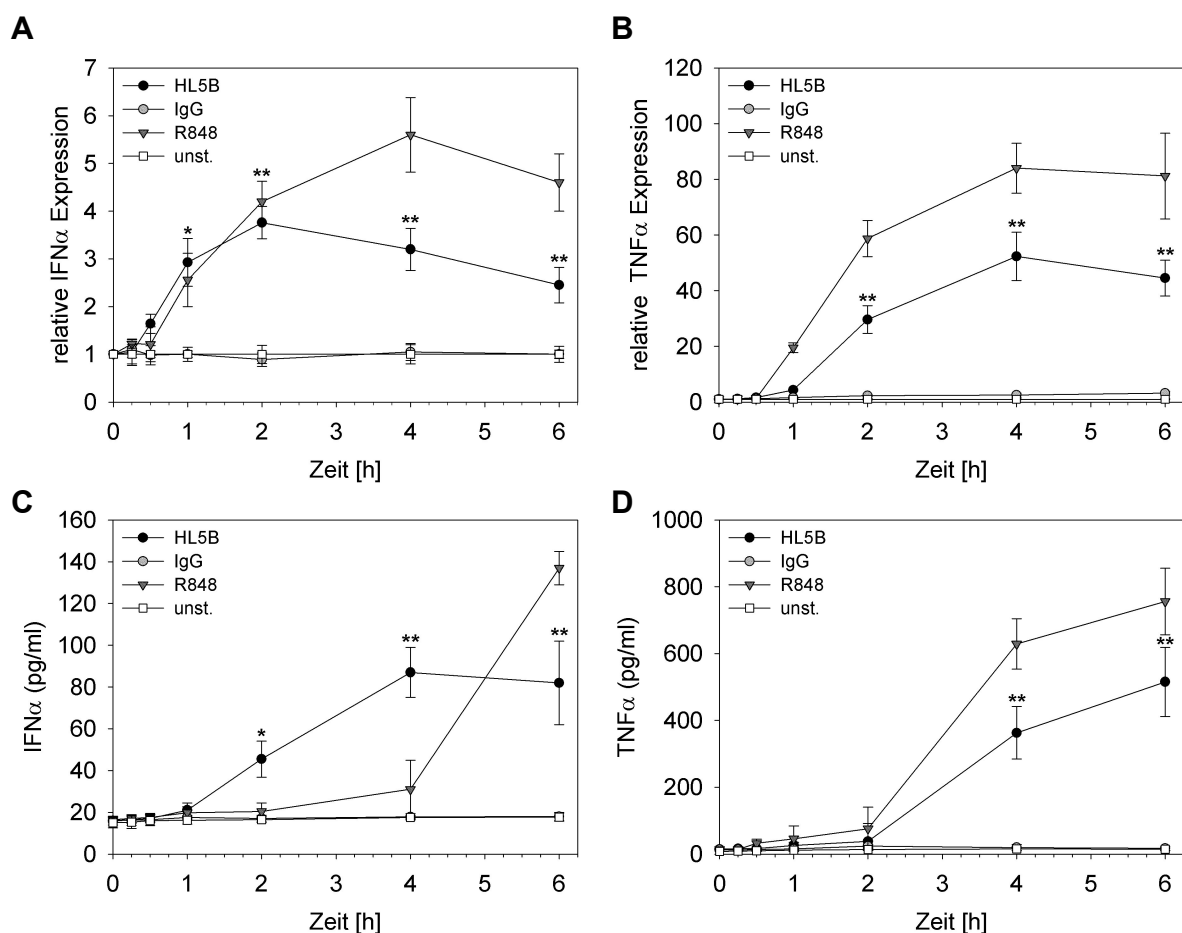


Abb. 4.3 Induktion von IFN α und TNF α .

Humane pDCs wurden mit HL5B, IgG-Kontroll-AK (je 100 ng/ml) und R848 (1 μ g/ml) über verschiedene Zeiträume von 15 min bis 6 h stimuliert (unst. = unstimulierte Kontrolle). (A) Die relative mRNA-Expression von IFN α (A) und TNF α (B) wurde im Vergleich zur Expression von β -Aktin mittels qRT PCR bestimmt. (B) Die Zytokin Sekretion von IFN α (C) und TNF α (D) wurde im ELISA ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen HL5B vs. IgG: * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$.

Im Vergleich zu $\text{IFN}\alpha$ und $\text{TNF}\alpha$ wurden IL-6 und IL-8 durch HL5B deutlich später induziert. Auf mRNA Ebene war nach 4 h die erste signifikante Hochregulierung der beiden Zytokine zu beobachten. Eine signifikant gesteigerte Sekretion in Medium konnte nach 6 h erstmalig nachgewiesen werden (vgl. Abb. 4.4).

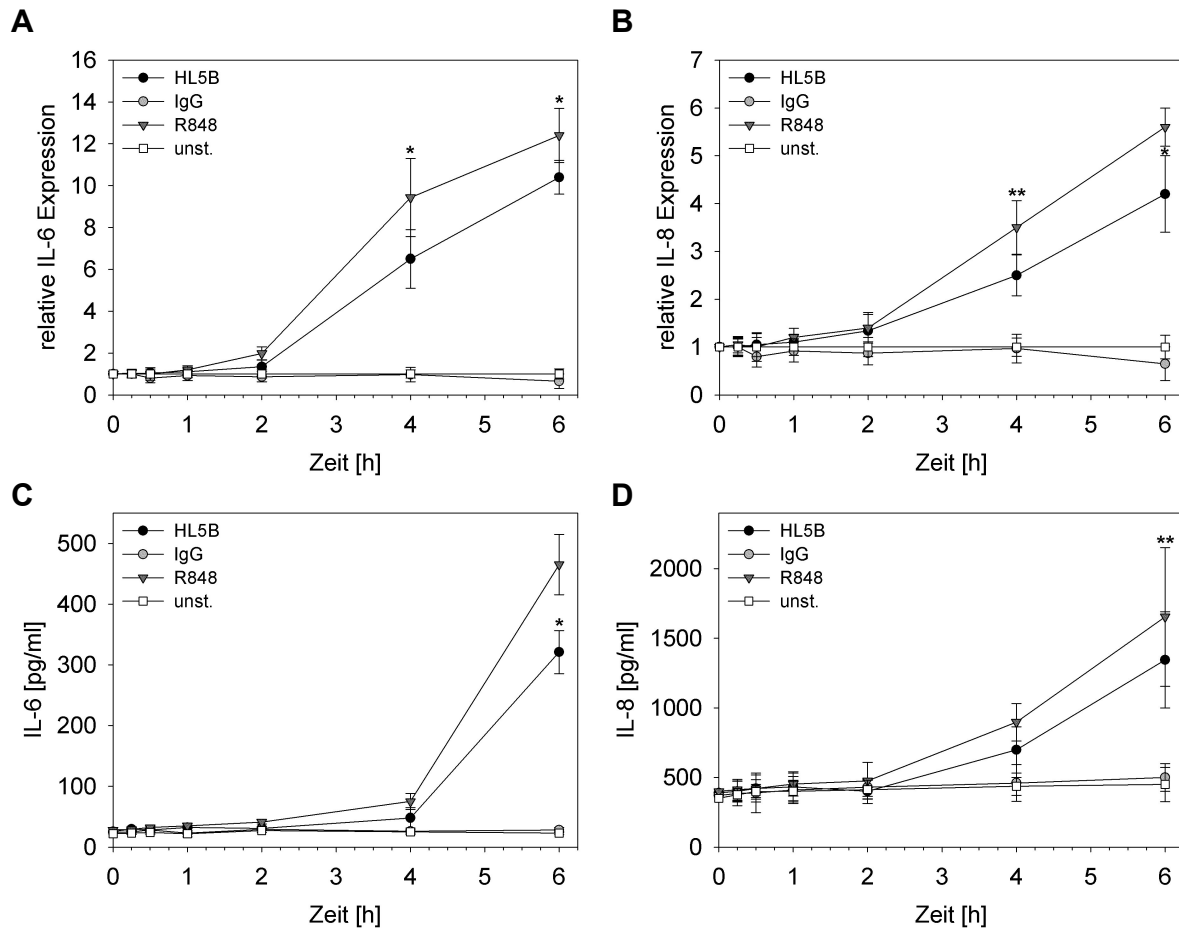


Abb. 4.4 Induktion von IL-6 und IL-8.

Humane pDCs wurden mit HL5B, IgG Kontroll-Antikörper (je 100 ng/ml) und R848 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über verschiedene Zeiträume von 15 min bis 6 h stimuliert (unst. = unstimulierte Kontrolle). (A) Die relative mRNA Expression von IL-6 (A) und IL-8 (B) wurde im Vergleich zur Expression von β -Aktin mittels qRT PCR bestimmt. (C) Die Zytokin Sekretion von IL-6 (C) und IL-8 (D) wurde im Überstand mittels ELISA detektiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen vs. IgG: * $p < 0,005$; ** $p < 0,01$.

4.3 Korrelation von TLR und Zytokin Induktion

4.3.1 Abhängigkeit der TLR7 Induktion von $\text{IFN}\alpha$ und $\text{TNF}\alpha$

Da sowohl $\text{IFN}\alpha$ als auch $\text{TNF}\alpha$ in der Lage sind TLR7 zu induzieren (Daten nicht gezeigt), stellte sich die Frage, ob die durch aPL induzierte verstärkte TLR7 mRNA Expression aus einer vermehrten Zytokin Sekretion der pDCs resultierte. Die Tatsache, dass TLR7 und $\text{IFN}\alpha$ nahezu zeitgleich induziert werden und $\text{TNF}\alpha$ sogar verzögert hochreguliert wird, widerspricht zwar dieser Annahme, dennoch sollten die Signale durch Zugabe von Adalimumab bzw. anti-BDCA-2 eindeutig von einander getrennt werden. Adalimumab ist ein therapeutischer humaner monoklonaler Antikörper, der $\text{TNF}\alpha$ bindet und so dessen biologische Wirkung inhibiert. Die Induktion und Sekretion von $\text{IFN}\alpha$ kann in pDCs hingegen durch die Ligandierung von BDCA-2 mit einem entsprechenden Antikörper inhibiert werden¹³⁵.

Bei Inhibition der $\text{IFN}\alpha$ Expression durch Koinkubation mit anti-BDCA-2 blieb die frühe TLR7 Induktion unverändert. Im weiteren Verlauf nahm die relative TLR7 mRNA Expression jedoch schneller wieder ab als bei Abwesenheit von BDCA-2 (Abb. 4.5A). Die $\text{IFN}\alpha$ Hochregulierung konnte erwartungsgemäß durch die Zugabe von BDCA-2 inhibiert werden (Abb. 4.5B). Ein ähnliches Bild zeigte sich bei Zugabe des $\text{TNF}\alpha$ -Blockers: die frühe TLR7 Induktion war unabhängig von der $\text{TNF}\alpha$ Sekretion während die Aufrechterhaltung des Signals durch $\text{TNF}\alpha$ vermittelt wurde (Abb. 4.5C). Gleiches gilt auch für die $\text{TNF}\alpha$ Produktion (Abb. 4.5D). Die Funktionalität von Adalimumab konnte dadurch nachgewiesen werden, dass es die stimulatorische Aktivität von $\text{TNF}\alpha$ nahezu vollständig inhibierte (Abb. 4.5C+D). Gleiche Ergebnisse für $\text{TNF}\alpha$ und Adalimumab konnten für Monomac1 Zellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

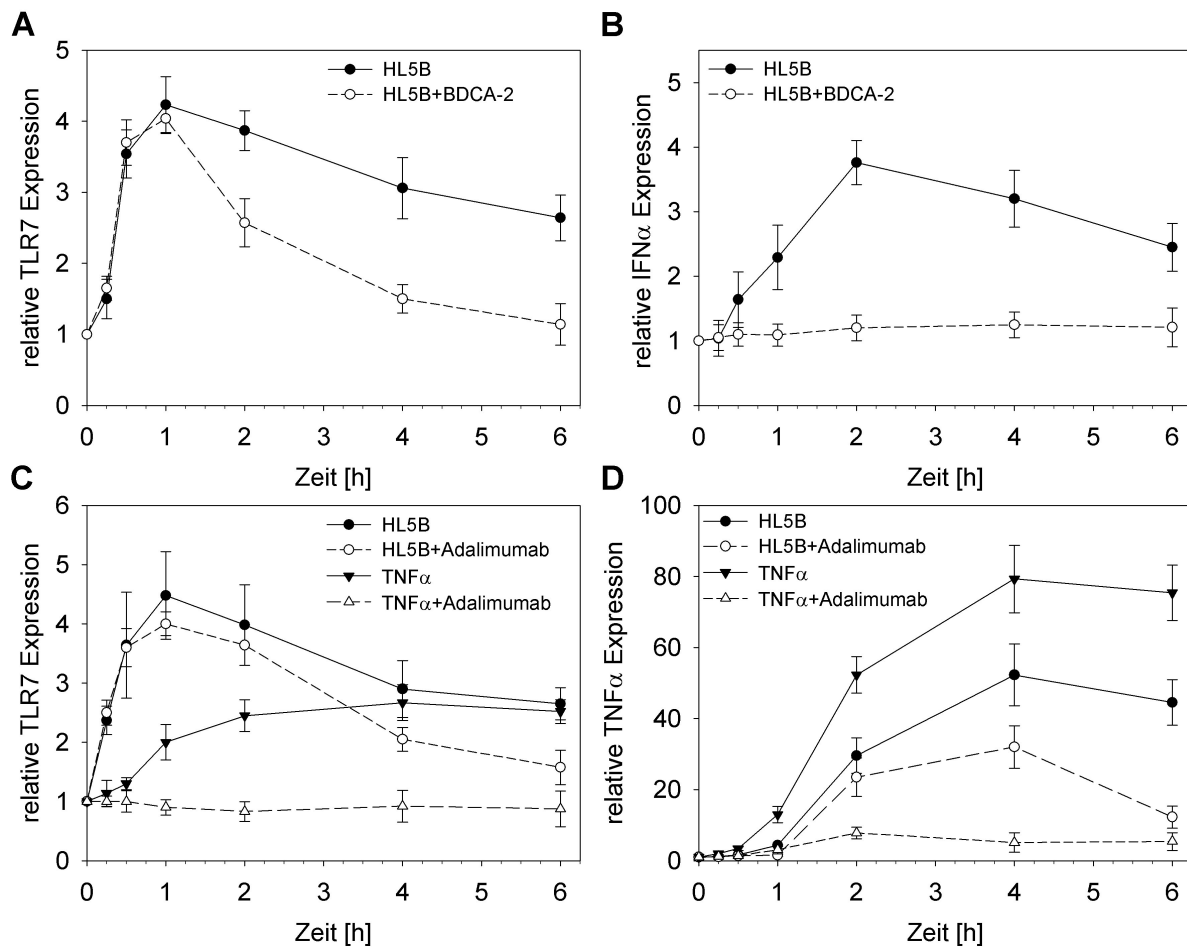


Abb. 4.5 **Abhängigkeit der TLR7 Induktion von IFN α und TNF α .**

(A, B) Humane pDCs wurden mit anti-human-BDCA-2 bzw. Kontroll-Maus-IgG1 Antikörper (je 1 $\mu\text{g/ml}$) für 30 min vorinkubiert bevor die Stimulation mit HL5B (100 ng/ml) erfolgte. Die relative TLR7 mRNA Expression (A) bzw. IFN α mRNA Expression (B) wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. (C, D) Humane pDCs wurden für 30 min mit Adalimumab (0,1 $\mu\text{g/ml}$) vorinkubiert. Anschließend erfolgte die Stimulation mit HL5B (100 ng/ml) bzw. TNF α (100 pg/ml) über verschiedene Zeiträume von 15 min bis 6 h. Die relative TLR7 mRNA Expression wurde mittels qRT PCR ermittelt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten.

4.3.2 **Abhängigkeit der Zytokin Produktion von TLR7**

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Hochregulierung von TLR7 unabhängig von IFN α und TNF α ist, sollte nun umgekehrt geklärt werden, ob die Zytokin Ausschüttung in pDCs TLR7-abhängig erfolgt. Es ist bekannt, dass die Signaltransduktion über TLR7 und TLR9 in pDCs zur IFN α und TNF α Sekretion führt¹⁶ und durch inhibitorische Desoxynukleotide (IRS661 für TLR7 und IRS869 für TLR9) gehemmt werden kann¹³³.

Abb. 4.6 verdeutlicht, dass die durch HL5B induzierte gesteigerte Zytokin mRNA Expression und Protein Sekretion durch die Zugabe von IRS661 auf das Niveau der IgG Kontrolle reduziert werden konnte. Im Gegensatz dazu hatte der TLR9 Inhibitor IRS869 keinen Effekt. Dies zeigt, dass die Zytokin Produktion vollständig über TLR7 vermittelt wird. In Monomac1 Zellen konnte die TNF α Produktion durch die Zugabe von IRS957 inhibiert werden. IRS957 inhibiert die Signaltransduktion über TLR7, TLR8 und TLR9. Der alleinige TLR9 Inhibitor IRS869 zeigte hingegen auch in diesen Zellen keinen Effekt (Daten nicht gezeigt).

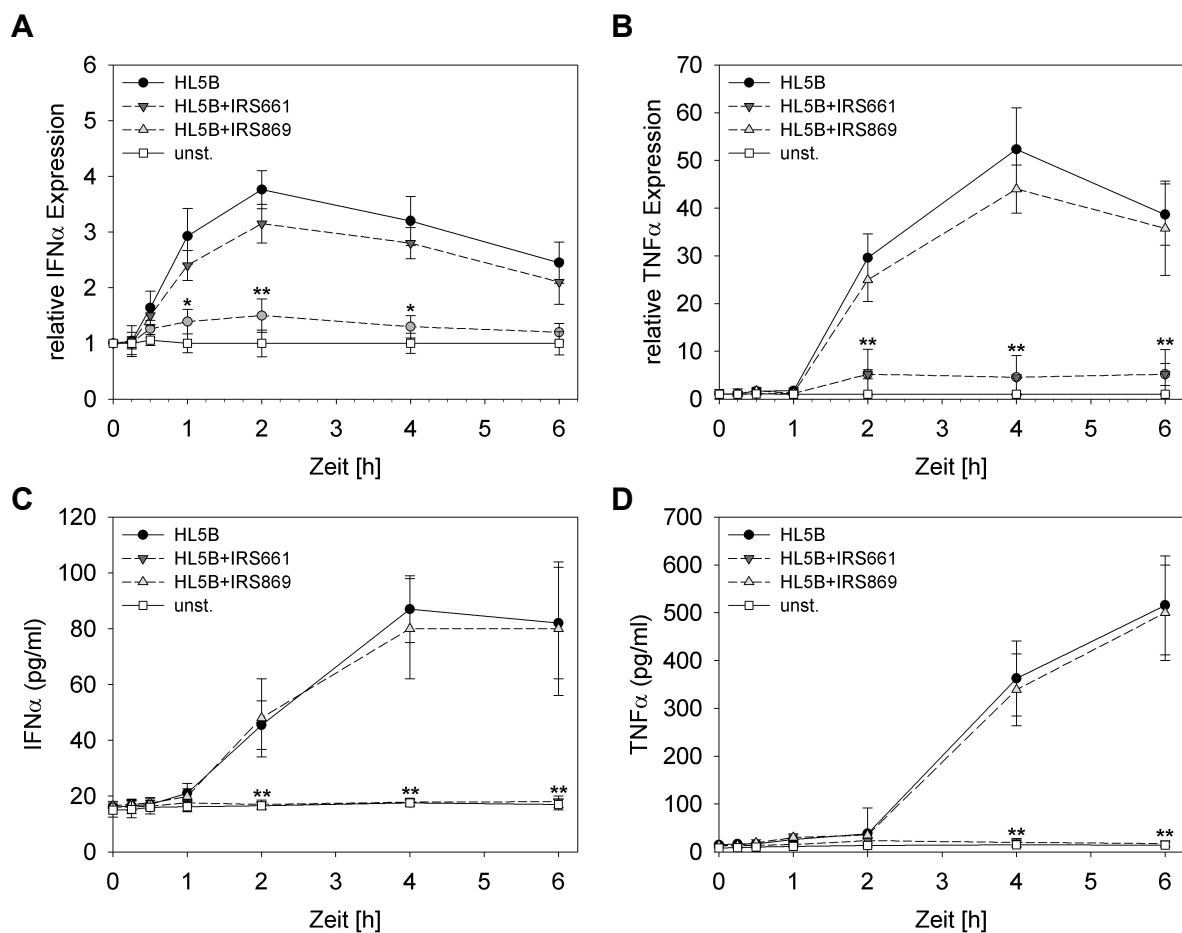


Abb. 4.6 TLR7 und TLR9 Inhibition.

Humane pDCs wurden für unterschiedliche Zeiträume (15 min bis 6 h) mit HL5B (100 ng/ml) alleine oder in Kombination mit IRS661 oder IRS869 (je 0,5 μ M) stimuliert. Die relative IFN α (A) bzw. TNF α (B) mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Die intrazelluläre Produktion von IFN α (C) und TNF α (D) wurde im ELISA ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen HL5B vs. HL5B+IRS661 * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

Diese TLR7 vermittelte Zytokin Sekretion führt zu der Frage, ob sich diese Ergebnisse durch die Zugabe eines spezifischen TLR7 Liganden weiter steigern lassen. Neben dem natürlichen TLR7 Liganden (ssRNA) existieren verschiedene synthetische TLR7 Agonisten wie R848 oder RNA40^{20,136-138}. Wie in Abb. 4.7 ersichtlich führte die kombinierte Stimulation mit HL5B und R848 in pDCs zu der erwarteten Steigerung der mRNA Expression und Sekretion von IFN α und TNF α . Auch in Monomac1 Zellen resultierte diese kombinierte Stimulation in einer signifikanten Steigerung der TNF α Produktion (Daten nicht gezeigt). Dabei war der Anstieg in beiden Zellpopulationen jedoch ungefähr doppelt so hoch wie erwartet, falls man von einem rein additiven Effekt der beiden Stimuli ausgeht. Gleiche Ergebnisse lieferte die Stimulation von pDCs mit RNA40 oder Imiquimod (Daten nicht gezeigt).

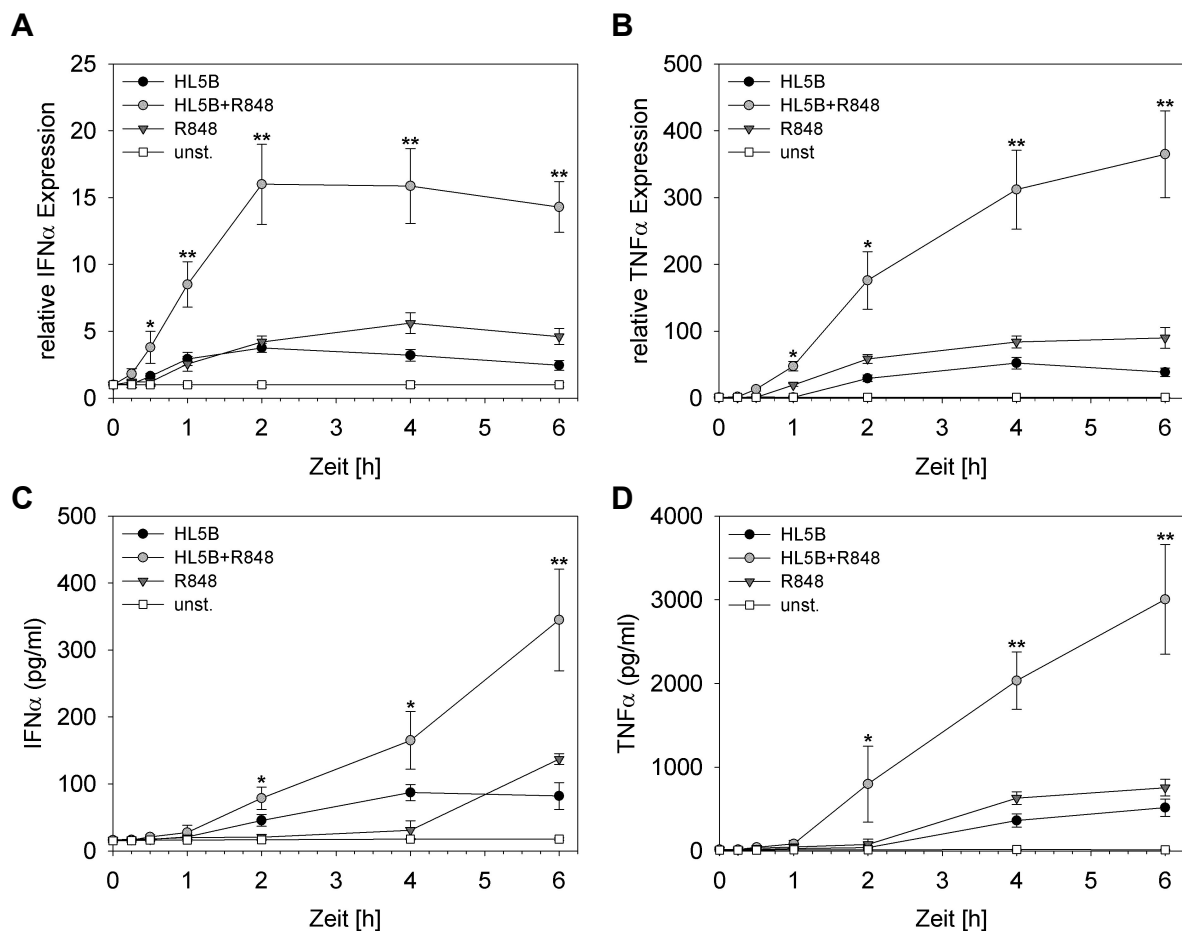


Abb. 4.7 Kombinierte TLR7 Stimulation.

Humane pDCs wurden für unterschiedliche Zeiträume (15 min bis 6 h) mit HL5B (100 ng/ml) oder R848 (1 μ g/ml) entweder alleine oder in Kombination stimuliert. Die relative IFN α (A) bzw. TNF α (B) mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Die intrazelluläre Produktion von IFN α (C) und TNF α (D) wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen R848 vs. HL5B+R848 * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$.

4.4 Mechanismus der Zytokin Induktion

Die zuvor beschriebenen Ergebnisse machen deutlich, dass die durch HL5B induzierte Sekretion von $\text{IFN}\alpha$ und $\text{TNF}\alpha$ über TLR7 vermittelt wird. Auf der Suche nach dem Mechanismus konnten wir bislang eine direkte TLR7 Aktivierung durch HL5B nicht ausschließen. Neben dieser Möglichkeit könnte TLR7 aber auch durch RNA, die aufgrund von Apoptose in den Zellkulturüberstand gelangt ist, aktiviert werden.

Um einen möglichen Einfluss von zelleigenen Nukleotiden oder Nukleinsäurefragmenten zu zeigen, wurden die gleichen Experimente wie zuvor unter Zugabe von RNase durchgeführt. Die RNase wurde dabei zunächst 30 min vor den übrigen Stimuli zugegeben. Während die durch HL5B induzierte TLR7 Expression von der RNase unbeeinflusst blieb (Abb. 4.8A), konnte die HL5B vermittelte gesteigerte $\text{IFN}\alpha$ bzw. $\text{TNF}\alpha$ mRNA Expression nahezu vollständig unterbunden werden (Abb. 4.8B, C). Die Potenzierung der Zytokin Induktion durch den synthetischen TLR Liganden R848 blieb hingegen erwartungsgemäß unbeeinflusst von der RNase, da R848 kann im Gegensatz zu RNA nicht von RNase degradiert werden kann. RNase alleine hatte keinen Einfluss auf die Expression von TLR7 (Daten nicht gezeigt).

Die gleichzeitige Zugabe von RNase und HL5B führte zu einem deutlich abgeschwächten Effekt der RNase. Dies spricht dafür, dass die Verminderung der Zytokin Expression auf der Degradation der RNA und nicht allein auf der Anwesenheit der RNase beruht. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in Monomac1 Zellen erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

Dieses RNase Experiment zeigt, dass die Aktivierung von TLR7 bzw. TLR8 durch RNA Moleküle erfolgt, die im Zellkulturüberstand vorhanden sind. Die aPL selbst induzieren die Expression von TLR7/8 und scheinen weiterhin diese Rezeptoren für ihre natürlichen Liganden zu sensibilisieren.

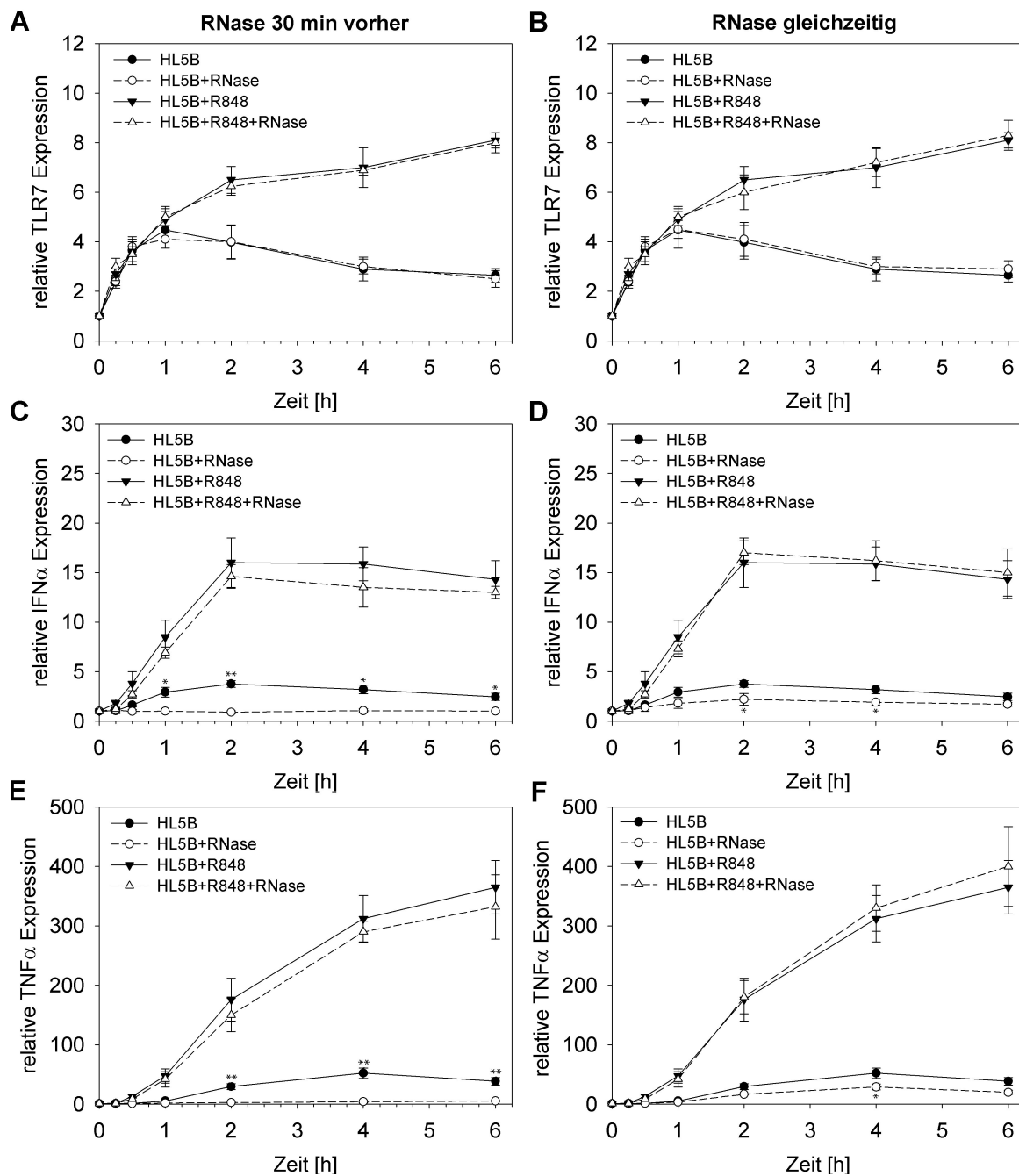


Abb. 4.8 RNase verhindert die Induktion von IFN α und TNF α .

