



**Bedeutung von KSRP für die  
Pathogenese von  
chronisch-inflammatorischen  
Erkrankungen**

**Rolle von KSRP in Immunzellen**

---

**Dissertation**

Zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Dipl. Biol. Rudolf Käfer

geb. am 18.12.1985 in Duschanbe

Frankfurt, 2019



Dekan:

1. Gutachterin:

2. Gutachter:

Tag der Prüfung:



*„In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,  
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,  
während sich der weite Ozean des Unbekannten  
vor unseren Augen Erstreckt.“*

SIR ISAAC NEWTON (1643 - 1772)

# Inhaltsverzeichnis

---

## Inhaltsverzeichnis

|  |            |
|--|------------|
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b>  | <b>II</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis</b>   | <b>VII</b> |
| <b>Tabellenverzeichnis</b>   | <b>XI</b>  |
| <b>Abkürzungsverzeichnis</b>   | <b>XII</b> |
| <b>1. EINLEITUNG</b>   | <b>1</b>   |
| <b>1.1 Die Regulation der Genexpression</b>  | <b>1</b>   |
| <b>1.2 Das ‘KH-type splicing regulatory protein’ KSRP</b>  | <b>2</b>   |
| 1.2.1 Einfluss von KSRP auf die mRNA Stabilität/posttranskriptionelle Mechanismen                  | 3          |
| 1.2.2 RNA-BP und Immunzellfunktionen   | 4          |
| <b>1.3 Immunzellen</b>   | <b>6</b>   |
| 1.3.1 Antigen präsentierende Zellen  | 7          |
| 1.3.1.1 Dendritische Zellen  | 7          |
| 1.3.1.2 Makrophagen  | 8          |
| 1.3.1.3 B-Zellen   | 9          |
| 1.3.2 Zytokine   | 10         |
| 1.3.3 T-Lymphozyten  | 11         |
| 1.3.4 Neutrophile Granulozyten   | 13         |
| <b>1.6 Dysregulation vom Immunsystem führt zu Autoimmunerkrankungen &amp; Allergien</b>            | <b>14</b>  |
| 1.6.1 Rheumatoide Arthritis  | 16         |
| 1.6.2 Allergisches Asthma Bronchiale   | 17         |
| 1.6.3 Modelle zur Untersuchung der Pathogenese humaner chronisch-inflammatorischer<br>Erkrankungen | 19         |
| 1.6.3.1 Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)  | 19         |
| 1.6.3.2 Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA)  | 20         |
| 1.6.4.3 Allergisches Asthma bronchiale   | 21         |
| <b>2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>   | <b>22</b>  |
| <b>3. MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>23</b>  |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>3.1 Material</b>  | <b>23</b> |
| 3.1.1 Laborgeräte  | 23        |
| 3.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterial  | 28        |
| 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien   | 31        |
| 3.1.4 Lösungen, Puffer und Kulturmedien  | 33        |
| 3.1.4.1 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer   | 34        |
| 3.1.4.2 FACS-Lösungen und -Puffer  | 37        |
| 3.1.5 Medien und Supplemente für Zellkulturen  | 37        |
| 3.1.6 Kits   | 40        |
| 3.1.7 Analyse Software   | 41        |
| 3.1.8 Antikörper   | 42        |
| 3.1.8.1 Antikörper zur Absättigung freier Fc-Rezeptoren                                  | 42        |
| 3.1.8.2 Antikörper zur FACS-Färbung  | 42        |
| 3.1.8.3 Isotypkontrollantikörper für die FACS-Färbung                                    | 44        |
| 3.1.8.4 Reagenzien zur Quantifizierung apoptotischer/nekrotischer Zellen                 | 44        |
| 3.1.8.5. Oligonukleotide   | 45        |
| <b>3.2. Zellbiologische Methoden</b>   | <b>45</b> |
| 3.2.1 Allgemeine Bedingungen   | 45        |
| 3.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl  | 45        |
| 3.2.3 Isolation muriner Knochenmark Vorläuferzellen                                      | 46        |
| 3.2.3.1 Kultivierung und Differenzierung von Knochenmarkszellen zu BM-DC und BM-M $\phi$ | 47        |
| 3.2.4 Isolation muriner PBMC aus dem Blut  | 48        |
| 3.2.5 Präparation von Milzzellen   | 48        |
| 3.2.5.1 Isolierung von T-Lymphozyten über Nylonwolle-Säulen                              | 49        |
| 3.2.5.2 Isolierung von T-Lymphozyten durch MACS  | 50        |
| 3.2.6 Stimulation der Immunzellen  | 51        |
| 3.2.7 T-Lymphozyten Proliferationsassay  | 52        |
| 3.2.7.1 Messung der zellulären <sup>3</sup> HTdR-Radioaktivität                          | 52        |
| 3.2.8 Untersuchung der Zellvitalität mittels MTT-Assays                                  | 53        |
| 3.2.9 Transwell Migrations-Assay   | 54        |
| <b>3.3 Fluoreszenz-basierte Methoden</b>   | <b>54</b> |
| 3.3.1 FACS ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting/Scanning</i> )                       | 54        |
| 3.3.2 Oberflächen FACS Färbung   | 56        |
| 3.3.3 Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen                              | 56        |
| 3.3.4 Zytokinmessung mittels <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)                          | 57        |
| <b>3.4. Tierexperimentelle Methoden</b>  | <b>58</b> |
| 3.4.1 Tierhaltung und Versuchstiere  | 58        |
| 3.4.2 Typisierung von Mäusen   | 59        |
| 3.4.3 PCR zur KSRP- Genotypisierung  | 60        |

# Inhaltsverzeichnis

---

|  |            |
|--|------------|
| 3.4.4 Kollagen Antikörper induzierte Arthritis (CAIA)                            | 62         |
| 3.4.4.1 Bestimmung des Arthritisindex  | 64         |
| 3.4.4.2 Histologische Paraffinschnitte und Übersichtsfärbung                     | 66         |
| 3.4.5 Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)  | 66         |
| 3.4.6 Asthma bronchiale Induktion  | 67         |
| 3.4.6.1 Lungenfunktionsmessung   | 68         |
| 3.4.6.1.1 Nicht-invasive Messung (Ganzkörperplethysmographie)                    | 69         |
| 3.4.6.1.2 Invasive Messung mittels BUXCO   | 71         |
| 3.4.6.1.3 Bronchoalveolar Lavage (BAL)   | 73         |
| 3.4.6.1.4 Herstellung von Zytospinpräparaten                                     | 74         |
| 3.4.6.1.5 Histologische Methoden und Färbungen                                   | 74         |
| 3.4.6.1.6 Auswertung der histologischen Schnitte                                 | 75         |
| <b>4. ERGEBNISSE</b>   | <b>76</b>  |
| <b>4.1 Charakterisierung von Immunzellen</b>                                     | <b>76</b>  |
| 4.1.1 Immunphänotypisierung von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen         | 77         |
| 4.1.2 Immunphänotypisierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes           | 85         |
| 4.1.3 Immunphänotypisierung von Milzzellen                                       | 89         |
| <b>4.2 Viabilität von Immunzellen</b>  | <b>95</b>  |
| 4.2.1 Quantifizierung von apoptotischen Knochenmarkszellen                       | 96         |
| 4.2.2 Quantifizierung apoptotischer Milzzellen                                   | 98         |
| 4.2.3 Quantifizierung apoptotischer PBMC   | 100        |
| <b>4.3 Migrationsfähigkeit von Immunzellen</b>                                   | <b>104</b> |
| <b>4.4 Zytokinproduktion von LPS-stimulierten Antigen präsentierenden Zellen</b> | <b>107</b> |
| 4.4.1 Zytokinmuster-Analysen von Milzzellen                                      | 108        |
| 4.4.2 Zytokinmuster-Analysen von BM-DC   | 112        |
| 4.4.3 Zytokinmuster-Analysen von BM-M $\phi$                                     | 113        |
| <b>4.5 T-Zell-Immunphänotyp</b>  | <b>114</b> |
| 4.5.1 Genotypische Unterschiede in der Viabilität der T-Zellen                   | 117        |
| 4.5.2 Untersuchung der T-Zellproliferation                                       | 119        |
| 4.5.3 Zytokinproduktion von polyklonal stimulierten T-Zellen                     | 121        |
| <b>4.6 Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen</b>                          | <b>123</b> |
| 4.6.1 Immunphänotypisierung von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen   | 123        |
| 4.6.2 T-Zellproliferation von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen     | 126        |
| 4.6.3 Zytokinproduktion von CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen       | 128        |



|   |            |
|---|------------|
| <b>4.7 Analysen im experimentellen Tiermodell der Kollagen Antikörper induzierten Arthritis</b>           | <b>134</b> |
| 4.7.1 Krankheitsverlauf von KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA   | 136        |
| 4.7.2 Histopathologische Analysen von KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA                                   | 137        |
| 4.7.3 Immunphänotypisierung von Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen an Tag 9 nach CAIA<br>Induktion    | 138        |
| 4.7.4 Immunphänotypisierung von Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen an Tag 5 nach CAIA<br>Induktion    | 144        |
| 4.7.5 Zytokinproduktion von Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA                              | 149        |
| 4.7.6 Zytokinproduktion von T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA                                | 151        |
| <b>4.8 Analysen im experimentellen Tiermodell des allergischen Asthmas</b>                                | <b>155</b> |
| 4.8.1 Messung der Atemwegshyperreaktivität in KSRP-defizienten Mäusen                                     | 155        |
| 4.8.2 Analyse der Immunzellen in der bronchoalveolären Lavage   | 158        |
| 4.8.3 Histologische Analysen zur Ermittlung des Entzündungsgrades und der Mukusproduktion in<br>der Lunge | 160        |
| <b>5. DISKUSSION</b>  | <b>164</b> |
| <b>5.1 Einfluss von KSRP-KO auf den Krankheitsverlauf von CAIA</b>  | <b>166</b> |
| 5.1.1 Effekt von Lymphozyten auf die Induktion von CAIA   | 170        |
| <b>5.2 Einfluss von KSRP-KO auf die Immunzellen</b>   | <b>172</b> |
| 5.2.1 Viabilität von Immunzellen  | 174        |
| 5.2.2 Migration von Immunzellen   | 176        |
| 5.2.3 Reifungszustand von Immunzellen   | 178        |
| 5.2.3.1 Reifungszustand von Immunzellen nach CAIA-Behandlung  | 179        |
| <b>5.3 Einfluss von KSRP-KO auf das Zytokinmuster</b>   | <b>181</b> |
| 5.3.1 TH <sub>1</sub> -assoziierte Zytokin Produktion   | 182        |
| 5.3.2 TH <sub>2</sub> -assoziierte Zytokin Produktion   | 184        |
| 5.3.3 Weitere Leitzytokine  | 188        |
| <b>5.4 KSRP scheint die TH<sub>2</sub>-Antwort zu limitieren</b>  | <b>190</b> |
| <b>5.5 Einfluss von KSRP-KO auf den Krankheitsverlauf von Asthma bronchiale</b>                           | <b>191</b> |
| <b>6. ZUSAMMENFASSUNG</b>   | <b>195</b> |
| <b>7. ABSTRACT</b>  | <b>197</b> |
| <b>8. ANHANG</b>  | <b>199</b> |

## **Inhaltsverzeichnis**

---

|                                 |            |
|---------------------------------|------------|
| <b>9. DANKSAGUNG</b>            | <b>211</b> |
| <b>10. ERKLÄRUNG</b>            | <b>212</b> |
| <b>11. LITERATURVERZEICHNIS</b> | <b>213</b> |
| <b>12. PUBLIKATIONEN</b>        | <b>231</b> |
| <b>13. LEBENSLAUF</b>           | <b>232</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Abb. 1 Standardmuster für die Ohrloch-Nummerierung von Mäusen .....  | 60 |
| Abb. 2: Versuchsschema zur Induktion von „Langzeit“- CAIA in KSRP <sup>-/-</sup> KO Mäuse .....  | 63 |
| Abb. 3: Versuchsschema zur Induktion von „Kurzzeit“- CAIA in KSRP <sup>-/-</sup> KO Mäuse.....   | 64 |
| Abb. 4: Immunisierungsschema zur Asthma Induktion .....  | 67 |
| Abb. 5: Aerosol-Kammer .....   | 68 |
| Abb. 6: Darstellung von Ganzkörperplethysmographen der Firma BUXCO®.....   | 70 |
| Abb. 7: Darstellung der Plethysmographen der Firma BUXCO®.....   | 72 |
| Abb. 8: Gating-Strategie für durchflusszytometrische Analysen von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen anhand einer Beispielfärbung..... | 77 |
| Abb. 9: Zellfrequenz-Analysen von Knochenmarks-abgeleiteten Vorläuferzellen aus KO und WT Mäusen .....                                       | 79 |
| Abb. 10: Zellfrequenz-Analysen aus Knochenmark differenzierten BM-DCs in WT und KO Mäusen.....   | 80 |
| Abb. 11: Expression von Aktivierungsmarkern auf BM-DC aus KSRP-defizienten und WT Mäusen.....  | 80 |
| Abb. 12: Expression-Analysen von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von BM-DC aus KO und WT-Mäusen.....                                  | 82 |
| Abb. 13: Zellfrequenz- Analysen aus Knochenmark differenzierten BM-Mφ in WT und KO Mäusen.....   | 83 |
| Abb. 14: Expression-Analysen von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von BM-Mφ aus KO und WT-Mäusen.....                                  | 84 |
| Abb. 15: Analyse myeloider Zellen aus PBMC mittels Durchflusszyometrie.....  | 86 |
| Abb. 16: Quantifizierung myeloider Zellen aus PBMC von WT und KO Mäusen.....   | 87 |
| Abb. 17: Quantifizierung von B- und T-Zellen aus PBMC von WT und KO Mäusen.....  | 88 |
| Abb. 18: Bestimmung von B-Zell und DC-Populationen in der murinen Milz .....   | 89 |
| Abb. 19: Quantifizierung Milzzell-Populationen von WT und KO Mäusen .....  | 91 |
| Abb. 20: Repräsentative FACS-Analysen des kostimulatorischen Molekül CD86 auf Milzzellen .....   | 92 |

## **Abbildungsverzeichnis**

---

|  |     |
|--|-----|
| Abb. 21: Analysen zum Reifungszustand von Milzzellen aus WT und KO Mäusen.....   | 93  |
| Abb. 22: Repräsentative FACS-Analysen der Viabilität von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen.....                   | 96  |
| Abb. 23: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen in Knochenmarks-abgeleiteten Vorläuferzellen.....                      | 98  |
| Abb. 24: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen von Milzzellen.....  | 99  |
| Abb. 25: Repräsentative Viabilitätsmessung myeloider Zellen aus dem peripheren Blut ...                                  | 100 |
| Abb. 26: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen von PBMC .....   | 102 |
| Abb. 27: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen von PBMC .....   | 103 |
| Abb. 28: Repräsentative Analysen der Migration neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark .....                       | 105 |
| Abb. 29: Quantitative Analysen der Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark .....                     | 105 |
| Abb. 30: Quantitative Analyse der Migration von BM-M $\phi$ .....  | 106 |
| Abb. 31: Zeitkinetik der Zytokinproduktion von Milzzellen aus KO und WT Mäusen .....                                     | 108 |
| Abb. 32: Zytokinmuster-Analysen von Milzzellen aus KO und WT Mäusen .....  | 111 |
| Abb. 33: Zytokinmuster-Analysen von BM-DC aus KO und WT Mäusen .....   | 112 |
| Abb. 34: Zytokinmuster-Analysen von BM-M $\phi$ KO und WT Mäusen.....  | 113 |
| Abb. 35: Frequenz-Analyse von T-Lymphozyten aus der Milz.....  | 115 |
| Abb. 36: Frequenz-Analyse von aktivierten T-Lymphozyten aus der Milz .....   | 116 |
| Abb. 37: Quantitative Viabilitäts-Analysen von CD3 <sup>+</sup> TZ aus dem peripheren Blut.....                          | 117 |
| Abb. 38: Quantitative Viabilitäts-Analysen von CD3 <sup>+</sup> TC aus der Milz .....                                    | 118 |
| Abb. 39: Proliferation von isolierten T-Zellen aus der Milz von KSRP KO und WT Mäusen nach polyklonaler Stimulation..... | 120 |
| Abb. 40: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen aus KO und WT Mäusen .....  | 122 |
| Abb. 41: Frequenz-Analyse von aktivierten CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz.....                                    | 124 |
| Abb. 42: Frequenz-Analyse von aktivierten CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz.....                                    | 125 |
| Abb. 43: Proliferation von isolierten CD4 <sup>+</sup> und CD8 <sup>+</sup> T-Zellen .....                               | 126 |
| Abb. 44: Zytokinmuster-Analysen von CD8 <sup>+</sup> T-Zellen aus KO und WT Mäusen.....                                  | 128 |

|  |     |
|--|-----|
| Abb. 45: Zytokinmuster-Analysen von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus KO und WT Mäusen.....  | 130 |
| Abb. 46: Zeitkinetik der Zytokinproduktion von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen aus KO und WT Mäusen ....                             | 133 |
| Abb. 47: Darstellung des Arthritis-Index für KO und WT Mäusen .....  | 136 |
| Abb. 48: Histopathologische Darstellung von H&E gefärbten Mausepfoten .....  | 137 |
| Abb. 49: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen Tag 9 nach CAIA Induktion .....                             | 141 |
| Abb. 50: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen an Tag 9 nach CAIA Induktion .....                          | 142 |
| Abb. 51: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen an Tag 5 nach CAIA Induktion .....                          | 145 |
| Abb. 52: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen an Tag 5 nach CAIA Induktion .....                          | 147 |
| Abb. 53: Zytokinmuster-Analysen von APC nach CAIA-Behandlung.....  | 150 |
| Abb. 54: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen nach CAIA-Behandlung.....   | 153 |
| Abb. 55: Analysen der AHR nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen.....                                 | 157 |
| Abb. 56: Analyse der zellulären Infiltration in der BAL nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen .....  | 159 |
| Abb. 57: Bestimmung des Entzündungsgrades in der Lunge nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen.....    | 160 |
| Abb. 58: Bestimmung der Mukusproduktion in der Lunge nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen .....     | 162 |
| Abb. 59: Quantifizierung der Mukusproduktion in der Lunge nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen..... | 163 |
| Abb. 60: Gating-Strategie für durchflusszytometrische Analysen von BM-DC anhand einer Beispielfärbung.....                     | 199 |
| Abb. 61: Zellfrequenz-Analysen aus Knochenmark differenzierten BM-DC und BM-M $\phi$ in KO und WT Mäusen .....                 | 199 |
| Abb. 62: Expression von Aktivierungsmarkern auf BM-M $\phi$ aus KSRP-defizienten und WT Mäusen.....                            | 200 |
| Abb. 63: Repräsentative FACS-Analysen der Viabilität von Milzzellen.....   | 201 |

## **Abbildungsverzeichnis**

---

|   |     |
|---|-----|
| Abb. 64: Gating-Strategie für durchflusszytometrische-Analysen mit Beispielfärbung zur Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf Milzzellen ..... | 202 |
| Abb. 65: Metabolische Aktivitäts-Analysen von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen aus WT und KO Mäusen .....   | 203 |
| Abb. 66: Metabolische Aktivitäts-Analysen von Milzzellen aus WT und KO Mäusen .....   | 204 |
| Abb. 67: Metabolische Aktivitäts-Analysen von BM-M $\phi$ aus WT und KO Mäusen.....   | 205 |
| Abb. 68: Metabolische Aktivitäts-Analysen von BM-DC aus WT und KO Mäusen .....  | 205 |
| Abb. 69: Repräsentative FACS-Analysen der Viabilität von Milzzellen .....   | 206 |
| Abb. 70: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen aus KO und WT Mäusen .....   | 207 |
| Abb. 71: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen nach CAIA Tag 9 .....  | 207 |
| Abb. 72: Analysen zum Reifungszustand aus Milzzellen von WT und KO Mäusen Tag 9 nach CAIA Induktion.....  | 208 |
| Abb. 73: Analysen zum Reifungszustand aus Milzzellen von WT und KO Mäusen Tag 5 nach CAIA Induktion.....  | 209 |
| Abb. 74: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen nach CAIA-Behandlung.....  | 210 |
| Abb. 75: Darstellung des Arthritis-Index für KO und WT Mäusen .....   | 210 |

### Tabellenverzeichnis

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller .....                                   | 23 |
| Tabelle 2: Verwendete Labor- und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller .....              | 28 |
| Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe der Hersteller.....                | 31 |
| Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer .....                           | 34 |
| Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten FACS-Lösungen und -Puffer .....                     | 37 |
| Tabelle 6: Zusammensetzung/Vertrieb von Medien und Supplemente für Zellkulturen .....          | 38 |
| Tabelle 7: Verwendete Kits und deren Hersteller .....  | 40 |
| Tabelle 8: Verwendete Analyse Software und deren Hersteller .....                              | 41 |
| Tabelle 9: Verwendete FACS-Antikörper und deren Hersteller.....                                | 42 |
| Tabelle 10: Verwendete Isotypkontrollantikörper und deren Hersteller.....                      | 44 |
| Tabelle 11: Verwendete Vitalitätsnachweis-Reagenzien und deren Hersteller .....                | 44 |
| Tabelle 12: Verwendete Primer für die PCR und deren Sequenz.....                               | 45 |
| Tabelle 13: Übersicht eines PCR-Ansatzes zur Genotypisierung und Reaktionsbedingungen<br>..... | 61 |
| Tabelle 14: Bestimmung des Arthritisindex .....  | 65 |

## Abkürzungsverzeichnis

---

### Abkürzungsverzeichnis

|            |   |
|------------|---|
| 5'-Cap     | 5'-Kappe  |
| 7-AAD      | 7-Aminoactinomycin  |
| AHR        | Atemwegshyperreaktivität  |
| AK         | Antikörper  |
| Ag         | Antigen   |
| AK         | Antikörper  |
| AMD        | <i>ARE-mediated decay</i> (ARE-vermittelter Abbau)                                      |
| AI         | Arthritisindex  |
| APC        | <i>antigen-presenting cell</i> (Antigen präsentierenden Zellen)                         |
| APC        | Allophycocyanin   |
| APOBEC-1   | <i>ApoB mRNA-editing complex 1</i>  |
| Aqua dest. | Aqua destillat  |
| AR         | Atemwegsreaktivität   |
| ARE        | <i>AU-rich elements</i> (AU reiche Elemente)  |
| AU         | <i>adenylate-uridylate</i>  |
| AUF-1      | <i>ARE/poly(U)-binding factor1</i>  |
| BAL        | Bronchoalveoläre Lavage   |
| BALF       | <i>BAL-Fluid</i>  |
| BM-DC      | <i>bone marrow derived dendritic cells</i>  |
| BZ         | B-Zellen  |
| BZR        | B-Zellrezeptor  |
| BP         | Bindeprotein  |
| CAIA       | Kollagen Antikörper-induzierte Arthritis ( <i>collagen antibody induced arthritis</i> ) |
| CBA        | <i>cytometric bead array</i>  |
| CC         | Chemokin  |



|       |   |
|-------|---|
| CCR2  | Chemokinrezeptor 2  |
| CD3   | <i>cluster of differentiation -3</i>                                |
| CFA   | <i>complete Freund's Adjuvant</i> (komplette Freund-Adjuvans)       |
| CII   | <i>collagen type II</i>   |
| CIA   | Kollagen-induzierte Arthritis ( <i>collagen-induced arthritis</i> ) |
| CIRP  | <i>cold-inducible RNA-binding protein</i>                           |
| CK1   | <i>casein kinase1</i>   |
| cmp   | <i>counts per minute</i>  |
| CSF   | <i>colony-stimulating factor</i> (Koloniestimulierender Faktor)     |
| c-src | <i>cellular-sarcoma</i> (Tyrosinkinase Src)                         |
| ctbp  | <i>c-terminal binding protein</i>                                   |
| CTL   | <i>cytotoxic T lymphocyte</i>                                       |
| Ctrl  | <i>control</i> (Kontrolle)  |
| CXCL1 | <i>chemokine (c-x-c motif) ligand 1</i>                             |
| Cy    | Cytochrom   |
| DAMPS | <i>damage associated molecular patterns</i>                         |
| DC    | <i>dendritic cell</i>   |
| DMEM  | <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>                           |
| DMSO  | Dimethylsulphoxide  |
| DNA   | <i>deoxyribonucleic acid</i>  |
| DPBS  | <i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i>                         |
| DVL   | <i>dishevelled</i>  |
| EAE   | Experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis                         |
| EDTA  | <i>Ethylendiamintetraacetat</i>                                     |
| EMEM  | <i>Eagle's Minimum Essentiell Medium</i>                            |
| FACS  | Durchflusszytometrie ( <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> ) |
| FCR   | <i>fragment crystallisable receptor</i>                             |
| FCS   | fötales Kälberserum   |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|                           |  |
|---------------------------|--|
| FITC                      | Fluoreszein-Isothiozyanat  |
| FSC                       | <i>forward scatter</i>   |
| FSTL1                     | <i>follistatin-like 1</i>  |
| FUSE                      | <i>far upstream sequence element</i>                                   |
| FVD                       | <i>Fixable Viability Dye</i>   |
| GM-CSF                    | <i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>                |
| HBSS                      | <i>hanks' balanced salt solution</i>                                   |
| HDAC                      | <i>histone-deacetylase</i>   |
| HLA                       | <i>human leukocyte antigen</i>   |
| HuR                       | <i>human antigen R</i>   |
| IFN                       | Interferone  |
| Ig                        | Immunoglobulin   |
| iNOS                      | induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthetase                              |
| lncRNAs                   | lange nicht codierende RNAs  |
| IL                        | Interleukin  |
| i.n.                      | intranasal   |
| i.p.                      | intraperitoneal  |
| ISS                       | <i>intronic splicing silencers</i>                                     |
| i.v.                      | intravenös   |
| IMDM                      | <i>Iscove's Modified Dilbecco's Medium</i>                             |
| JAK/STAT                  | <i>Januskinase/ Signal Transducers and Activators of Transcription</i> |
| KC                        | <i>Keratinocyte chemoattractant</i>                                    |
| KO                        | <i>knockout</i>  |
| KSRP                      | <i>KH-type splicing regulatory protein</i>                             |
| KSRP <sup>-/-</sup> -Maus | Mausstamm mit homozygot inaktivierten KSRP-Gen                         |
| KSRP <sup>+/-</sup> -Maus | Mausstamm mit heterozygot inaktivierten KSRP-Gen                       |
| LPS                       | Lipopolysaccharid  |
| LRP5/LRP6                 | <i>low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6</i>           |

|                |   |
|----------------|---|
| Ly6G           | <i>Lymphocyte antigen 6 complex locus G6D</i>                       |
| MAPK           | mitogenaktivierte Proteinkinase                                     |
| MCP-1          | <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>                               |
| mDCs           | myeloide dendritische Zellen  |
| MDSC           | <i>myeloid-derived suppressor cells</i>                             |
| MHC            | <i>major histocompatibility complex</i>                             |
| MCh            | Methacholin   |
| miRNAs         | <i>micro RNAs</i>   |
| mRNA           | <i>messenger RNA</i>  |
| MFI            | <i>mean fluorescence intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität) |
| MLR            | <i>mixed lymphocyte reaction</i>                                    |
| MTT            | 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid          |
| NF- $\kappa$ B | <i>nuclear factor kappaB</i>  |
| NK             | <i>natural killer cells</i> (natürliche Killerzellen)               |
| OVA            | Ovalbumin   |
| PABP           | <i>poly(A)-binding protein</i>                                      |
| PAMPS          | <i>pathogen associated molecular patterns</i>                       |
| PAS            | <i>Periodic acid–Schiff reaction</i>                                |
| PBMC           | <i>peripheral blood mononuclear cells</i>                           |
| PCP            | planare Zellpolarität   |
| PCR            | <i>polymerase chain reaction</i>                                    |
| pDCs           | plasmazytoide dendritische Zellen                                   |
| PE             | Phycoerythrin   |
| PE-Cy5/Cy7     | PE-Cychrom5/Cychrom7  |
| Penh           | enhanced pause; dimensionsloser Wert der Atemfunktion               |
| PG             | Prostaglandinen   |
| PGIA           | Proteoglykan-induzierten Arthritis                                  |
| Prä-mRNA       | <i>precursor messenger ribonucleic acid</i>                         |

## Abkürzungsverzeichnis

---

|          |                                     |
|----------|-------------------------------------|
| PRR      | <i>pattern recognition receptor</i> |
| PerCP    | Peridinin Chlorophyll Protein       |
| PS       | Phosphatidylserin                   |
| RA       | rheumatoide Arthritis               |
| RI       | <i>resistance index</i>             |
| RIP      | RNA Immunpräzipitation              |
| RNA      | <i>ribonucleic acid</i>             |
| RNA-BP   | RNA-Bindeprotein                    |
| ROS      | <i>reactive, oxygen species</i>     |
| RT       | Raumtemperatur                      |
| SNAP     | S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine |
| s.c.     | subkutan                            |
| shRNA    | <i>small hairpin RNA</i>            |
| SLE      | systematischer Lupus Erythematoses  |
| s.o.     | siehe oben                          |
| SSC      | <i>side scatter</i>                 |
| TCF      | <i>t-cell-factor</i>                |
| TCR      | <i>t cell receptor</i>              |
| TGF      | <i>transforming growth factor</i>   |
| TH1      | T-Helferzellen vom Typ1             |
| TH2      | T-Helferzellen vom Typ2             |
| TNFR2    | Tumor Nekrose Faktor-Rezeptor2      |
| TL       | terminaler loop                     |
| TLR      | <i>toll-like receptor</i>           |
| TTP      | Tristetraprolin                     |
| T-Zellen | T-Lymphozyt                         |
| TZ       | <i>t cell (T-Zelle)</i>             |
| USE      | <i>upstream sequence element</i>    |

## **Abkürzungsverzeichnis**

---

|      |   |
|------|---|
| UTRs | <i>untranslated region</i> (untranslatierte Regionen) |
| WT   | <i>wildtype</i> (Wildtyp)                             |

### 1. Einleitung

#### 1.1 Die Regulation der Genexpression

Der menschliche Körper besitzt über hundert Billionen Zellen mit ca. 270 verschiedenen Zelltypen, die alle ihr eigenes Expressionsmuster aufweisen. Daher ist eine regulierte Expression von Genen entscheidend für die spezifische Zelldifferenzierung und wird schon früh in der Entwicklung angelegt. Darüber hinaus muss die Zelle auch auf wechselnde Umweltbedingungen reagieren können und ihre Genexpression entsprechend anpassen. Vor allem die Zellen des Immunsystems sind darauf angewiesen, schnell auf pathogene Signale reagieren zu können [1, 2]. Eine Dysregulation der Genexpression kann unter anderem zur Entwicklung verschiedener Erkrankungen (Bsp. Autoimmunerkrankung) führen [3-5]. Daher gibt es verschiedene Regulationsmechanismen, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten in die Prozesse der Proteinbiosynthese eingreifen können.

Welcher DNA-Bereich transkribiert werden soll, ist zunächst abhängig von der Chromatinstruktur. Daher kann die Transkriptionsmaschinerie nur an entsprechende DNA-Abschnitte binden, die nicht in Histonkomplexe verpackt sind [6, 7]. Kommt es zur Initiation der Transkription, so wird diese durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren weiter beeinflusst. Die Transkriptionsfaktoren binden an die Promotor-Region des entsprechenden Gens und bilden zusammen mit der RNA-Polymerase II einen Präinitiationskomplex [8], der abhängig von weiteren Sequenzen (*Enhancer* oder *Silencer*-Region) sich positiv oder negativ auf die Regulation des Gens auswirkt. Während der Transkription wird die Erbinformation der chromosomalen DNA in eine *messenger* RNA (mRNA) umgeschrieben, die dabei entstehende prä-mRNA durchläuft weitere regulatorische Reifungsprozesse (Prozessierung) bevor sie als reife mRNA in das Zytoplasma transportiert und dort zu einem Protein translatiert wird [9, 10]. Das Entfernen von Introns in der prä-mRNA und das Zusammenführen der verbleibenden Exons in der mRNA wird als Spleißen (*splicing*) bezeichnet. Dabei können, wenn die Zahl der fusionierten Exons variiert wird (alternatives Splicen), unterschiedlich funktionelle mRNA-Moleküle aus der gleichen prä-mRNA entstehen [11]. Zur Stabilisierung des

mRNA-Moleküls und der anschließenden Ausschleusung in das Zytoplasma wird eine 7-Methyl-Guanosin-Kappe an das 5'-Ende (*5'-cap*) des ersten Exons sowie eine Polyadenylierung (Poly-A-Schwanz) an das 3'-Ende der mRNA angefügt [12]. Das nun prozessierte mRNA-Molekül bestehend aus einem Protein-kodierenden Bereich, welcher von zwei untranslatierten Regionen (UTRs) flankiert wird, wird nach dem Transport ins Zytoplasma für die Initiation der Translation zur Verfügung gestellt. Diese 5'- und 3'-UTRs sind am Transport der mRNA aus dem Zellkern, an der Regulation der mRNA Stabilität sowie der Translation maßgeblich beteiligt [13, 14].

### 1.2 Das '*KH-type splicing regulatory protein*' KSRP

Das *KH-type splicing regulatory protein* KSRP wurde erstmals 1997 von Min *et al.* als eine Komponente eines Multiprotein-Komplex beschrieben, dessen Funktion das alternative Spleißen (*Splicing*) der prä-mRNA des c-src Gens reguliert [15]. Die Interaktion von KSRP findet dabei am *intronic splicing silencers* (ISS) des c-src Gen statt. Diese prä-mRNA *Splicing* Funktion ist ein wichtiger Kontrollpunkt in der Regulation der Genexpression [16-18]. KSRP wird in nahezu allen Zellarten exprimiert und ist dort vorrangig im Nukleus lokalisiert [19].

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass KSRP an verschiedenen transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulationen der Genexpression beteiligt ist. So erhöht KSRP bspw. die Transkription des c-myc Gens durch die Interaktion mit der *far upstream sequence element* (FUSE)-Sequenz im Promotor des c-myc Gens [20]. Daher zählt KSRP als FU-BP2 zu den Mitgliedern der (FUSE)-BP Familie, die bestehend aus drei Mitgliedern FU-BP1, FU-BP2 und FU-BP3 die Expression des c-myc Protoonkogens regulieren. Des Weiteren hemmt KSRP, durch die Bindung an die „USE“-Sequenz (*upstream sequence element*) der Prothrombin-RNA, die Prozessierung des 3'-Endes der Prothrombin-RNA und damit die Prothrombin-Expression [21]. Darüber hinaus ist KSRP als eine wichtige Komponente des *ApoB mRNA-editing complex* (APO-BEC-1) zentral am „*editing*“ der apo-mRNA beteiligt [22]. Des Weiteren verstärkt KSRP die Biogenese der miRNA-155, indem es an den terminalen „loop“ (TL) der primären-miRNA bindet und deren Reifung durch die Rekrutierung der Enzyme Drosha und

## Einleitung

---

Dicer begünstigt [23]. MiRNAs sind nicht kodierende, kurze regulatorische RNAs, die auf post-transkriptioneller Ebene die Expression ihrer Ziel-mRNAs kontrollieren. Es ist bekannt, dass die miRNAs durch die Regulation der mRNA-Translation und Stabilität im Zytoplasma Genexpressionen beeinflussen [24]. Die miRNA-155 scheint ein wichtiger Regulator während der Immunzellentwicklung zu sein. Weiterhin scheint eine erhöhte Expression der miRNA-155 die Entstehung sowie die Progression der rheumatoiden Arthritis zu begünstigen [25]. Chou *et al.* konnten zeigen, dass die Abwesenheit von KSRP zu einer reduzierten miRNA-150-Expression führt, wodurch es zu einer Erhöhung von braunen Fettzellen im weißen Fettgewebe kommt [26]. In seinen Untersuchungen wiesen KSRP-defiziente Mäuse im Vergleich zu Kontroll-Mäusen eine deutlich reduzierte Adipositas auf. Auch Lin *et al.* zeigten, dass in KSRP-defizienten Mäusen gegenüber den Kontroll-Mäusen ein höherer Fettabbau stattfindet. So konnte in seiner Arbeit demonstriert werden, dass KSRP die Biogenese der miR-145 beeinflusst, die in diesem Zusammenhang als negativer Regulator des Fettabbaus im weißen Fettgewebe betrachtet wird [27]. Damit scheint KSRP auch ein kritischer Faktor für die Fettstoffwechsel-Balance der Energiespeicherung und des Energieverbrauchs im weißen Fettgewebe zu sein. Eine andere Publikation beschreibt, dass KSRP durch die Interaktion mit langen nicht codierenden RNAs (lncRNAs) an der Kontrolle der Genexpression beteiligt ist. So bindet KSRP am Anfang der Myogenese direkt an die lncRNA H19 in undifferenzierten C2C12 Zellen und vermittelt dadurch die Destabilisierung der Myogenin-mRNA [28].

KSRP ist somit ein multifunktionelle, an Nukleinsäure bindendes Protein mit diversen Funktionen in der Regulation von mRNAs und miRNAs [29-31].

### 1.2.1 Einfluss von KSRP auf die mRNA Stabilität/posttranskriptionelle Mechanismen

Eine zentrale Rolle übernimmt KSRP in der Regulation der mRNA-Stabilität und Translatierbarkeit. Durch die Bindung an die „AU-rich elements“ ARE-Sequenzen in der 3'UTR von mRNAs und die Rekrutierung von mRNA-abbauenden Enzymen (Degr-



dationsapparaten), konnte die RNA-destabilisierende Beteiligung von KSRP nachgewiesen werden [32, 33]. KSRP ist ein 75 kDa großes Protein, das vier bindende Regionen aus K-homologen Motiven (KH) aufweist. Die KH3- und KH4-Domänen sind dabei essentiell für die Bindung von KSRP an die mRNA und können auch unabhängig voneinander agieren [34]. Alternativ kann KSRP durch die Bindung an seine Ziel-mRNA zu einer Deadenylierung des Poly-A-Schwanzes führen und allgemein die Translationsrate verringern [35]. Schwerpunkt dieser Arbeit ist den Einfluss von KSRP auf die Immunzellfunktionen und in der Pathogenese von Erkrankungen zu analysieren.

### 1.2.2 RNA-BP und Immunzellfunktionen

Während der Transkription können RNA-Bindeproteine neben der Deadenylierung des Poly-A-Schwanzes auch den Abbau der 5'(7-Methyl-guanosin-)Klappe begünstigen und damit den mRNA-Abbau von Zytokinen (s. Kapitel 1.3.2) beschleunigen [36]. Weitere RNA-BP rekrutieren das Exosom, ein Proteinkomplex der mit seiner Ribonuklease-Aktivität zur Spaltung von Ribonukleinsäuren führt [34].

Darüber hinaus beeinflussen die RNA-BP auch auf posttranskriptioneller Ebene die Regulation von Zytokinen durch die Kontrolle des Kernexports, der Translationsinitialisierung und des mRNA-Abbaus [37]. Da die Zytokine wiederum die Funktion von Immunzellen steuern können, werden auch diese Zellen von den RNA-BP beeinflusst. Die posttranskriptionellen Kontrollmechanismen zielen vor allem auf die Cluster von Adenin- und Uridin-reichen Sequenzen (*AU-rich elements*, AREs) in der 3'UTR von ihren Ziel-mRNAs. Weiterhin interagieren neben RNA-BP auch microRNAs (miRNAs) mit ARE in diesen UTRs und tragen damit zur posttranskriptionellen Regulation der Genexpression bei [38, 39].

Während bspw. TTP (Tristetraprolin), AUF-1 (*ARE/poly(U)-binding factor1*) und KSRP (*KH-type splicing regulatory protein*) zu den destabilisierenden RNA-BP zählen und

## Einleitung

---

die Expression ihrer Ziel-Gene verringern [40-42], üben HuR und PABP (*poly(A)-binding protein*) überwiegend stabilisierende Funktionen auf ihre Ziel-mRNAs aus und erhöhen damit die Expression der Ziel-Gene [43, 44].

Unter anderem wird KSRP als zentraler Modulator des ARE-abhängigen mRNA-Abbaus (AMD) von pro-inflammatorischen Proteinen wie z.B. IL-6, IL-8, iNOS, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  und IFN- $\beta$  beschrieben [35, 45-50]. Diese löslichen Mediatoren beeinflussen Immunzellen in ihrer Aktivität und sind daher in der Lage die resultierende Immunantwort zu modulieren. Tatsächlich besitzen die meisten pro-inflammatorischen Mediatoren (Zytokine und Chemokine) ARE-Regionen, was die wichtige Funktion der posttranskriptionellen Genregulation während der Immunantwort verdeutlicht [37, 51]. *In vitro* stabilisiert das RNA-BP HuR beispielsweise die GATA-3 mRNA was vor allem in einer erhöhten Expression des Transkriptionsfaktor GATA-3 und der TH<sub>2</sub>-asoziiertes (T-Helferzelle 2) (s. Kapitel. 1.4.2) Zytokine wie IL-4 und IL-13 resultiert [52-54]. In diesem Fall spricht man von einer positiven Regulation durch das RNA-BP.

Interessanter- und paradoxerweise konnte jedoch in einem konditionellen *knockout* (KO)-Modell für das RNA-BP HuR in CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine erhöhte Zytokinproduktion an IL-2, IL-4 und IL-13 nachgewiesen werden [55]. In diesem Zusammenhang wurde in einer TH<sub>2</sub>-vermittelten Erkrankung (allergisches Asthma, s. K. 1.6.2) versucht, die TH<sub>2</sub> polarisierende Eigenschaft von HuR in der Pathogenese *in vivo* (im Gesamtorganismus) zu charakterisieren. Die HuR-defizienten Mäuse zeigten gegenüber Kontrollmäusen eine vergleichbare Krankheitssymptomatik, was in Kontrast zu dem erhöhten Anstieg von TH<sub>2</sub>-vermittelten Zytokinen steht, die in diesen Tieren detektiert wurden. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass *in vivo* komplexe Regulationsmechanismen greifen. Zhou *et al.* konnte in seiner Publikation die Beteiligung von RNA-BP mit der Entstehung neurogenen Erkrankungen in Verbindung bringen [56]. Der bedeutende Einfluss von RNA-BP für Entzündungsprozesse konnte bereits in verschiedenen Tiermodellen gezeigt werden. So entwickeln z.B. TTP-defiziente Mäuse eine massive Überexpression von pro-inflammatorischen löslichen Mediatoren (Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)), welche den Reifungszustand von dendritischen Zellen moduliert, was in einem chronisch-entzündlichen Phänotyp resultiert [57-60]. Auch der AUF-1 Knockout äußert sich in einer erhöhten pro-inflammatorischen Zytokin-Expression [61]. In einer anderen Publikation

konnte gezeigt werden, dass AUF-1 die IL-10 Expression in LPS-induzierten Monozyten moduliert und somit das angeborene Immunsystem beeinflussen kann [62]. Ein weiteres relativ unbekanntes temperaturabhängiges RNA-BP das CIRP (*cold-inducible RNA-binding protein*) [63], reguliert unter anderem die Expression von TNF- $\alpha$  in Makrophagen und beeinflusst damit hämorrhagischen Schock und Sepsis [64]. So konnte auch schon in isolierten Astrozyten aus KSRP-defizienten Mäusen, eine erhöhte Expression von pro-inflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  gezeigt werden [47]. Weitere Hinweise, dass KSRP in der Pathogenese von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle spielen kann, wurden in einem Tiermodell der multiplen Sklerose (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, EAE) dargestellt. Die KSRP-defizienten Mäuse exprimieren höhere Mengen an IFN- $\alpha$  und - $\beta$ , was zu einer Verringerung der Krankheitssymptomatik führt. Diese Überexpression an Interferonen schützt die KSRP-defizienten Mäuse auch besser gegen Virus-Infektionen [49, 50]. Somit scheint KSRP eine zentrale Funktion bei der Regulation der Expression von pro-inflammatorischen Genen einzunehmen. Hinsichtlich der Bedeutung von KSRP in der Pathogenese chronisch-inflammatorischer Erkrankungen *in vivo* ist aktuell nicht viel bekannt und soll in dieser Arbeit vertiefend untersucht werden.

### 1.3 Immunzellen

Alle Zellen des Immunsystems entstehen aus den pluripotenten Stammzellen des Knochenmarks [65-67]. Von ihrem Entstehungsort gelangen sie über das Blut und das lymphatische Gefäßsystem in alle Gewebe des Körpers, sind jedoch überwiegend in den primären und sekundären lymphatischen Organen lokalisiert. Immunzellen sind für die Abwehr gegen eine Vielzahl von pathogenen Erregern wie Viren, Bakterien und Pilzen verantwortlich, ebenso schützen sie den Organismus gegen entartete körpereigene Zellen (Tumorzellen), aber auch gegen Fremdstoffe. Grundlage für diesen Schutz ist die Fähigkeit, durch allgemeine und spezifische Erkennungsmechanismen zwischen eigenen und körperfremden molekularen Mustern unterscheiden zu können [68]. Die zellulären und humoralen Mechanismen, die von den Immunzellen eingeleitet

## Einleitung

---

werden, werden als Immunantwort bezeichnet. Abhängig von der Art der unspezifischen oder spezifischen Reaktion lassen sich die Immunzellen unter angeborenen bzw. erworbener Immunität klassifizieren [69].

Wie bereits erwähnt, sind diverse RNA-BP in der Regulation von immunmodulierenden Zytokinen (s. Kapitel 1.3.2), die von Immunzellen produziert werden, beteiligt (s. Kapitel 1.2.2). Während eines pro-inflammatorischen Prozesses liegt eine Vielzahl von entzündlichen Mediatoren vor, deren Anwesenheit Eigengewebe zerstören und transformieren kann. Daher ist es wichtig, schnellstmöglich nach Beseitigung des Erregers die gesteigerten pro-inflammatorischen Mediatoren zu limitieren. Der Abbau der entstehenden Mediator-mRNA scheint eine der effizientesten Varianten zu sein, um die Immunantwort auszubremsen [70].

### 1.3.1 Antigen präsentierende Zellen

Für die Aufrechterhaltung von Immunhomöostase kontrollieren Antigen präsentierende Zellen (APC) das Gleichgewicht zwischen Toleranz und Immunität. Professionelle APC wie z.B. Makrophagen, dendritische Zellen (DC) und B-Lymphozyten (BC) sind dabei von entscheidender Bedeutung für die Erkennung eines eindringenden Erregers und der Präsentation von Antigenen an die T-Lymphozyten (TC). Essentiell für die Erkennung körperfremder Muster sind PRR (*pattern recognition receptors*). Diese Mustererkennungsrezeptoren erkennen pathogen-assoziierte molekulare Muster, sogenannte PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) oder DAMPs (*damage associated molecular patterns*) [71]. Zu diesen gehören unter anderem Lipopolysaccharide (LPS) oder DNA/RNA von Bakterien bzw. Viren.

#### 1.3.1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen kommen fast überall im Körper vor, unter anderem in Herz, Niere, Darm, Epidermis, Dermis, Blut und dem afferenten Lymphsystem. Im aktivierten Zustand bilden sie „bäumchenartige“ Zytoplasmaausläufer und wurden daher nach ihrem

morphologischen Erscheinungsbild benannt (dendriticus =verzweigt). Zu den zwei bekanntesten DC Subpopulationen zählen myeloide DC, die morphologisch dem Monozyten ähneln und die plasmazytoiden DC, die Ähnlichkeit mit den B-Plasmazellen aufweisen [72]. Im Vergleich zu reifen DC besitzen unreife DC wenig Dendriten, zeigen eine starke Endozytoseaktivität und weisen eine geringe Migration auf. Erkennt eine unreife DC ein pathogen-abgeleitetes oder endogenes Gefahrensignal, kommt es zu phänotypischen und funktionalen Veränderungen, bei denen es zu einer Reduktion der Antigenaufnahme und dafür vermehrter Antigen-Präsentation und zur gerichteten Migration zu lymphatischem Gewebe kommt [73]. Neben einer gesteigerten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie z.B. CD40, CD80, CD86 und MHC-Molekülen sowie von Adhäsionsmolekülen kommt es auch zur vermehrten Sekretion proinflammatorischer Mediatoren wie IL-12 und TNF- $\alpha$ . Mit der Hilfe dieser Moleküle wird die Anlockung, Aktivierung und Polarisierung von T-Lymphozyten gewährleistet [74]. Abhängig von der Art der Antigenaufnahme werden den naiven T-Zellen die prozessierten Antigene entweder über MHCI oder MHCII-Moleküle (*major histocompatibility complex*) präsentiert. DC werden als Bindeglied zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort angesehen, da sie sowohl als Wächterzellen agieren, als auch im aktivierten Zustand zu den potentesten antigenpräsentierenden Zellen zählen, mit der größten T-Zell-stimulatorischen Kapazität [75].

### 1.3.1.2 Makrophagen

Makrophagen sind in der Lage Zellschrott über Phagozytose zu beseitigen, ebenso effektiv ist ihre Phagozytosefähigkeit gegenüber pathogenen Keimen und Mikroorganismen. Nach erfolgreichem Verdau werden die pathogenen Bestandteile als Antigene auf der Oberfläche von Makrophagen den T-Lymphozyten präsentiert.

Mit Hilfe der Chemotaxis gelangen Makrophagen zum Entzündungsherd, wo vor allem die Aufrechterhaltung einer bereits angelaufenen Immunreaktion unterstützt wird. Makrophagen stehen unter starkem Einfluss des exogenen Zytokinmilieus, so reagieren sie auf angeborene und antigenspezifische Immunstimulationen mit vorübergehenden und auch längerfristigen Veränderungen in ihrer Physiologie [76]. So kann z.B.

## Einleitung

---

IFN- $\gamma$ , das sowohl von angeborenen Immunzellen (NK) aber auch von antigenspezifischen wie den T-Helferzellen vom Typ 1 (TH<sub>1</sub>-Zellen) (s. Kapitel 1.4.2) sezerniert wird, Makrophagen aktivieren. Diese „klassisch“ aktivierten M1-Makrophagen besitzen pro-inflammatorische Eigenschaften und produzieren bspw. iNOS (induzierte Stickstoffmonoxid-Synthase) um Pathogene zu eliminieren. Sie verstärken die Immunantwort durch Sezernierung weiterer pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12 und TNF- $\alpha$  [77].

Befinden sich die Makrophagen in einem TH<sub>2</sub>-dominierendem Milieu, umgeben von IL-4, IL-5, IL-13 und IL-10, so kommt es zur Inhibierung der klassischen M1-Aktivierung und zur Entwicklung der M2-Makrophagen [78]. Dieser M2-Subtyp hat anti-inflammatorische Eigenschaften und ist unter anderem an der Gewebeheilung beteiligt. Auch basophile Granulozyten und Mastzellen sind in der Lage die Differenzierung zu M2-Makrophagen zu begünstigen. Durch Produktion von anti-inflammatorischen Mediatoren wie IL-10 und *transforming growth factor- $\beta$*  (TGF- $\beta$ ) nimmt der M2-Makrophage eine wichtige Rolle beim Abklingen einer Entzündung ein. Somit unterscheiden sich M1- und M2-Makrophagen nicht nur funktionell voneinander, sondern auch phänotypisch in der Expression von Rezeptoren und Mediatoren [79].

### 1.3.1.3 B-Zellen

Die naiven B-Lymphozyten (B-Zellen) zirkulieren überwiegend zwischen dem peripheren Blut und den sekundären lymphatischen Organen. Neben den T-Lymphozyten, sind die B-Zellen für die adaptive Immunantwort von essentieller Bedeutung, da sie durch Antikörperproduktion für die spezifische humorale Immunantwort verantwortlich sind, wohingegen T-Zellen primär die zelluläre Immunantwort regulieren [80]. Trifft die B-Zelle auf ein passendes Antigen, so erfolgt die Antigenbindung über den membrangebundenen B-Zellrezeptor (BZR). Dies ermöglicht die Endozytose mit anschließender Prozessierung und Präsentation der Peptidfragmente über den MHC-II-Komplex. Die Aktivierung der B-Zelle wird durch zelluläre und lösliche Einflussfaktoren reguliert und kann T-Zell-abhängig oder -unabhängig erfolgen [81, 82]. Im Fall einer T-Zell-abhängigen Aktivierung kann die B-Zelle wiederum Einfluss auf die Differenzierung der T-Zellen nehmen. Die Proliferation und Differenzierung der aktivierten B-Zellen findet in

den Keimzentren von Milz und Lymphknoten statt [83]. Dort entwickeln sich die B-Zellen zu unterschiedlichen Subpopulationen, unter anderem zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen oder langlebigen Gedächtnis-B-Zellen. Die Antikörper-sekretierenden Plasmazellen können nach Ausdifferenzierung verschiedene Immunglobulin-Klassen produzieren, die in unterschiedlichen Regionen des Körpers die zelluläre Immunabwehr unterstützen. Neben Opsonisierung von Bakterien für die Phagozytose, neutralisieren die von B-Zellen produzierten Antikörper Toxine, vermitteln zelluläre Zytotoxizität und aktivieren das Komplementsystem [84]. Dabei unterscheidet man zwischen vier wichtigen Antikörper-Isotypen Immunglobulin M (IgM), IgE, IgG und IgA. Neben der Beteiligung der Aktivierungsfaktoren und dem Ig-Klassenwechsel, entscheiden auch die sezernierten Zytokine über die funktionelle Rolle der B-Zelle [85]. So existieren B-Zellen, die hohe Mengen an IL-10 und geringere Mengen an IFN- $\gamma$  produzieren [86] und als regulatorische B-Zellen bezeichnet werden.

### 1.3.2 Zytokine

Zytokine sind niedermolekulare Botenstoffe, die vor allem von Immunzellen sezerniert werden um durch pleiotrope oder redundante Effekte unter anderem die Stimulation der Proliferation und Differenzierung von verschiedenen Immunzellen zu beeinflussen. Darüber hinaus können Zytokine autokin, parakrin und endokrin wirken. Sie binden an Oberflächenrezeptoren von Immunzellen, wodurch intrazelluläre Signalkaskaden (z.B. JAK/STAT-Signalweg) aktiviert werden, die eine Änderung der Genexpression verursachen. Das bereits mehrfach erwähnte regulatorische anti-inflammatorische Interleukin 10 (IL-10) wirkt immunsuppressiv, indem es Entzündungsreaktionen unterdrückt [87]. IL-10 ist in der Lage, die Produktion von IL-8 und Chemokinen zu reduzieren, ebenso kommt es in Anwesenheit von IL-10 zur Verringerung der Expression des MHCII-Komplexes und den Adhäsionsmolekülen zwischen den Effektorzellen. Vor allem für stimulierte Monozyten und Makrophagen konnte gezeigt werden, dass IL-10 die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$  reduziert [88]. Bei T-Lymphozyten wird durch IL-10 die TH<sub>1</sub>-Immunantwort unterdrückt und die TH<sub>2</sub>-Antwort begünstigt.

## **Einleitung**

---

TNF- $\alpha$  ist dagegen ein potentes pro-inflammatorisches Zytokin, welches eine zentrale Rolle in der Pathogenese von chronischen-entzündlichen Erkrankungen einnimmt, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis (RA) [89, 90]. Darüber hinaus ist es auch an immunsuppressiven Effekten beteiligt und reguliert unter anderem Apoptose und Zelldifferenzierung [91]. Aktivierte Monozyten und Makrophagen sind neben den Mastzellen und Lymphozyten die wichtigsten Produzenten dieses Zytokins [92]. Diese Zellen lassen sich wiederum selbst durch TNF- $\alpha$  stimulieren und vermitteln parakrin die Expression zahlreicher Zytokine wie IL-1, IL-6, IL-8, IFN- $\gamma$  und Akut-Phase-Proteine, sowie Prostaglandinen (PG) [93, 94]. Diese Zytokine beeinflussen wiederum den Immunphänotyp von Zellen und werden durch RNA-BP reguliert [95, 96].

### **1.3.3 T-Lymphozyten**

Während eines immunologisch entzündlichen Prozesses werden, ausgehend von den APC, die T-Lymphozyten angesteuert. Entzündliche Mediatoren, wie TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  induzieren vor allem pro-inflammatorische T-Zell-Subpopulationen wie TH<sub>1</sub> und TH<sub>17</sub>, die den weiteren Entzündungsverlauf verstärken. Sobald der Initiator der pro-inflammatorischen T-Zell-Antwort beseitigt wurde, wird eine alternativ polarisierende Reaktion eingeleitet, die unterstützend durch die TH<sub>2</sub>-Antworten die pro-inflammatorische Aktivität unterdrückt und die Gewebegeneration unterstützt [76]. Dabei nehmen immunmodulierende Zytokine wie IL-10, TGF- $\beta$  oder TH<sub>2</sub> vermitteltes IL-4 eine zentrale Rolle ein [70].

T-Zellen reifen und entwickeln ihren antigenspezifischen T-Zellrezeptor (TCR) im Thymus und bilden zusätzlich den CD3-Rezeptor aus. Abhängig von den weiterhin von den Zellen exprimierten Oberflächenmolekülen, werden die T-Zellen in CD4<sup>+</sup> bzw. in CD8<sup>+</sup> T-Zellen eingeteilt. Während CD8<sup>+</sup> T-Zellen (zytotoxischen T-Zellen, CTL) mit lysierenden Substanzen die Apoptose bei ihren Zielzellen initiieren, sind CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der Lage sich zu unterschiedlichen Effektorzellen zu differenzieren wie T-Helferzellen (T<sub>H</sub>) oder auch regulatorische T-Zellen (T<sub>reg</sub>), die wiederum weitere Immunzellen (z.B. Makrophagen und B-Zellen) mobilisieren und aktivieren können [97]. Damit naive



T-Zellen aktiviert werden können und über eine klonale Expansion die Differenzierung zur T-Effektorzellen induzieren, müssen sie durch APCs mit dem pathogen-spezifischen Antigen in Kontakt getreten sein. Zusätzlich wird für die Aktivierung ein weiteres, das so genannte kostimulatorische Signal benötigt. Dieses wird von kostimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD80/CD86, die von reifen APCs auf ihrer Oberfläche exprimiert werden, vermittelt. Die Erkennung der Antigene erfolgt bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen über den MHCI- und bei CD4<sup>+</sup> T-Zellen über den MHCII-Komplex. Diese CD4- bzw. CD8-Moleküle fungieren als Korezeptoren und stabilisieren die Bindung zwischen T-Zell-Rezeptor (TCR) und dem MHC-Komplex. CD8<sup>+</sup> T-Zellen sind auf die Bekämpfung intrazellulärer Krankheitserregern wie Viren und Bakterien oder malignen Zellen spezialisiert. Dabei sezernieren sie bevorzugt IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Grundsätzlich produzieren alle aktivierten T-Zellen IL-2, das als autokriner Zellwachstumsfaktor die Proliferation und die Differenzierung der T-Zelle verstärkt [96, 98].

Die CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich in weitere unterschiedliche Subpopulationen einteilen, die sich hinsichtlich ihres Phänotyps und ihrer Funktionen unterscheiden. Abhängig von den äußeren Faktoren in der Umgebung, vor allem durch das Zytokinmilieu können unterschiedliche Transkriptionsfaktoren in den naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen aktiviert werden, die für die Zelldifferenzierung von den T-Zellsubpopulationen verantwortlich sind [99]. Zu den Hauptgruppen der T-Zellsubpopulationen zählen die klassischen TH<sub>1</sub>, TH<sub>2</sub> und TH<sub>17</sub>, sowie die TH<sub>9</sub> und die T<sub>regs</sub>. Die Anwesenheit von IL-12 und IFN- $\gamma$  begünstigt die Differenzierung der naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen in TH<sub>1</sub> Zellen, die wiederum in der Lage sind zytotoxische T-Zellen und Makrophagen zu aktivieren [100, 101]. Ist die naive T-Zelle umgeben von hohen Mengen IL-4, so beeinflusst das Zytokin die TH<sub>2</sub>-Differenzierung. Während TH<sub>1</sub>-Zellen IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sezernieren, produzieren die TH<sub>2</sub> Zellen überwiegend IL-4, IL-5, IL-13, und IL-10 und beeinflussen damit die Antikörperproduktion in B-Zellen, die Aktivierung von eosinophilen Granulozyten und inhibieren verschiedene Funktionen von Makrophagen [102]. Darüber hinaus beeinflusst die Anwesenheit von IL-4 und TGF- $\beta$  die naiven T-Zellen zur TH<sub>9</sub>-Differenzierung. TH<sub>9</sub> Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie IL-9 exprimieren, das diverse pleiotrope Funktionen aufweist [103]. In Anwesenheit von pro-inflammatorischen Zytokinen wie IL-6 entwickeln sich naive T-Zellen zu TH<sub>17</sub> Zellen, die ebenfalls neben IL-17 auch IL-21 und IL-22 sezernieren. TH<sub>17</sub> Zellen sind außer an der Entstehung von autoimmunen Erkrankungen auch an Immunreaktionen gegen extrazelluläre Bakterien und Pilzen

involviert [104]. Als eine besonders wichtige Subpopulation benötigen T<sub>reg</sub> Zellen zur Differenzierung die Beteiligung von TGF- $\beta$  und sind wichtig für das Gleichgewicht der immunologischen Toleranz, sowie für die Suppression von pro-inflammatorischen Immunantworten. Das dabei sezernierte anti-inflammatorische Zytokin IL-10 übernimmt dabei die wichtigste Hauptfunktion. Ein weiteres wichtiges Prinzip der Immunregulation ist die gegenseitige Beeinflussung durch Zytokine, so sind z.B. die TH<sub>2</sub> Zellen die direkten Gegenspieler von TH<sub>1</sub> Zellen [105, 106]. Diese Vorgänge verdeutlichen, dass die T-Zellen auf die löslichen Mediatoren angewiesen sind und dass die Expression dieser Zytokine als Ziel-Molekül unter Kontrolle von RNA-BP stehen.