Humane pDCs wurden mit HL5B (100 ng/ml) oder R848 (1 μ g/ml) entweder alleine oder in Kombination mit RNase (10 μ g/ml) stimuliert. Dabei wurde die RNase entweder 30 min vor den Stimuli (A, C, E) oder zeitgleich zugegeben (B, D, F). Die relative TLR7 mRNA Expression (A, B) bzw. IFN α mRNA Expression (C, D) oder TNF α mRNA Expression (E, F) wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen HL5B vs. HL5B+RNase: * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$.

4.5 HL5B induzierte Aufnahme von RNA

Um zu klären, wie aPL die Aufnahme von RNA vermitteln, wurde HL5B auf seine Fähigkeit zur RNA-Bindung untersucht. Es ergab sich, dass HL5B kein nukleäres Antigen in keinem der konventionellen diagnostischen Assays bindet. Außerdem war es nicht möglich, die Bindung von HL5B an Cardiolipin durch Zugabe von RNA zu kompetitieren (Daten nicht gezeigt). Dies führte zu der Annahme, dass HL5B die Zellen zu RNA Aufnahme primen könnte. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden humane pDCs mit HL5B oder IgG in frischem Medium für 10 min inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurde das Medium entweder durch frisches oder durch konditioniertes Medium (in dem die Zellen vor der Zugabe der mAb kultiviert wurden) ersetzt. Während bei der Zugabe von frischem Medium die TNF α Induktion ausblieb, konnte durch Zugabe des RNA-haltigen konditionierten Mediums eine Hochregulierung von TNF α erzielt werden (Abb. 4.9A+B). Dieser Effekt konnte durch Zugabe von RNase zum konditionierten Medium aufgehoben werden (Abb. 4.9C). Voraussetzung für die TNF α Induktion war die Vorstimulierung mit HL5B. IgG hatte in diesem System keinen Effekt. Dies zeigte deutlich, dass die physische Anwesenheit von HL5B benötigt wird, um die Zellen für die RNA Aufnahme zu primen.

Zur weiteren Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die Internalisierung von Fluoreszenz-markierter im Durchflusszytometer untersucht. Erneut wurden die Zellen entweder mit IgG oder mit HL5B für 10 min vorinkubiert und anschließend mehrmals gewaschen. Im nächsten Schritt wurde markierte RNA40 zugeben. Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde erneut extensiv gewaschen, um RNA von der Zelloberfläche zu entfernen. Somit konnte ein Fluoreszenzsignal ausschließlich von endozytierter RNA40 stammen. Wie in Abb. 4.9D ersichtlich resultierte die Vorstimulierung mit HL5B in einer signifikanten Aufnahme von RNA40. Mithilfe von Tlr7 defizienten Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die RNA Aufnahme von der Präsenz von TLR7 abhängt. So blieb die in CD11c⁺ Zellen von C57BL/6 Mäusen beobachtete RNA40 Aufnahme in Tlr7^{-/-} Mäusen aus (Abb. 4.9E+F). Wie zu einem späteren Zeitpunkt beschrieben wird (vgl. 4.9), induziert HL5B die Translokation von TLR7/8 aus dem ER ins Endosom. Dieser Prozess verläuft vermutlich über die Zelloberfläche, da eine kurzzeitige Anwesenheit von TLR7 bzw. TLR8 auf der Zelloberfläche mikroskopisch beobachtet werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Auf der Plasmamembran könnte TLR7/8 seinen Liganden (im vorliegenden Fall RNA40) binden und so mit ins Endosom transportieren. Dies würde erklären, weshalb Zellen aus Tlr7 defizienten Mäusen keine RNA internalisieren können.

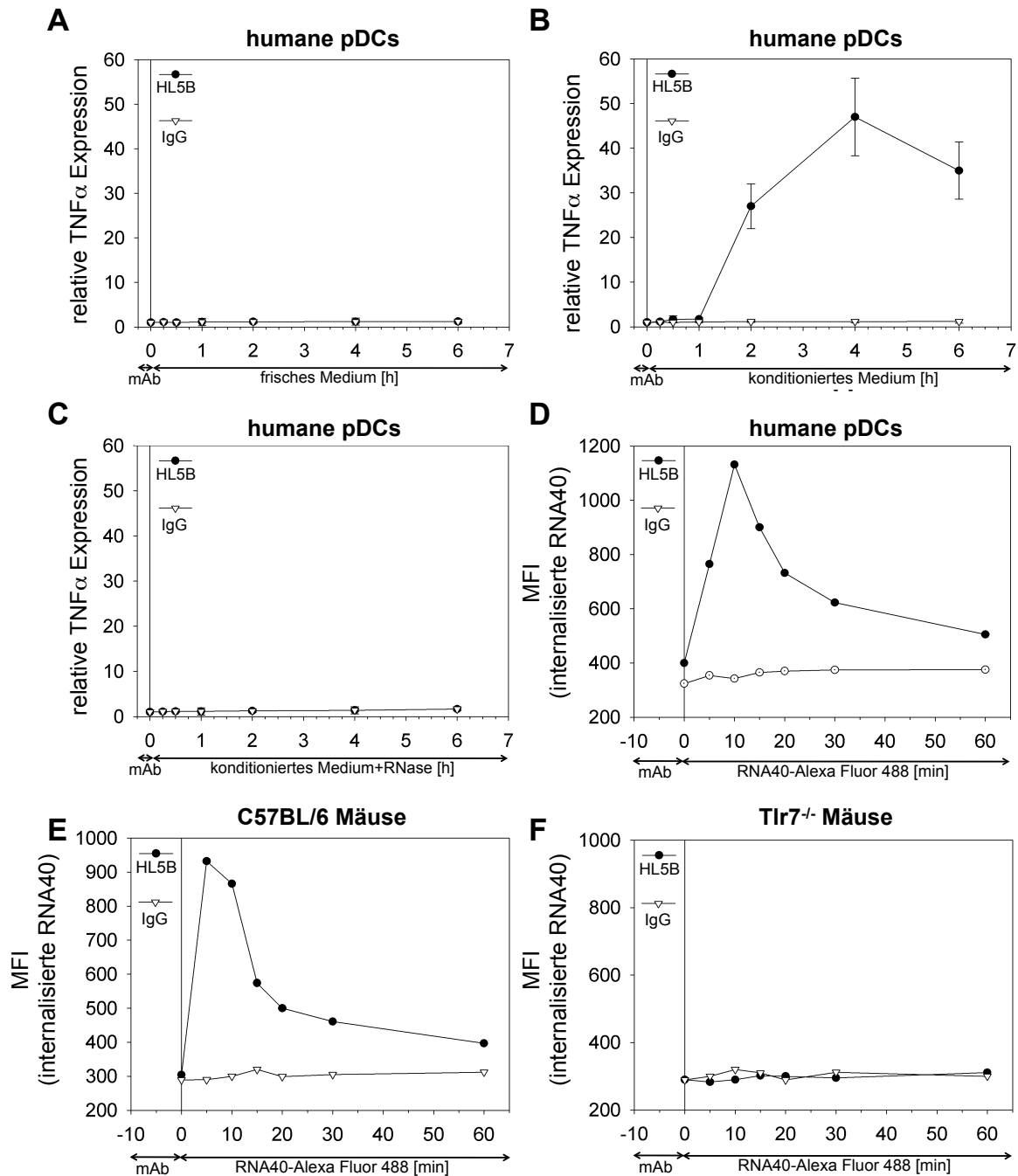


Abb. 4.9 RNA Aufnahme via TLR7.

(A-C) Humane pDCs wurden mit HL5B oder Kontroll IgG (je 100 ng/ml) in frischem Medium für 10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurde entweder frisches Medium (A), konditioniertes Medium (B) oder konditioniertes Medium+RNase (10 μ g/ml) (C) zugegeben. Die relative TNF α mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. (D-F) Humane pDCs (D) oder CD11c⁺ Zellen von C57BL/6 (D) bzw. Tlr7^{-/-} Mäusen wurden für 10 min mit HL5B oder IgG (je 100 ng/ml) vorinkubiert. Die Aufnahme von Fluoreszenz-markierter RNA40 wurde durchflusszytometrisch bestimmt.

4.6 NF- κ B vermittelte TLR7 Induktion

Da gezeigt werden konnte, dass die Aktivierung des TLR7 Gens unabhängig von der Zytokin Sekretion erfolgt, bleibt der Mechanismus der aPL vermittelten TLR7 Induktion weiter unklar. Allerdings haben Lee et al.¹³⁹ kürzlich die Promotorregion des TLR7 Gens charakterisiert und das NF- κ B Bindungsmotiv als einen Transkriptionsfaktor innerhalb dieser Region identifiziert. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe zeigen, dass die durch TLR7 Liganden ausgelöste proinflammatorische Aktivität über NF- κ B vermittelt wird. So konnte die durch TNF α induzierte verstärkte TLR7 Expression durch die Zugabe des NF- κ B Inhibitors Ro106-9920 beseitigt werden. Diese Ergebnisse führten zu der Überlegung ob auch die durch aPL induzierte TLR7 Hochregulierung über NF- κ B vermittelt wird und somit mittels Ro106-9920 inhibiert werden kann.

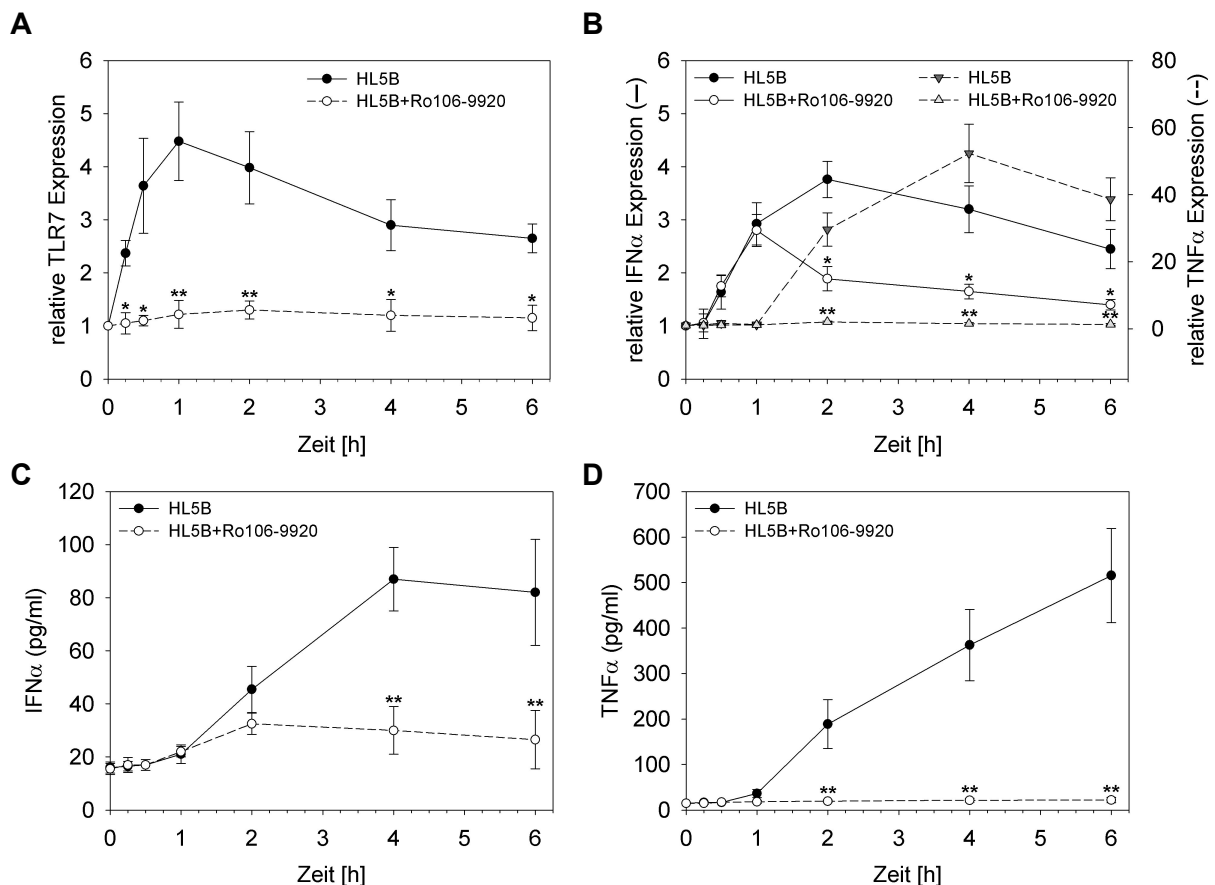


Abb. 4.10 NF- κ B Inhibition.

Humane pDCs wurden mit HL5B (100 ng/ml) alleine oder bei Anwesenheit von Ro106-9920 (5 μ M) stimuliert. Die relative TLR7 mRNA Expression (A) bzw. IFN α und TNF α mRNA Expression (B) wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Die Zytokin Sekretion (C+D) wurde mittels ELISA gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Signifikanzen HL5B vs. HL5B+Ro106-9920: * $p < 0,03$; ** $p < 0,005$.

Abb. 4.10 zeigt, dass der Effekt von HL5B auf die TLR7 mRNA Expression nahezu vollständig durch die Zugabe des NF- κ B Inhibitors Ro106-9920 beseitigt werden konnte. Dies spricht für einen NF- κ B abhängigen Prozess. Gleiches konnte auch für die TNF α Expression und Sekretion beobachtet werden. Die IFN α Expression ist hingegen in der frühen Phase unabhängig von NF- κ B, sodass es auch zu einer geringen frühen IFN α Ausschüttung kommt. Erst nach 2 h konnte der NF- κ B Inhibitor die durch HL5B induzierte verstärkte IFN α mRNA Expression signifikant vermindern. Alle Ergebnisse konnten auch mit zwei weiteren NF- κ B Inhibitoren (Bay11-7085 und Celastrol) bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

4.7 Endozytose und Akkumulation von aPL

Zwar konnte nachgewiesen werden, dass die verstärkte TLR Expression über NF- κ B vermittelt wird, dennoch bleibt der Mechanismus über den aPL NF- κ B aktivieren weiterhin ungeklärt. Die Identifizierung des zellulären Epitops als vermeintlicher Ausgangspunkt der aPL vermittelten Signaltransduktion versprach daher weitere Aufklärung. Da bislang alle biochemischen Techniken erfolglos blieben, sollte die konfokale Mikroskopie einen Aufschluss über das Bindungsmuster von aPL an mononukleäre Zellen geben. Dazu wurden lebende pDCs (Abb. 4.11A) und Monomac1 Zellen (Abb. 4.11B) mit FITC-markierten HL5B bzw. IgG inkubiert und dabei im Mikroskop beobachtet. Es konnte nachgewiesen werden, dass HL5B und IgG schon innerhalb der ersten Minuten von pDCs bzw. Monomac1 Zellen internalisiert werden. Abb. 4.11 zeigt nach 7 min eine deutliche Kolo-kalisation der Antikörper (grün) mit den sauren Organellen (Endosom, Lysosom), die mittels Lyso-Tracker visualisiert wurden (rot). Dabei scheint HL5B deutlich stärker im Endosom zu akkumulieren als IgG. Da pDCs als primäre Zellen nur eine eingeschränkte Lebenserwartung besitzen und zudem nur in sehr geringe Anzahl verfügbar sind, wurden die folgenden Experimente vorwiegend mit Monomac1 Zellen durchgeführt. Alle bisherigen an pDCs durchgeführten Ergebnisse konnten für TLR8 bzw. TNF α in Monomac1 Zellen mit einem vergleichbaren Zeitablauf bestätigt werden. TLR7 und TLR8 sind sehr nah verwandt, sodass die beiden Rezeptoren von einigen Forschern sogar als funktionell austauschbar betrachtet werden¹⁴⁰.

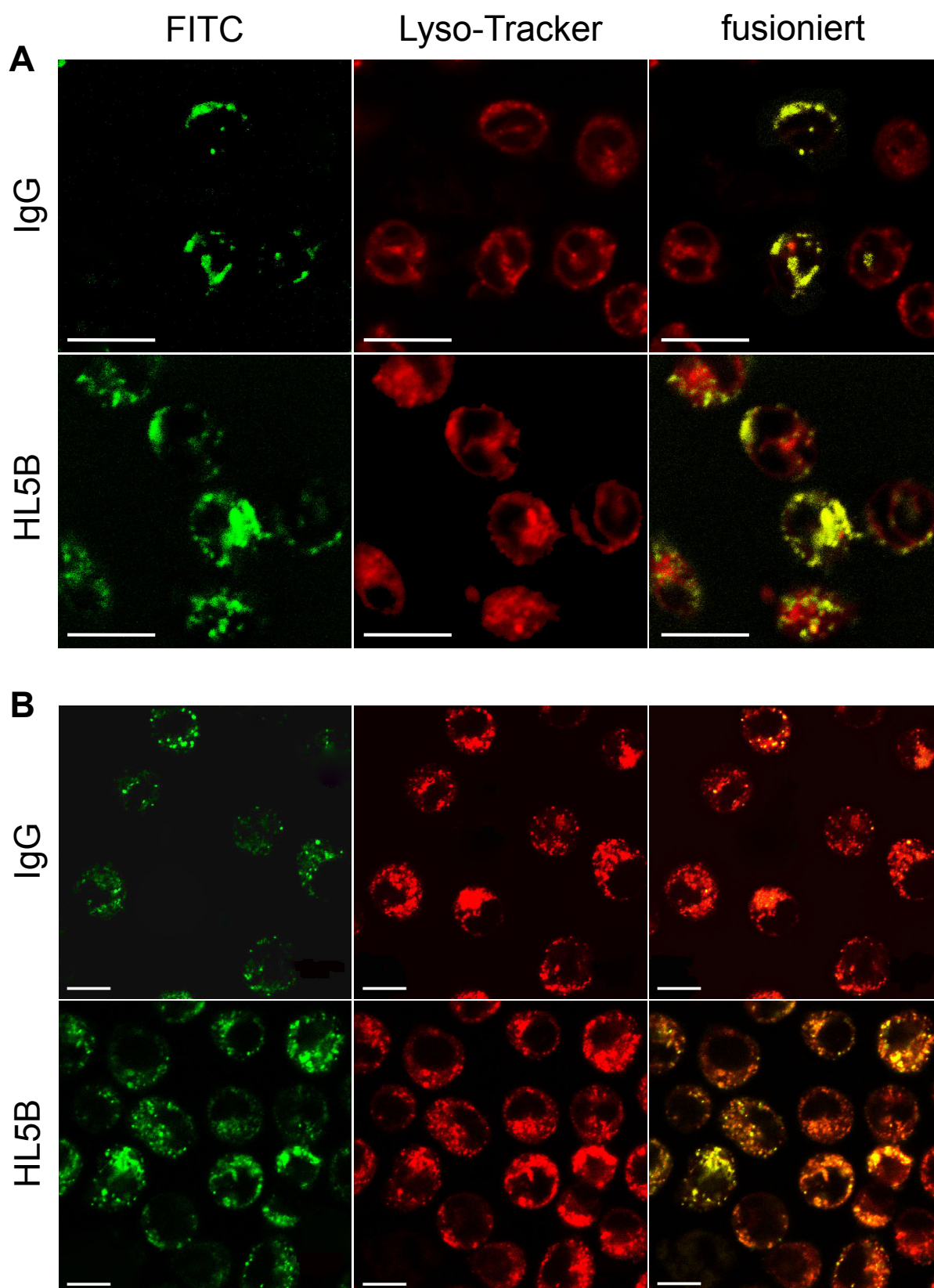


Abb. 4.11 Internalisierung von HL5B und IgG.

Humane pDCs (A) und Monomac1 Zellen (B) wurden für 15 min mit Lyso-Tracker (50 nM) vorbehandelt und dann mit IgG-FITC oder HL5B-FITC (je 500 ng/ml) inkubiert. Nach 7 min wurden die Zellen mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie unter exakt gleichen Einstellungen visualisiert. Die Bilder sind für 3 unabhängige Experimente repräsentativ. Balken = 10 μ m.

Nachdem die Internalisierung von HL5B nachgewiesen werden konnte stellte sich erneut die Frage nach dem zugrundeliegenden Mechanismus. Möglich wäre eine Fc γ -Rezeptor (Fc γ R) vermittelte Internalisierung oder aber auch eine Endozytose über Lipid Rafts. Lipid Rafts sind Membran Mikrodomänen deren Beteiligung an der Signaltransduktion im Kontext des APS bereits diskutiert wurde¹⁴¹. Um die Rolle dieser einzelnen Strukturen im Hinblick auf die TLR8 Hochregulierung und die Internalisierung aufzuklären, wurden verschiedene Inhibitionsexperimente durchgeführt. Die spezifische Bindung von HL5B an Phospholipide wurde mithilfe des Peptids „HLP“ inhibiert¹⁴², die Inhibition der drei Fc γ R (Fc γ RI-III) erfolgte mit entsprechenden Antikörpern und die Struktur der Lipid Rafts sollte durch Zugabe von Methyl- β -Cyclodextrin (M β CD) oder Nystatin¹⁴³ zerstört werden. Zunächst wurde der Effekt dieser Inhibitoren auf die Hochregulierung von TLR8 in Monomac1 Zellen untersucht (Abb. 4.12). Sowohl HLP als auch Fc γ RII waren in der Lage die TLR8 Induktion durch HL5B zu unterbinden. Fc γ RI und Fc γ RIII scheinen hingegen nicht beteiligt zu sein. Deren Ligation durch spezifische Antikörper hatte keinen Einfluss auf die durch HL5B induzierte TLR8 mRNA Expression. Aber auch die Zerstörung der Lipid Rafts über M β CD und Nystatin führte zur Inhibition der TLR8 Hochregulierung. M β CD und Nystatin zeigten dabei in den eingesetzten Konzentrationen und dem angegebenen Zeitraum keine zelltoxischen Eigenschaften (Daten nicht gezeigt).

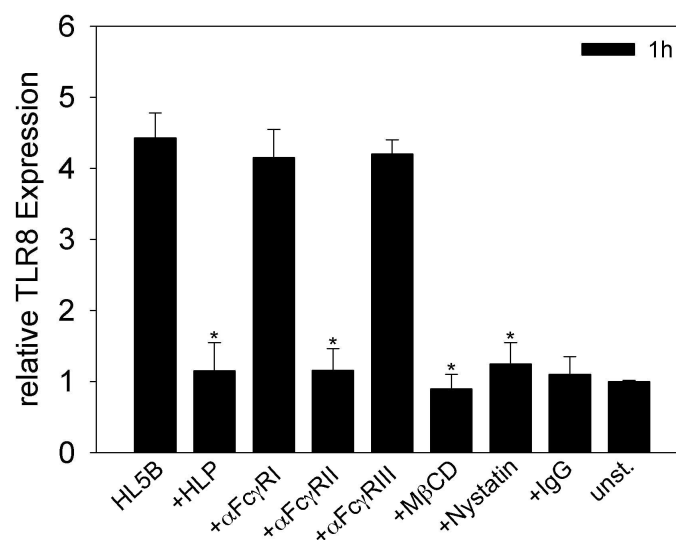


Abb. 4.12 Rolle von HLP, Fc γ R und Lipid Rafts.

Monomac1 Zellen wurden mit HL5B (100 ng/ml) alleine oder in Anwesenheit von HLP (250 ng/ml), α Fc γ RI-III (0,5 μ g/ml) M β CD (1mM) oder Nystatin (10 μ g/ml) stimuliert. Die relative TLR8 mRNA wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen HL5B vs. HL5B+Inhibitor: * $p < 0,005$.

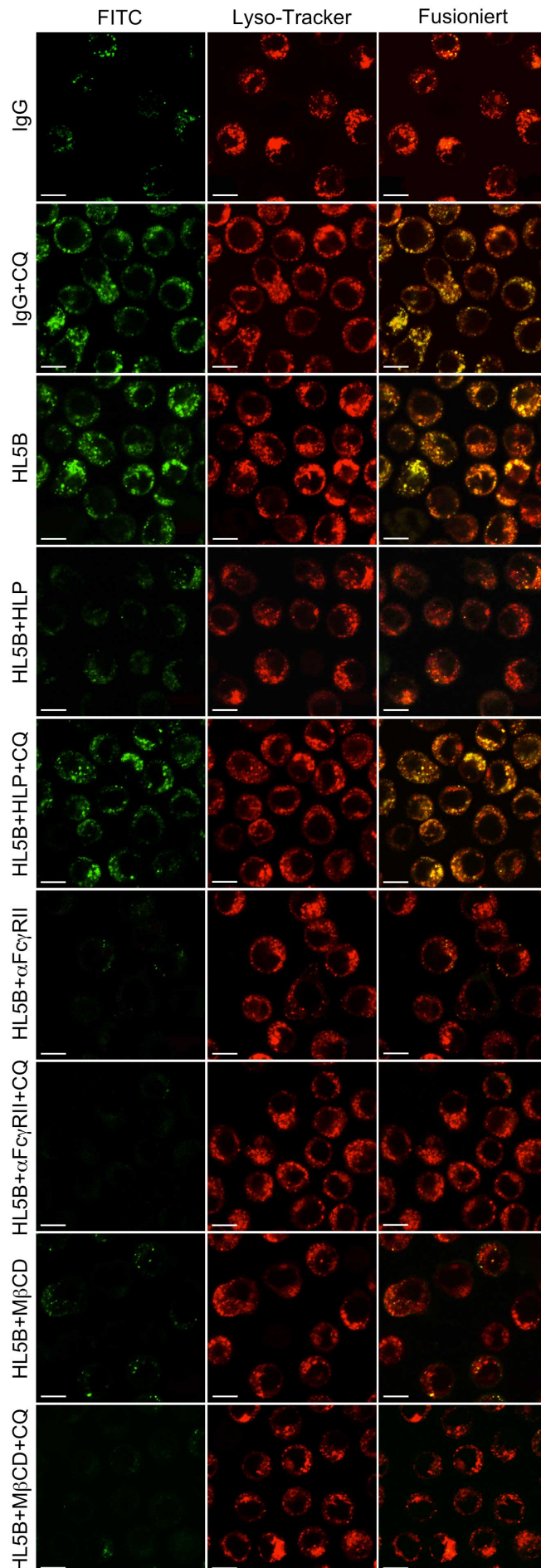


Abb. 4.13 Inhibition der Internalisierung und Akkumulation von HL5B .

Monomac1 Zellen wurden für 15 min mit Lyso-Tracker (50nM) vorbehandelt und dann mit HL5B-FITC (je 500 ng/ml) alleine oder in Anwesenheit von HLP (250 ng/ml), α Fc γ RII (0,5 μ g/ml) oder M β CD (1mM) inkubiert. Zur Inhibition der lysosomalen Degradation wurde 30 min vor den übrigen Reagenzien 100 μ M Chloroquine zugegeben. Die Zellen wurden nach 7 min mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie unter exakt gleichen Einstellungen visualisiert. Die Aufnahmen zur HL5B bzw. IgG Stimulation entsprechen den Bildern aus Abb. 4.11B). Die Daten sind repräsentativ für 3 unabhängige Experimente. Balken = 10 μ m.

Unsere Ergebnisse zeigen starke Übereinstimmung mit mikroskopischen Aufnahmen von der Arbeitsgruppe um Jean Gruenberg. Kobayashi et al. begründen die endosomale Akkumulierung eines murinen aPL (C64) mit der spezifischen Bindung des aPL an Lysobisphosphatidsäure (LBPA)¹⁴⁴. Sie vermuten weiterhin, dass IgG (aufgrund der fehlenden Eigenschaft zur LBPA-Bindung) direkt in die lysosomale Route eingeschleust und degradiert wird. Um diese Annahme zu bestätigen wurde die lysosomale Degradation mithilfe von Chloroquine unterbunden. Dabei konnte gezeigt werden, dass Fc γ RII sowie intakte Lipid Rafts lediglich essentiell für die Internalisierung des Antikörpers sind, während die Antigenspezifität offensichtlich für die Akkumulierung im Endosom verantwortlich ist. Unterbindet man die lysosomale Degradation mittels Chloroquine, akkumuliert sowohl IgG als auch HLP-blockierter HL5B in vergleichbarem Maße wie HL5B allein (Abb. 4.13).

4.8 Induktion von endosomalem Superoxid durch aPL

Bislang konnte gezeigt werden, dass aPL internalisiert werden und im Endosom angereichert werden. Wie von dort die Signaltransduktion zu NF- κ B und nachfolgenden TLR7 Hochregulierung erfolgt verbleibt ungeklärt. Die Tatsache dass es sich hier um sehr schnelle Ereignisse handelt, verweist auf eine mögliche Beteiligung von Radikalen an der Signaltransduktion. Endosomale Superoxid Produktion wurde kürzlich als ein neuer und schneller Signalmechanismus beschrieben^{145,146}. Superoxid gehört zur Gruppe der Reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), einer Gruppe von Molekülen, die aus der Aktivierung von Sauerstoff (O₂) durch Energie- oder Elektronen-Transfer entstehen^{147,148}. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ROS ein Potential zur NF- κ B Aktivierung besitzen^{145,149}.

Wurden Monomac1 Zellen mit dem ROS sensitiven Farbstoff L-012 beladen und anschließend mit HL5B oder der IgG Kontrolle stimuliert, so zeigte sich nur bei der HL5B Stimulation eine konzentrationsabhängige intrazelluläre ROS Produktion (Abb. 4.14A). Eine extrazelluläre ROS Produktion, die über die Inkubation mit Luminol/HRP detektierbar ist, konnte hingegen weder nach HL5B noch nach IgG Stimulation nachgewiesen werden (Abb. 4.14B).

Zur Identifizierung möglicher ROS Quellen wurden Inhibitoren für die NADPH Oxidase (Apocynin), Protein Kinase C (Chelerythrin) und Xanthin Oxidase (Allopurinol) eingesetzt. Lediglich die Zugabe des NADPH Oxidase Inhibitors konnte die HL5B induzierte ROS Produktion signifikant reduzieren. Chelerythrin zeigte nur in der frühen Phase einen leichten inhibitorischen Effekt (Daten nicht gezeigt). Allopurinol konnte das ROS Signal hingegen zu keinem Zeitpunkt vermindern (Abb. 4.15). Diese Daten sprechen für eine Superoxid-Produktion durch eine NADPH Oxidase als Basis für das intrazelluläre ROS Signal. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch bestärkt, dass die ROS Induktion durch HL5B auch durch Zugabe von PEG-SOD verhindert werden kann. Es ist bekannt, dass diese Polyethylen-Glycolgekoppelte Superoxid Dismutase (PEG-SOD) in die endosomale Route einzutreten vermag¹⁵⁰.

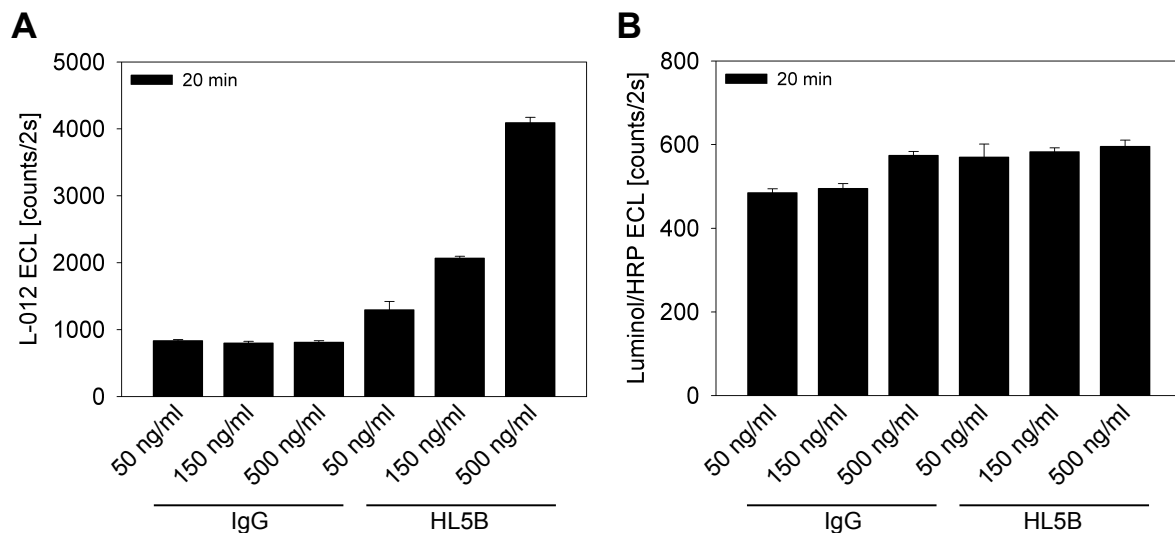


Abb. 4.14 ROS Induktion durch HL5B.

Monomac1 Zellen wurden mit HL5B oder IgG (100 ng/ml) stimuliert. (A) Die Induktion der intrazellulären ROS Produktion wurde über L-012 Chemilumineszenz ermittelt. (B) Die Detektion der extrazellulären ROS Produktion erfolgte über Luminol/HRP Chemilumineszenz. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SD von vier Messungen.

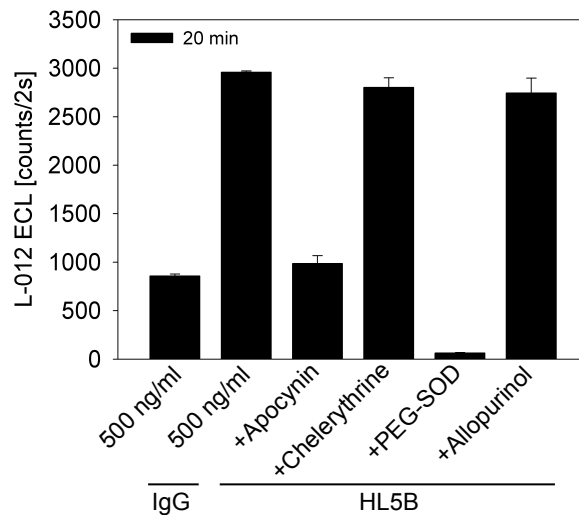


Abb. 4.15 Inhibition ROS Induktion durch HL5B.

Monomac1 Zellen wurden mit HL5B oder IgG (je 100 ng/ml) stimuliert. Die intrazelluläre ROS Produktion wurde über L-012 Chemilumineszenz nach der Inhibition mit Apocynin (1 mM), Chelerythrin (1 μ M), PEG-SOD (500 U/ml) oder Allopurinol (100 μ M) ermittelt. Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SD von 4 Messungen.

Um das HL5B induzierte intrazelluläre ROS Signal eindeutig als Superoxid Signal zu identifizieren, wurde die Produktion von Ethidium (E+) und 2-Hydroxy-Ethidium (2HE) mittels HPLC von Prof. Dr. Andreas Daiber quantifiziert. Bei Anwesenheit von HL5B im Zellkulturmedium stieg die intrazelluläre 2HE Konzentration im Vergleich zur IgG Kontrolle signifikant an (Abb. 4.16). Da 2HE nur in der Anwesenheit von Superoxid gebildet werden kann, spricht auch dieses Ergebnis dafür, dass die Bildung von Superoxid die initiale ROS Produktion als Antwort auf HL5B darstellt.

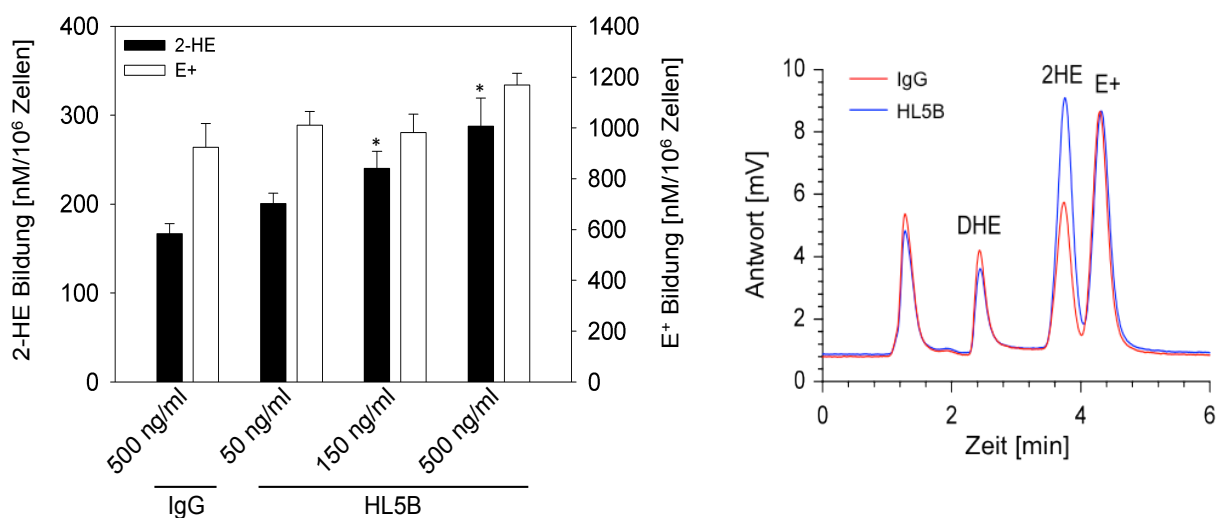


Abb. 4.16 Superoxid Induktion durch HL5B.

HPLC basierte Quantifizierung der 2HE und E+ Bildung als Antwort auf die Stimulation von Monomac1 Zellen mit HL5B oder IgG (je 100 ng/ml). Die Daten entsprechen Mittelwerten \pm SD von vier Messungen. Daten wurden von Prof. Dr. Andreas Daiber zur Verfügung gestellt.

Die eindeutige endosomale Lokalisation der Superoxid Produktion wurde im konfokalen Mikroskop durch die Färbung mit H₂HFF-BSA nachgewiesen. Wie in Abb. 4.17 ersichtlich, konnte die HL5B induzierte ROS Bildung (grüne Fluoreszenz) in den sauren Organellen (Lysosom, Endosom) über Kolokalisation (mit Pfeilen gekennzeichnet) mit dem Lyso-Tracker (rot) nachgewiesen werden. IgG zeigte erwartungsgemäß kein Potential zur ROS Induktion.

Da in der Literatur kürzlich gezeigt werden konnte, dass die endosomale Superoxid Produktion von der Aktivität eines endosomalen Anionenkanals, Chloridkanal-3 (ClC-3) abhängt^{145,146}, sollte auch im Rahmen dieser Arbeit analysiert werden, ob Inhibitoren von ClC-3 wie z.B. Nifluminsäure (NFA) die HL5B induzierte ROS Produktion unterbinden können. Dazu wurden Monomac1 Zellen erneut mit H₂HFF-BSA beladen und der Effekt von NFA sowie der Effekt von ROS Scavengern auf die ROS Produktion durchflusszytometrisch erfasst. Wie Abb. 4.18 zeigt, konnte die ROS Produktion erwartungsgemäß von den ROS Scavengern N-Acetylcystein (NAC) und PEG-SOD inhibiert werden. Aber auch die Anwesenheit von NFA unterdrückte die ROS Bildung, was das Konzept einer endosomalen Superoxid Bildung weiter untermauert. In weiteren Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass sowohl NFA als auch die ROS Scavenger die Induktion von TLR8 mRNA durch HL5B inhibieren. Gleiches gilt für die nachfolgende TNF α Sekretion der Zellen (Abb. 4.19).

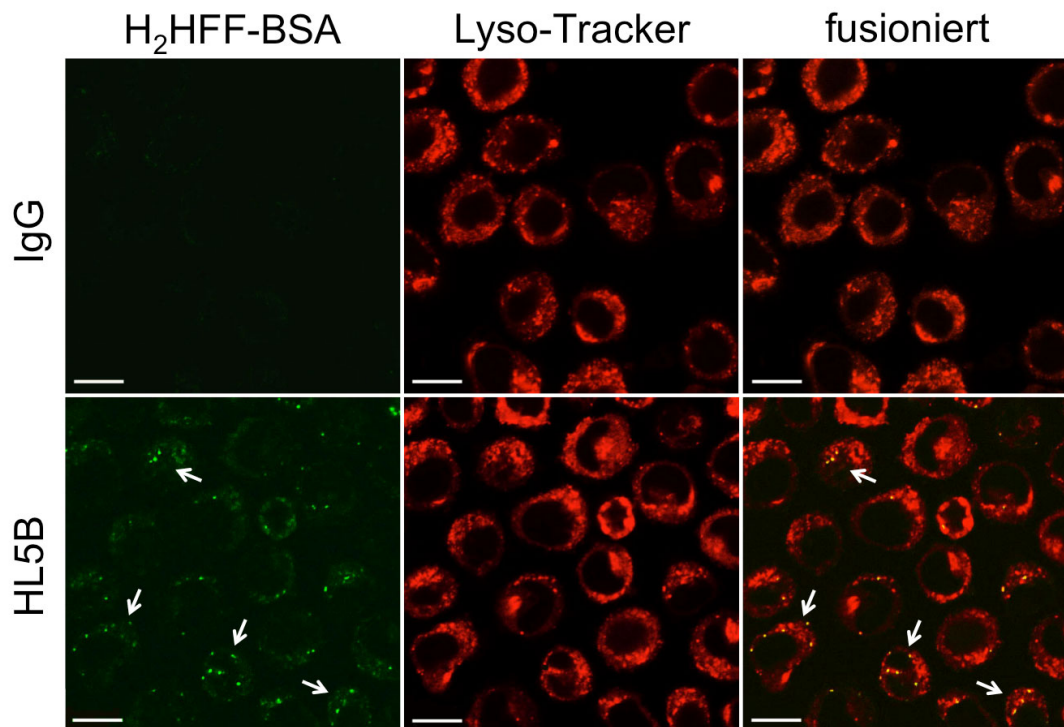


Abb. 4.17 Endosomale ROS Bildung.

Monomac1 Zellen wurden für 2 min mit H₂HFF-BSA beladen bevor sie für 15 min mit HL5B oder IgG stimuliert wurden (je 500 ng/ml). Die ROS Bildung wurde mithilfe der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie unter exakt identischen Einstellungen detektiert. Die sauren Organellen wurden mit Lyso-Tracker (50 nM) visualisiert. Die Kolokalisation von fluoreszierendem H₂HFF-BSA mit Lyso-Tracker ist mit Pfeilen markiert. Die ROS Produktion konnte durch Zugabe von PEG-SOD (500 U/ml) blockiert werden. Balken = 10 µm.

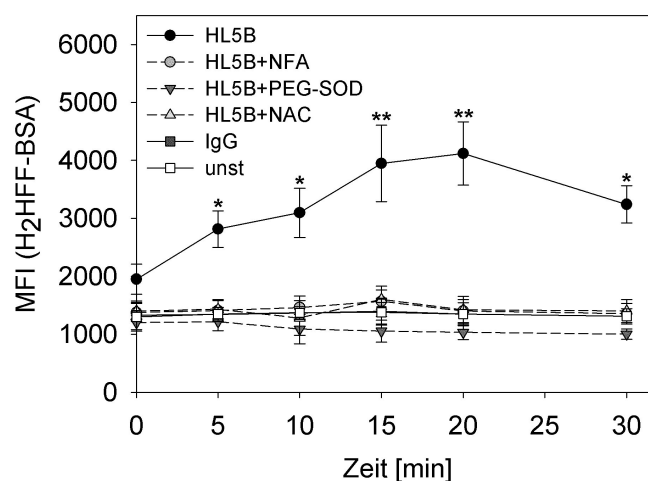


Abb. 4.18 Inhibition der endosomalen Superoxid Induktion durch HL5B.

Monomac1 Zellen wurden für 2 min mit H₂HFF-BSA beladen bevor sie mit HL5B oder IgG stimuliert wurden. Die Inhibition erfolgte durch Zugabe von NFA (0,1 mM), PEG-SOD (500 U/ml) oder N-Acetylcystein (NAC) (10 mM). Die durch ROS Produktion bedingte Zunahme des Fluoreszenzsignals wurde durchflusszytometrisch erfasst. Die Daten entsprechen Mittelwerten +/- SD von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen HL5B vs. HL5B+Inhibitor: * p < 0,005; ** p < 0,001.

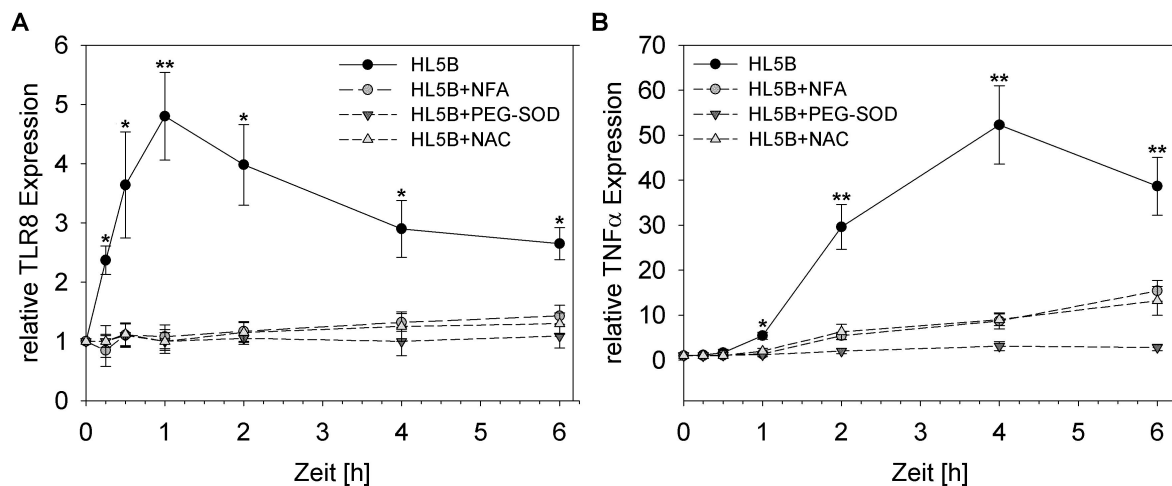


Abb. 4.19 Superoxid-abhängige TLR8 und TNF α Induktion .

Monomac1 Zellen wurden mit HL5B (100 ng/ml) entweder alleine oder in Anwesenheit von NFA (0,1 mM), PEG-SOD (500U/ml) oder N-Acetylcystein (NAC) (10 mM) stimuliert. Die relative TLR8 (A) bzw. TNF α (B) mRNA Expression wurde mittels qRT PCR ermittelt und gegen die relative Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen HL5B vs. HL5B+Inhibitor: * $p < 0,005$; ** $p < 0,001$.

4.9 aPL induzieren die Translokation von TLR7/8

Die intrazellulären TLRs (TLR3, TLR7-9) befinden sich in ruhenden Zellen im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Erst als Antwort auf eine PAMP-vermittelte Stimulation erfolgt ihre Translokation ins Endosom. Diese intrazelluläre Lokalisation ermöglicht die Erkennung von viralen Nukleinsäuren, die über die endosomale Route in die Zelle gelangen. Weiterhin verhindert sie die Aktivierung durch „Selbst-Nukleotide“¹⁵¹, da im ER keine TLR Aktivierung möglich ist. Erst im sauren Milieu des Endosoms kann die Aktivierung der TLRs erfolgen. Wären die TLRs auch in ruhenden Zellen im Endosom lokalisiert, so könnte jede körpereigene Nukleinsäure, die z.B. durch Endozytose-Prozesse in das Endosom gelangt, die TLRs unkontrolliert aktivieren.

Wie zuvor in den RNase Experimenten gezeigt werden konnte, resultierte die gesteigerte Zytokin Sekretion nach HL5B Stimulation aus einer Aktivierung der TLRs durch die in der Zellkultur vorhandenen „Selbst-Nukleotide“. Obwohl HL5B offenbar nicht direkt an der TLR Aktivierung beteiligt war, konnte der aPL die TLRs für ihre Liganden sensibilisieren.

Diese Ergebnisse könnten dadurch erklärt werden, dass aPL die Translokation von TLR7 bzw. TLR8 vom ER ins Endosom induzieren. Weiterhin würde diese Hypothese erklären warum die Inhibition von NF- κ B zwar TNF α Sekretion unterbindet nicht aber die frühe IFN α Produktion: im frühen Endosom erfolgt die TLR7 vermittelte IFN α Induktion unabhängig von NF- κ B¹⁵². Nimmt man an, dass HL5B die Translokation der TLRs ins Endosom induziert, wo sie von RNA aus der Zellkultur aktiviert werden können, so würde man tatsächlich eine frühe NF- κ B unabhängige IFN α Sekretion erwarten.

Um die intrazelluläre Lokalisation von TLR8 in Monomac1 Zellen zu visualisieren, wurden Fluoreszenz-markierte Antikörper gegen TLR8 sowie Marker für das frühe Endosom (EEA1) bzw. für das ER (Calnexin) eingesetzt. In IgG stimulierten Zellen konnte eine signifikante Kolokalisation von TLR8 und Calnexin nachgewiesen werden während die Färbungen für TLR8 und EEA1 in diesem Ansatz keine Überlappungen zeigten. Nach HL5B Stimulation ergab sich ein umgekehrtes Bild: während keine Überlappung von TLR8 und Calnexin nachgewiesen werden konnte, wurde eine deutliche Kolokalisation von TLR8 und EEA1 detektiert (Abb. 4.20).

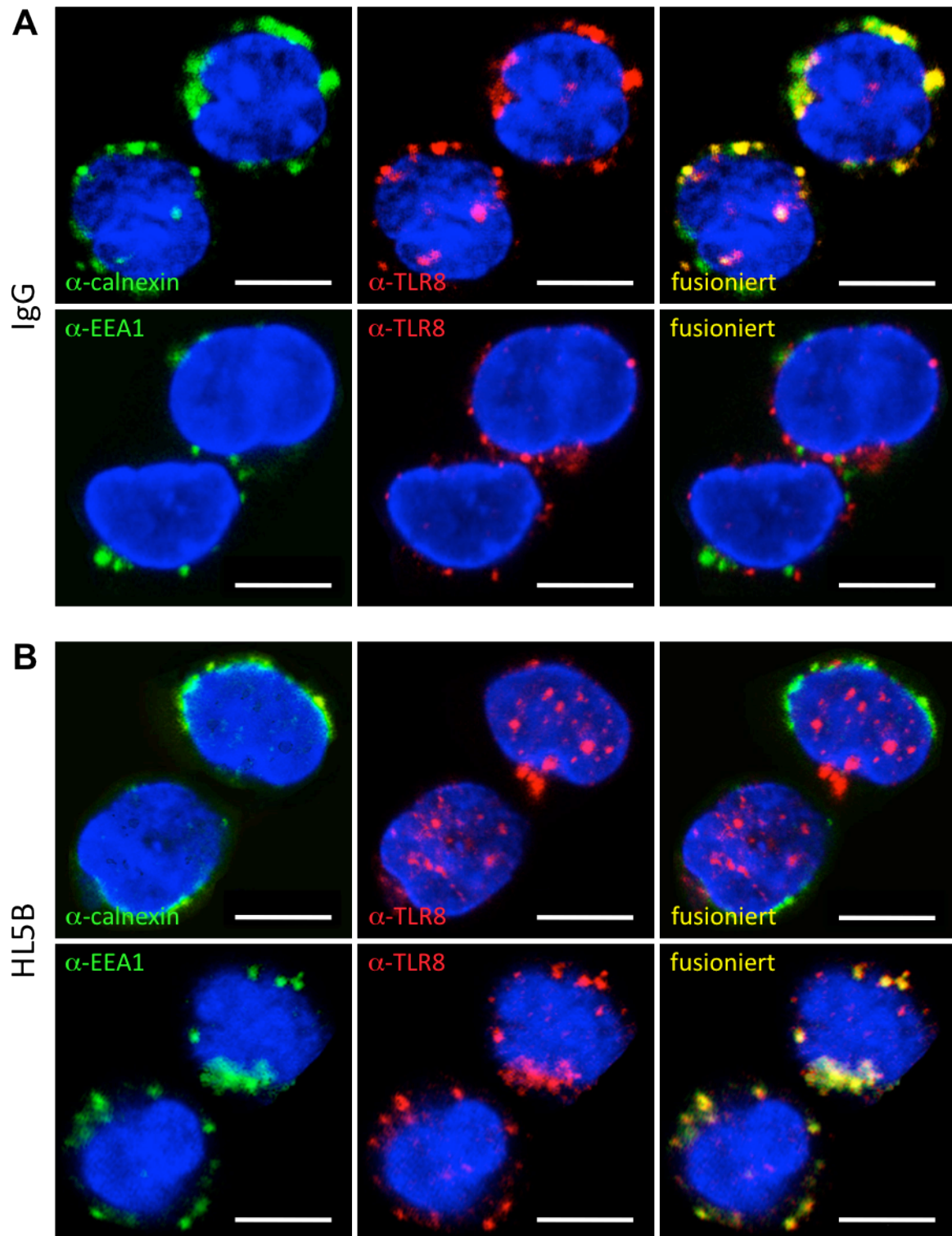


Abb. 4.20 aPL induzieren die Translokation von TLR8.

Konfokale Aufnahmen von Monomac1 Zellen, die mit α -TLR8 (rot) und α -Calnexin bzw. α -EEA1 (grün) gefärbt wurden. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) visualisiert. Vor der Fixierung wurden die Zellen für 30 min mit IgG oder HL5B (je 100 ng/ml) stimuliert. (A) TLR8 ist nach IgG Stimulation mit Calnexin aber nicht mit EEA1 kolokalisiert. (B) Kolokalisation von TLR8 mit EEA1 statt mit Calnexin nach HL5B Stimulation. Balken = 10 μ m.

4.10 APS Patienten

Um zu überprüfen, ob die stimulatorische Aktivität von HL5B und HL7G auch in aPL von Patienten mit APS vorkommt, wurden ähnliche Stimulationsexperimente mit IgG Fraktionen von Patienten mit primärem APS oder sekundärem APS durchgeführt. Als Kontrolle dienten IgG Fraktionen von SLE-Patienten. Weiterhin wurde die relative TLR7 Expression in PBMCs aus dem Blut von APS Patienten im Vergleich zu PBMCs aus dem Blut gesunder Spender bestimmt.

4.10.1 Stimulationsversuche mit IgG Fraktionen

Analog zu den Stimulationsexperimenten mit den monoklonalen aPL wurden pDCs nun mit IgG Fraktionen stimuliert und die relative TLR7 mRNA Expression, die TNF α Sekretion sowie die Superoxid-Bildung bestimmt. Insgesamt wurden IgG Fraktionen von 4 Patienten mit primärem APS (m/f = 1/3; Durchschnittsalter 51 Jahre, Range 39-72), 10 Patienten mit sekundärem APS (m/f = 2/8; Durchschnittsalter 42 Jahre, Range 21-54), von 10 SLE Patienten ohne aPL (m/f = 2/8; Durchschnittsalter 44,5 Jahre, Range 28-64) sowie von 10 gesunden Kontrollspendern (m/f = 2/8; Durchschnittsalter 37 Jahre, Range 24-65) eingesetzt.

Es konnte gezeigt werden, dass die IgG Fraktionen der APS Patienten eine verstärkte TLR7 Expression induzierten und zwar unabhängig vom Vorliegen einer SLE Erkrankung (Abb. 4.21A). Die IgG Fraktionen der SLE Patienten ohne aPL besaßen hingegen im Bezug auf die TLR7 Expression nur ein minimal höheres stimulatorisches Potential als die IgG Fraktionen der gesunden Spender. Letztere konnten gar keine Expressionssteigerung von TLR7 in pDCs induzieren. Weiterhin waren nur die IgG Fraktionen der APS Patienten -im Gegensatz zu den IgG Fraktionen der SLE Patienten- in der Lage ROS zu induzieren (Abb. 4.21B). Die aus der Stimulation mit IgG Fraktionen aus APS Patienten resultierende verstärkte TLR7 Expression wurde von einer gesteigerten TNF α Ausschüttung begleitet, welche durch die Zugabe von IRS661 blockiert werden konnte (Abb. 4.22). Hingegen induzierten die IgG Fraktionen von SLE Patienten eine deutlich schwächere Zytokin Sekretion, die nur marginal durch die Zugabe des TLR7 Inhibitors reduziert werden konnte.

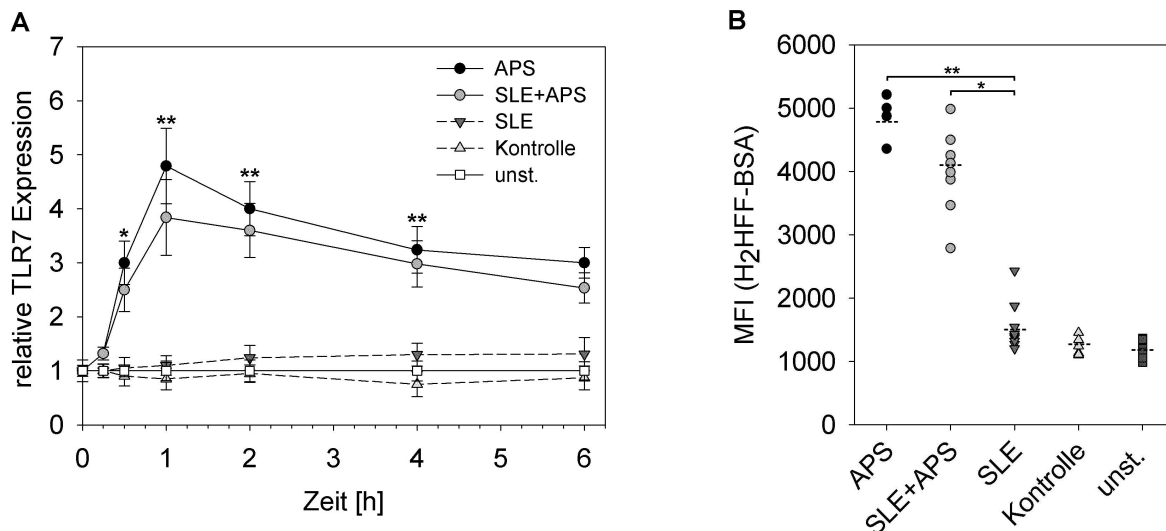


Abb. 4.21 IgG Fraktionen von APS Patienten induzieren TLR7 und ROS.

Humane pDCs wurden mit IgG Fraktionen (je 100 µg/ml) von 4 primären APS Patienten, 10 Patienten mit sekundärem APS auf dem Hintergrund einer SLE Erkrankung, 10 SLE Patienten und IgG Fraktionen von 10 gesunden Kontroll-Spendern stimuliert. (A) qRT PCR nach unterschiedlichen Stimulations-Zeiträumen von 15 min bis 6 h. Die TLR7 mRNA Expression wurde gegen die Expression von β-Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von fünf unabhängigen Experimenten mit allen 34 IgG Fraktionen. Signifikanzen APS vs. SLE: * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$. (B) Die durch ROS Produktion bedingte Zunahme des Fluoreszenzsignals wurde durchflusszytometrisch erfasst. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von fünf unabhängigen Experimenten. Signifikanzen (A) APS bzw. SLE+APS vs. SLE: * $p < 0,02$; ** $p < 0,001$; (B) * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$.

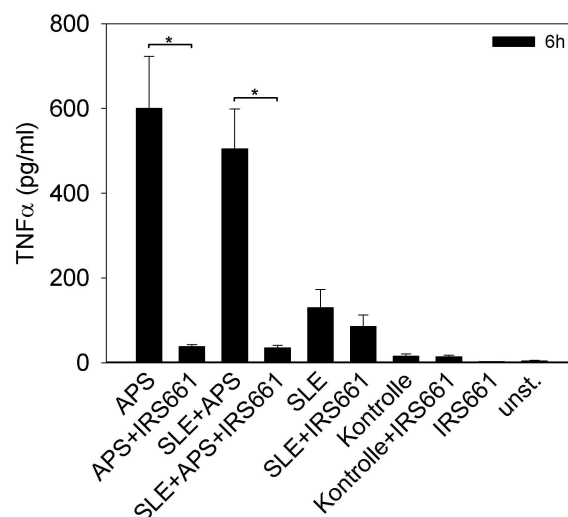


Abb. 4.22 IgG Fraktionen von APS Patienten induzieren TNF α .

Humane pDCs wurden analog zu Abb. 4.21 stimuliert. Die Sekretion von TNF α wurde im ELISA ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD von 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen APS vs. APS+IRS661: * $p < 0,001$.