### 1.3.4 Neutrophile Granulozyten

Die neutrophilen Granulozyten entstehen im Knochenmark aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen, die unter dem Einfluss von CSF über Zwischenstadien der Progenitorzellen und Myeloblasten zu Granulozyten differenzieren. Abhängig von deren Morphologie, werden diese in eosinophile, basophile und neutrophile Granulozyten eingeteilt. Die neutrophilen Granulozyten besitzen segmentierte Nuklei und verschiedene zytoplasmatische Granula, die antimikrobielle Peptide und Enzyme enthalten, welche essentiell für die Beseitigung von Pathogenen genutzt werden [107]. Reife neutrophile Granulozyten besitzen eine geringe Lebensdauer von ca. acht Stunden, dennoch bilden sie den Hauptanteil der im peripheren Blut zirkulierenden Leukozytenpopulation. Werden die Neutrophilen durch einen Stimulus aktiviert, so verlängert sich deren Lebensdauer auf bis zu zwei Tage. Erhalten sie jedoch keine stimulierenden Signale, so wird die Apoptose induziert [108]. Da die neutrophilen Granulozyten primär an der Phagozytose und der Abtötung von Bakterien und anderen Mikroorganismen beteiligt sind, zählen sie zu einem wichtigen Bestandteil der angeborenen Immunantwort. Damit die neutrophilen Granulozyten in das entzündete Gewebe gelangen können, besitzen sie die Fähigkeit zur Migration in Richtung eines ansteigenden Gradienten (Chemotaxis) [109]. Grundsätzlich entstehen bei Inflammationen oder Verletzungen chemotaktische Stimuli (mikrobielle Moleküle). Des Weiteren sind Neutrophile in

der Lage, als erste Abwehrzellen den Krankheitsherd zu erreichen, da sie im peripheren Blut zirkulieren und zu den schnellsten mobilen Säugerzellen zählen. Ebenso können auch Immunzellen, wie aktivierte Makrophage, die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten über die Sekretion bestimmter Zytokine, wie TNF- $\alpha$ , IL-1 und IL-8 verstärken. Diese Zytokine sind in der Lage neben der Erhöhung der Migration von Neutrophilen auch die Endothelzellen zu stimulieren und somit deren Expression von Adhäsionsmolekülen (Selektine- und Integrin-Liganden) zu erhöhen. Damit steigt der intensive Kontakt mit dem Endothel, sodass die Neutrophilen über die Endothelzellen „rollen“, adhären und über trans- oder parazelluläre Migration (Diapedese) die betroffenen Areale des Körpers erreichen [110]. Am Zielort angekommen, phagozytieren die neutrophilen Granulozyten Pathogene, die intrazellulär abgebaut werden, oder bewirken durch die extraphagolysomale Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (*reactive, oxygen species*, ROS) deren Eliminierung [111]. Der dabei freigesetzte ROS kann dabei auch das eigene Gewebe schädigen.

Neutrophile Granulozyten scheinen neben den eosinophilen Granulozyten auch bei der Erkrankung Asthma bronchiale relevant zu sein. So wurden neutrophile Granulozyten insbesondere bei schweren Fällen von Asthma als potentielle Effektorzellen beschrieben, da vorwiegend eine erhöhte Neutrophilenzahl neben den Eosinophilen im Sputum, in der Bronchoalveoläre Lavage (BAL) und im Gewebe der allergisch entzündeten Lungen nachgewiesen wurde [112-115].

### **1.6 Dysregulation vom Immunsystem führt zu Autoimmunerkrankungen & Allergien**

Damit bspw. Krankheitserreger erkannt und bekämpft werden können, müssen Immunzellen in der Lage sein, durch allgemeine und spezifische Erkennungsmechanismen zwischen eigenen und körperfremden molekularen Mustern unterscheiden zu können. Dies fasst man unter dem Begriff immunologische Toleranz zusammen. Der Verlust an Toleranz gegenüber Selbst- bzw. harmlosen Umwelt-Antigenen führt zu Fehlregulation des Immunsystems, die zur Schädigung gesunder, körpereigener Zellen beitragen z.B. bei Allergien oder Autoimmunerkrankungen [116]. Bereits während

## Einleitung

---

der Lymphozyten-Reifung im Thymus werden autoreaktive T-Zellen, die mit einer zu hohen Affinität Selbstantigene über MHC-Komplexe erkennen und binden, depletiert. Dadurch sollen nur T-Zellen in die Peripherie gelangen, die eine geringe Affinität gegenüber Selbst-Peptid:MHC-Komplexe aufweisen und somit die Toleranz gegenüber Selbstantigenen aufrecht erhalten [117, 118]. Überleben dennoch autoreaktive T-Zellen die thymischen Selektionsprozesse, können diese in der Peripherie durch verschiedene Toleranzmechanismen (Ignoranz, Anergie und Immunsuppression) unter Kontrolle gebracht werden [116, 119]. Auch autoreaktive B-Lymphozyten werden bereits im Verlauf ihrer Reifung im Knochenmark selektiert, die jedoch in der Peripherie im Wesentlichen durch die T-Zellen kontrolliert werden [120]. Trotzdem können autoreaktive T-Zellen während einer Inflammation eine adaptive Immunantwort induzieren, sofern ihnen das entsprechende Antigen präsentiert wird und kostimulatorische Signale vorhanden sind. So kommt es bei Autoimmunerkrankungen zu einer überschießenden „Auto-Inflammation“, die durch Hyperaktivität von Immunzellen gegenüber Selbstantigenen getrieben wird. Ähnlich überreaktiv verhält sich das Immunsystem bei einer Allergie. In diesem Fall entwickelt das Immunsystem eine adaptive Überempfindlichkeitsreaktion gegenüber exogenen harmlosen Antigenen (Bsp. Pollen). Dies wird als schädigende Hypersensitivität bezeichnet [121, 122]. Bei dieser Hypersensitivitätsreaktion liegt unter anderem eine Dysregulation der T-Zell Balance vor, die auf erhöhte TH<sub>2</sub>-Aktivität (z.B. Asthma) zurückzuführen ist, während Autoimmunerkrankungen (z.B. rheumatoide Arthritis) von überschießenden TH<sub>1</sub>-Reaktionen beeinflusst werden. Dadurch entsteht ein Ungleichgewicht und somit eine Dysregulation zwischen anti-inflammatorischen (IL-10) und pro-inflammatorischen (TNF- $\alpha$ ) Zytokinen, die zur Entstehung einiger Autoimmunerkrankungen und Allergien beitragen [123].

Hierbei sind RNA-BP in der Lage, über Regulation der Expression von immunmodulatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , einen pro-inflammatorischen Immunphänotyp von Zellen zu erzeugen, was wiederum zu der erwähnten Dysregulation führen kann.

### 1.6.1 Rheumatoide Arthritis

Mit einer Prävalenz von ca. 1-2 % der Bevölkerung gehört die rheumatoide Arthritis (RA) zu den häufigsten Autoimmunerkrankungen. Sie betrifft Frauen etwa doppelt so häufig wie Männer und beginnt überwiegend im jüngeren oder mittleren Erwachsenenalter. Inzwischen ist bekannt, dass RA-Patienten ein um etwa 50 % erhöhtes Risiko einer vorzeitigen Sterblichkeit haben und ihre Lebenserwartung im Vergleich zur Allgemeinbevölkerung um 3 bis 10 Jahren sinkt [124-128].

Bei dieser chronisch-entzündlichen Autoimmunerkrankung führt ein Ungleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Mediatoren zur unkontrollierten Entzündung, die gekennzeichnet ist durch eine immunvermittelte entzündliche Synovitis, bei der es zur Zerstörung des Knorpel- und Knochengewebes kommt [129]. Zu Beginn der Erkrankung sind oft kleine Gelenke der Hände und Füße betroffen und sie ist oft mit Schmerzen, Schwellungen und Beeinträchtigungen der Gelenkfunktion verbunden.

Die exakte Ursache für die Entstehung der RA ist noch nicht bekannt, man geht davon aus, dass eine Vielzahl genetischer und nicht-genetischer Faktoren an der Auslösung der Erkrankung beteiligt ist. Es wird unter anderem angenommen, dass ein unbekanntes Antigen auf APC von autoreaktiven T-Zellen erkannt, jedoch nicht von körpereigenen Toleranzmechanismen kontrolliert und als fremd angesehen wird und so die Entzündung induziert wird. Dabei soll die Expression eines bestimmten *human leukocyte antigen* (HLA)-DRB1-Allels an der Entstehung der Erkrankung beteiligt sein. Ebenso fördert die Dysregulation von Toleranzmechanismen die Autoimmunerkrankung. Bei manchen RA-Patienten konnten Autoantikörper im Serum nachgewiesen werden, die gegen IgG gerichtet sind und als sog. Rheumafaktoren (RF) zur Auslösung der Symptomatik durch Bildung von Immunkomplexen führen. Des Weiteren sollen über virale und auch bakterielle Infektionen Kreuzreaktionen von selbstantigen- und pathogen-spezifischen T-Zellen die Erkrankung verursachen [130-133].

Bei der Pathogenese kommt es zu einer hohen Akkumulation inflammatorischer Immunzellen (Monozyten, Makrophagen, Neutrophile und Lymphozyten) in der Synovia der Gelenke. Diese Immunzellen aktivieren über soluble Mediatoren (TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17) synoviale Fibroblasten, Chondrozyten und Osteoklasten, die Matrix-Me-

talloproteasen (MMP) und Kollagenasen ausbilden und damit zur Destruktion der extrazellulären Matrix (EZM) beitragen. Dies führt über Entzündungsschübe zu Schwellung und Schmerzen und zur Entstehung des so genannten Pannusgewebes, durch das letztendlich Knochen- und Knorpelgewebe zerstört wird [134-136].

### **1.6.2 Allergisches Asthma Bronchiale**

Aktuell leiden schätzungsweise weltweit ca. 235 Millionen Menschen unter Asthma. Diese schwerwiegende chronische Erkrankung des Respirationstraktes zählt zu den häufigsten nichtübertragbaren Erkrankungen bei Kindern [137]. Das chronische Asthma bronchiale ist durch eine Empfindlichkeit der Atemwege (Hyperreagibilität) auf nicht immunologische Reize mit einer Verengung zu reagieren charakterisiert, einhergehend mit einer gesteigerten Verkrampfung der Bronchialmuskulatur und Hypersekretion von zähem Schleim [138, 139]. Die pathologischen Veränderungen weisen sich klinisch durch wiederkehrende Atemnotfälle, verursacht durch Verengung der Atemwege, begleitet von Husten und Giemen auf [140]. Während bei Kindern und Jugendlichen überwiegend die allergische Form, auch extrinsisches Asthma genannt, auftritt, dominiert im Erwachsenenalter das intrinsische (nicht-allergische) Asthma bronchiale. Das intrinsische Asthma kann durch unterschiedliche Stimuli, wie chemische Reizstoffe, virale Infektionen, Medikamente oder auch Stress hervorgerufen werden. Bedingt durch verschiedene Umweltallergene, wie Gräser- und Blüten-Pollen, Schimmelpilze, Hausstaubmilben und Tierhaare, wird der Anfall beim allergischen Asthma ausgelöst [141]. Beide Formen weisen gleiche Symptome auf und sind charakterisiert durch verstärkte Infiltration eosinophiler Granulozyten und T-Lymphozyten im Respirationstrakt. Dabei kommt es zur erhöhten Sekretion von TH<sub>2</sub> assoziierten Zytokinen (wie z.B. IL-4, IL-5, IL-13 und IL-9) und verstärkter Mukusproduktion. Sehr häufig wird daher auch eine Mischform (extrinsisches und intrinsisches Asthma) beobachtet [142, 143].

Bei dem allergischen Asthma findet eine hyperreaktive Immunreaktion gegen harmlose Substanzen (Antigene) statt, die vom Ablauf in drei Phasen definiert wird und zwar in die Induktions-, Früh- und Spätphase. Während der Induktionsphase werden die

Antigene (Allergene), die über die Atemwege in den Körper gelangen von APCs phagozytiert und über MHC-Moleküle präsentiert. Vor allem in regionalen Lymphknoten treten die APC mit entsprechenden T-Zellen in Kontakt und können in Anwesenheit von IL-4 naive T-Zellen zur TH<sub>2</sub>-Differenzierung stimulieren. Diese wiederum können durch Produktion von IL-4 und IL-13 in B-Zellen den Immunglobulinklassenwechsel von IgM zu IgG1 und IgE induzieren, was zur Auslösung der Entzündungskaskade führt [144]. Die Sensibilisierungsreaktion verläuft weitgehend symptomfrei und dient primär der Aktivierung von T-Zellen. Nach einem wiederholten Kontakt mit dem selben Allergen, kommt es in der frühen Phase zur IgE-vermittelten, quervernetzten Aktivierung von IgE-Rezeptoren (FcεRI- und -RII-Rezeptoren) auf Mastzellen, Monozyten und eosinophilen und basophilen Granulozyten, das vor allem bei Mastzellen eine Degranulation verursacht, bei der unterschiedliche Mediatoren wie Histamin über Vesikel freigesetzt werden. Weitere Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine und Leukotriene, werden neben einer Vielzahl von Zytokinen (IL-6, IL-5, IL-9, IL-13, TNF-α, GM-CSF) zur Förderung des inflammatorischen Prozesses, sezerniert. Während die Mastzellen den Übergang von der Früh- zur Spätphase einleiten, dominieren Entzündungszellen wie T-Lymphozyten, Makrophagen, Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten im weiteren Verlauf der allergischen Entzündung [145-147]. Dabei ist die Bildung von TH<sub>2</sub> Zellen bei der Ausbildung von allergischem Asthma von entscheidender Bedeutung [148]. Die von TH<sub>2</sub> Zellen sezernierten asthmaspezifischen Zytokine IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 und IL-17 führen zu einer anhaltenden Immunreaktion [148-150]. Die TH<sub>2</sub>-Differenzierung wird durch die Anwesenheit von IL-4 aufrechterhalten und das dabei produzierte IL-5 dient zur Aktivierung und Proliferation von B-Zellen und eosinophilen Granulozyten. IL-13, das ebenfalls die Pathogenese von Asthma moduliert, beeinflusst die Mukusproduktion und kann durch das Vorhandensein von IL-9 verstärkt werden. IL-17 scheint neben der Entwicklung von Asthma durch Aktivierung und Rekrutierung von Neutrophilen auch protektive Effekte auf die Inflammation der Lunge zu haben [151-154].

### **1.6.3 Modelle zur Untersuchung der Pathogenese humaner chronisch-inflammatorischer Erkrankungen**

Tiermodelle können klinische und histologische Analogien zu menschlichen Autoimmunerkrankungen aufweisen und übernehmen daher eine wichtige Rolle in der Erforschung von Autoimmunerkrankungen. Mit Hilfe von *in vivo* Modellen ist man in der Lage während einer Erkrankung die zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen im Gesamtorganismus zu untersuchen und therapeutische Aspekte zu analysieren. Besonders Kleintiere mit einer Lebenserwartung von zwei bis drei Jahren wie Mäuse vermehren sich schnell, verursachen geringe Haltungskosten und besitzen viele Erkrankungen mit ähnlichen genetischen Ursachen. Daher ist kaum ein anderer Säuger-Organismus so gut untersucht wie die Maus [155-157].

#### **1.6.3.1 Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)**

Zur Untersuchung der RA eignet sich besonders das klassische und am besten untersuchte Tiermodell der Kollagen-induzierte Arthritis (CIA) [158-160]. Wie bereits erwähnt, steht ein unbekanntes Autoantigen im Verdacht die humane RA auszulösen und die damit verbundene Inflammation der Gelenke, gefolgt von Knorpel- und Knochenerosion. Ausgelöst wird die CIA in Mäusen durch eine autoimmune Antwort auf das Kollagen Typ II (CII), was die Hauptkomponente des Gelenkknorpels darstellt [161]. Das CII wird in der extrazellulären Matrix der Knochen und des Knorpels von Chondrozyten synthetisiert. Die Immunisierung der Versuchstiere erfolgt mit CII (Huhn) gelöst in komplettem Freundschens Adjuvans (CFA). CFA besteht aus einer Mineralölfraction mit hitzegetöteten Mycobakterien, das besonders geeignet ist für die Auslösung einer CIA [162]. Daraus resultiert eine kreuzreaktive autoimmune Antwort gegen das CII im Gelenkknorpel der Maus. Durch die Stimulation von Kollagen-spezifischen T- und B-Lymphozyten und die Produktion spezifischer Antikörper, entwickelt sich eine Immunantwort gegen das murine CII [163, 164]. Im Synovium lässt sich, vergleichbar mit der humanen RA, eine massive Infiltration von neutrophilen Granulozyten, M1-Makrophagen, CD4<sup>+</sup> T- und B-Zellen nachweisen. Ab etwa dem 20. Tag nach



der Immunisierung der Tiere, tritt als Symptom bei den erkrankten Tieren eine Pfotenschwellung auf (s. K. 3.4.4.1). Des Weiteren spricht man von einer klassischen TH<sub>1</sub> vermittelten Antwort, da überwiegend TH<sub>1</sub> assoziierte Zytokine wie bspw. IFN- $\gamma$  im Gegensatz zu TH<sub>2</sub>-Zytokinen (IL-4, IL-10) von T-Zellen sezerniert werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass eine zusätzliche Gabe von IFN- $\gamma$  oder des TH<sub>1</sub>-Differenzierungsfaktors IL-12 die Progression als auch den Schweregrad der induzierten Arthritis fördert, während die Neutralisation von IFN- $\gamma$  die Entstehung der Erkrankung inhibiert [165-167]. Die Relevanz der T-Zellen in der Pathogenese von CIA wird auch in anderen Publikationen demonstriert. Es konnte gezeigt werden, dass bei  $\alpha\beta$ -TCR-defizienten Mäusen und nach Behandlung mit anti-TCR $\alpha\beta$  monoklonalen Antikörpern die Entstehung von CIA reduziert und sogar verhindert werden konnte [168, 169]. Ebenso konnte auch gezeigt werden, dass B-Zell-defiziente Mäuse keine CIA entwickeln [170]. Im murinen CIA Modell wird vor allem der DBA/1 Mausstamme verwendet, da diese Mäuse mit dem MHC-II Haplotypen H-2q eine höhere Suszeptibilität für die Induktion von CIA aufweisen [171-173]. Der genetische Hintergrund der jeweiligen Mausstämme nimmt somit eine entscheidende Rolle bei der Entstehung der CIA ein [174].

### 1.6.3.2 Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA)

Ein weiteres derzeit intensiv genutztes Tiermodell ist die Kollagen Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA). Dabei kommt es zur Verwendung von einem Gemisch aus mehreren monoklonalen Antikörpern, die gegen das murine Kollagen Typ II gerichtet sind [175, 176]. Im Vergleich zu CIA können mit CAIA auch Mausstämme auf C57BL/6 Hintergrund, die den MHC-II Haplotypen H-2b tragen und somit nicht anfällig für eine CII-induzierte Arthritis sind, induziert werden und weisen einen schnellen Krankheitsbeginn bereits nach drei Tagen auf. Es konnte gezeigt werden, dass bei den Versuchstieren die Abwesenheit von T- und/oder B-Lymphozyten in einer höheren Suszeptibilität für CAIA resultiert. In diesem Zusammenhang wird die regulatorische Rolle der adaptiven Lymphozyten diskutiert [177]. Dagegen verursacht eine Depletion von neutrophilen Granulozyten einen abgeschwächten Krankheitsverlauf, zusätzliche solen Makrophagen als Hauptkomponenten entscheidend am Krankheitsgeschehen beteiligt sein [178]. Des Weiteren kann die Induktion von CAIA mit der Applikation von

LPS gesteigert werden. Mit Hilfe beider Modelle können komplexe immunologische Fragestellungen *in vivo* untersucht werden. Sie eignen sich auch um die Rolle von RNA-BP auf die Immunzellen/Pathogenese der Autoimmunantwort zu untersuchen.

### 1.6.4.3 Allergisches Asthma bronchiale

Vergleichbar wie auch in anderen Krankheitsmodellen variiert die Suszeptibilität für das allergische Asthma bronchiale abhängig vom Stamm bzw. dem genetischen Hintergrund der Versuchstiere. Zusätzlich beeinflusst das Geschlecht die Schwere der Erkrankung [179-181]. So scheinen weibliche BALB/c-Mäuse besonders prädestiniert für die Entwicklung von Asthma zu sein. Verantwortlich dafür zeigen sich höhere Mastzellaktivitäten einhergehend mit erhöhtem TH<sub>2</sub> assoziierten Zytokinmilieu (IL-4, IL-5 und IL-13). Da Mäuse nicht in der Lage sind auf natürlicher Weise Asthma bronchiale zu entwickeln, wird über ein Allergen (Ovalbumin, OVA) eine systemische Sensibilisierung erzielt, damit eine nachweisbare Atemwegshyperreagibilität erzeugt werden kann. Bei den etablierten Modellen kommt es vor allem zur akuten allergischen Entzündungen der Atemwege [182]. Dazu wird das Allergen OVA in der Regel mit einem Adjuvanz (Aluminium-Hydroxid) intraperitoneal appliziert und anschließend in der so genannten Provokationsphase intranasal verabreicht, was eine Aktivierung der TH<sub>2</sub>-Zellen bewirkt. Die wiederholende Provokation mit OVA verursacht in Anwesenheit von TH<sub>2</sub> assoziierten Zytokinen wie IL-5 und IL-13 die Akkumulation von Effektorzellen wie eosinophilen Granulozyten in der Lunge. Obwohl es bekannt ist, dass IL-17 produzierende Zellen durch Aktivierung und Rekrutierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten entscheidend an der Krankheitsentwicklung beteiligt sind, wurden auch regulatorische Effekte von TH<sub>17</sub> Zellen dokumentiert [183-185].

### 2. Zielsetzung der Arbeit

Verschiedene RNA-BP nehmen Einfluss auf den Immunphänotyp von Zellen, weshalb eine Dysregulation der Genexpression durch RNA-BP zur Entstehung verschiedener Erkrankungen wie bspw. Autoimmunerkrankungen beitragen könnte. Im Falle des bisher wenig erforschten Bindeprotein KRSP handelt es sich um ein multifunktionelles und regulatorisches, einzelsträngiges Nukleinsäure bindendes Protein, welches eine zentrale Funktion in der Regulation der Expression pro-inflammatorischer Gene einzunehmen scheint. Der aktuelle Forschungsstand zeigt, dass es auf verschiedenen Weisen in die posttranskriptionelle Regulation der pro-inflammatorischen Genexpression eingreift. Des Weiteren konnten einige Untersuchungen an isolierten Zellen zeigen, dass KSRP in der Lage ist immunologische Prozesse zu beeinflussen, da es die Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren reguliert, die wiederum in der Modulation der Immunantwort involviert sind. Zu der genauen Beteiligung von KRSP an der Pathogenese von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen *in vivo* existieren allerdings bisher nur wenige Untersuchungen. Um neue Behandlungswege entwickeln zu können, ist diese Erkenntnis jedoch zwingend erforderlich.

Daher sollen in etablierten Mausmodellen zur Darstellung von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, der Einfluss von KSRP auf immunmodulatorische Prozesse im Gesamtorganismus untersucht werden. Hierbei soll unter Berücksichtigung von chronischen Entzündungen die Charakterisierung der Wirkung des inaktivierten Gens (KSRP-Knockout-Mäuse) auf die Immunzellenfunktion *in vivo* erfolgen.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Laborgeräte

Tabelle 1: Verwendete Laborgeräte und deren Hersteller

| Gerät         | Modell                           | Hersteller  |
|---------------|----------------------------------|-------------|
| Analysenwaage | Analytic AC120 S<br>(0,1mg-121g) | Sartorius   |
|               | Kern 444-35 N<br>(0,01-400 g)    | Kern        |
|               | Kern PCB<br>(0,1-4000g)          | Kern        |
| Autoklav      | V-150                            | System GmbH |
|               | Laboklav                         | VWR         |
| Beta Counter  | 1205 Betaplate                   | LKB Wallac  |
| Brutschrank   | CB 150, CB 210                   | Binder      |
|               | Hera Cell 150                    | Heraeus     |
| Digitalwaage  | Basic Typ 1202                   | Sartorius   |
| Dispenser     | Multipipette® 4780               | Eppendorf   |
| Dispensette   | 10 ml                            | Brand       |

| Gerät                   | Modell                                       | Hersteller               |
|-------------------------|--|--------------------------|
| Durchflusszytometer     | Attune NxT                                   | Thermo Fisher Scientific |
|                         | BD Acurii™ C6                                | BD Biosciences           |
|                         | FACSCanto II                                 | BD Biosciences           |
|                         | FACSCalibur                                  |                          |
|                         | LSRII  |                          |
| Elektrophorese          | GPS 200/400                                  | Pharmacia                |
| Fluorometer/Luminometer | Dynex MRX TC Revelation<br>Microplate Reader | Dynex Technologies       |
| Folien-Einschweiß-Gerät | Heat Sealer 1295-012                         | Audion Elektro           |
| Gefrierschrank -20°C    | Siemens Sika Frost Comfort<br>electronic     | Siemens AG               |
| Gefrierschrank -80°C    | Herafreeze                                   | Heraeus                  |
| Hämazytometer           | Neubauer Improved,<br>Bright Line, 0,1 mm    | AO Spencer               |
| Kühlschrank + 4°C       | Liebherr MedLine<br>LKv 3910                 | Liebherr                 |
| Hämazytometer           | Profi line                                   | AO Spencer               |
| Manual MACS® Separators | QuadroMACS™                                  | Miltenyi Biotec          |
| Magnetrührer            | IKAMAG®Reo                                   | Janke & Kunkel           |

## Material & Methoden

| Gerät                   | Modell  | Hersteller        |
|-------------------------|---|-------------------|
| Manual MACS® Separators | Big-Squid Ikamag                              | IKA Labor-technik |
| Mehrkanalpipetten       | Multipette Plus, 12-Kanal-Pipette<br>0,5-10µl | Eppendorf         |
|                         | Finnpipette, 8-Kanal-Pipette<br>30 – 300 µl   | Thermo Scientific |
|                         | Finnpipette, 12-Kanal-Pipette<br>50 – 300 µl  | Labsystems        |
| Mikroskope              | CK2   | Olympus           |
|                         | CH2   | Labsystems        |
|                         | Leitz DMIL                                    | Leica             |
| Pipetten                | 0,5 – 10 µl<br>1 – 10 µl<br>100 –1000 µl      | Thermo Scientific |
|                         | 0,5 – 10 µl<br>1 – 10 µl<br>100 –1000 µl      | Eppendorf         |
| NanoZoomer              | 2.0HT   | Hamamatsu         |

| Gerät                      | Modell                      | Hersteller                    |
|----------------------------|-----------------------------|-------------------------------|
| Pipetten                   | 20 – 200 µl                 | ErgoOne, Starlab GmbH         |
|                            | Finnpipette 5 – 40 µl       | Labsystems                    |
| Pipettierhilfen            | Pipetus®A-akku              | Hirschmann Laborgeräte        |
|                            | Pipetboy plus               | Tecnomara                     |
| Plethysmograph             | Modell PLY 3211             | Bucxo® Research Systems       |
| Präparierbesteck           | -                           | Hammacher                     |
| Reagenzglasschüttler       | Vortex Genie 2™             | Bender & Hobein               |
| Sterilwerkbank             | HeraeusLamin Air®HB 2448    | Heraeus                       |
|                            | Herasafe                    | Heraeus                       |
| Wasserbad                  | GFL Typ 1012                | Gesellschaft für Labortechnik |
|                            | Julabo TW20                 | Julabo                        |
| Wasserdeionisierungsanlage | Purelab Classic DI          | ELGA                          |
| Zählhilfe                  | Laboratory Counter          | Becton Dickinson GmbH         |
| Zellerntegerät             | Harvester<br>MACH II/SN 453 | Tomtec                        |
| Zellzählgerät              | CASY TT                     | Schärfe System GmbH           |

## Material & Methoden

---

| Gerät       | Modell                                 | Hersteller      |
|-------------|--|-----------------|
| Zentrifugen | Avanti J-26 XP                         | Beckman Coulter |
|             | Multifuge 1 L-R<br>(300 g = 1.200 rpm) | Heraeus         |
|             | Megafuge 40R                           | Heraeus         |
|             | Galaxy Mini                            | VWR             |
|             | MicroStar 17R                          | VWR             |
|             | Biofuge fresco                         | Heraeus         |
|             | Biofuge 12                             | Heraeus         |
|             | Megafuge 1.0R                          | Heraeus         |
|             | Mikrozentrifuge SIGMA                  | Sigma           |
|             | Cytospin 3                             | Shandon         |



**3.1.2 Labor- und Verbrauchsmaterial**

**Tabelle 2: Verwendete Labor- und Verbrauchsmaterialien und deren Hersteller**

| <b>Material</b>               | <b>Modell</b>                 | <b>Hersteller</b>        |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------|
| Alufolie                      | 30u-Qualität                  | Roth                     |
| Bakteriologische Petrischalen | Ø 94 mm, Höhe 16 mm           | Greiner Bio-one GmbH     |
|                               | Ø 60 mm, Höhe 15 mm           |                          |
| Dispensiergerätaufsatz        | PD-Tips,<br>0,5; 2,5 und 5 ml | Brand GmbH & Co. KG      |
| Einfrierbox                   | Cryo 1 Freezing Container     | Thermo Fisher Scientific |
| Einfrierröhrchen              | Nunc cryo Tube™ vials         | Nunc                     |
| Einmalkanülen                 | 0,7 x 30 mm Sterican®         | Becton Dickinson         |
|                               | 0,4 x 19 mm Sterican®         |                          |
|                               | 0,5 x 16 mm Sterican®         | B/Braun                  |
| Einmalspritzen                | Omnifix® 1 ml                 | B/Braun                  |
|                               | Omnifix® 5 ml                 | B/Braun                  |
|                               | 10ml Discardit™ II            | Becton Dickinson GmbH    |
| Einschweißfolien              | 102 x 258 mm                  | PerkinElmer              |
| Filterpapiere                 | Für Cytospin                  | Shandon                  |
| FACS-Röhrchen                 | Falcon 5 ml Rundbodenröhrchen | Becton Dickinson GmbH    |
| Glasfaserfilter               | 102 x 258 mm                  | PerkinElmer              |

## Material & Methoden

| Material       | Modell   | Hersteller                 |
|----------------|--|----------------------------|
| Glaspipetten   | Precicolor 5, 10 und 25 ml   | Hilgenberg GmbH            |
|                | Techcolor 5, 10 und 25 ml  | Hirschmann Laborgeräte     |
|                | Silberbrand Eterna<br>5, 10 und 25 ml                                | Brand GmbH & Co. KG        |
| Handschuhe     | Sempercare®  | Semperit                   |
| Kulturflaschen | 75 cm <sup>2</sup> , 25 cm <sup>2</sup> , 175 cm <sup>2</sup>        | Greiner Bio-one GmbH       |
| Kulturplatten  | Cellstar Gewebekulturplatte,<br>6-well, Flachboden                   | Greiner Bio-one GmbH       |
|                | Cellstar Gewebekulturplatte,<br>24-well, Flachboden                  |                            |
|                | Cellstar Gewebekulturplatte,<br>48-well, Flachboden                  |                            |
|                | Cellstar Gewebekulturplatte,<br>96-well, Flachboden                  |                            |
|                | CytoOne<br>Gewebekulturplatte,<br>6-well, Flachboden,<br>unbehandelt | Starlab International GmbH |
|                | CytoOne<br>Gewebekulturplatte,<br>12-well, Flachboden                |                            |
|                | CytoOne<br>Gewebekulturplatte,<br>24-well, Flachboden                |                            |

## Material & Methoden

| Material                                     | Modell                                  | Hersteller                 |
|--|---|----------------------------|
| Ohrstanzer                                   | Typ I                                   | ZoonLab                    |
| Objektträger                                 | 76 x 26 cm Mattrand                     | Diagonal GmbH & Co. KG     |
| Nylonwolle                                   | MKN-100 Nylon Wool Fiber                | Kisker Biotech             |
| Parafilm                                     | Parafilm N                              | Nationalcam™               |
| Pasteurpipetten                              | 150 mm                                  | VWR GmbH                   |
| Pipettenspitzen                              | Gelbe Spitzen: bis 200 µl               | Sarstedt AG                |
|  | Blaue Spitzen: bis 1000 µl              | Roth                       |
|  | Kristallspitzen:<br>Tip one 0,1 – 10 µl | Starlab International GmbH |
|  | Weißer Spitzen: bis 200 µl              |                            |
| Plastikpipetten                              | Cellstar 5, 10, 25 und<br>50 ml         | Greiner Bio-one GmbH       |
| Polypropylenröhrchen<br>(Spitzboden Falcons) | 15 ml und 50 ml                         | Greiner Bio-one GmbH       |
| Reaktionsgefäße                              | 0,65 ml; 1,5 ml und 2 ml                | Sarstedt AG                |
| Reaktionsgefäße<br>("Safe-Lock")             | 0,5 ml; 1 ml; 2 ml                      | Eppendorf                  |
| Rundbodenröhrchen                            | 13 ml                                   | Greiner Bio-one GmbH       |
| Säulen                                       | LS Säulen                               | Miltenyi Biotec            |
| Spritzenvorsatzfilter                        | 0,45 µm                                 | Schleicher & Schuell       |
|  | 0,2 µm                                  | Sarstedt AG                |

## Material & Methoden

| Material         | Modell                 | Hersteller            |
|------------------|------------------------|-----------------------|
| Transferpipette  | 3,5 ml                 | Sarstedt AG           |
| Transwell-Filter | 5 µm Porengröße        | costar®               |
| Zellschaber      | 24 cm                  | NeoLabs               |
| Zellsieb         | Cell Strainer: Ø 40 µm | Becton Dickinson GmbH |
| Z-Gel Micro Tube | 1, 1 ml                | Sarstedt AG           |

### 3.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit Angabe der Hersteller

| Substanz                             | Hersteller/Vertrieb |
|--------------------------------------|---------------------|
| Agarose                              | Roth                |
| Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) | Roth                |
| Aluminiumhydroxid, Imject® (Alum)    | Perbio              |
| Collagen Type II (chicken)           | Sigma-Aldrich       |
| CD28 monoklonaler Antikörper         | eBioscience™        |
| CD3 monoklonaler Antikörper          | eBioscience™        |
| Complete Freund's Adjuvant (CFA)     | Otto Nordwald       |
| Dimethylsulphoxide (DMSO) Hybri-max® | Sigma-Aldrich       |
| Entellan®                            | Merck               |
| Ethanol 96 %, vergällt               | BD                  |

## Material & Methoden

| Substanz   | Hersteller/Vertrieb   |
|--|---|
| Ethyldiamintetraessigsäure, Na <sub>2</sub> -Salz x 2<br>H <sub>2</sub> O (EDTA) | Roth  |
| GM-CSF-  | Überstand der GM-CSF-produzierenden<br>Zelllinie X63/GM-CSF |
| Glutamin L(+) (C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> )    | Roth  |
| Golgi Plug   | BD Biosciences  |
| Guanidiniumisothiocyanat (GIT)   | Roth  |
| <sup>3</sup> H-Thymidin ( <sup>3</sup> HTdR)                                     | Amersham Biosciences GmbH                                   |
| Ionomycin  | Tocris Bioscience   |
| Isopropanol (2-Propanol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O)                        | Hedinger  |
| Kaliumchlorid (KCl)  | Merck   |
| Keratinocyte chemoattractant Recombinantes murine KC (CXCL1)                     | Peprtech  |
| Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> )                                      | Riedel-de Haën  |
| Lipopolysaccharid (LPS); E. coli   | Calbiochem  |
| Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )  | Merck   |
| Methanol   | Mallinckrodt-Baker  |
| Recombinantes Monocyte Chemotactic Protein-1 (MCP-1 (CCL2))                      | Peprtech  |
| Natriumchlorid (NaCl)  | Roth  |
| Natriumcitrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> )    | Roth  |

## Material & Methoden

| Substanz   | Hersteller/Vertrieb |
|--|---------------------|
| Natriumdisulfit ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ )                  | Merck               |
| Natriumhydrogencarbonat ( $\text{NaHCO}_3$ )                           | Merck               |
| Natriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )                  | Roth                |
| Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )                                      | Roth                |
| Huhn Ovalbumin (OVA)   | Sigma-Aldrich       |
| Paraformaldehyd (PFA)  | Merck               |
| S-Nitroso-N-acetyl-DL-penicillamine (SnAP)                             | Sigma-Aldrich       |
| Szintillationsflüssigkeit  | Roth                |
| Terralin® Liquid   | Schülke & Mayr GmbH |
| Rekombinanter muriner Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (rm TNF- $\alpha$ ) | ImmunoTools         |
| Wasser, pyrogenfrei, steril (Aqua B. Braun)                            | B/Braun             |
| Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )                          | Merck               |

### 3.1.4 Lösungen, Puffer und Kulturmedien

Für die Herstellung der Puffer und Lösungen wurde, wenn nicht anders angegeben deionisiertes Wasser aus der hauseigenen Deionisierungsanlage (ELGA) verwendet. Die Kulturmedien, Puffer und Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4°C gelagert.

**3.1.4.1 Allgemein verwendete Lösungen und Puffer**

**Tabelle 4: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen und Puffer**

| <b>Lösung/Puffer</b>                           | <b>Zusammensetzung/Vertrieb</b>   |
|--|---|
| BASE-Solution, 50 x                            | 12,5 ml 5 N NaOH<br>1 ml 0,5 M EDTA<br>36,5 ml PCR-H <sub>2</sub> O   |
| BASE-Solution, 1 x                             | 0,5 ml BASE 50 x<br>24,5 ml PCR-H <sub>2</sub> O<br>pH 12   |
| CII-Lsg.                                       | 4 mg/ml CII in 0,05 M Essigsäure  |
| DEPC-Wasser                                    | DNA- H <sub>2</sub> O mit 0,1 Vol % DEPC, auto-<br>klaviert   |
| DPBS (Dulbecco's Phosphate buffered<br>saline) | Gibco   |
| EDTA-Puffer                                    | 30mM EDTA/ 0,01% NaN <sub>3</sub> -Puffer in<br>100 ml PBS  |
| Ethanol 70 %                                   | Hergestellt aus 96 % Ethanol und entio-<br>nisierem Wasser  |
| Gey'scher Lysepuffer                           | 0,25 g KHCO <sub>3</sub> , 2,07 g Ammoniumchlo-<br>rid und 0,0093 g EDTA wurden in 250<br>ml entionisiertem Wasser gelöst, pH 7,5<br>eingestellt und sterilfiltriert (0,2 µm) |

## Material & Methoden

| Lösung/Puffer                              | Zusammensetzung/Vertrieb  |
|--|---|
| GIT-Puffer                                 | 4 M GIT<br>2 mM Natriumcitrat<br>0,5 % Sarcosyl<br>0,1 M $\beta$ -Mercaptoethanol<br>in DEPC-H <sub>2</sub> O |
| HBSS (Hank's balanced salt solution)       | Sigma-Aldrich   |
| Laufpuffer 5x                              | 124 mM TRIS-HCl<br>959 mM Glycin<br>17 mM SDS in H <sub>2</sub> O pH 7,8                                      |
| Lymphocyte Separation Medium<br>(LSM 1077) | GE Healthcare   |
| MACS-Puffer                                | DPBS/2mM EDTA<br>745 mg EDTA wurden in 1 Liter 1xPBS<br>(pH 7,2) gelöst und anschließend auto-<br>klaviert    |
| NEUTRALISATION-Solution, 50 x              | 15,75 g Tris-HCl<br>50 ml PCR-H <sub>2</sub> O  |
| NEUTRALISATION-Solution, 1 x               | 0,5 ml NEUTRALISATION 50 x<br>24,5 ml PCR-H <sub>2</sub> O<br>pH 5  |



## Material & Methoden

| Lösung/Puffer                          | Zusammensetzung/Vertrieb   |
|--|--|
| OVA/Alum                               | 500µg OVA in 0,9% NaCl im Verhältnis 1:1 mischen mit 10 % Alum mit NaOH auf pH 6,5 einstellen, 1 Std. bei RT unter Lichtausschluss inkubieren, für 5 min bei RT zentrifugieren (1500 UpM). Pellet in 10 ml 0,9 % NaCl resuspendieren |
| 1xPBS (Phosphate buffered saline)      | 40,2 g NaCl und 7,8 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O wurden in 5 Liter entionisiertem Wasser gelöst, pH 7,2 eingestellt mit 10 M NaOH und die Lösung anschließend autoklaviert                                |
| Trypanblau-Stammlösung (0,4 % v/v)     | Sigma-Aldrich, Steinheim   |
| Trypanblau-Gebrauchslösung (0,1 % v/v) | Verdünnung der Trypanblau-Stammlösung im Verhältnis 1:4 in 1xPBS   |

## Material & Methoden

### 3.1.4.2 FACS-Lösungen und -Puffer

Tabelle 5: Zusammensetzung der verwendeten FACS-Lösungen und -Puffer

| Lösung/Puffer                     | Zusammensetzung  |
|-----------------------------------|--|
| FACS-Fixierungslösung (0,7 % PFA) | 0,7 g PFA wurden bei 56°C in 100 ml 1xPBS (pH 7,2) gelöst                |
| FACS-Medium                       | In 1xPBS wurden 2 % (v/v) FCS (Gibco) verdünnt (filtriert; 0,4 µm)       |
| FACS-Puffer                       | In 1xPBS/2 mM EDTA wurden 2 % (v/v) FCS verdünnt (filtriert; 0,4 µm)     |
| intrazelluläre FACS-Puffer        | In 1xPBS/2mM EDTA wurden 0,5 % FACS (Gibco) verdünnt (filtriert; 0,4 µm) |

### 3.1.5 Medien und Supplemente für Zellkulturen

Zur Kultivierung der steril aus den Versuchstieren entnommenen Organe bzw. der daraus gewonnenen Zellen wurden die Puffer, Kultur- und Waschmedien mit fötalem Kälberserum versetzt, welches als Nährstoffquelle für die Zellen dient und entscheidend für das Wachstum der Zellen ist. Das FCS war mycoplasmenfrei und steril. Zur Langzeitaufbewahrung wurde es in Aliquoten bei -20°C und zur kurzzeitigen Verwendung bei 4°C gelagert.

**Tabelle 6: Zusammensetzung/Vertrieb von Medien und Supplemente für Zellkulturen**

| Medium/Supplement                          | Zusammensetzung/Vertrieb  |
|--|---|
| Fetales Kälberserum (FCS)                  | Gibco   |
|  | PAA   |
| Pferdserum (HS)                            | GE Healthcare   |
| Glutamin (200 mM)                          | Supplement in Kulturmedien;<br>5,84 g/L (+)-Glutamin (Roth) wurden in 200 ml 1xPBS gelöst und sterilfiltriert (0,2 µm), 1%ig eingesetzt in Kulturmedium                           |
| β-Mercaptoethanol (5 mM)                   | 40 µl β-Mercaptoethanol (Roth) wurden in 114 ml IMDM verdünnt und sterilfiltriert (0,2 µm), 1%ig eingesetzt in Kulturmedien   |
| Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep)        | Mischung aus 10 <sup>4</sup> IU/ml Penicillin und 10 <sup>4</sup> µg/ml Streptomycin (PAA, Österreich); 1%ig eingesetzt in Kulturmedien und Waschmedien zum Schutz vor Verkeimung |
| EMEM (Eagle's Minimum Essentiell Medium)   | Sigma-Aldrich   |
| IMDM (Iscove's Modified Dilbecco's Medium) | Sigma-Aldrich   |
| DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)  |   |

## Material & Methoden

| Medium/Supplement                                | Zusammensetzung/Vertrieb  |
|--|---|
| Kulturmedium für murine BM-DCs                   | IMDM mit folgenden Supplementen:<br>5 % (v/v) FCS (Gibco)<br>1 % (v/v) Pen/Strep<br>2 mM L-Glutamin<br>50 µM β-Mercaptoethanol<br>5 % (v/v) GM-CSF (Überstand der GM-CSF-<br>produzierenden Zelllinie X63/GM-CSF) |
| Kulturmedium für murine BM-Makro-<br>phagen      | IMDM mit folgenden Supplementen:<br>5 % (v/v) FCS (Gibco)<br>5 % (v/v) HS<br>1 % (v/v) Pen/Strep<br>2 mM L-Glutamin<br>50 µM β-Mercaptoethanol<br>25ng/ml M-CSF   |
| Kulturmedium für murine T-Zellen<br>(Testmedium) | IMDM mit folgenden Supplementen:<br>5 % (v/v) FCS (PAA)<br>1 % (v/v) Pen/Strep<br>2 mM L-Glutamin<br>50 µM β-Mercaptoethanol  |
| Waschmedium                                      | EMEM mit folgenden Supplementen:<br>2 % (v/v) FCS (PAA)<br>1 % (v/v) Pen/Strep  |

3.1.6 Kits

Tabelle 7: Verwendete Kits und deren Hersteller

| Kits   |               | Hersteller      |
|--|---------------|-----------------|
| Arthrogen-CIA® 5-monoclonal Anti-body Cocktail Kit |               | Amsbio          |
| Anti-Ly-6G MicroBead Isolation Kit mouse           |               | Miltenyi Biotec |
| CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit mouse        |               | Miltenyi Biotec |
| CD8 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit mouse        |               | Miltenyi Biotec |
| Mouse Cytokin Flex Set (CBA)                       | IL-1 $\beta$  | BD Biosciences  |
|  | IL-2          |                 |
|  | IL-4          |                 |
|  | IL-5          |                 |
|  | IL-6          |                 |
|  | IL-9          |                 |
|  | IL-10         |                 |
|  | IL-12         |                 |
|  | IL-13         |                 |
|  | IL-17A        |                 |
|  | IFN- $\gamma$ |                 |
|  | TNF- $\alpha$ |                 |

## Material & Methoden

| Kits  | Hersteller              |
|---|-------------------------|
| CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin | Promega                 |
| BD™ CompBeads Set   | BD Biosciences          |
| Diff-Quick®-Färbeset  | Medion Diagnostics GmbH |
| REDTagReady-Mix   | Sigma Aldrich           |

### 3.1.7 Analyse Software

Tabelle 8: Verwendete Analyse Software und deren Hersteller

| Bezeichnung                      | Hersteller              |
|----------------------------------|-------------------------|
| C6 Analysis Software für Accuri™ | BD Biosciences          |
| BioSystem XA Software            | Buxco Research Systems  |
| CellQuest Software               | Becton Dickinson        |
| FlowJo Analysesoftware           | Tree Star, Inc.         |
| BD FACSDiva™ Software            | BD Biosciences          |
| FCAP Array™ Software             | BD Biosciences          |
| Graphpad PRISM                   | Graphpad Software, Inc. |
| NDP.view2                        | Hamamatsu Photonics     |
| SigmaPlot                        | Systat Software         |

### 3.1.8 Antikörper

#### 3.1.8.1 Antikörper zur Absättigung freier Fc-Rezeptoren

Um unspezifische Bindungen der FACS-Antikörper an Fc-Rezeptoren der Zellen zu verhindern, wurden die Zellen vor der eigentlichen Antikörperfärbung mit einem FcR-blockierenden Antikörper inkubiert.

Bei den murinen Primärzellen wurde der Antikörper 2.4G2 verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Ratte-anti-Maus Fc $\gamma$ RII/III (CD16/32) Antikörper des Isotyps Ratte-IgG2b [186], gewonnen aus dem Kulturüberstand des B-Zell-Hybridoms 2.4G2. Eingesetzt wurde der Antikörper in einer Konzentration von 67 ng pro Probe.

#### 3.1.8.2 Antikörper zur FACS-Färbung

Tabelle 9: Verwendete FACS-Antikörper und deren Hersteller

| Antikörper gegen | Isotyp         | Klon    | Markierung | Konzentration/<br>5x10 <sup>5</sup> Zellen | Hersteller        |
|------------------|----------------|---------|------------|--|-------------------|
| Maus<br>MHCII    | Ratte<br>IgG2b | M5/114  | APC        | 0,01 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                 | eBioscience       |
| Maus<br>CD86     | Ratte<br>IgG2a | GL1     | PE-Cy7     | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                 | BD<br>Biosciences |
| Maus<br>CD80     | Hamster<br>IgG | 16-10A1 | FITC       | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                 | eBioscience       |
| Maus<br>CD40     | Ratte<br>IgG2a | 1C10    | PE         | 0,1 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                  | eBioscience       |
| Maus<br>CD11b    | Ratte<br>IgG2b | M1/70   | PE-Cy7     | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                 | eBioscience       |

## Material & Methoden

| Antikörper gegen | Isotyp         | Klon     | Markierung | Konzentration/<br>5x10 <sup>5</sup> Zellen | Hersteller               |
|------------------|----------------|----------|------------|--|--------------------------|
| Maus<br>Ly6G     | Ratte<br>IgG   | 1A8      | PE         | 0,1 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                  | BD<br>Bioscience         |
| Maus<br>Ly6G     | Ratte<br>IgG2a | 1A8      | PB         | 0,2 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                  | BioLegend                |
| Maus<br>CD19     | Ratte<br>IgG2a | 1D3      | APC-Cy7    | 0,1 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                  | BD<br>Bioscience         |
| Maus<br>CD3e     | Hamster<br>IgG | 145-2C11 | PerCP      | 0,1 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                  | BD<br>Bioscience         |
| Maus<br>CD3e     | Hamster<br>IgG | 145-2C11 | PE         | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                 | Thermo Fisher Scientific |
| Maus<br>CD4      | Ratte<br>IgG2b | GK1.5    | APC        | 0,025 µg/<br>5x10 <sup>5</sup>             | eBioscience              |
| Maus<br>CD8a     | Ratte<br>IgG2a | 53-6.7   | PE-Cy5     | 0,025 µg/<br>5x10 <sup>5</sup>             | BD<br>Bioscience         |
| Maus<br>CD8a     | Ratte<br>IgG2a | 53-6.7   | eFluor450  | 0,5 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                  | Thermo Fisher Scientific |
| Maus<br>CD25     | Ratte<br>IgG1  | 7D4      | FITC       | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                 | BD<br>Bioscience         |



**3.1.8.3 Isotypkontrollantikörper für die FACS-Färbung**

**Tabelle 10: Verwendete Isotypkontrollantikörper und deren Hersteller**

| <b>Antikörper</b> | <b>Klon</b> | <b>Markierung</b> | <b>Konzentration/<br/>5x10<sup>5</sup> Zellen</b> | <b>Firma</b> |
|-------------------|-------------|-------------------|---|--------------|
| Hamster IgG       | eBio299Arm  | FITC              | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                        | eBioscience  |
| Ratte IgG2a       | eBR2a       | PE                | 0,1 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                         | eBioscience  |
| Ratte IgG2a       | eBR2a       | PE-Cy7            | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                        | eBioscience  |
| Ratte IgG2b       | eB149/10H5  | APC               | 0,01 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                        | eBioscience  |
| Ratte IgG1        | eBRG1       | FITC              | 0,04 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                        | eBioscience  |
| Maus IgG1         | IS5-21F5    | PE                | 0,1 µg/ 5x10 <sup>5</sup>                         | eBioscience  |

**3.1.8.4 Reagenzien zur Quantifizierung apoptotischer/nekrotischer Zellen**

**Tabelle 11: Verwendete Vitalitätsnachweis-Reagenzien und deren Hersteller**

| <b>Reagenzien</b>                          | <b>Verdünnung</b> | <b>Hersteller</b> |
|--|-------------------|-------------------|
| Fixable Viability Dye<br>(FVD) eFluor® 450 | 1:1000            | eBioscience       |
| 7-AAD                                      | 1:40              | Biologend         |
| Alexa Fluor® 647 Annexin<br>V              | 1:350             | Biologend         |

## Material & Methoden

---

### 3.1.8.5. Oligonukleotide

Tabelle 12: Verwendete Primer für die PCR und deren Sequenz

| Allel   | 5' Primer               | 3' Primer               |
|---------|-------------------------|-------------------------|
| KSRP WT | GCG GGG AGA ATG TGA AGG | GAG GCC CCT GGT TGA AGG |
| KSRP KO | CTC CGC CTC CTC AGC TTG |                         |

## 3.2. Zellbiologische Methoden

### 3.2.1 Allgemeine Bedingungen

Um Kontaminationen zu vermeiden, wurden alle Zellkultur-Arbeiten an einer sterilen Werkbank ausgeführt. Alle verwendeten Materialien wurden entweder steril vom Hersteller erworben, autoklaviert oder steril filtriert. Benötigte Reagenzien und Medien wurden vor Benutzung im Wasserbad auf 37°C erwärmt und mit Terralin liquid desinfiziert. Die Kultivierung von murinen Zellen erfolgte in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub>.

### 3.2.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die Zellzahl von isolierten Immunzellen (Milzzellen, T-Zellen, BM-DC usw.) wurde nach deren Inkubation mit Trypanblau mittels einer "Neubauer Improved"-Zählkammer lichtmikroskopisch bestimmt. Die Proben der homogenen Zellsuspension wurden in Trypanblau verdünnt (1:2; 1:5 und 1:10 Verdünnungen). Der Farbstoff Trypanblau kann durch die permeabilisierte Membran toter Zellen eindringen, wodurch diese Zellen blau gefärbt werden und gut von den lebenden Zellen unterschieden werden können. Für die Zellzahlbestimmung wurden alle Zellen innerhalb der vier Großquadrate,

die sich jeweils in 16 kleinere unterteilen, gezählt. Zellen, die auf den Rändern dieser Kleinquadrate lagen, wurden halb gezählt. Mit Hilfe der folgenden Formel wurde die Lebendgesamtzellzahl (LGZZ) ermittelt:

**Zellzahl/ml = Anzahl der gezählten Zellen in allen Großquadraten (x) / Anzahl der Großquadrate (4) x Verdünnungsfaktor (x) x Kammerfaktor ( $10^4$ ) x Volumen (x ml)**

### 3.2.3 Isolation muriner Knochenmark Vorläuferzellen

Die Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen wurden aus isolierten Knochenmarkszellen der Tibien und Femuren von Mäusen gewonnen. Es wurde das ursprünglich von Scheier *et al.* [187] publizierte und nach Lutz *et al.* [188] modifizierte Verfahren angewandt. Die 6-14 Wochen alten Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet und die Femuren und Tibien beider Hinterbeine steril heraus präpariert. Mit einem in 70%iges Ethanol getränktes Papiertuch wurden Muskelreste vom Knochen entfernt, letztere anschließend kurz in 70%igem Ethanol desinfiziert und in kaltem Waschmedium (s. Tabelle 6) aufbewahrt. Um das Knochenmark zu isolieren, wurden die Gelenkköpfe mit einer Schere an beiden Seiten abgeschnitten und das Knochenmark mit 1 ml kalter Waschlösung mit Hilfe einer 0,5 mm Kanüle bei den Tibien bzw. einer 0,7 mm Kanüle bei den Femuren und einer dazugehörigen 1 ml Spritze aus dem Knochen in eine frische Petrischale gespült. Durch mehrmaliges Aufziehen in die Spritze wurden die Zellen vereinzelt. Die Zellsuspension wurde anschließend über ein 40 µm Zellsieb in ein 50 ml Gefäß überführt und für 10 Minuten bei 4°C und 300xg zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand dekantiert und das Zellsediment aufgebrochen. Um die in der Zellsuspension enthaltenen Erythrozyten zu lysieren, wurde 1 ml Gey'scher Lyse-Puffer (s. Tabelle 4) pro präpariertem Maus-Äquivalent (Knochenmarkszellen aus zwei Tibien und Femuren) zu den Zellen gegeben und für eine Minute unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 40 ml kaltem Waschmediums wurde die Lyse gestoppt. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 300xg) und anschließend zwei Mal mit je 20 ml kaltem Waschmedium gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Zellen in 5 ml Testmedium (s. Tabelle 6) je Maus-Äquivalent aufgenommen und die Zellzahl bestimmt.

## Material & Methoden

---

### 3.2.3.1 Kultivierung und Differenzierung von Knochenmarkszellen zu BM-DC und BM-M $\phi$

Knochenmarkszellen, die als Vorläuferzellen-Quelle genutzt und nicht weiter differenziert wurden, konnten mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in 24-Loch Gewebekulturplatten oder im 96-Loch Format mit  $0,5 \times 10^6$  Zellen/100  $\mu$ l ausgesät werden.

Zur Differenzierung frisch gewonnener muriner Vorläuferzellen zu BM-DC (*bone marrow derived dendritic cells*) wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 2,5 ml BM-DC-Kulturmedium (s. Tabelle 6) in unbeschichtete 6-Loch Gewebekulturplatten ausgesät, alternativ  $2 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 10 ml in bakteriologischen Petrischalen eingesät. Für BM-M $\phi$  (*bone marrow derived macrophages*) Differenzierung wurden  $3 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 10 ml in bakteriologischen Petrischalen eingesät. Die Kultivierung der Zellen erfolgte über 7-9 Tage im Brutschrank bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. An Tag 3 und Tag 6 wurden die Zellen durch Zugabe von 5 ml BM-DC- und/oder BM-M $\phi$ -Kulturmedium (s. Tabelle 6) pro Petrischale bzw. 0,5 ml BM-DC-Kulturmedium pro Loch einer 6-Loch Gewebekulturplatte gefüttert. Zur Ausreifung immaturer Zellen wurden die nicht adhären-ten Zellen der Kultur an Tag 7-9 durch sanftes Spülen mit einer 10 ml Glaspipette geerntet und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellsuspension wurde für 8-10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) und 300xg zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellsediment in frischem, vorgewärmtem Kulturmedium (s. Tabelle 6) resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

### 3.2.4 Isolation muriner PBMC aus dem Blut

Die PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) sind mononukleäre Zellen, die im peripheren Blut zu finden sind. Die Blutentnahme erfolgte retro-orbital. Dazu wurden Mäuse für wenige Sekunden mit CO<sub>2</sub> begast und mit einer Glaskapillare wurde der Venenkomplex hinter dem Auge von der Innenseite des Auges her angestochen und wenige Tropfen Blut gesammelt. Um daraus das Serum zu gewinnen wurde das Blut in 1,1 ml Micro-Z-Gel-Röhrchen aufgenommen, diese bei 10000xg bei RT zentrifugiert und das Serum (flüssiger Überstand über dem Gel) abgenommen und bei -20°C gelagert. Aus derselben Maus wurden fünf Tropfen Blut in 1 ml EDTA-Puffer (vorgelegt in 1,5 ml Eppis bei RT) aufgefangen und sofort durch Invertieren vermischt. Die Blutproben wurden mit RT warmen 3 ml Waschmedium (s. Tabelle 6) verdünnt und vorsichtig auf 4 ml Lymphozyten-Separationsmedium (s. Tabelle 4) der Dichte 1,077 beschichtet. Des Weiteren erfolgt eine Dichtegradientenzentrifugation bei RT mit 1300xg für 20 min ohne Bremse. PBMC, die sich in der Interphase des Gradienten (milchig) befanden wurden vorsichtig mit einer Pasteurpipette abgenommen und in 7,5 ml, 4°C kaltes Waschmedium (vorgelegt in 15 ml Gefäß) überführt und für 10 min bei 4°C mit 400xg abzentrifugiert, um die Proben zu waschen [189]. Nach der Zentrifugation wurden die PBMC für Analysen wie Durchflusszytometrie und Viabilitäts-Assay verwendet.

### 3.2.5 Präparation von Milzzellen

Die Tötung der Mäuse erfolgte mittels zervikaler Dislokation. Vor der Entnahme der Milz wurde die Maus auf ihre rechte Seite gelegt, das Fell mit 70%igem Ethanol desinfiziert und die Maus anschließend mit sterilisiertem Präparierbesteck im Abdominalbereich longitudinal aufgeschnitten. Nach Öffnung der Bauchdecke wurde die Milz entnommen und in einem 50 ml Gefäß, welches mit 5 ml eiskaltem Waschmedium (s. Tabelle 6) gefüllt war, bis zur Verwendung aufbewahrt. Für den Organaufschluss wurden die Milzen unter sterilen Bedingungen über einem Zellsieb (Porengröße 40 µm) mit dem Stempel einer 1 ml Spritze komplett zerrieben und die Milzzellen im 50 ml

## **Material & Methoden**

---

Gefäß aufgenommen. Mit 10 ml 4°C kaltem Waschmedium wurde anschließend Stempel und Zellsieb durchgespült. Danach wurde die Zellsuspension für zehn Minuten bei 300xg und 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellsediment durch Anschneiden aufgebrochen. Die anschließende Erythrozytenlyse der Zellsuspension erfolgte durch Zugabe von 1 ml Gey'schem Lyse-Puffer (s. Tabelle 4) pro Milz und wurde nach einer Minute bei RT durch Zugabe von 30 ml gekühltem Waschmedium abgestoppt. Es folgten zwei weitere Zentrifugationsschritte (7 min, 4°C, 300xg) mit je 10 ml Waschmedium pro Milz. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt.

### **3.2.5.1 Isolierung von T-Lymphozyten über Nylonwolle-Säulen**

Die Aufreinigung der T-Zellen aus einer Milzzellsuspension erfolgte über Nylonwolle-Säulen. Zur Herstellung dieser Nylonwolle-Säulen wurden 0,6 g Nylonwolle pro Säule abgewogen und mit Hilfe von zwei Hakenpinzetten von Knötchen befreit. Die fein gepuffte, lockere Nylonwolle wurde anschließend in eine 10 ml Spritze ohne Kolben überführt und diese in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und autoklaviert. Da T-Zellen im Vergleich zu Leukozyten, DCs und Makrophagen keine Adhärenz an Nylonwolle aufweisen, können sie hierdurch effizient aus einer heterogenen Milzzellsuspension isoliert werden [190].

Für die Aufreinigung der T-Lymphozyten wurden die Nylonwolle-Säulen zunächst äquilibriert. Dazu wurden jeweils 20 ml Waschmedium auf jede Säule gegeben, mit einer sterilisierten Pinzette vorhandene Luftblasen herausgedrückt und dabei das Volumen der Nylonwolle auf ca. 6 ml reduziert. Die Säulen wurden in verschlossenen 50 ml Reaktionsgefäßen für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert, in neue 50 ml Reaktionsgefäße überführt und mit frischen 20 ml vorgewärmten Waschmedium gespült. Die präparierten Milzzellen (siehe Kapitel 3.2.5) wurden vorsichtig mittig auf die Säulen getropft. Pro Säule wurden Zellen von maximal zwei Milzen aufgereinigt. Des Weiteren erfolgte die Zugabe von je 1 ml warmem Waschmedium, um die Zellen nicht austrocknen zu lassen. Außerdem können somit alle Zellen in die Nylonwolle einsickern. Die beladenen Säulen wurden dann für 45 Minuten bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach der Inkubation konnten die T-Lymphozyten eluiert werden. Dazu wurde jede Nylonwolle-Säule auf eine 0,7 x 30 mm Kanüle gesteckt, die durch einen mit

70%igem Alkohol desinfizierten Deckel eines frischen 50 ml Reaktionsgefäßes gestochen wurde. Anschließend wurden die Zellen mit insgesamt 20 ml warmem Waschmedium eluiert, indem die Nylonwolle-Säulen mit 5 ml Aliquoten beladen und durch Drehen des Deckels auf eine Durchflussgeschwindigkeit von ungefähr einem Tropfen pro Sekunde eingestellt wurden. Nach der Elution wurde ein neuer Deckel auf das Reaktionsgefäß aufgesetzt und es erfolgte die Sedimentierung der Zellen für zehn Minuten bei 4°C und 300xg. Der Überstand wurde ab dekantiert, das Zellpellet in warmem, GM-CSF freiem Kulturmedium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Die T-Zellen wurden auf eine Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.

### 3.2.5.2 Isolierung von T-Lymphozyten durch MACS

Mit Hilfe von MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*) ist es möglich aus einem heterogenen Zellgemisch bestimmte Zellpopulationen zu isolieren. Dazu werden die Zellen mit spezifischen magnetischen Antikörper (*MicroBeads*) markiert, die dann beim Passieren der Matrix der MACS-Säulen im Magnetfeld des MACS Separators zurückgehalten und somit von den unmarkierten Zellen getrennt werden. Die Aufreinigung kann mit zwei unterschiedlichen Verfahren durchgeführt werden. Es können in einem heterogenen Zellgemisch gezielte Zellpopulation durch die *MicroBeads* markiert und isoliert werden, dies wird als Positiv-Selektion bezeichnet. Um Voraktivierungen an Zielzellen zu vermeiden, verwendet man die Negativ-Selektion bei der alle anderen Zellpopulationen über *Microbeads* abgefangen werden und nur die gewünscht unmarkierte Zielpopulation im Durchfluss gewonnen wird.

Für unsere Fragestellung in meiner Arbeit wurden naive T-Zellpopulationen benötigt, daher wurde die Negativ-Selektion für die magnetische T-Zell Separation gewählt.

Für die T-Zell-Aufreinigung wurden präparierte Milzzellen (s. 3.2.5) verwendet, die nach Bestimmung der Zellzahl in zwei gleiche Teile halbiert wurden. Während der eine Teil für die CD4<sup>+</sup> T-Zell Separation und der andere Teil für die CD8<sup>+</sup> T-Zell Separation verwendet wurde. In beiden Fällen wurde ein *T-Cell Isolations Kit* (s. Tabelle 7) verwendet, welches ein Cocktail an monoklonalen Antikörpern enthält die gegen CD11b, CD11c, CD19, B220, CD49b, CD105, Anti-MHC-II, Ter-119, TCR $\gamma/\delta$  und CD8a oder

## Material & Methoden

---

CD4 gerichtet waren. Mittels Manual MACS® Separator und MACS LS Säulen erfolgte die Isolation in allen Arbeitsschritten nach Angaben des Herstellers.

### 3.2.6 Stimulation der Immunzellen

Durch die Stimulierung wurden die Immunzellen *in vitro* maturiert. Das ist notwendig um das intrinsische Potenzial der Immunantwort und der damit produzierende und sezernierende Zytokinmuster, der jeweiligen Immunzellen zu provozieren.

Abhängig von der benötigten Menge der Zellen, wurden Knochenmarkszellen, Milzzellen sowie immature BM-DC und BM-M $\phi$  geerntet und im 6-, 12-, 24- bzw. 96-Loch Format stimuliert. Zur Ausreifung wurden die Zellkulturen mit zwei Stimulanzien (Lipopolysaccharid (LPS) & Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )) in optimaler (100 & 20 ng/ml) und suboptimaler Konzentration (10 & 5 ng/ml) stimuliert, und für weitere 1, 3, 6 und 24 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

T-Zellen, die entweder über MACS oder Nylonwolle isoliert wurden, wurden in 24-Loch aber auch im 96-Loch Format kultiviert und polyklonal stimuliert. Dazu wurden unbeschichtete Gewebekulturplatten verwendet, die vorher mit 5  $\mu$ g/ml anti-CD3 Antikörper (s. Tabelle 3) beladen wurden und für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubierten. Vor Zugabe der Zellen wurde der überschüssige, nicht an dem Plattenboden adhärierte Antikörper abgenommen und zweimal mit 100  $\mu$ l sterilem PBS leicht ausgewaschen. Anschließend wurden die T-Zellen mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml ausgesät und den Kostimulus anti-CD28 (s. Tabelle 3) in einer Konzentration von 2  $\mu$ g/ml dazugegeben. Diese T-Zellen inkubierten für 90 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub>. Spezifische T-Zellpopulationen (CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen), die über MACS aufgereinigt wurden, wurden in weiteren Untersuchungen ebenfalls zur Zeitkinetik-Studien herangezogen und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1, 3, 6, 24, 48, 72 Stunden) polyklonal stimuliert.



### 3.2.7 T-Lymphozyten Proliferationsassay

Durch den Einbau von Tritium-markiertem Thymidin ( $^3\text{HTdR}$ ) in die DNA der sich teilenden Zellen kann deren Proliferation bestimmt werden. Dabei steht die resultierende Radioaktivität der Probe in direkter Relation zur Anzahl der proliferierten Zellen.

Für diesen Versuch wurden die isolierten T-Zellen wie unter Kapitel 3.2.5.1 und 3.2.5.2 beschrieben im Testmedium auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt und mit  $5 \times 10^4/100 \mu\text{l}$  als höchste Konzentration im 96-Loch Format ausgesät. Die polyklonal stimulierten T-Zellen (s. 3.2.6) wurden in Triplikatansätzen über drei Stufen in einer 96-well-Flachboden-Platte seriell 1:2 (je  $100 \mu\text{l}$ ) verdünnt. Die anfängliche Zellzahl betrug dabei pro Loch  $5 \times 10^4$  Zellen/ $100 \mu\text{l}$ . Ein weiteres Triplikat wurde nur mit T-Zellen angelegt, um deren basale Proliferation im unstimulierten Zustand zu messen.

Alle in 96-Loch-Platten durchgeführten Proliferationen wurden für 72 Stunden bei  $37^\circ\text{C}$  und 10 %  $\text{CO}_2$  im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden in jede Vertiefung  $0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{HTdR}$  zugegeben und die Platten für weitere 16-18 Stunden inkubiert. Nur sich replizierende T-Zellen bauen das Methyl-( $^3\text{H}$ )-Thymidin in ihre DNA ein. Zum Beenden der Proliferation wurden die Platten bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren oder direkt geerntet (s. 3.2.7.1).

#### 3.2.7.1 Messung der zellulären $^3\text{HTdR}$ -Radioaktivität

Mit Hilfe eines Zellerntegerätes (s. Tabelle 1) wurden die Zellen aus den 96-Loch-Platten mittels destillierten Wassers auf eine Glasfaser-Filtermembran transferiert. Dabei werden die Zellen lysiert und die DNA wird an der Filtermembran festgehalten. Überschüssiges  $^3\text{HTdR}$  und mögliche Zellreste wurden durch Ausspülen mit destilliertem Wasser entfernt. Die DNA auf der Filtermembran wurde anschließend in der Mikrowelle immobilisiert und mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit in einer Plastikfolie eingeschweißt. Die in der DNA gebundene Radioaktivität wurde als emittierende  $\beta$ -Strahlung im Szintillationszähler als „counts per minute“ (cpm) quantifiziert.

### 3.2.8 Untersuchung der Zellvitalität mittels MTT-Assays

Der MTT-Assay diente zur Untersuchung der metabolischen Aktivität zwischen Immunzellen von KSPR<sup>-/-</sup> (KO) und KSRP<sup>+/+</sup> (WT) Tieren.

Das als MTT bezeichnete Tetrazoliumsalz (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-Tetrazoliumbromid) ist ein gelber, wasserlöslicher Farbstoff, der von vitalen Zellen durch Dehydrogenasen zum blauen Formazan reduziert wird [191]. Somit kann die Substanz nur von vitalen Zellen verstoffwechselt werden und den Farbwechsel hervorrufen. Der Zellvitalitätstest wurde in 96-well-Gewebekulturplatten mit  $2,5 \times 10^5$  BM-DC, BM-M $\phi$  und Milzzellen und bei Messungen mit Vorläuferzellen aus dem Knochenmark mit  $5 \times 10^5$  Zellen in 100  $\mu$ l Kulturmedium pro Loch angesetzt, wobei jeweils Vierfachansätze durchgeführt wurden. Die Immunzellen wurden 24 Stunden vor dem MTT-Assay ausgesät, damit sie am Boden der Gewebekulturplatten adhären konnten. Als negative Kontrolle dienten unbehandelte Zellen und für die Positivkontrolle wurde Wasserstoffperoxid verwendet. Nach 24 Stunden Inkubationszeit mit den Substanzen erfolgte die Nachweisreaktion.

Die eingesetzten Konzentrationen betragen:

DMSO: 1 %, 2%, 3%, 5% und 10%;

SNAP: 100  $\mu$ M, 250  $\mu$ M, 500  $\mu$ M;

Ionomycin: 100 nM, 250 nM, 500 nM;

LPS: 100ng/ml;

Die Durchführung des MTT-Assays erfolgte mit dem *CellTiter 96® Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Technical Bulletin Kit* von Promega. Gearbeitet wurde nach dem Protokoll des Herstellers. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Dynex MRX TC Revelation Microplate Reader. Die Daten wurden mittels Microsoft Office Excel 2010 ausgewertet.

### 3.2.9 Transwell Migrations-Assay

Mit dem Migrations-Assay soll die Motilität von BM-M $\phi$  und neutrophilen Zellen *in vitro* quantifiziert werden. Es kam zur Verwendung von Transwell-Filtern mit einer Porengröße von 5  $\mu\text{m}$  für 24-Loch-Kulturplatten. Für die Untersuchung der Makrophagen Migration wurde in Triplikaten gearbeitet und in die Vertiefungen von 24-Loch-Platten jeweils 600  $\mu\text{l}$  M $\phi$ -Medium vorgelegt, sowie zusätzlich 100 ng/ml ***Monocyte Chemotactic Protein-1*** (MCP-1) dazu gegeben. Um die basale Migration ohne Einfluss des spezifischen Lockstoffs zu analysieren, wurde jeweils ein Duplikat ohne MCP-1 angelegt. Zu allen Vertiefungen wurden die Transwell-Filter eingesetzt und die 9 Tage alten Makrophagen (s. 3.2.3) in einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen in einem Volumen von 100  $\mu\text{l}$  zugegeben. Für die Analysen des Migrationsverhaltens von neutrophilen Zellen wurde als Immunzell-Quelle das Knochenmark verwendet. Diese Zellen wurden in gleicher Konzentration ( $5 \times 10^6$  Zellen/100 $\mu\text{l}$ ) im Testmedium gehalten und mit 250 ng/ml ***Keratinocyte chemoattractant*** (KC) stimuliert. Für beide Immunzell-Populationen erfolgte die Migration für 4 Stunden bei 37°C und 10 % CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Anschließend wurden die Zellen auf der Oberseite zusammen mit dem Transwell-Filter entfernt und die migrierten Zellen in der Vertiefung geerntet und am selben Tag mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie analysiert.

## 3.3 Fluoreszenz-basierte Methoden

### 3.3.1 FACS (*Fluorescence Activated Cell Sorting/Scanning*)

Zellen exprimieren Proteine, deren Nachweis zur Identifizierung des Zelltyps sowie zur Feststellung ihres Aktivierungsgrades genutzt werden kann. Mittels durchflusszytometrischer Analysen kann die Intensität der Proteinexpression einzelner Zellen bestimmt werden. Bei der FACS-Analyse, handelt es sich um eine Antigen-Antikörper-

## Material & Methoden

---

Reaktion, bei der ein antigenspezifischer Antikörper bspw. an einen Zelloberflächenmarker bindet, um das nachzuweisende Molekül zu markieren. Primäre Antikörper können entweder direkt mit einem Fluorochrom markiert sein, aber auch ohne Fluoreszenzkopplung eingesetzt werden. Im letzteren Falle wird ein Fluoreszenzfarbstoffmarkierter, sekundärer Antikörper benötigt, der an dem Primärantikörper bindet. Im Rahmen der FACS-Analyse können auch die Zellgröße und die Binnenstruktur der Zellen bestimmt werden, um damit Aussagen über den morphologischen Zustand von Zellpopulationen treffen zu können [192].

Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch eine Kapillare gesaugt und die Zellen einzeln sequentiell durch das fokussierte Licht von Lasern gelenkt. Dadurch werden die Zellen angeregt und die daraus resultierende Lichtstreuung, sowie die emittierte Fluoreszenz der Antikörper-gekoppelten Fluorophore mittels Detektoren nachgewiesen. Abhängig von der Größe und Komplexität einer Zelle variiert die Menge des gestreuten Lichtes. Die im Vorwärtsstreulicht (*forward scatter* (FSC)) bestimmte Absorption des Lichtes lässt auf die Zellgröße schließen. Das im 90° Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht (*side scatter* (SSC)) hängt von der Zelldichte und der Granularität der Zelle ab.

Im Rahmen der Doktorarbeit wurden folgende Fluoreszenzfarbstoffe verwendet: Allophycocyanin (APC), Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), PE-Cychrom5 (PE-Cy5), PE-Cychrom7 (PE-Cy7), Peridinin-chlorophyll protein (PerCP), Peridinin-chlorophyll protein-Cychrom5.5 (PerCP-Cy5.5) und Pacific blue (PB). Dadurch konnten auch Mehrfachfärbungen durchgeführt werden.

Die Daten wurden entweder als Dot Plot oder als Histogramm aufgetragen und mit der BD FACS Diva<sup>TM</sup> Software und der FlowJo Analysesoftware ausgewertet.

### 3.3.2 Oberflächen FACS Färbung

Zur Durchführung wurden die Zellen (3.2.3, 3.2.4, 3.2.5 und 3.2.9) nach dem Ernten direkt in FACS-Röhrchen überführt ( $1 \times 10^6$ - $0,5 \times 10^6$  Zellen/Röhrchen), bei 4°C und 300xg 10 Minuten lang sedimentiert und der Überstand mittels einer Absaugvorrichtung entfernt. Zur Absättigung der Fc-Rezeptoren wurden die Zellen mit 25 µl des 2.4G2 (2,5µg/ml in FACS-Medium) Antikörpers (s. Kapitel 3.1.8.1) pro Röhrchen für 10 min bei 4°C inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte eine weitere Inkubation mit 25 µl des entsprechenden Antikörpers bzw. der Isotypkontrolle in entsprechender Verdünnung (s. 3.1.8.3) für 20 Minuten bei 4°C im Dunkeln. Um die Lebensfähigkeit der Immunzellen zu überprüfen wurde zusätzlich eine zweite separate Färbung der Proben mit den Reagenzien Annexin V und 7-AAD durchgeführt (3.1.8.4). Während der Inkubation wurden die Proben einmal gemischt. Der überschüssige Antikörper wurde mit 1 ml FACS-Puffer ausgewaschen, erneut zentrifugiert (10 min, 4°C, 300xg), der Überstand abgesaugt und die Zellen in 350 µl 1xPBS/0,7% PFA fixiert. Bis zur Messung am FACS-Gerät wurden die Proben bei 4°C im Dunkeln gelagert.

### 3.3.3 Quantifizierung apoptotischer und nekrotischer Zellen

Während der frühen Phase des Zelltodes stülpen die Zellen Phosphatidylserin (PS), das in viablen Zellen nur in der inneren Zellmembran lokalisiert ist, an die Membranaußenseite. Annexin V bindet  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig mit einer hohen Affinität für Phosphatidylserin (PS) und wird daher für den Nachweis für apoptotischer Zellen verwendet. Für die Detektion mittels FACS wurde fluorochromgekoppeltes Annexin V, verwendet [193, 194].

Mit Hilfe des Farbstoffes 7-AAD (7-Aminoactinomycin) lassen sich tote Zellen bzw. spätnekrotische Zellen färben. 7-AAD hat die Eigenschaft in die DNA von Zellen zu interkalieren. Es dringt nur in Zellen ein, die keine intakte Zellmembran besitzen und dient somit als „Vitalfarbstoff“. Auf der gleichen Weise wirkt auch *Fixable Viability Dye eFluor™ 450* (FVD) als Vitalitätsfarbstoff, jedoch lassen sich die Proben mit diesem Reagenz fixieren und müssen nicht direkt wie bei Verwendung von 7-AAD innerhalb

## **Material & Methoden**

---

von 60 min gemessen werden. Die Analysen mit diesem Reagenz wurden nach dem Standardprotokoll des Herstellers durchgeführt.

Alle Apoptose-/Nekrosefärbungen wurden parallel mit der extrazellulären FACS-Färbung (3.3.2) mit Annexin/7-AAD entsprechend der Verdünnung (3.1.8.4) durchgeführt. Nach Behandlung der unterschiedlichen Immunzell-Populationen mit den Farbstoffen wurden die Proben 15 Minuten lang bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 300µl HBSS-Puffer (s. Tabelle 4) je Probe. Die Proben wurden möglichst im Dunkeln gehalten und bis zur Messung auf Eis gestellt. Nach Anweisungen des Herstellers wurden die Proben innerhalb von 60 Minuten gemessen.

### **3.3.4 Zytokinmessung mittels *Cytometric Bead Array* (CBA)**

Mit Hilfe des *Cytometric Bead Array* (CBA) von BD™ lassen sich mehrere Zytokine gleichzeitig in einer Probe quantifizieren. Es handelt sich um eine durchflusszytometrische Anwendung, bei der Partikel (Beads) mit spezifischen Antikörpern gegen bestimmte Zytokine gekoppelt werden [195]. An diese Zytokine bindet auch ein Sekundärantikörper, der mit dem Fluoreszenzfarbstoff Phycoerythrin (PE) markiert ist. Die Fluoreszenzintensität steigt proportional mit gebundenen Zytokinmenge an; daher kann durch einen Standard auf die Zytokin-Konzentration in der Probe zurückgeschlossen werden. Die Fluoreszenzintensitäten zeigen zytokinabhängig unterschiedlich starke Fluoreszenzintensitäten bei APC und APC-Cy7. Im Dot Plot lassen sich die zu messenden Zytokine in unterschiedlichen, klar voneinander abgetrennten Bead-Populationen darstellen, da jede Bead-Art eine individuelle Kombination aus zwei Fluoreszenzfarbstoffen in unterschiedlichen Konzentrationen besitzt.

Für die Zytokinmessung wurde das CBA Flex Set der Firma BD Biosciences (s. Tabelle 7) verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Zur Messung wurden Überstände von isolierten Milzzellen (3.2.5), ausdifferenzierten BM-DC und BM-Mφ nach 1, 3, 6 und 24 Stunden Stimulierung (3.2.6) und Überstände von polyklonal stimulierten T-Zellen (3.2.5.1 und 3.2.5.2) nach 1, 3, 6, 24, 48, 96 Stunden Inkubationsdauer verwendet. In den Überständen von Antigen präsentierenden Zellen wurden

IL-1 $\beta$ , IL-10, IL-12, IL-6 und TNF- $\alpha$  nachgewiesen und in den T-Zell-Überständen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 und IL17A.

Alle Zellüberstände wurden bei -20°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt für die Zytokinanalyse aufgetaut. Die Messung der Proben erfolgte am FACS Canto II und LSR II der Firma BD und wurde mit Hilfe von FCAP Array™ Software ausgewertet.

### 3.4. Tierexperimentelle Methoden

#### 3.4.1 Tierhaltung und Versuchstiere

Für die verschiedenen Experimente wurden im Rahmen dieser Arbeit Mäuse mit inaktiviertem KSRP-Gen (KSRP<sup>-/-</sup>) des Inzuchtstammes C57BL/6 verwendet. Diese wurden anfangs aus der Arbeitsgruppe Chen bezogen, wo sie auch generiert wurden [49]. Durch Verpaarung von heterozygoten Tieren (KSRP<sup>+/-</sup>), wurde die Zucht aufrechterhalten und somit die Gewinnung von experimentalen KSRP<sup>-/-</sup> (KO) und KSRP<sup>+/+</sup> (WT) Tieren garantiert. Die Versuchstiere wurden von der zentralen Versuchstiereinrichtung der Universität Mainz (TARC) bezogen und unter kontrollierten pathogenfreien Bedingungen in einem 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus mit Wasser und Futter ad libitum gehalten. Die Tierversuche wurden vom ethischen Gremium genehmigt und nach dem deutschen Tierschutzgesetz und den Richtlinien für die Verwendung von Versuchstieren gemäß dem Leitfaden für die Pflege und Verwendung von Labortieren der Nationalen Gesundheitsinstitute durchgeführt.

Abhängig von dem Mäusestamm variiert auch der genetische Hintergrund dieser Mäuse, daher wurde auch der DBA/1 Mäusestamm für die Zucht verwendet. Die Mäuse auf dem DBA/1 Hintergrund exprimieren überwiegend den Haplotyp H-2q auf ihrem MHC-II Komplex. Das macht die Mäuse anfälliger für das sehr häufig genutzte und etablierte Krankheitsmodell der Kollagen induzierten Arthritis (CIA) [172, 196, 197]. Da Mäuse mit dem C57BL/6 Hintergrund einen anderen Haplotypen (H-2b) auf dem MHC-II Komplex exprimieren, kann bei ihnen kaum oder nur sehr schwer eine Kollagen induzierte Arthritis durch spezifische autoreaktive T-Zellen ausgelöst werden

## **Material & Methoden**

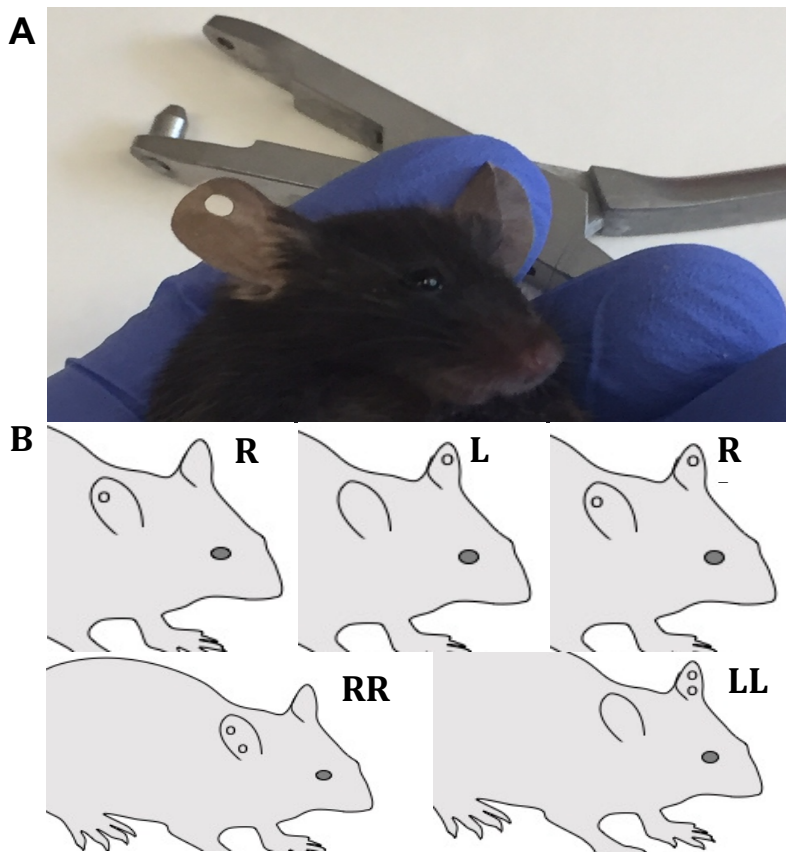
---

[198]. Um zu gewährleisten, dass die C57BL/6 KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäuse sich effektiv mit dem autoimmunen Krankheitsmodell (CIA) induzieren lassen, wurden die KSRP<sup>+/-</sup> heterozygoten Tieren mit dem DBA/1 Stamm verpaart. Die Rückkreuzung wurde nach dem Schema von Kikawadka et al [199] bis zur zehnten Generation durchgeführt, bevor die Tiere für die jeweiligen Experimente herangezogen wurden.

### **3.4.2 Typisierung von Mäusen**

Damit der genetische Hintergrund von unseren Zuchttieren bestimmt werden konnte, wurden die entwöhnten Jungtiere ab der 3-4 Woche typisiert und damit gleichzeitig markiert, auf diese Weise können mehrere Tiere im gleichen Käfig gehalten und unterschieden werden. Mit einem Ohrstanzer werden die Mäuse im Käfig markiert, dazu erhält die erste Maus im Käfig eine R Markierung (1 Loch im rechten Ohr), die zweite Maus wird L (1 Loch in linkem Ohr), die dritte RL (rechts und links im Ohr jeweils ein Loch), die vierte RR (2 Löcher im rechten Ohr) und die fünfte Maus mit LL (2 Löcher im linken Ohr) markiert (siehe Abb. 1)





**Abb. 1 Standardmuster für die Ohrloch-Nummerierung von Mäusen**

Teilabbildung A zeigt eine Originalaufnahme einer rechts markierten C57BL/6 Maus. Im Hintergrund ist das Werkzeug, der Ohrstanzer zu sehen, mit dem die Maus markiert wurde. In Teilabbildung B ist eine schematische Darstellung von Ohrlochnungen bei Mäusen dargestellt.

Die erhaltenen Ohrstanzen, dienen weiterhin als Quelle für die Gewinnung genomischer DNA und werden in 0,2 ml PCR-Tubes gesammelt. Um die genomische DNA aus den Ohrstanzen zu präparieren wurde 50 µl BASE-Lösung (s. Tabelle 4) zum Tube dazugegeben und 30 min bei 95°C inkubiert und dann auf 10 °C abkühlen gelassen. Danach wurden 50 µl NEUTRALISATION-Lösung dazugegeben und das Ganze 10 sekundenlang intensiv gemischt. Die enthaltene isolierte DNA in der Lösung konnte direkt für die PCR eingesetzt werden.

### 3.4.3 PCR zur KSRP- Genotypisierung

Die aus den Ohrstanzen gewonnene DNA wurde mittels PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese auf den Genotyp hin untersucht. Die verwendeten Primer (s. Tabelle 12) und die Reaktionsbedingungen sind in Tabelle 13 aufgeführt.

## Material & Methoden

Tabelle 13: Übersicht eines PCR-Ansatzes zur Genotypisierung und Reaktionsbedingungen

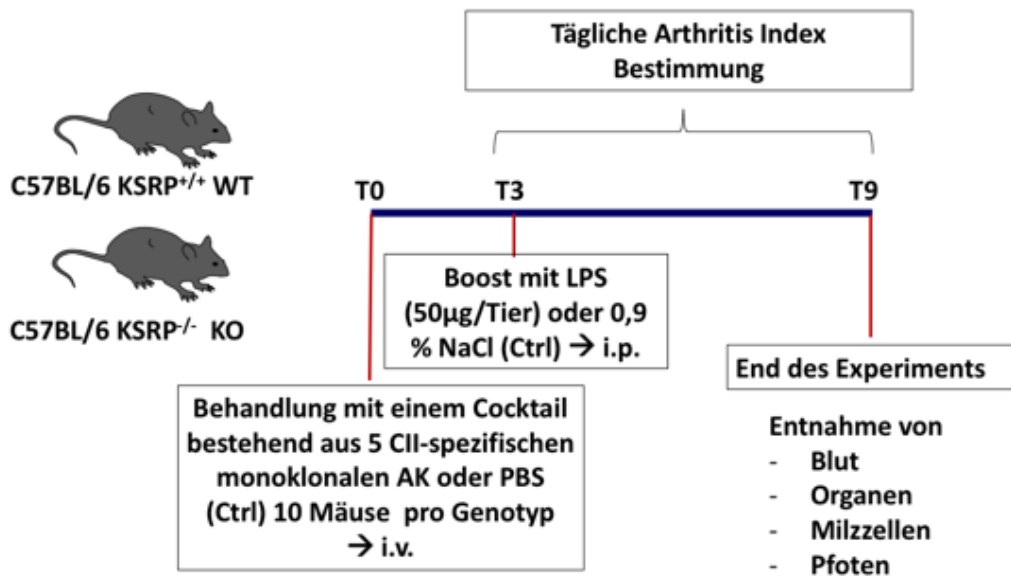
| KSRP Genotypisierung |         | KSRP Bedingungen |        |
|----------------------|---------|------------------|--------|
| REDTagReady-Mix      | 12,5 µl | 94°C             | 3 min  |
| 10 µM 5' Primer WT   | 1,5 µl  | 35 x             |        |
| 10 µM 5' Primer KO   | 1,5 µl  | 94 °C            | 30 sec |
| 10 µM 3' Primer      | 3 µl    | 60 °C            | 1 min  |
| PCR-H <sub>2</sub> O | 3,5 µl  | 72 °C            | 1 min  |

Nach der PCR wurden die kompletten Proben auf 2%igen Agarosegelen aufgetragen und bei 120 V gelelektrophoretisch nach ihrer Ladung und Größe aufgetrennt. Bei Tieren mit heterozygoten Hintergrund erwartet man zwei Banden mit einer Größe von 300 und 250 Basenpaare (bp) und homozygote Tiere zeigen entweder eine Bande bei 300 bp (WT) oder 250 bp (KO).

### 3.4.4 Kollagen Antikörper induzierte Arthritis (CAIA)

Da C57BL/6 Mäuse mit inaktiviertem KSRP-Gen nahezu resistent gegen die klassische Induktion einer Arthritis durch Kollagen Typ II sind, wurde die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA) als ein angemessenes autoimmunes Krankheits-Mausmodell gewählt (s. Kapitel 1.6.3.2) [171, 200]. CAIA wurde in C57BL/6 Mäuse mit einem Gemisch von 5 spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen Kollagen Typ II (s. Tabelle 7) induziert. Appliziert wurden 2,54 mg des monoklonalen Antikörper-Gemisches intravenös (i.v.) in die Schwanzvene der Tiere. Tiere, die als Kontrolle dienen sollten, wurden ebenfalls i.v. mit PBS gespritzt (s. Abb. 2). An Tag drei wurde die mit CAIA behandelte Gruppe mit 50 µg LPS behandelt („geboostet“) um die Entwicklung der Erkrankung zu unterstützen und die Kontroll-Gruppe erhielt 0,9% NaCl intraperitoneal (i.p.) appliziert. Laut Protokoll des Herstellers sollten ab dem vierten Tag pathologisch phänotypische Veränderung sichtbar werden, daher wurde bereits nach der LPS-Behandlung, bis zum neunten Tag, an dem die Tiere getötet wurden, täglich der Arthritisindex (s. 3.4.4.1) bestimmt. Der Krankheitsverlauf zwischen den Wildtypen (WT) und KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäusen wurde verglichen und dokumentiert.

## Material & Methoden

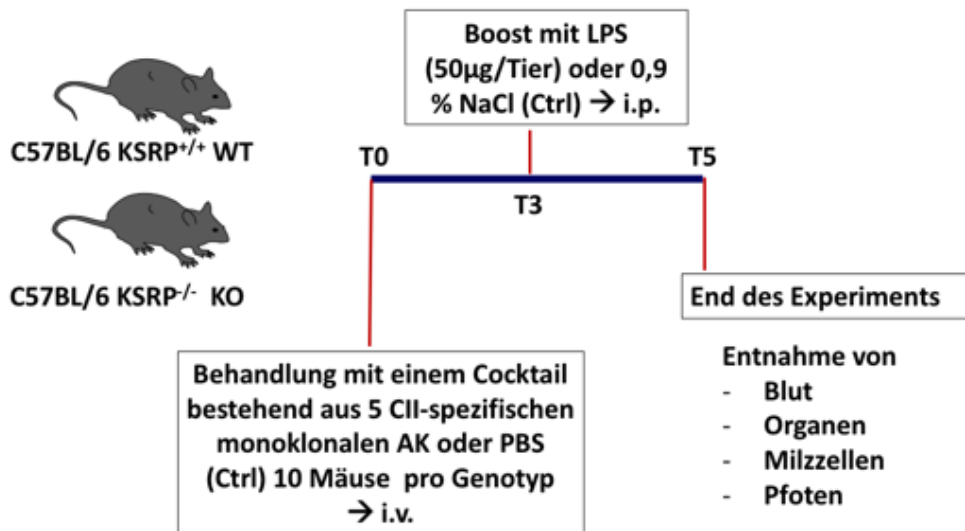


**Abb. 2: Versuchsschema zur Induktion von „Langzeit“- CAIA in KSRP<sup>-/-</sup> KO Mäuse**

Bei diesem CAIA-Modell (Kollagen-Antikörper induzierte Arthritis) handelt es sich um ein Mausmodell für rheumatoide Arthritis bei dem ein Gemisch von 5 monoklonalen Antikörpern verwendet wird, die gegen Kollagen Typ II gerichtet sind. Die Applikation erfolgt über i.v. Injektion der Schwanzvene, dadurch kommt es ab dem 2-4 Tag zur Entwicklung von Arthritis. Die Versuchstiere wurden in zwei verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt: Während den Tieren aus der 1. Gruppe an Tag 0 2,5 mg/Maus AK-Gemisch gespritzt und an Tag 3 50 µg/Maus LPS („boost“) appliziert wurde, erhielt die Kontroll-Gruppe (Ctrl) statt den AK PBS und statt LPS 0,9 % NaCl. Weiterhin wurde ab dem dritten Tag bis zum Tötungstag Tag 9 der Arthritisindex von allen behandelten Tieren bestimmt. Am Versuchsende kam es zur Entnahme von Blut, Organen, Milzzellen und Pfoten, die für folgende Analysen weiter aufgearbeitet wurden.

Am Ende des Experiments (Tag 9) wurde den Tieren Blut, Organe, Pfoten und Immunzellen entnommen. Die Pfoten wurden in 4% Formalin eingelegt und für die histologische Präparation an die Pathologie der Uniklinik Mainz weitergegeben. Das Blut wurde genutzt um daraus die PBMC zu isolieren und die Unterschiede der Inflammation anhand des Zytokinmusters zu bestimmen. Organe, wie Lymphknoten, Leber und ein Teil der Milz wurden bei -80 °C weggefroren, um aus diesen Geweben in weiteren Experimenten mRNA-Expressions-Analysen durchführen zu können. Ansonsten wurde die Milz neben der T-Lymphozyten Isolierung auch für die Charakterisierung der Antigen präsentierenden Zellen (APC) genutzt.

In weiteren Experimenten wurde der Versuch wiederholt und am fünften Tag beendet, mit dem Hintergrund Unterschiede auf Immunzelebene zwischen den Genotypen bereits vor der pathologisch, phänotypischen Ausprägung zu detektieren (s. Versuchsaufbau Abb. 3).



### Abb. 3: Versuchsschema zur Induktion von „Kurzzeit“- CAIA in KSRP<sup>-/-</sup> KO Mäuse






Bei diesem CAIA-Modell (Kollagen-Antikörper induzierte Arthritis) handelt es sich um ein Mausmodell für rheumatoide Arthritis bei dem ein Gemisch von 5 monoklonalen Antikörpern verwendet wird, die gegen Kollagen Typ II gerichtet sind. Die Applikation erfolgt über i.v. Injektion der Schwanzvene, dadurch kommt es ab dem 2-4 Tag zur Entwicklung von Arthritis. Die Versuchstiere wurden in zwei verschiedene Behandlungsgruppen eingeteilt: Während den Tieren aus der 1. Gruppe an Tag 0 2,5 mg/Maus AK-Gemisch gespritzt und an Tag 3 50µg/Maus LPS („boost“) appliziert wurde, erhielt die Kontroll-Gruppe (Ctrl) statt den AK PBS und statt LPS 0,9 % NaCl. Weiterhin wurde ab dem dritten Tag bis zum Tötungstag Tag 5 der Arthritisindex von allen behandelten Tieren bestimmt. Am Versuchsende kam es zur Entnahme von Blut, Organen, Milzzellen und Pfoten, die für folgende Analysen weiter aufgearbeitet wurden.

#### 3.4.4.1 Bestimmung des Arthritisindex

Die Schwere der Arthritis wurde optisch am Grad der Pfortenschwellung bestimmt. Wenn die Pfoten keine erkennbaren Schwellungen aufwiesen, erhielt die Maus einen Arthritisindex (AI) von 0. Mit Zunahme der Schwellung (wie in Tab. 14 beschrieben) im Bereich der Knöchel und Gelenke wurde der Index jeder Pforte pro Maus addiert, so dass der maximal zu erreichende AI für jedes Tier bei 16 sein konnte. Innerhalb der Versuchsgruppen wurde der Arthritisindex durch die Bildung der Mittelwerte aller Tiere jeder Versuchsgruppe bestimmt. Die Bestimmung des AI wurde verblindet durchgeführt.

## Material & Methoden

Tabelle 14: Bestimmung des Arthritisindex

| Index | Pfoten  | Merkmale  |
|-------|---|---|
| 0     |    | Normal /<br>Keine Schwellung an Zehen oder Gelenken                   |
| 1     |    | Schwellung an einem Zeh   |
| 2     |   | Schwellung von 2 -3 Zehen oder nur des Knöchelbereichs                |
| 3     |  | Schwellung des Knöchelbereichs und des Metatarsus/-carpus             |
| 4     |  | Extensive Schwellung der gesamten Pfote, eingeschränkte Beweglichkeit |

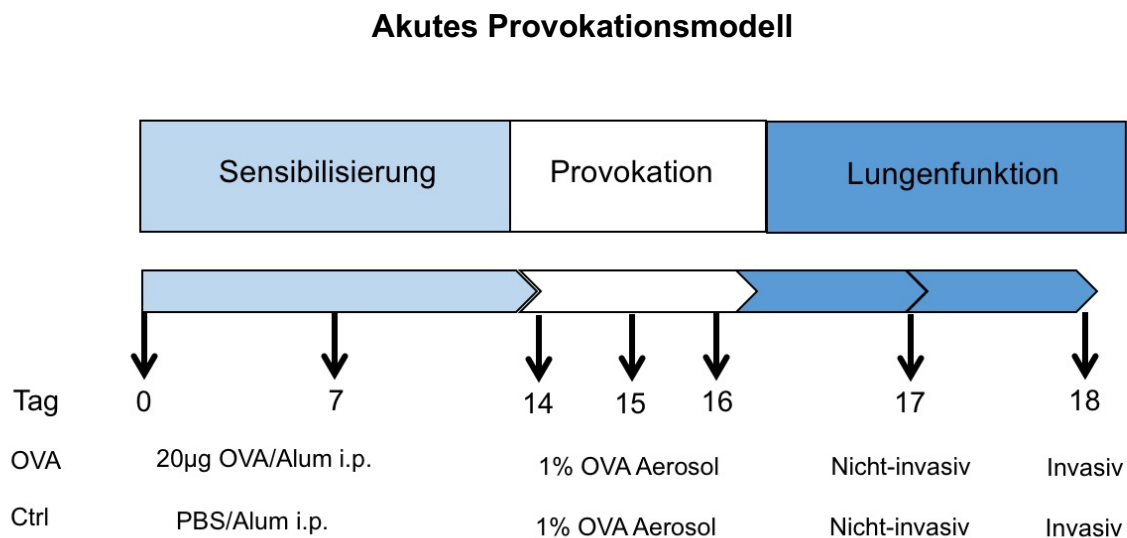
### 3.4.4.2 Histologische Paraffinschnitte und Übersichtsfärbung

Die histologischen Paraffinschnitte der Pfoten wurden in Kooperation mit dem Institut für Allgemeine Pathologie in der Universitätsmedizin Mainz unter Leitung der Medizintechnischen Assistentin (MTA) Silke Mitschke angefertigt. Dazu wurden die Pfoten zuerst in 4% Formalin für 24 Stunden fixiert, sowie für 3-4 Wochen in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Schnitte wurden mit 5 µm Dicke angefertigt und unter standardisierter Methode im Leica ST 4040 Autostainer mit Hämatoxylin und Eosin (H&E) gefärbt. Die H&E-Färbung ist die klassische Methode für histologische Übersichtspräparate bei der das Hämatoxylin die Kerne und das Eosin überwiegend die interzelluläre Substanz anfärbt [201, 202].

### 3.4.5 Kollagen-induzierte Arthritis (CIA)

Zur Induktion des klassischen tierexperimentellen Modells, der Kollagen-induzierten Arthritis (*Collagen Induced Arthritis*) wurden Tiere aus dem DBA/1 x C57BL/6 KSRP<sup>+/-</sup> Stamm verwendet (s. Kapitel 1.6.3.1) [200]. Die Tiere wurden in zwei Haupt- mit jeweils zwei Untergruppen eingeteilt. Den WT- und KSRP KO-Tieren aus der Kontrollgruppe wurden jeweils 50 µl PBS appliziert. Die zweite CIA-Gruppe, die ebenfalls aus WT- und KO-Tieren bestand, wurde mit 100 µg Hühner-Kollagen II (CII) immunisiert (s. Tabelle 3). Dazu wurde eine Emulsion aus gleichen Teilen einer wässrigen CII-Lsg. (4 mg/ml in 0,05 M Essigsäure) und *Complete Freund's Adjuvant* (CFA) homogenisiert, das aus einer Mineralölfraction und hitzeinaktivierten Mykobakterien besteht. Es wurde solange unter Kühlung homogenisiert bis eine milchige Emulsion entstand. Von dieser wurden jeder Maus aus der CIA-Gruppe 50 µl im Schwanzansatz intradermal injiziert. An Tag 21 und 31 wurde die Immunisierung (*boost*) auf gleicher Weise wiederholt. Ab der zweiten Applikation konnten pathologische Veränderungen bei den CIA-Mäusen beobachtet werden, die wie in Kapitel 3.4.4.1 beschrieben über den AI dokumentiert wurden.

### 3.4.6 Asthma bronchiale Induktion

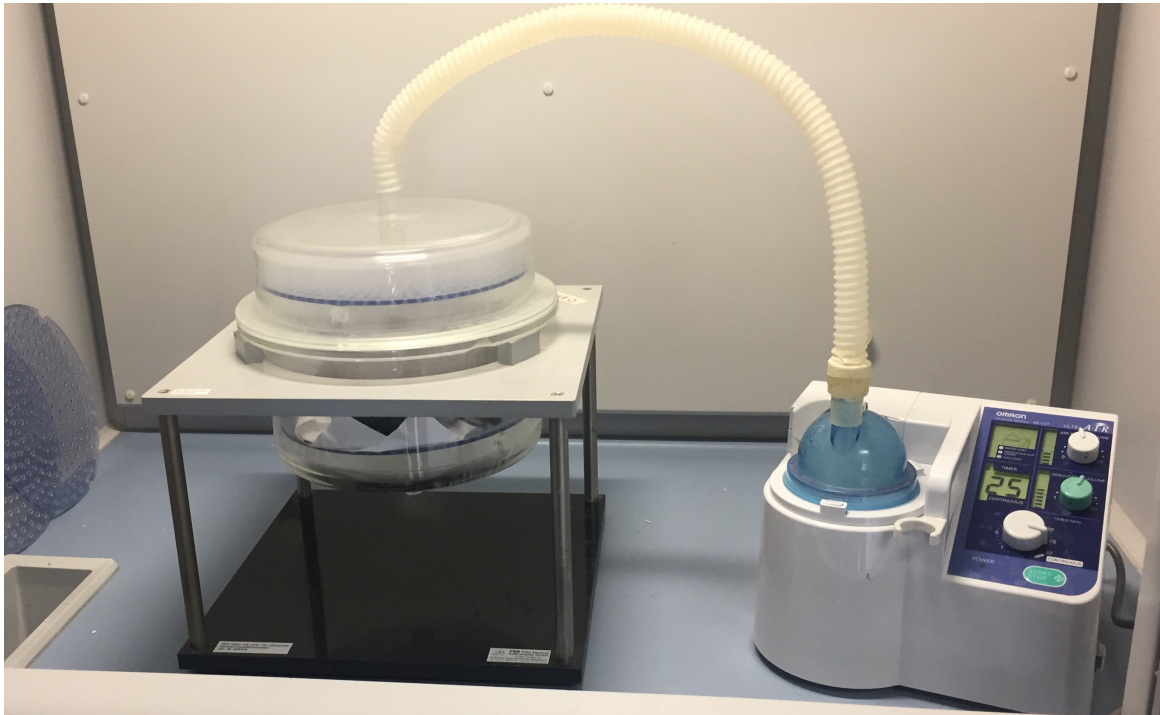


**Abb. 4: Immunisierungsschema zur Asthma Induktion**

Bei diesem akuten Provokationsmodell werden die behandelten Tiere an Tag 0 und Tag 7 mit 20 µg OVA/Alum i.p. immunisiert, während die Kontroll-Tiere einen PBS/Alum-Mix erhalten. Die Provokation verläuft bei beiden Gruppen gleich. Die Mäuse werden an Tag 14, 15 und 16 mit einer 1%igen OVA-Lösung für 30 min in einer Aerosol-Kammer vernebelt. An Tag 17 werden die Mäusen einer nicht-invasiven und an Tag 18 einer invasiven Lungenfunktionsmessung unterzogen.

Als ein weiteres murines Krankheitsmodell wurde ein klassisches allergisches Atemwegsentzündungs-Modell, das Akute Provokationsmodell, gewählt (s. Abb. 4) [203-205]. Die Mäuse wurden in Kontroll-(Ctrl) und Behandlungs-Gruppen (OVA) eingeteilt. An Tag 0 und 7 wurde eine Sensibilisierung gegenüber dem Modellallergen Ovalbumin (OVA) durchgeführt. Dazu wurden die Mäuse intraperitoneal mit 100 µl OVA/Aluminiumkaliumsulfatlösung-Komplex gespritzt, das einer Menge von 20 µg OVA entspricht. Eine Woche nach der letzten Sensibilisierung wurden die Tiere mit einer 1%igen OVA-Lösung für 30 Minuten in einer Aerosol-Kammer exponiert (s. Abb. 5). Diese Provokation der sensibilisierten Mäuse erfolgte an drei hintereinander folgenden Tagen (Tag 14, 15 u. 16). Anschließend wurde die Lungenfunktion gemessen, dazu erfolgte die nicht-invasive Lungenfunktions-Messung (3.4.6.1.1) an Tag 17 und die invasive Messung des Atemwegswiderstands (3.4.6.1.2) an Tag 18. Im Anschluss wurde die Bronchoalveolar Lavage (BAL) (s. 3.4.6.1.3) durchgeführt und die Lunge entnommen, um auftretende Entzündungsreaktionen mit Hilfe von histologischen Lungenschnitten (s. 3.4.6.1.5) analysieren zu können.





**Abb. 5: Aerosol-Kammer**

*In dieser Aerosol-Kammer wurden bis zu fünf Tiere gleichzeitig mit einer 1%igen OVA-Lösung für 30 Minuten vernebelt. Diese OVA-Provokation wurde an drei hintereinanderfolgenden Tagen (Tag 14, 15 und 16) durchgeführt.*

### 3.4.6.1 Lungenfunktionsmessung

Der bronchoalveoläre Strömungswiderstand sowie die **Atemwegsreaktivität (AR)** stehen in direktem Zusammenhang mit Größe und Alter eines Individuums. Als Schutzmechanismus vor zu tiefer Inhalation schädlicher Substanzen, ist die Lunge in der Lage auf einen unspezifischen Stimulus hin die Atemwege zunehmend zu verengen. Beim allergischen Asthma kommt es zu einer unphysiologisch starken Verengung der Atemwege und einem erhöhten Atemwegswiderstand, das als **Atemwegshyperreaktivität (AHR)** bezeichnet wird [206, 207]. In der vorliegenden Arbeit wurde Metacholin (MCh) als unspezifisch inhalativer Stimulus verabreicht um die folgenden Auswirkungen auf den Strömungswiderstand mit einer nicht-invasiven und einer invasiven Lungenfunktionsmessung zu analysieren.

Diese Messungen erfolgten in Zusammenarbeit mit der Asthma Core Facility des Forschungszentrums für Immuntherapie.

## Material & Methoden

---

### 3.4.6.1.1 Nicht-invasive Messung (Ganzkörperplethysmographie)

24 Stunden nach der letzten Aerosol-Provokation wurden die Versuchstiere für die nicht-invasive Messung in die Kammern des Ganzkörperplethysmographen der Firma BUXCO® gesetzt [208]. Die Kammern wurden zuvor nach Herstellerprotokoll kalibriert.

In diesen Kammern, die mit Druckmesser, Luftfeuchtheitsmesser, Pneumotachographen und Aerosolkopf verbunden sind, konnten die Mäuse sich frei bewegen, daher wurde den Mäusen vor der eigentlichen Messung eine Ruhephase von 5 min gegeben. Anschließend wurde während der Normalatmung der Maus der Kammerdruck gemessen, zur Software weitergeleitet und dort als Diagramm dargestellt. Druckveränderungen in den Kammern, die durch Inspiration und Expiration der Versuchstiere zustande kamen, stehen in direkter Relation zum Atemwiderstand.

Zu Beginn der Messung wurde die Ruheatmung der Versuchstiere für 5 min gemessen und die Werte gemittelt. Der erhaltene Wert wurde als Ruhewert (*baseline*) definiert. Über einen Vernebler wurde in ansteigender Dosierung (6,25; 12,5; 25 und 50 mg/ml und 7min/Dosierung) in einem ca. 3-minütigen Intervall aerolisiertes Methacholin in die Kammern eingeleitet. Nach jeder Methacholindosis erfolgte eine Pause von 7 Minuten. Die Änderung des Drucks in der Kammer bzw. die Änderung des Atemwiderstandes wurde gemessen und der Mittelwert berechnet. Aus den resultierenden Druckänderungen, bedingt durch die Inspiration und Expiration der Tiere, errechnet sich ein dimensionsloser Parameter, der sogenannte PenH- (*pause enhanced*) Wert. Dieser steigt proportional zum zunehmenden Atemwiderstand an [209].



**Abb. 6: Darstellung von Ganzkörperplethysmographen der Firma BUXCO®**

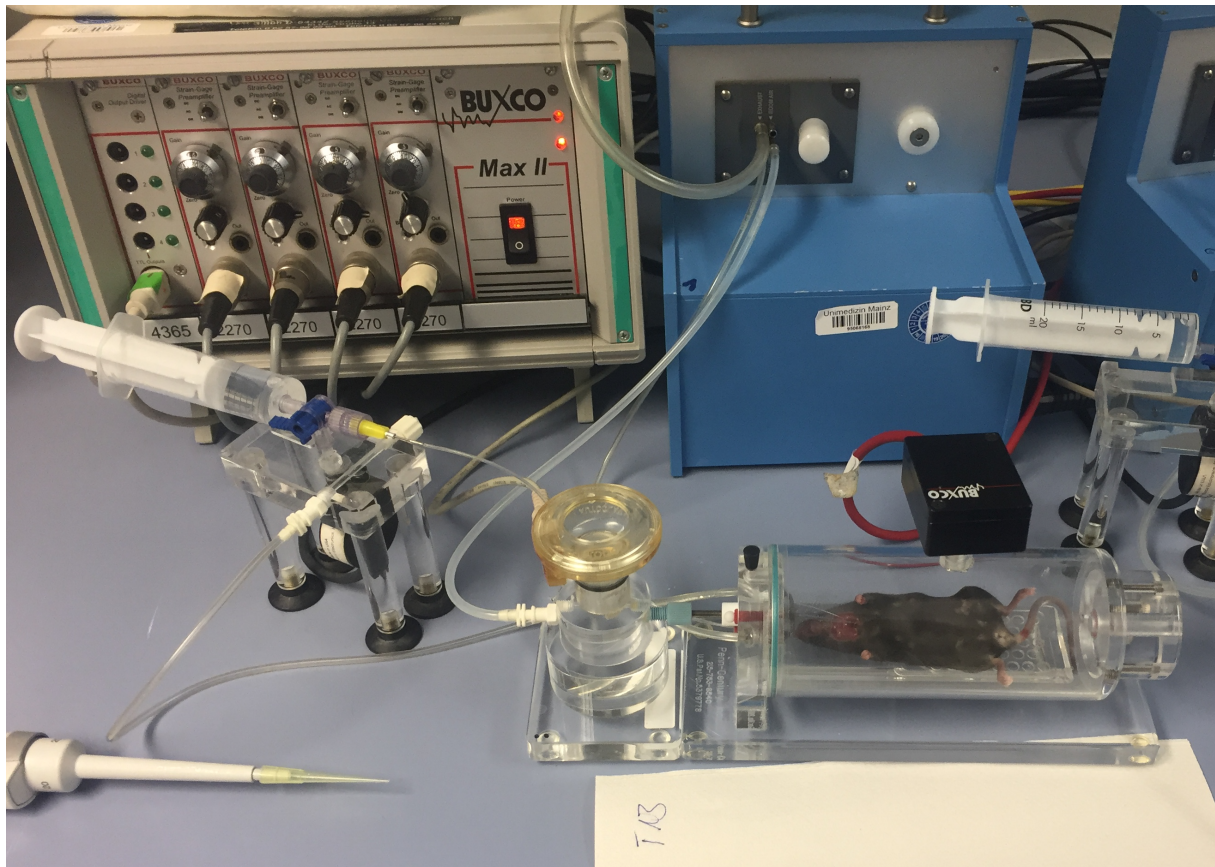
*An dem Ganzkörperplethysmographen-System befinden sich vier separate Kammern, so dass parallel 4 Mäuse gleichzeitig gemessen werden konnten. Nach der, über die Ruheatmung, definierten Erfassung der Ruhephase (baseline) wurden ansteigende MCh-Dosen (6,25; 12; 25; 50mg/ml) in 5-minütigen Intervallen gemessen. Im Anschluss daran erfolgte eine 7-minütige Ruhepause. Die Veränderung des Atemwiderstandes der Mäuse wurde als PenH an dem mit dem System verbundenen Computer dargestellt.*

## Material & Methoden

---

### 3.4.6.1.2 Invasive Messung mittels BUXCO

Mit dem invasiven System der Firma BUXCO® wurde die Atemwegshyperreaktivität an den Versuchstieren gemessen, die zuletzt vor 48 Stunden mit aerosolisiertem OVA provoziert wurden [210]. Dazu wurden die Tiere mit Pentobarbital 90 mg/kg i.p betäubt, das Fell und die Haut oberhalb des Cervix entfernt und mit zwei Pinzetten sowie einem Skalpell der Ösophagus und die Trachea freigelegt. Mit einem kleinen vertikalen Schnitt wurde die Trachea geöffnet, ein 16 mm Tubus vorsichtig eingeführt und mit einem medizinischen Faden in dieser Position fixiert. Die anästhesierten und tracheotomierten Tiere wurden in die Kammern eines Plethysmographen gelegt und mechanisch ventiliert. Beim Verschließen der Kammer wurde ein weiterer Schlauch in den Oesophagus intubiert, der mit einem Druck-Messfühler (*Transducer*) verbunden ist. Gemäß Protokoll wurden die Kammern vor jeder Messung kalibriert. Für die Lungenfunktionsmessung wurde zunächst die Grundreaktivität der Atemwege bestimmt, dazu wurde eine Minute lang die Baseline aufgezeichnet. Im zweiten Schritt wurden für 30 Sekunden mit der geringsten Dosis beginnend (6,25 mg/ml) eine Methacholinlösung über den Tubus direkt in die Lunge aerosolisiert und die Änderung des Atemwiderstands für 5 Minuten aufgezeichnet. Die weiteren Methacholin-Dosen (12,5; 25; und 50 mg/ml) wurden mit aufsteigender Konzentration aerosolisiert und die Schritte mehrmals wiederholt. Die aufgezeichnete Druckdifferenz wurde mit einer speziellen Software (BioSystem XA) des Herstellers und Excel ausgewertet. Der Atemwegswiderstand wird als Resistance (RI (cm H<sub>2</sub>O x sek/ml) angegeben und die Daten als Mittelwerte (MW ± SEM) dargestellt.



**Abb. 7: Darstellung der Plethysmographen der Firma BUXCO®**

Die anästhesierten und tracheotomierten Mäuse wurden in den Kammern mechanisch ventiliert. Ein Tubus, der in den Oesophagus eingeführt wurde, dokumentierte die Atemaktivität, während über einen zweiten Tubus in der Lunge die MCh-Dosen (6,25; 12,5; 25 und 50 mg/ml) in aufsteigender Konzentration appliziert wurden. Durch die Veränderungen des Ein- und Ausatemdrucks bezogen auf ein Volumen und dem Druck in der Kammer, berechnet eine spezielle Software die Atemwegsresistenz.

## **Material & Methoden**

---

### **3.4.6.1.3 Bronchoalveolar Lavage (BAL)**

Um pathologische Veränderungen im bronchialen Sputum analysieren zu können, wurden mit Hilfe der Lungenspülung zelluläre und nicht zelluläre Bestandteile aus den Bronchiolen und Alveolen gewonnen. Dazu wurde die Lavage (wie von Maxeiner et al beschrieben, [211]) direkt nach der invasiven Messung durchgeführt. Es wurden 1000 µl eiskalte, physiologische Kochsalzlösung mit einer 1 ml Spritze über den bereits für die Lungenfunktionsmessung gesetzten Tubus in die Lunge injiziert und unter leichtem Massieren des Brustraumes wieder herausgezogen. Das wiedergewonnene Material wurde in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 300xg). Der zellfreie Überstand, der sogenannte BAL-Fluid (BALF), wurde bis zum Zeitpunkt der Zytokinbestimmung bei – 20 °C gelagert. Das Zellsediment wurde aufgebrochen und die Zellen in 200 µl kaltem 1xPBS resuspendiert und bis zur Bestimmung der Zellzahl auf Eis gelagert. Die gewonnenen Zellen wurden zur Herstellung von Zytospinpräparaten (s. K. 3.4.6.1.4) verwendet, um später die einzelnen Immunzell-Populationen in der BAL näher zu charakterisieren. Nach der BAL wurde der Thorax der Mäuse geöffnet, indem Rippen lateral des Sternums durchtrennt wurden. Der rechte Lungenflügel wurde mit einem medizinischem Faden von dem linken Lungenflügel getrennt und für weitere mRNA-Expressions-Analysen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80°C gelagert. Der linke Lungenflügel wurde über den bereits gelegten Tubus mit 4%iger Formalinlösung gefüllt und in ein 15 ml Polypropylenröhrchen, welches ebenfalls mit 3 ml 4%iger Formalinlösung befüllt war, überführt und fixiert. Diese Proben wurden zur histologischen und immunhistologischen Aufbereitung an die Histologie Core Facility der Universitätsmedizin Mainz übergeben.

### 3.4.6.1.4 Herstellung von Zytospinpräparaten

Die aus der BAL gewonnenen Zellen wurden mit Hilfe des CASY®-Zellzählgerätes ausgezählt. Es wurden 100 µl je Probe für einen Spin zugegeben und die Zellen in einer Cytospinzentrifuge bei mittlerer Beschleunigung für 5 min bei 500 UpM auf einen Objektträger zentrifugiert. Die so erhaltenen Dünnschichtpräparate wurden luftgetrocknet und nach Angaben des Herstellers mit dem Diff-Quick®-Färbesets (s. Tabelle 7) gefärbt und fixiert. Anschließend wurden die Präparate erneut luftgetrocknet und mit Hilfe von Entellan® (s. Tabelle 3) mit Deckgläschen eingedeckt.

Nach der Färbung der Präparate erfolgte die morphologische Analyse der Immunzellen in der BAL. Dabei unterschied man zwischen neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Lymphozyten und alveolären Makrophagen.

### 3.4.6.1.5 Histologische Methoden und Färbungen

Das in 4%iger Formalinlösung fixierte Lungengewebe wurde unter Leitung von Frau Claudia Braun in der histologischen Core Facility der Universitätsmedizin Mainz aufbereitet. Die fixierten Lungenstücke wurden nach Einbettung in Paraffin mit Hilfe eines Mikrotomes in ca. 5 µm dünne Scheiben geschnitten und auf Objektträger aufgebracht, die im Standardverfahren gefärbt wurden.

Als Übersichtsfärbung wurde die **Hämatoxilin-Eosin-Färbung** gewählt, damit man Aussagen über die Gewebestrukturen treffen kann und die dadurch sichtbaren Unterschiede zwischen gesunden, entzündeten und pathogenen Strukturen erkennt [212].

Als weitere Färbemethode wurde die *Periodic acid-Schiff reaction* (**PAS-Färbung**) gewählt, da durch diese Färbung neutrale Mukopolysaccharide, Muko- und Glykoproteine, Glykolipide und Phospholipide sichtbar gemacht werden [213]. Dadurch lassen sich die schleimbildenden Becherzellen in der Lunge darstellen [214].

## **Material & Methoden**

---

### **3.4.6.1.6 Auswertung der histologischen Schnitte**

Die unter Kapitel 3.4.4.1 und 3.4.6.1.5 beschriebenen, histologisch gefärbten Paraffinschnitte wurden mit Unterstützung der Gewebe-Biobank in der Pathologie in Mainz, mit Hilfe des Nano Zoomer Scanner bis auf 20-fache Vergrößerung digitalisiert. Die Auswertung und Darstellung der histologischen Schnitte erfolgte mit dem Programm NDP.view2.