4.10.2 TLR7 Expressionsniveau in PBMCs von Patienten

Die TLR7 mRNA sowie Protein Expression wurde in PBMCs von APS Patienten im Vergleich zur TLR7 Expression in gesunden Spendern bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass die PBMCs der APS Patienten im Vergleich zu den gesunden Spendern eine spezifisch verstärkte TLR7 mRNA Expression aufweisen. Diese Ergebnisse beweisen, dass die durch monoklonale aPL induzierten Effekte *in vitro* sich auch *in vivo* in einer veränderten Reaktivität von pDCs widerspiegeln.

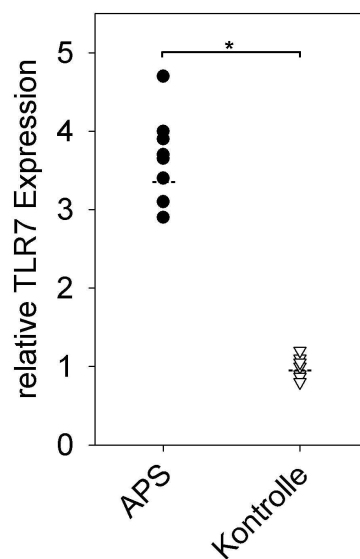


Abb. 4.23 TLR7 Expressionslevel in PBMCs von APS Patienten.

Das TLR7 Expressionslevel wurde in PBMCs von 8 APS Patienten, 6 RA Patienten sowie von 8 gesunden Spendern mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Signifikanzen APS vs. RA: * $p < 0,03$; ** $p < 0,005$.

4.11 Aktivierung humaner pDCs durch aPL

Professionelle APCs wie humane pDCs bilden eine wichtige Schnittstelle der innate und adaptiven Immunantwort. Zur effektiven Antigenpräsentation wird die verstärkte Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD80, CD86) benötigt⁵⁶. Eine mögliche Aktivierung der pDCs durch aPL sollte durch die durchflusszytometrische Analyse der Expressionsstärke dieser kostimulatorischen Moleküle bestimmt werden.

Es konnte gezeigt werden dass die Stimulation mit HL5B in einer deutlich verstärkten Expression von CD80 und CD86 in CD123^{HI}CD303⁺HLA-DR^{HI}PI^{LOW} pDCs resultierte. Vergleichbare Ergebnisse konnten mit HL7G erzielt werden (Daten nicht gezeigt). IgG hatte hingegen keinen Effekt auf den Aktivierungszustand der pDCs. Eine zusätzliche Steigerung der Expressionsstärke der kostimulatorischen Moleküle konnte durch die kombinierte Stimulation mit HL5B und RNA40 erzielt werden. Dabei wurde die durch RNA40 induzierte Hochregulation dieser Moleküle signifikant überschritten (Abb. 4.24).

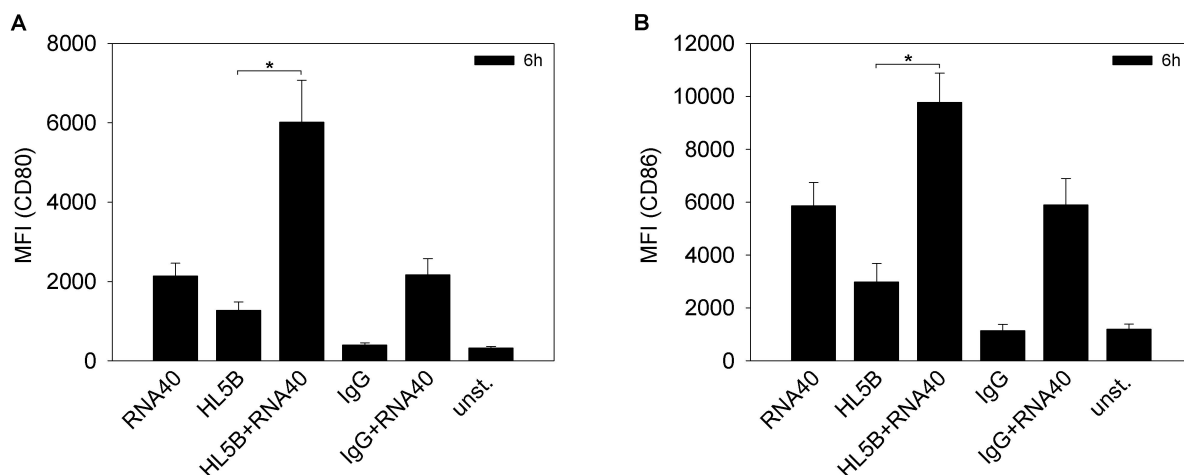


Abb. 4.24 Expression von CD80 und CD86 auf pDCs.

Humane CD123^{HI}CD303⁺HLA-DR^{HI}PI^{LOW} pDCs wurden mit HL5B und IgG (je 100 ng/ml) entweder alleine oder in Kombination mit RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. Kontrollen waren R848 stimulierte Zellen sowie unstimulierte Zellen. Die Expression von CD80 (A) und CD86 (B) auf der Zelloberfläche wurde nach 6 h durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten entsprechen der mittleren Fluoreszenz Intensität von 5 unabhängigen Experimenten +/- SD (die entsprechenden MFIs der Isotyp Kontrollen wurden subtrahiert). * p < 0,005; ** p < 0,05.

Diese Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle nach Stimulation mit HL5B und/oder RNA40 resultierte aus der Aktivierung von TLR7. So konnte bei Anwesenheit des TLR7 Inhibitors IRS661 keine Aktivierung der pDCs beobachtet werden. Weiterhin wird die Regulation von CD80/86 offenbar durch die endosomale Superoxid-Produktion bedingt: die Expression beider Aktivierungsmarker konnte durch die Zugabe von NFA signifikant reduziert werden (Abb. 4.25).

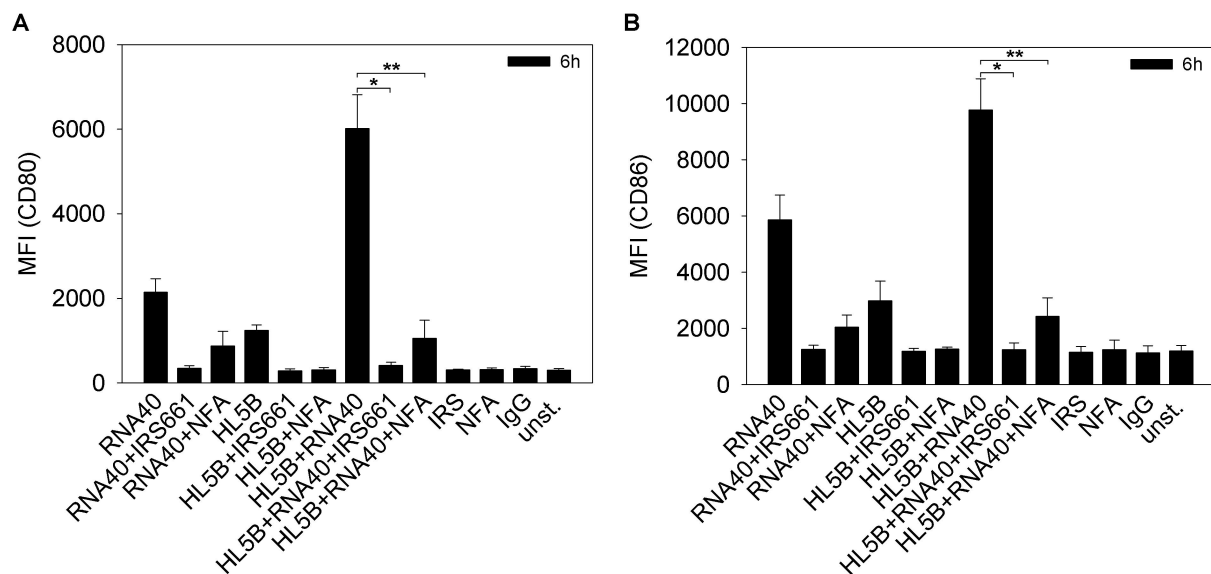


Abb. 4.25 Inhibition der CD80 und CD86 Expression durch IRS661 und NFA.

Humane CD123^{HI}CD303⁺HLA-DR^{HI}PI^{LOW} pDCs wurden mit HL5B und IgG (je 100 ng/ml) entweder alleine oder in Kombination mit RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. Die Inhibitoren IRS661 (0,5 µM) bzw. NFA (0,1 mM) wurden 30 min vor den Stimuli zugegeben. Die Expression von CD80 (A) und CD86 (B) auf der Zelloberfläche wurde nach 6 h durchflusszytometrisch ermittelt. Die Daten entsprechen der mittleren Fluoreszenz Intensität von 5 unabhängigen Experimenten +/- SD (die entsprechenden MFIs der Isotyp Kontrollen wurden subtrahiert). * p < 0,001; ** p < 0,03.

4.12 Aktivierung von T-Zellen durch aPL aktivierte pDCs

Um sicherzustellen, dass die Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle mit einer funktionellen Aktivierung der pDCs einhergeht, wurde der Effekt von stimulierten pDCs auf das Priming allogener naiver T-Zellen untersucht. Dazu wurden Kokultur Experimente über 5 Tage mit CFSE-gefärbten CD3⁺ T-Zellen durchgeführt. Die Proliferation der T-Zellen spiegelte sich in einem verminderten CFSE-Signals wieder. Dabei resultierte eine Zellteilung in einer 50%igen Reduktion des Fluoreszenzsignals.

Wie in Abb. 4.26 ersichtlich konnten pDCs, die zuvor mit aPL oder RNA40 stimuliert wurden, eine T-Zell Proliferation hervorrufen. Dieses T-Zell Priming konnte durch die kombinierte Stimulation beider Reagenzien zusätzlich deutlich verstärkt werden. IgG hingegen war nicht in der Lage pDCs zur T-Zell-Aktivierung zu primen und konnte auch nicht die durch RNA40 induzierte T-Zell Proliferation weiter steigern.

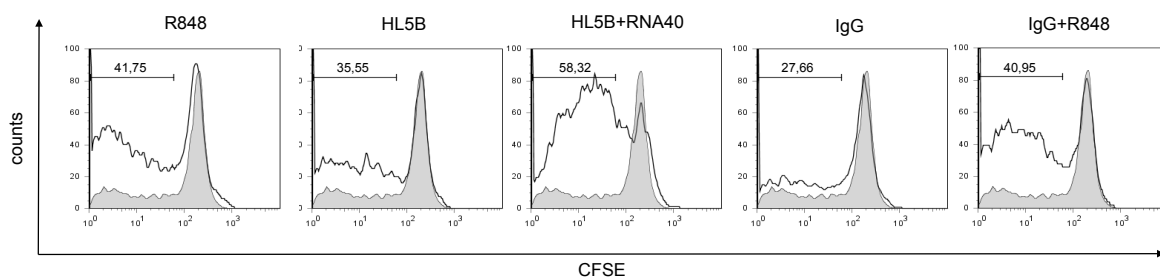


Abb. 4.26 T-Zell Proliferation.

Humane pDCs wurden mit HL5B und IgG Kontroll Antikörper (je 100 ng/ml) entweder alleine oder in Kombination mit RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. Kontrollen waren RNA40 stimulierte sowie unstimulierte Zellen. Nach 6 h wurden CD3⁺ CFSE gefärbte T-Zellen zugegeben. Nach 5 Tagen wurde die Reduktion des CFSE Fluoreszenzsignals (als ein Marker für T-Zell Proliferation) in CD4⁺ T-Zellen detektiert. Das schattierte Histogramm zeigt das CFSE Signal der Kokultur mit unstimulierten pDCs. Die Ergebnisse sind für 5 unabhängige Experimente repräsentativ.

In weiteren Experimenten konnten die proliferierenden T-Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker als CD4⁺ T-Zellen charakterisiert werden. Eine Proliferation der zytotoxischen CD8⁺ T-Zellen konnte hingegen nicht detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Durch den Nachweis der Th2-Zell typischen Marker CCR7, CRTH2 und CD202 auf der Oberfläche der aktivierten CD3⁺CD4⁺ T-Zellen konnten diese weiterhin eindeutig als Th2-Helferzellen identifiziert werden (Abb. 4.27).

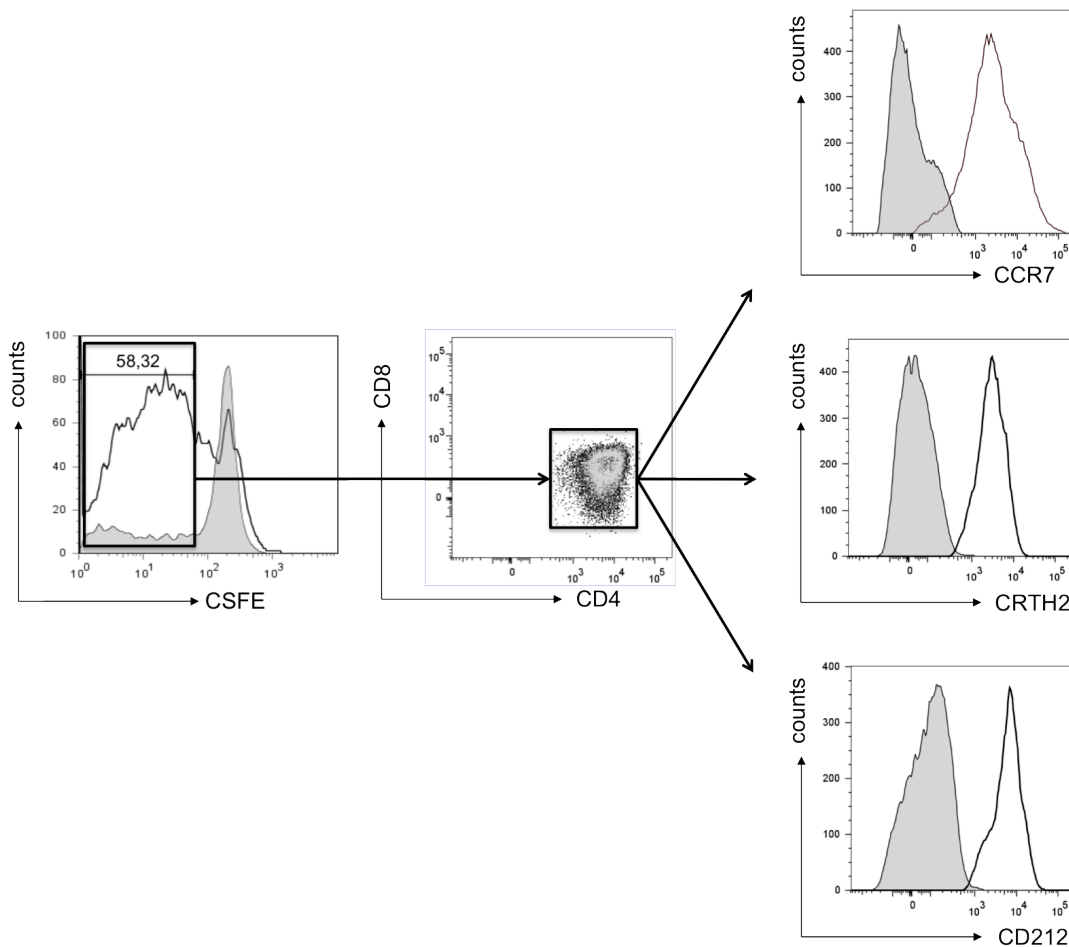


Abb. 4.27 Charakterisierung der proliferierenden T-Zellen.

Die CFSE^{LOW} proliferierenden T-Zellen aus Abb. 4.24 konnten durch zusätzliche Oberflächenfärbungen im Durchflusszytometer als CD4⁺CD8⁻CCR7⁺CRTH2⁺CD212⁺ Th2-Helferzellen charakterisiert werden. Die Ergebnisse sind für 5 unabhängige Experimente repräsentativ.

4.13 Aktivierung von B-Zellen

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass aPL stimulierte pDCs Th2-Zellen primen, stellte sich die Frage nach einer möglichen nachfolgenden autologen B-Zell Aktivierung, Proliferation und Antikörper Sekretion. Dazu wurden verschiedene Kokultur Experimente angesetzt. Um die Abhängigkeit der B-Zell-Aktivierung von den verschiedenen Zelltypen genau zu bestimmen, wurden neben der Kokultur von B-Zellen mit T-Zellen und pDCs auch Kulturen mit jeweils nur einer weiteren Zell-Population durchgeführt.

Der Einfluss von löslichen Komponenten (z.B. Zytokinen) sollte mithilfe sogenannter Transwell-Kokulturen ermittelt werden, in denen die B-Zellen räumlich getrennt von den pDCs und T-Zellen kultiviert wurden: durch die 0,2 µm-Membran ist zwar ein Austausch löslicher Faktoren möglich, nicht jedoch ein direkter Zell-Zell-Kontakt. Weiterhin blieb zu klären, ob B-Zellen auch in Monokultur durch aPL aktiviert werden können.

4.13.1 B-Zell Aktivierungsmarker

Nach 6 Tagen wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD40 und CD86 durchflusszytometrisch bestimmt. Abb. 4.26 zeigt, dass HL5B wie auch IgG in keinem der Versuchsansätze eine gesteigerte Expression von CD40 und CD86 in B-Zellen induzieren konnte. Die Stimulation mit dem TLR7 Ligand RNA40 hingegen resultierte in allen Ansätzen in einer ungefähr verdoppelten Expression von CD40 und CD86. Bei einer Kokultur von B-Zellen und pDCs, konnte die durch RNA40 induzierte Hochregulierung der kostimulatorischen Moleküle durch die Zugabe von HL5B zusätzlich verstärkt werden. Diese Steigerung wurde abgeschwächt, wenn die B-Zellen in Transwell-Kultur zwar mit konditioniertem Medium versorgt wurden, jedoch keinen direkten Zell-Zell-Kontakt zu den pDCs ausbilden konnten. Die aus der kombinierten Stimulation (HL5B+RNA40) resultierende verstärkte B-Zell-Aktivierung konnte durch die Anwesenheit von CD3⁺ T-Zellen weiter gesteigert werden. Wurden die B-Zellen hingegen in Abwesenheit der pDCs mit den T-Zellen kokubiert, konnte HL5B keinen Einfluss auf die durch RNA40 induzierte B-Zell-Aktivierung nehmen. Auch in einer B-Zell-Monokultur konnte HL5B den Effekt des TLR7 Liganden nicht steigern.

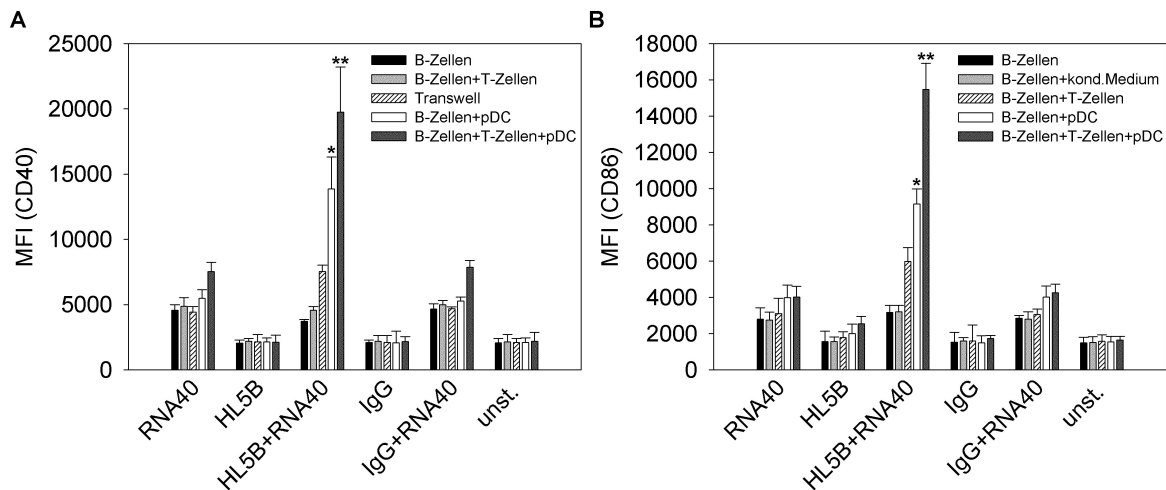


Abb. 4.28 B-Zell Aktivierungsmarker.

B-Zellen wurden entweder alleine, in Kokultur mit T-Zellen und/oder pDCs sowie in Transwell-Kokulturen mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml) und/oder RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. B- und T-Zellen waren dabei zu einander autolog. Die pDCs stammten aus einem allogenen Spender. Die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40 (A) und CD86 (B) wurde nach 4 Tagen durchflusszytometrisch bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) von 3 unabhängigen Experimenten +/- SD. Signifikanzen HL5B+RNA40 vs. RNA40: * p < 0,05; ** p < 0,001.

4.13.2 B-Zell Proliferation

Die Proliferation der CD19⁺ B-Lymphozyten wurde über die Abnahme des CFSE-Fluoreszenzsignals ermittelt. Die Stimulation mit dem TLR7 Liganden RNA40 resultierte in allen Versuchsansätzen in einer B-Zell Proliferation. Während die Kokultur der B-Zellen mit T-Lymphozyten praktisch keinen Unterschied zu der B-Zell-Monokultur erbrachte, konnte der Anteil an proliferierenden Zellen durch die Zugabe von konditioniertem Medium bzw. durch Kokultur mit pDCs erhöht werden. Dabei konnten pDCs im Vergleich Transwell-Kultur eine deutlich stärkere B-Zell Proliferation induzieren (35,92% vs. 26,98% proliferierende B-Lymphozyten). Eine weitere Steigerung der Zellteilungsrate wurde durch die gemeinsame Kokultur von B-Zellen mit pDCs und T-Zellen erzielt (40,96%). HL5B wie auch IgG konnten lediglich bei Anwesenheit der pDCs eine sehr schwache Proliferation der B-Zellen induzieren. Wurde HL5B jedoch in Kombination mit RNA40 eingesetzt, so konnte bei Anwesenheit von pDCs der Anteil der sich teilenden B-Zellen im Vergleich zur alleinigen Stimulation mit RNA40 signifikant erhöht werden (48,96% bei HL5B+RNA40 Stimulation vs. 35,92% bei RNA40 Stimulation).

Durch die Zugabe von T-Zellen konnte dieser Effekt weiter verstärkt werden, sodass nach kombinierter HL5B und RNA40 Stimulation bei 69,87% der CD19⁺ Zellen ein vermindertes CFSE Signal nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.29).

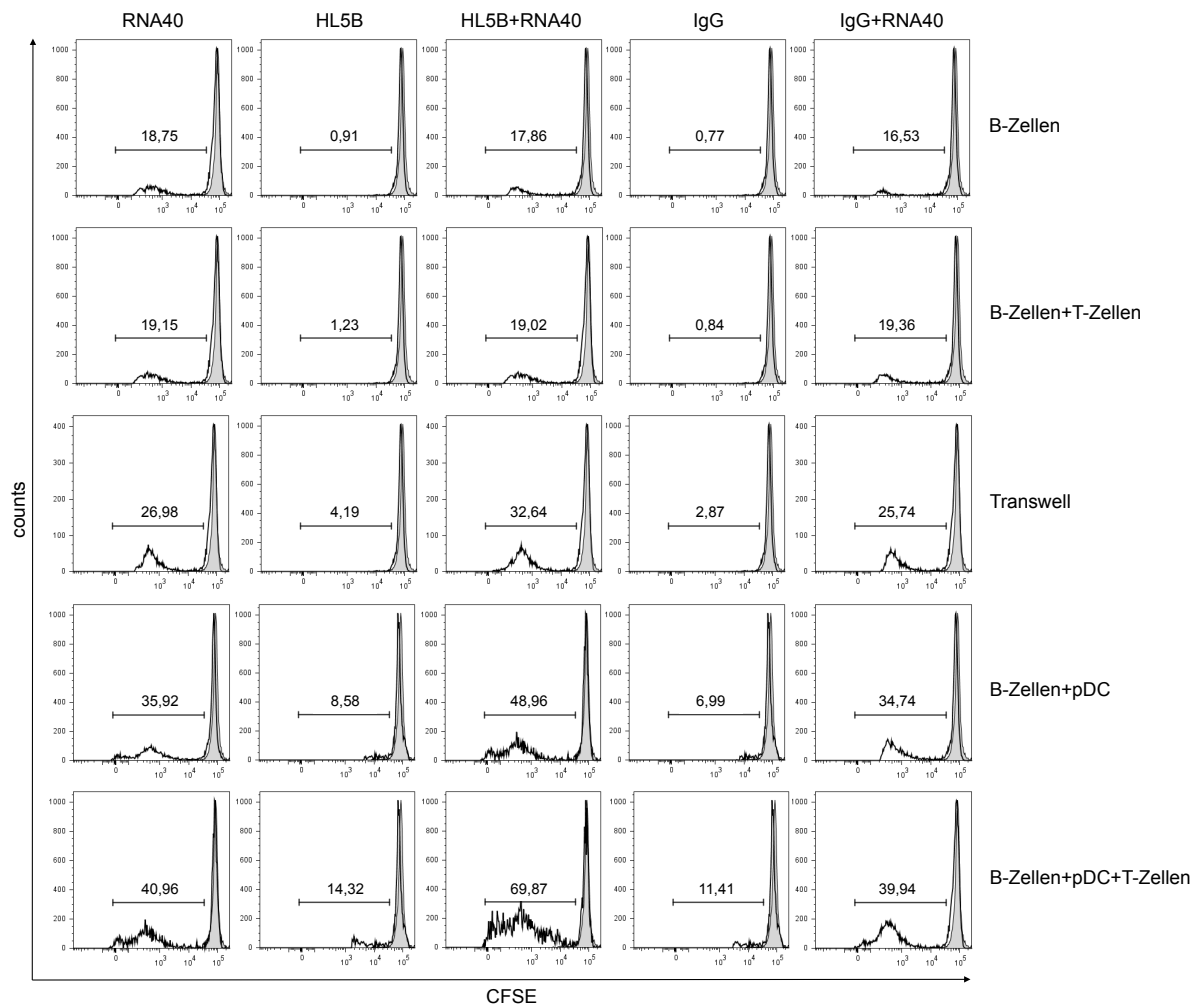


Abb. 4.29 B-Zell Proliferation.

B-Zellen wurden entweder alleine, in Kokultur mit T-Zellen und/oder pDCs sowie in Transwell-Kokulturen (= kond. Medium) mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml) und/oder RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. B- und T-Zellen waren dabei zu einander autolog. Die pDCs stammten aus einem allogenen Spender. Nach 7 Tagen wurde die Reduktion des CFSE Fluoreszenzsignals in CD19⁺MHCII^{HI} B-Zellen detektiert. Das schattierte Histogramm zeigt das CFSE Signal der Kokultur mit unstimulierten pDCs. Die Ergebnisse sind für 3 unabhängige Experimente repräsentativ.

4.13.3 Differenzierung von B-Zellen

Aufgrund der bisherigen Beobachtungen stellte sich die Frage, ob HL5B+RNA40 stimulierte pDCs sogar die Plasmazelldifferenzierung fördern können. Plasmazellen sind charakterisiert durch eine hohe Expression von CD38 und CD138¹⁵³. Nach 8 Tagen wurde daher der prozentuale Anteil der CD38⁺CD138⁺ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Wie Abb. 4.30 zeigt, konnte in B-Zell-Monokulturen sowie in der Kokultur von B-Zellen und T-Zellen durch keinen der Stimuli eine Plasmazelldifferenzierung induziert werden. In den übrigen drei Kokultur Ansätzen resultierte hingegen die Stimulation mit dem TLR7 Liganden RNA40 in einem vermehrten Anteil von CD38⁺CD138⁺ B-Zellen. Eine Steigerung dieses Anteils konnte durch die kombinierte Stimulation mit HL5B und RNA40 erzielt werden. HL5B alleine konnte hingegen in keinem der Ansätze eine B-Zell-Differenzierung einleiten. Die maximale Zunahme an Plasmazellen konnte beobachtet werden, wenn B-Zellen zusammen mit HL5B, RNA40, pDCs und T-Zellen kokultiviert wurden. Unter diesen Kulturbedingungen konnten 75,9% ± 4,3% Zellen als Plasmazellen identifiziert werden. Ohne Anwesenheit von T-Zellen war der Anteil an Plasmazellen mit 52,6% ± 4,7% deutlich niedriger. Die räumliche Trennung der B-Zellen von den pDCs durch Transwell-Systeme führte zu einer weiteren Abschwächung des Differenzierungsprozesses.

Ansatz	Anteil CD38 ⁺ CD138 ⁺ Plasmazellen [%]					
	RNA40	HL5B	HL5B+ RNA40	IgG	IgG+ RNA40	unst.
B-Zellen	6,2 ± 2,1	4,7 ± 2,0	7,5 ± 3,2	4,9 ± 1,6	5,8 ± 2,3	5,1 ± 1,9
B-Zellen+ T-Zellen	5,7 ± 2,5	4,2 ± 1,1	5,6 ± 3,0	4,6 ± 1,2	5,9 ± 2,6	4,7 ± 1,6
Transwell	11,3 ± 3,7	6,1 ± 1,4	18,6 ± 2,5	6,0 ± 1,7	10,9 ± 2,8	5,6 ± 1,5
B-Zellen+ pDCs	34,9 ± 5,2	5,8 ± 1,5	52,6 ± 4,7	5,7 ± 1,3	35,2 ± 5,1	5,9 ± 1,4
B-Zellen+ pDCs+T-Zellen	45,7 ± 6,4	5,7 ± 2,1	75,9 ± 4,3	5,9 ± 1,8	45,1 ± 7,4	5,5 ± 1,7

Abb. 4.30 Plasmazelldifferenzierung.

B-Zellen wurden entweder alleine, in Kokultur mit T-Zellen und/oder pDCs sowie in Transwell-Kokulturen (= kond. Medium) mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml) und/oder RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. B- und T-Zellen waren dabei zu einander autolog. Die pDCs stammten aus einem allogenen Spender. Nach 8 Tagen wurde der Anteil an CD38⁺CD138⁺ innerhalb der CD3⁺CD123⁻ Zellen durchflusszytometrisch bestimmt. Die Ergebnisse entsprechend den Mittelwerten +/- SD von 3 unabhängigen Experimenten.

4.13.4 Ig Sekretion durch B-Zellen

Da die Kombination von HL5B und RNA40 in B-Zellen bei Anwesenheit von pDCs eine deutliche Plasmazelldifferenzierung induzierte, stellte sich die Frage nach einer möglichen Immunglobulin Produktion. Dazu wurde nach 8 Tagen die IgM- sowie die IgG-Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA bestimmt. Weiterhin wurde die Konzentration von anti-Cardiolipin Antikörpern des IgM und IgG Isotyps ermittelt.

Wie in Abb. 4.31 zu sehen ist, decken sich die Ergebnisse zur Antikörper-Produktion mit denen der B-Zell-Differenzierung. So konnte weder in der B-Zell-Monokultur noch bei der Kokultur von B- und T-Zellen eine IgM oder IgG Produktion detektiert werden. Jedoch konnte in den Ansätzen in denen eine Plasmazelldifferenzierung beobachtet wurde auch eine Ig Produktion nachgewiesen werden. So induzierte RNA40 in den Transwell-Experimenten eine deutliche IgM und IgG Sekretion. Die zusätzliche Zugabe von HL5B zeigte jedoch keinen Effekt. War jedoch ein direkter Zell-Zell-Kontakt von B-Zellen und pDCs möglich, konnte HL5B die durch RNA40 verursachte Ig Produktion deutlich steigern. Dieser Erhöhung wurde durch die Anwesenheit von T-Zellen zusätzlich verstärkt. HL5B und IgG alleine konnten erwartungsgemäß in keinem der Ansätze eine IgM oder IgG Produktion induzieren.

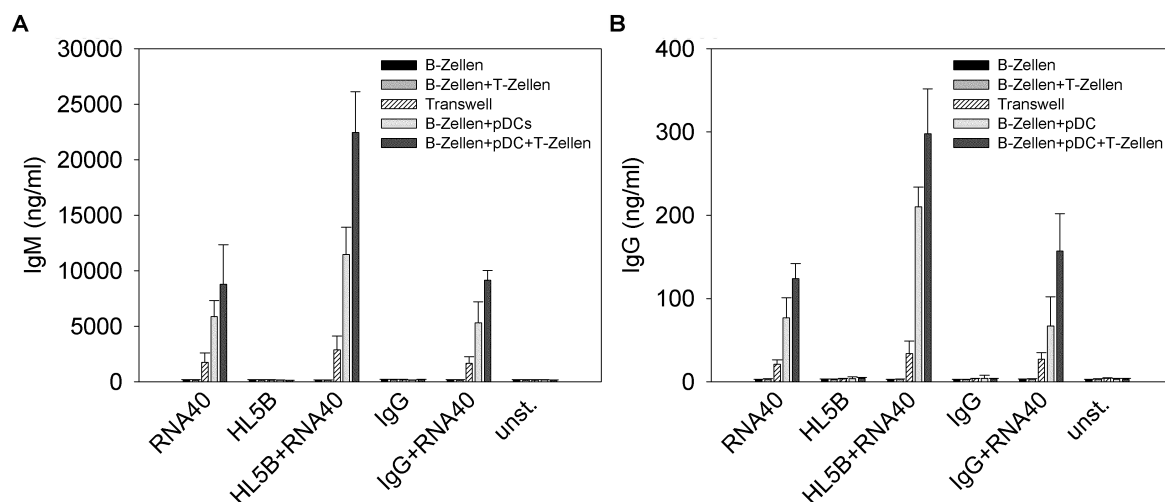


Abb. 4.31 IgM und IgG Sekretion durch B-Zellen.

B-Zellen wurden entweder alleine, in Kokultur mit T-Zellen und/oder pDCs sowie in Transwell-Kokulturen (= kond. Medium) mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml) und/oder RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. B- und T-Zellen waren dabei zu einander autolog. Die pDCs stammten aus einem allogenen Spender. Nach 8 Tagen wurde die IgM (A) und IgG (B) Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA ermittelt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten +/- SD von 3 unabhängigen Experimenten.

Abb. 4.32 zeigt, dass die kombinierte Stimulation (HL5B+RNA40) B-Zellen zur Sekretion von anti-Cardiolipin Antikörpern vor allem des IgG Isotyps anregte. Hierbei war allerdings ein direkter Zell-Zell-Kontakt zu den pDCs notwendig. Aber auch der TLR7 Ligand alleine konnte eine schwache Produktion von IgM und IgG Cardiolipin Antikörpern bei Anwesenheit der pDCs induzieren.

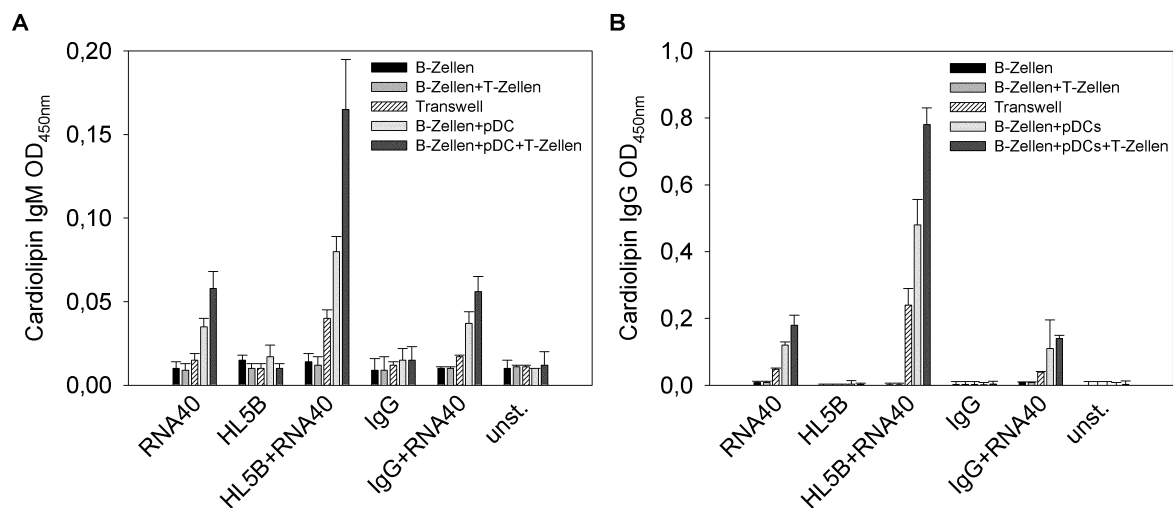


Abb. 4.32 anti-Cardiolipin IgM und IgG Sekretion durch B-Zellen.

B-Zellen wurden entweder alleine, in Kokultur mit T-Zellen und/oder pDCs sowie in Transwell-Kokulturen (= kond. Medium) mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml) und/oder RNA40 (10 µg/ml) stimuliert. B- und T-Zellen waren dabei zu einander autolog. Die pDCs stammten aus einem allogenen Spender. Nach 8 Tagen wurde die anti-Cardiolipin-IgM (A) und -IgG (B) Konzentration im Zellkulturüberstand mittels ELISA ermittelt. Die Ergebnisse entsprechen den Mittelwerten \pm SD von 3 unabhängigen Experimenten.

4.14 Bestätigung der Ergebnisse im Mausmodell

Da für einige im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren pleiotrope Effekte beschrieben wurden, sollten die wichtigsten Aspekte des hier beschriebenen Signaltransduktionsweges zusätzlich in entsprechenden Knock-out Mausmodellen verifiziert werden. Weiterhin konnte durch die Verwendung transgener Mäuse der Subtyp der beteiligten NADPH Oxidase identifiziert werden.

4.14.1 Tlr Knock-out Mäuse

Versuche mit dem inhibitorischen TLR7 Oligonukleotid IRS661 zeigten, dass die durch Stimulation mit HL5B hervorgerufene Induktion von proinflammatorischen Zytokinen abhängig von TLR7 und somit auch abhängig von MyD88 erfolgt. Dieses Ergebnis konnte im Tlr7^{-/-} bzw. MyD88^{-/-} Mausmodell bestätigt werden. Wie in Abb. 4.33 ersichtlich, können HL5B und R848 lediglich in den Kontroll-Tieren eine Hochregulierung der TNF α bzw. IFN α mRNA Expression induzieren. In Tlr7^{-/-} bzw. MyD88^{-/-} Mäusen war hingegen erwartungsgemäß keine Stimulation durch HL5B oder R848 nachweisbar, während beide Liganden in Tlr9^{-/-} Mäusen ein verstärktes stimulatorisches Potential zeigten. Eine TLR2 und TLR4 Abhängigkeit von HL5B konnte mithilfe entsprechender Tlr2,4 defizienter Mäusen ausgeschlossen werden.

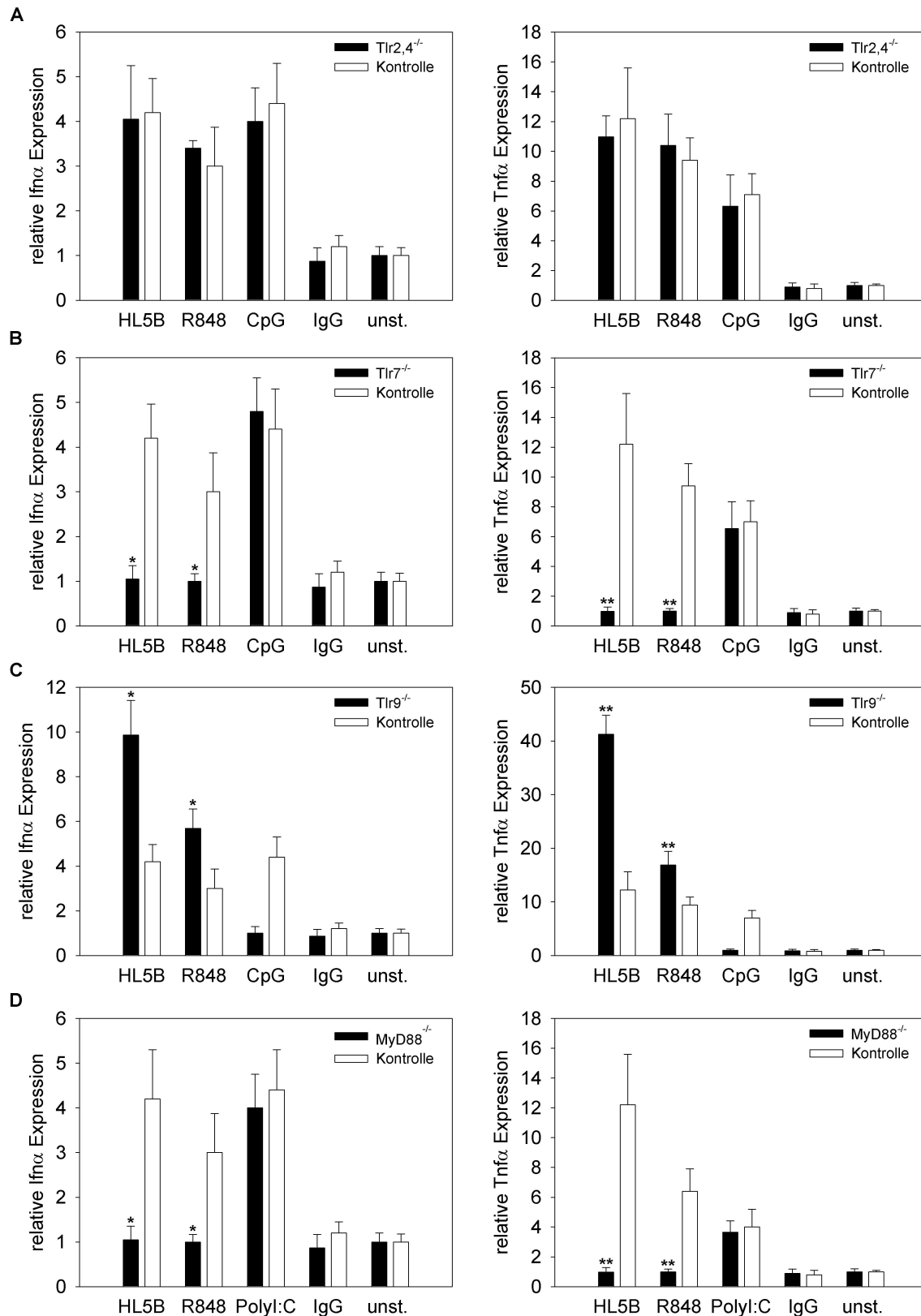


Abb. 4.33 Zytokin mRNA Expression in Knock-out Mäusen.

Murine CD11c⁺ Zellen aus je 3 Mäusen wurden für 4 h mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml), R848 (1 μ g/ml), CpG (1 μ g/ml) oder PolyI:C (50 μ g/ml) stimuliert. Die relative Ifn α (A) bzw. Tnf α (B) mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen HL5B bzw. R848 (Knock-out) vs. HL5B (Kontrolle) bzw. R848 (Knock-out) vs. R848 (Kontrolle): * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$.

4.14.2 Gp91^{phox} / p47^{phox} Knock-out Mäuse

Der mikroskopische Nachweis von Superoxid nach HL5B Stimulation sowie die inhibitorische Kapazität von NFA verweisen auf eine endosomale Nox Aktivität. Im Hinblick auf diese Lokalisation erscheint eine Beteiligung von Nox1 oder Nox2 sehr realistisch: während Nox3 und Nox5 in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnten^{154,155} und Nox4 im ER sowie im Nukleus funktionell aktiv ist^{156,157}, konnten Nox1 und Nox2 bereits im Endosom nachgewiesen werden^{145,158,159}. Mithilfe zweier Mausstämme sollte eindeutig geklärt werden, welcher Nox Subtyp durch HL5B in dendritischen Zellen bzw. in Monozyten aktiviert wird.

Nox2 wird auch als Gp91^{phox} bezeichnet und wird aktiviert, indem ihre cytosolischen Untereinheiten p47^{phox}, p67^{phox} und p21^{rac} als Aktivierungskomplex zur Membran transloziert werden und an Cytochrom b558 binden. Die Phosphorylierung der p47^{phox} durch die Protein Kinase C (PKC) ist in intakten Zellen für den regelgerechten Zusammenbau und die Aktivierung der Nox2 essentiell^{160,161}. Aber auch für Nox1 wurde eine p47^{phox} abhängige Aktivierung beschrieben¹⁶².

Wie in Abb. 4.34 ersichtlich, war weder in Gp91^{phox-/-} noch in p47^{phox-/-} Mäusen eine Hochregulierung von TLR7 durch HL5B möglich (Abb. 4.32A+B). Dies verweist auf eine Nox2 abhängige endosomale Superoxid Produktion, die die Induktion von Tlr7 bedingt. Zusätzlich ist offensichtlich auch die Translokation der intrazellulären TLRs von der Nox2 Aktivierung abhängig. So konnte HL5B in keinen der beiden Knock-out Mausstämme eine verstärkte Zytokin mRNA Expression stimulieren (Abb. 4.32C-F). Auch R848 scheint zumindest zum Teil TLR7 bzw. dessen Translokation in Nox2-abhängiger Weise zu induzieren. Zwar ist in beiden transgenen Mausstämmen noch eine schwache Hochregulation von Tlr7 bzw. Ifn α /Tnf α messbar, im Vergleich zu den Kontrollen sind die entsprechenden Signale jedoch signifikant reduziert.

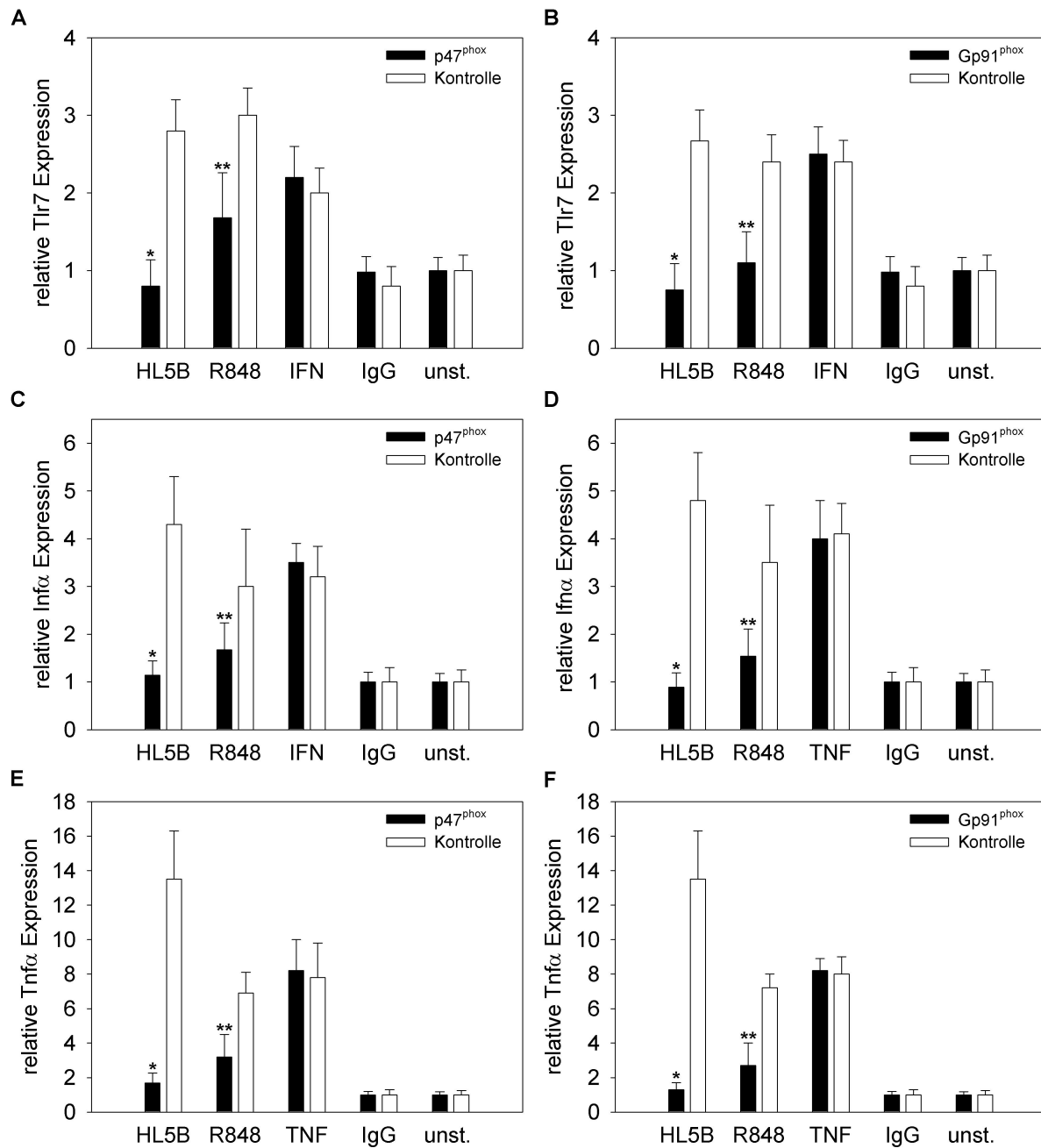


Abb. 4.34 Nox2 Abhängigkeit der Tlr7 Induktion und Translokation.

Murine CD11c⁺ Zellen aus je 2 Mäusen wurden für 1 h (A, B) bzw. für 4 h (C-F) mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml), R848 (1 µg/ml), IFN α (500 U/ml) oder TNF α (100 pg/ml) stimuliert. Die relative Tlr7 (A, B) Ifn α (C, D) bzw. Tnf α (E, F) mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen HL5B (Knock-out) vs. HL5B (Kontrolle) bzw. R848 (Knock-out) vs. R848 (Kontrolle): * p < 0,005; ** p < 0,05.

4.14.3 Gpx Knock-out Mäuse

Der enzymvermittelte Abbau von H_2O_2 erfolgt entweder durch Disproportionierung über Katalase ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$) oder mittels Peroxidasen. Die überwiegend im Zytosol vorkommende Glutathion-Peroxidase (Gpx) erzeugt oxidiertes Glutathion, welches über Glutathion-Reduktase unter Verbrauch von NADPH zu GSH rezykliert wird ($\text{GSSG} + \text{NADPH} + \text{H}^+ \rightarrow 2\text{GSH} + \text{NADP}^+$). Das Fehlen der Gpx in $\text{Gpx}^{-/-}$ Mäusen führt daher zu einem deutlichen langsameren Abbau von zytosolischem H_2O_2 .

Wie Abb. 4.35 und Abb. 4.36 zeigen, reagieren diese $\text{Gpx}^{-/-}$ Mäuse deutlich sensitiver auf HL5B als die Wildtypen. Dabei ist nicht nur die Tlr7 Hochregulierung sondern auch die Induktion der mRNA Expression von $\text{Ifn}\alpha$ und $\text{Tnf}\alpha$ drastisch verstärkt. In deutlich abgeschwächter Form spiegelt sich dieses Bild bei Stimulation mit R848 wieder. Auch hier können die CD11c^+ Zellen der $\text{Gpx}^{-/-}$ Mäuse im Vergleich zu CD11c^+ Zellen aus den Kontrollen signifikant stärker zur Tlr7 bzw. zur $\text{Ifn}\alpha/\text{Tnf}\alpha$ mRNA Expression angeregt werden. Dies deutet darauf hin, dass das aus Superoxid gebildete H_2O_2 von entscheidender Bedeutung für die TLR Induktion sowie den Translokationsprozess ist.

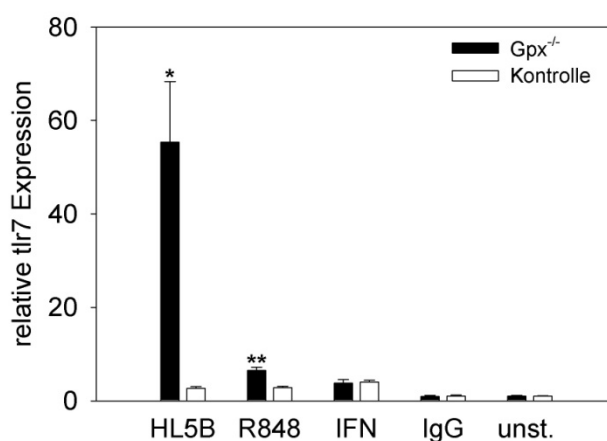


Abb. 4.35 H_2O_2 Abhängigkeit der Tlr7 Induktion.

Murine CD11c^+ Zellen aus je 3 Mäusen wurden für 1 h mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml), R848 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oder $\text{IFN}\alpha$ (500 U/ml) stimuliert. Die relative Tlr7 mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen HL5B (Knock-out) vs. HL5B (Kontrolle) bzw. R848 (Knock-out) vs. R848 (Kontrolle): * $p < 0,001$; ** $p < 0,02$.

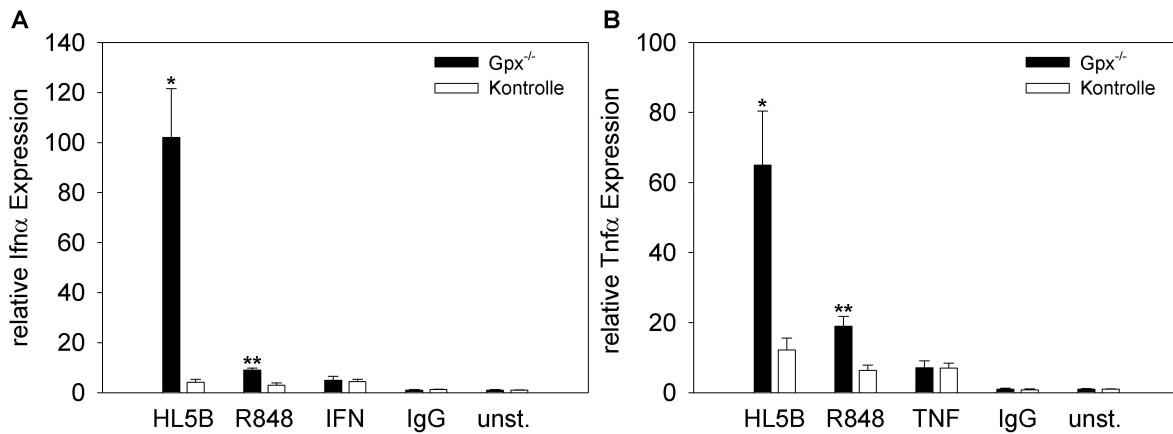


Abb. 4.36 H₂O₂ Abhängigkeit der *Ifnα*/*Tnfα* Induktion.

Murine CD11c⁺ Zellen aus je 3 Mäusen wurden für 4 h mit HL5B, IgG (je 100 ng/ml), R848 (1 µg/ml), IFN α (500 U/ml) oder TNF α (100 pg/ml) stimuliert. Die relative *Ifnα* (A) oder *Tnfα* (B) mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SD. Signifikanzen HL5B (Knock-out) vs. HL5B (Kontrolle) bzw. R848 (Knock-out) vs. R848 (Kontrolle): * $p < 0,001$; ** $p < 0,01$.

5 Diskussion

Im Rahmen dieser Doktorarbeit konnte ein neuer Signaltransduktionsmechanismus beschrieben werden, der für das Verständnis der APS Pathogenese sowie der innate Immunität im Allgemeinen eine wichtige Rolle spielt: über die endosomale Aktivierung einer NADPH Oxidase können TLR7 und TLR8 in pDCs und Monozyten reguliert und transloziert werden. Kofaktor unabhängige IgG aPL sind in der Lage diesen Signaltransduktionsweg zu induzieren und so die TLRs für ihre Liganden zu sensibilisieren. Bei Kontakt mit den spezifischen Agonisten kommt es dadurch zu den für das APS typischen verstärkten proinflammatorischen und prokoagulantem Effekten sowie zur Aktivierung einer positiver Rückkopplungsschleife: nach Stimulation mit aPL und TLR Liganden aktivieren pDCs T-Zellen sowie B-Lymphozyten. Dies resultiert letztendlich in der Sekretion neuer aPL durch B-Zellen und somit in einem dauerhaft erhöhten aPL Titer.

5.1 Internalisierung von aPL

Es konnte gezeigt werden, dass aPL von pDCs und Monomac1 Zellen in wenigen Minuten internalisiert und im Endosom akkumuliert werden. Unsere Aufnahmen zeigen dabei eine auffallende Ähnlichkeit zu Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe von Jean Gruenberg. Kobayashi et al. beschreiben die Akkumulierung eines aPL (6C4) im Endosom als eine Folge der spezifischen Bindung des aPL an LBPA¹⁴⁴. LBPA ist ein Lipid, das ausschließlich in den inneren Membranen des späten Endosoms vorkommt¹⁶³. Dort spielt es eine wichtige Rolle bei der Regulation des Protein-, Lipid- und Cholesterol-Transports^{164,165}. Über die Bindung an LBPA können aPL den intrazellulären Proteintransport beeinflussen und so pathogene Mechanismen, die vermutlich an der Entwicklung des APS beteiligt sind, induzieren¹⁶⁶. Wir gehen davon aus, dass sich HL5B genau wie 6C4 verhält und nach der Internalisierung im Endosom an LBPA bindet. Dafür spricht, dass HL5B *in vitro* ebenfalls an LBPA bindet und dass für 6C4 ein mit HL5B vergleichbares Potential zur TLR7 bzw. TLR8 Induktion nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.1).

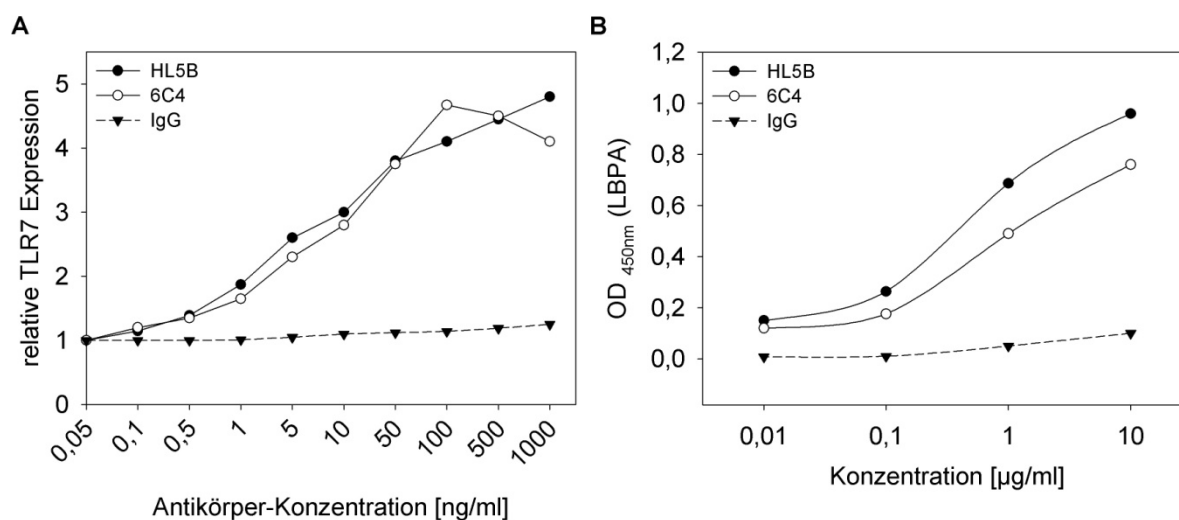


Fig. 5.1 TLR7 Induktion durch 6C4 und Bindung von HL5B an LBPA.

Dosis-Wirkungskurve von HL5B, 6C4 bzw. IgG. (A) Die relative TLR7 Expression wurde mittels qRT PCR in humanen pDCs ermittelt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. (B) Die Bindung an LBPA wurde mit einem entsprechenden ELISA bestimmt.

Im Gegensatz zu aPL ist unspezifisches IgG nicht befähigt LBPA zu binden, weshalb es nicht im späten Endosom angereichert sondern zeitnah über die lysosomale Route degradiert wird¹⁶⁶. Wir konnten aber nachweisen, dass durch die Inhibition der lysosomalen Degradation mittels Chloroquine eine endosomale IgG Anreicherung ermöglicht werden kann.

Der genaue Mechanismus der Internalisierung von 6C4 wurde nicht beschrieben. Galve-de Rochemonteix et al. vermuten aufgrund der langsamen Kinetik eine Pinozytose, schließen aber eine Rezeptor vermittelte Endozytose nicht aus¹⁶⁶. Im Gegensatz dazu konnte die Internalisierung von HL5B als ein sehr schneller Prozess charakterisiert werden. Dies lässt eine Rezeptor vermittelte Internalisierung vermuten. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bei Blockierung des $Fc\gamma RII$ die Menge an internalisiertem HL5B deutlich reduziert ist. Aber auch intakte Lipid Rafts scheinen für den Endozytose Prozess von Bedeutung zu sein. Eine Assoziation von $Fc\gamma$ Rezeptoren mit Lipid Rafts konnte zwar bislang nur für $Fc\gamma RI$ eindeutig nachgewiesen werden¹⁶⁷, aber auch für $Fc\gamma RII$ wird ein Einwandern in Lipid Raft Domänen als Folge einer Liganden-Bindung vermutet¹⁶⁸. Daher erscheint eine direkte Korrelation von $Fc\gamma RII$ und Lipid Rafts bei der Endozytose von aPL durchaus möglich. Die Antikörper-Spezifität ist offensichtlich vor allem für die Bindung an LBPA und die damit verbundene Akkumulierung im Endosom verantwortlich.