Die Auswertung der Hämatoxilin-Eosin-Färbung erfolgte, indem ein standardisierter inflammatorischer Index („*score*“) zugrunde gelegt wurde und anhand dessen der Entzündungsgrad der einzelnen Proben ermittelt wurde.

Bei der PAS-Färbung wird die Anzahl der mukusproduzierenden Becherzellen ermittelt. Die Anzahl der positiven Becherzellen, diese sind in der Färbung als purpurviolett Zellen sichtbar, per Atemweg (Bronchiole) wird ermittelt und prozentual zu der Gesamtzahl der Epithelzellen der Basalmembran gesetzt. Mehrere Bronchien pro Tier und mehrere Mäuse pro Gruppe werden in einem Mittelwert zusammengefasst.



## 4. Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung von Immunzellen

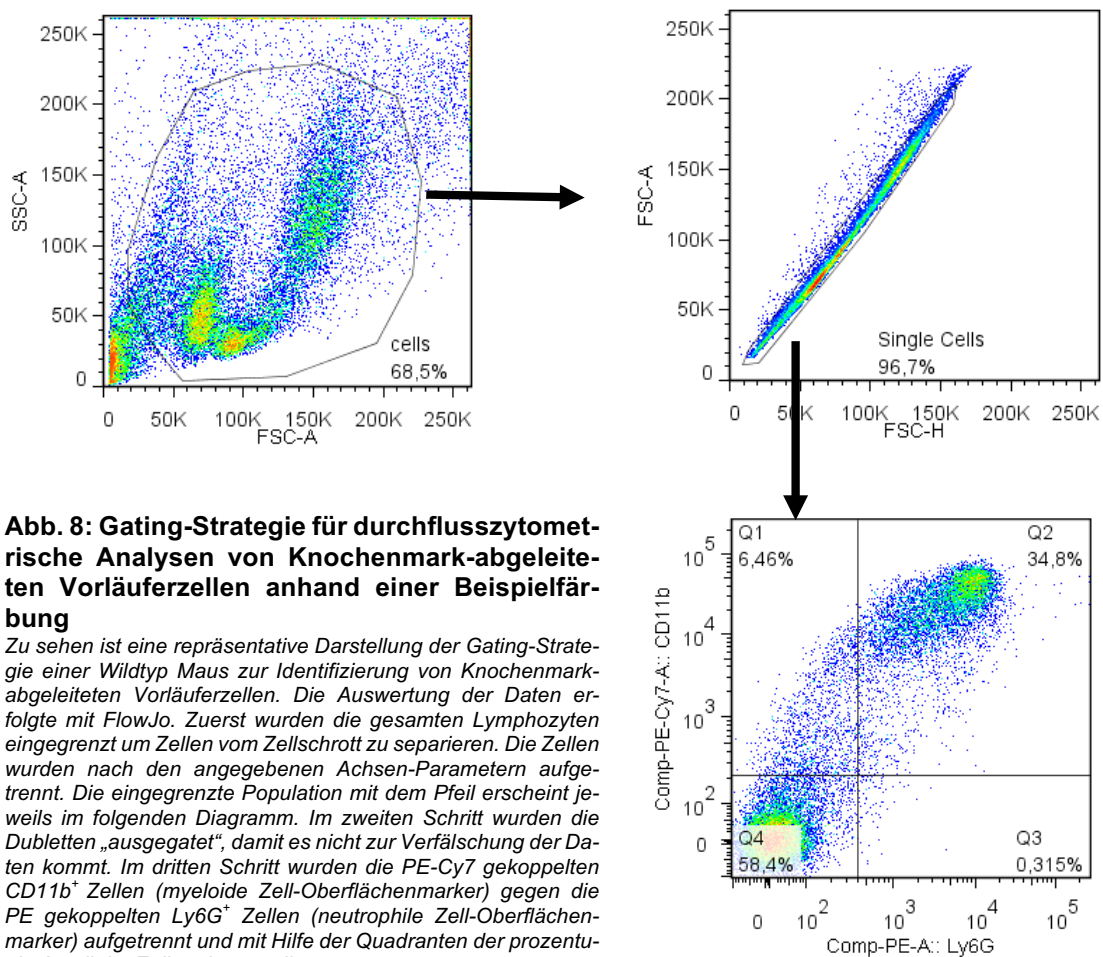
Aktuell ist noch nicht genau bekannt, wie vielfältig der Einfluss des RNA-BP KSRP auf die Immunzellfunktionen ist. Li *et al.* [47] konnte zeigen, dass in Astrozyten von Mäusen mit inaktiviertem KSRP-Gen die Produktion von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  vergleichsweise höher ist, als in Wildtyp-Tieren. Ebenfalls konnte schon gezeigt werden, dass nach Stimulation von adhärenente Monozyten und Makrophagen aus dem Peritoneum von KSRP-defizienten (KSRP KO) Mäusen die mRNA-Expression von TNF- $\alpha$ , iNOS und CXCL1 signifikant erhöht ist im Vergleich zu Wildtyp-Tieren (WT) [46, 215]. Diese löslichen Mediatoren sind im Stande sowohl den Immunphänotyp als auch die daraus resultierenden Immunantworten zu beeinflussen. Daher sollen im Folgenden die Immunzellen unter Berücksichtigung der Abwesenheit von KSRP genauer untersucht werden.

In den folgenden FACS-Analysen wurden unterschiedliche Immunzell-Populationen aus KSRP KO Mäusen unter basalen Bedingungen untersucht und mit Immunzellen aus WT Mäusen verglichen. Ebenso wurde untersucht wie sich der Immunphänotyp und die Immunzellfrequenz der einzelnen Immunzell-Populationen nach 24 Std. LPS-Stimulation der isolierten Zellen verändert. Mit Hilfe von *lineage marker* (Zelltypmarkern), die an spezifische Oberflächenantigene von Immunzellen binden, lassen sich die verschiedenen Zelltypen voneinander unterscheiden und charakterisieren [216]. Des Weiteren lassen sich mit Aktivierungsmarkern kostimulatorische Moleküle an den Immunzelloberflächen nachweisen, sodass Aussagen zum Aktivierungszustand bzw. zum Reifungszustand der Immunzellen getroffen werden können.

## Ergebnisse

### 4.1.1 Immunphänotypisierung von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen

Da die Hämatopoese im Knochenmark stattfindet und auch die Immunzellen ihren Ursprung aus hämatopoetischen Stammzellen haben, wurde das Knochenmark als erste Quelle für die Immunzell-Isolierung gewählt [217]. Röhrenknochen wie Beinknochen enthalten Knochenholräume aus denen sich das Knochenmark samt Vorläuferzellen leicht isolieren lässt. Ein weiterer Vorteil, neben der Generierung von BM-DC und BM-M $\phi$ , ist die hohe Frequenz an neutrophilen Granulozyten im Knochenmark.

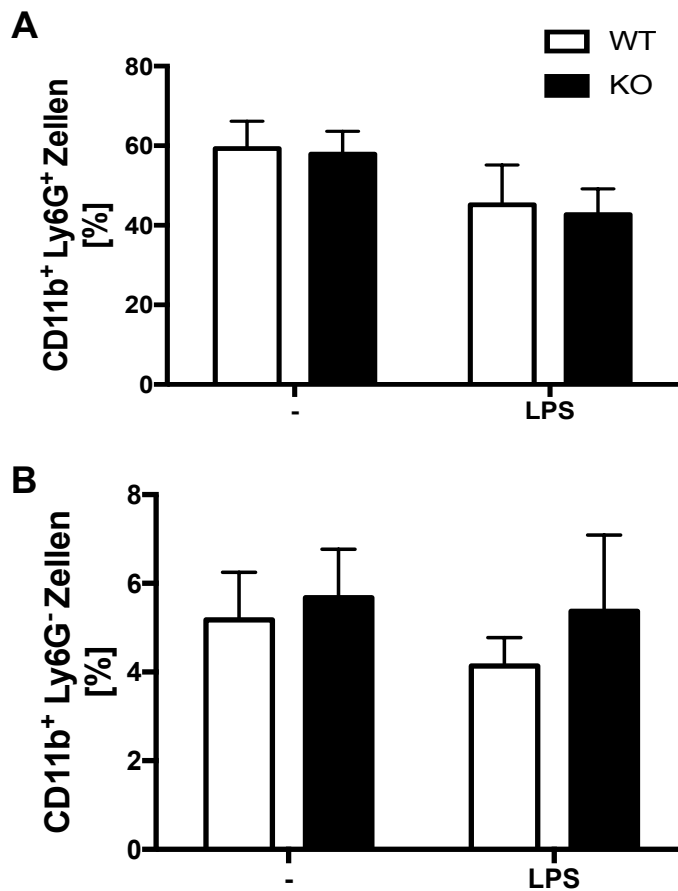


Eine dieser hämatopoetischen Zellreihen sind die myeloischen Vorläuferzellen, aus denen sich überwiegend Immunzellen (Mastzellen, mDC, Makrophagen, und neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten) differenzieren, die primär an der unspezifischen, angeborenen Immunabwehr beteiligt sind. Im ersten Schritt sollte die Charakterisierung dieser überwiegend myeloiden Immunzellen aus dem Knochenmark stattfinden. In den danach folgenden Experimenten wurden Immunzellen aus der Peripherie (Kapitel 4.1.2 PBMC und Kapitel 4.1.3 Milz) untersucht.

In Abb. 8 sieht man repräsentativ primäre FACS-Daten der Gating-Strategie, die zur Charakterisierung von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen angewandt wurde. Im dritten und letzten Schritt der Gating-Strategie ist der prozentuale Anteil von CD11b<sup>+</sup> und Ly6G<sup>+</sup> Zellen (ca. 41 %) der repräsentativen Wildtyp-Maus nach 24 stündiger Stimulation mit LPS zu erkennen (Abb. 8).

Um die Veränderungen des prozentualen Anteiles der Immunzellen besser beurteilen zu können, wurden die erhaltenen Daten der unterschiedlichen Genotypen nebeneinander innerhalb der Gruppen grafisch dargestellt (Abb. 9). In Teilabbildung 9A ist zu erkennen, dass unter basalen Bedingungen der prozentuale Anteil der neutrophilen Granulozyten zwischen WT und KO-Tieren kaum einen Unterschied aufweist. Es zeigt sich ein 59 % Anteil an neutrophilen Zellen im Knochenmark von Wildtyp-Tieren, wobei kein Unterschied zu den KO-Tieren mit 58 % neutrophiler Zellen besteht. Nach 24-stündiger LPS Stimulation weisen die Zellen unabhängig vom Genotyp eine rund 24 % verminderte CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Expression im Vergleich zu unstimulierten Zellen auf. Das Expressionsniveau der Oberflächenmarker liegt hier Genotyp unspezifisch zwischen 43-45 %  $\pm$  10 %. In Teilabbildung 9B ist gezeigt, dass unter basalen Bedingungen im Knochenmark der beiden Genotypen ca. 6 %  $\pm$  1 % an myeloide Zellen nachgewiesen wurden. Auch nach Behandlung mit LPS zeigt sich genotypisch, unspezifisch eine Verringerung der Immunzell-Frequenz um ca. 1 %. Auch der etwas größere Standardfehler in Teilabb. 9B trägt dazu bei, dass kein Genotyp-spezifischer Unterschied zu erkennen ist.

## Ergebnisse



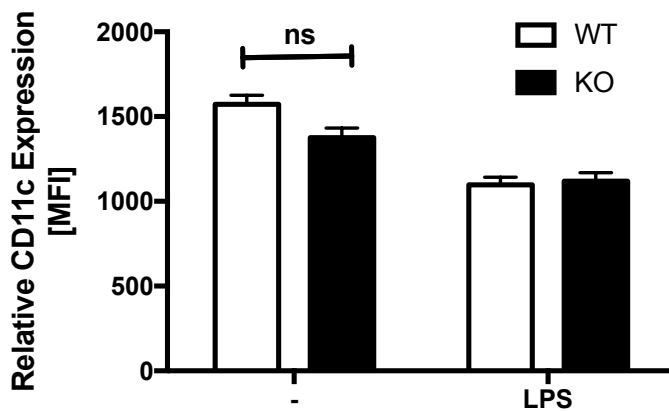
### Abb. 9: Zellfrequenz-Analysen von Knochenmarks-abgeleiteten Vorläuferzellen aus KO und WT Mäusen

In Teilabb. A ist der prozentuale Anteil der CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> Zellen (BM-Neutrophile) ohne Stimulus (-) und nach 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS dargestellt. Teilabb. B zeigt den prozentualen Anteil der CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>-</sup> Zellen (myeloide Zellen) ohne Stimulus (-) und nach 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS. Die Expressionen der Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Immunzell-Frequenzen aus KSRP<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen werden als weiße Balken abgebildet, während schwarze Balken den KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäusen zuzuordnen sind. Die Daten repräsentieren den Mittelwert als % ± SEM von 3-4 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

Wie in Kapitel 3.2.3.1 beschrieben wurden die isolierten Knochenmarkszellen mit CSF zu BM-DCs und BM-M $\phi$  differenziert. Diese ausdifferenzierten Immunzellen wurden mit einer definierten Zellzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen pro Maus am FACS-Gerät analysiert, daher lässt sich keine Aussage über die Immunzellfrequenz zwischen den Genotypen treffen (s. Anhang: Abb. 61).

Aus diesem Grund wurde bei den analysierten Immunzellen die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) zwischen den Genotypen verglichen. Dadurch konnte bei einer knapp 100 prozentigen reinen Population dennoch die genotypische Expression der Oberflächenmarker CD11c (BM-DC) und F480 (BM-M $\phi$ ) zwischen KSRP KO und WT-Mäusen verglichen werden.

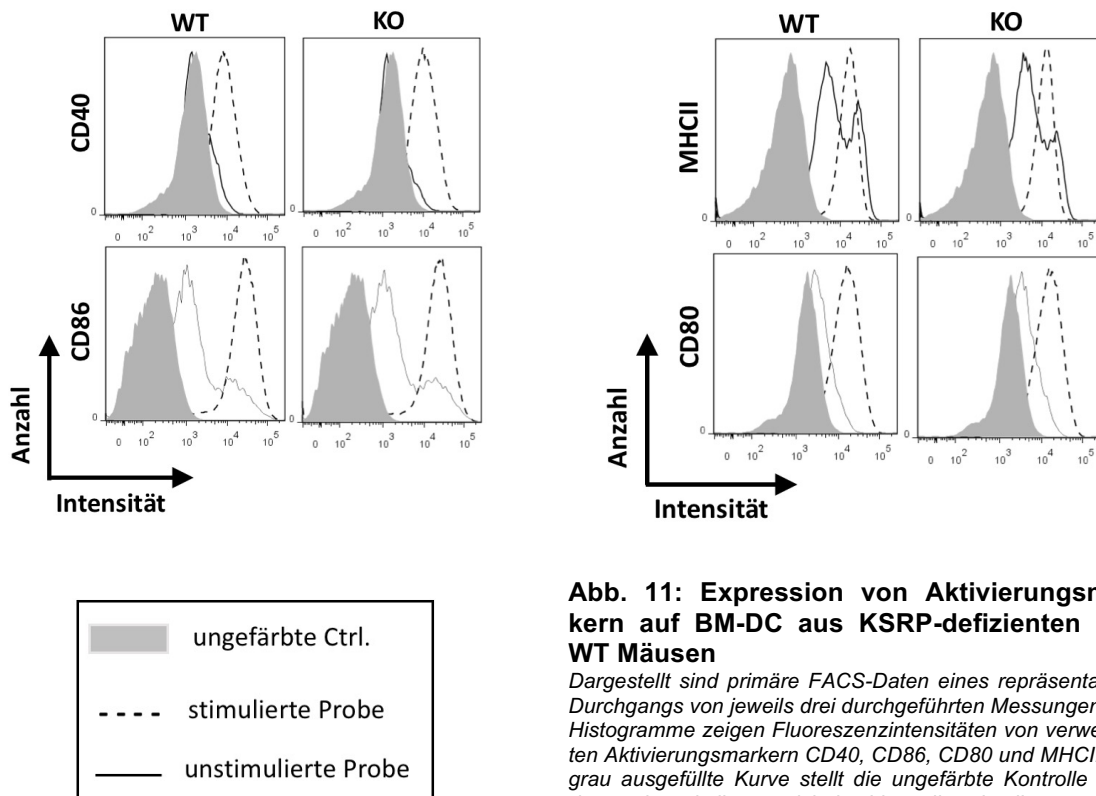
In Abb. 10 ist gezeigt, dass unter basalen Bedingungen die relative CD11c Expression in den WT-Tieren bei 1573 liegt, im Vergleich dazu liegt die MFI in KO-Tieren ohne signifikanten Unterschied bei 1377. Nach 24-stündiger Stimulation mit LPS verringert sich sowohl in WT- als auch in KO-Tieren die CD11c Expression um ca. 30% bezogen auf unstimulierte BM-DC und liegt somit bei ca. 1100.



**Abb. 10: Zellfrequenz-Analysen aus Knochenmark differenzier-ten BM-DCs in WT und KO Mäusen**

Dargestellt ist die Mittlere Fluoreszenzintensi-tät (MFI) von CD11c<sup>+</sup> (DC-Oberflä-chen-Marker) Zellen ohne Stimulus (-) und nach 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS. Die Analysen der Oberflächenmarke-rexpression wurden mittels Durchflusszyto-metrie durchgeführt. Die MFIs von KSRP<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen werden als weiße Balken ab-gebildet, während schwarze Balken den KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäusen zuzuordnen sind. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + SEM von 3-4 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: ns = nicht signifi-kant; T-Test.

In Abb. 11 wird der Aktivierungszustand und somit der Reifungszustand von BM-DC aus KSRP KO- und WT-Tieren verglichen. Zu sehen sind repräsentative FACS-Daten, die deutlich die höhere Intensität von Aktivierungsmarkern (CD40, CD86, CD80 und MHCII) nach Behandlung mit LPS (Stimulation) gegenüber von ungefärbten und un-stimulierten aus Knochenmark differenzierten BM-DCs erkennen lassen (Abb. 11).



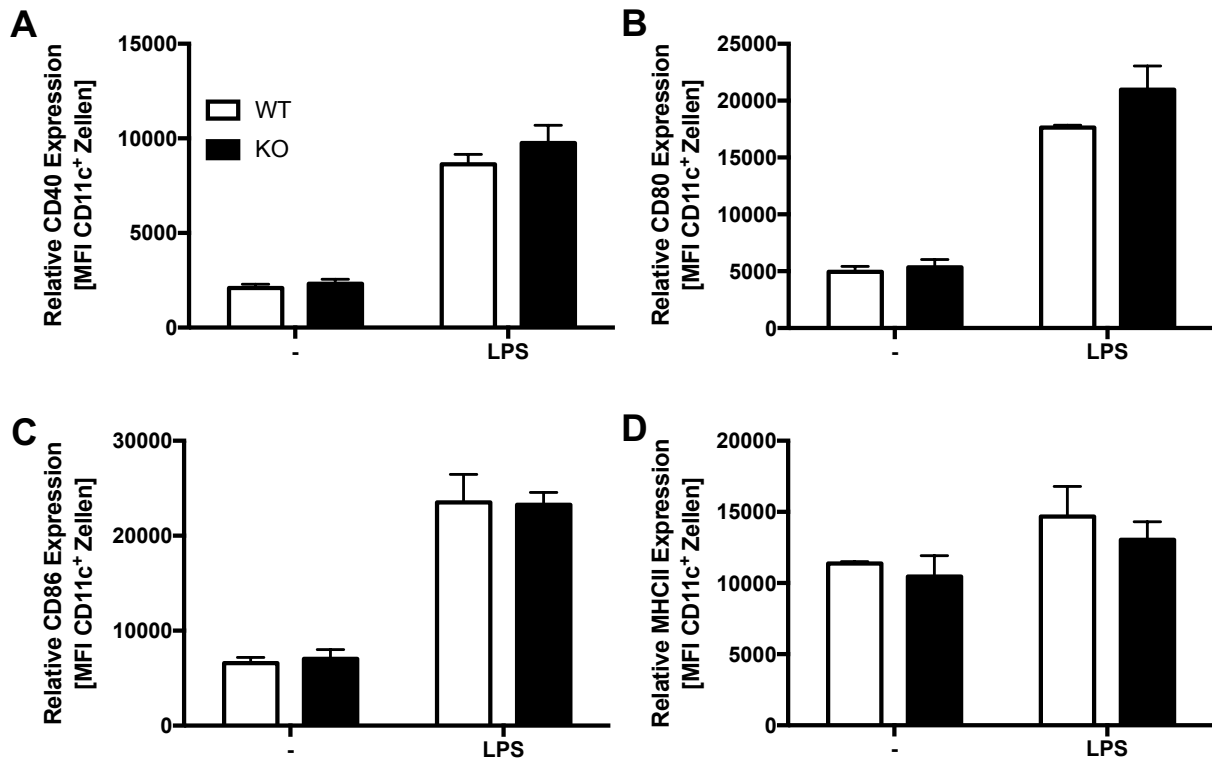
**Abb. 11: Expression von Aktivierungsmar-kern auf BM-DC aus KSRP-defizienten und WT Mäusen**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten eines repräsentativen Durchgangs von jeweils drei durchgeführten Messungen. Die Histogramme zeigen Fluoreszenzintensitäten von verwendeten Aktivierungsmarkern CD40, CD86, CD80 und MHCII. Die grau ausgefüllte Kurve stellt die ungefärbte Kontrolle (Ctrl) dar, während die gestrichelte Line, die stimulierte und die durchgängige schwarze Line, die unstimulierte Probe darstel-len.

## Ergebnisse

---

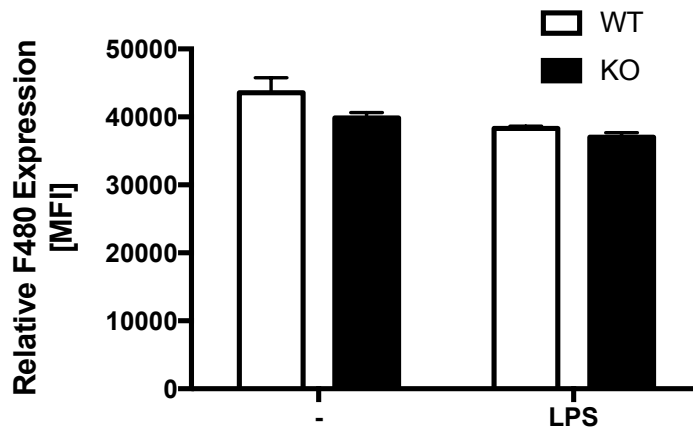
Betrachtet man sich den MFI-Wert der beiden Gruppen (- & LPS) (Teilabb. 12A, B, C und D) so wird deutlich, dass die Inkubation der BM-DC mit LPS eine deutliche Aufregulierung der Aktivierungsmarker verursacht. Das Expressionsniveau von CD40 (Teilabb. 12A) liegt bei immaturren BM-DC Genotyp unspezifisch bei ca. 2300. Nach Stimulation mit LPS steigt der MFI-Wert von WT BM-DC auf 8630, ähnlich erhöht bei 9758 liegt der MFI-Wert in KO BM-DC. Ähnlich sieht es für die Expression von CD80 (Teilabb. 12B) und CD86 (Teilabb. 12C) bei unstimulierten BM-DC aus. Im ersten Fall liegt der MFI-Wert Genotyp unspezifisch bei ca. 5000 und im zweiten Fall bei ca. 7000. Nach LPS-Stimulation erhöht sich die CD80-Expression in WT BM-DC um das 3,6-fache und in KO BM-DC um das 4,2-fache, dieser Unterschied zwischen den Genotypen ist durch den erhöhten Standardfehler nicht signifikant. Die CD86-Expression liegt ebenfalls Genotyp-unabhängig nach LPS-Zugabe 3,3-fach höher, als im Vergleich zu unstimulierten BM-DC. Vergleicht man die Expression der kostimulatorischen Moleküle mit der Expression des antigenpräsentierenden MHC-II-Komplex (Teilabb. 12D), so wird deutlich, dass dieser bereits unter basalen Bedingungen ein höheres Expressionsniveau von 11366 im WT und 10449 in KO BM-DCs aufweist. In diesem Fall bewirkt die Inkubation mit LPS nur eine moderate Aufregulation von 29 % bei WT DCs und 24 % bei KO DCs gegenüber den unbehandelten Zellen.



**Abb. 12: Expression-Analysen von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von BM-DC aus KO und WT-Mäusen**

Dargestellt ist die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der kostimulatorischen Moleküle CD40 (A), CD80 (B), CD86 (C) und des antigenpräsentierenden MHC-II-Komplexes (D) auf der Oberfläche von unreifen (-) und reifen (LPS) BM-DC. Es werden unbehandelte (-) und 24 h mit LPS behandelte (LPS) BM-DC verglichen. Die Expression der Aktivierungsmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die MFI von KSRP<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen werden als weiße Balken abgebildet, während schwarze Balken den KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäusen zuzuordnen sind. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + SEM von 3-4 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

Als nächstes wurden aus dem Knochenmark differenzierte BM-M $\phi$  mit Hilfe des Oberflächenmarkers F480 untersucht. Abb. 13 zeigt eine MFI von 43566 für die relative Expression von F480 in den WT-Tieren unter basalen Bedingungen, vergleichsweise liegt die MFI in KO Tieren bei ca. 40000. Nach 24-stündiger Stimulation mit LPS verringerte sich sowohl in WT- als auch in KO-Tieren die F480 Expression um ca. 10%  $\pm$  2 % im Vergleich zu unstimulierten BM-M $\phi$ .

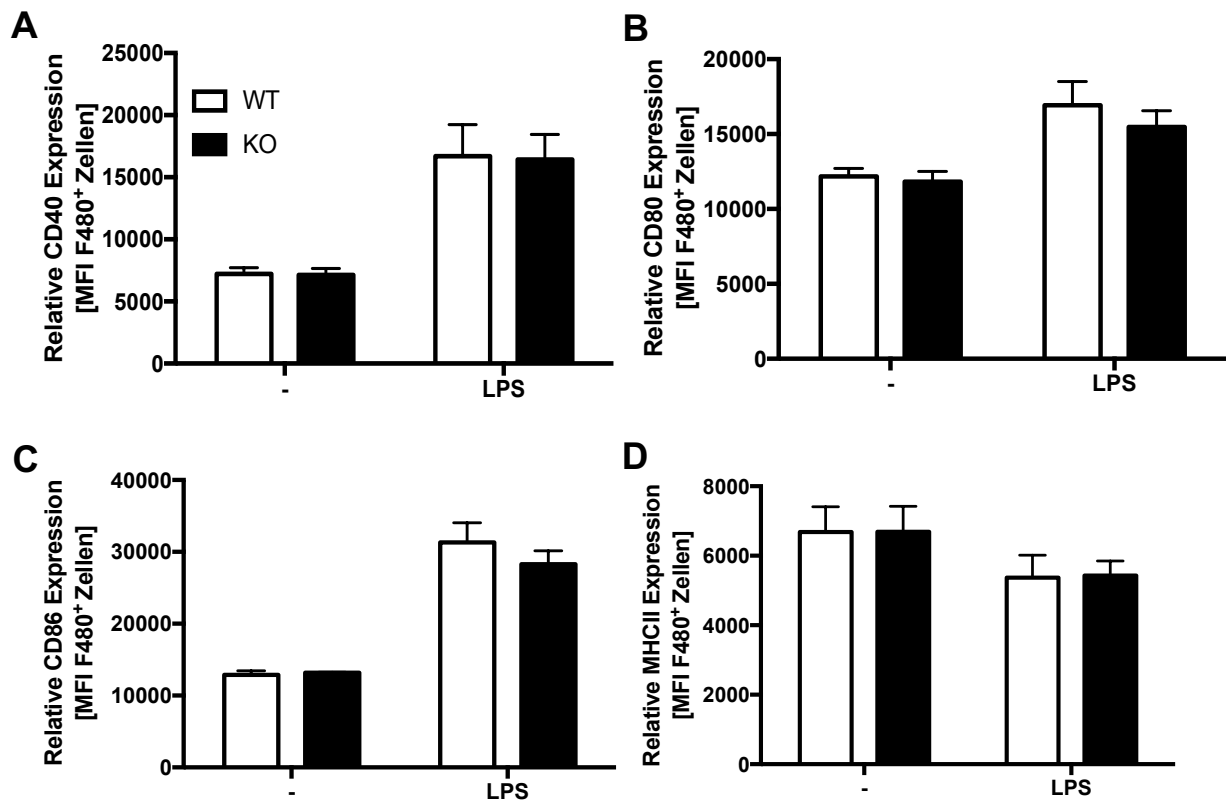


**Abb. 13: Zellfrequenz-Analysen aus Knochenmark differenzierten BM-M $\phi$  in WT und KO Mäusen**

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) F480<sup>+</sup> (M $\phi$ -Oberflächenmarker) Zellen ohne Stimulus (-) und nach 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS. Die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die MFI von KSRP<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen werden als weiße Balken abgebildet, während schwarze Balken den KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäusen zuzuordnen sind. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + SEM von 3-4 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

In Abb. 14 wird der Reifungszustand von BM-M $\phi$  aus KSRP KO- und WT-Tieren dargestellt. Vergleicht man die MFI-Werte von unbehandelten mit LPS-behandelten BM-M $\phi$  (Teilabb. 14A, B und C), so erkennt man eine deutliche Aufregulation der kostimulatorischen Moleküle (CD40, CD80 u. CD86). Unbehandelte BM-M $\phi$  (Teilabb. 14A) zeigen mit einer MFI von ca. 7200 keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der CD40-Expression. Die Behandlung mit LPS erhöht die MFI von CD40 in beiden Genotypen auf ca. 16500. Auch das Expressionsniveau von CD80 unterscheidet sich unter basalen Bedingungen nicht zwischen den Genotypen und liegt bei ca. 1250 (Teilabb. 14B). Nach 24-stündiger LPS-Behandlung kommt es zur Erhöhung der CD80-Expression mit einem MFI-Wert von 16933 in WT-M $\phi$  und 15466 in KO-M $\phi$ . Ähnlich zeigt der Aktivierungsmarker CD86 keinen Unterschied in der Expression zwischen unbehandelten KO und WT BM-M $\phi$  (Teilabb. 14C). Die MFI für CD86-Expression liegt bei stimulierten WT BM-M $\phi$  bei 31333 und 28300 bei KO BM-M $\phi$ . Der MHC-II-Komplex zeigt bei immaturren BM-M $\phi$  Genotyp-unspezifisch ein höheres Expressionsniveau von ca. 6700. Die Inkubation mit LPS verringert die Expression des MHC-II-Komplexes um ca. 20 % in beiden Genotypen im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen.





**Abb. 14: Expression-Analysen von Aktivierungsmarkern auf der Oberfläche von BM-Mφ aus KO und WT-Mäusen**

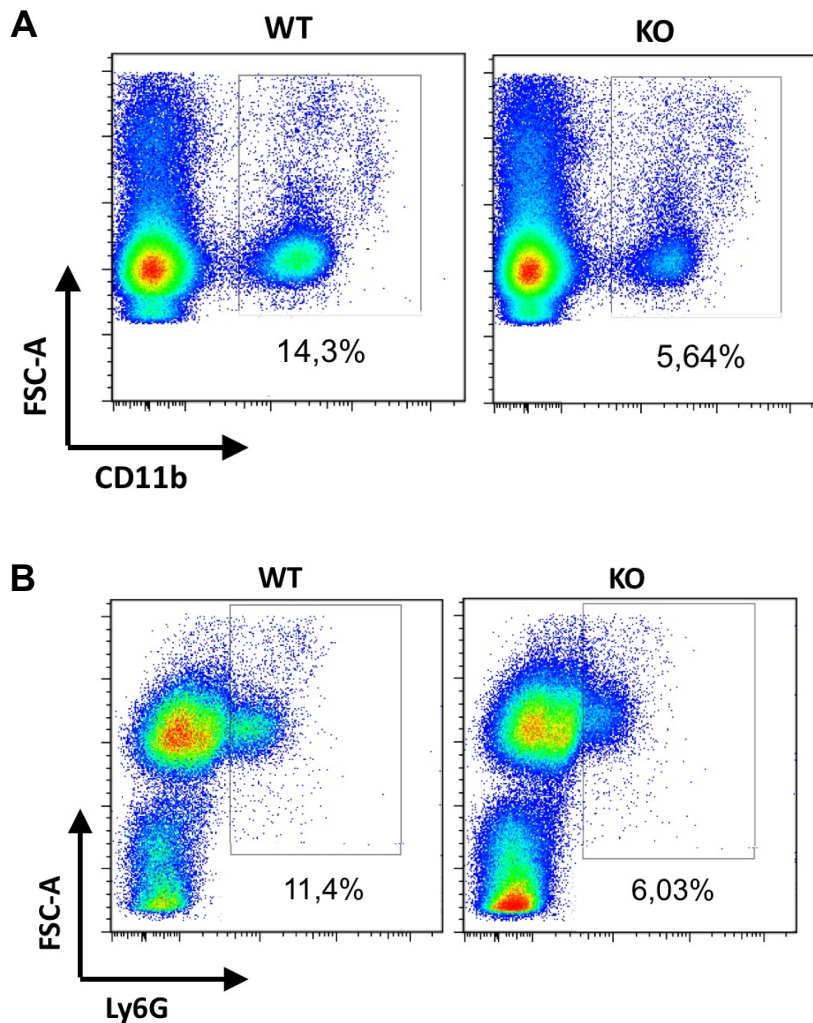
Dargestellt ist die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der kostimulatorischen Moleküle CD40 (A), CD80 (B), CD86 (C) und des antigenpräsentierenden MHC-II-Komplexes (D) auf der Oberfläche von unreifen (-) und reifen (LPS) BM- Mφ. Es werden unbehandelte (-) und 24 h mit LPS behandelte (LPS) BM- Mφ verglichen. Die Expression der Aktivierungsmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die MFI von KSRP<sup>+/+</sup> (WT) Mäusen werden als weiße Balken abgebildet, während schwarze Balken den KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäusen zuzuordnen sind. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + SEM von 3-4 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

Nach der Hämatopoese wandern die ausdifferenzierten Zellen aus dem Knochenmark in die Peripherie, daher wurden weitere Immunzellpopulation einerseits im Blut (Kapitel 4.1.2) und in der Milz (Kapitel 4.1.3) untersucht [218, 219].

### 4.1.2 Immunphänotypisierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Als eine weitere Immunzell-Quelle wurde das periphere Blut von KSRP-KO und WT Mäusen untersucht. In dem peripheren Blut sind mononukleäre Zellen, die sogenannten PBMC (*peripheral blood mononuclear cells*) enthalten, darunter zählen Lymphozyten, Monozyten und Dendritische Zellen. Ähnlich wie im humanen Blut verteilt, variieren diese Immunzell-Population im murinen Blut abhängig von Geschlecht, Stamm und unterschiedlichen weiteren Faktoren [220-222]. Allgemein erwartet man in PBMC zwischen 70-80 % Lymphozyten, bestehend aus 50-70 % T-Zellen, 10-20 % B-Zellen und 10-20 % Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen), 10-20 % Monozyten und 1-2 % DCs. Wie in Kapitel 3.2.4 beschrieben, wurden die PBMC isoliert und anschließend deren Identität mittels Durchflusszytometrie bestimmt, indem die Immunzell-Frequenz zwischen den Genotypen analysiert wurde.

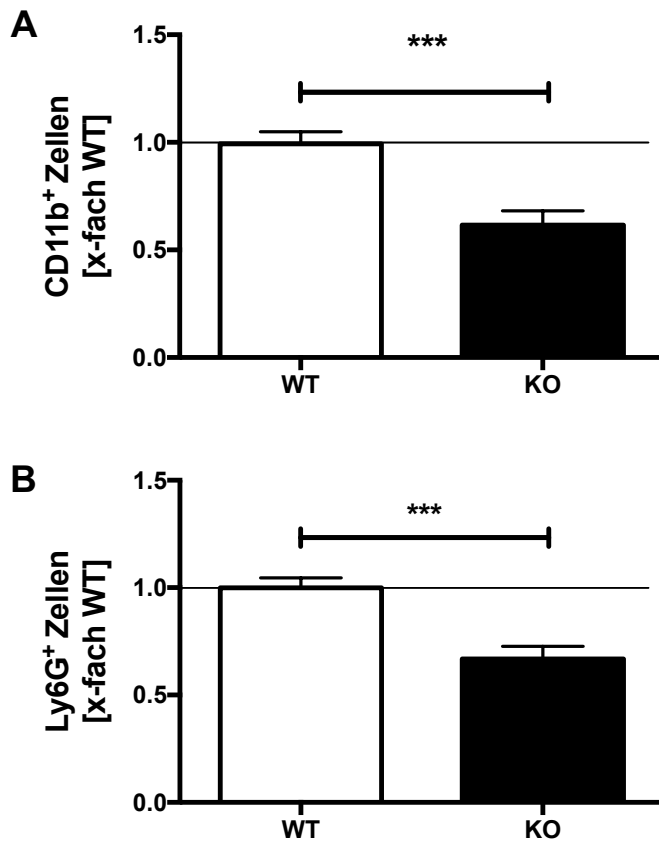
In Abb. 15 sieht man repräsentativ primäre FACS-Daten von myeloiden Zellen aus Blutproben von jeweils einer WT und KSRP KO Maus, die mit der Software FlowJo ausgewertet wurden. In der KO Maus ist ein deutlich geringerer prozentualer Anteil an CD11b<sup>+</sup> (myeloide Oberflächenmarker) (ca. 10 %) sowie auch an Ly6G<sup>+</sup> (neutrophile Oberflächenmarker) Zellen (ca. 5 %) im Vergleich zur WT Maus zu sehen (Abb. 15).



**Abb. 15: Analyse myeloider Zellen aus PBMC mittels Durchflusszytometrie**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten von repräsentativen Blutproben aus jeweils einer WT und KO Maus von insgesamt 6-15 durchgeführten Messungen. In Teilabb. A sind fluoreszenzgekoppelte CD11b<sup>+</sup> und in Teilabb. B Ly6G<sup>+</sup> Zellen gegen FSC-A aufgetrennt, man erkennt den prozentualen Anteil einer aus WT (links) und KO Maus (rechts) eingegrenzten CD11b bzw. Ly6G Population. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo [241].

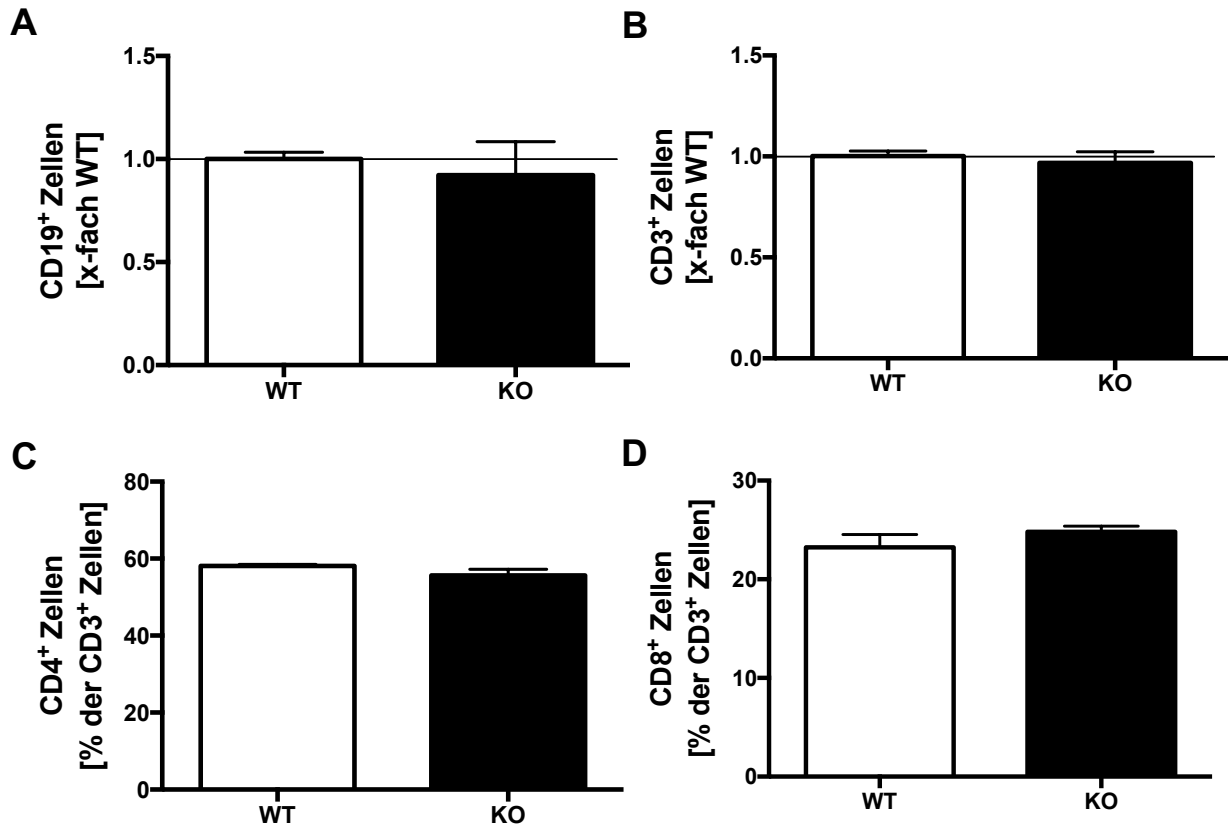
In Teilabb. 16A ist gezeigt, dass isolierte und unbehandelte PBMC aus KSRP-defizienten Mäusen eine hoch-signifikant verringerte Frequenz an CD11b<sup>+</sup> Zellen aufweisen im Vergleich zu WT Mäusen. Nach der festgestellten Frequenzabnahme von CD11b positiven Zellen wurde im kleineren Umfang geschaut, ob diese Zellen zu den neutrophilen Granulozyten gehören. Daher wurde mit Ly6G gefärbt und auch diese Population verringerte sich signifikant im peripheren Blut von KSPR-defizienten Mäusen.



**Abb. 16: Quantifizierung myeloider Zellen aus PBMC von WT und KO Mäusen**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD11b<sup>+</sup> (myeloide Zell-Oberflächenmarker) Zellen in Teilabb. A und von Ly6G<sup>+</sup> (neutrophile Zell-Oberflächenmarker) Zellen in Teilabb. B aus dem peripheren Blut von WT und KO Mäusen. Die jeweiligen Daten wurden auf die Expression in WT PBMC normiert. Die Expression des Oberflächenmarkers wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet und + Standardfehler von jeweils 6-15 individuellen Mäusen pro Genotyp bestimmt. Statistik: \*\*\* $p < 0,001$ ; T-Test [241].

Abb. 17 zeigt weitere Frequenz-Analysen von Lymphozyten aus dem peripheren Blut von WT und KSRP KO Mäusen. Die normierten Daten in Teilabb. 17A zeigen, dass im Blut von KSRP-defizienten Mäusen die B-Zell Frequenz vergleichbar mit den B-Zellen in WT Mäusen ist. Auch in Teilabb. 17B erkennt man, dass es keinen Genotyp-spezifischen Unterschied in der allgemeinen T-Zell Verteilung gibt. In einem etwas kleinerem Umfang mit vier Tieren pro Genotyp wurde auch nochmal spezifischer nach den größeren TZ-Subpopulationen geschaut. In Teilabb. 17C wird die Frequenz von CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> und in Teilabb 17D von CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelt positiven T-Zellen verglichen. In beiden Fällen ist kein Unterschied zwischen den Genotypen zu erkennen, jedoch variiert das Verhältnis der TZ-Subpopulation zueinander deutlich. Von den gesamten analysierten T-Zellen aus dem Blut exprimieren ca. 60 % CD4 und nur ca. 25 % CD8 auf ihrer Oberfläche.



**Abb. 17: Quantifizierung von B- und T-Zellen aus PBMC von WT und KO Mäusen**

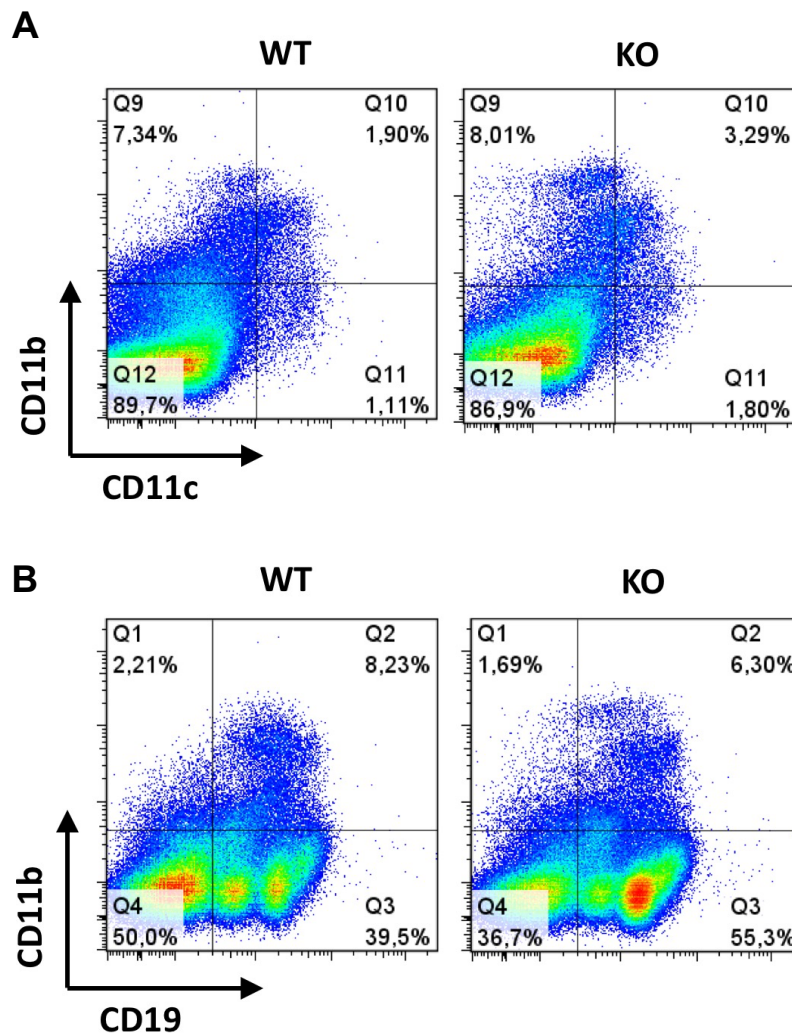
Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD19<sup>+</sup> (B-Zell-Oberflächenmarker) Zellen in Teilabb. A und von CD3<sup>+</sup> (T-Zell-Oberflächenmarker) Zellen (Teilabb. B) aus dem peripheren Blut von WT und KO Mäusen, normiert auf die Expression in WT PBMC. Teilabb. C zeigt den prozentualen Anteil der CD4<sup>+</sup> und Teilabb. D der CD8<sup>+</sup> TZ-Subpopulation. Die Expression der Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und + Standardfehler von Messungen aus jeweils 6-15 individuellen Mäusen pro Genotyp.

Weitere Immunzellpopulationen wie Makrophagen und DCs waren in einer zu gering Menge im Blut vorhanden und konnten daher nicht quantifiziert werden.

## Ergebnisse

### 4.1.3 Immunphänotypisierung von Milzzellen

Die murine Milz ist anatomisch und funktionell vergleichbar mit der humanen Milz [223]. Als größtes Organ des lymphatischen Systems filtert die Milz effektiv das Blut nach möglichen pathogenen Erregern, ebenso trägt sie zur Entwicklung und Produktion von maturierten Immunzellen bei [224-226]. Diese befinden sich überwiegend in der weißen Pulpa und sind wie folgt verteilt: ~60 % B-Zellen, ~20 % T-Zellen und die weiteren ~ 20 % sind Monozyten, Makrophagen und DCs.



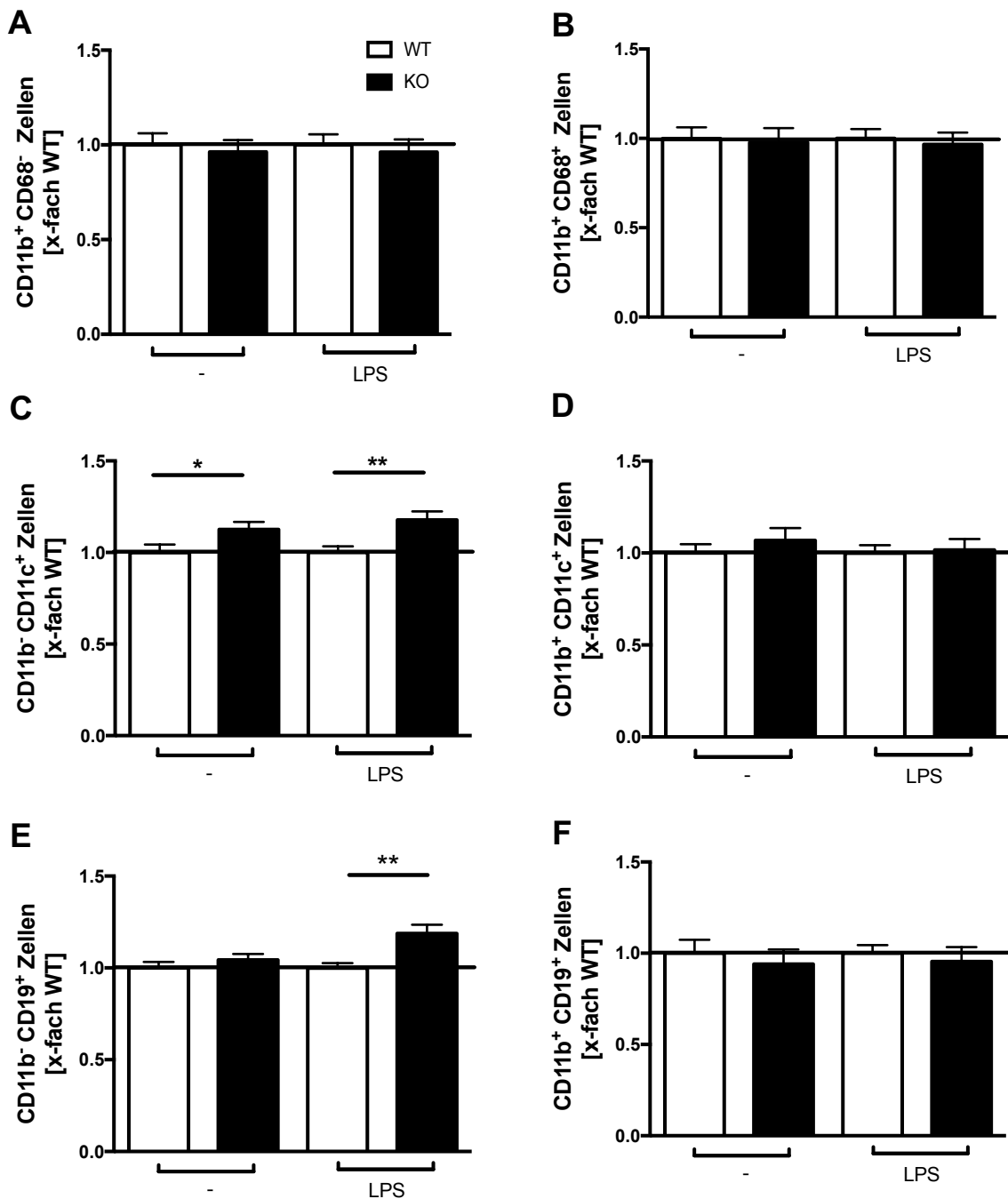
**Abb. 18: Bestimmung von B-Zell und DC-Populationen in der murinen Milz**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten von einer repräsentativen WT und KO Maus von jeweils 25-31 durchgeführten Messungen. In Teilabb. A sind Fluoreszenz-gekoppelte CD11c<sup>+</sup> (DC Oberflächenmarker) und in Teilabb. B CD19<sup>+</sup> Zellen (B-Zell Oberflächenmarker) gegen CD11b (myeloide Oberflächenmarker) aufgetrennt. Der prozentuale Anteil aus WT (links) und KO Maus (rechts) wird mit Hilfe von Quadranten dargestellt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo.

In Abb. 18 sieht man primäre FACS-Daten von Milzzellen aus jeweils einer WT und KSRP KO Maus repräsentativ für 25-31 durchgeführte Messungen, die mit der Software FlowJo ausgewertet wurden. Zu sehen ist ein deutlich höherer prozentualer Anteil an CD11b<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> (B-Zell-Oberflächenmarker) Zellen in der KO Maus gegenüber der WT Maus. Auch der prozentuale Anteil an CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (DC-Oberflächenmarker) Zellen ist in der KO Maus gegenüber der WT Maus erhöht (Abb. 18).

In der auf den WT bezogenen quantitativen Auswertung wurden unterschiedliche Milzzellpopulationen *ex vivo* untersucht (s. Abb. 19), die ohne (-) oder 24 Std. mit Stimulus (LPS) inkubiert wurden. Die Frequenz von immaturren und maturierten myeloiden Milzzellen zeigt keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Teilabb. 19A). Auch die Makrophagen-Population zeigt unabhängig von der Stimulierung keine unterschiedliche Verteilung in der Milz. Teilabb. 19C zeigt eine signifikant höhere Frequenz plasmazytoide DC in unstimulierten KO Milzzellen im Vergleich zu unstimulierten WT Milzzellen. Deutlicher wird der genotypische Unterschied nach 24-stündiger Stimulation mit LPS. Vergleichsweise zeigen myeloide DC eine nicht signifikant, moderat erhöhte Frequenz in unbehandelten KO Milzzellen gegenüber den WT Milzzellen (Teilabb. 19D), nach 24-stündiger Stimulation mit LPS ist der beschriebene Unterschied nicht mehr zu sehen. Unbehandelte B-Zellen, die CD19 ohne CD11b auf ihrer Oberfläche exprimieren, zeigen in KO Milzzellen keine Veränderung ihrer Frequenz gegenüber wildtypischen Milzzellen (Teilabb. 19E). Nur reife B-Zellen weisen eine signifikant höhere Anzahl in KO Milzzellen im Vergleich zu wildtypischen Milzzellen auf. Eine weitere B-Zell-Population in der Milz, die zusammen mit CD19 auch CD11b Moleküle auf ihrer Oberfläche exprimiert, zeigt mit und ohne Stimulation keine signifikanten Frequenz-Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Teilabb. 19F).

## Ergebnisse

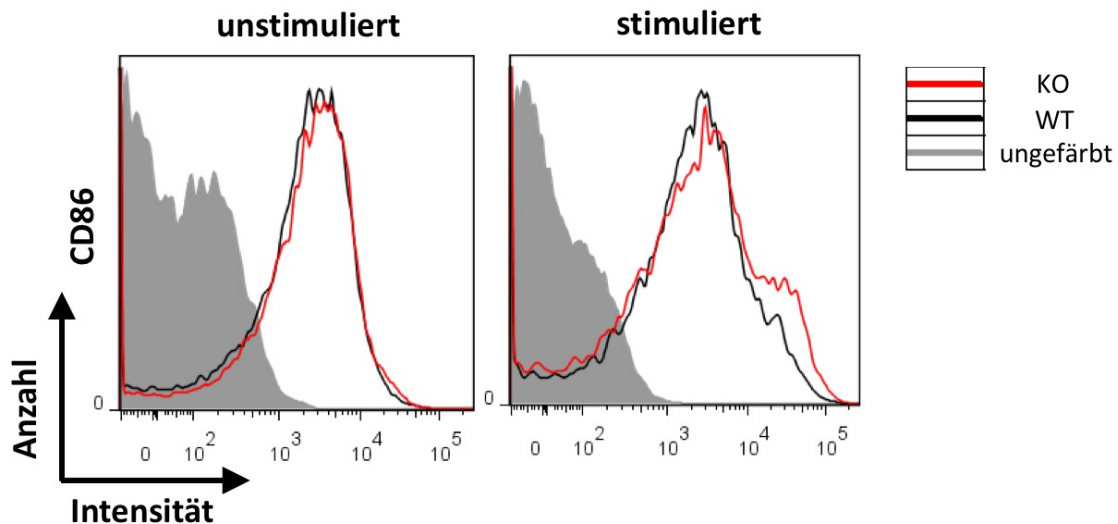


### Abb. 19: Quantifizierung Milzzell-Populationen von WT und KO Mäusen

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> (myeloide Zellen) (A), CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (Makrophagen) (B), CD11b<sup>-</sup>CD11c<sup>+</sup> (pDCs) (C), CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (mDCs) (D), CD11b<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> (BZ) (E) und CD11b<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (BZ) (F) aus der Milz von WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS (100ng/ml) behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet und + Standardfehler von jeweils 25-31 Mäusen pro Gruppe und Genotyp bestimmt. Statistik: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; T-Test.



In Abb. 20 sind primäre FACS-Daten von unstimulierten und mit LPS stimulierten Milzzellen zu sehen. Gezeigt ist eine höhere Fluoreszenzintensität des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf LPS-stimulierten KO Milzzellen, gegenüber Milzzellen aus WT Mäusen. Eine Darstellung der Gating-Strategie befindet sich im Anhang (Abb. 64).

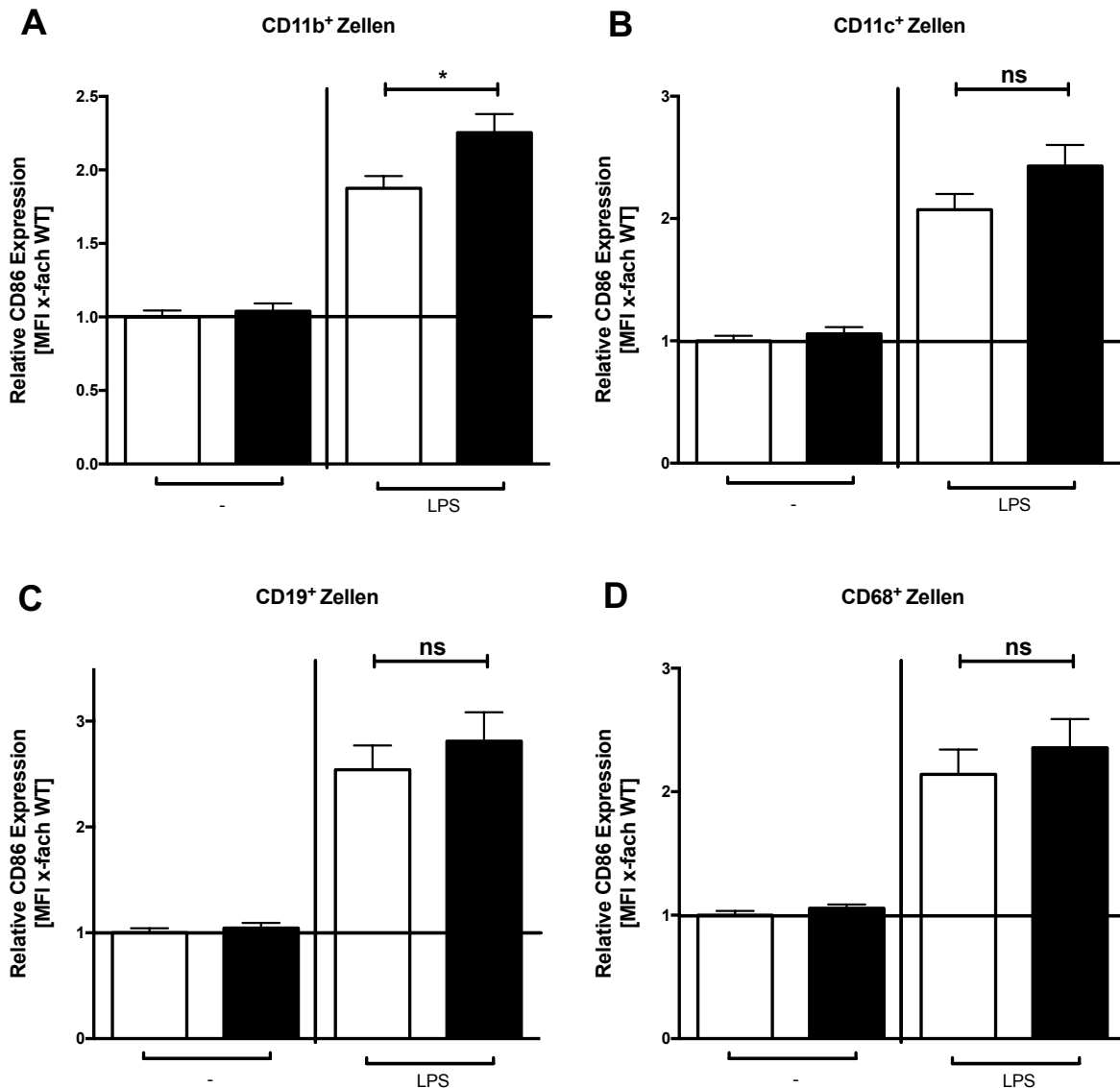


**Abb. 20: Repräsentative FACS-Analysen des kostimulatorischen Molekül CD86 auf Milzzellen**  
 Dargestellt ist die Expression von CD86 auf unstimulierte und für 24 h mit LPS (100 ng/ml) stimulierten Milzzellen als primäre FACS-Daten eines repräsentativen Durchgangs von jeweils 20-25 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Die Histogramme zeigen die Fluoreszenzintensität des kostimulatorischen Molekül CD86 aus KO und WT Milzzellen gegenüber einer ungefärbten Probe. Die grau ausgefüllte Kurve stellt die ungefärbte Kontrolle (Ctrl) dar, während die rote Line die KO und die schwarze Line die WT Probe darstellt. Die Auswertung dieser Daten erfolgte mit FlowJo.

Um diese Tendenz näher zu untersuchen, wurden die erhaltenen Daten quantifiziert und sind in Abb. 21 dargestellt. Diese Abb. 21 zeigt sehr deutlich, dass die LPS-Stimulation bei allen untersuchten Milzzellpopulationen zu einer höheren CD86-Expression geführt hat und dient somit als Nachweis über den Aktivierungszustand dieser Zellen. Während die CD86-Expression bei unbehandelten Milzzellen von WT und KO Tieren niedrig ist, steigt die Expression des Aktivierungsmarkers nach Stimulation mit LPS um fast das Zweifache an gegenüber den unstimulierten Proben. Die myeloide Zellen aus KO Tieren zeigen nach LPS-Stimulation ein mit 37 % signifikant höheres Expressionslevel im Vergleich zu myeloiden Zellen aus WT Tieren (Teilabb. 21A). CD11c<sup>+</sup> Zellen zeigen nach LPS-Stimulation in KO Tieren eine Aufregulation des Aktivierungsmarkers um das 2,4-fache gegenüber den unbehandelten Zellen (Teilabb. 21B). Ähnlich mit einem 2,1-fach höherem CD86-Expressionslevel verhalten sich die stimulierten CD11c<sup>+</sup> Zellen aus den WT Tieren im Vergleich zu unbehandelten Zellen. In Teilabb. 21C sieht man ebenfalls, dass LPS behandelte B-Zellen aus KO Tieren

## Ergebnisse

eine ca. 34 % höhere CD86-Expression aufweisen im Vergleich zu stimulierten B-Zellen aus WT Tieren. Die Teilabb. 21D zeigt für stimulierte Makrophagen eine ähnliche Genotyp-spezifische Veränderung der CD86-Expression, hier beträgt die Expressionszunahme in KO Tieren ca. 20 % mehr gegenüber den Makrophagen aus WT Tieren.



**Abb. 21: Analysen zum Reifungszustand von Milzzellen aus WT und KO Mäusen**

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf CD11b<sup>+</sup> (A), CD11c<sup>+</sup> (B), CD19<sup>+</sup> (C) und CD68<sup>+</sup> (D) unstimulierten (-) und 24 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimulierten (LPS) Milzzellen. Die Daten sind normiert auf die CD86-Expression in unbehandelten WT Milzzellen. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Aktivierungsmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet und + Standardfehler von jeweils 20-25 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp bestimmt. Statistik: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; T-Test.

Immunzellen, die aus dem Knochenmark von KSRP-defizienten Mäusen analysiert wurden, zeigen keine signifikanten, immunphänotypischen Unterschiede im Vergleich zu WT. In dem Blut von KO Mäusen konnte eine signifikant geringere Frequenz an myeloiden CD11<sup>+</sup> Zellen bzw. an neutrophilen Granulozyten nachgewiesen werden. Weitere signifikante Unterschiede konnten mit stimulierten Milzzellen gezeigt werden, sowohl pDCs (CD11b<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) als auch BZ (CD11b<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) sind in einer signifikant höheren Frequenz in den Milzen von KO Mäusen vorhanden. Die LPS-Stimulation bewirkt weiterhin eine tendenziell stärkere Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf den prominenten Immunzellpopulationen in der Milz von KSRP-defizienten Mäusen. Die T-Zellen zählen ebenfalls zu der Haupt-Zellpopulation in der Milz, die Analysen dazu werden in einem separaten Kapitel 4.5 zusammengefasst. Im nächsten/folgenden Kapitel soll geklärt werden, ob die gerade beschriebenen Unterschiede vom Immunphänotyp auf eine differenzielle Viabilität der Zellen zurückzuführen ist.

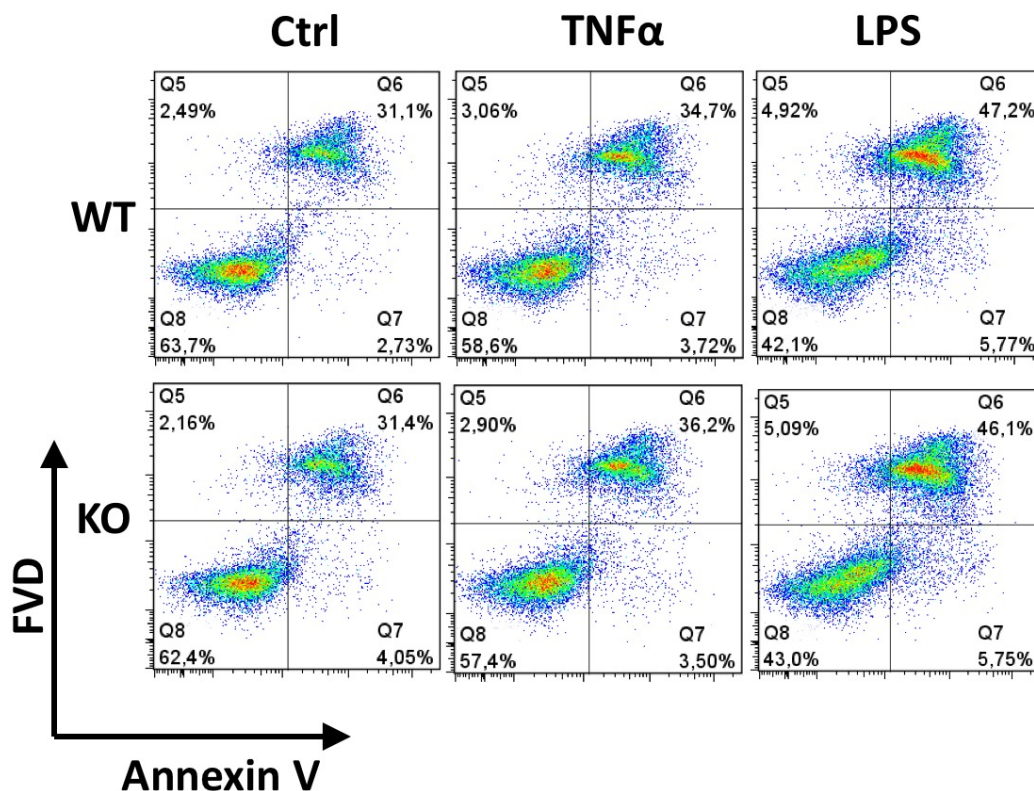
### 4.2 Viabilität von Immunzellen

Einige Unterschiede in der Immunzell-Frequenz von KSRP-defizienten Mäusen konnten bereits in den vorherigen Untersuchungen beobachtet werden. Diese Veränderungen könnten unterschiedliche Gründe haben. Eine naheliegende Frage, die in diesem Kontext untersucht werden soll ist, ob KSRP mit der Viabilität der Zellen interferiert. Daher soll in den folgenden Experimenten geklärt werden, ob die zelluläre Apoptose- und Nekroserate zwischen den Genotypen variiert. Dazu wurde die Viabilität der unterschiedlichen Immunzellpopulationen unter basalen Bedingungen und nach 24-stündiger Inkubation mit Stimulanzien wie TNF- $\alpha$  und LPS untersucht. Beide Substanzen haben Einfluss auf diverse immunregulatorische Funktionen, sind aber auch durch ihre Beteiligung an unterschiedlichen Signaltransduktionsprozessen in der Lage proapoptotische Effekte zu begünstigen [227-232].

Frühapoptotische Zellen lassen sich durch Annexin V nachweisen, wohingegen Zellen, die durch FVD (*fixable viability dye*) oder 7-AAD (7-Aminoactinomycin D) angefärbt werden, als nekrotisch bezeichnet werden. In der frühen Phase des Zelltodes kommt es zum Transfer von Phosphatidylserin (PS), einen Zellmembranbestandteil, von der Innenseite der Zellmembran zur Membranaußenseite. Annexin V bindet Ca<sup>2+</sup> abhängig an Phospholipid-Proteine mit einer hohen Affinität für PS und wird daher als Nachweis für apoptotische Zellen verwendet [193, 194]. Tote und spätnekrotische Zellen lassen sich dagegen mit den „Vitalfarbstoffen“ FVD und 7-AAD färben. Diese Reagenzien dringen in Zellen, die keine intakte Zellmembran besitzen, ein und interkalieren in die DNA dieser Zellen [233].

### 4.2.1 Quantifizierung von apoptotischen Knochenmarkszellen

In Abb. 22 sind primäre FACS-Viabilitäts-Analysen von einer repräsentativen Messung dargestellt. In den Diagrammen sind die nekrotischen Knochenmarkszellen (y-Achse) gegen frühapoptotische Zellen (x-Achse) aufgetragen. Mit Hilfe der eingeteilten Quadranten lassen sich Aussagen über den prozentualen Anteil der positiv gefärbten Knochenmarkszellen treffen, wobei jeweils im ersten Quadranten lebende Zellen dargestellt werden. In der folgenden Abb. 23 wurde die Gesamt-Frequenz von Annexin V mit den unterschiedlichen Bedingungen zwischen den Genotypen quantitativ ausgewertet.



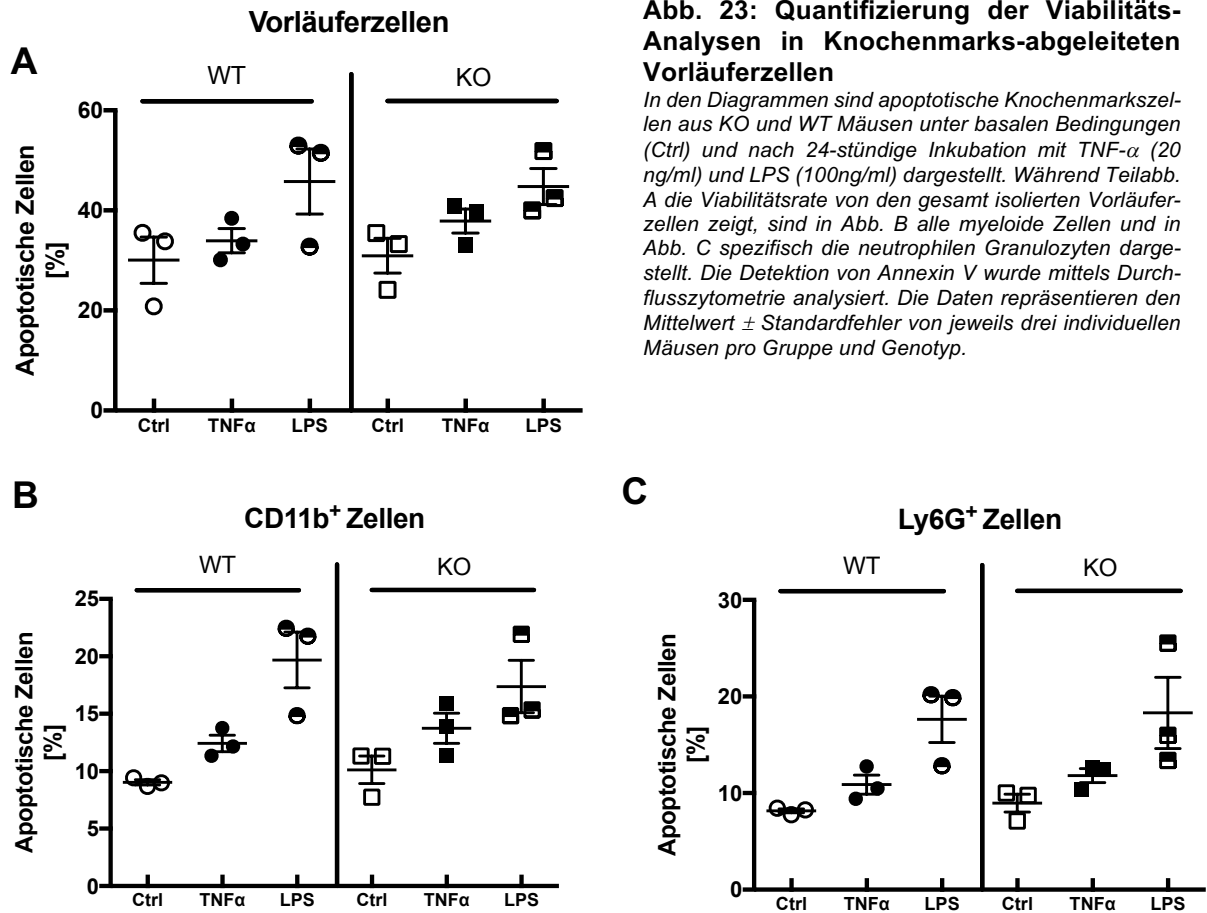
**Abb. 22: Repräsentative FACS-Analysen der Viabilität von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen aus WT und KO Mäusen unter basalen Bedingungen (Ctrl) und nach 24-stündiger Behandlung mit (20ng/ml) TNF- $\alpha$  und (100ng/ml) LPS. Die Detektion von FVD (fixable viability dye), sowie Annexin V erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei sind die lebenden Zellen im ersten Quadranten (Q8) dargestellt. Zu sehen ist ein repräsentativer Durchgang von drei durchgeführten Messungen. Die Auswertung dieser Daten erfolgte mit FlowJo.

## Ergebnisse

---

Teilabb. 23A zeigt die prozentuale Apoptoserate der Gesamtvorläuferzellen, welche aus Knochenmark von WT und KSRP KO Mäusen isoliert wurden. Die Vorläuferzellen aus WT und KO Tieren zeigen bereits ohne Behandlung eine Apoptoserate von ca. 30 %. TNF- $\alpha$  bewirkt eine minimale Zunahme der apoptotischen Zellen um 4 % in Knochenmarkszellen von WT und um 8 % in Knochenmarkszellen von KO Mäusen. Etwas höher mit einem größeren Standardfehler liegt die Apoptoserate nach LPS-Behandlung Genotyp-unspezifisch bei ca. 45 %. Die Teilabb. 23B zeigt, dass unter basalen Bedingungen in dem gesamten Knochenmark aus WT und KO Tieren ca. 10 % der myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen Annexin V positiv sind und somit apoptotisch. TNF- $\alpha$  erhöht die Frequenz von Annexin V in myeloiden WT Zellen um ca. 3 %, mit 4 % Erhöhung ist somit die Apoptoserate in myeloiden KO Zellen ähnlich. Auch hier zeigt LPS einen etwas stärkeren apoptotischen Effekt mit 10 % höheren Frequenz in WT und 7 % höherer Frequenz von Annexin V gegenüber den unbehandelten Kontrollen. In Teilabb. 23C wurde die Apoptoserate von neutrophilen Granulozyten im Knochenmark analysiert. Entsprechend der Viabilität von myeloiden Zellen sind die Ergebnisse auch hier Genotyp-unspezifisch.



**Abb. 23: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen in Knochenmarks-abgeleiteten Vorläuferzellen**

In den Diagrammen sind apoptotische Knochenmarkszellen aus KO und WT Mäusen unter basalen Bedingungen (Ctrl) und nach 24-stündige Inkubation mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) und LPS (100ng/ml) dargestellt. Während Teilabb. A die Viabilitätsrate von den gesamt isolierten Vorläuferzellen zeigt, sind in Abb. B alle myeloide Zellen und in Abb. C spezifisch die neutrophilen Granulozyten dargestellt. Die Detektion von Annexin V wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils drei individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

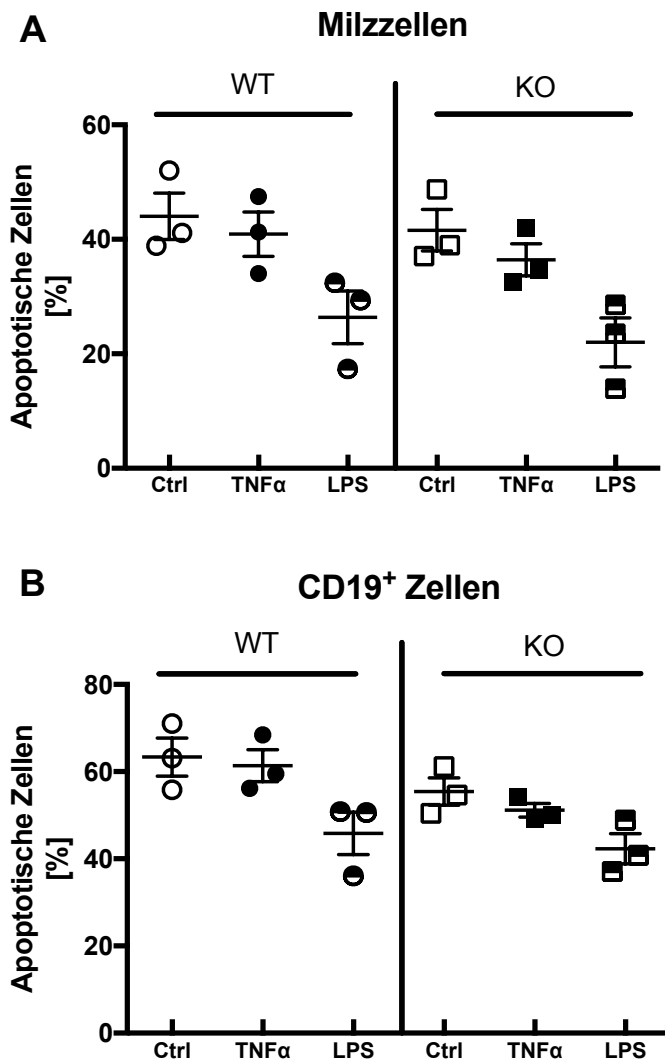
#### 4.2.2 Quantifizierung apoptotischer Milzzellen

In Abb. 24 sind primäre FACS-Viabilitäts-Analysen von einer repräsentativen Messung dargestellt, die Daten sind vergleichbar mit Abb. 22 (s. Anhang Abb. 63)

Aus Teilabbildung 24A wird ersichtlich, dass unbehandelte Milzzellen aus WT Tieren mit 44 % eine vergleichbare Apoptoserate aufweisen, wie Milzzellen aus KSRP KO Tieren. Der Einfluss von Stimulanzen bewirkt in Milzzellen eine Verringerung der apoptotischen Zellen. Die Annexin V Frequenz in den Milzzellen von WT Tieren sinkt um 3 % nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  und um 18 % nach LPS-Zugabe, ähnlich verringert sich die Apoptoserate um 8 % nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  und um 20 % nach Behandlung mit LPS in Milzzellen von KO Tieren gegenüber den entsprechenden unbehandelten Kontrollen. Bei unbehandelten WT CD19<sup>+</sup> B-Zellen liegt die Apoptoserate bei

## Ergebnisse

64 %, verglichen mit KO CD19<sup>+</sup> B-Zellen ist dort die Apoptoserate mit 55 % geringer. Mit 2 % geringerem Anteil an apoptotischen Zellen in WT B-Zellen und 4 % in KO B-Zellen bewirkt TNF- $\alpha$  nur minimale Veränderungen gegenüber unbehandelten Proben (Teilabb. 24B). LPS-Zugabe bewirkt eine deutlichere Abnahme von apoptotischen Zellen um 22 % in WT B-Zellen und 15 % in KO B-Zellen gegenüber den unbehandelten Kontrollen.



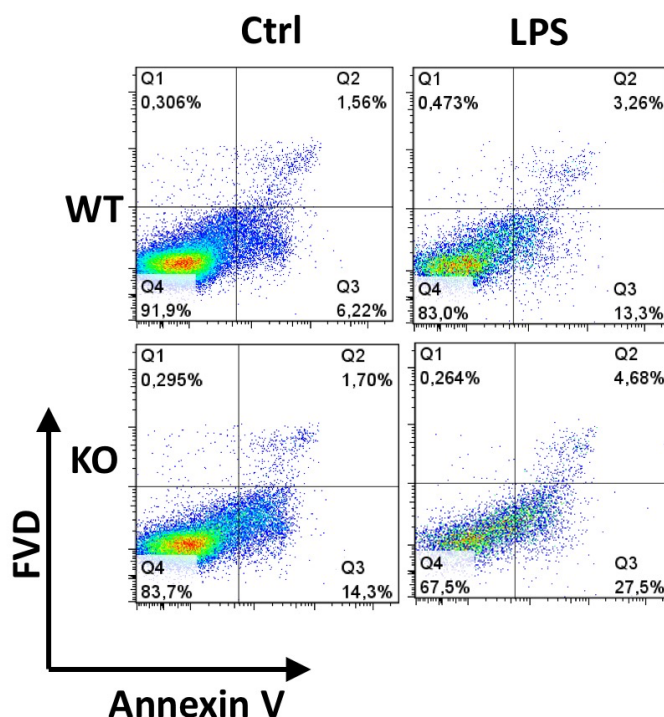
**Abb. 24: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen von Milzzellen**

In den Diagrammen sind apoptotische Milzzellen aus KO und WT Mäusen unter basalen Bedingungen (Ctrl) und nach 24-stündiger Inkubation mit TNF- $\alpha$  (20 ng/ml) und LPS (100 ng/ml) dargestellt. Während Teilabb. A die Viabilitätsrate von den gesamten isolierten Milzzellen zeigt, sind in Abb. B spezifisch B-Zellen dargestellt. TNF- $\alpha$  wurde mit 20 und LPS 100 ng/ml eingesetzt. Die Detektion von Annexin V wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils drei individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp.



### 4.2.3 Quantifizierung apoptotischer PBMC

Die primären FACS-Daten der Lebend/tot-Färbung myeloider PBMC zeigen eine deutlich höhere Frequenz an lebenden Zellpopulationen im Vergleich zu Zellpopulationen aus Milz oder Knochenmark (Abb. 25). Bei diesen repräsentativen Messungen sieht man bereits im ersten Quadranten von Kontroll-KO-Mäusen ein um ca. 12 % verringerten Anteil an lebenden  $CD11b^+$  Zellen gegenüber dem WT. Während in den vorherigen Analysen der überwiegende Anteil an toten Zellen als FVD und Annexin V doppelt positiv dokumentiert wurde, überwiegen in diesen Messungen prozentual die frühapoptotischen ( $FVD^-AnnexinV^+$ ) Zellen. Die Apoptoserate steigt in myeloiden Zellen von unbehandelten KSRP-KO Mäusen aber auch in Mäusen, denen 20 mg/kg LPS appliziert wurde, um etwa das Doppelte an im Vergleich zu Mäusen ohne KSRP KO.



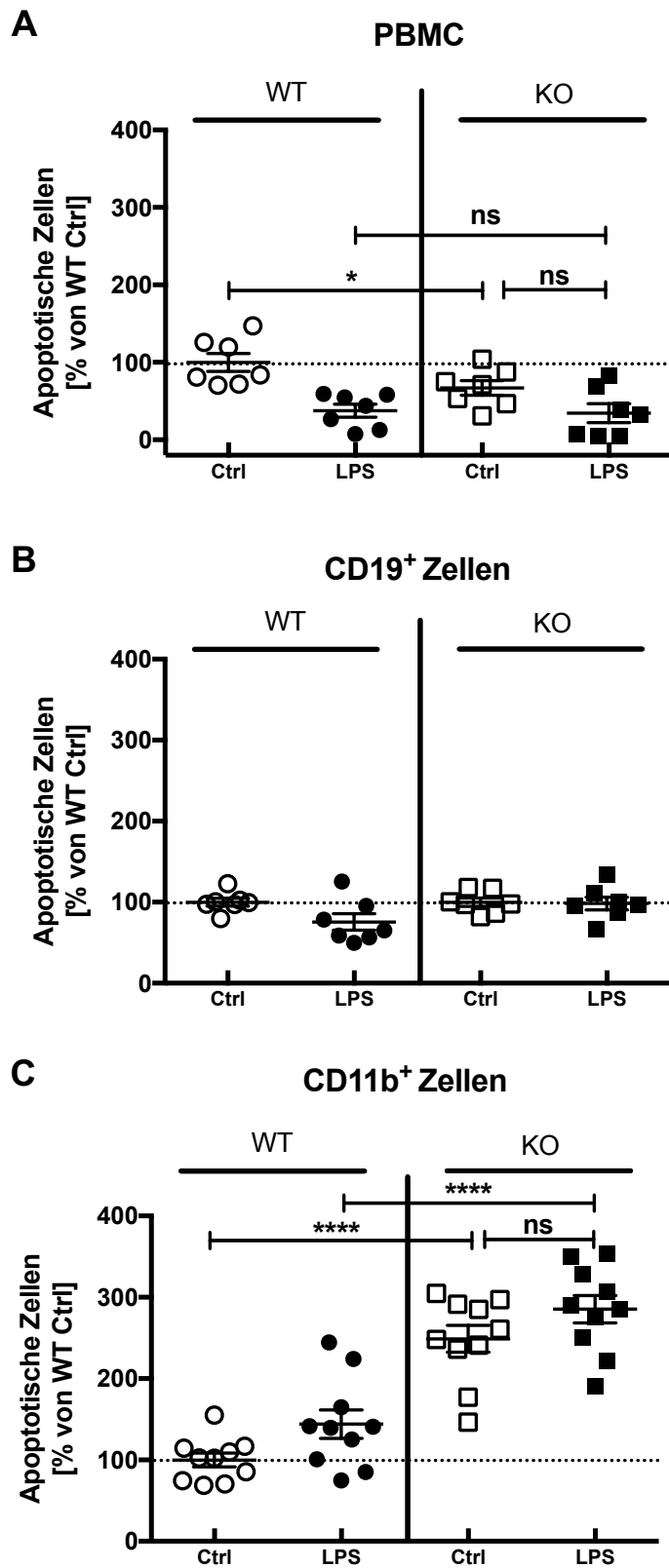
**Abb. 25: Repräsentative Vitabilitätsmessung myeloider Zellen aus dem peripheren Blut**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten von myeloiden  $CD11b^+$  Zellen aus unbehandelten KO und WT Mäusen (Ctrl), sowie aus Mäusen, die für 6 Stunden mit 20 mg/kg LPS i.p. gespritzt wurden. Die Detektion von FVD (fixable viability dye), sowie von Annexin V erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei sind die lebenden Zellen im ersten Quadranten (Q4) dargestellt. Zu sehen ist ein repräsentativer Durchgang von jeweils 7-10 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Die Auswertung dieser Daten erfolgte mit FlowJo [241].

## Ergebnisse

---

Die quantifizierten Viabilitätsdaten sind normiert auf die unterschiedlichen Messungen der jeweiligen unbehandelten WT Kontrolle (*Ctrl*), wodurch die Genotyp-spezifische Veränderung verdeutlicht wird. Vergleicht man die Apoptoserate der Gesamt-PBMC aus unbehandelten Mäusen, so verringert sich die Frequenz von Annexin V positiver Zellen in KO Mäusen signifikant um ca. 33 % (Teilabb 26A). Mäuse, denen für 6 Stunden LPS appliziert wurde, zeigen ebenfalls eine geringere Frequenz an Annexin V positiven Zellen, in WT PBMC sinkt die Apoptoserate um 62 %, ähnlich wie in PBMC aus KO Mäusen mit 66 % gegenüber den WT Kontrollen. Betrachtet man die B-Zellen aus dem peripheren Blut, ist lediglich eine moderate Verringerung der Annexin V Frequenz in WT Mäusen, die mit LPS behandelt wurden, zu beobachten. Andere Gruppen zeigen keine Viabilitäts-Veränderungen von peripheren B-Zellen im Vergleich zu Kontroll-WT Mäusen. Der deutlichste Unterschied ist zwischen CD11b<sup>+</sup> myeloiden Zellen zu erkennen (Teilabb. 26C). Übereinstimmend mit primären FACS-Analysen, lässt sich in unbehandelten KO Mäusen eine ca. 2,5-fach höhere Frequenz an apoptotischen myeloiden Zellen messen, im Vergleich zu unbehandelten WT Mäusen. Die Apoptoserate von myeloiden WT Zellen in LPS-behandelten Mäusen erreicht zwar ebenfalls einen 1,44-fachen höheren Wert, jedoch ist die Frequenz an apoptotischen myeloiden Zellen in KO Tieren ca. 2,9-fach höher als bei den WT Kontrollen. Diese Genotyp-spezifischen Unterschiede sind statistisch signifikant.

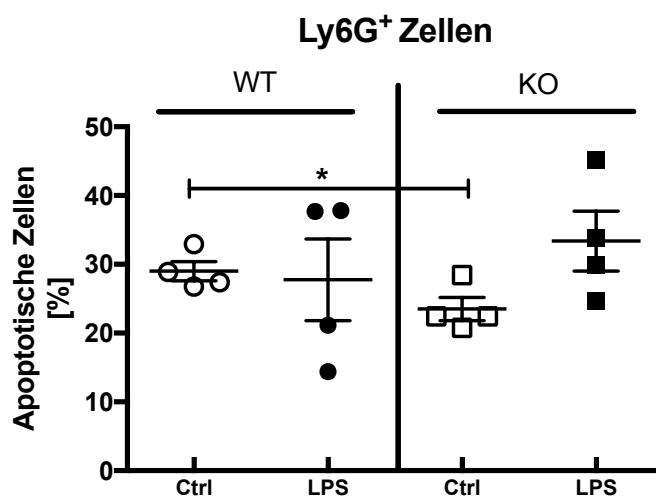


**Abb. 26: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen von PBMC**

In den Diagrammen sind apoptotische PBMC (A), B-Zellen (B) und myeloide Zellen (C) aus unbehandelten KO und WT Mäusen (Ctrl), sowie aus Mäusen, die für 6 Stunden mit 20 mg/kg LPS i.p. gespritzt wurden, dargestellt. Die Detektion von Annexin V erfolgte mittels Durchflusszytometrie und wurde auf die Expression in unbehandelten WT PBMC normiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet und  $\pm$  Standardfehler von jeweils 7-10 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp bestimmt. Statistik: ns = nicht signifikant \* $p < 0,05$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$ ; One-way ANOVA.

## Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob es sich bei den myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen um neutrophile Granulozyten handelt, wurde in einem kleineren Umfang mit vier Tieren pro Genotyp die Apoptoserate von Ly6G<sup>+</sup> Zellen bestimmt. Anders als bei der Gesamtpopulation an CD11b<sup>+</sup> Zellen verringert sich die Apoptoserate von unbehandelten KO Mäusen um 19 % im Vergleich zum WT. LPS-behandelte Mäuse zeigen Genotyp-unspezifisch eine ca. 30-prozentige ( $\pm 3\%$ ) Frequenz an apoptotischen Zellen.



**Abb. 27: Quantifizierung der Viabilitäts-Analysen von PBMC**

In den Diagrammen sind apoptotische Ly6G<sup>+</sup> Zellen aus unbehandelten KO und WT Mäusen (Ctrl), sowie aus Mäusen, die für 6 Stunden mit 20 mg/kg LPS i.p. gespritzt wurden, dargestellt. Die Detektion von Annexin V wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und  $\pm$  Standardfehler von jeweils drei individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: \* $p < 0,05$ ; T-Test.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Viabilität von den gesamten myeloiden Zellen aus dem Blut von KSRP-defizienten Mäusen stark eingeschränkt ist (Abb. 27). Neutrophile Granulozyten zeigen zwar im Blut eine geringere Frequenz der Zellpopulation (Abb. 16), aber keine erhöhte Sterblichkeit (Abb. 27). Daher wurde nach weiteren funktionellen Parametern analysiert und im nachfolgenden Kapitel 4.3 die Migrationsfähigkeit untersucht. Für diejenigen Immunzell-Populationen, für die keine Unterschiede in der Frequenz und in der Viabilität nachgewiesen werden konnten, gibt es auch keine Unterschiede in der metabolischen Aktivität (Anhang: Abb. 65-68).

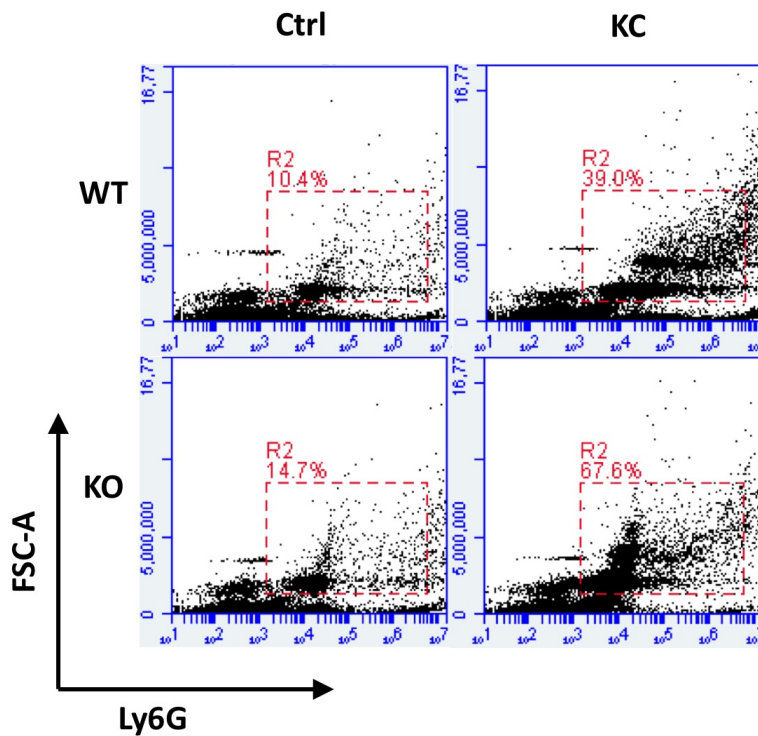
### 4.3 Migrationsfähigkeit von Immunzellen

Mit den vorherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass neutrophile Granulozyten zwar mit einer geringeren Zell-Frequenz im Blut vorkommen, jedoch nicht verstärkt apoptotisch/nekrotisch sind. Als eine mögliche Ursache könnte eine gestörte Migrationsfähigkeit, die Einfluss auf das Auswandern dieser Zellen in die Peripherie nimmt, in Betracht gezogen werden.

Die Motilität bzw. die Migration von Immunzellen lässt sich durch sogenannte „Lockstoffe“ (Chemokine) steuern. Daher können bspw. Immunzellen am Entzündungsherd über Sekretion spezifischer Chemokine gezielt benötigte Immunzellen rekrutieren [234].

In Vorversuchen wurden die optimalen Bedingungen für die Migrations-Assays etabliert. Daher wurden die nachfolgenden Versuche mit  $5 \times 10^5$  Zellen pro 24-Loch-Platte und mit Transwell-Einsätzen mit einer Porengröße von 5  $\mu\text{m}$  durchgeführt.

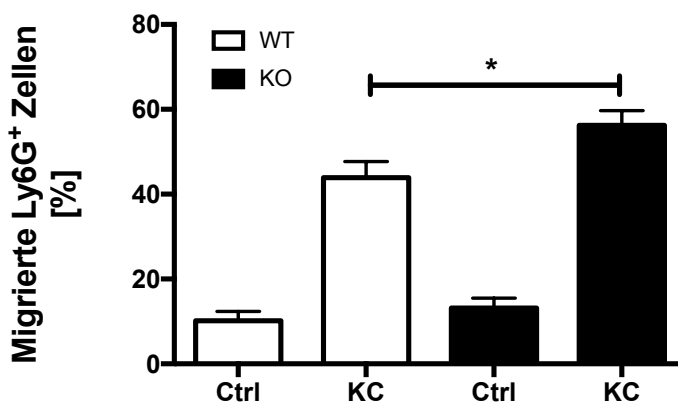
Abb. 28 zeigt repräsentative FACS-Daten der Migration  $\text{Ly6G}^+$  Knochenmarkszellen aus KSRP-defizienten und WT Mäusen. Die neutrophilen Granulozyten aus WT Mäusen zeigen ohne die Anwesenheit des Chemokins eine Migration von ca. 10 % der ursprünglich eingesetzten  $5 \times 10^5$  Knochenmarkszellen. Neutrophile Granulozyten aus KO Mäusen zeigen eine vergleichbare Migration von ca. 15 %. In Anwesenheit des KC-Chemokins (s. Kapitel 3.2.9) steigt die Migration in WT  $\text{Ly6G}^+$  Zellen auf ca. 40 %, Zellen aus KO Mäusen zeigen dagegen mit ca. 68 % die höchste Migrationsrate.



**Abb. 28: Repräsentative Analysen der Migration neutrophiler Granulozyten aus dem Knochenmark**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten von Ly6G<sup>+</sup> (neutrophile Oberflächenmarker) Oberflächen Knochenmarkszellen, die ex vivo im Transwell-System ohne (Ctrl) und mit Chemokin (KC) migriert sind. Die Migration wurde über einen Zeitraum von 4 h analysiert. Die rot eingegrenzte Population entspricht dem prozentualen Anteil der migrierten Ly6G<sup>+</sup> Zellen von einer repräsentativen WT und KO Maus. Die Messung und Auswertung dieser Daten erfolgte am BD Acuril™ C6.

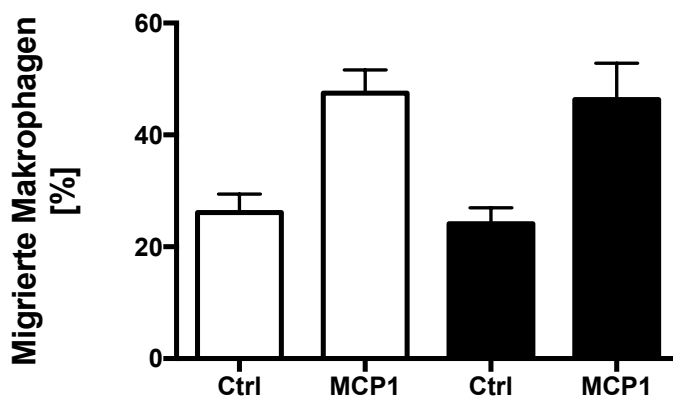
Die Quantifizierung der Daten von jeweils sechs durchgeführten Messungen ergab eine statistisch signifikante höhere Migrationsrate von KSRP-defizienten neutrophilen Granulozyten im Vergleich zu den WT Granulozyten. Die basale Migrationsrate von neutrophilen Zellen aus WT Mäusen liegt Genotyp-unspezifisch bei 10 % ( $\pm 3$  %). In Anwesenheit von KC steigt die Migration von WT Neutrophilen auf 44 % und in neutrophilen Zellen von KO Mäusen mit einem signifikanten Unterschied auf 56 %.



**Abb. 29: Quantitative Analysen der Migration von neutrophilen Granulozyten aus dem Knochenmark**

Zusehen ist der prozentuale Anteil von Ly6G<sup>+</sup> (neutrophile Oberflächenmarker) Knochenmarkszellen aus WT und KO Mäusen, die ex vivo im Transwell-System ohne (Ctrl) und mit Chemokin (KC) migriert sind. Die Detektion von Ly6G<sup>+</sup> Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und + Standardfehler von jeweils sechs untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: \*p < 0,05; T-Test.

Parallel zu den neutrophilen Granulozyten wurde eine Vergleichspopulation mitgeführt (Abb. 30). Dazu wurden Knochenmarkszellen über neun Tage zu Makrophagen differenziert (s. Kapitel 3.2.3.1). Makrophagen zeigen unter basalen Bedingungen Genotyp-unspezifisch eine etwas höhere Migration von 26 % im Vergleich zu neutrophilen Granulozyten. Unter Einfluss von MCP-1 (s. Kapitel 3.2.9) steigt die Motilität von WT BM-M $\phi$  um ca. 25 %, vergleichbar ähnlich steigt auch die Makrophagen Migration aus KO Mäusen.



**Abb. 30: Quantitative Analyse der Migration von BM-M $\phi$**

Zusehen ist der prozentuale Anteil von BM-M $\phi$  aus WT und KO Mäusen, die ex vivo im Transwell-System ohne (Ctrl) und mit Chemokin (MCP1) migriert sind. Die Detektion von Makrophagen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und + Standardfehler von jeweils vier untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

Die Ergebnisse zeigen eine leicht verbesserte Motilität und Chemotaxis von neutrophilen Granulozyten aus KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Es lässt sich daraus schlussfolgern, dass die Granulozyten keinen Defekt in der Migration aufweisen.

### 4.4 Zytokinproduktion von LPS-stimulierten Antigen präsentierenden Zellen

Aus eigenen Vorarbeiten und Daten aus der Literatur ist bekannt, dass KSRP durch die Bindung an die ARE-Sequenzen in der 3'-UTR der mRNAs von pro-inflammatorischen Proteinen wie IL-6, IL-8, iNOS und TNF- $\alpha$  deren mRNA-Abbau begünstigt [29, 32, 35, 45, 46]. Eine weitere Publikation [49] zeigt, dass KSRP-defiziente Mäuse durch höhere IFN- $\alpha$  und - $\beta$  Level besser gegen Virus-Infektionen geschützt sind, da auch hier KSRP über mRNA-Stabilität die genannten Interferone reguliert.

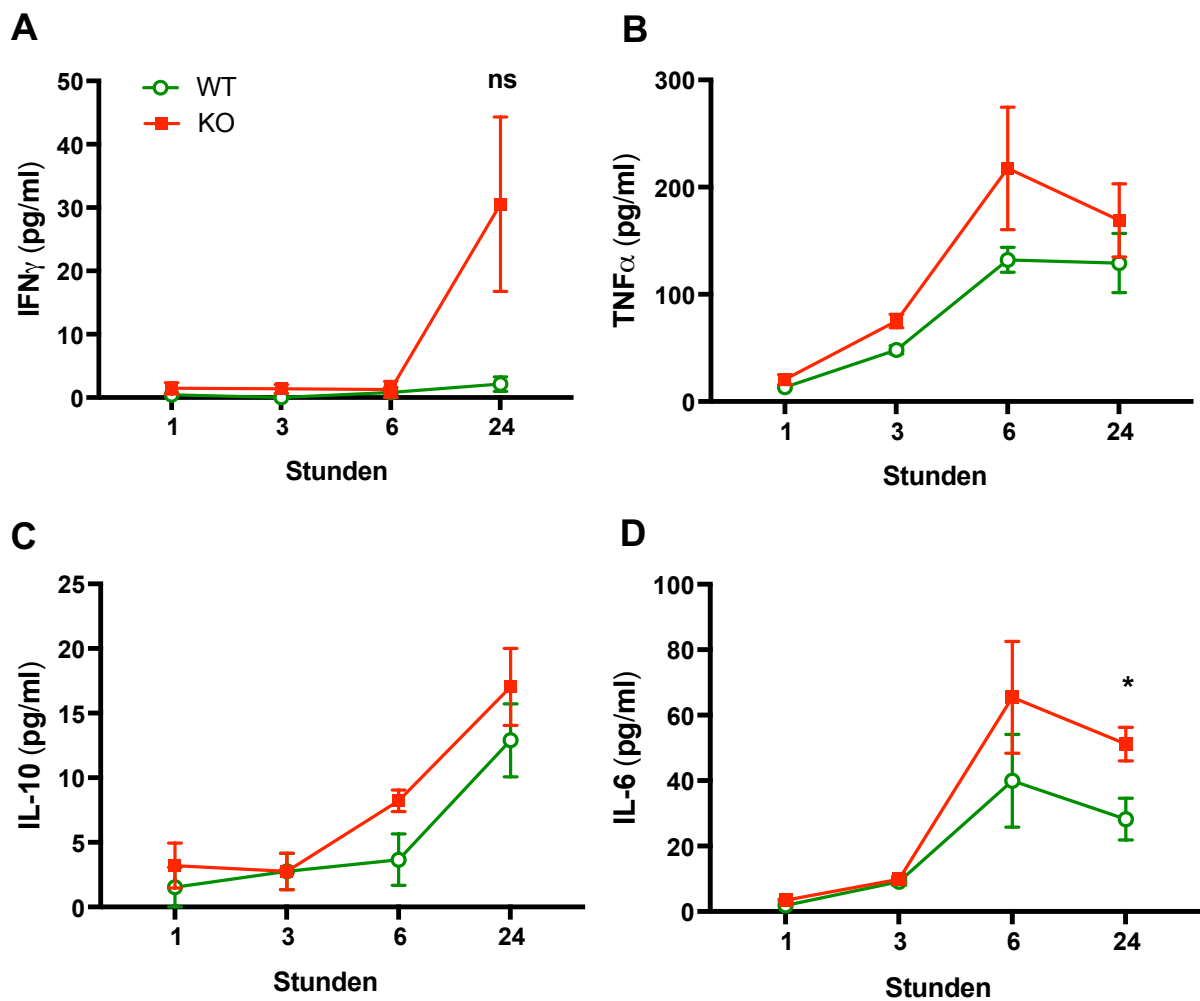
Dadurch wird der regulatorische Einfluss von KSRP auf die pro-inflammatorische Genexpression deutlich. Genauere Untersuchungen zum Zytokin-Expressionsmuster von unterschiedlichen Immunzellpopulationen sollen in dieser Arbeit die zentrale Rolle von KSRP bei der pro-inflammatorischen Immunzellregulation spezifizieren. Allgemein wird angenommen, dass Zytokine regulierende Funktionen im Wachstum und der Differenzierung von Zellen einnehmen [235, 236]. Einen ebenso großen Einfluss haben Zytokine auf die Aktivierung und Steuerung unseres Immunsystems. Somit ist deren Einfluss in der Immunzellregulation unvermeidlich.

In den folgenden Experimenten sollte der Einfluss von KSRP auf die Zytokinexpression einzelner Immunzellpopulationen analysiert werden. Dazu wurden in Vorversuchen Zeit-Kinetikstudien durchgeführt, bei denen Immunzellen mit sub- und optimaler Dosis an TNF- $\alpha$  und LPS behandelt wurden und die sezernierenden Zytokine im Zellüberstand nach 1, 3, 6 und 24 Stunden gesammelt und analysiert wurden. Damit sollte nicht nur der idealste Zeitpunkt, sondern auch die passende Konzentration des Stimulus für die Zytokinproduktion bestimmt werden. Dabei konnte ermittelt werden, dass sich die TNF- $\alpha$  Stimulation mit sub- und optimaler Dosis für die Zytokinproduktion nicht eignete (Daten nicht gezeigt). Die verwendete LPS Konzentration von 100 ng/ml zeigte dabei den stärksten stimulierenden Effekt und wurde daher in folgenden Experimenten verwendet.



#### 4.4.1 Zytokinmuster-Analysen von Milzzellen

Milzzellen (siehe Kapitel 3.2.5 und 3.2.6) wurden mit 100 ng/ml LPS (optimale Dosis) stimuliert, die dadurch produzierten Zytokine wurden aus dem Zellüberstand gesammelt und mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma BD Biosciences analysiert.



**Abb. 31: Zeitkinetik der Zytokinproduktion von Milzzellen aus KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Produktion von IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C) und IL-6 (D) von LPS (100 ng/ml) stimulierten Milzzellen. Die Konzentrationen von diesen Zytokinen wurden aus dem Zellkulturüberstand nach 1, 3, 6 und 24 Stunden über CBA quantifiziert. Wiedergegeben sind die Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler von jeweils drei untersuchten individuellen Mäusen pro Genotyp. Statistik: ns = nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; T-Test.

## Ergebnisse

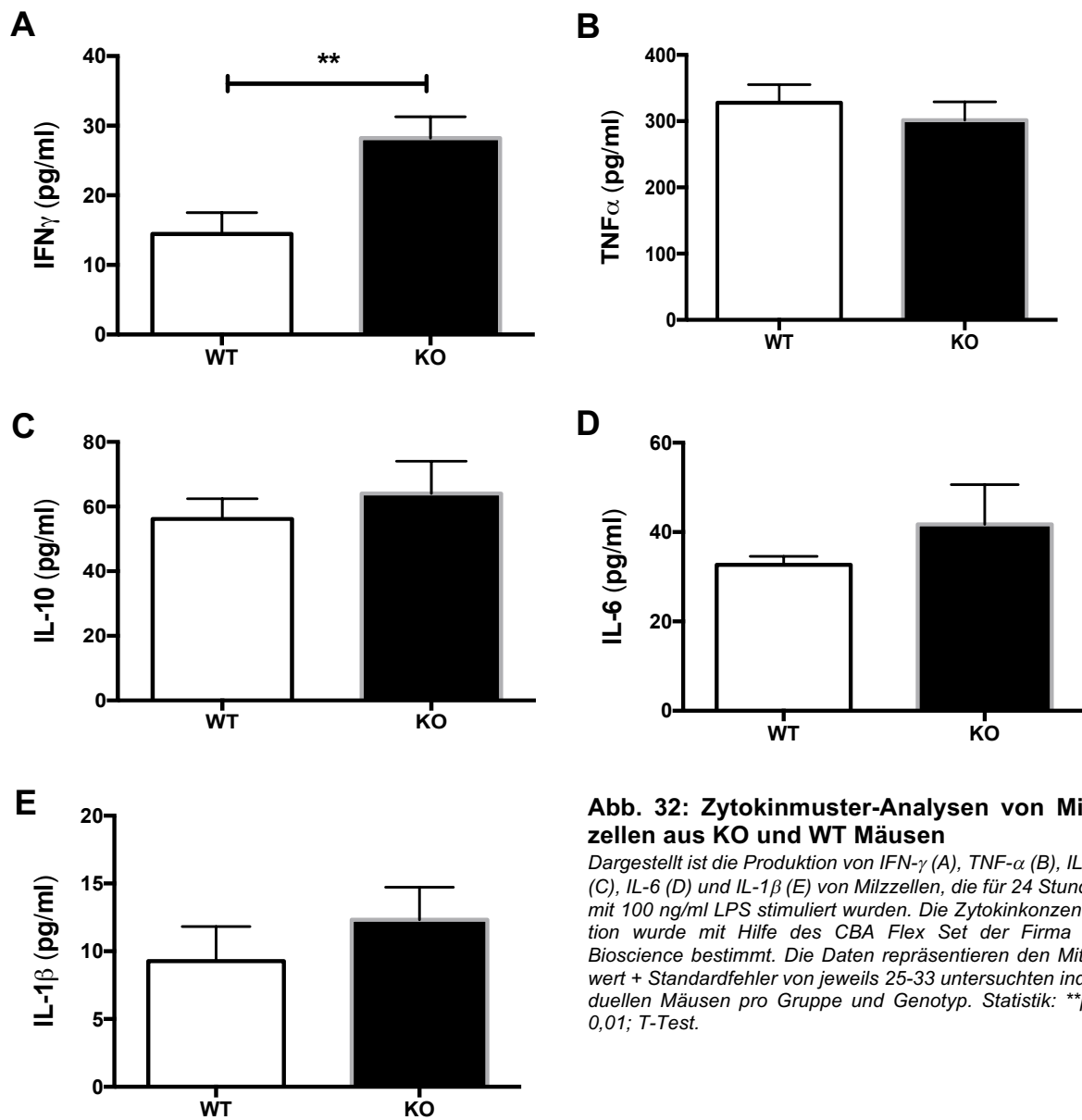
---

IFN- $\gamma$  lässt sich erst nach 24-stündiger Inkubation mit LPS in moderaten Mengen im Zellüberstand von WT Milzzellen nachweisen (Teilabb. 31A). Eine deutlich höhere IFN- $\gamma$  Menge von ca. 30 pg/ml konnte im Überstand von Milzzellen aus KO Tieren gemessen werden. Durch die heterogenen Werte einzelner Tiere ist dieser Unterschied in dem hier vorliegenden Umfang statistisch nicht signifikant. Teilabb. 31B zeigt, dass TNF- $\alpha$  bereits nach 1 Stunde im Überstand von WT Milzzellen (13,34 pg/ml) und KO Milzzellen (20,59 pg/ml) nachgewiesen werden kann. Die Zytokinproduktion steigt nach 3 Stunden im WT auf 48,22 pg/ml und auf 75,12 pg/ml in KO Zellen an. Nach 6 Stunden scheint die Produktion von TNF- $\alpha$  in Milzzellen von WT Mäusen bei 132,24 pg/ml und in Zellen von KO Mäusen bei 216,60 pg/ml ein Maximum anzunehmen, da nach 24 Stunden die TNF- $\alpha$  Konzentration im WT auf 129,24 pg/ml und im KO auf 169 pg/ml absinkt. Geringe IL-10 Mengen lassen sich nach einer Stunde im Überstand von WT (1,54 ng/ml) und KO Milzzellen (3,2 pg/ml) nachweisen, die nach 3 Stunden Genotyp-unspezifisch bei 2,75 pg/ml liegen (Teilabb. 31C). Nach 6 Stunden Stimulation steigt die IL-10 Konzentration im Überstand von KO Milzzellen auf 8,22 pg/ml an, im Vergleich zu 3,66 pg/ml in WT Milzzellen. Nach 24-stündiger Stimulation hält sich der moderate Unterschied mit einer IL-10 Konzentration von 12,9 pg/ml im Überstand vom WT gegenüber 17,03 pg/ml im Überstand von KO Milzzellen. Auch die IL-6 Produktion zeigt nach 1- (2-3 pg/ml) und 6- stündiger Stimulation (9-10 pg/ml) keine Unterschiede zwischen den Genotypen. Nach 24 Stunden wird der Unterschied signifikant und liegt bei WT Milzzellen bei 28,23 pg/ml und in KO Milzzellen bei 51,18 pg/ml.

Mit Hilfe der Zeitkinetik konnte der 24 Stunden-Wert als idealer Zeitpunkt für den Nachweis von Zytokinen im Zellüberstand für weitere Untersuchungen festgelegt werden. Die folgenden Experimente wurden mit einer höheren Mauszahl von mindestens 25 Mäusen pro Genotyp durchgeführt.

Betrachtet man sich in der Teilabb. 32A die IFN- $\gamma$  Produktion nach 24-stündiger Stimulation mit LPS, so wird deutlich, dass mit einem höheren Probenumfang der bereits beobachtete Unterschied in Teilabb. 32A nun auch statistisch signifikant ist. Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen produzieren 28,99 pg/ml IFN- $\gamma$  im Vergleich zu (14,458 pg/ml) Milzzellen in WT Mäusen. Der Unterschied in der TNF- $\alpha$  Produktion (Teilabb.

31B) ist trotz der erhöhten Mauszahl nicht signifikant, die TNF- $\alpha$  Mengen liegen Genotyp-unspezifisch relativ konstant bei ca. 312 pg/ml  $\pm$  12 pg/ml. In Teilabb. 32C ist die IL-10 Produktion aus KSRP-defizienten Milzzellen leicht erhöht (64,05 pg/ml), gegenüber Milzzellen aus WT Mäusen (56,32 pg/ml). Der signifikante Unterschied in der IL-6 Produktion konnte durch weitere Experimente nicht bestätigt werden (Teilabb. 32D), hier bleibt der tendenzielle Unterschied erhalten. Die IL-6 Konzentration im Zellüberstand von Milzzellen aus WT Mäusen liegt bei ca. 33 pg/ml im Vergleich zu 41,72 pg/ml im Überstand von KSRP-defizienten Milzzellen. In den vorangehenden Untersuchungen waren die IL-1 $\beta$  Konzentrationen in den Milzüberständen zu gering um eine aussagekräftige Quantifizierung durchführen zu können. Mit der Erhöhung des Probenumfangs konnte nun die IL-1 $\beta$ -Produktion von stimulierten Milzzellen nachgewiesen werden (Teilabb. 32E). Die IL-1 $\beta$  Konzentration liegt bei Milzzellen aus WT Tieren bei 9,3 pg/ml und vergleichbar mit 12,33 pg/ml in Überständen von KSRP-defizienten Milzzellen.

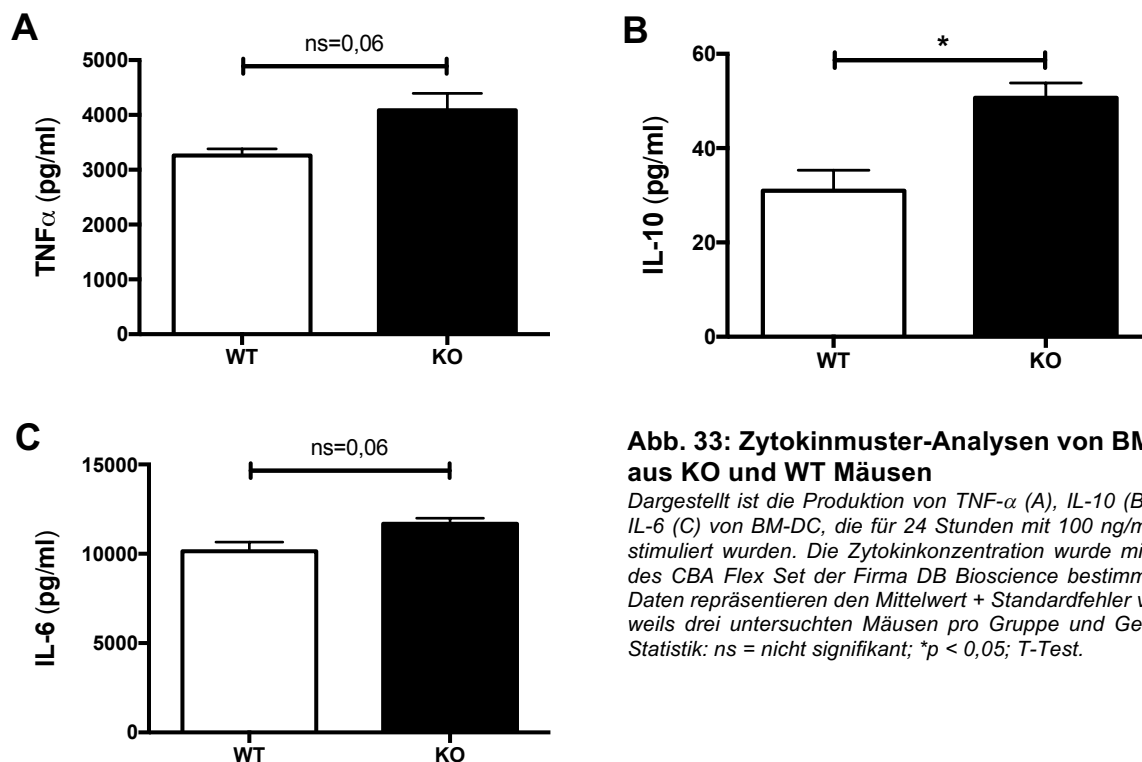


**Abb. 32: Zytokinmuster-Analysen von Milzzellen aus KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Produktion von IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B), IL-10 (C), IL-6 (D) und IL-1 $\beta$  (E) von Milzzellen, die für 24 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert wurden. Die Zytokinkonzentration wurde mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 25-33 untersuchten individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: \*\*p < 0,01; T-Test.

#### 4.4.2 Zytokinmuster-Analysen von BM-DC

Neben den Milzzellen, die aus unterschiedlichen Immunzelltypen bestehen, wurde auch spezifischer in einer definierten Immunzellpopulation nach dem intrinsischen Potential Zytokine zu produzieren untersucht. Dazu wurden wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben dendritische Zellen aus Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen über kolonie-stimulierende Faktoren wie GM-CSF dendritische Zellen differenziert. Auch hier wurde in Vorversuchen eine Zeitkinetik erstellt und mit unterschiedlichen Konzentrationen von Stimulanzen gearbeitet. Die besten Ergebnisse wurden nach 24-stündiger Stimulation mit 100ng/ml LPS (optimalen Dosis) erzielt.



**Abb. 33: Zytokinmuster-Analysen von BM-DC aus KO und WT Mäusen**

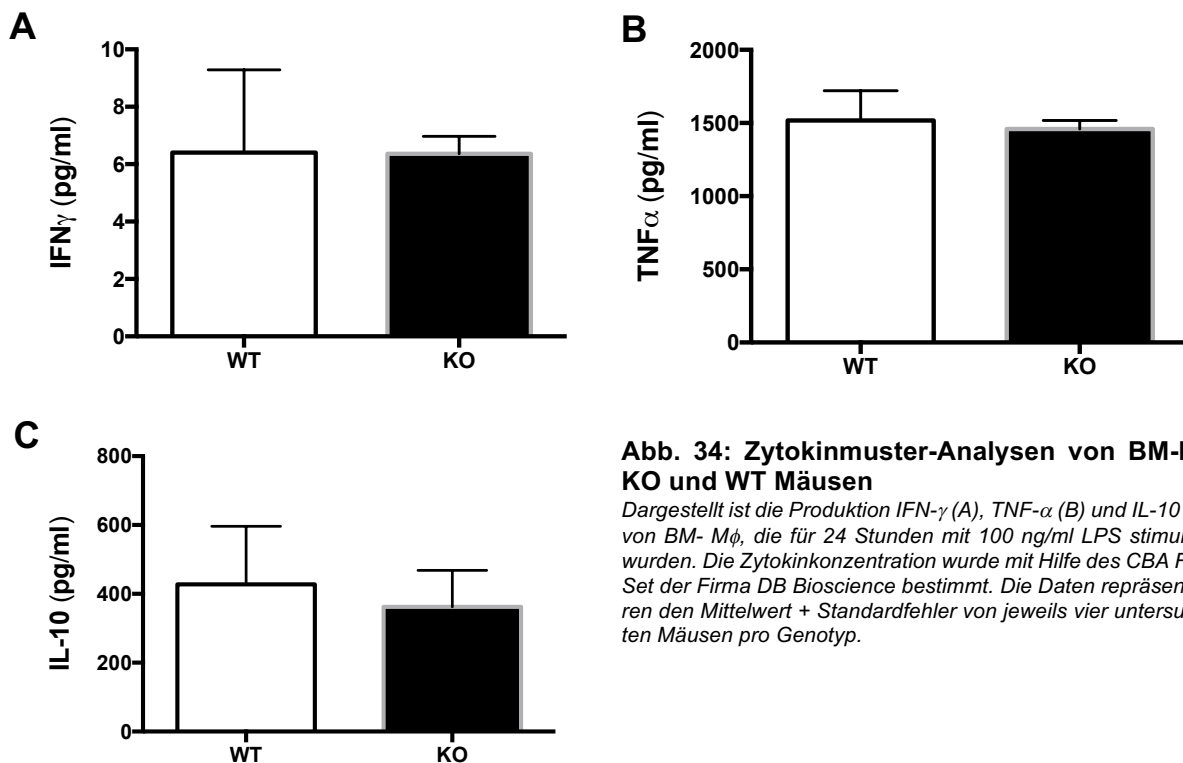
Dargestellt ist die Produktion von TNF- $\alpha$  (A), IL-10 (B), und IL-6 (C) von BM-DC, die für 24 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert wurden. Die Zytokinkonzentration wurde mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils drei untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: ns = nicht signifikant; \* $p < 0,05$ ; T-Test.