5.2 aPL induzieren endosomales Superoxid

Endosomale ROS Produktion wurde kürzlich als ein neuer Signalmechanismus beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte eine intrazelluläre ROS Produktion nach aPL Stimulation in Monomac1 Zellen bzw. pDCs mittels Chemilumineszenz bzw. Durchflusszytometrie detektiert werden. In der HPLC konnte diese ROS als Superoxid identifiziert werden. Der inhibitorische Effekt von Apocynin verweist weiterhin auf eine NADPH Oxidase (Nox) abhängige Superoxid Entstehung. Nox sind membranständige Enzymkomplexe, die die univalente Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Superoxid katalysieren. Superoxid wird im Folgenden entweder spontan oder *via* Superoxid Dismutase (SOD) in H₂O₂ umgewandelt¹⁶⁹. Apocynin kann diese Nox Aktivität in Phagozyten, vermutlich über die Blockierung von Sulfhydryl-Gruppen, spezifisch inhibieren¹⁷⁰. Einen Hinweis auf den genauen Subtyp des Enzyms kann die Inhibition mit Apocynin jedoch nicht geben. Insgesamt existieren 5 unterschiedliche Nox Subtypen: Nox1-5, sind zwar strukturell eng verwandt, unterscheiden sich aber durch ihre Aktivierungsmechanismen und Lokalisation. Eine Dysregulierung kann bei allen Proteinen der Nox Familie zu der Ausbildung einer Vielzahl von Krankheiten wie z.B. Arteriosklerose oder rheumatoide Arthritis führen¹⁷¹. Da im Rahmen dieser Arbeit eine Superoxid Produktion im Endosom nachgewiesen werden konnte, erscheint eine Beteiligung von Nox1 oder Nox2 sehr realistisch. Während Nox3 und Nox5 in der Plasmamembran nachgewiesen werden konnten^{154,155} und Nox4 im ER sowie im Nukleus funktionell aktiv ist^{156,157}, konnten Nox1 und Nox2 im Endosom lokalisiert werden^{145,158,159}. So konnten Miller et. al in vaskulären glatten Muskelzellen eine durch IL-1 β und TNF α induzierte ROS Produktion im Endosom nachweisen. Diese hängt von der Aktivität eines Anionen-Chlorid Transporters CIC-3 sowie von Nox1 ab und resultiert in der Aktivierung von NF- κ B. CIC-3 agiert vermutlich als Chlorid-Protonen Austauscher und kann so einen Ladungsausgleich vornehmen, ohne den es schnell zu einer Depolarisierung der Membran und somit zum Abbruch der Nox1 Aktivität käme¹⁴⁵. Ähnliche Ergebnisse konnten Li et. al für MCF-7 Zellen zeigen¹⁵⁸. Hier wird die durch IL-1 β induzierte ROS Produktion allerdings von Nox2 katalysiert. Dennoch konnte auch bei einer Nox2 Aktivität eine Abhängigkeit von CIC-3 nachgewiesen werden. Über den DIDS und NFA sensitiven Chlorid Kanal CIC-3 kann Superoxid das Endosom verlassen und an der endosomalen Oberfläche durch eine SOD in das zur NF- κ B Aktivierung benötigte H₂O₂ umgewandelt werden^{158,159}.

Unsere Ergebnisse sprechen dafür, dass sich aPL einem ähnlichen Mechanismus bedienen: die NF- κ B abhängige TLR und Zytokin Induktion kann durch NFA nahezu vollständig inhibiert werden. Mit Hilfe eines transgenen Mausmodells konnte nachgewiesen werden, dass aPL die für Phagozyten typische Nox2 aktivieren¹⁷¹.

5.3 aPL induzieren die Translokation von TLR7/8

Neben der NF- κ B Aktivierung induzieren aPL jedoch auch die Translokation der TLRs vom ER ins Endosom. Diese Translokation wird von der endosomalen ROS Produktion bedingt, ist aber von NF- κ B unabhängig, wie Versuche mit dem NF- κ B Inhibitor Ro106-9920 zeigen. Selbst bei Zugabe dieses Inhibitors erfolgt in der frühen Phase eine über TLR7 vermittelte Induktion von IFN α , was eine zuvor erfolgte Translokation von TLR7 voraussetzt. Die Translokation von TLR7/8 führt weiterhin zu einer extremen Sensibilisierung der Rezeptoren für ihre Liganden (ssRNA).

TLR3 sowie TLR7-9 erkennen doppel-strängige RNA, einzel-strängige RNA bzw. unmethylierte CpG und sind intrazellulär lokalisiert^{18,172,173}. Diese Lokalisation der Nukleotid-erkennenden TLRs ermöglicht die Erkennung viraler Strukturen und verhindert gleichzeitig die Aktivierung der Rezeptoren durch körpereigene Nukleinsäuren²¹. Dieser Schutz vor einer ungewollten endogenen Aktivierung wird in unstimulierten Zellen durch eine Sequestrierung der intrazellulären TLRs im ER zusätzlich verstärkt. Für TLR7 und TLR9 konnte gezeigt werden, dass beide Rezeptoren erst bei Kontakt mit einem entsprechenden Stimulus ins Endosom transloziert werden. Da die Aktivierung von TLR7 und TLR9 durch ihre Liganden der Azidifizierung des Endolysosoms bedarf, ist nur dort eine vollständige Aktivierung der TLRs möglich¹⁷⁴.

Über den zugrundeliegenden Mechanismus der Translokation ist bislang nur wenig bekannt, da die Sequestrierung der TLRs im ER erst seit kurzem beschrieben wird. Allerdings konnten drei Proteine identifiziert werden, die am Translokationsprozess beteiligt sind.

Neben dem polytrophischen Membranprotein UNC93B1 ist auch das Chaperon gp96 für die Liganden induzierte Aktivierung und Translokation von TLR7/9 essentiell^{22,23}. Für die TLR9 Translokation konnte weiterhin eine Abhängigkeit von PRAT4A nachgewiesen werden¹⁷⁵.

Interessanterweise können nicht nur Nukleinsäuren die Translokation der intrazellulären TLRs auslösen. Auch für LPS wurde ein solches Potential beschrieben²². Gleiches gilt offenbar auch für aPL: in der vorliegenden Arbeit konnte die Translokation von TLR8 aus dem ER ins Endosom durch aPL induziert werden. Aufgrund der hohen Homologie^{176,177} zwischen TLR7 und TLR8 sowie aufgrund ihrer funktionellen Austauschbarkeit¹⁴⁰ gehen wir davon aus, dass aPL auch in pDCs TLR7 translozieren. Dies wurde mikroskopisch zwar nicht bestätigt, aber nur so kann die Zytokin Produktion nach HL5B Stimulierung erklärt werden.

Weiterhin deuten unsere Daten erstmals auf eine entscheidende Rolle der endosomalen Superoxid Produktion im Hinblick auf die TLR Translokation hin: auch die durch R848 induzierte TNF α Sekretion (als Indikator für eine erfolgte TLR Translokation) kann durch die Inhibition der Superoxid Produktion unterbunden werden (Daten nicht gezeigt). Wie genau endosomales Superoxid die Aktivierung von UNC93B1 und somit die Translokation einleitet ist unklar. Denkbar wären p38, SSH1L, cSrc oder ERK1/2 vermittelte Signaltransduktionskaskaden, deren Induktion durch endosomales Superoxid bereits beschrieben wurde¹⁷¹.

Unsere Ergebnisse unterstreichen zusätzlich die Notwendigkeit der soeben beschriebenen Sequestrierung der TLRs im ER. Sobald die TLRs im Endosom lokalisiert sind können sie durch endogene Nukleinsäuren aktiviert werden. Diese endogene RNA ist vermutlich in Folge apoptotischer oder nekrotischer Ereignisse entstanden. Die RNA Aufnahme ist dabei abhängig von der Vorinkubation der Zellen mit HL5B sowie der Anwesenheit von TLR7 bzw. TLR8. Wir gehen daher davon aus, dass die durch HL5B induzierte Translokation von TLR7/8 durch HL5B über die Zelloberfläche erfolgt, so wie es schon für TLR9 beschrieben wurde¹⁹. So kann TLR7/8 an der Zelloberfläche seinen eigenen Liganden d.h. endogene RNA binden und ins Endosom internalisieren wo es zu einer (ungewollten) TLR Aktivierung kommt.

Zusammenfassend zeigen unsere Daten, dass aPL die Entstehung von Autoimmunität fördern, indem sie die Translokation von TLRs - insbesondere TLR7 - induzieren und so deren endogene Aktivierung ermöglichen.

5.4 Intrazelluläre TLRs und Autoimmunerkrankungen

In den letzten Jahren konnte bereits nachgewiesen werden, dass TLR7 und TLR9 durch endogene RNA bzw. DNA aktiviert werden können und daher eine wichtige Rolle im Hinblick auf die Entstehung einer Vielzahl von Autoimmunerkrankungen einnehmen. Vor allem die Aktivierung von TLR7 mit körpereigener RNA resultiert in einer starken IFN α Produktion¹⁷⁸. IFN α gilt als einer der wichtigsten Mediatoren im Hinblick auf die Pathogenese von Autoimmunkrankheiten. Eine Vielzahl von Studien konnte bereits nachweisen, dass erhöhte IFN α Serum-Titer in SLE Patienten direkt mit der Schwere der Erkrankung korrelieren¹⁷⁹⁻¹⁸². Im Rahmen des SLE bilden Nukleotide Immunkomplexe mit Autoantikörpern und können so über den niedrig affinen Fc γ RII ins Endosom internalisiert werden, wo sie TLR7 oder TLR9 aktivieren^{183,184}. Unsere Ergebnisse mit aPL beinhalten ebenfalls eine verstärkte IFN α Produktion sowie eine Internalisierung der aPL über Fc γ RII. Die Bildung eines Immunkomplexes im klassischen Sinne konnte jedoch für keinen der verwendeten aPL nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu klassischen Anti-nukleären Antikörpern ermöglichen aPL offenbar eine Aktivierung von TLR7/8 durch körpereigene RNA, indem sie die Translokation der TLRs über die Zelloberfläche induzieren. An der Plasmamembran können TLR7/8 RNA binden und so ins Endosom befördern.

Das Beispiel SLE macht weiterhin deutlich, dass eine verstärkte TLR7 Expression zur Ausbildung einer Autoimmunerkrankung wesentlich beitragen kann. Dazu wurden Experimente mit BXSB Mäusen (auch bekannt als Yaa Mäuse) durchgeführt. Die Yaa Translokation von der distalen Region des X-Chromosoms auf das Y-Chromosom induziert eine Duplikation des Locus. Der Yaa Locus beinhaltet mehrere Gene unter anderem das Gen für TLR7. Die so induzierte zusätzliche Kopie des TLR7 Gens resultiert in einer Überempfindlichkeit der B-Zellen dieser Mäuse gegenüber spezifischer TLR Liganden^{185,186}.

Zudem verschlimmert die Yaa-Mutation die SLE-Pathologie wenn sie in SLE Mäuse gekreuzt wird¹⁸⁷ und verschiebt das Autoantikörper Repertoire dieser Mäuse in Richtung solcher mit Reaktivität gegen RNA-assoziierte Autoantigene¹⁸⁸. Deane et al. konnten nachweisen, dass die Duplikation des TLR7 Gens alleine für die Autoimmunreaktion verantwortlich ist. So führte die Reduktion der Genmenge zur Beseitigung des Yaa-Phänotyps¹⁸⁷. Auch im Kontext des APS spielt offenbar die verstärkte Expression von TLR7 bzw. TLR8 eine wichtige Rolle. Dabei ist eine Antigen-Reifung der aPL offenbar nicht zwangsläufig erforderlich. So kann auch RR7F, dessen Sequenz nahezu einer bekannten Keimbahn-Sequenz entspricht, TLR7 bzw. TLR8 induzieren. Neben dieser Hochregulierung der TLRs ist in unseren Augen jedoch vor allem die durch aPL induzierte Translokation der TLRs ein entscheidender Mechanismus im Hinblick auf die Durchbrechung der Selbst-Toleranz bzw. der Entwicklung von Autoimmunität. Dies impliziert, dass aPL eventuell eine größere Relevanz in der Aktivierung und/oder der Ausbreitung von SLE innehaben. Möglicherweise ist die durch aPL induzierte Translokation Voraussetzung für die im Rahmen des SLE typische Aktivierung der TLRs durch Immunkomplexe. Das häufige Auftreten von aPL in SLE Patienten, was in der Regel als ein sekundäres Ereignis angesehen wird, müsste demnach in einem völlig neuem Licht interpretiert werden.

Im Gegensatz zu TLR7/8 kann TLR9 -abhängig vom Krankheitsmodel- sowohl pathogen als auch protektiv wirken. Während TLR9 eine pathogene Rolle im Hinblick auf Psoriasis oder den Lupus nephritis einnimmt¹⁸⁹⁻¹⁹³, kann die Zugabe eines TLR9 Liganden die Entstehung der inflammatorischen Arthritis inhibieren¹⁹⁴. Im Rahmen unserer Studien konnte weder eine TLR9 Induktion noch eine TLR9-vermittelte Zytokin Produktion als Antwort auf die aPL Stimulierung gezeigt werden. Dennoch gehen wir davon aus, dass TLR9 zusammen mit TLR7/8 durch aPL transloziert werden. Zum einen begründen wir diese Annahme dadurch, dass die TLR9 Translokation ebenso wie die Translokation von TLR7 ein UNC93B1-abhängiger Prozess ist. Weiterhin konnten wir zeigen, dass aPL auch TLR9 für seinen Liganden CpG sensibilisiert. So zeigten HL5B und CpG (Abb. 5.2) den selben synergistischen Effekt im Hinblick auf die $IFN\alpha$ bzw. $TNF\alpha$ Produktion wie HL5B und R848 (vgl. Abb. 4.7). Mehrere Studien konnten bereits zeigen, dass die TLR9 vermittelte $INF\alpha$ Induktion in einer negativen Weise durch TLR7 reguliert wird. Umgekehrt korreliert

die negative Regulation von TLR7 direkt mit einer positiven Regulation von TLR9¹⁹⁵⁻¹⁹⁷. Dieser funktionelle Antagonismus zwischen TLR7 und TLR9 liegt möglicherweise auch in unserem Versuchsaufbau vor, was die alleinige Aktivierung von TLR7 bzw. TLR8 sowie die verstärkte Sensitivität gegenüber HL5B in TLR9 defizienten Mäusen erklären würde.

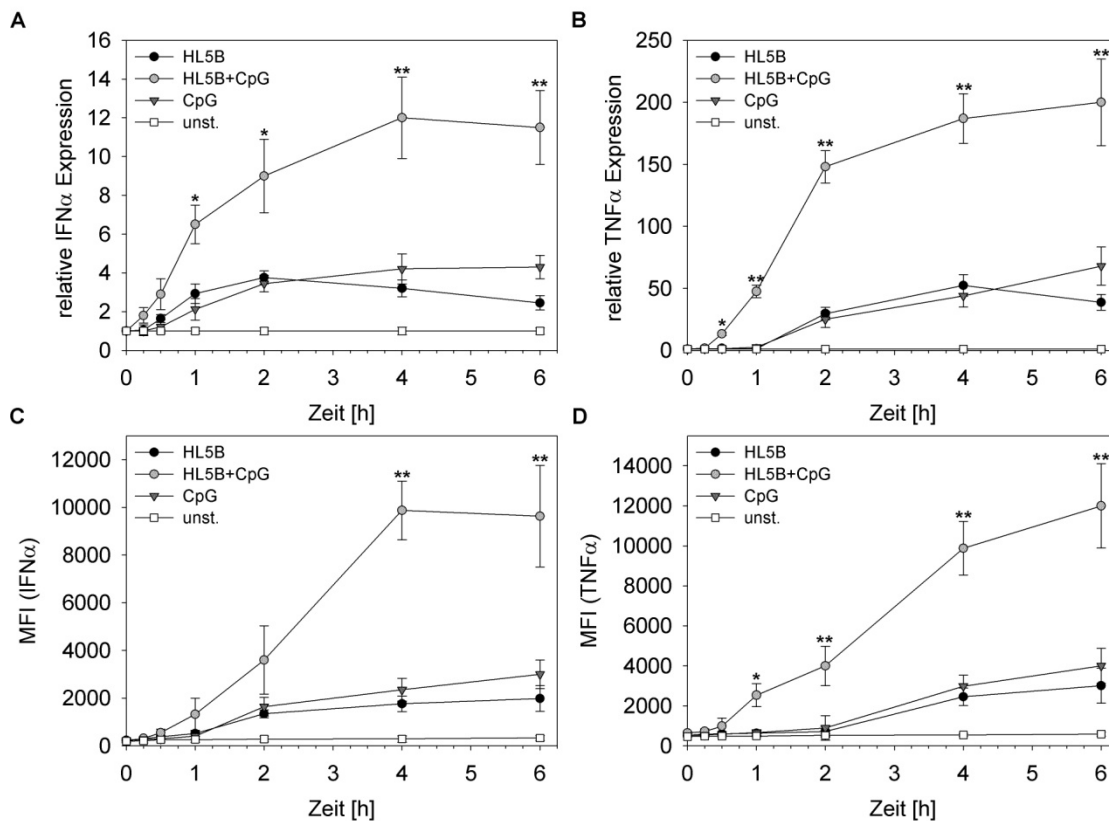


Abb. 5.2 Kombinierte TLR9 Stimulation.

Humane pDCs wurden für unterschiedliche Zeiträume (15min bis 6h) mit HL5B (100ng/ml) oder CpG (1 μ g/ml) entweder alleine oder in Kombination stimuliert. Die relative IFN α (A) bzw. TNF α (B) mRNA Expression wurde mittels qRT PCR bestimmt und gegen die Expression von β -Aktin normalisiert. Die intrazelluläre Produktion von IFN α (C) und TNF α (D) wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von mindestens 5 unabhängigen Experimenten. Signifikanzen CpG vs. HL5B+CpG * $p < 0,01$; ** $p < 0,005$.

Auch eine Rolle von TLR3 im Kontext von Autoimmunerkrankungen wurde bereits beschrieben¹⁹⁸. Da TLR3 jedoch weder in primären pDCs noch in primären Monozyten exprimiert wird¹⁹⁹ und auch nicht intrazellulär von Monomac1 Zellen nachgewiesen werden konnte, gehen wir davon aus, dass TLR3 in der hier beschriebenen Signaltransduktion keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt.

5.5 Extrazelluläre TLRs und Autoimmunerkrankungen

Eine Beteiligung von extrazellulären TLRs an der Pathogenese von APS wurde bereits mehrfach beschrieben. Dabei stehen vor allem TLR2 und TLR4 im Fokus. So gibt es Hinweise darauf, dass Kofaktor abhängige aPL über die Bindung von β 2GPI an Annexin A2 und TLR4 Endothelzellen (EC) aktivieren können^{200,201}. Da Annexin A2 die Zellmembran nicht durchspannt, wird TLR4 als Adaptor-Protein benötigt^{202,203}. Nach Meinung von Meroni et al. wird diese Bindung durch ein „Molecular Mimicry“ zwischen β 2GPI und mikrobiellen Strukturen ermöglicht. TLR4 könnte dann die Signaltransduktion über NF- κ B einleiten, wodurch ein proinflammatorischer und prokoagulanter Phänotyp in EC induziert werden könnte^{204,205}. In Monozyten konnten Lopez-Pedrerera et al. eine TLR4 abhängige erhöhte TF Expression mittels aPL induzieren^{127,206}. Ein Zusammenhang zwischen TLR4 und der Thromboseentstehung konnte Pierangeli et al. in vivo zeigen. Nach Injektion von aPL zeigten Mäuse, die eine Mutation im TLR4 Gen besaßen, eine signifikante Verminderung an EC-adhärenenten Leukozyten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe¹²⁶. Weiterhin konnte die Gruppe um Pierangeli die zentrale Rolle von Annexin A2 in vivo nachweisen. APL induzierte Thrombosen, TF Aktivität sowie die Expression des vaskulären Zelladhäsion-Moleküls 1 (VCAM-1) waren in A2^{-/-} Mäusen im Vergleich zu A2^{+/+} Mäusen signifikant verringert²⁰⁷.

Eine entscheidende Rolle von TLR2 im Hinblick auf die Aktivierung muriner embryonaler Fibroblasten (EF) konnten Satta et al. messen. So resultierte die Stimulation mit anti- β 2GPI-IgG Fraktionen aus APS Patienten in einer Hochregulierung der inflammatorischen Marker MCP-1, ICAM-1 und IL-6 in Wildtyp EFs. Dieser Effekt blieb bei TLR2 defizienten EFs vollkommen aus und war bei TLR1 und TLR6 defizienten EFs deutlich reduziert. Die Defizienz von TLR4 hatte hingegen keinen Einfluss sodass die Expression der inflammatorischen Marker auf einem zum Wildtyp vergleichbaren Niveau blieb²⁰⁸.

Es fällt auf, dass bei allen dieser Experimente β 2GPI abhängige aPL verwendet wurden. HL5B hingegen kann in Kofaktor unabhängiger Art und Weise die TF Expression in Monozyten induzieren^{103,105}. Der hoch verwandte aPL HL7G besitzt zwar die Fähigkeit β 2GPI zu binden, sein Potential zur Cardiolipin-Bindung bleibt davon jedoch unbeeinflusst²⁰⁹.

Für beide Kofaktor unabhängigen aPL wurde eine Signaltransduktionskaskade beschrieben, die über intrazelluläre TLRs vermittelt wird. Dies beweist erneut, dass schon die alleinige Bindung an anionische Phospholipide proinflammatorische und prokoagulante Signalmechanismen auslösen kann. In unseren an primären Monozyten durchgeführten Experimenten¹¹⁴ konnte aber bislang eine Rolle von TLR2 und/oder TLR4 nicht ausgeschlossen werden. Durch die Verwendung von humanen pDCs konnte nun nachgewiesen werden, dass es sich um einen TLR4 unabhängigen Mechanismus handelt, da pDCs kein TLR4 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren³⁷. Auch die Expression von TLR2 konnte in frisch isolierten primären pDCs nicht nachgewiesen werden. Da aber auch humane EC, die in der Regel kein TLR2 exprimieren, durch inflammatorische Stimuli zur TLR2 Expression angeregt werden können²¹⁰, möchten wir einen ähnlichen Effekt in pDCs nicht vollkommen ausschließen. Da die Induktion von TLR7 sowie dessen Translokation als sehr frühe Ereignisse charakterisiert werden konnten, erscheint uns eine TLR2 Abhängigkeit in dieser frühen Phase jedoch unrealistisch. Denkbar wären aber weitere durch aPL ausgelöste Signalkaskaden, die über extrazelluläre TLRs in einer späteren Phase vermittelt werden. Dies würde erklären, warum die oben beschriebenen über TLR2 bzw. TLR4 vermittelte proinflammatorischen und prokoagulanten Eigenschaften von aPL erst nach 24 h oder mehr beobachtet werden können. Eine frühe Induktion der intrazellulären TLRs wurde von keiner dieser Gruppen analysiert.

Obwohl bei den oben beschriebenen Daten zu TLR4 nach unserer Ansicht eine Endotoxin Kontamination nicht ausreichend ausgeschlossen wurde, stimmen wir mit Pierangeli et al. überein, dass es prinzipiell mehrere unabhängige Mechanismen geben kann, die in die Pathogenese des APS involviert sind¹²⁶. So war beispielsweise der monoklonale IgM aPL JGG9 nicht in der Lage intrazelluläre TLRs zu induzieren. Weiterhin erfolgte die JGG9 induzierte TNF α Sekretion in primären Monozyten unabhängig von TLR8 (Daten nicht gezeigt). Die Tatsache, dass in pDCs keine Zytokin Ausschüttung durch JGG9 induziert werden konnte, spricht für einen TLR2 und/oder TLR4 abhängigen Prozess. Möglicherweise lösen aPL vom IgM Isotyp einen Signalweg aus, der über extrazelluläre TLRs vermittelt wird, während IgG aPL eine über intrazelluläre TLRs vermittelte Signalkaskade induzieren. Andererseits könnte aber auch der Unterschied zwischen JGG9 und HL5B durch die Kofaktor Abhängigkeit von JGG9 bedingt werden.

5.6 pDC abhängige T- und B-Zell Aktivierung durch aPL

Die Aktivierungsexperimente mit humanen pDCs machten deutlich, dass HL5B die durch TLR7 Liganden induzierte Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle signifikant steigern kann. Dieser Prozess ist abhängig von der endosomalen Superoxid Produktion, wie die Inhibition mit NFA zeigt. Für Nox2 konnte bereits eine Beteiligung an der Aktivierung von dendritischen Zellen sowie der Antigen Prozessierung nachgewiesen werden²¹¹.

Dass es sich hierbei um eine funktionelle Aktivierung der pDCs handelt, zeigt das Potential zur nachfolgenden T-Zell bzw. B-Zell Induktion. In der Literatur ist bereits beschrieben, dass die Ligation von TLR7 und TLR9 eine vollständige Aktivierung der pDCs auslöst²¹². Dabei resultiert die Ausreifung der pDCs in der Regel in einer schnellen und massiven Induktion von Th1-polarisierendem $\text{IFN}\alpha$ ²¹³. Auch die Stimulation mit aPL resultierte in einer frühen $\text{IFN}\alpha$ Induktion was eine Th1-Induktion vermuten ließe. In der späten Phase wurde die $\text{IFN}\alpha$ Produktion nach HL5B Stimulation von einer IL-6 und $\text{TNF}\alpha$ Sekretion abgelöst. Auch $\text{TNF}\alpha$ fördert die Differenzierung von T-Lymphozyten in Richtung der Th1-Zellen. Im Widerspruch dazu konnte in der vorliegenden Arbeit nach HL5B+RNA40 Stimulation eine Th2-Zell-Proliferation gezeigt werden. Möglicherweise handelt es sich hierbei um eine IL-6-vermittelte Aktivierung und Proliferation. IL-6 induziert im Gegensatz zu $\text{IFN}\alpha$ und $\text{TNF}\alpha$ eine Th2-Immunantwort²¹⁴. Weiterhin konnten bereits verschiedene Arbeiten zeigen, dass pDCs prinzipiell in der Lage sind Th2 Zellen zu primen. Sie werden daher oftmals auch als DC2-Zellen bezeichnet⁵⁹. So konnten Boonstra et al nachweisen, dass murine pDCs -abhängig von der Dosis des Antigens- sowohl die Entwicklung von Th1- als auch Th2-Zellen induzieren können²¹⁵. Zudem beschreiben Rissoan et al. eine IL-4 und IL-2 unabhängige Th2-Zell Induktion durch CD40L aktivierte pDCs⁵⁹.

Während die Rolle der T-Zellen innerhalb der Pathogenese des APS bislang ungeklärt bleibt, ist allgemein akzeptiert, dass ihre Dysregulierung Autoimmunität verursachen kann²¹⁶. Dabei werden Organ-spezifische Autoimmunkrankheiten wie die allergische Encephalomyelitis oder der Insulin-abhängige Diabetes mellitus als Th1 vermittelt beschrieben.

Hingegen wurden bei der graft-versus-host Krankheit, der progressiven systemischen Sklerose, allergischen Erkrankungen und SLE eine Th2-Prädominanz beschrieben²¹⁷. So wurden in SLE Patienten erhöhte Serum-Titer von Th2-Zytokinen wie IL-4, IL-6 und IL-10 bei gleichzeitiger Reduktion der Th1-Zytokine (IL-2, IFN γ) beschrieben²¹⁸. Zwar wurde im Rahmen dieser Arbeit kein T-Zell-Zytokin-Profil erstellt, dennoch deutet die eindeutige phänotypische Identifizierung der proliferierenden T-Zellen als Th2-Zellen stark darauf hin, dass es im Kontext des APS wie auch bei SLE zu einer Verschiebung des Th1/Th2-Gleichgewichts in Richtung der Th2-Zellen kommt. Dabei ist es besonders interessant, dass auch im Rahmen des SLE trotz starker IFN α Sekretion eine Th2-Zell-Induktion erfolgen kann. Über den zugrundeliegenden Mechanismus ist jedoch bislang noch nichts Genaueres bekannt.

Die Aktivierung von Th2-Zellen verweist auf eine mögliche nachfolgende B-Zell-Aktivierung. B-Zellen fördern die Ausbildung einer Vielzahl von Autoimmunkrankheiten. Das Spektrum reicht von SLE²¹⁹⁻²²¹ und RA²²² bis zur Multiplen Sklerose²²³. Dabei ermöglichen B-Zellen die Entwicklung von Autoimmunität nicht nur über die Sekretion von Autoantikörpern, sondern auch durch die Autoantigen-Präsentation und die Sekretion von proinflammatorischen Molekülen^{219,224-226}.

Im Hinblick auf die durch HL5B induzierte Hochregulation von TLR7 sind B-Zellen besonders interessant. B-Zellen exprimieren wie auch pDCs die intrazelluläre TLRs TLR7 und TLR9. Zwar konnte HL5B weder eine verstärkte TLR7 oder TLR9 mRNA Expression induzieren noch die B-Zellen aktivieren (Daten nicht gezeigt), jedoch wurde die durch Hanten et al.²²⁷ bereits beschriebene B-Zell-Aktivierung durch TLR-Liganden bei Anwesenheit von HL5B deutlich verstärkt.

Eine Plasmazelldifferenzierung oder Immunglobulinproduktion konnte in B-Zell-Monokulturen jedoch weder durch den TLR7 Ligand noch durch eine Kombination von TLR7 Ligand und aPL induziert werden. Gleiches wurde bei der Kokultur von B- und T-Zellen beobachtet. Erst die Zugabe von pDCs zu diesen Zellkulturen konnte die Ausdifferenzierung zur Plasmazelle einleiten wobei auch hier HL5B und RNA40 synergistisch wirkten.

Auf der Suche nach dem Mechanismus wurde deutlich, dass die funktionelle Einheit zwischen B-Zellen und pDCs vor allen Dingen durch lösliche Faktoren zustande kam. So konnte in humanen B-Zellen, die in Transwell-Systemen mit konditioniertem Medium von pDCs versorgt wurden, ebenfalls eine schwache B-Zell-Differenzierung eingeleitet werden. Die Anwesenheit von T-Zellen war dabei nicht notwendig, konnte aber die B-Zell-Aktivierung weiter fördern.

In der Literatur wird die Rolle der DCs in der Aufrechterhaltung der humoralen Immunantwort seit langem beschrieben. So wurde in früheren Arbeiten gezeigt, dass 1. die DCs erst CD4⁺ T-Zellen aktivieren müssen und 2. die nun aktivierten CD4⁺ T-Zellen die Entwicklung der naiven B-Zellen zur Plasmazelle einleiten^{228,229}. Die Möglichkeit einer direkten Interaktion von pDCs und B-Zelle wird erst seit kurzem berücksichtigt. So konnten Fayette et al. in verschiedenen Studien zeigen, dass mDCs, welche aus CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen generiert worden waren, B-Zellen sowohl zur Plasmazelldifferenzierung anregen als auch einen "Isotype Switch" zu IgA-produzierenden Zellen induzieren können^{72,73}. Douagi et al. konnten 2009 die wichtige Rolle der pDCs in dieser direkten Interaktion hervorheben: die Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass pDCs und keine mDCs die B-Zell-Proliferation nach Stimulation mit TLR7/8 Liganden deutlich steigern. Als Antwort auf TLR7/8 Stimulation vermitteln pDCs hauptsächlich über die Produktion von IFN α die Hochregulierung verschiedener Transkriptionsfaktoren und fördern so die Differenzierung von B-Zellen in IgM-, IgG- und IgA- produzierende Zellen²³⁰.