## Ergebnisse

Teilabb. 33A zeigt im BM-DC Überstand von KSRP KO Mäusen höhere Mengen an  $\text{TNF-}\alpha$  (4084,84 pg/ml), als im Vergleich zum Überstand (3261,5 pg/ml) von WT BM-DC. Deutlicher wird es für die Produktion von IL-10 (Teilabb. 33B): hier produzieren KSRP-defiziente BM-DC signifikant höhere Mengen an IL-10 gegenüber den Kontrollzellen. Auch die Konzentration an IL-6 scheint mit 11676,72 pg/ml im Überstand von KO BM-DC tendenziell höher zu liegen als im Überstand (10145,45 pg/ml) von WT BM-DC.

### 4.4.3 Zytokinmuster-Analysen von BM-M $\phi$

Parallel zur Differenzierung von BM-DC wurden aus Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen auch Makrophagen mit M-CSF angereichert. Unter den gleichen Bedingungen wie bei BM-DC, wurden die Zytokine im Zellüberstand von Makrophagen quantifiziert.



**Abb. 34: Zytokinmuster-Analysen von BM-M $\phi$  KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Produktion IFN- $\gamma$  (A), TNF- $\alpha$  (B) und IL-10 (C) von BM-M $\phi$ , die für 24 Stunden mit 100 ng/ml LPS stimuliert wurden. Die Zytokinkonzentration wurde mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience bestimmt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils vier untersuchten Mäusen pro Genotyp.

Nach LPS-Zugabe ließen sich nur geringe Mengen an IFN- $\gamma$  im Überstand von Makrophagen nachweisen (Teilabb. 34A), während im Überstand von BM-DC gar kein IFN- $\gamma$  detektiert werden konnte. Weitere detektierbare Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Teilabb. 34B) und IL-10 (Teilabb. 34C) wurden mit vergleichbaren Konzentrationen im Überstand nachgewiesen und zeigen somit keine Genotyp-spezifische Zytokin Produktion in Makrophagen.

Stimulierte Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen produzieren deutlich höhere IFN- $\gamma$  Mengen, die in beispielhaft untersuchten spezifischen Zelltypen nicht nachgewiesen wurden. Des Weiteren konnte die signifikant höhere IL-10 Produktion in BM-DC in stimulierten Makrophagen nicht bestätigt werden.

KSRP scheint Zelltyp-spezifisch die Zytokinproduktion in Antigen präsentierenden Zellen (APC) zu modulieren. Ebenso konnte nachgewiesen werden, dass KSRP den Phänotyp, die Viabilität und Motilität von myeloide APC beeinflusst. Daher soll in folgenden Untersuchungen geklärt werden, ob KSRP auch einen intrinsischen Effekt auf den T-Zell Immunphänotyp ausübt.

### 4.5 T-Zell-Immunphänotyp

T-Zellen gehören dem adaptiven Immunsystem an, dennoch besitzen sie übergreifende Funktionen und interagieren mit dem angeborenen Immunsystem. Allgemein unterscheidet man beim adaptiven Immunsystem zwischen humoraler und zellvermittelter Immunantwort [237, 238]. Die zellvermittelte Immunantwort richtet sich primär gegen bakteriell oder viral infizierte sowie entartete körpereigene Zellen und wird von CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) durchgeführt. Während bei humoraler Immunantwort überwiegend CD4<sup>+</sup> T-Helfer-Zellen an der Vermittlung von Antikörper produzierenden und sezernierenden B-Lymphozyten beteiligt sind [239, 240]. T-Zellen sind in der Lage pathogenes, prozessiertes Material (Antigene) abhängig von ihrem TCR über MHC-Moleküle auf der Oberfläche von Antigen-präsentierenden Zellen zu

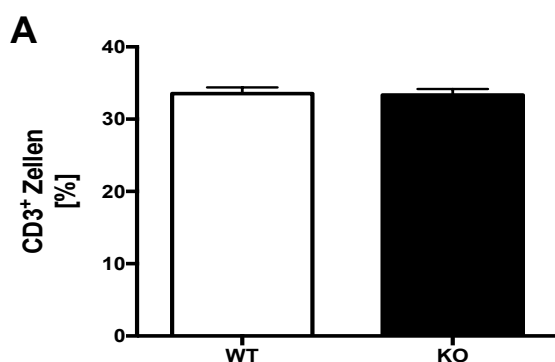
## Ergebnisse

erkennen und Immunantworten zu induzieren [241, 242]. In diesem Zusammenhang werden Zytokine produziert, die die Steuerung der Immunantwort beeinflussen.

Welchen Einfluss KSRP auf den T-Zell-Immunchenotyp hat und welche damit einhergehenden Funktionen verändert werden, soll mit den folgenden Experimenten geklärt werden.

In den Untersuchungen wurden aus KSRP WT und KO Mäusen die Milzzellen aufgereinigt (Kapitel 3.2.5) und mittels Durchflusszytometrie unter basalen Bedingungen die Frequenz der Gesamtzellpopulation der  $CD3^+$  T-Zellen bestimmt. Weiterhin wurde spezifischer nach den  $CD4^+$  und  $CD8^+$  TZ-Subpopulationen geschaut und den Aktivierungszustand zwischen den genannten Subpopulationen verglichen.

In Teilabb. 35A ist ganz deutlich zu erkennen, dass es keine Unterschiede, in der Frequenz von  $CD3^+$  Zellen, zwischen den Genotypen gibt. Genotypen-unabhängig liegt die Frequenz von  $CD3^+$  Zellen bei ca. 34 %. Teilabb. 35B zeigt, dass die Frequenz der  $CD4^+$  T-Zellpopulation in beiden Genotypen bei ca. 50 % der gesamten T-Zellpopulation liegt. Auch der Anteil der  $CD8^+$  T-Zellpopulation liegt unabhängig vom Genotyp bei ca. 36 % und zeigt damit übereinstimmend mit den vorherigen Daten keinen Unterschied in der Verteilung der TZ-Subpopulation.



**Abb. 35: Frequenz-Analyse von T-Lymphozyten aus der Milz**

In Teilabbildung A ist der prozentuale Anteil der gesamten  $CD3^+$  T-Zellpopulation als Diagramm dargestellt. Teilabbildung B zeigt den prozentualen Anteil der  $CD3^+CD4^+$  und Teilabb. C der  $CD3^+CD8^+$  TZ-Subpopulation. Die Expression der Oberflächenmarker wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + SEM von 16 individuellen Mäusen pro Genotyp.

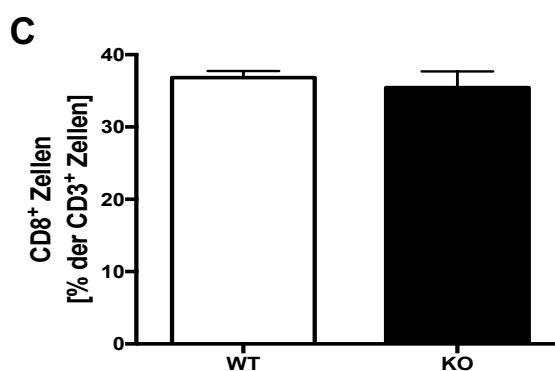
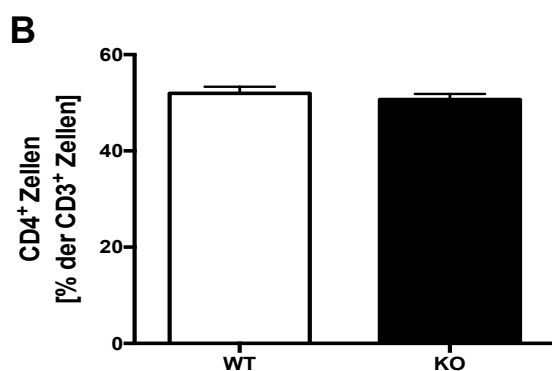
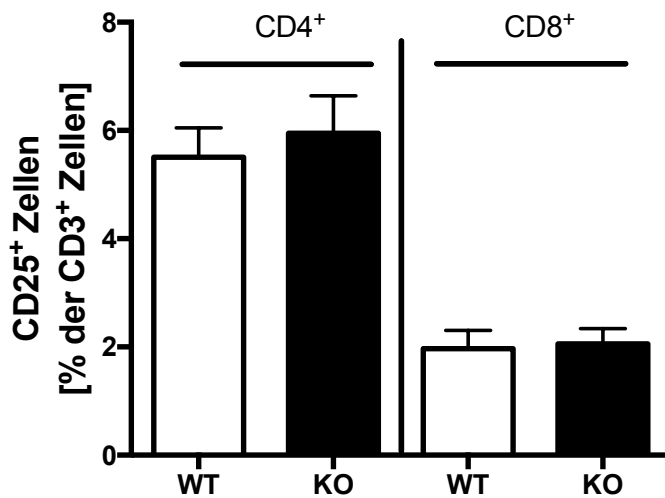




Abb. 36 zeigt die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 auf CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Von den gesamt analysierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen exprimieren 5,5 % an CD4<sup>+</sup> TZ aus WT Mäusen den Aktivierungsmarker und ca. 6 % CD4<sup>+</sup> TZ aus KO Mäusen. Auf CD8<sup>+</sup> TZ lässt sich die Expression von CD25 Genotyp-unabhängig mit ca. 2 % bestimmen.



**Abb. 36: Frequenz-Analyse von aktivierten T-Lymphozyten aus der Milz**

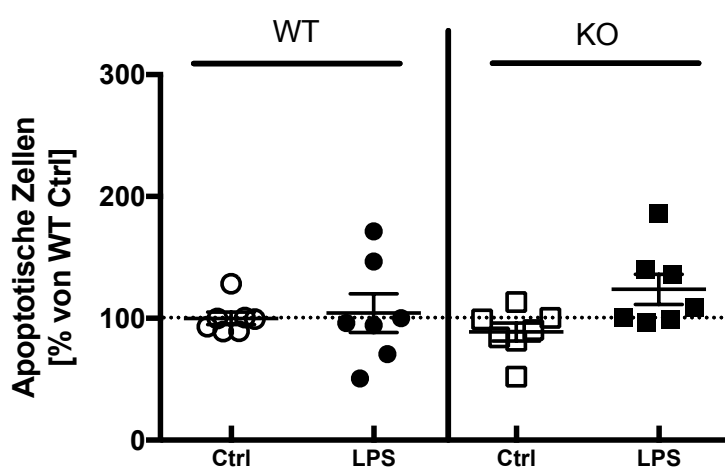
Dargestellt ist der prozentuale Anteil des Aktivierungsmarkers CD25 auf doppelt positiven CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> (links) und CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (rechts) T-Zellen aus der Milz. Die Expression des Aktivierungsmarkers wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + SEM von jeweils 16 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

Die Frequenz der CD3<sup>+</sup> Zellen aus der Milz von KSRP-defizienten Mäusen unterscheiden sich nicht von Kontroll-Mäusen. Ebenfalls zeigen deren T-Zell-Subpopulation vergleichbare Frequenzen, gleiches konnte in den Blutanalysen gezeigt werden (Kapitel 2.1.2).

### 4.5.1 Genotypische Unterschiede in der Viabilität der T-Zellen

Es konnten auf Frequenz-Ebene keine Genotyp-spezifischen Unterschiede zwischen den untersuchten T-Zellpopulationen beobachtet werden. Um Veränderungen in der Viabilität ausschließen zu können, wurden wie in Kapitel 4.2 beschrieben auch für T-Zellen Viabilitäts-Analysen durchgeführt. Dazu wurden  $CD3^+$  TZ unter basalen Bedingungen, aber auch in Mäusen, denen 20 mg/kg LPS (*in vivo*) appliziert wurde, untersucht. Die Untersuchung der Milzzellen erfolgte ebenfalls unter basalen Bedingungen, aber auch nach 24-stündigem Einfluss mit 100ng/ml LPS (*ex vitro*) (Kapitel 3.2.6).

Die Apoptoserate der T-Zellen ist in Abb. 37 dargestellt. Dazu wurden die apoptotischen  $CD3^+$  T-Zellen von unbehandelten WT Mäusen (Ctrl) als 100 % definiert und der Anteil der apoptotischen Zellen unter den anderen Bedingungen dazu in Relation gesetzt. T-Zellen aus WT Mäusen, die mit LPS behandelt wurden, zeigen im Vergleich zur Kontroll-Gruppe keine relevanten Veränderungen in der Apoptose. Ähnlich verhält sich die Apoptoserate von  $CD3^+$  TZ aus KSRP KO Mäusen gegenüber den Kontroll-Proben. T-Zellen aus LPS behandelten KO Mäusen zeigen gegenüber den Kontroll-Proben eine Zunahme der Apoptoserate um ca. 24 %. Dieser Unterschied ist aber aufgrund der heterogenen Werte nicht signifikant.

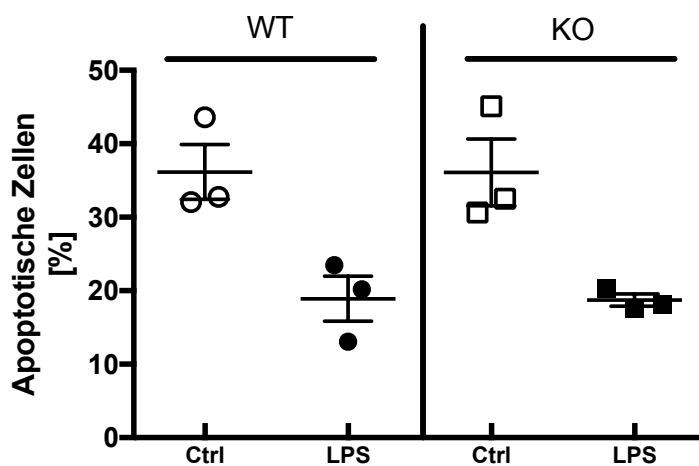


**Abb. 37: Quantitative Viabilitäts-Analysen von  $CD3^+$  TZ aus dem peripheren Blut**

Das Diagramm zeigt apoptotische  $CD3^+$  TZ aus unbehandelten KO und WT Mäusen (Ctrl), sowie aus Mäusen, die für 6 Stunden mit 20 mg/kg LPS *i.p.* gespritzt. Die Detektion von Annexin V wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt und normiert auf die Expression in unbehandelten WT PBMC. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet  $\pm$  Standardfehler von jeweils 7-10 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp bestimmt.

Im kleineren Umfang wurde der Vollständigkeitshalber die Apoptoserate von CD3<sup>+</sup> T-Zellen auch in der Milz untersucht.

In den Milzzellen von unbehandelten WT Mäusen, liegt der Anteil an apoptotischen CD3<sup>+</sup> T-Zellen bei ca. 36 % (Abb. 38). Ebenfalls unverändert mit 36 % liegt die Apoptoserate bei T-Zellen aus unbehandelten KSRP KO Mäusen. LPS scheint die Frequenz an apoptotischen Zellen zu verringern, dies Genotyp-unspezifisch auf ca. 19 %.



**Abb. 38: Quantitative Viabilitäts-Analysen von CD3<sup>+</sup> TC aus der Milz**

Das Diagramm zeigt apoptotische CD3<sup>+</sup> TC aus der Milz von KO und WT Mäusen, unter basalen Bedingungen (Ctrl) und nach 24-stündigem Einfluss mit 100ng/ml LPS. Die Detektion von Annexin V wurde mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Die Daten repräsentieren den Mittelwert ± Standardfehler von jeweils drei untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp.

Mit Hilfe dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Abwesenheit von KSRP keinen deutlichen Einfluss auf die Viabilität von CD3<sup>+</sup> T-Zellen nimmt, auch unter Einfluss von LPS.

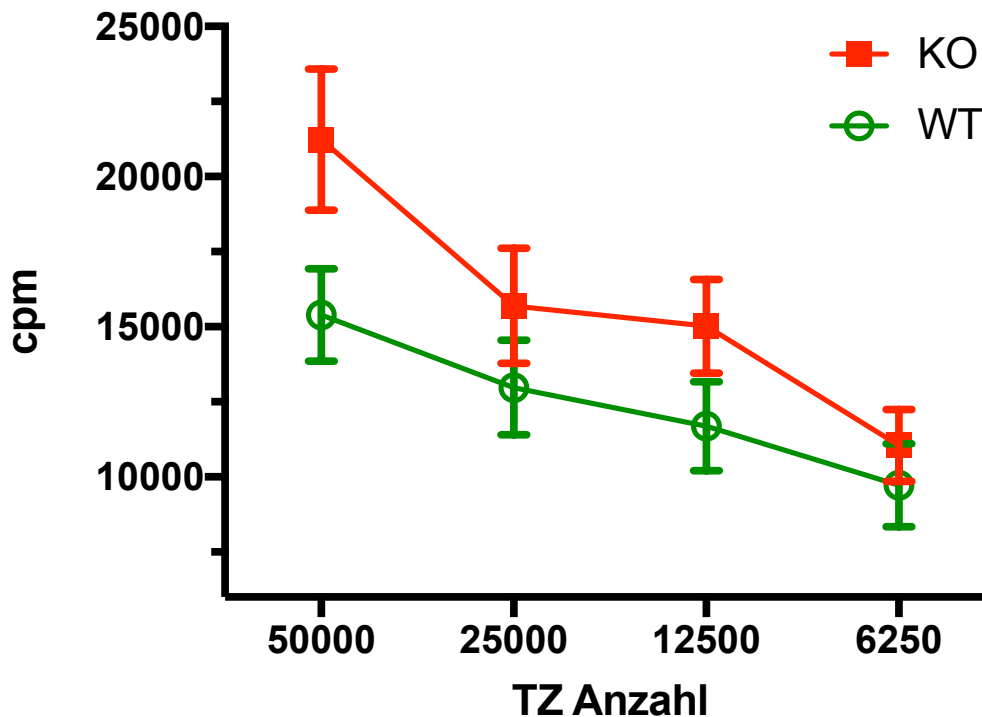
### 4.5.2 Untersuchung der T-Zellproliferation

KSRP scheint bei T-Zellen in der Peripherie keinen Einfluss auf den Phänotyp zu haben. Die Viabilität von KSRP-defizienten T-Zellen scheint ebenfalls unbeeinträchtigt zu sein.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit soll die Proliferation von KSRP-defizienten T-Zellen analysiert werden. Dadurch soll geklärt werden, ob und welche Einschränkungen T-Lymphozyten in Abwesenheit von KSRP aufweisen. T-Zellen müssen im Stande sein zu proliferieren, um ihre Aufgaben im Immunsystem effektiv ausüben und spezifische Antigene erkennen zu können [243].

Dazu wurden alle in der Milz enthaltenen T-Zell Subpopulationen (wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben) über Nylonwolle isoliert und polykonal mit CD3 und CD28 AK für einen T-Zell-Proliferationsassay stimuliert (Kapitel 3.2.6 & 3.2.7).

Abb. 39 zeigt die eingebaute Menge an  $^3\text{H}$ -Thymidin in „counts per minute“ (cpm), welche proportional zu T-Zellproliferation ist. Hierbei wird die Proliferation zwischen den Genotypen verglichen. Betrachtet man sich die Proliferationsrate für die höchste eingesetzte T-Zahl ( $5 \times 10^5$  Zellen), zeigen die T-Zellen in KSRP-KO Mäusen eine deutlich höhere (21233 cpm) Proliferation gegenüber den Kontroll-Tieren (15390 cpm). Bei sinkender Anzahl der eingesetzten T-Zellmenge verringert sich zwar der Unterschied in der Proliferation zwischen den Genotypen, die Tendenz bleibt jedoch erhalten. Die tendenziell höhere T-Zellproliferation in KSRP-defizienten Mäusen war jedoch nicht signifikant.



**Abb. 39: Proliferation von isolierten T-Zellen aus der Milz von KSRP KO und WT Mäusen nach polyklonaler Stimulation**

Dargestellt sind unterschiedliche T-Zellanzahlen polyklonal stimulierter T-Zellen aus KO (rot) und WT (grün) Mäusen. Die über Nylonwolle aufgereinigten T-Zellen wurden für 90 Std. mit anti-CD3 (1µg/ml) und anti-CD28 (2µg/ml) polyklonal stimuliert. In den letzten 18 Std. der Inkubation wurde zu den proliferierenden T-Zellen  $^3\text{H}$  Thymidin (0,5µCi/Vertiefung) zugegeben. Das in die T-Zellen eingebaute  $^3\text{H}$  Thymidin wurde mit Hilfe des Szintillationszählers als „count per minute“ (cpm) analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 20-25 Tieren/Genotyp.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz mangelnder signifikanter Unterschiede in Viabilität und im Phänotyp der T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen die Proliferation stärker induziert zu sein scheint.

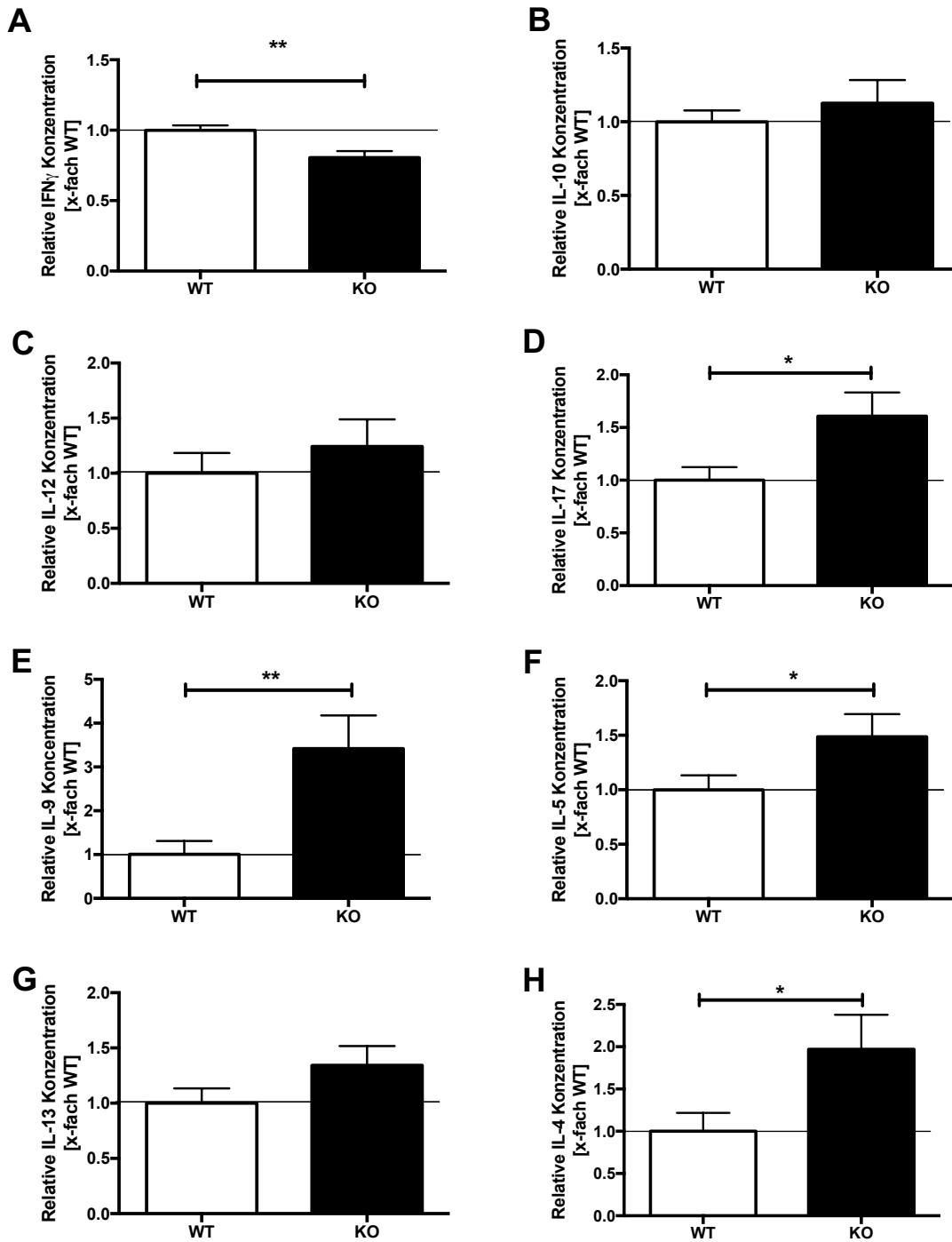
Da T-Zellen basierend auf dem von ihnen produzierten Zytokinmuster unterschiedliche Funktionen ausüben und wir in vorherige Untersuchungen in APC zelltyp-spezifische Unterschiede aufwiesen, sollte der Einfluss von KSRP auf die Zytokinproduktion von T-Zellen untersucht werden

### 4.5.3 Zytokinproduktion von polyklonal stimulierten T-Zellen

T-Zellen werden durch das Zytokinmilieu gesteuert und üben viele ihrer Funktionen über Zytokine aus. So werden B-Zell-Effektorfunktionen durch IFN- $\gamma$  unterstützt und weitere regulatorischen Funktionen durch IL-10 ausgeübt [244, 245]. Um Hinweise auf sichtbare Beteiligung von KSRP auf T-Zell Subpopulationen zu erhalten, wurden isolierte T-Zellen polyklonal stimuliert und das von ihnen produzierte Zytokinmuster im T-Zell-Überstand bestimmt (3.2.5.1; 3.2.6 u. 3.3.4).

In Abb. 40 ist die im T-Zell-Überstand mittels CBA gemessene Zytokinkonzentration dargestellt. Die analysierten Zytokinkonzentrationen von polyklonal stimulierten T-Zellen aus WT Mäusen als 1 definiert und die gemessenen Zytokinkonzentrationen aus Überständen von KO Mäusen dazu in Relation gesetzt.

T-Zellen aus KSRP-KO Mäusen produzieren signifikant weniger IFN- $\gamma$  Mengen im Vergleich zu T-Zellen aus WT Mäusen (Teilabb. 40A). Im Gegensatz dazu wird IL-10 Genotyp-unspezifisch in gleichen Mengen produziert (Teilabb. 40B). Die IL-12 Produktion liegt ähnlich wie IL-10 Genotyp-unspezifisch auf gleichem Level (Teilabb. 40C). Die Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  (Anhang: Abb. 70A+B) zeigen keine Unterschiede zwischen den Genotypen in den gemessenen Zytokinkonzentrationen. IL-17, IL-9, IL-5 und IL-4 zeigen nach der Quantifizierung signifikant höhere Konzentrationen im T-Zell-Überstand von KO Mäusen im Vergleich zu T-Zellen aus WT Mäusen (Teilabb. 40D, E, F u. H). Auch IL-13 scheint in höheren Konzentrationen im T-Zell-Überstand von KSRP-defizienten Mäusen vorzukommen, dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Teilabb. 40G).



#### Abb. 40: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen aus KO und WT Mäusen

Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), IL-12 (C), IL-17 (D), IL-9 (E), IL-5 (F), IL-13 (G) und IL-4 (H) aus dem Überstand polyklonal stimulierter T-Zellen. Nach Aufreinigung durch Nylonwolle, wurden die Zellen für 90 Std. mit anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) und anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) polyklonal stimuliert. Die Zytokinmessung wurde mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience durchgeführt. Die Daten wurden auf die jeweilige Zytokinkonzentration in WT-Mäusen normiert und repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 15-25 individuellen Mäusen pro Genotyp. Statistik: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; T-Test.

## Ergebnisse

---

Aus den analysierten Zytokinen-Daten geht hervor, dass T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen deutlich weniger TH1 assoziierte Zytokine (IFN- $\gamma$ ) und im Gegenzug mehr an TH2 assoziierten Zytokinen (IL-5, IL-4, IL-9, IL-17) produzieren. KSRP scheint diese Veränderung des Zytokinmusters hervorzurufen.

### 4.6 Charakterisierung von T-Zell-Subpopulationen

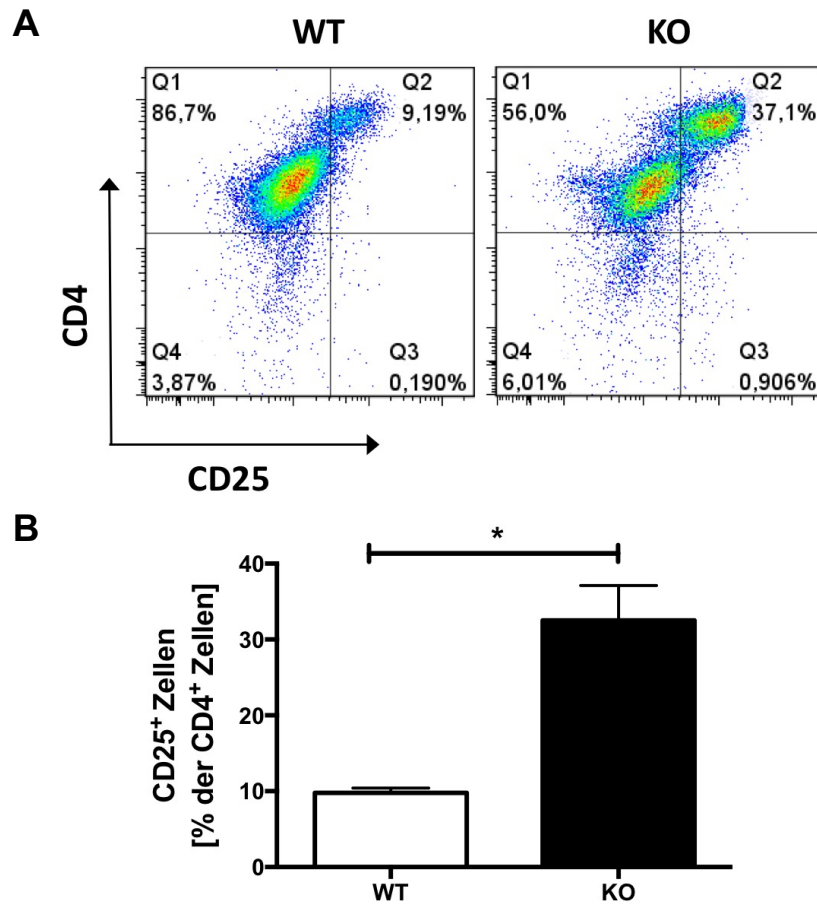
Die bereits erwähnten CD8<sup>+</sup> und CD4<sup>+</sup> positiven TZ-Subpopulationen sind mit unterschiedlichen Funktionen hauptsächlich an adaptiven Immunantworten beteiligt [240]. In diesem Kapitel werden über *Magnetic-Bead-Separation-System* (MACS) (K. 3.2.5.2) aufgereinigte TZ-Subpopulationen näher charakterisiert.

#### 4.6.1 Immunphänotypisierung von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Mit Hilfe des MACS wurden aus Milzzellen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> positive T-Zellen isoliert und für 90 Stunden polyklonal mit CD3 und CD28 AK stimuliert. Anschließend wurde die Identität sowie der Aktivierungszustand mittels Durchflusszytometrie analysiert.

In Teilabb. 41A sind primäre Dotplots von jeweils einer repräsentativen WT und KSRP KO Maus dargestellt. Aufgetragen sind CD4 gegen CD25, die ersten Quadranten (Q4) zeigen die negativen (CD25<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>) T-Zellen und im dritten Quadranten (Q2) sind die doppelt positiven (CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>) T-Zellen dargestellt. Die Quantifizierung in Teilabb. 41B zeigt, dass polyklonal stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus KO Mäusen einen fast dreifach so hohen Aktivierungszustand aufweisen, gegenüber den CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus WT Mäusen.

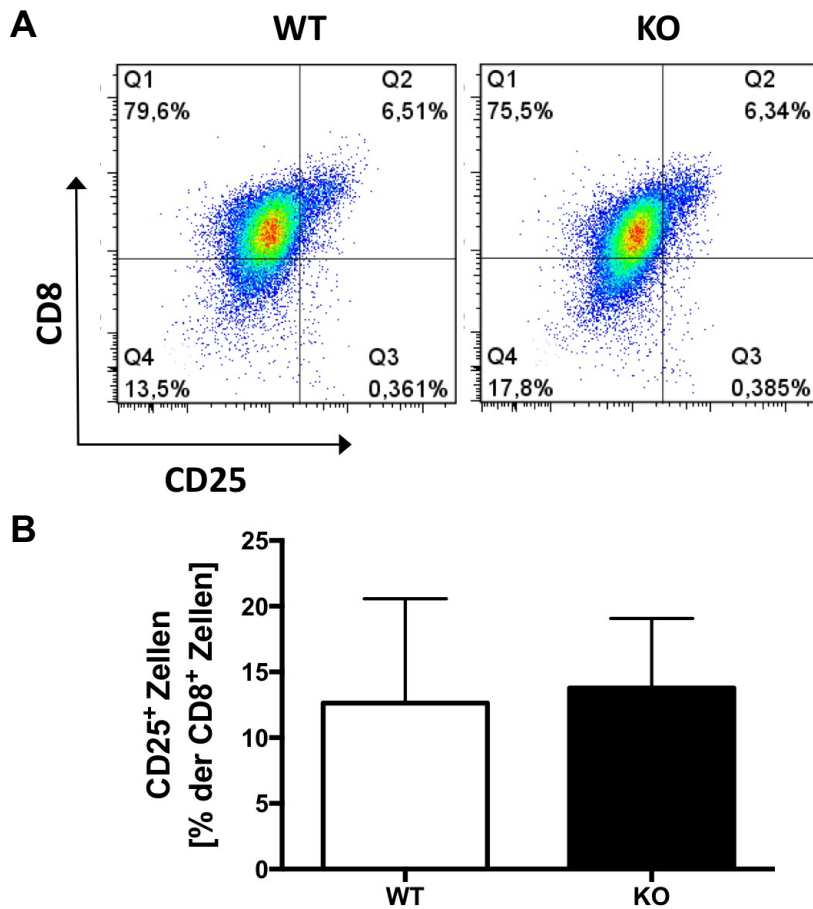




**Abb. 41: Frequenz-Analyse von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz**

In Teilabb. A sind primäre FACS-Daten eines repräsentativen Durchgangs von 2-3 durchgeführten Messungen dargestellt. Teilabb. B zeigt den prozentualen Anteil der CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> doppelt positiven T-Zellen. Die Expression der Oberflächen- und Aktivierungsmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 2-3 untersuchten Mäusen pro Genotyp. Statistik: \* $p < 0,05$ ; T-Test.

Aus den primären FACS-Daten in Teilabb. 42A sind keine Unterschiede in der Frequenz der doppelt positiven CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu erkennen, auch nach Quantifizierung der Daten (Teilabb. 42B) wird deutlich, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der CD25-Expression aufweisen.



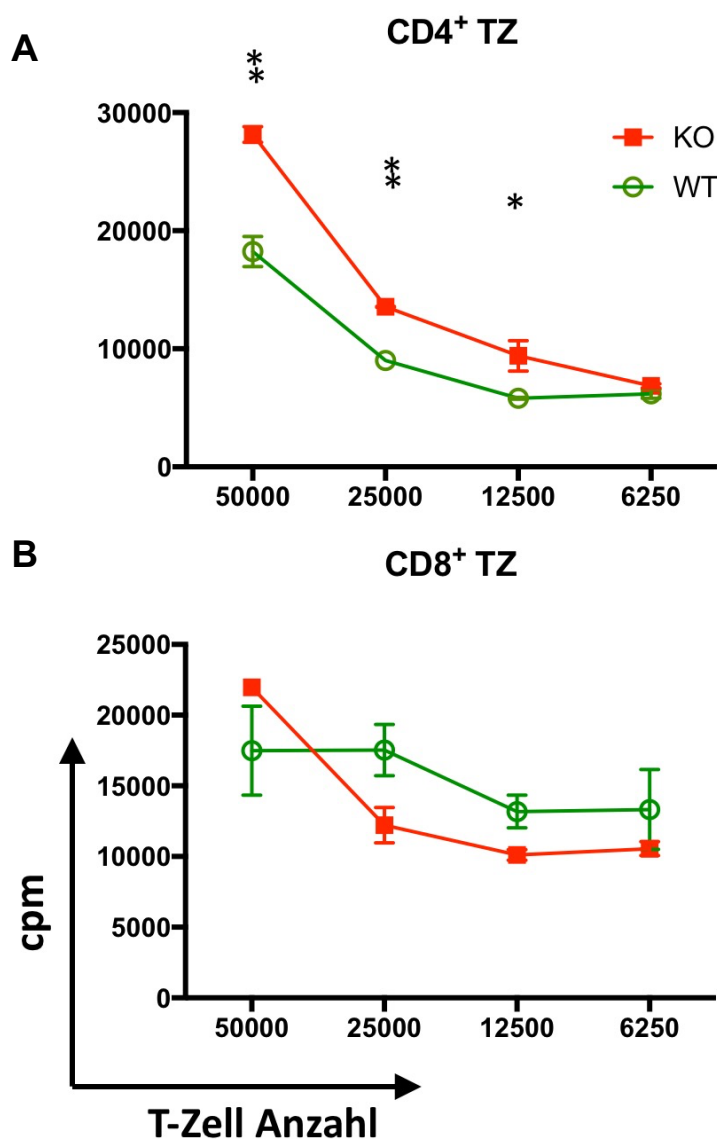
**Abb. 42: Frequenz-Analyse von aktivierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus der Milz**

In Teilabb. A sind primäre FACS-Daten eines repräsentativen Durchgangs von 2-3 durchgeführten Messungen dargestellt. Teilabb. B zeigt den prozentualen Anteil der CD25<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> doppelt positiven T-Zellen. Die Expression der Oberflächen- und Aktivierungsmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 2-3 untersuchten Mäusen pro Genotyp.

Aus den Ergebnissen geht hervor, dass die KSRP Defizienz T-Zelltyp spezifisch für einen höheren Aktivierungszustand in CD4<sup>+</sup> T-Zellen verantwortlich ist.

4.6.2 T-Zellproliferation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Als nächstes sollte auch für die mittels MACS separierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> TZ-Subpopulationen ein Proliferationsassay durchgeführt werden. Dies dient der Klärung, ob sich ein KSRP-Defizit auch funktional auf die Expansion der unterschiedlichen Subpopulationen auswirken kann.



**Abb. 43: Proliferation von isolierten CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen**

Dargestellt sind unterschiedliche T-Zellanzahlen an polyklonal stimulierte CD4<sup>+</sup> (A) und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (B) aus KO (rot) und WT (grün) Mäusen. Diese über MACS aufgereinigten T-Zellen wurden für 90 Std. mit anti-CD3 (1µg/ml) und anti-CD28 (2µg/ml) polyklonal stimuliert. In den letzten 18 Std. der Inkubation wurde zu den proliferierenden T-Zellen <sup>3</sup>H Thymidin (0,5µCi/Vertiefung) zugegeben. Das in die T-Zellen eingebaute <sup>3</sup>H Thymidin wurde mit Hilfe des Szintillationszählers als „count per minute“ (cpm) analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert und ± Standardfehler von jeweils 3 Tieren/Genotyp. Statistik: \*p < 0,05; \*\*p < 0,01; T-Test.

## Ergebnisse

---

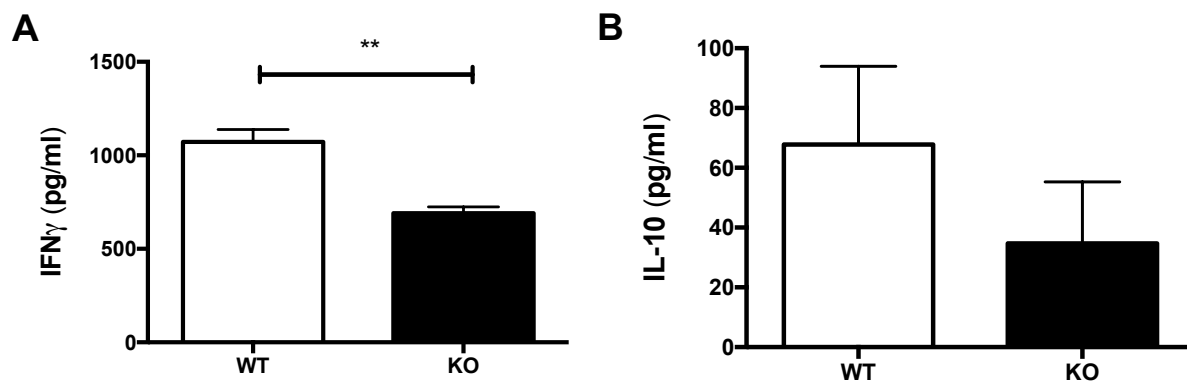
In Abb. 43 ist die Proliferation von  $CD4^+$  (A) und  $CD8^+$  T-Zellen (B) nebeneinander dargestellt. In Teilabb. 43A ist deutlich zu erkennen, dass die polyklonal stimulierten  $CD4^+$  T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen eine signifikant höhere Proliferationsrate im Vergleich zu  $CD4^+$  T-Zellen aus WT Mäusen aufweisen. Dies konnte für unterschiedliche T-Zell Anzahlen ( $5 \times 10^4$ ,  $2,5 \times 10^4$ ,  $12,5 \times 10^4$ ) gezeigt werden.  $CD8^+$  T-Zellen zeigen dagegen keine eindeutigen Unterschiede in der T-Zell Proliferation (Teilabb. 43B). Die Proliferationsrate der am höchsten eingesetzten  $CD8^+$  T-Zellmenge für KSRP KO und WT Mäusen erreicht aufgrund des Standardfehlers einen ähnlichen Wert. Bei geringeren T-Zellzahlen fällt die Proliferationsrate der T-Zellen aus KSRP KO Mäusen unterhalb des Proliferationsniveaus von T-Zellen aus den Kontrollmäusen.

Die Ergebnisse der Proliferationsanalysen bestätigen den signifikant erhöhten Aktivierungszustand in  $CD4^+$  T-Zellen aus KO-Tieren. Die erhöhte Proliferationsrate der  $CD4^+$  T-Zellen könnte wahrscheinlich die tendenziell gesteigerte Proliferation der Gesamt-T-Zellen erklären. Dieser Unterschied (Abb. 39) lässt sich durch die signifikant hohe Proliferation von  $CD4^+$  T-Zellen begründen.

### 4.6.3 Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Da in Kapitel 4.5.3 bereits signifikante Unterschiede in der Zytokinproduktion der KSRP-defizienten T-Zellen beobachtet wurden, sollten nun die spezifischen Subpopulationen untersucht werden. Daher wurden über MACS isolierte CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Z-Subpopulationen für 90 Stunden polyklonal stimuliert und das Zytokinmuster aus dem T-Zell Überstand mit Hilfe von CBA analysiert.

In den Überständen aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte IFN- $\gamma$  und IL-10 nachgewiesen und quantifiziert werden. In Teilabb. 43A ist gezeigt, dass im T-Zell Überstand von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen eine signifikant geringere Menge an IFN- $\gamma$  (690 pg/ml) nachgewiesen wurde im Vergleich zu Kontrolle (1072 pg/ml). Teilabb. 44B zeigt eine sehr geringe Konzentration an IL-10, die sich nicht zwischen den beiden Genotypen unterscheidet.



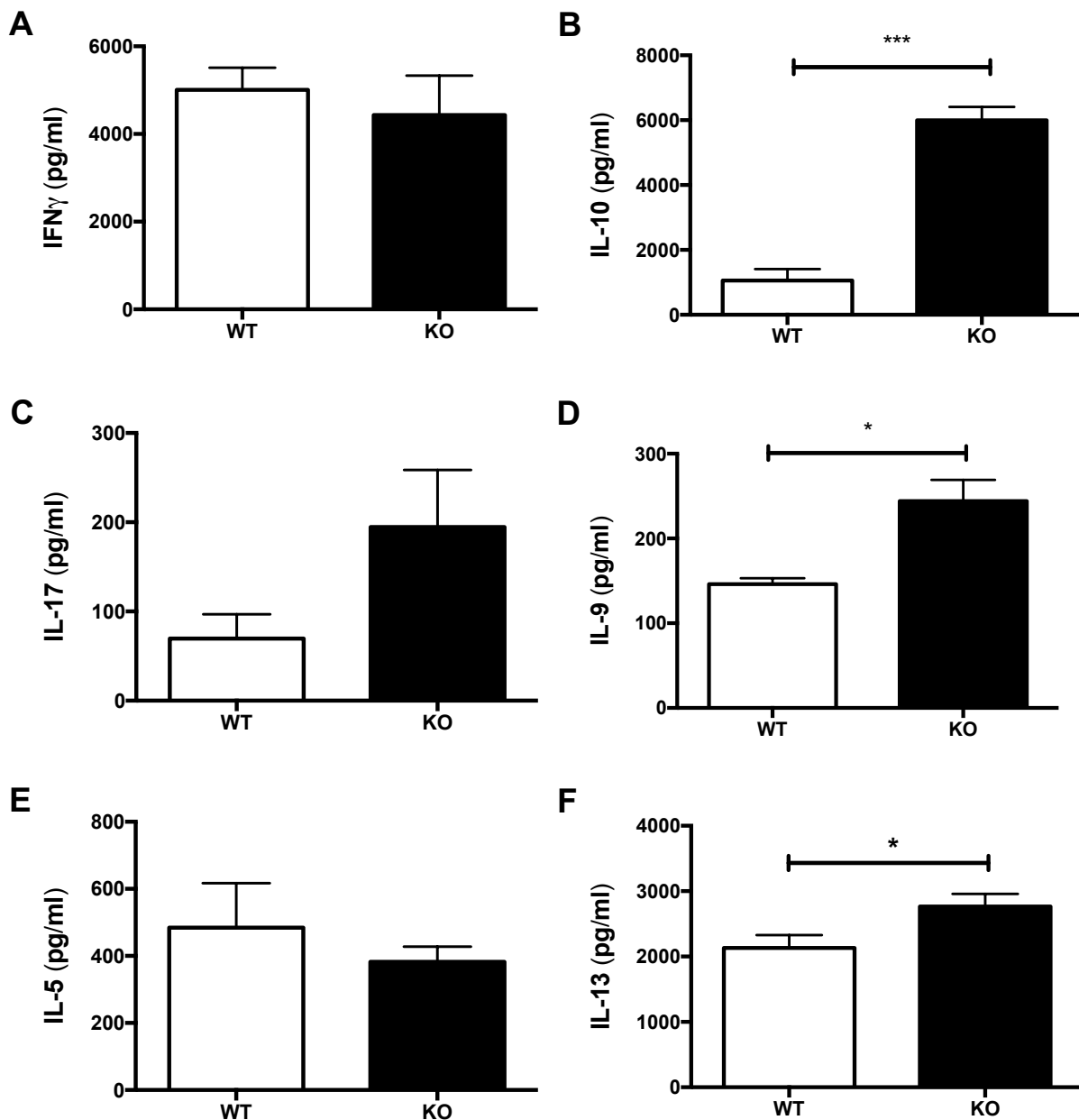
**Abb. 44: Zytokinmuster-Analysen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  (A) und IL-10 (B) in den Überständen von CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Diese über MACS aufgereinigten T-Zellen wurden für 90 Std. mit anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) und anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) polyklonal stimuliert und die Zytokin Konzentration im Zellüberstand mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 3 untersuchten Mäusen pro Genotyp. Statistik: \*\*p < 0,01; T-Test.

## Ergebnisse

---

Vergleichbar zu CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden im Überstand von KSRP-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen ebenfalls leicht geringere Konzentrationen an IFN- $\gamma$  nachgewiesen (Teilabb. 45A). Die Konzentration von IFN- $\gamma$  liegt im Überstand von KO Mäusen bei 4432,6 pg/ml und unterscheidet sich nicht signifikant im Vergleich zu Kontroll-Proben (ca. 5000 pg/ml). Sehr eindeutig wird der Unterschied in der IL-10 Produktion (Teilabb. 45B). Im Überstand von KSRP-defizienten Mäusen konnte eine 6-fach höhere Konzentration an IL-10 gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden. IL-17 scheint ebenfalls stärker durch T-Zellen in KO Tieren (194 pg/ml) produziert zu werden als durch CD4<sup>+</sup> T-Zellen (70 pg/ml) aus den WT Mäusen. Dieser Unterschied zeigt jedoch keine statistische Signifikanz (Teilabb. 45C). Eindeutiger wird es für die IL-9 Produktion: KSRP-defiziente CD4<sup>+</sup> T-Zellen produzieren fast die doppelte Menge an IL-9 gegenüber den Kontroll-Zellen (Teilabb. 45D). Während IL-5, aufgrund hoher Schwankungen, keinen Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen den Genotypen aufweist (Teilabb. 45E), konnten signifikant höhere IL-13 Konzentrationen im Überstand von KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu Kontrolle nachgewiesen werden (Teilabb. 45F).



**Abb. 45: Zytokinmuster-Analysen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), IL-17 (C), IL-9 (D), IL-5 (E) und IL-13 (F) in den Überständen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese über MACS aufgereinigten T-Zellen wurden für 90 Std. mit anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) und anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) polyklonal stimuliert und die Zytokin Konzentration im Zellüberstand mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience analysiert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 3 untersuchten Mäusen pro Genotyp. Statistik: \* $p < 0,05$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ; T-Test.

## Ergebnisse

---

Die Zytokinmessungen erfolgten 90 Stunden nach polyklonaler Stimulation aus Überständen von T-Zellen, welche auch für Proliferationassays verwendet wurden. Dadurch ist es möglich, den signifikant stärker proliferierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen das entsprechende Zytokinmilieu zuzuordnen. Dies liefert erste Hinweise auf eventuelle TZ Subpopulationen, die für diesen Effekt verantwortlich sein könnten.

In weiteren Experimenten wurde mit Hilfe einer Zeitkinetik die Zytokinexpression von polyklonal stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen genauer untersucht, mit dem Hintergrund Unterschiede in der Zytokinproduktion bereits zu früheren Zeitpunkten zu erfassen und Sättigungsbereiche ausschließen zu können. Untersucht wurde die Zytokinproduktion mittels CBA bereits nach 0, 1, 3, 6, 24, 48 und 72 Stunden aus über MACS aufgereinigte und polyklonal stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus KSRP KO und WT Tieren. Zu den Zeitpunkten unter 6 Stunden konnten keine von den untersuchten Zytokinen im T-Zell Überstand nachgewiesen werden, daher wurden die Zytokinmengen in der Zeitkinetik ab 6 Stunden dargestellt.

Die IFN- $\gamma$  Produktion in Teilabb. 46A zeigt eine Genotyp-unspezifische Zunahme beginnend nach 24-stündiger Stimulation. IL-10 konnte in vorherigen Untersuchungen nach 90 Stunden in signifikant höheren Konzentrationen im Zellüberstand von KSRP-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. In Teilabb. 46B scheint die Konzentration von IL-10 schon nach 72 Stunden deutlich im T-Zell Überstand von KSRP-defizienten Tieren gegenüber der Kontrolle erhöht zu sein. Nach 24 Stunden Stimulation konnten im Überstand von KSRP-KO Tieren bereits höhere Mengen (ca. 30 pg/ml) an IL-17 gemessen werden, im Vergleich zur Kontrolle (Teilabb. 46C). Nach 48-stündiger Stimulation wird dieser Unterschied zwar etwas deutlicher, bewegt sich aber auch nach 72-stündiger Stimulation mit ca. 100 pg/ml mehr IL-17 im Überstand von KSRP-KO T-Zellen im Vergleich zu Kontroll- T-Zellen. Der IL-17 Konzentrationsunterschied ist zwischen KSRP-KO und WT T-Zellen nicht signifikant. Dieser Unterschied wird nach 48-stündiger Stimulation deutlicher, liegt aber aufgrund von heterogenen Werten auch nach 72 Stunden bei ca. 130 pg/ml. KO T-Zellen scheinen IL-9 erst nach 48-stündiger Stimulation in höheren Mengen im Vergleich zur Kontroll-Zellen zu sezernieren, dieser Unterschied wird nach 72-stündiger Stimulation deutlicher (Teilabb 46D) und aus vorherigen Untersuchungen konnten wir nach 90 Stunden einen signifikanten

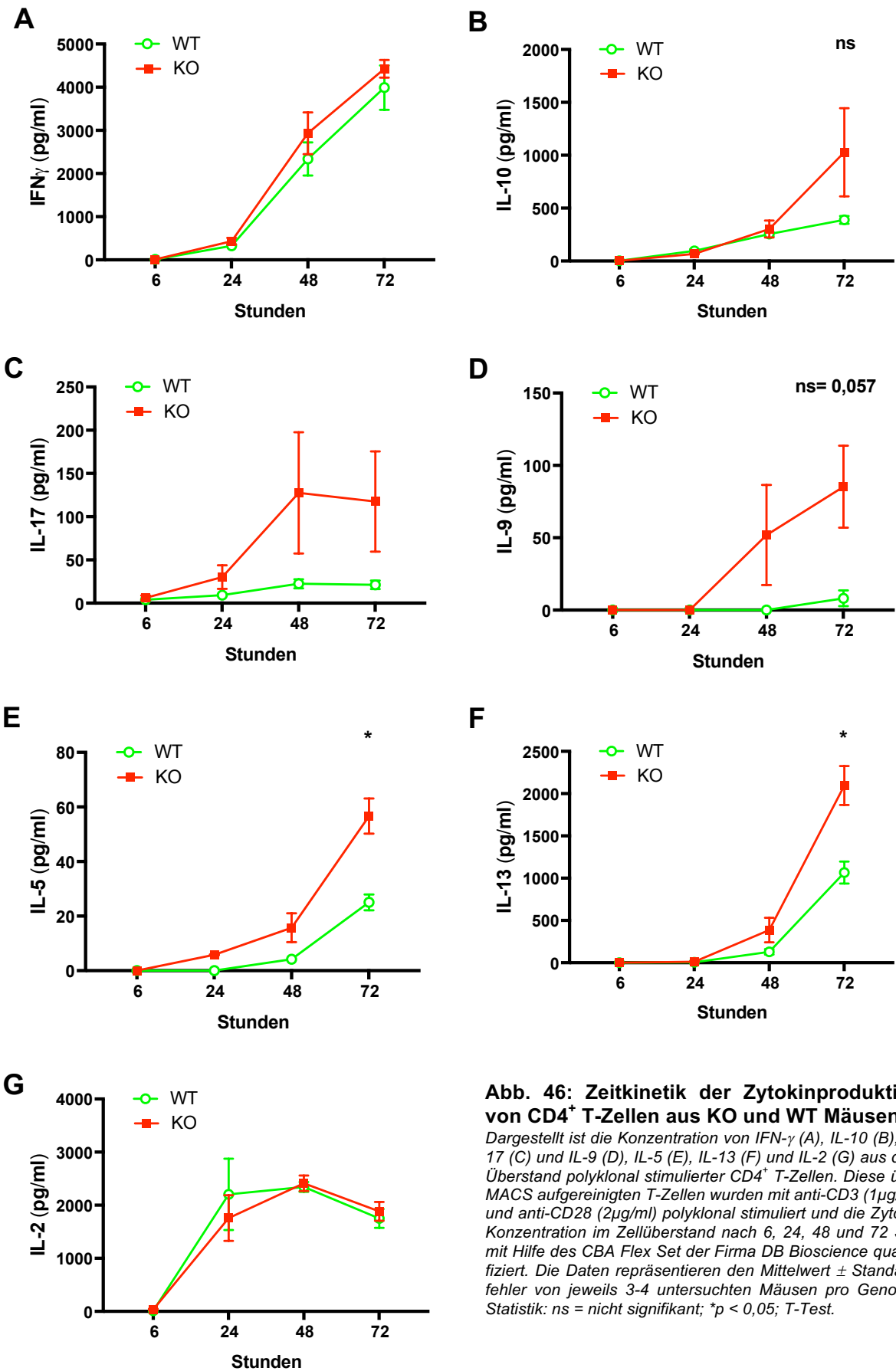


Unterschied für die IL-9 Produktion nachweisen (Teilabb. 45D). Die IL-5 Konzentrationen wiesen nach 90-stündiger Stimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen auf (Teilabb. 45E). In Teilabb. 46E ist die Zeitkinetik für IL-5 dargestellt, hierbei wurden bereits nach 24 Stunden Stimulation höhere IL-5 Mengen im T-Zell Überstand von KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zum Kontroll-Überstand gemessen. Dieser Unterschied wird nach 48-stündiger Stimulation deutlicher und signifikant nach 72 Stunden. IL-13 scheint erst nach 48 Stunden in deutlich messbaren Mengen im Überstand nachweisbar zu sein (Teilabb. 46F). Ähnlich wie IL-5 zeigte auch IL-13 einen erst tendenziellen Unterschied, der erst nach 72-stündiger Stimulation mit höheren IL-13 Mengen im Überstand von KSRP-defizienten Mäusen (2095 pg/ml) gegenüber dem Kontroll-Überstand (1066 pg/ml) signifikant wurde.

IL-2 wird primär von T-Zellen autokrin zur Proliferation genutzt, aus diesem Grund ist es besonders wichtig dieses Zytokin zu früheren Zeitpunkten nachzuweisen [246, 247]. Bereits nach 6 Stunden Stimulation konnte IL-2 in sehr geringen Konzentrationen Genotyp-unspezifisch nachgewiesen werden (Teilabb 46G). Die IL-2 Konzentration steigt nach 24 Stunden Genotyp-unspezifisch auf ca. 2000 pg/ml an und erreicht nach 48 Stunden den Sättigungsbereich, sodass es nach 72 Stunden zu einer Abnahme der Konzentration von IL-2 (auf ca. 1800 pg/ml) kommt.

Die isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen bestätigen die bereits beobachteten Unterschiede der Milz T-Zellpopulation zwischen den Genotypen sowohl in der T-Zellproliferation als auch in der Zytokinproduktion. Auch die Ergebnisse der Zeitkinetik bestätigen die vorherigen Daten.

# Ergebnisse



**Abb. 46: Zeitkinetik der Zytokinproduktion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), IL-17 (C) und IL-9 (D), IL-5 (E), IL-13 (F) und IL-2 (G) aus dem Überstand polyklonal stimulierter CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Diese über MACS aufgereinigten T-Zellen wurden mit anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) und anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) polyklonal stimuliert und die Zytokin Konzentration im Zellüberstand nach 6, 24, 48 und 72 Std. mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience quantifiziert. Die Daten repräsentieren den Mittelwert  $\pm$  Standardfehler von jeweils 3-4 untersuchten Mäusen pro Genotyp. Statistik: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; T-Test.

IL-5 weist aufgrund hoher Schwankungen keinen Unterschied in der Zytokinproduktion zwischen den Genotypen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf. Mit der höheren Versuchsanzahl in der Zeitkinetik konnte daraufhin der tendenzielle Unterschied statistisch belegt werden.

Zusammenfassend kann gezeigt werden, dass KSRP-defiziente Mäuse unter basalen Bedingungen keine Unterschiede in der Frequenz der T-Zellen (CD3<sup>+</sup>) aufweisen. Sowohl die TZ-Subpopulationen (CD4<sup>+</sup> u. CD8<sup>+</sup>) aus der Milz als auch aus dem peripheren Blut zeigen keine Unterschiede in der Verteilung und der Viabilität zwischen den Genotypen. Die Proliferation scheint in gesamten T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen erhöht zu sein. Das Zytokinmuster deutet mit geringerer IFN- $\gamma$  und höheren IL-17, IL-9, IL-4, IL-5 und IL-13 Konzentrationen auf einen TH<sub>2</sub>-Shift hin. Isolierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen aus KSRP KO Mäusen zeigen eine statistisch signifikant höhere Proliferation. Dies konnte für CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus KO Tieren nicht nachgewiesen werden. FACS-Analysen bestätigen mit einer Signifikanz den erhöhten Aktivierungszustand von CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Zusätzliche CBA-Analysen von CD4<sup>+</sup> T-Zellen verdeutlichen neben der bereits dokumentierten verstärkten Produktion von IL-9, IL-13 usw. auch eine signifikant höhere Produktion von IL-10. Diese genotypisch spezifischen Unterschiede konnten mit Hilfe der Zytokin Zeitkinetik untermauert werden.

Im folgenden Kapitel soll der Einfluss von KSRP in pro-inflammatorischen und immunologischen Prozessen im Gesamtorganismus untersucht werden, um im Modell der chronischen Entzündung weitere Informationen über die Aktivität des RNA-bindenden Proteins in immunologischen Prozessen zu erfahren.

### **4.7 Analysen im experimentellen Tiermodell der Kollagen Antikörper induzierten Arthritis**

Anhand vorheriger Experimente konnten wir in KSRP-defizienten Mäusen zeigen, dass deutliche Effekte in Bezug auf die Immunzell-Frequenz bei myeloiden Zellen (Abb. 16) zu beobachten waren. Die Kapazität dieser Zellen scheint aufgrund erhöhter Sterberate (Abb. 26) eingeschränkt zu sein.

## Ergebnisse

---

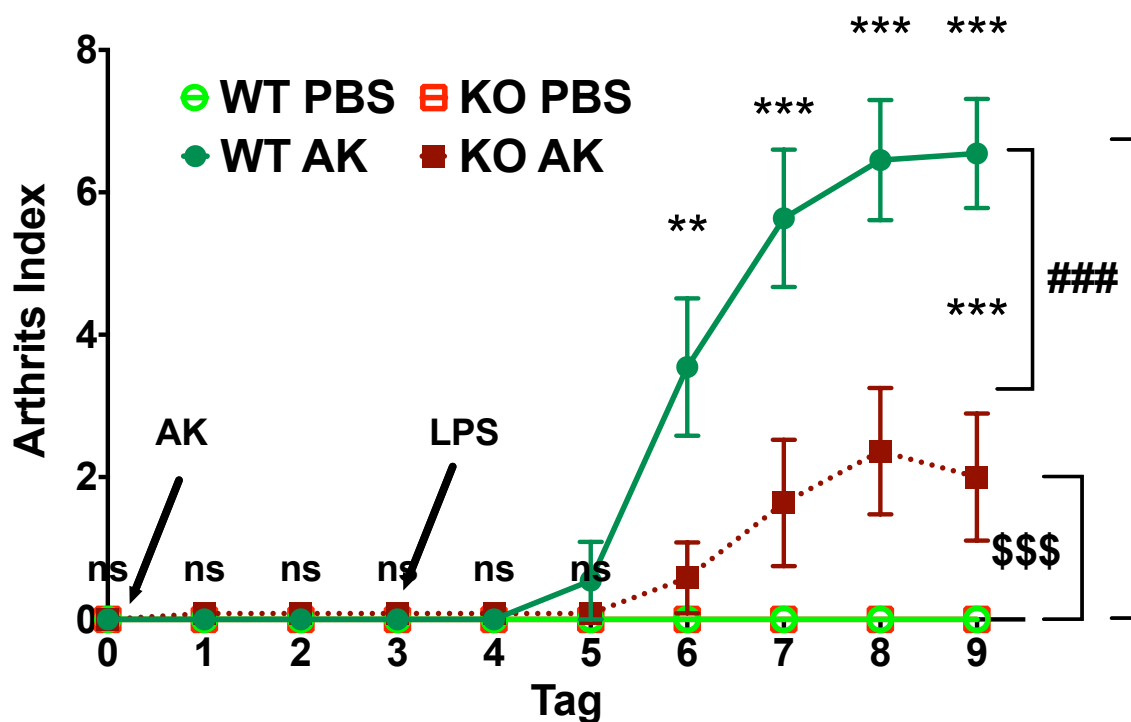
Auf T-Zell-Ebene konnten ebenfalls signifikante Unterschiede in der Immunzell-Frequenz beobachtet werden, wenn diese aktiviert vorliegen (Abb. 41). Am interessantesten ist bei  $CD4^+$  T-Zellen der  $TH_2$ -Shift mit dem deutlich höheren Anteil des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Abb. 45).

Diese vor allem *ex vivo* Ergebnisse sollen mit einem entsprechenden Krankheitsmodell überprüft werden. Dabei soll geklärt werden ob die bisher erhobenen Ergebnisse zu einem anderen "outcome" einer chronisch entzündlichen Erkrankung in KSRP-defizienten Mäuse führen. Daher wurde ein murines Krankheitsmodell gewählt, in dem aktivierte myeloide Zellen und eine verstärkte Beteiligung an aktivierten  $TH_1$ -Zellen eine wichtige Rolle spielen [175, 200]. Ein klassisches tierexperimentelles Modell der rheumatoiden Arthritis (RA) ist die Kollagen-(CII)-induzierte Arthritis (CIA) [160, 248]. Es ist jedoch bekannt, dass nicht alle Mäusestämme für die CIA empfindlich sind. Dabei können die besten Ergebnisse in dem DBA/1-Stamm erzielt werden (Kapitel 3.4.5). Die Mäuse mit dem inaktivierten KSRP-Gen wurden allerdings auf Hintergrund des C57BL/6-Stammes generiert [171]. Aus diesem Grund wird die Kollagen-Antikörper-induzierten Arthritis (CAIA) verwendet, die in C57BL/6-Mäusen erfolgreich als Autoimmunitätsmodell etabliert ist. Bei dieser Methode wird die CAIA in den Mäusen durch die Applikation von 5 monoklonalen Kollagen-Antikörpern und einer zusätzlichen Behandlung mit LPS ausgelöst. Im Unterschied zum klassischen CIA-Modell beginnt die Schwellung der Pfoten in der CAIA bereits ca. drei Tagen nach der Antikörper-/LPS-Applikation und erreicht laut Literatur bis zum neunten Tag die maximale Ausprägung des Arthritis-Phänotyps (Kapitel 3.4.4) [200]. Um die Rolle von KSRP für die Pathogenese der CAIA zu charakterisieren, wurden phänotypische und weitere Analysen auf Zellebene durchgeführt. Daher wurde bei den behandelten Mäusen die schwere des Krankheitsverlaufs mit der täglichen Bestimmung des Arthritis-Index dokumentiert und an Tag 9 die Mäuse getötet um histologische und immunologische Analysen durchzuführen (s. Versuchsaufbau Abb. 2).

#### 4.7.1 Krankheitsverlauf von KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA

Teilabb. 47 zeigt den phänotypische Krankheitsverlauf von allen behandelten Mäusen, der als Arthritis-Index (s. Tabelle 14) dokumentiert wurde.

WT Mäuse, welche mit AK behandelt wurden, zeigen bereits nach dem 5. Tag geschwollene Pfoten. Es wurden stärkere Schwellung der Pfoten ab Tag 6 nach CAIA-Induktion bei WT-Tieren gegenüber KSRP-defizienten Mäusen beobachtet. Während sich der AI in KSRP KO Mäusen nach Tag 8 zu verringern scheint, verschlimmert sich der Krankheitsverlauf in WT Mäusen bis Tag 9 weiter. Die KSRP-defizienten Mäuse entwickeln eine signifikant geringere Arthritis-Symptomatik im Vergleich zu WT Mäusen.



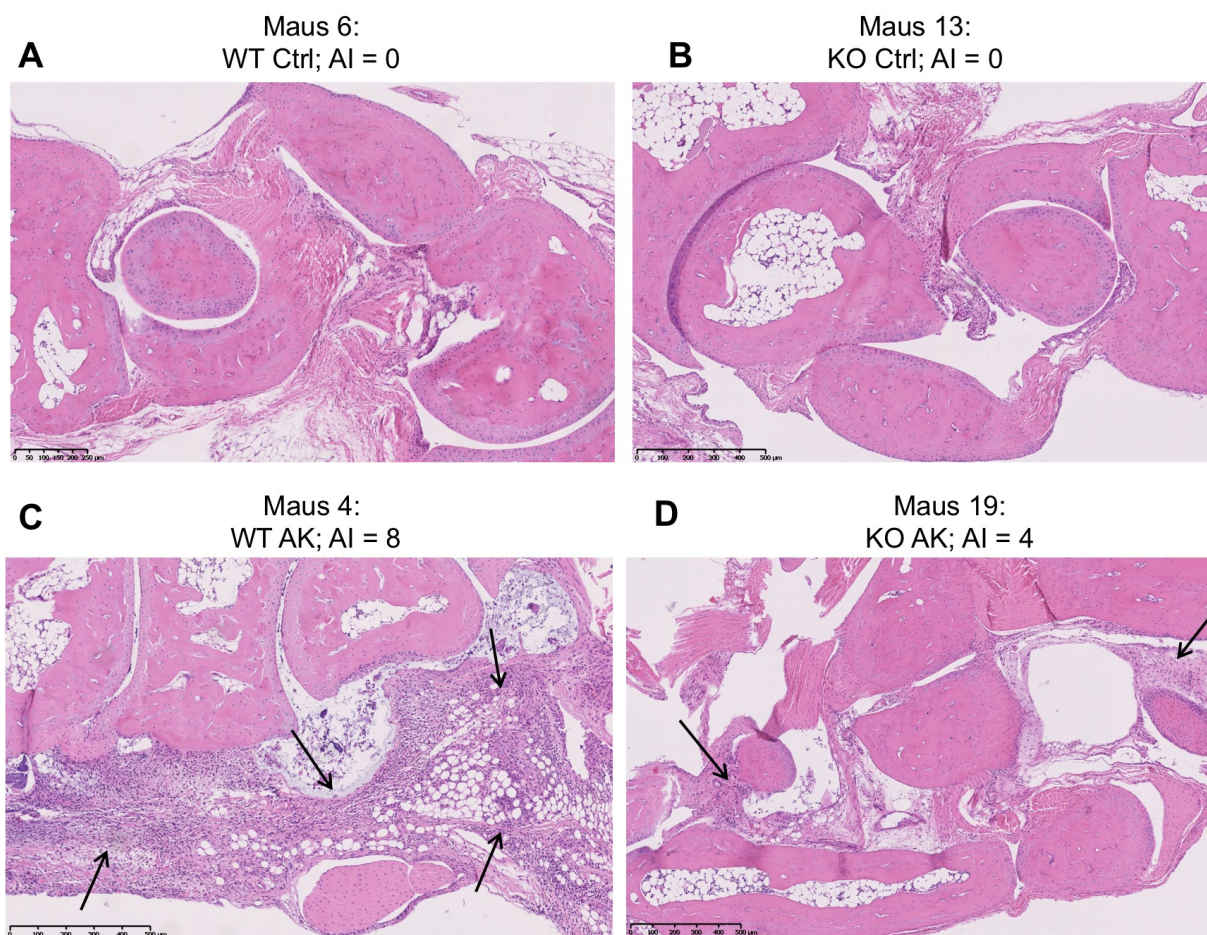
**Abb. 47: Darstellung des Arthritis-Index für KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Entwicklung des Arthritis-Index von CAIA in WT und KO Mäusen. WT (AK) und KO (AK) Mäuse wurden an Tag 0 mit einem Gemisch aus 5 spezifischen Kollagen-II-Antikörpern (2,54 mg/Maus) behandelt, während den Kontroll-Gruppen WT (Ctrl) und KO (Ctrl) PBS gespritzt wurde. An Tag 3 erhielten die Mäuse in der behandelten Gruppe 50 µg/Maus LPS und die Kontroll-Gruppen 0,9% NaCl. Die Entwicklung des klinischen Arthritis-Phänotyps wurde ab Tag 3 bis Tag 9 dokumentiert und als Mittelwert des Arthritis-Index dargestellt (AI, ± Standardfehler). Am Versuchsende (Tag 9) wurden die Mäuse (n=10-15) durch zervikale Dislokation getötet und die Organe für weitere Analysen entnommen. (Statistik: \*\*\*:  $p < 0.001$ ; ns: nicht signifikant gegen AK-behandelte KSRP<sup>-/-</sup> Mäuse; ###:  $p < 0.001$ ; gegen PBS-behandelte KSRP WT Mäuse; \$\$\$:  $p < 0.001$  gegen PBS-behandelte KSRP<sup>-/-</sup> Mäuse [241])

## Ergebnisse

### 4.7.2 Histopathologische Analysen von KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA

Pathophysiologische Veränderungen in den Gelenken von AK-behandelten Mäusen sollen mittels der Übersichtsfärbung (Kapitel 3.4.4.2) dargestellt werden. Dadurch soll vor allem die Infiltration der Immunzellen und die Schwere der Entzündung beurteilt werden. Die histologischen Paraffinschnitte der Pfoten wurden in Kooperation mit dem Institut für Allgemeine Pathologie in der Universitätsmedizin Mainz unter Leitung der MTA Silke Mitschke angefertigt.



#### Abb. 48: Histopathologische Darstellung von H&E gefärbten Mauspfoten

Dargestellt sind repräsentative 5  $\mu\text{m}$  dicke Schnitte von KO und WT Mauspfoten, die mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt wurden. Die Pfoten stammen von KSRP WT und KO Mäusen und wurden an Tag 9 nach CAIA-Induktion aus Kontroll- (A+B) (Ctrl) und mit Antikörper gegen Kollagen behandelten Tieren (C+D) (AK) entnommen. Diese wurden zunächst 24 Stunden in 4% Formaldehyd fixiert, sowie für 3-4 Wochen in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Lösung decalcifiziert und dehydriert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen, wurden mit dem Nano Zoomer Scanner erstellt und die Auswertung erfolgte mit der NDP.view2 Software. Die schwarzen Pfeile deuten Stellen in den Gelenken an, in welche Immunzellen infiltriert sind [241].

Abb. 48 zeigt repräsentative H&E gefärbte Paraffinschnitte der Pfoten von WT und KSRP-defizienten Mäusen, in denen durch die Einfärbung die Unterscheidung zwischen Zellkernen und interzellulärer Substanz ermöglicht wird. Teilabb. 48A+B zeigen die Verteilung der Immunzellen unter basalen Bedingungen im Synovia des Gelenkes. Die Gelenke von CAIA-behandelten WT Mäusen (Teilabb. 48C) zeigen eine höhere Infiltration der Immunzellen im Vergleich zu Gelenken von KSRP-defizienten Mäusen (Teilabb. 48D). Die Pfeile deuten auf die stark von Immunzellen infiltrierten (dunkleren) Bereiche im Gelenk hin.

Die mit Antikörpern gegen Kollagen behandelten KSRP-defizienten Mäuse zeigen eine signifikant geringere Krankheitssymptomatik im Vergleich zu WT Mäusen. Übereinstimmend mit dem AI konnte in den histologischen Übersichtsfärbungen auch eine geringe Immunzell-Infiltration in den Pfoten von KSRP-KO Tieren nachgewiesen werden.

### **4.7.3 Immunphänotypisierung von Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen an Tag 9 nach CAIA Induktion**

Weitere Untersuchungen auf Immunzellebene wurden mit Milzzellen durchgeführt. Dazu wurden die Milzzellen wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben von allen behandelten Maus-Gruppen im CAIA-Versuch präpariert und untersucht. Ein Teil der isolierten Milzzellen wurden direkt nach dem Präparieren mit Hilfe der Durchflusszytometrie (3.3.2) analysiert. Die verbleibenden Zellen wurden aufgeteilt und die eine Hälfte mit LPS (100 ng/ml) für 24 Stunden stimuliert während die andere Hälfte der Zellen unstimuliert bei gleichen Bedingungen inkubiert wurde (3.2.6). Nach 24 Stunden wurden Zytokine in dem Zellüberstand mittels CBA-Analysen (3.3.4) bestimmt und die Zellen ebenfalls mit Hilfe der Durchflusszytometrie analysiert.

Die Immunzell-Frequenz von direkt *ex vivo* untersuchten Milzzellen zeigten keine Unterschiede zu den ausgesäten und unbehandelten Milzzellen, daher wurden im Folgenden nur die Ergebnisse von den unstimulierten und stimulierten Milzzellen gezeigt.

## Ergebnisse

---

In Abb. 49 ist der prozentuale Anteil von den unterschiedlich behandelten Immunzellen in Relation zu unbehandelten und unstimulierten Milzzellen aus WT Tieren dargestellt. Teilabb. 49A zeigt eine signifikant reduzierte CD11b Expression (myeloide Zellen) in LPS-stimulierten Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen, im Vergleich zur LPS-behandelten Wildtyp-Kontrolle. Milzzellen aus AK-behandelten Mäusen zeigen eine Zunahme der Gesamtfrequenz an CD11b<sup>+</sup> in WT und KO Milzzellen gegenüber den Kontroll-Tieren. Vergleicht man die relative CD11b-Expression innerhalb der Gruppen, erkennt man in unstimulierten Milzzellen von AK-behandelten Mäusen ebenfalls eine Abnahme der CD11b<sup>+</sup> Zellen in KO Tieren, gegenüber den WT Tieren. Restimuliert man diese Milzzellen mit LPS, erhält man eine statistisch signifikante Reduktion von CD11b<sup>+</sup> Zellen in KSRP-defizienten Milzzellen im Vergleich zu WT Milzzellen. Die Expression von CD11c (DCs) scheint in Milzzellen von KSRP-defizienten Mäusen, unter basalen Bedingungen aber auch nach LPS-Behandlung, leicht erhöht zu sein, ist jedoch nicht statistisch signifikant (Teilabb. 49B). Milzzellen aus AK-behandelten Mäusen zeigen Genotyp-unspezifisch eine etwas verringerte CD11c Expression. Für CD19<sup>+</sup> Milzzellen (B-Zellen) konnte in diesem Versuch kein Genotyp-spezifischer Unterschied in der CD19-Expression sowohl bei Kontroll-Tieren als auch in Tieren, die mit AK behandelt wurden, erfasst werden (Teilabb. 49C). In Teilabb. 49D erkennt man eine geringe Zunahme der CD68-Expression (Makrophagen) in KO Milzzellen aus AK-unbehandelten Mäusen. Milzzellen aus AK-behandelten Mäusen zeigen unabhängig von der Stimulation, einen umgekehrten Effekt. Sowohl die tendenzielle Zunahme in KO Kontroll-Mäusen, als auch die geringe Abnahme der CD68-Expression in AK-behandelten KO Mäusen, sind statistisch nicht signifikant. Der Aktivierungsmarker CD86 zeigt nach LPS-Behandlung erwartungsgemäß Genotyp-unspezifisch in Kontroll-Mäusen ein höheres Expressionsniveau, (Teilabb. 49E). LPS-stimulierte Milzzellen aus AK-behandelten Mäusen weisen im Vergleich zu stimulierten Kontroll-Zellen deutlich geringere CD86-Expressionslevels auf, die jedoch im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-Milzzellen dennoch erhöht sind.



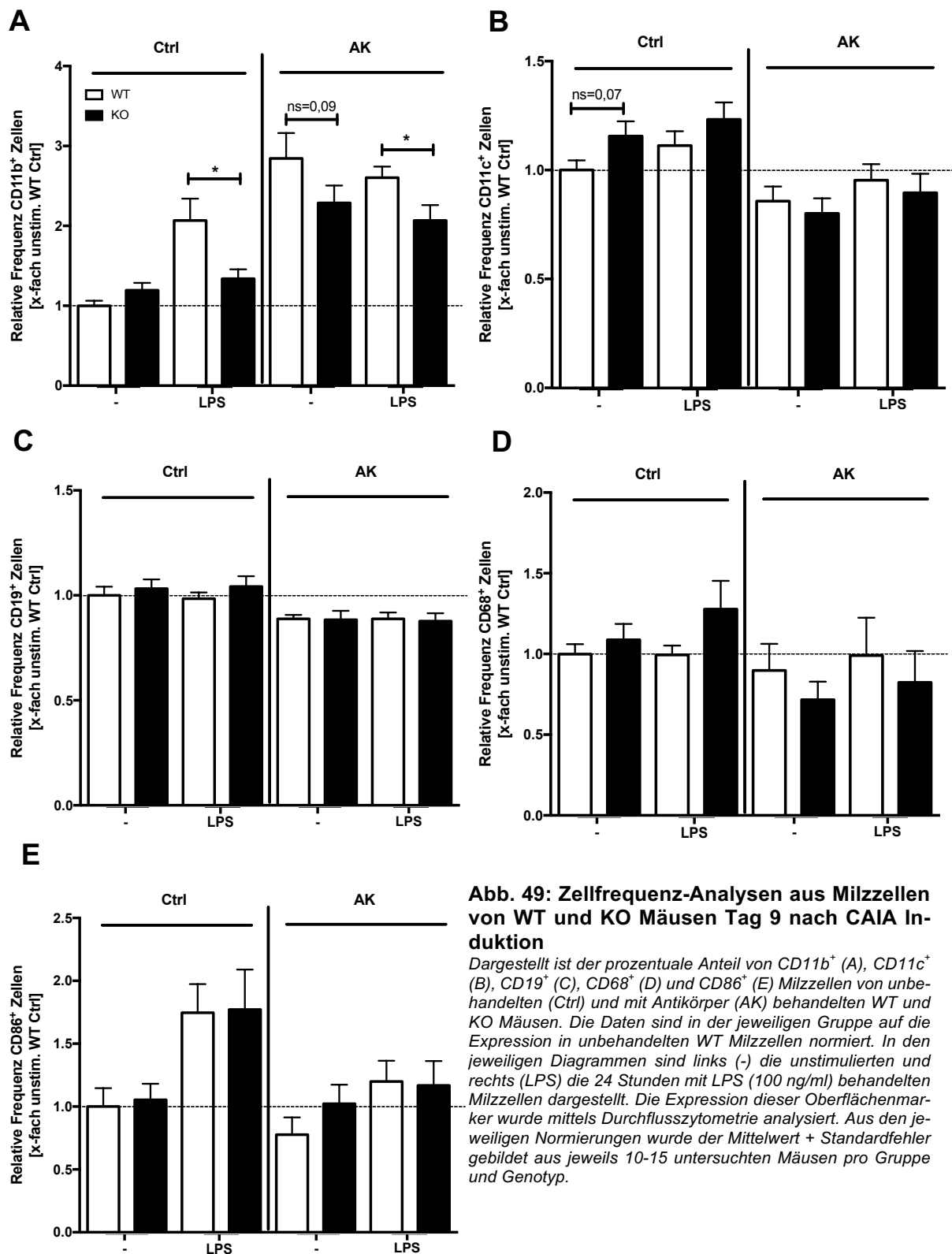
In Abb. 50 wurde der prozentuale Anteil von spezifischen Immunzelltypen zwischen den Genotypen verglichen.

Teilabb. 50A zeigt keine Unterschiede zwischen der Frequenz an  $CD11b^+CD68^-$  Zellen von unstimulierten und mit LPS stimulierten Milzzellen aus Kontroll-Tieren. Nach der Behandlung mit Antikörpern gegen das Kollagen weisen KSRP-defiziente Mäuse vergleichbar mit den reinen  $CD11b^+$  Milzzellen (Teilabb. 49A) verringerte Frequenzen auf.

Auch die Frequenz-Analysen von Makrophagen (Teilabb. 50B) zeigen keinen signifikanten Unterschied zwischen den Genotypen und somit ein identisches Bild, wie es in Teilabb. 49D beschrieben wurde.

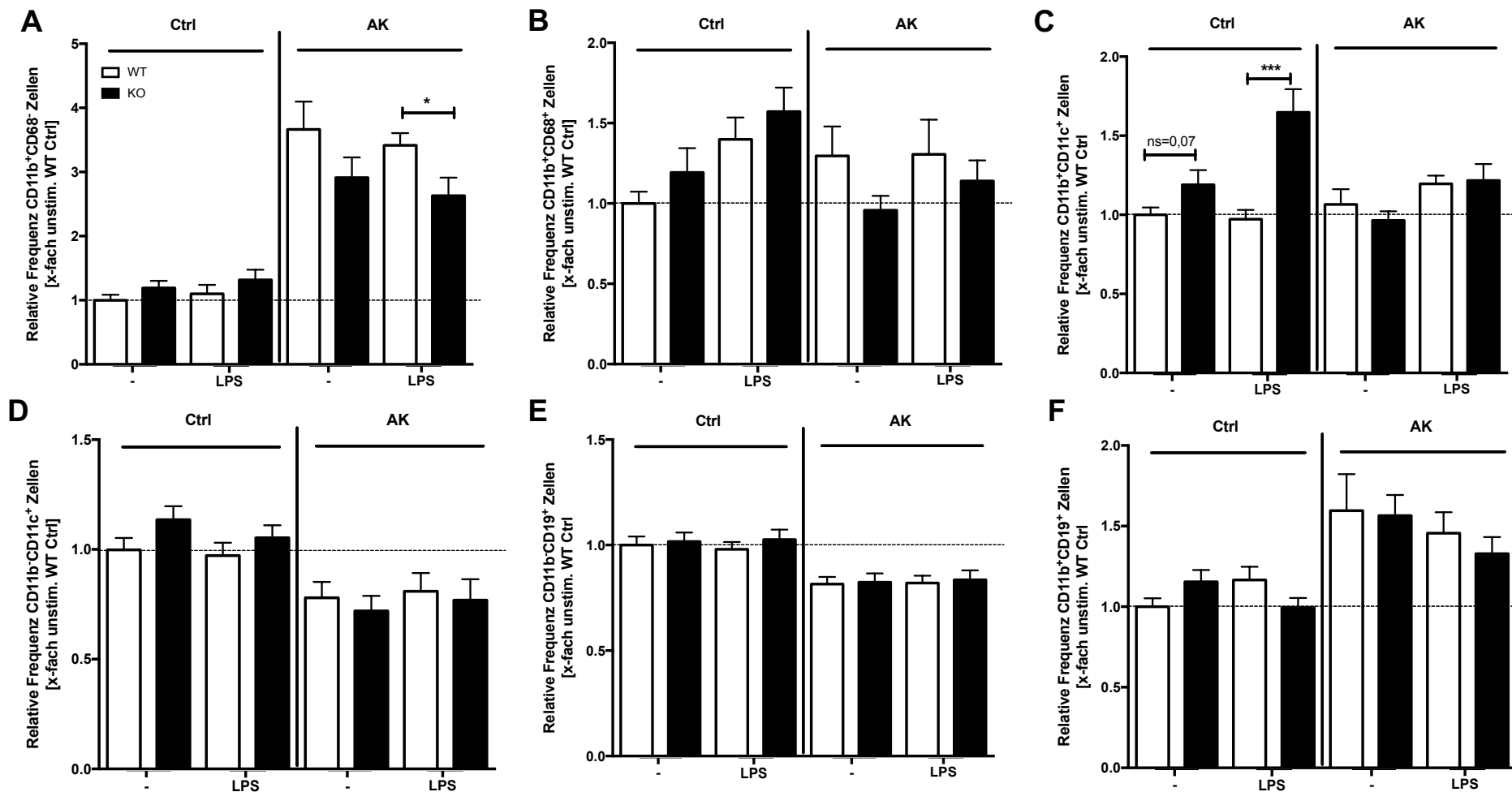
Myeloide DC (Teilabb. 50C) aus KSRP-defizienten Mäusen zeigen unter Kontroll-Bedingungen eine erhöhte Anzahl von  $CD11b^+CD11c^+$  Zellen und nach LPS Stimulation sogar mit einem statistisch signifikanten Unterschied im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Dieser Unterschied konnte in Milzzellen aus Mäusen, die mit Antikörpern gegen Kollagen behandelt wurden, nicht mehr nachgewiesen werden. Plasmacytoide DC scheinen in KO Kontroll-Mäusen ebenfalls in einer etwas höheren Frequenz im Vergleich zu WT pDC vorhanden zu sein, dieser Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant (Teilabb. 50 D). Mäuse die mit AK-behandelt wurden, weisen in der Milz Genotyp-unspezifisch geringere Frequenzen an pDC auf. Die  $CD11b^-CD19^+$  BZ-Subpopulation zeigt sowohl in Milzzellen aus Kontroll-Mäusen, als auch in Milzzellen aus CAIA-behandelten Mäusen keine Unterschiede in der Frequenz zwischen den Genotypen auf (Teilabb. 50E). Die  $CD11b^+$  B-Zell-Subpopulation zeigt ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Frequenz der Expression zwischen den Genotypen in Kontroll-Mäusen (Teilabb. 50F). CAIA-behandelte Mäuse scheinen in den Milzzellen diese Immunzellpopulation Genotyp-unspezifisch, in höheren Leveln zu exprimieren.

# Ergebnisse



**Abb. 49: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen Tag 9 nach CAIA Induktion**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD11b<sup>+</sup> (A), CD11c<sup>+</sup> (B), CD19<sup>+</sup> (C), CD68<sup>+</sup> (D) und CD86<sup>+</sup> (E) Milzzellen von unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in unbehandelten WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS (100 ng/ml) behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert + Standardfehler gebildet aus jeweils 10-15 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp.



**Abb. 50: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen an Tag 9 nach CAIA Induktion**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (myeloide Zellen) (A), CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (Makrophagen) (B), CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (mDC) (C), CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (pDC) (D), CD11b<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (BC) (E) und CD11b<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (F) Zellen aus der Milz von unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in unbehandelten WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS (100 ng/ml) behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert + Standardfehler gebildet für jeweils 10-15 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; \*\*\*p < 0,001. T-Test.

## Ergebnisse

---

Der prozentuale Anteil der Immunzellen aus den Milzen von Mäusen an Tag 9 nach CAIA Induktion, zeigen vor allem übereinstimmend mit den myeloiden Zellpopulationen aus dem Blut (4.1.2), signifikant geringere Frequenzen (Abb. 49A) in den KSRP-defizienten Mäusen.

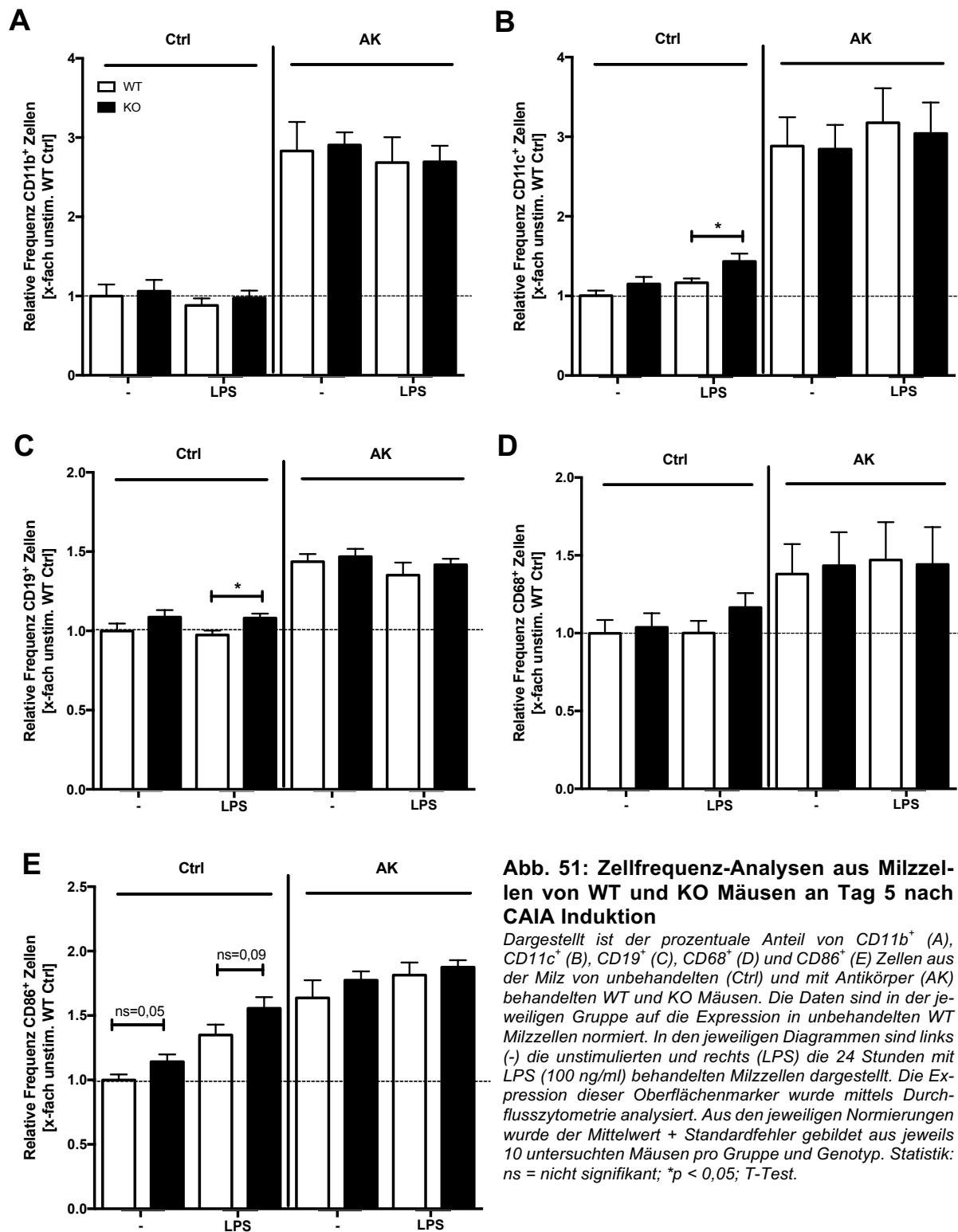
Durch Messung der mittleren Fluoreszenzintensität von CD11b<sup>+</sup> Zellen in CAIA-behandelten Mäusen, konnte ebenfalls eine signifikante Abnahme der CD11b-Expression in Milzzellen von KO Mäusen nachweisen werden (s. Anhang: Abb. 71). Untersuchungen zum Reifungszustand dieser unterschiedlichen Immunzellpopulationen wurden ebenfalls in der Milz von CAIA-behandelten Mäusen durchgeführt (s. Anhang: Abb. 72). Die Effekte sind vergleichbar mit den Ergebnissen aus Kapitel 4.1.3. und zeigen einen erhöhten Aktivierungszustand von myeloiden Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu unstimulierten Kontroll-Tieren.

Es wurden keine starken Veränderungen in Bezug auf die Frequenz der unstimulierten und mit LPS-stimulierten Immunzellen in der Milz aus AK-behandelten Mäusen im Vergleich zu den Kontrollgruppen beobachtet. Um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen durch die Wahl der Versuchslänge nicht zu erkennen waren, wurden die Versuche zu einem früheren Zeitpunkt wiederholt.

#### 4.7.4 Immunphänotypisierung von Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen an Tag 5 nach CAIA Induktion

Im Folgenden sollen die gleichen Analysen wie in Kapitel 4.7.3 zu einem früheren Zeitpunkt durchgeführt werden. Nach Induktion von CAIA konnten in den behandelten Mäusen bereits ab dem fünften Tag phänotypische Veränderungen beobachtet werden. Daher wird ebenfalls an dem fünften Tag nach der CAIA-Induktion der Immunphänotyp in der Milz von den behandelten Mäusen untersucht, um bereits in dieser Effektorphase weitere Unterschiede auf Immunzell-Ebene erfassen zu können (siehe Versuchsaufbau Abb. 3).

In Abb. 51 ist die Frequenz spezifischer Oberflächenrezeptoren in der Milz von „Kurzzeit-CAIA“-behandelten Mäusen (Tag 5) dargestellt. Signifikante Unterschiede in der Frequenz von CD11b exprimierender Zellen konnten in diesem Versuch in den Kontroll-Tieren nicht nachgewiesen werden (Teilabb. 51A). Am fünften Tag nach CAIA-Behandlung ist das Expressionsniveau von CD11b<sup>+</sup> Zellen im Gesamten höher als an Tag 9, unabhängig vom Genotyp und Stimulation. Die Expression von CD11c<sup>+</sup> auf Zellen steigt nach LPS Stimulation in KSRP-defizienten Kontroll-Mäusen signifikant an, dieser Unterschied konnte auch in vorherigen Untersuchung beobachtet werden (Teilabb. 51B). An Tag 5 nach CAIA-Induktion ist das Expressionsniveau von CD11c<sup>+</sup> Zellen zwar deutlich höher als in den unbehandelten Kontroll-Tieren, unterscheidet sich aber nicht zwischen den Genotypen. Die Expression von CD19<sup>+</sup> (Teilabb. 51C) und CD68<sup>+</sup> (Teilabb. 51D) Zellen in LPS-Stimulierten Milzzellen von Kontroll-Tieren bestätigten die vorherigen Ergebnisse. Die Expression beider Oberflächenmarker nimmt in Tieren am fünften Tag nach AK-Behandlung Genotyp-unspezifisch zu. Das etwas höhere Expressionslevel des Aktivierungsmarkers CD86 in Milzzellen von KSRP-defizienten Mäusen bestätigt ebenfalls die Ergebnisse aus vorherigen Untersuchungen (Teilabb. 51E). Milzzellen aus CAIA-behandelten Mäusen zeigen Stimulations-unabhängig einen höheren Aktivierungszustand.



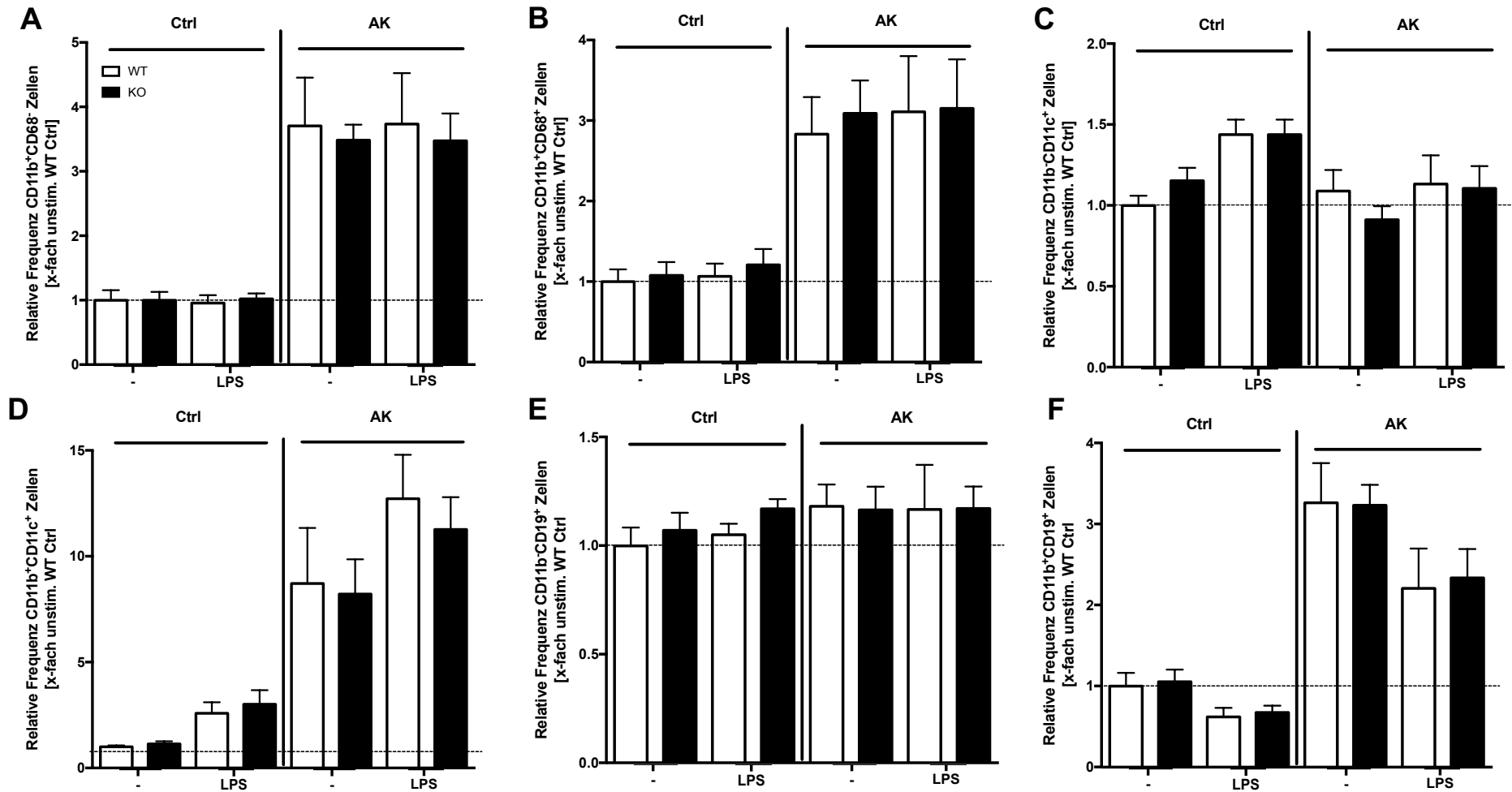
**Abb. 51: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen an Tag 5 nach CAIA Induktion**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD11b<sup>+</sup> (A), CD11c<sup>+</sup> (B), CD19<sup>+</sup> (C), CD68<sup>+</sup> (D) und CD86<sup>+</sup> (E) Zellen aus der Milz von unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in unbehandelten WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS (100 ng/ml) behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert + Standardfehler gebildet aus jeweils 10 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: ns = nicht signifikant; \*p < 0,05; T-Test.

Die Frequenz der CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>-</sup> myeloiden Zellpopulation ist am fünften Tag nach CAIA-Induktion in den Milzen um das ca. 3-fache höher als in den Milzen von Kontroll-Mäusen (Teilabb. 52A). Auch die CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> Makrophagen zeigen einen Genotyp-unspezifischen 3-fachen Anstieg der Frequenz in der Milz an Tag 5 (Teilabb. 52B).

Unbehandelte Milzzellen zeigen vergleichbar mit vorherigen Ergebnissen eine erhöhte Frequenz von mDC in KSRP KO Mäusen (Teilabb. 52C). Die Frequenz von AK-unbehandelten mDC sowie von pDC ist in den Kontroll-Mäusen nach LPS-Behandlung höher als in den unstimulierten Kontroll-Zellen (Teilabb. 53 B+C). Jedoch ist ein deutlicher Unterschied in der Frequenz von mDC und pDC nach AK-Behandlung zu beobachten. Am 5. Tag nach CAIA-Induktion nimmt die Frequenz von mDC gegenüber den Kontroll-Tieren ab, während die Frequenz der pDC fast um das zehnfache erhöht vorliegt. Für die CD11b<sup>-</sup> B-Zell Subpopulation erhalten wir in LPS-stimulierten Milzzellen aus KO Kontroll-Mäusen eine im Vergleich zu den Kontroll-Zellen höhere Frequenz (Teilabb. 52E). In AK-behandelten Mäusen können dagegen keine Unterschiede in der Frequenz nachgewiesen werden. In Teilabb. 52F ist gezeigt, dass die CD11b<sup>+</sup> B-Zell Subpopulation in Milzzellen von Kontroll-Tieren nach LPS-Stimulierung Genotyp-unabhängig in geringerer Frequenz vorliegt. In den Milzen von CAIA-behandelten Mäusen messen wir eine ca. 3-fach höhere Frequenz an CD11b<sup>+</sup> B-Zellen, gegenüber den Kontroll-Mäusen, diese verringert sich ebenfalls nach LPS-Stimulation Genotyp-unabhängig.

# Ergebnisse



**Abb. 52: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen an Tag 5 nach CAIA Induktion**

Dargestellt ist der prozentuale Anteil von CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (myeloide Zellen) (A), CD11b<sup>+</sup>CD68<sup>+</sup> (Makrophagen) (B), CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (pDC) (C), CD11b<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (mDC) (D), CD11b<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (BC) (E) und CD11b<sup>+</sup>CD19<sup>+</sup> (F) Zellen aus der Milz von unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in unbehandelten WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS (100 ng/ml) behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert + Standardfehler gebildet aus jeweils 10 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp.



Aus den Frequenz-Analysen von unbehandelten Kontroll-Mäusen erhalten wir weitgehend übereinstimmend mit vorherigen Analysen (4.1.3) ähnliche Ergebnisse. Die Immunzell-Frequenz in der Milz von AK-behandelten Mäusen variiert zwischen dem 5. und 9. Tag. Während am fünften Tag nach CAIA-Induktion die Frequenz in der Milz für alle unstimulierte und mit LPS-stimulierten Immunzellpopulationen gegenüber den unbehandelten Kontroll-Mäusen erhöht ist, so verringert sich im Gesamten die jeweiligen Frequenzen am 9. Tag, mit Ausnahme von myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen. Restimulierte CD11b<sup>+</sup> Zellen zeigen am 9. Tag nach der CAIA-Induktion vergleichbar mit den Ergebnissen aus dem Blut (4.1.2.), eine Genotyp-spezifische signifikant reduzierte Frequenz in Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen. Auf MFI-Ebene konnte die insgesamt reduzierte Expression von CD11b<sup>+</sup> Zellen an Tag neun bestätigt werden (Anhang: Abb. 71). Untersuchungen zum Aktivierungszustand bestätigen in den LPS-stimulierten Kontroll-Milzzellen eine tendenzielle höhere Expression des Aktivierungsmarkers CD86 auf den Oberflächen von stimulierten KSRP KO Milzzellen im Vergleich zu Kontroll-Tieren (Anhang: Abb. 72 u. Abb. 73).

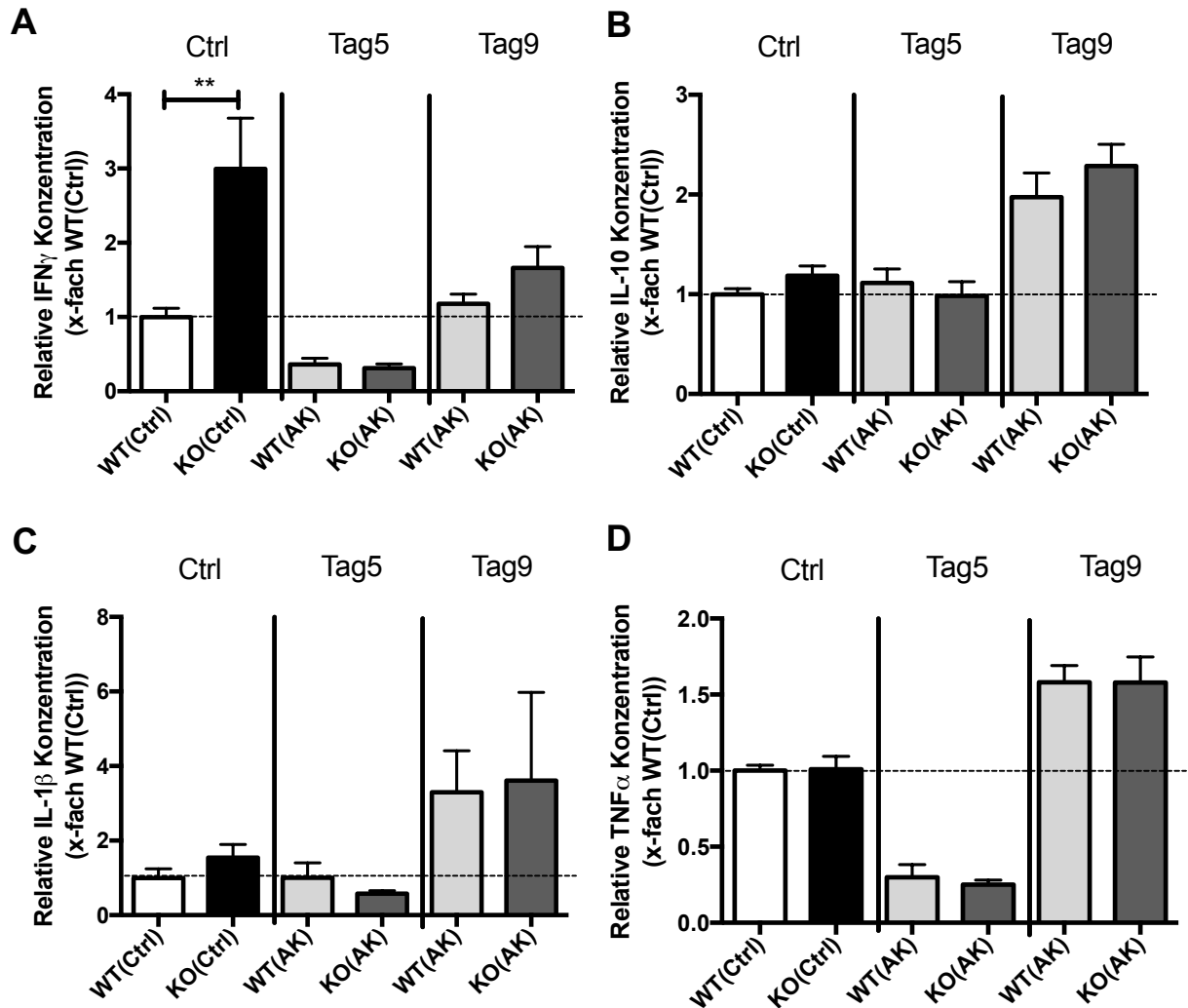
In folgenden Untersuchungen sollte das Zytokinmuster von APC ebenfalls an Tag 5 und 9 nach CAIA-Induktion bestimmt werden.

### 4.7.5 Zytokinproduktion von Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA

In CAIA-behandelten Mäusen konnte am fünften Tag in der Milz eine Frequenz-Zunahme von nahezu allen untersuchten Immunzellpopulationen beobachtet werden. Diese Zunahme der Frequenzen zeigte zwischen den Genotypen keine Unterschiede. Von den isolierten und mit LPS restimulierten Milzzellen wurde zusätzlich im Zellüberstand die Zytokinmuster mit Hilfe des CBA-Systems bestimmt.

In Abb. 53 sind die gemessenen Zytokinkonzentrationen auf die jeweilige Konzentration im Zellüberstand von WT Milzzellen bezogen, um so die Unterschiede zwischen den Genotypen und den einzelnen Gruppen besser zu erfassen. Wie bereits in vorherigen Untersuchungen (K. 4.2.2) nachgewiesen, zeigen Milzzellen aus KSRP-KO Mäusen ohne AK-Behandlung eine signifikant (3-fach) höhere IFN- $\gamma$  Produktion im Vergleich zu Milzzellen aus WT Mäusen (Teilabb. 53A). Milzzellen produzieren Genotyp-unabhängig am fünften Tag nach Arthritis-Induktion ca. 70 % weniger IFN- $\gamma$  im Vergleich zur WT-Kontrolle bei Versuchsbeginn. Am neunten Tag erhöht sich die IFN- $\gamma$ -Produktion in der Milz von KO und WT Mäusen, mit einer deutlicheren Zunahme im Zellüberstand von KO Milzzellen (1,7-fach) gegenüber 1,2-fach im Überstand von WT Milzzellen. Die IL-10 Produktion liegt in unbehandelten KO Milzzellen um ca. 20 % erhöht vor, im Vergleich zur Kontrolle (Teilabb. 53B). Fünf Tage nach CAIA-Behandlung liegt die Menge an IL-10 Genotyp-unabhängig im Kontroll-Bereich. Erst am neunten Tag wurden 2-fach höhere IL-10 Mengen im Überstand von WT Milzzellen und 2,3-fache höhere Mengen im Überstand von KO Milzzellen, im Vergleich zur Kontrolle am Versuchsbeginn, gemessen. IL-1 $\beta$  weist teilweise geringe und sehr heterogene Messdaten auf (Teilabb. 53C), daher kann man Allgemein betrachtet keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der IL-1 $\beta$  Produktion von Milzzellen aus unbehandelten und am 5. Tag nach CAIA-behandelten Mäusen erkennen. Am 9. Tag nach Induktion erhöht sich die IL-1 $\beta$ -Produktion in der Milz von WT Mäusen um das 5,6-fache und um 7,1-fache in der Milz von KO Tieren, dieser Unterschied bleibt aufgrund von hohen Schwankungen statistisch nicht signifikant. Milzzellen produzieren TNF- $\alpha$  in unbehandelten Mäusen, sowie in AK-behandelten Mäusen an Tag 5 und Tag 9, Genotyp-unspezifisch in gleichen Mengen (Teilabb. 53D). Milzzellen scheinen am fünften Tag

nach AK-Behandlung unabhängig vom Genotyp ca. 70 % weniger und am neunten Tag ca. 60 % mehr TNF- $\alpha$  im Vergleich zu Kontrolle zu produzieren.



**Abb. 53: Zytokinmuster-Analysen von APC nach CAIA-Behandlung**

Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), IL-1 $\beta$  (C) und TNF- $\alpha$  (D) in Milzzellen aus unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen im Vergleich. Die Zytokinmessung wurde mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience durchgeführt. Die Daten sind normiert auf die jeweilige relative Zytokinkonzentration von WT Milzzellen und repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 15-28 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: \*\*p < 0,01; T-Test.

### 4.7.6 Zytokinproduktion von T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen nach CAIA

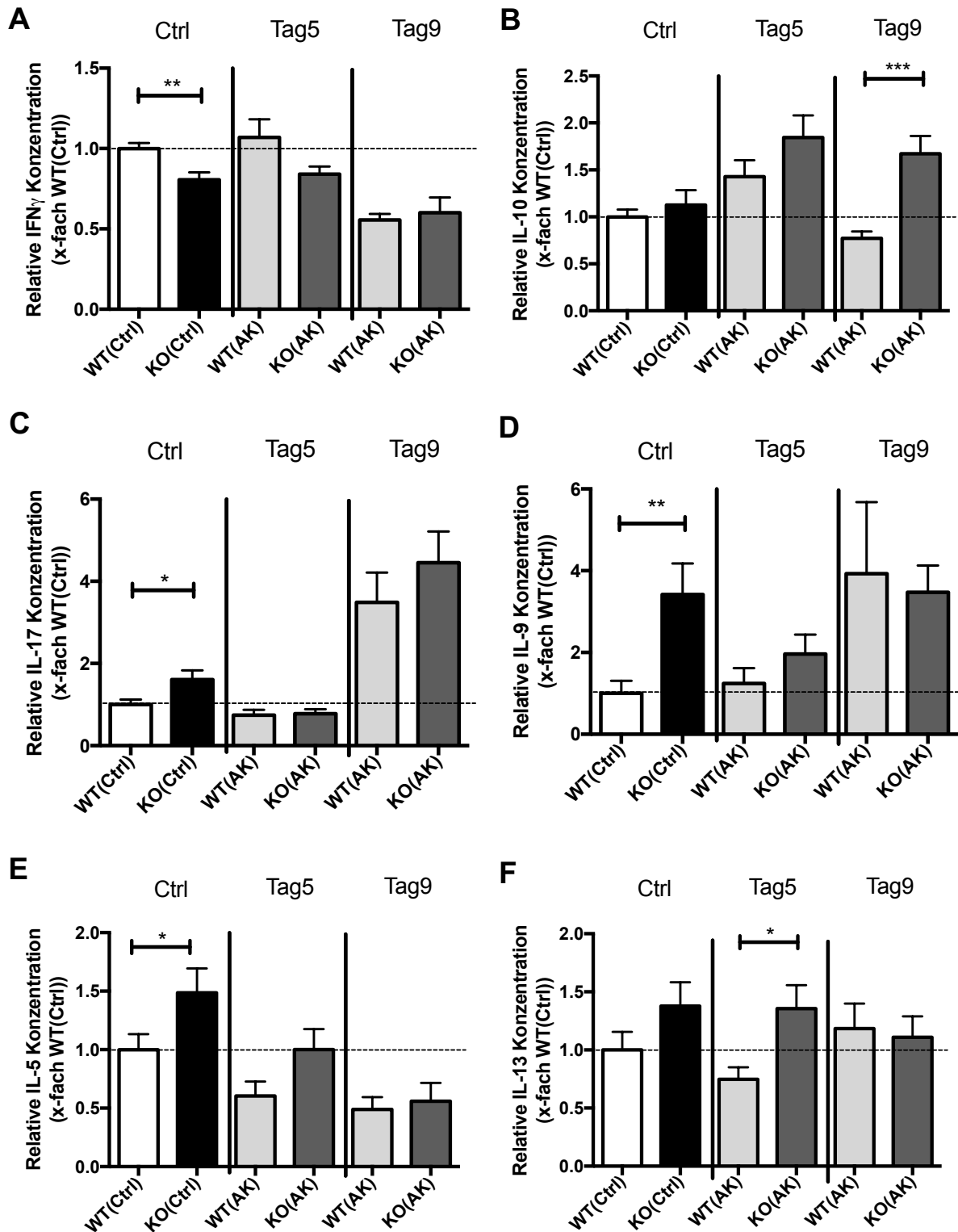
Genotyp-spezifische Unterschiede in der Zytokinproduktion von polyklonal stimulierten T-Zellen konnten bereits in vorherigen Untersuchungen gezeigt werden. Wie sich das Zytokinprofil von restimulierten T-Zellen nach und während einer pro-inflammatorischen Erkrankung verändert, soll in dem aktuellen Kapitel gezeigt werden.

Abb. 54 zeigt die jeweils relativen Zytokinkonzentrationen bezogen auf die WT-Kontrolle. In Teilabb. 54A ist die signifikant reduzierte IFN- $\gamma$  Konzentration im T-Zellüberstand von KSRP-defizienten Mäusen zu erkennen. Ähnlich verhält sich der Unterschied in der IFN- $\gamma$  Produktion zwischen den Genotypen am fünften Tag nach CAIA-Induktion. Am neunten Tag nach CAIA-Induktion verringert sich die IFN- $\gamma$  Produktion in T-Zellen von WT Mäusen um ca. 50 % gegenüber der unbehandelten Kontrolle und erreicht damit ein vergleichbares Zytokinniveau, wie im Überstand von KSRP KO T-Zellen gemessen wurde. IL-10 scheint im T-Zellüberstand von unbehandelten KO Mäusen moderat erhöht zu sein (Teilabb. 54B), gegenüber den WT Kontroll-Zellen. Dieser Unterschied wird deutlicher am fünften Tag nach CAIA-Induktion. Es konnten 1,84-fach mehr IL-10 im Überstand von KO T-Zellen im Vergleich zu 1,43-facher Erhöhung im WT T-Zellüberstand, gegenüber der unbehandelten WT Kontrolle gemessen werden. Am neunten Tag wurde im T-Zellüberstand von KSRP-defizienten Mäusen eine doppelt so hohe Menge an IL-10 im Vergleich zum Überstand von WT Mäusen gemessen. Die T-Zellen aus Kontroll-Mäusen zeigen vergleichbar mit vorherigen Untersuchungen (K. 4.5.3) signifikant höhere IL-17 Mengen im Überstand von KSRP-defizienten Mäusen (Teilabb. 54C). Während am fünften Tag nach CAIA-Induktion die IL-17 Produktion gegenüber der unbehandelten Kontrolle Genotyp-unspezifisch um ca. 25 % reduziert vorliegt, so steigt diese am neunten Tag um das 3,5- im WT und 4,5-fache im Überstand von KO T-Zellen an. Auch die IL-9 Messung in Kontroll-T-Zellen bestätigt in Teilabb. 54D die auch zuvor gemessene signifikante Zunahme an IL-9 im Überstand von KSRP-defizienten T-Zellen (K. 4.5.3). Dieser Effekt ist am fünften Tag nach CAIA-Induktion abgeschwächt und nicht mehr signifikant. Am neunten Tag steigt die IL-9 Menge in den Überständen Genotyp-unspezifisch um fast das 4-fache

an. IL-5 kann in signifikant höheren Mengen im T-Zellüberstand von unbehandelten KO Mäusen nachgewiesen werden, im Vergleich zu Kontroll-Zellen (Teilabb. 54E). Dieser Effekt ist auch am fünften Tag nach CAIA-Behandlung in abgeschwächter Form noch zu beobachten. Am neunten Tag dagegen verringert sich die IL-5 Konzentration im Überstand von WT und KO T-Zellen und erreicht in beiden Genotypen nur noch ca. 50 % der Ausgangskonzentration. IL-13 konnte ebenfalls in T-Zellüberständen aus unbehandelten KO Mäusen in deutlich höhere Konzentrationen, im Vergleich zum Überstand aus Kontroll-Zellen, nachgewiesen werden (Teilabb. 54E). Am fünften Tag nach CAIA-Behandlung lässt sich dieser Effekt auch statistisch signifikant belegen und verschwindet am neunten Tag vergleichbar mit dem Effekt von IL-5.

Für weitere Zytokine wie TNF- $\alpha$  konnte unter basalen Bedingungen und nach Induktion der Krankheit kein Unterschied in der Zytokinproduktion festgestellt werden (Anhang: Abb. 74B). Auch für IL-1 $\beta$  konnte kein Unterschied in der Zytokinproduktion von unbehandelten und am fünften Tag mit AK-behandelten T-Zellen zwischen den Genotypen festgestellt werden (Anhang: Abb. 74A). Man erkennt am neunten Tag eine deutlich höhere IL-1 $\beta$  Produktion, anhand der höheren IL-1 $\beta$  Menge im Zellüberstand von KO T-Zellen. Dieser Unterschied kann jedoch statistisch nicht bestätigt werden.

## Ergebnisse



### Abb. 54: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen nach CAIA-Behandlung

Dargestellt ist die Konzentration von IFN- $\gamma$  (A), IL-10 (B), IL-17 (C), IL-9 (D), IL-5 (E) und IL-13 (F) in den Überständen von T-Zellen, die über Nylonwolle aufgereinigt wurden und für 90 Std. mit anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) und anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) polyklonal stimuliert. Die Zytokinmessung wurde mit Hilfe des CBA-Systems durchgeführt. Die Daten sind normiert auf die jeweilige relative Zytokinkonzentration von WT T-Zellen und repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 15-28 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; T-Test.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass KSRP abhängig vom Zelltyp unterschiedlichen Einfluss auf die Zytokinproduktion nimmt. Während IFN- $\gamma$  in KSRP-defizienten Milzzellen signifikant höhere Expressionslevel aufweist, verringert sich das Expressionsniveau in KSRP-defizienten T-Zellen. Allgemein konnte für die Zytokinproduktion in Milzzellen Genotyp-unabhängig am fünften Tag eine deutliche Abnahme und am neunten Tag eine deutliche Zunahme der untersuchten Zytokine, mit Ausnahme von IL-10, nachgewiesen werden. T-Zellen zeigen dagegen am fünften Tag vergleichbar mit unbehandelten T-Zellen ähnliche aber abgeschwächte Unterschiede zwischen den Genotypen in der Zytokinproduktion, die meist am neunten Tag verändert vorliegen (Ausnahme IL-10). In weiteren Untersuchungen wurde auch im peripheren Blut von Kontroll- und CAIA-behandelten Mäusen an Tag fünf und neun das Zytokinmuster analysiert (K. 3.2.4). Bei diesen CBA-Analysen konnten keine eindeutigen Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen den Genotypen und nach AK-Behandlung festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Mit dem gewählten Krankheitsmodell CAIA (s. 4.7) konnten wir einen veränderten Krankheitsverlauf in Tieren mit inaktiviertem KSRP Gen beobachten. Die Inaktivierung des KSRP-Gens führte aber entgegengesetzt der Erwartung zu einer Abschwächung der Antikörper-induzierten Inflammation. Sowohl die verringerte Symptomatik als auch die reduzierte Immunzell-infiltration in den Pfoten von KSRP-defizienten Mäusen konnten sehr deutlich nachgewiesen werden. Die Charakterisierung von Immunzellen in der Milz demonstrierte auch am neunten Tag nach CAIA-Behandlung mit der verringerten Frequenz an myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen den möglichen Einfluss dieses Zelltyps in dem gewählten Krankheitsmodell. Weitere signifikante Unterschiede auf T-Zellebene, bezogen auf die bereits in vorherigen Untersuchungen detektierte polarisierte TH<sub>2</sub> Antwort, konnten bestätigt werden. Bei diesen KSRP-defizienten T-Zellen deutete vor allem das Zytokinmuster mit der geringeren IFN- $\gamma$  und höheren IL-17, IL-9, IL-4, IL-5 und IL-13 Konzentrationen auf einen TH<sub>2</sub>-Shift hin.