Unsere Beobachtung, dass nicht nur lösliche Komponenten sondern auch ein direkter Zell-Zell-Kontakt von pDCs und B-Zellen die B-Zell-Aktivierung fördern, deckt sich mit Ergebnissen von Ding et al. Diese Gruppe konnte zeigen, dass die Separation von pDCs und B-Zellen durch Transwell Systeme die kostimulatorische Kapazität der pDCs im Bezug auf B-Zell-Proliferation und Antikörper-Sekretion signifikant reduziert²³¹. Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, dass HL5B+RNA40 stimulierte B-Zellen in Anwesenheit von pDCs neben IgM vor allem IgG sezernieren. Ähnliche Ergebnisse konnten Jego et al. in Virus-aktivierten B-Zell/pDC Kokulturen erzielen.

Sie beschreiben die verstärkte Ig Produktion als Folge einer selektiven Aktivierung von Gedächtnis-B-Zellen durch pDCs via IFN α ²³². Im Menschen sind zwei Klassen von Gedächtnis-B-Zellen beschrieben: IgM⁺ B-Gedächtniszellen sowie B-Gedächtniszellen, die einen Isotypen-Klassenwechsel durchlaufen haben²³³⁻²³⁵. Bislang ist wenig über den Ursprung der IgM⁺ B-Gedächtniszellen bekannt. Allerdings deuten Maus-Experimente darauf hin, dass sich diese Zellen im Rahmen einer T-Zell unabhängigen Immunantwort differenzieren. Im Gegensatz dazu wird für den Isotyp-Klassenwechsel in der Regel die Hilfe von T-Zellen benötigt. T-Zellen exprimieren CD40L auf ihrer Oberfläche und können über die Bindung an CD40 der B-Zellen den Isotypen-Switch einleiten^{236,237}.

Unsere Daten deuten darauf hin, dass HL5B bei gleichzeitiger Stimulation mit RNA40 und in Anwesenheit von pDCs B-Gedächtniszellen aktivieren und diese zum Klassenwechsel anregen kann. Dazu war in unserem Modell wie auch bei Experimenten von Jego et al.²³² keine T-Zell-Hilfe notwendig. Da allerdings auch pDCs in der Lage sind CD40L auf ihrer Oberfläche exprimieren²³⁸, können sie möglicherweise darüber einen Isotypen-Klassenwechsel in B-Zellen einleiten. Weiterhin konnte im Rahmen dieser Arbeit nach kombinierter Stimulation mit HL5B und RNA40 ein erhöhter Anteil von anti-Cardiolipin-Antikörpern, vor allem vom IgG-Isotyp im Medium nachgewiesen werden. Dass es sich dabei nicht um Rückstände von HL5B sondern um neue sezernierte Antikörper handelt, zeigte die Bestimmung der anti-Cardiolipin-IgG-Titer an Tag 2, 4 und 6. Zu diesen Zeitpunkten waren keine aPL vom IgG Isotyp detektierbar (Daten nicht gezeigt).

Die Beobachtung, dass vor allem das IgG-Repertoire einen erhöhten Anteil an anti-Cardiolipin-Antikörpern aufweist, lässt sich möglicherweise durch den vollzogenen Klassenwechsel erklären. Im Rahmen dieses Klassenwechsels kommt es zu extensiven somatischen Hypermutationen was zu einer veränderten Antikörper Affinität oder zur Entstehung autoreaktiver Antikörper führen kann²³⁹⁻²⁴¹. So konnten in zirkulierenden IgG⁺ B-Gedächtniszellen vermehrt ANAs sowie polyreaktive Antikörper nachgewiesen werden²⁴².

Bei allen diesen Kokultur Experimenten fällt auf, dass HL5B als einzelner Stimulus nahezu keinen Einfluss auf die Aktivierung von T- bzw. B-Zellen ausüben konnte. Dennoch konnte die Wirkung des TLR7 Liganden durch Zugabe von aPL signifikant erhöht werden. Dieser synergistische Effekt spricht erneut dafür, dass aPL in erster Linie die TLR7/8 Achse sensibilisieren indem sie die Translokation sowie die verstärkte Expression des TLRs induzieren. Bei Anwesenheit eines entsprechenden Liganden kann so eine deutlich verstärkte Immunantwort erfolgen, die letztendlich durch die Aktivierung von Ig-sezernierenden B-Zellen in einem positiven Feedback Loop resultiert. Dies würde einen Erklärungsansatz bieten, warum APS Patienten für eine lange Zeit asymptomatisch bleiben und erst im Kontext einer akuten Infektion die klassischen Symptome des APS ausbilden.

5.7 Relevanz der Ergebnisse in vivo

Die vivo Relevanz unserer Ergebnisse konnte mithilfe der Beobachtung gezeigt werden, dass auch IgG Fraktionen aus APS Patienten diesen neuen Signalweg induzieren können. So konnten IgG Fraktionen in pDCs sowohl endosomales Superoxid als auch die Überexpression von TLR7 induzieren. Die verstärkte Zytokin Sekretion nach Stimulation mit den IgG Fraktionen der Patienten interpretieren wir als Resultat einer erfolgten Translokation von TLR7. Weiterhin konnte in PBMCs von APS Patienten eine verstärkte TLR7 Expression nachgewiesen werden. Besonders dieses Ergebnis spricht dafür, dass die Hochregulierung von TLR7/8 nicht nur ein Zellkultur-Phänomen ist, sondern auch in vivo präsent ist und so zur Entwicklung eines proinflammatorischen und prokoagulanten Phänotyps beitragen kann.

5.8 Ausblicke

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine zentrale Rolle der endosomalen Nox2 im Bezug auf die Translokation sowie die Regulation von TLR7/8 gezeigt werden. Der genaue Mechanismus der Nox Aktivierung durch aPL verbleibt jedoch unklar.

Ein nächster Schritt wäre daher die Untersuchung der zugrundeliegenden Signaltransduktionskaskade der Nox2 Aktivierung. Weiterhin bliebe zu klären, wie die endosomale Superoxid Produktion in einer Translokation von TLR7/8 resultiert. Denkbar wäre beispielsweise eine Phosphorylierung von UNC93B1. Dies könnte mithilfe entsprechender Westernblot Verfahren verifiziert werden. Weiterhin stellt sich die Frage, ob es generell mehrere Mechanismen der Translokation gibt. Dies erscheint wahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass IgG Fraktionen aus SLE Patienten eine TNF α Sekretion ohne vorherige Radikal Bildung induzieren. Ein interessanter Aspekt ist auch die Frage, ob die hier gefundene Signalkaskade auch in weiteren Zelltypen relevant ist. Von besonderem Interesse wären hier vor allem Endothelzellen deren Beteiligung an der Entstehung von Thrombosen im Rahmen des APS bereits bekannt ist. Zusätzlich bleibt zu klären, wie pDCs B-Lymphozyten zur Produktion von anti-CL Antikörpern des IgG Isotyps anregen. Ein besseres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen könnte möglicherweise neue Ansatzpunkte in der Therapie des APS liefern.

6 Zusammenfassung

Das Antiphospholipid-Syndrom (APS) ist eine Autoimmunerkrankung die sich durch venöse und arterielle Thrombosen und/oder Spontanaborte bei gleichzeitigem Nachweis von persistierenden, erhöhten Antiphospholipid-Antikörper (aPL)-Titern charakterisieren lässt. Die zugrunde liegenden Mechanismen, über die aPL Pathogenität vermitteln, sind bislang wenig verstanden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass drei humane monoklonale IgG aPL sowie IgG Fraktionen von APS Patienten eine Überexpression von TLR7 und TLR8 in plasmazytoiden dendritischen Zellen bzw. monozytären Zellen induzieren. Gleichzeitig erfolgt die Induktion der TLR7/8 Translokation vom endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Endosom. Diese Effekte werden durch die Internalisierung der aPL und die nachfolgende Aktivierung einer NADPH Oxidase sowie durch endosomale Superoxid Produktion vermittelt. Als Folge dessen werden die Zellen extrem für TLR7/8 Liganden sensibilisiert (vgl. Abb. 6.1).

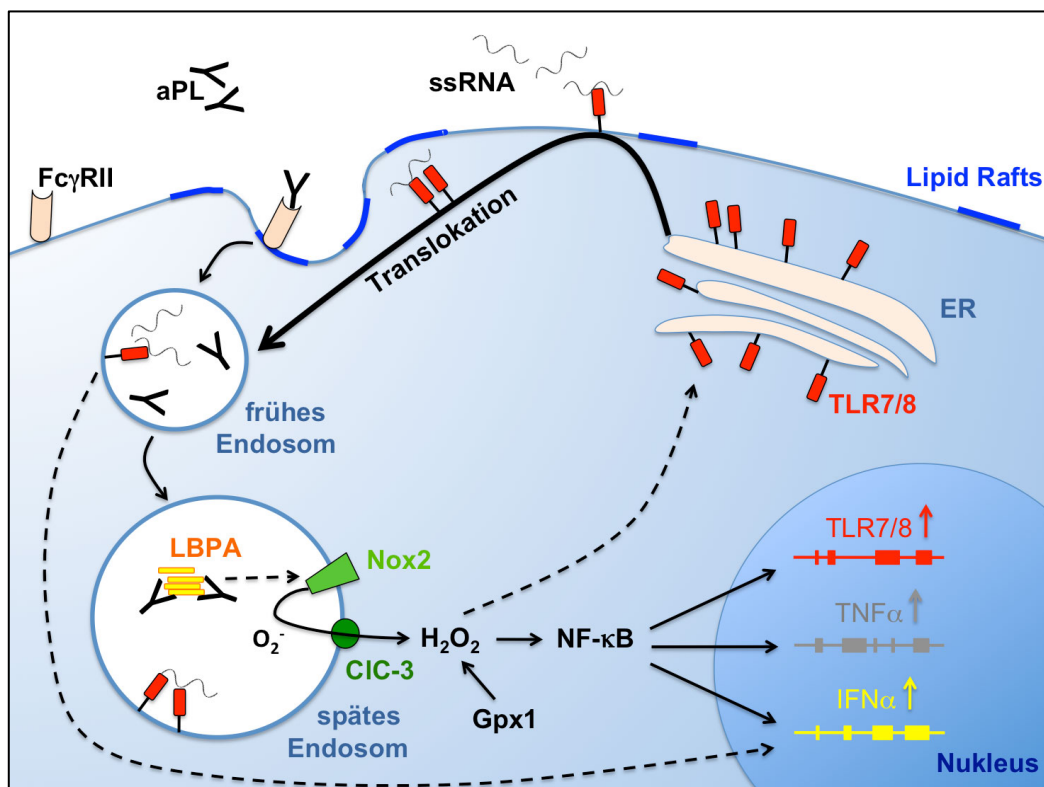


Abb. 6.1 Signalmechanismus von aPL des IgG Isotyps.

IgG aPL werden über FcγRII endozytiert. Durch ihre Bindung an LBPA entgehen aPL der lysosomalen Degradation und akkumulieren im späten Endosom wo sie Nox2 aktivieren. Das entstandene O₂⁻ kann über CIC-3 das Endosom verlassen und wird im Zytoplasma zu H₂O₂ konvertiert. Über H₂O₂ wird die Translokation von TLR7/8 über die Plasmamembran ins Endosom induziert. An der Zelloberfläche bindet TLR7/8 RNA und bringt diese mit ins Endosom, wo eine TLR Aktivierung durch diese endogene RNA erfolgen kann. Weiterhin kommt es zu einer H₂O₂ vermittelten Aktivierung von NF-κB. NF-κB fungiert als Transkriptionsfaktor für die Gen-Expression von TLR7/8, TNFα und IFNα. Lediglich IFNα kann auch -ausgehend vom frühen Endosom- unabhängig von NF-κB induziert werden.

Diese Beobachtungen beschreiben einen neuen Signalmechanismus der innate Immunität, der seinen Ursprung im Endosom nimmt. Da die Überexpression von TLR7 auch in pDCs von APS Patienten detektiert werden konnte, bieten unsere Ergebnisse eine Erklärung für die proinflammatorischen und prokoagulanten Effekte von aPL.

Weiterhin führte die kombinierte Stimulation mit aPL und TLR7 Liganden in pDCs zu einem signifikant verstärkten Potential zur CD4+ Th2 Zell Aktivierung bzw. zur Regulation der B-Zell Differenzierung und Immunglobulin Produktion. Die Anwesenheit der pDCs erhöhte dabei synergistisch die CD40/86 Expression, die Proliferation sowie die Plasmazell-Differenzierung von isolierten peripheren B-Zellen, die mit aPL und TLR Liganden stimuliert wurden. Dieser Stimulationsansatz war außerdem ausreichend um naive B-Zellen zur IgM/IgG Produktion anzuregen und die Synthese neuer IgG aPL durch Gedächtnis-B-Zellen einzuleiten. Die Beteiligung der pDCs an diesem Prozess erfolgte durch Zytokin Sekretion sowie direktem Zell-Zell-Kontakt. Die Anwesenheit von Th2-Helferzellen war dabei nicht obligatorisch, konnte jedoch die B-Zell Aktivierung zusätzlich fördern. Eine Hochregulierung von TLR7 oder TLR9 innerhalb der B-Zell Population war nicht involviert.

Diese Ergebnisse zeigen erstmalig die Relevanz einer pDC Aktivierung im Hinblick auf die Aufrechterhaltung der pathogenen Aktivität im Rahmen des APS. Da eine Dysregulierung von TLR7 bereits als ursächlich für die Ausbildung einer systemischen Autoimmunität erachtet wird, sollten unsere Ergebnisse für das generelle Verständnis von Autoimmunität von großer Relevanz sein.

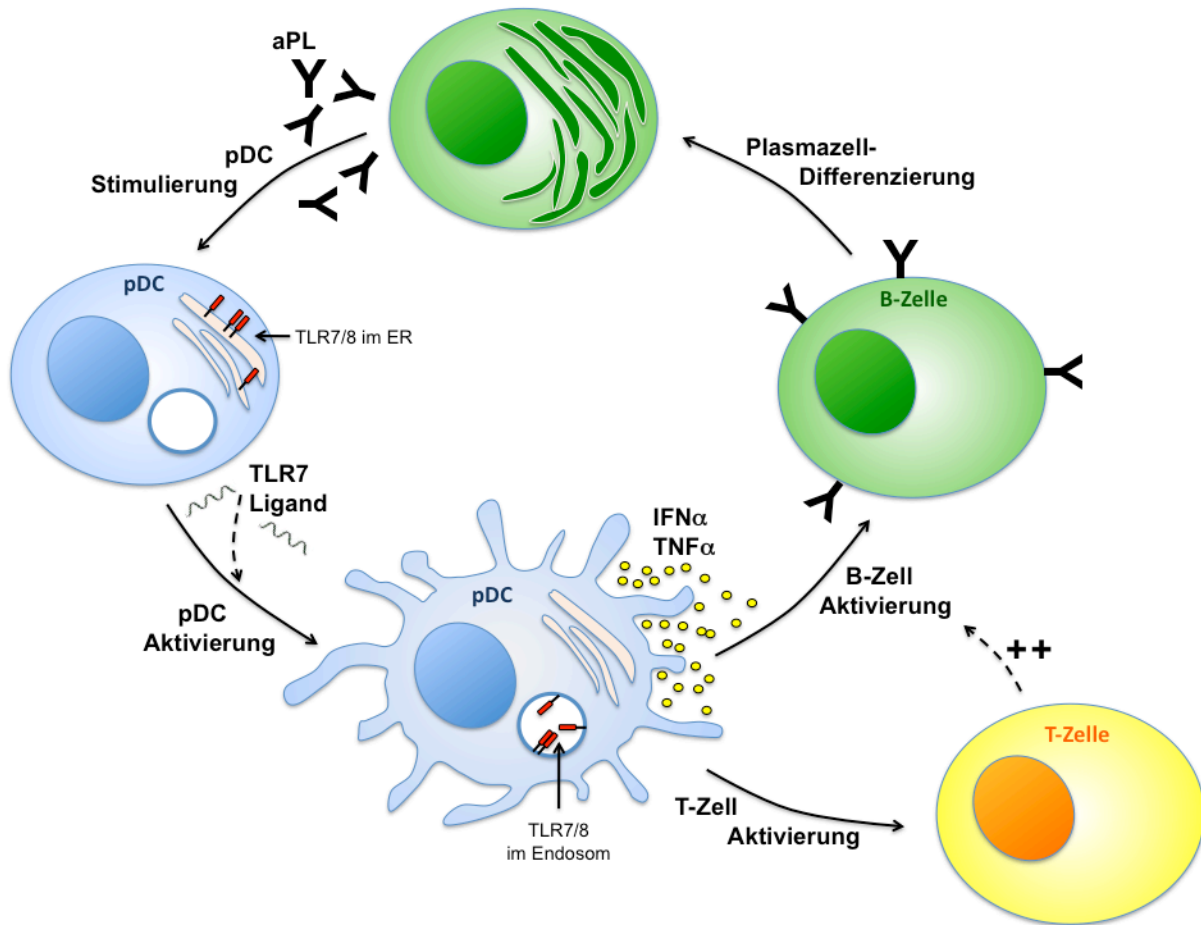


Abb. 6.2 aPL induzieren einen positiven Feedback-Loop.

aPL stimulierte pDCs können nach Kontakt mit TLR7 Liganden die B-Zell Aktivierung sowie die B-Zell Differenzierung in aPL-produzierende Plasmazellen einleiten, woraus ein dauerhaft erhöhter aPL-Titer resultiert. Die Anwesenheit von T-Zellen kann diesen Mechanismus zusätzlich verstärken.

7 **Literaturverzeichnis**

1. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* **296**, 298-300 (2002).
2. Ganz, T. Antimicrobial polypeptides in host defense of the respiratory tract. *J Clin Invest* **109**, 693-697 (2002).
3. Banchereau, J., *et al.* Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **18**, 767-811 (2000).
4. Peiser, L., Mukhopadhyay, S. & Gordon, S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* **14**, 123-128 (2002).
5. Barton, G.M. & Medzhitov, R. Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Curr Opin Immunol* **14**, 380-383 (2002).
6. Medzhitov, R. & Janeway, C.A., Jr. Innate immunity: the virtues of a nonclonal system of recognition. *Cell* **91**, 295-298 (1997).
7. Medzhitov, R. & Janeway, C., Jr. Innate immunity. *N Engl J Med* **343**, 338-344 (2000).
8. Aderem, A. & Ulevitch, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* **406**, 782-787 (2000).
9. Hashimoto, C., Hudson, K.L. & Anderson, K.V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell* **52**, 269-279 (1988).
10. Belvin, M.P. & Anderson, K.V. A conserved signaling pathway: the *Drosophila* toll-dorsal pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* **12**, 393-416 (1996).
11. Nicolas, E., Nappi, A.J. & Lemaitre, B. Expression of antimicrobial peptide genes after infection by parasitoid wasps in *Drosophila*. *Dev Comp Immunol* **20**, 175-181 (1996).
12. Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P. & Janeway, C.A., Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* **388**, 394-397 (1997).
13. Rock, F.L., Hardiman, G., Timans, J.C., Kastelein, R.A. & Bazan, J.F. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 588-593 (1998).
14. Hasan, U., *et al.* Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* **174**, 2942-2950 (2005).
15. Hajjar, A.M., *et al.* Cutting edge: functional interactions between toll-like receptor (TLR) 2 and TLR1 or TLR6 in response to phenol-soluble modulins. *J Immunol* **166**, 15-19 (2001).
16. Kawai, T. & Akira, S. Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Res Ther* **7**, 12-19 (2005).
17. Takeda, K. & Akira, S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* **17**, 1-14 (2005).
18. Matsumoto, M., *et al.* Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol* **171**, 3154-3162 (2003).
19. Latz, E., *et al.* TLR9 signals after translocating from the ER to CpG DNA in the lysosome. *Nat Immunol* **5**, 190-198 (2004).

20. Heil, F., *et al.* The Toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, 8 and 9 subfamily. *Eur J Immunol* **33**, 2987-2997 (2003).
21. Barton, G.M., Kagan, J.C. & Medzhitov, R. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol* **7**, 49-56 (2006).
22. Kim, Y.M., Brinkmann, M.M., Paquet, M.E. & Ploegh, H.L. UNC93B1 delivers nucleotide-sensing toll-like receptors to endolysosomes. *Nature* **452**, 234-238 (2008).
23. Saitoh, S. & Miyake, K. Regulatory molecules required for nucleotide-sensing Toll-like receptors. *Immunol Rev* **227**, 32-43 (2009).
24. Zhang, D., *et al.* A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**, 1522-1526 (2004).
25. Hawn, T.R., *et al.* A common dominant TLR5 stop codon polymorphism abolishes flagellin signaling and is associated with susceptibility to legionnaires' disease. *J Exp Med* **198**, 1563-1572 (2003).
26. Lauw, F.N., Caffrey, D.R. & Golenbock, D.T. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol* **26**, 509-511 (2005).
27. Muzio, M., Ni, J., Feng, P. & Dixit, V.M. IRAK (Pelle) family member IRAK-2 and MyD88 as proximal mediators of IL-1 signaling. *Science* **278**, 1612-1615 (1997).
28. Ghosh, S., May, M.J. & Kopp, E.B. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-260 (1998).
29. Kawai, T. & Akira, S. TLR signaling. *Semin Immunol* **19**, 24-32 (2007).
30. Kawai, T. & Akira, S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**, 460-469 (2007).
31. Yamamoto, M., *et al.* Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* **301**, 640-643 (2003).
32. Oshiumi, H., *et al.* TIR-containing adapter molecule (TICAM)-2, a bridging adapter recruiting to toll-like receptor 4 TICAM-1 that induces interferon-beta. *J Biol Chem* **278**, 49751-49762 (2003).
33. Yamamoto, M., *et al.* TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol* **4**, 1144-1150 (2003).
34. Siegal, F.P., *et al.* The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* **284**, 1835-1837 (1999).
35. Lennert, K. & Remmele, W. [Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes.]. *Acta Haematol* **19**, 99-113 (1958).
36. Inaba, K., *et al.* Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **176**, 1693-1702 (1992).
37. Colonna, M., Trinchieri, G. & Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* **5**, 1219-1226 (2004).

38. Blom, B., Ho, S., Antonenko, S. & Liu, Y.J. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J Exp Med* **192**, 1785-1796 (2000).
39. Inaba, K., Inaba, M., Naito, M. & Steinman, R.M. Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J Exp Med* **178**, 479-488 (1993).
40. Moll, H., Fuchs, H., Blank, C. & Rollinghoff, M. Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen-specific T cells. *Eur J Immunol* **23**, 1595-1601 (1993).
41. Reis e Sousa, C., Stahl, P.D. & Austyn, J.M. Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J Exp Med* **178**, 509-519 (1993).
42. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**, 389-400 (1995).
43. Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-1118 (1994).
44. Feldman, S.B., *et al.* Viral induction of low frequency interferon-alpha producing cells. *Virology* **204**, 1-7 (1994).
45. Kaisho, T. & Akira, S. Dendritic-cell function in Toll-like receptor- and MyD88-knockout mice. *Trends Immunol* **22**, 78-83 (2001).
46. Grouard, G., *et al.* The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* **185**, 1101-1111 (1997).
47. Asselin-Paturel, C., *et al.* Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology. *Nat Immunol* **2**, 1144-1150 (2001).
48. Cella, M., Facchetti, F., Lanzavecchia, A. & Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent TH1 polarization. *Nat Immunol* **1**, 305-310 (2000).
49. de Saint-Vis, B., *et al.* A novel lysosome-associated membrane glycoprotein, DC-LAMP, induced upon DC maturation, is transiently expressed in MHC class II compartment. *Immunity* **9**, 325-336 (1998).
50. Cella, M., Engering, A., Pinet, V., Pieters, J. & Lanzavecchia, A. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature* **388**, 782-787 (1997).
51. Nijman, H.W., *et al.* Antigen capture and major histocompatibility class II compartments of freshly isolated and cultured human blood dendritic cells. *J Exp Med* **182**, 163-174 (1995).
52. Lanzavecchia, A. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr Opin Immunol* **8**, 348-354 (1996).
53. Albert, M.L., Sauter, B. & Bhardwaj, N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* **392**, 86-89 (1998).

54. Sallusto, F., *et al.* Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* **28**, 2760-2769 (1998).
55. Gunn, M.D., *et al.* Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med* **189**, 451-460 (1999).
56. Janeway, C.A. *Immunologie*, (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2002).
57. Doherty, P.C. & Zinkernagel, R.M. A biological role for the major histocompatibility antigens. *Lancet* **1**, 1406-1409 (1975).
58. Gutcher, I. & Becher, B. APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation. *J Clin Invest* **117**, 1119-1127 (2007).
59. Risoan, M.C., *et al.* Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186 (1999).
60. Cella, M., *et al.* Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat Med* **5**, 919-923 (1999).
61. Rolink, A. & Melchers, F. B-cell development in the mouse. *Immunol Lett* **54**, 157-161 (1996).
62. Rolink, A.G., Melchers, F. & Andersson, J. The transition from immature to mature B cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **246**, 39-43; discussion 44 (1999).
63. Rolink, A., *et al.* Differentiation, dedifferentiation, and redifferentiation of B-lineage lymphocytes: roles of the surrogate light chain and the Pax5 gene. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **64**, 21-25 (1999).
64. Nadler, L.M., *et al.* B4, a human B lymphocyte-associated antigen expressed on normal, mitogen-activated, and malignant B lymphocytes. *J Immunol* **131**, 244-250 (1983).
65. Sato, S., Steeber, D.A., Jansen, P.J. & Tedder, T.F. CD19 expression levels regulate B lymphocyte development: human CD19 restores normal function in mice lacking endogenous CD19. *J Immunol* **158**, 4662-4669 (1997).
66. Tedder, T.F. & Isaacs, C.M. Isolation of cDNAs encoding the CD19 antigen of human and mouse B lymphocytes. A new member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol* **143**, 712-717 (1989).
67. Kunkel, E.J. & Butcher, E.C. Plasma-cell homing. *Nat Rev Immunol* **3**, 822-829 (2003).
68. Howard, J.C., Hunt, S.V. & Gowans, J.L. Identification of marrow-derived and thymus-derived small lymphocytes in the lymphoid tissue and thoracic duct lymph of normal rats. *J Exp Med* **135**, 200-219 (1972).
69. Nieuwenhuis, P. & Ford, W.L. Comparative migration of B- and T-Lymphocytes in the rat spleen and lymph nodes. *Cell Immunol* **23**, 254-267 (1976).
70. Dubois, B., *et al.* Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40-activated B lymphocytes. *J Exp Med* **185**, 941-951 (1997).
71. Dubois, B., *et al.* Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol* **161**, 2223-2231 (1998).
72. Fayette, J., *et al.* Dendritic cells enhance the differentiation of naive B cells into plasma cells in vitro. *Scand J Immunol* **48**, 563-570 (1998).
73. Fayette, J., *et al.* Human dendritic cells skew isotype switching of CD40-activated naive B cells towards IgA1 and IgA2. *J Exp Med* **185**, 1909-1918 (1997).

74. Hargreaves, D.C., *et al.* A coordinated change in chemokine responsiveness guides plasma cell movements. *J Exp Med* **194**, 45-56 (2001).
75. Youngman, K.R., *et al.* Correlation of tissue distribution, developmental phenotype, and intestinal homing receptor expression of antigen-specific B cells during the murine anti-rotavirus immune response. *J Immunol* **168**, 2173-2181 (2002).
76. Paterson, P.Y. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* **111**, 119-136 (1960).
77. Panitch, H.S. & McFarlin, D.E. Experimental allergic encephalomyelitis: enhancement of cell-mediated transfer by concanavalin A. *J Immunol* **119**, 1134-1137 (1977).
78. Pettinelli, C.B. & McFarlin, D.E. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* **127**, 1420-1423 (1981).
79. Buschard, K. Passive transfer of virus induced diabetes mellitus with spleen cells. *Acta Pathol Microbiol Scand C* **86**, 29-32 (1978).
80. Buschard, K., Madsbad, S. & Rygaard, J. Passive transfer of diabetes mellitus from man to mouse. *Lancet* **1**, 908-910 (1978).
81. White, J., *et al.* The V beta-specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T cells and clonal deletion in neonatal mice. *Cell* **56**, 27-35 (1989).
82. Paliard, X., *et al.* Evidence for the effects of a superantigen in rheumatoid arthritis. *Science* **253**, 325-329 (1991).
83. Kraft, M., *et al.* Synovial fibroblasts as target cells for staphylococcal enterotoxin-induced T-cell cytotoxicity. *Immunology* **93**, 20-25 (1998).
84. Zamvil, S.S. & Steinman, L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol* **8**, 579-621 (1990).
85. Racke, M.K., *et al.* Superantigen modulation of experimental allergic encephalomyelitis: activation of anergy determines outcome. *J Immunol* **152**, 2051-2059 (1994).
86. Miller, S.D., *et al.* Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* **3**, 1133-1136 (1997).
87. Kamradt, T. & Volkmer-Engert, R. Cross-reactivity of T lymphocytes in infection and autoimmunity. *Mol Divers* **8**, 271-280 (2004).
88. Tough, D.F., Borrow, P. & Sprent, J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon in vivo. *Science* **272**, 1947-1950 (1996).
89. Ehl, S., Hombach, J., Aichele, P., Hengartner, H. & Zinkernagel, R.M. Bystander activation of cytotoxic T cells: studies on the mechanism and evaluation of in vivo significance in a transgenic mouse model. *J Exp Med* **185**, 1241-1251 (1997).
90. Tough, D.F., Sun, S. & Sprent, J. T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS). *J Exp Med* **185**, 2089-2094 (1997).
91. Infante-Duarte, C. & Kamradt, T. Lipopeptides of *Borrelia burgdorferi* outer surface proteins induce Th1 phenotype development in alphabeta T-cell receptor transgenic mice. *Infect Immun* **65**, 4094-4099 (1997).

92. Damian, R.T. Molecular mimicry: parasite evasion and host defense. *Curr Top Microbiol Immunol* **145**, 101-115 (1989).
93. Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B. Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* **230**, 1043-1045 (1985).
94. Jahnke, U., Fischer, E.H. & Alvord, E.C., Jr. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* **229**, 282-284 (1985).
95. Schwimbeck, P.L. & Oldstone, M.B. Molecular mimicry between human leukocyte antigen B27 and Klebsiella. Consequences for spondyloarthropathies. *Am J Med* **85**, 51-53 (1988).
96. Hemmer, B., Stefanova, I., Vergelli, M., Germain, R.N. & Martin, R. Relationships among TCR ligand potency, thresholds for effector function elicitation, and the quality of early signaling events in human T cells. *J Immunol* **160**, 5807-5814 (1998).
97. Hemmer, B., *et al.* Human T-cell response to myelin basic protein peptide (83-99): extensive heterogeneity in antigen recognition, function, and phenotype. *Neurology* **49**, 1116-1126 (1997).
98. Vreugdenhil, G.R., *et al.* Molecular mimicry in diabetes mellitus: the homologous domain in coxsackie B virus protein 2C and islet autoantigen GAD65 is highly conserved in the coxsackie B-like enteroviruses and binds to the diabetes associated HLA-DR3 molecule. *Diabetologia* **41**, 40-46 (1998).
99. Gibofsky, A., Kerwar, S. & Zabriskie, J.B. Rheumatic fever. The relationships between host, microbe, and genetics. *Rheum Dis Clin North Am* **24**, 237-259 (1998).
100. Hughes, G.R. Thrombosis, abortion, cerebral disease, and the lupus anticoagulant. *Br Med J (Clin Res Ed)* **287**, 1088-1089 (1983).
101. Asherson, R.A. The catastrophic antiphospholipid syndrome, 1998. A review of the clinical features, possible pathogenesis and treatment. *Lupus* **7 Suppl 2**, S55-62 (1998).
102. Ulcova-Gallova, Z., *et al.* Anti-phospholipid antibodies against phosphatidylinositol, and phosphatidylserine are more significant in reproductive failure than antibodies against cardiolipin only. *Am J Reprod Immunol* **54**, 112-117 (2005).
103. Lackner, K.J., von Landenberg, C., Barlage, S. & Schmitz, G. Analysis of prothrombotic effects of two human monoclonal IgG antiphospholipid antibodies of apparently similar specificity. *Thromb Haemost* **83**, 583-588 (2000).
104. Giles, I.P., *et al.* A systematic analysis of sequences of human antiphospholipid and anti-beta2-glycoprotein I antibodies: the importance of somatic mutations and certain sequence motifs. *Semin Arthritis Rheum* **32**, 246-265 (2003).
105. von Landenberg, C., Lackner, K.J., von Landenberg, P., Lang, B. & Schmitz, G. Isolation and characterization of two human monoclonal anti-phospholipid IgG from patients with autoimmune disease. *J Autoimmun* **13**, 215-223 (1999).
106. Sheng, Y., Kandiah, D.A. & Krilis, S.A. Beta2-glycoprotein I: target antigen for 'antiphospholipid' antibodies. Immunological and molecular aspects. *Lupus* **7 Suppl 2**, S5-9 (1998).

107. McNeil, H.P., Simpson, R.J., Chesterman, C.N. & Krillis, S.A. Anti-phospholipid antibodies are directed against a complex antigen that includes a lipid-binding inhibitor of coagulation: beta 2-glycoprotein I (apolipoprotein H). *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 4120-4124 (1990).
108. Galli, M., *et al.* Anticardiolipin antibodies (ACA) directed not to cardiolipin but to a plasma protein cofactor. *Lancet* **335**, 1544-1547 (1990).
109. Bevers, E.M. Anticardiolipin antibody cofactor. *Lancet* **337**, 550 (1991).
110. Oosting, J.D., *et al.* Antiphospholipid antibodies directed against a combination of phospholipids with prothrombin, protein C, or protein S: an explanation for their pathogenic mechanism? *Blood* **81**, 2618-2625 (1993).
111. Sammaritano, L.R., Lockshin, M.D. & Gharavi, A.E. Antiphospholipid antibodies differ in aPL cofactor requirement. *Lupus* **1**, 83-90 (1992).
112. Shi, W., Chong, B.H., Hogg, P.J. & Chesterman, C.N. Anticardiolipin antibodies block the inhibition by beta 2-glycoprotein I of the factor Xa generating activity of platelets. *Thromb Haemost* **70**, 342-345 (1993).
113. Forastiero, R.R., Martinuzzo, M.E., Cerrato, G.S., Kordich, L.C. & Carreras, L.O. Relationship of anti beta2-glycoprotein I and anti prothrombin antibodies to thrombosis and pregnancy loss in patients with antiphospholipid antibodies. *Thromb Haemost* **78**, 1008-1014 (1997).
114. Doring, Y., *et al.* Human antiphospholipid antibodies induce TNFalpha in monocytes via Toll-like receptor 8. *Immunobiology* (2009).
115. Gastineau, D.A., Kazmier, F.J., Nichols, W.L. & Bowie, E.J. Lupus anticoagulant: an analysis of the clinical and laboratory features of 219 cases. *Am J Hematol* **19**, 265-275 (1985).
116. Pazner, R., Rosner, E. & Many, A. Circulating anticoagulant in systemic lupus erythematosus: clinical manifestations. *Acta Haematol* **76**, 90-94 (1986).
117. Wilson, W.A., *et al.* International consensus statement on preliminary classification criteria for definite antiphospholipid syndrome: report of an international workshop. *Arthritis Rheum* **42**, 1309-1311 (1999).
118. Brandt, J.T., Barna, L.K. & Triplett, D.A. Laboratory identification of lupus anticoagulants: results of the Second International Workshop for Identification of Lupus Anticoagulants. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulants/Antiphospholipid Antibodies of the ISTH. *Thromb Haemost* **74**, 1597-1603 (1995).
119. Miyakis, S., *et al.* International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). *J Thromb Haemost* **4**, 295-306 (2006).
120. Lackner, K.J., Peetz, D. & von Landenberg, P. Revision of the Sapporo criteria for the antiphospholipid syndrome-- coming to grips with evidence and Thomas Bayes? *Thromb Haemost* **95**, 917-919 (2006).
121. Kutteh, W.H. & Franklin, R.D. Assessing the variation in antiphospholipid antibody (APA) assays: comparison of results from 10 centers. *Am J Obstet Gynecol* **191**, 440-448 (2004).
122. Lockshin, M.D. & Erkan, D. Treatment of the antiphospholipid syndrome. *N Engl J Med* **349**, 1177-1179 (2003).
123. Shoenfeld, Y., Meroni, P.L. & Cervera, R. Antiphospholipid syndrome dilemmas still to be solved: 2008 status. *Ann Rheum Dis* **67**, 438-442 (2008).

124. Lehmann, H.W., von Landenberg, P. & Modrow, S. Parvovirus B19 infection and autoimmune disease. *Autoimmun Rev* **2**, 218-223 (2003).
125. Shoenfeld, Y., *et al.* Infectious origin of the antiphospholipid syndrome. *Ann Rheum Dis* **65**, 2-6 (2006).
126. Pierangeli, S.S., *et al.* Toll-like receptor and antiphospholipid mediated thrombosis: in vivo studies. *Ann Rheum Dis* **66**, 1327-1333 (2007).
127. Lopez-Pedreria, C., Buendia, P., Aguirre, M.A., Velasco, F. & Cuadrado, M.J. Antiphospholipid syndrome and tissue factor: a thrombotic couple. *Lupus* **15**, 161-166 (2006).
128. Pierangeli, S.S., Vega-Ostertag, M. & Harris, E.N. Intracellular signaling triggered by antiphospholipid antibodies in platelets and endothelial cells: a pathway to targeted therapies. *Thromb Res* **114**, 467-476 (2004).
129. Wolberg, A.S. & Roubey, R.A. Mechanisms of autoantibody-induced monocyte tissue factor expression. *Thromb Res* **114**, 391-396 (2004).
130. Salmon, J.E. & Girardi, G. Antiphospholipid antibodies and pregnancy loss: a disorder of inflammation. *J Reprod Immunol* **77**, 51-56 (2008).
131. Fischetti, F., *et al.* Thrombus formation induced by antibodies to beta2-glycoprotein I is complement dependent and requires a priming factor. *Blood* **106**, 2340-2346 (2005).
132. Pierangeli, S.S., *et al.* Requirement of activation of complement C3 and C5 for antiphospholipid antibody-mediated thrombophilia. *Arthritis Rheum* **52**, 2120-2124 (2005).
133. Barrat, F.J., *et al.* Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **202**, 1131-1139 (2005).
134. Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
135. Dzionek, A., *et al.* BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *J Exp Med* **194**, 1823-1834 (2001).
136. Jurk, M., *et al.* Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat Immunol* **3**, 499 (2002).
137. Hemmi, H., *et al.* Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat Immunol* **3**, 196-200 (2002).
138. Lee, J., *et al.* Molecular basis for the immunostimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 6646-6651 (2003).
139. Lee, J., *et al.* Nuclear factor kappaB (NF-kappaB) activation primes cells to a pro-inflammatory polarized response to a Toll-like receptor 7 (TLR7) agonist. *Biochem J* **421**, 301-310 (2009).
140. Heil, F., *et al.* Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* **303**, 1526-1529 (2004).
141. Sorice, M., *et al.* Anti-beta2-glycoprotein I antibodies induce monocyte release of tumor necrosis factor alpha and tissue factor by signal transduction pathways involving lipid rafts. *Arthritis Rheum* **56**, 2687-2697 (2007).

142. Fischer, C., *et al.* Identification of a peptide mimicking the binding pattern of an antiphospholipid antibody. *Immunobiology* **211**, 695-699 (2006).
143. Smart, E.J. & Anderson, R.G. Alterations in membrane cholesterol that affect structure and function of caveolae. *Methods Enzymol* **353**, 131-139 (2002).
144. Kobayashi, T., *et al.* A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* **392**, 193-197 (1998).
145. Miller, F.J., Jr., *et al.* Cytokine activation of nuclear factor kappa B in vascular smooth muscle cells requires signaling endosomes containing Nox1 and CIC-3. *Circ Res* **101**, 663-671 (2007).
146. Lamb, F.S., Moreland, J.G. & Miller, F.J., Jr. Electrophysiology of reactive oxygen production in signaling endosomes. *Antioxid Redox Signal* **11**, 1335-1347 (2009).
147. Unfried, K., Sydlik, U., Bierhals, K., Weissenberg, A. & Abel, J. Carbon nanoparticle-induced lung epithelial cell proliferation is mediated by receptor-dependent Akt activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **294**, L358-367 (2008).
148. Klotz, L.O. Oxidant-induced signaling: effects of peroxynitrite and singlet oxygen. *Biol Chem* **383**, 443-456 (2002).
149. Gloire, G., Legrand-Poels, S. & Piette, J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol* **72**, 1493-1505 (2006).
150. Beckman, J.S., *et al.* Superoxide dismutase and catalase conjugated to polyethylene glycol increases endothelial enzyme activity and oxidant resistance. *J Biol Chem* **263**, 6884-6892 (1988).
151. Kawai, T. & Akira, S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol* **21**, 317-337 (2009).
152. Gilliet, M., Cao, W. & Liu, Y.J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol* **8**, 594-606 (2008).
153. Joshua, D., *et al.* The labelling index of primitive plasma cells determines the clinical behaviour of patients with myelomatosis. *Br J Haematol* **94**, 76-81 (1996).
154. Nakano, Y., *et al.* Critical roles for p22phox in the structural maturation and subcellular targeting of Nox3. *Biochem J* **403**, 97-108 (2007).
155. Kawahara, T. & Lambeth, J.D. Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate modulates Nox5 localization via an N-terminal polybasic region. *Mol Biol Cell* **19**, 4020-4031 (2008).
156. Ambasta, R.K., *et al.* Direct interaction of the novel Nox proteins with p22phox is required for the formation of a functionally active NADPH oxidase. *J Biol Chem* **279**, 45935-45941 (2004).
157. Kuroda, J., *et al.* The superoxide-producing NAD(P)H oxidase Nox4 in the nucleus of human vascular endothelial cells. *Genes Cells* **10**, 1139-1151 (2005).
158. Li, Q., *et al.* Nox2 and Rac1 regulate H₂O₂-dependent recruitment of TRAF6 to endosomal interleukin-1 receptor complexes. *Mol Cell Biol* **26**, 140-154 (2006).
159. Mumbengegwi, D.R., Li, Q., Li, C., Bear, C.E. & Engelhardt, J.F. Evidence for a superoxide permeability pathway in endosomal membranes. *Mol Cell Biol* **28**, 3700-3712 (2008).

-
160. Alvarez-Maqueda, M., *et al.* Homocysteine enhances superoxide anion release and NADPH oxidase assembly by human neutrophils. Effects on MAPK activation and neutrophil migration. *Atherosclerosis* **172**, 229-238 (2004).
161. Siow, Y.L., Au-Yeung, K.K., Woo, C.W. & O, K. Homocysteine stimulates phosphorylation of NADPH oxidase p47phox and p67phox subunits in monocytes via protein kinase C β activation. *Biochem J* **398**, 73-82 (2006).
162. Banfi, B., Clark, R.A., Steger, K. & Krause, K.H. Two novel proteins activate superoxide generation by the NADPH oxidase NOX1. *J Biol Chem* **278**, 3510-3513 (2003).
163. Kobayashi, T., *et al.* Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem* **277**, 32157-32164 (2002).
164. Gruenberg, J. Lipids in endocytic membrane transport and sorting. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 382-388 (2003).
165. Matsuo, H., *et al.* Role of LBPA and Alix in multivesicular liposome formation and endosome organization. *Science* **303**, 531-534 (2004).
166. Galve-de Rochemonteix, B., *et al.* Interaction of anti-phospholipid antibodies with late endosomes of human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**, 563-574 (2000).
167. Beekman, J.M., van der Linden, J.A., van de Winkel, J.G. & Leusen, J.H. Fc γ R1 (CD64) resides constitutively in lipid rafts. *Immunol Lett* **116**, 149-155 (2008).
168. Strzelecka-Kiliszek, A., Korzeniowski, M., Kwiatkowska, K., Mrozinska, K. & Sobota, A. Activated Fc γ R2 and signalling molecules revealed in rafts by ultra-structural observations of plasma-membrane sheets. *Mol Membr Biol* **21**, 101-108 (2004).
169. Caldefie-Chezet, F., *et al.* Is the neutrophil reactive oxygen species production measured by luminol and lucigenin chemiluminescence intra or extracellular? Comparison with DCFH-DA flow cytometry and cytochrome c reduction. *Clin Chim Acta* **319**, 9-17 (2002).
170. Simons, J.M., Hart, B.A., Ip Vai Ching, T.R., Van Dijk, H. & Labadie, R.P. Metabolic activation of natural phenols into selective oxidative burst agonists by activated human neutrophils. *Free Radic Biol Med* **8**, 251-258 (1990).
171. Brown, D.I. & Griendling, K.K. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* **47**, 1239-1253 (2009).
172. Ahmad-Nejad, P., *et al.* Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate Toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* **32**, 1958-1968 (2002).
173. Nishiya, T., Kajita, E., Miwa, S. & Defranco, A.L. TLR3 and TLR7 are targeted to the same intracellular compartments by distinct regulatory elements. *J Biol Chem* **280**, 37107-37117 (2005).
174. Hacker, H., *et al.* CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation. *EMBO J* **17**, 6230-6240 (1998).
175. Takahashi, K., *et al.* A protein associated with Toll-like receptor (TLR) 4 (PRAT4A) is required for TLR-dependent immune responses. *J Exp Med* **204**, 2963-2976 (2007).
176. Du, X., Poltorak, A., Wei, Y. & Beutler, B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur Cytokine Netw* **11**, 362-371 (2000).
-

177. Chuang, T.H. & Ulevitch, R.J. Cloning and characterization of a sub-family of human toll-like receptors: hTLR7, hTLR8 and hTLR9. *Eur Cytokine Netw* **11**, 372-378 (2000).
178. Vollmer, J., *et al.* Immune stimulation mediated by autoantigen binding sites within small nuclear RNAs involves Toll-like receptors 7 and 8. *J Exp Med* **202**, 1575-1585 (2005).
179. Ronnblom, L. & Alm, G.V. Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system. *Arthritis Res Ther* **5**, 68-75 (2003).
180. Hooks, J.J., *et al.* Immune interferon in the circulation of patients with autoimmune disease. *N Engl J Med* **301**, 5-8 (1979).
181. Bengtsson, A.A., *et al.* Activation of type I interferon system in systemic lupus erythematosus correlates with disease activity but not with antiretroviral antibodies. *Lupus* **9**, 664-671 (2000).
182. Ytterberg, S.R. & Schnitzer, T.J. Serum interferon levels in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **25**, 401-406 (1982).
183. Means, T.K., *et al.* Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *J Clin Invest* **115**, 407-417 (2005).
184. Lovgren, T., Eloranta, M.L., Bave, U., Alm, G.V. & Ronnblom, L. Induction of interferon-alpha production in plasmacytoid dendritic cells by immune complexes containing nucleic acid released by necrotic or late apoptotic cells and lupus IgG. *Arthritis Rheum* **50**, 1861-1872 (2004).
185. Pisitkun, P., *et al.* Autoreactive B cell responses to RNA-related antigens due to TLR7 gene duplication. *Science* **312**, 1669-1672 (2006).
186. Subramanian, S., *et al.* A Tlr7 translocation accelerates systemic autoimmunity in murine lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 9970-9975 (2006).
187. Deane, J.A., *et al.* Control of toll-like receptor 7 expression is essential to restrict autoimmunity and dendritic cell proliferation. *Immunity* **27**, 801-810 (2007).
188. Marshak-Rothstein, A. Toll-like receptors in systemic autoimmune disease. *Nat Rev Immunol* **6**, 823-835 (2006).
189. Deng, G.M., Nilsson, I.M., Verdrengh, M., Collins, L.V. & Tarkowski, A. Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* **5**, 702-705 (1999).
190. Ehlers, M., Fukuyama, H., McGaha, T.L., Aderem, A. & Ravetch, J.V. TLR9/MyD88 signaling is required for class switching to pathogenic IgG2a and 2b autoantibodies in SLE. *J Exp Med* **203**, 553-561 (2006).
191. Ronaghy, A., *et al.* Immunostimulatory DNA sequences influence the course of adjuvant arthritis. *J Immunol* **168**, 51-56 (2002).
192. Asagiri, M., *et al.* Cathepsin K-dependent toll-like receptor 9 signaling revealed in experimental arthritis. *Science* **319**, 624-627 (2008).
193. Prinz, M., *et al.* Innate immunity mediated by TLR9 modulates pathogenicity in an animal model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* **116**, 456-464 (2006).
194. Wu, H.J., *et al.* Inflammatory arthritis can be reined in by CpG-induced DC-NK cell cross talk. *J Exp Med* **204**, 1911-1922 (2007).

195. Marshall, J.D., Heeke, D.S., Gesner, M.L., Livingston, B. & Van Nest, G. Negative regulation of TLR9-mediated IFN-alpha induction by a small-molecule, synthetic TLR7 ligand. *J Leukoc Biol* **82**, 497-508 (2007).
196. Berghofer, B., Haley, G., Frommer, T., Bein, G. & Hackstein, H. Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-C-oligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production. *J Immunol* **178**, 4072-4079 (2007).
197. Wang, J., *et al.* The functional effects of physical interactions among Toll-like receptors 7, 8, and 9. *J Biol Chem* **281**, 37427-37434 (2006).
198. Lang, K.S., *et al.* Toll-like receptor engagement converts T-cell autoreactivity into overt autoimmune disease. *Nat Med* **11**, 138-145 (2005).
199. Hornung, V., *et al.* Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**, 4531-4537 (2002).
200. Zhang, J. & McCrae, K.R. Annexin A2 mediates endothelial cell activation by antiphospholipid/anti-beta2 glycoprotein I antibodies. *Blood* **105**, 1964-1969 (2005).
201. Raschi, E., Testoni, C., Borghi, M.O., Fineschi, S. & Meroni, P.L. Endothelium activation in the anti-phospholipid syndrome. *Biomed Pharmacother* **57**, 282-286 (2003).
202. MacDonald, K.P., *et al.* Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood* **100**, 4512-4520 (2002).
203. Cockrell, E., Espinola, R.G. & McCrae, K.R. Annexin A2: biology and relevance to the antiphospholipid syndrome. *Lupus* **17**, 943-951 (2008).
204. Meroni, P.L., Raschi, E., Testoni, C. & Borghi, M.O. Endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies. *Clin Immunol* **112**, 169-174 (2004).
205. Meroni, P.L., Raschi, E., Testoni, C., Parisio, A. & Borghi, M.O. Innate immunity in the antiphospholipid syndrome: role of toll-like receptors in endothelial cell activation by antiphospholipid antibodies. *Autoimmun Rev* **3**, 510-515 (2004).
206. Lopez-Pedrerera, C., *et al.* Antiphospholipid antibodies from patients with the antiphospholipid syndrome induce monocyte tissue factor expression through the simultaneous activation of NF-kappaB/Rel proteins via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, and of the MEK-1/ERK pathway. *Arthritis Rheum* **54**, 301-311 (2006).
207. Romay-Penabad, Z., *et al.* Annexin A2 is involved in antiphospholipid antibody-mediated pathogenic effects in vitro and in vivo. *Blood* **114**, 3074-3083 (2009).
208. Satta, N., *et al.* The role of TLR2 in the inflammatory activation of mouse fibroblasts by human antiphospholipid antibodies. *Blood* **109**, 1507-1514 (2007).
209. Prinz, N., Hauser, F., Lorenz, M., Lackner, K.J. & von Landenberg, P. Structural and functional characterization of a human IgG monoclonal antiphospholipid antibody. *Immunobiology*.
210. Satta, N., Kruithof, E.K., Reber, G. & de Moerloose, P. Induction of TLR2 expression by inflammatory stimuli is required for endothelial cell responses to lipopeptides. *Mol Immunol* **46**, 145-157 (2008).

-
211. Savina, A., *et al.* NOX2 controls phagosomal pH to regulate antigen processing during crosspresentation by dendritic cells. *Cell* **126**, 205-218 (2006).
212. Diebold, S.S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. & Reis e Sousa, C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* **303**, 1529-1531 (2004).
213. Kadowaki, N., Antonenko, S., Lau, J.Y. & Liu, Y.J. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* **192**, 219-226 (2000).
214. Diehl, S. & Rincon, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol* **39**, 531-536 (2002).
215. Boonstra, A., *et al.* Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation. *J Exp Med* **197**, 101-109 (2003).
216. Shi, Y., *et al.* Critical regulation of CD4+ T cell survival and autoimmunity by beta-arrestin 1. *Nat Immunol* **8**, 817-824 (2007).
217. Romagnani, S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 285-294 (1999).
218. Klinman, D.M. & Steinberg, A.D. Inquiry into murine and human lupus. *Immunol Rev* **144**, 157-193 (1995).
219. Chan, O.T., Madaio, M.P. & Shlomchik, M.J. The central and multiple roles of B cells in lupus pathogenesis. *Immunol Rev* **169**, 107-121 (1999).
220. Leandro, M.J., Edwards, J.C., Cambridge, G., Ehrenstein, M.R. & Isenberg, D.A. An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* **46**, 2673-2677 (2002).
221. Sfrikakis, P.P., Boletis, J.N. & Tsokos, G.C. Rituximab anti-B-cell therapy in systemic lupus erythematosus: pointing to the future. *Curr Opin Rheumatol* **17**, 550-557 (2005).
222. Edwards, J.C., *et al.* Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **350**, 2572-2581 (2004).
223. Antel, J. & Bar-Or, A. Roles of immunoglobulins and B cells in multiple sclerosis: from pathogenesis to treatment. *J Neuroimmunol* **180**, 3-8 (2006).
224. Chan, O. & Shlomchik, M.J. A new role for B cells in systemic autoimmunity: B cells promote spontaneous T cell activation in MRL-lpr/lpr mice. *J Immunol* **160**, 51-59 (1998).
225. Chan, O.T., Hannum, L.G., Haberman, A.M., Madaio, M.P. & Shlomchik, M.J. A novel mouse with B cells but lacking serum antibody reveals an antibody-independent role for B cells in murine lupus. *J Exp Med* **189**, 1639-1648 (1999).
226. Harris, D.P., *et al.* Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. *Nat Immunol* **1**, 475-482 (2000).
227. Hanten, J.A., *et al.* Comparison of human B cell activation by TLR7 and TLR9 agonists. *BMC Immunol* **9**, 39 (2008).
228. Sornasse, T., *et al.* Antigen-pulsed dendritic cells can efficiently induce an antibody response in vivo. *J Exp Med* **175**, 15-21 (1992).
-

-
229. Inaba, K., Steinman, R.M., Van Voorhis, W.C. & Muramatsu, S. Dendritic cells are critical accessory cells for thymus-dependent antibody responses in mouse and in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 6041-6045 (1983).
230. Douagi, I., *et al.* Human B cell responses to TLR ligands are differentially modulated by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* **182**, 1991-2001 (2009).
231. Ding, C., Cai, Y., Marroquin, J., Ildstad, S.T. & Yan, J. Plasmacytoid dendritic cells regulate autoreactive B cell activation via soluble factors and in a cell-to-cell contact manner. *J Immunol* **183**, 7140-7149 (2009).
232. Jego, G., *et al.* Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* **19**, 225-234 (2003).
233. Agematsu, K., *et al.* B cell subpopulations separated by CD27 and crucial collaboration of CD27+ B cells and helper T cells in immunoglobulin production. *Eur J Immunol* **27**, 2073-2079 (1997).
234. Klein, U., Rajewsky, K. & Kuppers, R. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* **188**, 1679-1689 (1998).
235. Tangye, S.G., Liu, Y.J., Aversa, G., Phillips, J.H. & de Vries, J.E. Identification of functional human splenic memory B cells by expression of CD148 and CD27. *J Exp Med* **188**, 1691-1703 (1998).
236. Fanslow, W.C., *et al.* Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells. *J Immunol* **149**, 655-660 (1992).
237. Jabara, H.H. & Geha, R.S. The superantigen toxic shock syndrome toxin-1 induces CD40 ligand expression and modulates IgE isotype switching. *Int Immunol* **8**, 1503-1510 (1996).
238. Kumagai, Y., Takeuchi, O. & Akira, S. TLR9 as a key receptor for the recognition of DNA. *Adv Drug Deliv Rev* **60**, 795-804 (2008).
239. Ray, S.K., Putterman, C. & Diamond, B. Pathogenic autoantibodies are routinely generated during the response to foreign antigen: a paradigm for autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 2019-2024 (1996).
240. Shlomchik, M., *et al.* Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med* **171**, 265-292 (1990).
241. van Es, J.H., *et al.* Somatic mutations in the variable regions of a human IgG anti-double-stranded DNA autoantibody suggest a role for antigen in the induction of systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* **173**, 461-470 (1991).
242. Tiller, T., *et al.* Autoreactivity in human IgG+ memory B cells. *Immunity* **26**, 205-213 (2007).

8 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	micro
ACL	Anti-Cardiolipin-Antikörper
APC	antigen-presenting cell
apL	Antiphospholipid-Antikörper
aPTT	activated partial thromboplastin time
APS	Antiphospholipid Syndrom
β2GPI	β2-Glykoprotein I
BCR	b-cell receptor
BDCA	blood dendritic cell antigen
CD	cluster of differentiation
cDNA	complementary DNA
CL	Cardiolipin
CIC-3	endosomaler Chloridkanal-3
DC	dendritic cell
DHE	Dihydroethidium
DNA	deoxyribonucleic acid
dsDNA	Doppelstrang-DNA
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
ER	Endoplasmatisches Retikulum
h	Stunde
HL5B/HL7G	aPL aus einem Patienten mit den Initialen H.L 5B bzw. HL7G entsprechen der Koordinaten der Wells
HLA	human leukocyte antigen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPC	interferon producing cell
IFN	Interferon

IRAK	IL-1 receptor associated kinase
IRF	interferon regulatory factor
IRS	immunregulatorische Sequenz
ISTH	Internationale Gesellschaft für Thrombosen und Hämostase
KM	Knochenmark
LA	Lupus Antikoagulan
LAL	Limulus Amebocyte Lysate
LBPA	Lysobisphosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	leucin-rich repeat
MAP	mitogen activated protein
mDC	myeloid dendritic cell
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
MIP	Macrophage inflammatory Protein
MLR	mixed leucocyte reaction
mRNA	messenger RNA
MyD88	myeloid differentiation primary response gene 88
NAC	N-Acetyl-Cystein
NFA	Nifluminsäure
NF- κ B	nuclear factor of <i>kappa</i> light polypeptide
OD	optische Dichte
PAMPs	pathogen-associated molecular patterns
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction
pDC	plasmacytoid dendritic cell
POD	Peroxidase
PPR	patter recognition receptor
qRT-PCR	quantitative reverse transcription PCR

RNA	ribonucleic acid
sec	Sekunde
SFM	Serum freies Medium
SLC	second lymphoid organ chemokine
SLE	systemic lupus erythematosus
ssRNA	single-stranded RNA
SSW	Schwangerschaftswoche
TAB	TAK1 binding protein
TAK	transforming growth factor- β -activated kinase
TCR	t-cell receptor
TF	tissue factor
Th-Zelle	T-Helferzelle
TICAM	TIR-domain-containing adapter molecule
TIR	Toll-/IL-1 receptor domain
TIRAP	TIR-domain-containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	tumor necrosis factor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TRAF	TNFR associated factor
TRAM	TRIF-related adaptor molecule
TRIF	TIR-domain-containing adapter protein inducing IFN- α

10 **Anhänge**

10.1 **Veröffentlichungen**

1. Doring, Y., Hurst, J., Lorenz, M., Prinz, N., Clemens, N., Drechsler, M. D., Bauer, S., Chapman, J., Shoenfeld, Y., Blank, M., Lackner, K. J., and von Landenberg, P. 2009. Human antiphospholipid antibodies induce TNFalpha in monocytes via Toll-like receptor 8. *Immunobiology*.
2. Hurst, J., Prinz, N., Lorenz, M., Bauer, S., Chapman, J., Lackner, K. J., and von Landenberg, P. 2009. TLR7 and TLR8 ligands and antiphospholipid antibodies show synergistic effects on the induction of IL-1beta and caspase-1 in monocytes and dendritic cells. *Immunobiology* **214**: 683.
3. Hurst, J., Lorenz, M., Prinz, N., and von Landenberg, P. The roll of Toll-like receptors in the antiphospholipid syndrome. *Curr Rheumatol Rep* **12**: 58.
4. Prinz, N., Hauser, F., Lorenz, M., Lackner, K. J., and von Landenberg, P. Structural and functional characterization of a human IgG monoclonal antiphospholipid antibody. *Immunobiology* **216**: 145.
5. Prinz, N., Clemens N., Strand, D., Pütz, I., Lorenz, M., Daiber, A., Stein, P., Degreif, A., Radsak, M., Schild, H., Bauer, S., von Landenberg, P. and Lackner, KJ. Antiphospholipid-Antibodies Induce Translocation of TLR7 and TLR8 to the Endosome in Human Monocytes and Plasmacytoid Dendritic Cells. Submitted to *Blood*. 2011.