### 4.8 Analysen im experimentellen Tiermodell des allergischen Asthmas

Im einen aktuellen allergischen Krankheitsmodell sollte der dominierende TH<sub>2</sub>-Shift in KSRP-defizienten Mäusen bekräftigt werden. Darum wurde das allergische Asthmodell gewählt, bei dem das adaptive Immunsystem mit der dominierenden TH<sub>2</sub>-Antwort eine sehr große Bedeutung hat. In dem vorherigen Krankheitsmodell der Kollagen-Antikörper-induzierten-Arthritis wurde eine schwächere Krankheitssymptomatik beobachtet, nun erwarten wir einen umgekehrten Effekt. Die bereits nachgewiesene TH<sub>2</sub> und TH<sub>9</sub> Polarisierung soll die verstärkte Asthmasymptomatik begünstigen [249, 250].

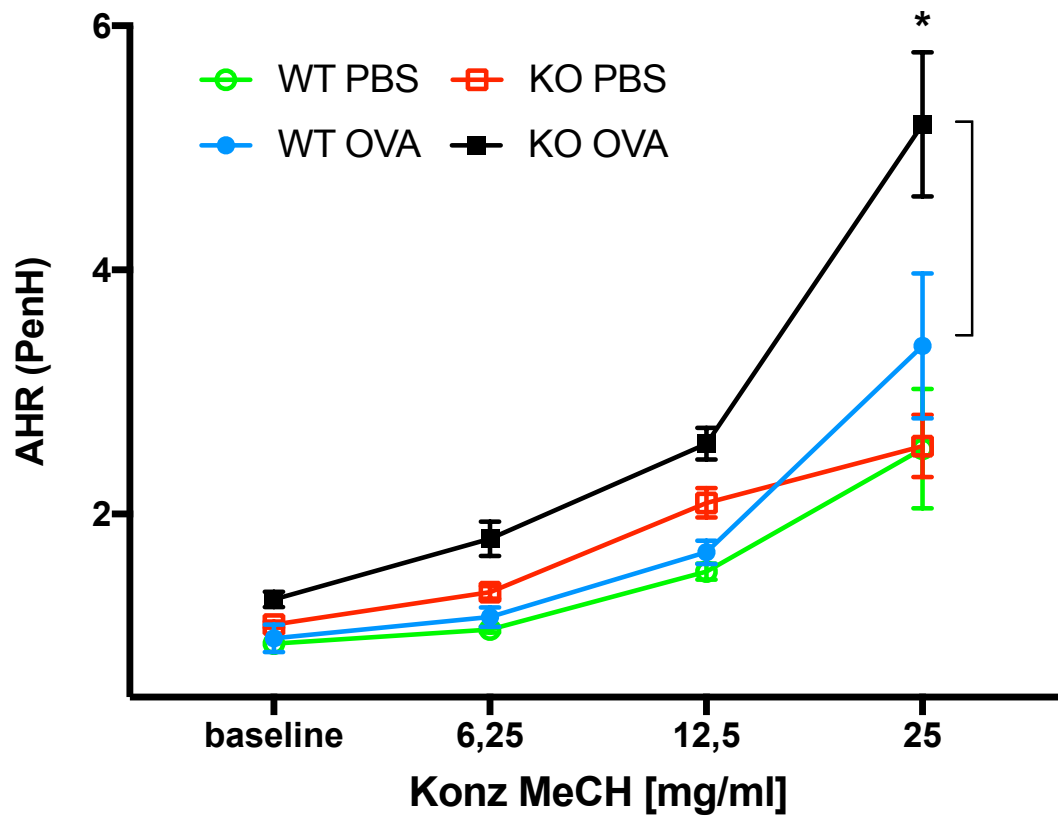
#### 4.8.1 Messung der Atemwegshyperreaktivität in KSRP-defizienten Mäusen

Die Immunisierung und Challenge der Versuchstiere erfolgte mit OVA wie in Abb. 4 dargestellt. Um die Auswirkungen des KSRP Knockdowns auf die nach der Provokation auftretenden Entzündungsreaktionen in der Lunge zu analysieren, wurde beginnend mit dem Ganzkörper-Plethysmographen die Lungenfunktion analysiert (Kapitel 3.4.6.1.1).

Mit Hilfe der AHR, die als charakterliches Merkmal für die Krankheitssymptomatik im Asthmodell gilt, können die funktionellen Einschränkungen in der Lunge bspw. erhöhter Atemwegswiderstand dokumentiert und analysiert werden [251, 252]. Im Ganzkörper-Plethysmographen wurde der PenH-Wert bestimmt, dazu wurde zunächst die Grundaktivität (*baseline*) der Versuchstiere aufgenommen und nach weiterer Provokation mit Methacholin (6,25; 12,5 und 25mg) (s. Kapitel 3.4.6) die Änderung des PenH-Wertes aufgezeichnet.



In Abb. 55 ist die Atemwegshyperreaktivität von Kontroll- und Ovalbumin-sensibilisierten Mäusen dargestellt. Mit OVA sensibilisierte KSRP-defiziente Mäuse scheinen bereits ohne Zugabe des Stimulus (MCh) einen moderat höheren AHR im Vergleich zu anderen Versuchsgruppen zu haben. Während nach Zugabe von 6,25mg/ml MCh die AHR in WT Mäusen unabhängig von der Behandlung vergleichbar mit der Grundaktivität bleibt, steigt der PenH-Wert in OVA sensibilisierten KO Mäusen auf 1,8 und in PBS-behandelten KO Mäusen moderat auf 1,4 an. Eine weitere Erhöhung der Methacholindosis lässt vor allem die AHR in OVA-behandelten KO Mäusen auf 2,6 und auf 2,1 (PenH) in PBS behandelten KO Mäusen ansteigen. Der PenH-Wert von WT Mäusen bleibt behandlungsunabhängig relativ unverändert bei  $1,7 \pm 0,1$  gleich. Eine weitere Verdopplung der Dosis auf 25 mg/ml zeigt eine statistisch signifikante Zunahme der AHR in OVA-behandelten KO Mäusen (5,2 PenH) gegenüber den OVA-behandelten WT Mäusen (3,4 PenH).



**Abb. 55: Analysen der AHR nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen**

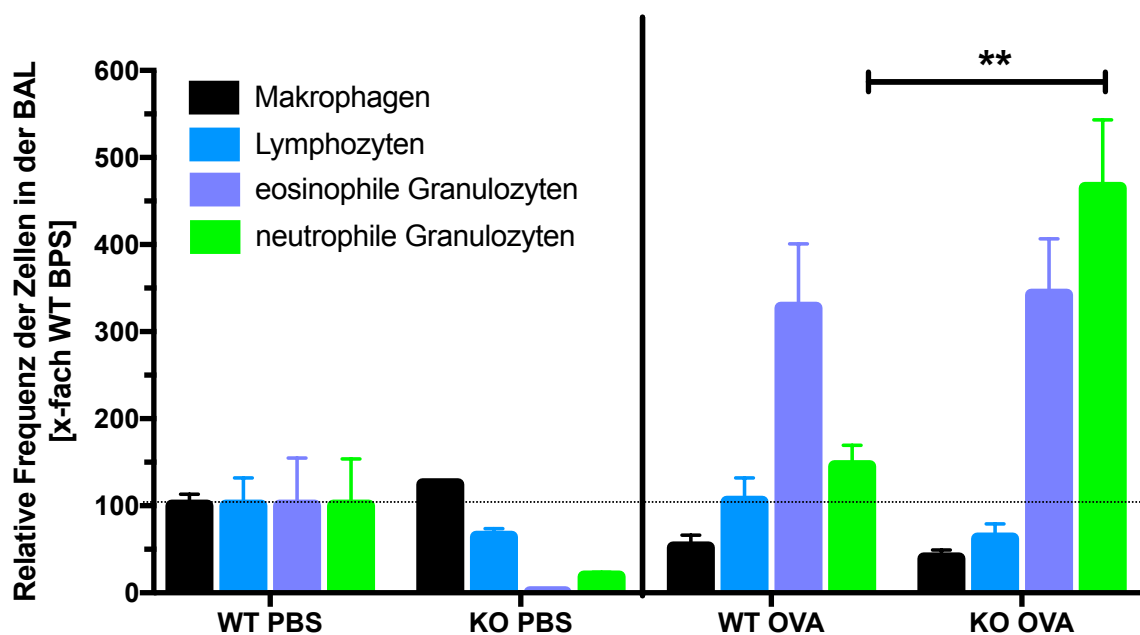
Dargestellt ist die AHR als PenH von wie in Abb. 4 gezeigt sensibilisierten WT und KO Mäusen. Alle Versuchsgruppen wurden 24 Stunden nach der dreitägigen Provokation einer invasiven Lungenfunktionsmessung unter ansteigenden Dosen Methacholin unterzogen. Dazu wurde anfangs für fünf Minuten die Grundaktivität gemessen und anschließend der Atemwiderstand nach Provokation mit Methacholin (6,25; 12,5; 25mg/ml) aufgezeichnet. Abgebildet sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM der Atemwiderstände von fünf untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp. Statistik: \* $p < 0,05$ ; T-Test.

### 4.8.2 Analyse der Immunzellen in der bronchoalveolären Lavage

Neben dem funktionellen Parameter der Atemwegsentzündung wurde auch die zelluläre Zusammensetzung der Bronchiolen und Alveolen in den Versuchstieren mit Hilfe der Lungenspülung BAL untersucht. Beim allergischen Asthma bronchiale korreliert die Schwere der Entzündungsreaktion unter anderem mit der massiven Einwanderung spezifischer Immunzellen in das Lumen der Lunge [253]. Daher wurden die Lungen der Versuchstiere mit einer Kochsalzlösung ausgespült und die Frequenz von den darin gewonnenen Immunzellen (Makrophagen, Lymphozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten) analysiert (3.4.6.1.3 u. 3.4.6.1.3).

In Abb. 56 ist die relative Frequenz der akkumulierten Zellen in der BAL dargestellt. Vergleicht man die Frequenz von eosinophilen und neutrophilen Granulozyten aus den Lungen von PBS-behandelten KSRP KO Mäusen mit den Kontroll-Mäusen, erkennt man eine deutlich verringerte Frequenz in der Gruppe von PBS-KO Mäusen. Aufgrund hoher Schwankungen lässt sich dieser Unterschied statistisch nicht bestätigen. Die OVA-sensibilisierten WT Mäuse zeigen im Vergleich zu Kontroll-Mäusen eine fast 3-fach höhere Frequenz an eosinophilen und nur 0,5-fache Erhöhung an neutrophilen Granulozyten, während Makrophagen um 50 % reduziert vorliegen. OVA-behandelte KO Mäuse weisen vergleichbar zu OVA-behandelten WT Mäusen ähnliche Frequenzen an eosinophilen Granulozyten auf. Dagegen steigt die Frequenz der neutrophilen Granulozyten in OVA-behandelten KO Mäusen 4-fach so hoch an, gegenüber den OVA WT Mäusen. Mit diesem statistisch signifikanten Unterschied, ist das die deutlichste Veränderung zwischen den Genotypen.

## Ergebnisse

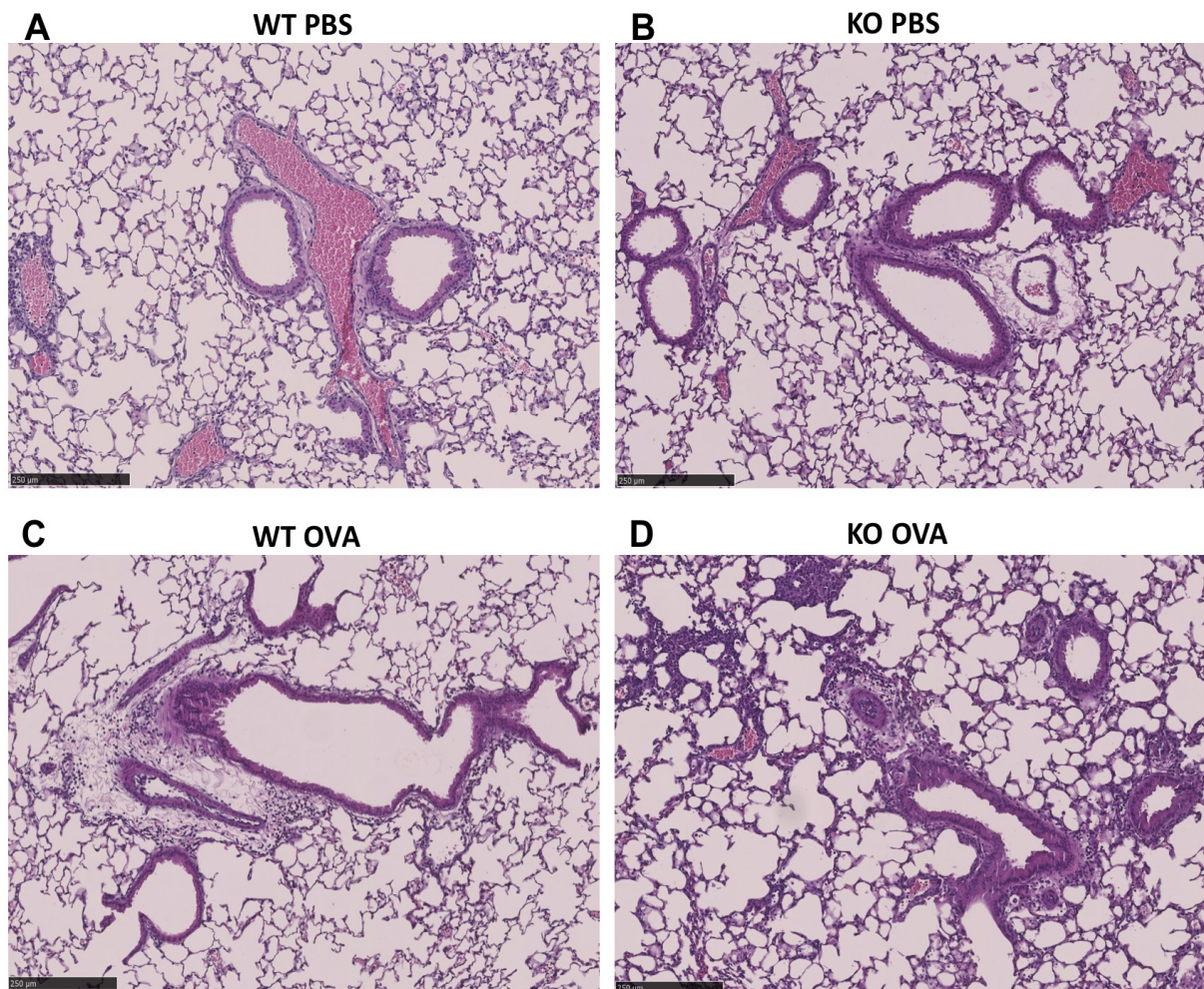


**Abb. 56: Analyse der zellulären Infiltration in der BAL nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen**

Die Versuchstiere wurden wie in Abb. 4 behandelt und 48 Stunden nach der letzten Provokation die Lunge mit 1 ml Kochsalzlösung ausgespült. Diese Spülflüssigkeit wurde sedimentiert, die gewonnenen Zellen aus der Spülflüssigkeit wurden auf Objektträgern zentrifugiert und anschließend nach Angaben des Herstellers mittels Diff-Quick® Färbeset gefärbt. Die gemessene Frequenz der jeweiligen Immunzellpopulationen aus den PBS-behandelten WT Mäusen wurden als 100 % definiert und dienten damit als Kontrollwert. Die Frequenz der Immunzellpopulationen aus anderen Gruppen wurden auf den PBS-behandelten WT bezogen. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert + Standardfehler von fünf untersuchten Mäusen pro Gruppe gebildet. Statistik: \*\*p < 0,01; One-way ANOVA.

### 4.8.3 Histologische Analysen zur Ermittlung des Entzündungsgrades und der Mukusproduktion in der Lunge

Um weitere lokale Entzündungen zu visualisieren und zwischen den Genotypen zu vergleichen, wurden histologische Schnitte des Lungengewebes unter Leitung von Frau Claudia Braun in der histologischen Core Facility der Universitätsmedizin Mainz angefertigt. Dadurch werden mit Hilfe der H&E-Färbung die Zellkerne blau angefärbt und ermöglicht somit die Beurteilung der Zellinfiltration. Die Ermittlung des Entzündungsgrades des Lungengewebes gibt weitere Anhaltspunkte zur Schwere der Asthmaerkrankung.



**Abb. 57: Bestimmung des Entzündungsgrades in der Lunge nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen**

Dargestellt sind repräsentative 10-fach vergrößerte Gewebeschnitte der Lunge von Kontroll- (PBS) und Sensibilisierten (OVA) Mäusen, die mit H&E gefärbt wurden. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen, wurden mit dem Nano Zoomer Scanner erstellt und die Auswertung erfolgte mit der NDP.view2 Software.

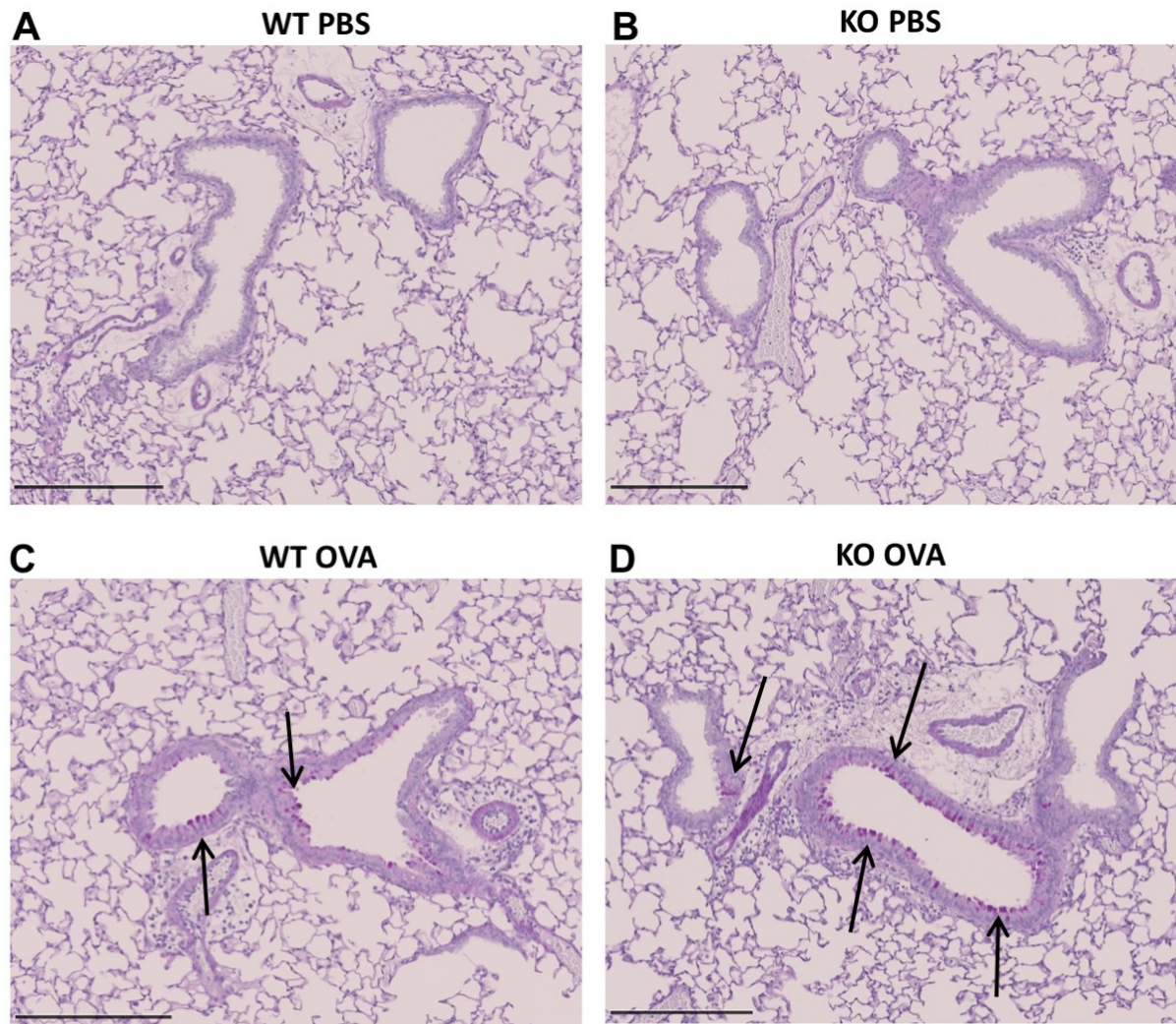
## Ergebnisse

---

In Abb. 57 wurden die H&E gefärbten Lungenschnitte der OVA/PBS-behandelten Versuchstieren qualitativ auf Zellinfiltration (Migration) und Gewebeschädigung untersucht. In Teilabb. 57A ist ein H&E gefärbter Lungenschnitt einer repräsentativen PBS-behandelten WT Maus dargestellt. Zu sehen ist mittig im Bild ein Blutgefäß flankiert von zwei Bronchien, die restlichen homogenen Muster charakterisieren die Alveolen. In Teilabb. 57B sind ebenfalls mehrere Querschnitte von Bronchien aus einer PBS-behandelten KO Maus zu erkennen. Diese wirken von der Färbung leicht dunkler im Vergleich zur WT Maus. OVA-behandelte WT Mäuse zeigen wie in Teilabb. 57C deutlich zu erkennen mehr akkumulierte Zellen um die Bronchien herum, der Bereich ist unverkennbar dunkler und das Gewebe scheint beschädigt und aufgerissen zu sein. Der Gewebeschnitt von einer mit OVA behandelten KSRP-defizienten Maus (Teilabb. 58D) zeigt deutlich größere und dunklere Bereiche um die Bronchien herum. Hier scheinen auch deutlich mehr Immunzellen an den Alveolen versammelt vorzuliegen.

Die vermehrte Mukusproduktion, durch die Becherzellen im Epithel der Atemwege, ist neben der beschriebenen Entzündungsreaktion in der Lunge, ein weiteres charakteristisches Merkmal für *Asthma bronchiale*. Dabei kommt es zur Verengung der Bronchien, was zu einer Erschwerung der Atmung führt. Mukusproduzierende Becherzellen werden mittels der *periodic acid-schiff* (PAS)-Färbung purpurviolett dargestellt (s. K. 3.4.6.1.5).

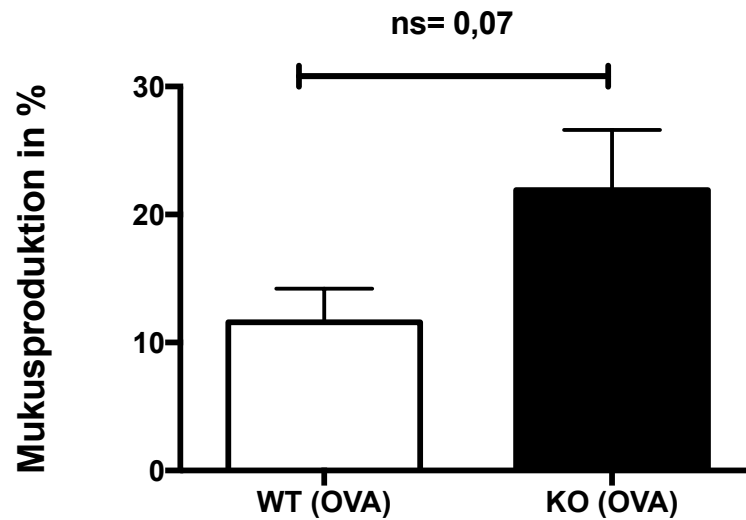
Abb. 58 zeigt repräsentative PAS-Schnitte von OVA/PBS-behandelten KSRP KO und WT Mäusen. Wie zu erwarten, konnten keine mukusproduzierenden Becherzellen in den beiden PBS Kontroll-Gruppen (Teilabb. 58 A+B) nachgewiesen werden. Bei den OVA-behandelten Mäusen beider Genotypen konnte im Vergleich zu unbehandelten Mäusen eine vermehrte Schleimproduktion festgestellt werden (Teilabb. 58 C+D). Die Pfeile markieren die purpurvioletten gefärbten Becherzellen (PAS<sup>+</sup> Zellen).



**Abb. 58: Bestimmung der Mukusproduktion in der Lunge nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen**

*Dargestellt sind repräsentative 10-fach vergrößerte Gewebeschnitte der Lunge von Kontroll- (PBS) und Sensibilisierten (OVA) Mäusen, die mit PAS gefärbt wurden. Die PAS<sup>+</sup> Zellen weisen auf mukusproduzierende Zellen hin, die einzeln mit den schwarzen Pfeilen markiert werden. Die lichtmikroskopischen Aufnahmen, wurden mit dem Nano Zoomer Scanner erstellt und die Auswertung erfolgte mit der NDP.view2 Software.*

Wie bereits unter Kapitel 2.4.6.1.6 beschrieben erfolgte die Quantifizierung nach manueller Auszählung der schleimsezernierenden Becherzellen im Verhältnis zu den bronchialen Epithelzellen. Der prozentuale Anteil der mukusproduzierenden Becherzellen liegt bei OVA-behandelten KO Mäusen bei ca. 20 % und damit 10 % höher als bei OVA-behandelten WT Mäusen.



**Abb. 59: Quantifizierung der Mukusproduktion in der Lunge nach Sensibilisierung mit OVA in WT und KSRP-defizienten Mäusen**

*Die Anzahl an positiven Becherzellen per Bronchiole wurde ermittelt und auf die Gesamtzahl der bronchialen Epithelzellen der Basalmembran bezogen. Zusammengefasst wurden drei bis fünf Bronchien pro Tier und drei bis vier Mäuse pro Gruppe und als Mittelwert + Standardfehler dargestellt. Statistik: ns = nicht signifikant, T-Test.*

Die OVA-sensibilisierten KSRP-defizienten Mäuse zeigen mit einer signifikant höheren Atemwegshyperreaktivität funktionelle Einschränkungen und damit eine prominentere Krankheitssymptomatik im Vergleich zu OVA-behandelten WT Mäusen. Die Auswertung der BAL-Flüssigkeit ergab einen signifikanten Anstieg an neutrophilen Granulozyten in den Lungen von OVA-behandelten KO Mäusen, dies konnte mit der höheren Zell-Filtration in den pathohistologischen, H&E gefärbten Lungenschnitten bestätigt werden. Auch der höhere prozentuale Anteil an mukusbildenden Becherzellen in KSRP-defizienten Mäusen bestätigt den höheren Schweregrad der Entzündung der Atemwege.



### 5. Diskussion

RNA-BP sind in diversen Regulationen der Genexpression involviert. In der vorliegenden Arbeit liegt der Fokus auf dem regulatorischen RNA-BP KSRP und dessen Einfluss auf die Immunzellfunktion und -aktivität. Die Funktion sowie Aktivität von Immunzellen wird vor allem durch soluble Mediatoren wie Zytokinen beeinflusst, deren Expression wiederum durch RNA-BP moduliert wird [96]. Damit Immunzellen schnell auf pathogene Signale mit einer passenden Immunantwort reagieren können, werden Zytokin-kodierende mRNA-Moleküle in spezifischen zytoplasmatischen Strukturen, den Granula, gespeichert sodass die Translation zu einem funktionellen Protein schneller vonstattengehen kann, als durch Initiation einer neuen Transkription möglich wäre [37]. Die 3'-UTR der meisten Zytokin-kodierenden mRNA-Moleküle weisen ARE-Sequenzen auf, wodurch die Bindung von RNA-BP ermöglicht und die damit verbundene Regulation der Translation oder deren Abbau begünstigt werden.

Unterschiedliche Publikationen zeigen, dass RNA-BP die RNA-Stabilität von Zytokinen sowohl positiv als auch negativ beeinflussen können [34, 36, 40, 41, 43, 46]. So zeigt die Publikation von Chen *et al.*, dass das RNA-BP HuR an die mRNA von IL-17 bindet, wodurch eine Stabilisation des Transkripts erfolgt, was in einer erhöhten IL-17 mRNA- und Protein-Menge resultiert [254]. Die Abwesenheit von HuR verringert die IL-17 Expression in dem Mausmodell der multiplen Sklerose (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, EAE) und reduziert somit die Krankheitssymptomatik. Des Weiteren konnte in *ex vivo* Ergebnissen gezeigt werden, dass die Anwesenheit des RNA-BP HuR einen positiven Effekt auf die RNA-Stabilität von TH<sub>2</sub>-assoziierten Zytokinen (IL-4 und IL-13) hat [52-54]. Allerdings konnte die Untersuchung von Gubin *et al.* entgegen den vorliegenden Befunden nachweisen, dass trotz der Abwesenheit von HuR in einem HuR Knockout-Mausmodell höhere Zytokinmengen an IL-5 und IL-13 vorlagen [55].

Auch *in vivo* wurde die Pathogenese einer TH<sub>2</sub>-dominierenden Erkrankung (Asthma) unter Berücksichtigung des HuR-KO charakterisiert. Obwohl *in vitro* der Einfluss von HuR auf die Expression von TH<sub>2</sub>-assoziierten Zytokin-mRNAs bereits nachgewiesen

## Diskussion

---

wurde, konnte im Gesamtorganismus der HuR-defizienten Mäuse auf Grund der Komplexität kein wesentlicher Unterschied in der Krankheitssymptomatik im Vergleich zu den Kontroll-Mäusen festgestellt werden.

Die vorgestellten Untersuchungen zeigen, wie wichtig die Betrachtung der RNA-BP-vermittelten Regulation der Genexpression im Gesamtorganismus ist. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, in unterschiedlichen Krankheitsmodellen den bedeutenden Einfluss des RNA-BP KSRP vor allem während inflammatorischer Prozesse zu untersuchen und zu verstehen.

Das RNA-BP Tristetraprolin (TTP) zählt wie KSRP zu den mRNA negativ (destabilisierenden) regulierenden Bindeproteinen, da die Expression ihrer Ziel-Gene verringert wird [40-42]. Bros *et al.* konnte in seinen Untersuchungen (*in vitro*) in unstimulierten TTP-defizienten DC eine verringerte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD86 gegenüber den unstimulierten WT DC demonstrieren [58]. Da aber der Aktivierungszustand von DC (APC) Einfluss auf die T-Zell stimulatorische Kapazität nimmt, scheint der veränderte Aktivierungszustand von unstimulierten TTP-defizienten DC die Proliferation von naiven T-Zellen zu unterdrücken. Weiterhin wurden im Vergleich zu WT DC höhere Mengen an IL-1 $\beta$  mRNA sowie geringere Mengen an TNF- $\alpha$  und IL-10 mRNA in TTP-defizienten DC nachgewiesen. In TTP-defizienten Makrophagen wurden im Vergleich zu WT Makrophagen hingegen höhere Level an TNF- $\alpha$  und GM-CSF gemessen [255, 256]. Ebenfalls konnte in TTP-defizienten Mäusen eine extreme Überexpression von pro-inflammatorischen Zytokinen gezeigt werden, die wiederum zu einem für RA-Patienten typischen chronisch-entzündlichen Phänotyp beitragen [57-60]. Dies lässt die Vermutung zu, dass auch in KSRP-defizienten Mäusen der Verlauf von chronischen Erkrankungen verändert sein könnte.

Auch für das mRNA destabilisierende RNA-BP KSRP konnte vereinzelt nachgewiesen werden, dass es an der Regulation der Aktivität von Immunzellen beteiligt ist. So wurde beispielsweise in KSRP-defizienten Astrozyten eine erhöhte Produktion von TNF- $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  im Vergleich zu Kontroll-Tieren beobachtet [47]. Andere Publikationen zeigen, dass in Peritonealzellen (adhärente Monozyten und Makrophagen) von KSRP-defizienten Mäusen die mRNA-Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- $\alpha$  und iNOS) im Vergleich zu den der Wildtyp-Tieren ebenfalls erhöht vorliegt [46, 49, 215]. Des Weiteren wurden in einem Tiermodell (EAE) mit KSRP-de-

fizienten Mäusen signifikant erhöhte Mengen an Interferonen ( $-\alpha$  und  $-\beta$ ), nachgewiesen, die wiederum zur Verringerung der Krankheitssymptomatik und zum erhöhten Schutz gegen Virus-Infektionen beitragen [49, 50]. Es konnte zudem vereinzelt dargestellt werden, dass bei inflammatorischen Erkrankungen die Beteiligung von regulatorischen RNA-BP maßgeblich ist [57, 60, 61, 254, 257, 258]. Daher liegt der Verdacht nahe, dass auch KSRP an der Pathogenese von inflammatorischen Erkrankungen beteiligt sein könnte.

### 5.1 Einfluss von KSRP-KO auf den Krankheitsverlauf von CAIA

Um zu verstehen, welche Relevanz KSRP für immunologische Erkrankungen (wie bspw. RA und Asthma) hat, wurde in der vorliegenden Arbeit die Pathogenese von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen *in vivo* untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die CAIA-Methode (s. Kapitel 1.6.3.2 u. 3.4.4) als etabliertes Mausmodell für chronisch-inflammatorische Erkrankungen gewählt, da sich hierbei unabhängig vom genetischen Mausstamm-Hintergrund eine Arthritis induzieren lässt. Die Untersuchungen zur KSRP-Funktion wurden an Mäusen durchgeführt, bei denen ein inaktiviertes KSRP-Gen (KSRP KO) vorlag und die unter Kontrollbedingungen keine phänotypischen Veränderungen zum Wildtyp aufwiesen [49]. Dabei konnte gezeigt werden, dass die CAIA-behandelten KSRP-defizienten Mäuse einen signifikant geringeren Arthritis Index (AI) im Vergleich zu WT Mäusen aufwiesen (Abb. 47). In Abwesenheit von KSRP entwickelt sich die Krankheitssymptomatik der Arthritis verspätet und deutlich geringer.

Dieser unerwartete Befund widerspricht den Ergebnissen aus der gesichteten Literatur [29, 32, 35, 45-47]. So konnten die angeführten Publikationen belegen, dass KSRP als negativer Regulator durch die Bindung an die ARE-Sequenzen in der 3'UTR der mRNAs von pro-inflammatorischen Proteinen (IL-6, IL-8, iNOS und TNF- $\alpha$ ), deren mRNA-Abbau begünstigt. Somit konnte in Abwesenheit von KSRP ein erhöhtes pro-inflammatorisches Milieu nachgewiesen werden, weshalb eine verstärkte (pro-inflammatorische) CAIA-Symptomatik in KSRP-defizienten Mäusen erwartet wurde.

## Diskussion

---

Übereinstimmend mit dem geringeren AI, zeigte die histologische Übersichtsfärbung eine geringere Infiltration von Immunzellen in den Pfoten von KSRP-defizienten Mäusen (Abb. 48). Dabei handelte es sich vor allem um myeloide Zellen (CD11b<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> und Ly6G<sup>+</sup> Zellen), was bereits Frau Schrick in ihrer Arbeit darstellen konnte [259]. Wie ebenfalls aus der Literatur bekannt, stellen vor allem die myeloiden Zellen die hauptbeteiligte Immunzellpopulation dar, die in diesem Mausmodell die CAIA-Symptomatik vorantreiben [175, 176, 178, 260]. Somit scheint die verringerte myeloide Zellzahl zur Reduktion der Krankheitssymptomatik beizutragen.

Im Rahmen der CAIA verursachen die gegen Kollagen II gerichteten autoreaktiven Antikörper Entzündungen, indem sie an Gelenkknorpel binden und das Komplementsystem beeinflussen [176, 261]. Hierbei können entstehende Komplementfragmente die Sezernierung von pro-inflammatorischen Mediatoren in der Umgebung der Gelenke induzieren. Diese Fragmente binden wiederum an Immunkomplexen an oder aktivieren lokale Zellen durch die Bindung an die Fc-Rezeptoren (FcR-Vernetzung). Bei diesen Prozessen werden Monozyten/Makrophagen und neutrophile Granulozyten rekrutiert, die sowohl als Hauptverursacher von CAIA fungieren aber auch gleichzeitig verantwortlich für die Progression dieser Erkrankung zu sein scheinen [175, 176, 178]. In einer weiteren Publikation konnte gezeigt werden, dass im CAIA-Modell die Behandlung mit Antileukoprotein kinase, welche die Serin Protease-Aktivität in Leukozyten inhibiert, zu einem Funktionsverlust führt, der vorrangig bei neutrophilen Zellen einsetzt. Dieser Vorgang resultiert wiederum in einer deutlich verringerten Krankheitssymptomatik [260]. Einen regulatorischen Einfluss auf die Pathogenese scheinen dagegen T- und B-Lymphozyten zu haben, da die Abwesenheit dieser Lymphozyten die Suszeptibilität für CAIA in Mäusen verstärkt [177]. Auch unsere Experimente liefern Hinweise, dass der KSRP KO über Modulation der Lymphozyten den Verlauf der CAIA beeinflussen könnte (s. 5.1.1).

In unseren Untersuchungen lag der Fokus unter anderem auf der Charakterisierung der Immunzellverteilung von KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. Daher wurden insbesondere Frequenz-Analysen von Milzzellen am neunten Tag nach CAIA-Induktion in WT und KSRP-KO durchgeführt. In diesem Zusammenhang war vor allem die Frage interessant, ob nach der Antikörper- Applikation Genotyp-spezifische Unterschiede in der Frequenz der Immunzellen auftreten. Durch die Vorteile der einfachen Isolation und hohen Ausbeute an Milzzellen, wurde dieses Organ als primäre

Immunzell-Quelle verwendet (Kapitel 3.2.5). Für die Charakterisierung dieser Immunzellen wurden typische Oberflächenmarker für myeloide Zellen (CD11b), Makrophagen (CD68), B-Zellen (CD19), DC Marker (CD11c) und Aktivierungsmarker CD86 verwendet (Abb. 49 u. Abb. 50).

Aus den Untersuchungen der Milz wird deutlich, dass am neunten Tag nach der Antikörper-Behandlung die Anzahl der Immunzellen (mit Ausnahme von CD68<sup>+</sup> und CD11b<sup>+</sup> Zellen) in den behandelten Tieren geringer waren als bei Kontrolltieren. Übereinstimmend mit den myeloiden Zellpopulationen aus dem Blut (Abb. 16), konnte auch hier nach einer zusätzlichen LPS-Behandlung eine signifikant verringerte CD11b-Frequenz in KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu den WT Mäusen verzeichnet werden (Abb. 49). Dies wurde durch Untersuchungen der mittleren Fluoreszenzintensität bezüglich der CD11b-Expression bestätigt (Anhang: Abb. 71).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Frequenz von CD11b<sup>+</sup> Zellen in Abwesenheit von KSRP im peripheren Blut unter basalen Bedingungen signifikant reduziert ist (Abb. 16). Dieser Effekt zeigte sich ebenfalls am neunten Tag nach einer CAIA-Induktion in LPS-stimulierten Milzzellen sowie in den Pfoten der Mäuse (Abb. 49 A und Abb. 48). In einer aktuellen Publikation wird das regulatorische posttranskriptionelle Netzwerk vorgestellt, welches in dem Prozess der myeloiden Differenzierung involviert ist [262]. KSRP stellt hierbei den Hauptakteur dar. In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass KSRP die Biogenese (Prozessierung) der miRNA-129 vermittelt (s. Kapitel 1.2), welche einen negativen Einfluss auf RUNX1 (*run related transcription factor 1*) nimmt. RUNX1 unterdrückt wiederum die Granulozyten-Differenzierung durch die Hemmung des G-CSF (*granulocyte colonie stimulating factor*) Rezeptors und der verstärkten Expression des M-CSF Rezeptors. Durch die Aufregulation von miRNA-129, welche durch KSRP begünstigt wird, kann RUNX1 blockiert werden, woraus eine verstärkte Granulozyten-Differenzierung sowie eine erhöhte CD11b-Frequenz resultieren. Bei KSRP-KO bleibt demnach die verstärkte miRNA-129 Prozessierung aus, wodurch die Expression von RUNX1 nicht mehr blockiert wird und die Monozyten-Differenzierung begünstigt werden kann. Damit lässt sich die verringerte Frequenz an myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen bei Abwesenheit von KSRP erklären.

Da die myeloide Zellpopulation entscheidend zur Entwicklung und Progression der Krankheitssymptomatik in CAIA beiträgt, könnte die Verringerung der Zellpopulation in

## Diskussion

---

einer verringerten Arthritis-Induktion in Mäusen mit inaktiviertem KSRP-Gen resultieren [175-178, 260]. Weiterhin könnte man die Expression der miRNA-129 in KO Tieren bspw. mit Hilfe eines PCR-Systems untersuchen, um so eine mögliche verringerte Expression aufzeigen zu können und dadurch Rückschlüsse auf den Einfluss von KSRP auf die CAIA-Entwicklung zu ziehen.

Die Auswirkungen des KSRP Knockdowns im CAIA-Modell wurden zusätzlich zu einem früheren Zeitpunkt untersucht (Abb. 3). Dazu wurde die Immunzellphänotypisierung bereits am fünften Tag nach der CAIA-Behandlung durchgeführt, um in der Effektorphase der Immunzellen weitere Unterschiede auf Immunzell-Ebene aufzeigen zu können. Allerdings konnten hierbei keine neuen Genotyp-spezifischen Erkenntnisse erlangt werden. Bezogen auf die Gesamt-Frequenz einzelner Zelltyp-spezifischer Oberflächenmarker (Abb. 52) zeigte sich eine deutlich erhöhte Immunzell-Anzahl im Vergleich zu den Nicht-Antikörper-behandelten Kontrolltieren.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass an Tag fünf nach Applikation der monoklonalen Antikörper die Immunzellen Genotyp-unabhängig zwecks Induktion einer Immunantwort aufreguliert werden, da die Zellpopulationen in der Milz an Tag neun in vergleichsweise geringeren Frequenzen vorkommen. Eine Ausnahme stellen myeloide Zellen dar, da diese auch am neunten Tag nach CAIA-Induktion in Vergleich zu anderen Immunzellen in der Milz mit einer erhöhten Frequenz einhergehen (Abb. 49). Während der akuten Phase im CAIA wird die Gelenkinfiltration überwiegend durch myeloide Zellen wie bspw. neutrophile Granulozyten und Makrophagen dominiert [175, 176]. Tatsächlich konnte bereits nachgewiesen werden, dass schon insbesondere psychologischer Stress sich negativ auf die Verteilung der Immunzellen auswirkt [263]. Vor allem sollen *in vivo* die während dem Stress freigesetzten Glucocorticoide (Hormone) immunsuppressiv wirken. Bailey *et al.* beschreibt in seiner Arbeit, dass nicht alle Immunzellpopulation von dem Stress betroffen seien und insbesondere myeloide CD11b<sup>+</sup> Zellen aber auch Granulozyten deutlich in einem höheren prozentualen Anteil in der Milz im Vergleich zu anderen Immunzellpopulationen vorzufinden sind [264]. Da die CAIA-Behandlung und die damit entstehenden Schmerzen der Mäuse möglicherweise ebenfalls zu Stress führen, könnte auch dadurch vermutlich die deutlich höhere myeloide Immunzell-Frequenz an Tag neun nach CAIA-Behandlung begründet wer-

den. Dieser Befund deckt sich auch mit der Genotyp-unabhängigen Zunahme der Frequenz von myeloiden Zellen in Mäusen nach CAIA-Behandlung gegenüber den Kontroll-Tieren.

### 5.1.1 Effekt von Lymphozyten auf die Induktion von CAIA

Wie bereits erwähnt, kann die Induktion von CAIA unabhängig von B- und T-Lymphozyten stattfinden [177]. Die Depletion von T- und oder B-Lymphozyten führt sogar zu einer stärker ausgeprägten Krankheitssymptomatik. Aus diesem Grund wird die Beteiligung regulatorischer Lymphozyten-Subpopulationen in der Pathogenese dieser chronisch-inflammatorischen Immunerkrankung diskutiert. Über adaptive humorale aber auch zellvermittelte Immunantworten sind die T-Zellen in der Lage, auch mit dem angeborenen Immunsystem zu interagieren und damit übergreifende Funktionen auszuüben. Dass regulatorische RNA-BP auch T-Zell-Differenzierung modulieren, konnte bereits für HuR und TTP gezeigt werden. HuR beeinflusst nicht nur den TH<sub>2</sub>-assoziierten Transkriptionsfaktor GATA-3, sondern stabilisiert auch die mRNA der TH<sub>2</sub>-vermittelten mRNA der Zytokine IL-4 und IL-13 [52-55]. Ebenso wurde bereits erwähnt, dass TTP neben TNF- $\alpha$  und GM-CSF auch die mRNA von IL-2 negativ beeinflusst [59, 60, 258]. IL-2 wird neben NK- und B-Zellen überwiegend von aktivierten T-Zellen produziert. Zudem dient es als Zellwachstumsfaktor und steigert autokrin die Zellproliferation [98, 243, 246, 247, 265]. Auch KSRP scheint IL-2 negativ zu modulieren, indem es an die 3'UTR der IL-2 mRNA bindet und deren Abbau durch Rekrutierung der Degradationsmaschinerie begünstigt [32]. In diesem Zusammenhang sollen T-Zellen in Abwesenheit von KSRP näher untersucht werden.

Unter basalen Bedingungen wurde die Frequenz der CD3CD4 und CD3CD8 doppelt positiven T-Zellen im peripheren Blut (Abb. 17), sowie in der Milz (Abb. 35) untersucht. Zusätzlich wurde der Aktivierungszustand dieser T-Zell-Subpopulationen mit der Detektion des typischen T-Zell-Aktivierungsmarkers CD25 nachgewiesen (Abb. 36). Bei der Untersuchung zeigten sich keine Frequenz-Unterschiede zwischen KSRP-defizienten T-Zellen und Kontroll-T-Zellen. Auch die Viabiliäts-Assays zeigten keine Genotyp-spezifischen Unterschiede (Abb. 37 u. Abb. 38). Demnach scheint KSRP in der

## Diskussion

---

Peripherie unter basalen Bedingungen in naiven T-Zellen keinen Einfluss auf den klassischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zell-Immunchenotyp zu nehmen. Ob KSRP zu funktionalen Veränderungen nach polyklonaler Stimulation führt, sollte mit T-Zellproliferations-Assays überprüft werden (Kapitel 3.2.7). Damit T-Zellen effektiv ihre Aufgaben im Immunsystem ausüben können, sollten sie proliferieren, um hierfür eine ausreichende Anzahl an Effektor T-Zellen zur Bekämpfung des Antigens zur Verfügung zu stellen [266]. Die aus der Milz isolierten T-Zellen KSRP-defizienter Mäuse zeigten in den unterschiedlichen T-Zell Konzentrationen einen tendenziell höheren Einbau des <sup>3</sup>H-Thymidins und somit eine moderat höhere Proliferation (Abb. 39). Um genauere Aussagen über die T-Zell-Subpopulationen treffen zu können, wurden die kompletten T-Zellen aus der Milz mit Hilfe des MACS-Systems nach CD4 und CD8 positiven T-Zellen separiert und ebenfalls polyklonal stimuliert (Kapitel 3.2.5.2 u. 3.2.6). Mit dieser Untersuchung konnte deutlich gezeigt werden, dass die CD4<sup>+</sup> TZ-Subpopulation der KSRP-defizienten Mäuse im Vergleich zu den Kontroll-Zellen eine signifikant höhere Proliferationsrate aufwies, während die Proliferation von CD8<sup>+</sup> TZ-Subpopulationen Genotyp-unspezifisch unverändert blieb (Abb. 43). Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde der Aktivierungszustand der polyklonal stimulierten TZ-Subpopulationen mit Hilfe von FACS-Analysen untersucht (Kapitel 4.6.1). Auch hier wird deutlich, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellpopulation eine signifikant erhöhte Frequenz an aktivierten CD25<sup>+</sup> T-Zellen aufweisen (Abb. 41), während die CD8<sup>+</sup> T-Zellen Genotyp-unabhängig vergleichbare Level des Aktivierungsmarkers CD25 exprimieren (Abb. 42). Diese verstärkte T-Zell-Proliferation der CD4<sup>+</sup> Subpopulation, könnte die Entstehung und die Progression von Entzündungen, sowie von Autoimmunerkrankungen und Allergien entscheidend beeinflussen [106, 267-269], da insbesondere die Aktivierung der Proliferation von CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen unter anderem entscheidend über das Ausmaß der Krankheits-Symptomatik in allergischem Asthma bestimmen [270]. Auch bei der rheumatoiden Arthritis zählen die CD4<sup>+</sup> T-Zellen zur Haupt-Zellpopulationen im entzündlichen Infiltrat in Synovialgelenken von RA-Patienten [271]. Weiterhin wurden auch Proliferations-Assays mit Gesamt-T-Zellen aus CAIA-behandelten Mäusen durchgeführt, wobei jedoch keine Genotyp-spezifischen Unterschiede festgestellt werden konnten (Daten nicht gezeigt). In diesem Fall müsste man wie in Kapitel 3.2.5.2 beschrieben, mit Hilfe des MACS-Systems die CD4 und CD8 positiven T-Zell separieren, um die Proliferation der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen bestimmen zu können. Auch im Asthma-Modell (s. Kapitel 4.8) steht die Untersuchung der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Proliferation noch aus und



sollte bei Wiederholung des Experiments ebenfalls untersucht werden, um so die signifikant höhere Proliferationsrate in KSRP-defizienten polyklonal stimulierten T-Zellen zu bestätigen.

### 5.2 Einfluss von KSRP-KO auf die Immunzellen

Bereits vor der CAIA-Induktion wurden die Immunzellen von KSRP-defizienten Mäusen aus unterschiedlichen Geweben (Knochenmark, Blut und Milz) mit Hilfe von FACS-Analysen phänotypisch charakterisiert und mit den Immunzellen der Wildtyp-Mäusen verglichen (Kapitel 4.1). In diesem Zusammenhang wurden die Immunzellen mit dem pathogenen Stimulus (LPS) aktiviert, um auch Aussagen über den Reifungszustand zu ermöglichen. Die Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen wurden durch Zugabe von GM-CSF und M-CSF zu BM-DC und BM-M $\phi$  differenziert und anschließend mit Hilfe von Zelloberflächenmarkern charakterisiert (Kapitel 4.1.1). Für diese Zellpopulationen konnten keine Genotyp-spezifischen Unterschiede in der Frequenz beobachtet werden.

Die isolierten PBMC aus KSRP-defizienten Mäusen zeigten jedoch im Vergleich zu WT Mäusen eine signifikant reduzierte Frequenz an myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen und Ly6G<sup>+</sup> Granulozyten (Abb. 16), während die adaptiven T- und B-Lymphozyten keine Unterschiede in der Frequenz zwischen den Genotypen aufwiesen (Abb. 17).

Weitere signifikante Unterschiede in der Frequenz zeigten sich an Hand von isolierten LPS-stimulierten Milzzellen (Kapitel 4.1.3). Sowohl pDCs (CD11b<sup>-</sup>CD11b<sup>+</sup>) als auch B-Zellen (CD11b<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) waren in einer signifikant höheren Frequenz in den Milzzellen von KSRP KO Mäusen vorhanden (Abb. 19). In diesem Fall konnte auch für myeloide CD11b<sup>+</sup> Zellen ein signifikant erhöhter Aktivierungszustand nach LPS-Stimulation beobachtet werden (Abb. 21). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Immunzellen nicht nur Genotyp-spezifisch, sondern auch Gewebe-spezifisch in unterschiedlicher Frequenz vorliegen.

## Diskussion

---

Besonders deutlich wurde dieser Unterschied im peripheren Blut beobachtet. Hierbei zeigte sich, dass sowohl myeloide CD11b<sup>+</sup> Zellen als auch Ly6G<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten in einer signifikant reduzierten Frequenz in KSRP-defizienten Mäusen vorkamen. Dieser Befund lässt vermuten, dass die KSRP-defizienten Mäuse bereits unter basalen Bedingungen eine verringerte Anzahl an Immunzellen besitzen, welche für die CAIA Entstehung und Progression essentiell sind [175, 176, 178]. Warum die besagten Unterschiede in der Frequenz von myeloiden KSRP-defizienten CD11b<sup>+</sup> Zellen auftreten, wurde bereits in Kapitel 5.1 diskutiert. So scheint der Einfluss von KSRP auf die Biogenese (erhöhte Prozessierung) von miR-129 über RUNX1 die myeloide Zelldifferenzierung zu beeinflussen [262]. Warum jedoch die Unterschiede in der Frequenz der Immunzellen unter basalen Bedingungen Genotyp-spezifisch insbesondere zwischen Milzzellen und PBMC auftreten und nicht bereits schon im Knochenmark nachgewiesen werden können, kann noch nicht sicher beantwortet werden. Naheliegender wäre allerdings die Tatsache, dass die Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen durch eine erhöhte externe Zugabe der Differenzierungsfaktoren M-CSF und GM-CSF gezielt die Differenzierung begünstigen würden, während bei untersuchten Immunzellen aus der Peripherie (Blut u. Milz) die Differenzierung weitgehend auf natürlichem/physiologischem Wege durch die Anwesenheit bzw. Abwesenheit von KSRP bestimmt wird.

Auch in anderen RNA-BP-KO Mäusen konnten schon ähnliche Verschiebungen der Immunzellfrequenz nachgewiesen werden, wie bspw. *in vivo* von TTP-defizienten Mäusen. So konnte ein prozentual verringerter Anteil an B- und T-Zellen und zusätzlich eine erhöhte Anzahl an NK sowie an myeloiden Zellen wie Granulozyten und Makrophagen in Abwesenheit von TTP nachgewiesen werden, wodurch der modulierende Einfluss des RNA-BP TTP auf einzelne Immunzelltypen deutlich wurde [255, 256]. Die Immunfrequenz Unterschiede werden insbesondere aufgrund der verstärkten Anwesenheit von GM-CSF begründet, da TTP die Stabilität der GM-CSF-mRNA negativ reguliert und das Fehlen dieses RNA-BP in höheren Mengen GM-CSF resultiert, was wiederum die Granulozyten und die Monozyten Differenzierung positiv beeinflusst.

Die verringerte Anzahl an CD11b<sup>+</sup> sowie Ly6G<sup>+</sup> Immunzellen in KSRP-defizienten Mäusen könnte mit der geringeren Infiltration von Immunzellen in den Pfoten der Tiere an Tag neun nach CAIA Induktion korrelieren (Abb. 48). Dieser Befund, wurde von Frau Schrick ebenfalls mittels mRNA-Analysen bestätigt, indem mRNA Expressionen

von spezifischen Markergenen der Immunzellen gemessen wurden [259]. Diese Unterschiede in der Immunzell-Frequenz können auf verschiedene Faktoren zurückzuführen sein. Eine naheliegende Erklärung für die verringerte Immunzell-Anzahl könnte durch eine geringere Viabilität der Zellen begründet sein, sodass dieser Umstand untersucht werden sollte (Kapitel 4.2). Dadurch kann geklärt werden, ob KSRP mit den Mechanismen der zellulären Apoptose und Nekrose interferiert, wodurch eine geringere Zellzahl begründet wäre.

Des Weiteren könnte eine gestörte Migration der Zellen die verringerte Frequenz von myeloiden Zellen in der Peripherie und in den Pfoten verursachen. Dies führt als Konsequenz zu einer verringerten Inflammation innerhalb der Krankheitssymptomatik.

### 5.2.1 Viabilität von Immunzellen

Bei Einschränkungen der Viabilität von Zellen findet man oft morphologische Veränderungen der Zelle, die vor allem zum Zelltod führen können. Dabei unterscheidet man zwischen der zufälligen ungeordneten Form des Zelltodes (Nekrose) und dem programmiert gesteuerten Zelltod (Apoptose), der von der Zelle selbst durchgeführt wird. Jedoch lassen sich Apoptose und Nekrose nicht immer voneinander trennen und werden daher auch als Aponekrose bezeichnet [272].

Bei der Untersuchung der zellulären Apoptose- und Nekroserate wurden unterschiedliche Immunzelltypen sowohl unter basalen Bedingungen als auch nach Stimulus, betrachtet. Dabei wurden Substanzen verwendet (TNF- $\alpha$  und LPS), die proapoptotische Effekte in den Zellen begünstigen (Kapitel 4.2). Die genannten Substanzen sind in der Lage über die Bindung der Todesrezeptoren (bspw. TNF-Rezeptor 2, TNFR2) intrazelluläre Signalkaskaden (bspw. *nuclear factor kappaB*, NF $\kappa$ B) zu induzieren, die über Aktivierung von Caspasen letztendlich zum Zelltod (Apoptose) führen [228, 273]. Da wie bereits erwähnt sowohl TTP als auch KSRP die Stabilität von TNF- $\alpha$  negativ regulieren, beeinflussen diese RNA-BP indirekt die Aktivierung der Todesrezeptoren und somit die daran gekoppelten Signalkaskaden.

## Diskussion

---

Es erwies sich hierbei, dass die untersuchten Immunzellpopulationen aus dem Knochenmark sowie aus der Milz unabhängig von der Behandlung, keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der Viabilität aufwiesen (Abb. 23 und Abb. 24). Wiedererwartend zeigte sich hierbei jedoch die Genotyp-unspezifische Abnahme der Apoptoserate nach LPS-Behandlung in der Milz. Als mögliche Erklärung könnte hierfür die unterschiedliche Zusammensetzung, der Immunzellpopulation dienen. Denn die Immunzellpopulation in der Milz ist weitgehend heterogen und enthält eine hohe Anzahl an T-Zellen, die wiederum für das Überleben von Immunzellen relevant sein könnten [274]. So können diese T-Zellen nach eigener Stimulation in Kontakt mit aktivierten APC treten und somit die APC mit Hilfe von Überlebenssignalen am Leben halten. Durch LPS lassen sich T-Zellen in der Regel nicht stimulieren, da die klassischen Rezeptoren wie Toll-like Rezeptoren (TLR) auf den T-Zell-Oberflächen nicht exprimiert werden, wobei die Untersuchungen von Tough *et. al* eine LPS-vermittelte Stimulation von T-Zellen aufzeigen [275]. Somit könnten in diesem Fall die unter anderem stimulierten T-Zellen den Immunzellpopulationen aus der Milz Überlebenssignale vermitteln und damit die Apoptoserate nach Behandlung mit LPS verringern.

Im Gegensatz dazu konnte bei der Untersuchung der PBMC eine deutlich erhöhte Mortalität der gesamten myeloiden Zellen von KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nachgewiesen werden (Abb. 26). Die signifikant erhöhte Annexin V Frequenz auf CD11b<sup>+</sup> Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen, demonstriert sehr deutlich die erhöhte Sterblichkeit dieser Zellen. Während die Immunzellpopulation aus dem Knochenmark und der Milz *in vitro* 24 Stunden mit 100 ng/ml LPS behandelt wurden, unterscheidet sich die Art des LPS Stimulus bei den PBMC. Denn die PBMC wurden aus Mäusen isoliert, denen 6 Stunden vorher 20 mg/Kg LPS intraperitoneal appliziert wurde. Zusätzlich könnte die unterschiedliche LPS Konzentration aber auch die Wirkungsdauer und Art der Applikation, sowie die Komplexität des Gesamtorganismus, weitere Apoptose-vermittelte Signalwege begünstigen.

Der damit verbundene Mechanismus ist aktuell nicht bekannt, jedoch konnte KSRP bereits als Zell-Zyklus-Regulator identifiziert werden. Die Publikation von Boucas *et al.* zeigt, dass KSRP die Expression des Zyklin-abhängigen Kinase Inhibitor 1A negativ beeinflusst und somit in Abwesenheit von KSRP die embryonalen Fibroblasten vermehrt in G1-Phase vorliegen [276].

Interessanterweise zeigen die Viabilitäts-Assays für Ly6G<sup>+</sup> neutrophile Granulozyten aus KSRP KO-Mäusen gegenüber den WT Mäusen keine erhöhte, sondern eine geringere Sterblichkeit (Abb. 27). An dieser Stelle wären jedoch weitere Untersuchungen notwendig um den genauen Immunzelltyp mit spezifischen Oberflächenmarkern bestimmen zu können, damit die spezifische myeloide CD11b<sup>+</sup> Zelllinie identifiziert werden kann. Dennoch implizieren die erläuterten Ergebnisse, dass in neutrophilen Granulozyten trotz der Abwesenheit von KSRP keine Apoptose-vermittelten Signalwege induziert werden.

Zusätzlich wurde die Vitalität mit Hilfe der Messung der metabolischen Aktivität untersucht. Dies sollte den Einfluss des KSRP Knockdowns auf Immunzell-Populationen, für die keine Unterschiede in Frequenz und Viabilität nachgewiesen werden konnten, klären (Anhang: Abb. 65, Abb. 66, Abb. 67 u. Abb. 68). Im Vergleich zu WT-Zellen, wies die metabolische Aktivität von KSRP-defizienten Zellen unter basalen und aktivierten Bedingungen eine tendenziell verringerte Vitalität auf. Dieser Effekt konnte statistisch jedoch nicht bestätigt werden und wurde daher nicht weiter untersucht.

### 5.2.2 Migration von Immunzellen

Um zusätzlich weitere funktionelle Parameter der Immunzellen zu analysieren, wurden gezielt myeloide Zellen, wie die neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, in Bezug auf Migrationseinschränkungen untersucht (Kapitel 4.3). Dabei wurde die Motilität von Makrophagen und neutrophilen Zellen sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit der spezifischen Chemokine KC (Neutrophile) und MCP-1 (Makrophagen) untersucht. Während bei Makrophagen keine Unterschiede in der Migration zwischen den Genotypen festgestellt werden konnten (Abb. 30), zeigten KSRP-defiziente neutrophile Granulozyten im Vergleich zu WT-Zellen eine ca. 10 % stärkere Migrationsrate (Abb. 29). Diese Ergebnisse widerlegen die anfängliche Hypothese, dass die KSRP-defizienten Mäuse eine dysfunktionale Migration aufgrund von verringerter Frequenzen an myeloiden Zellen in der Peripherie und in den Pfoten, aufweisen. Übereinstimmend mit den eigenen Ergebnissen (Abb. 29), konnte auch Sundaram *et. al*

## Diskussion

---

den Einfluss von KSRP auf die KC-abhängige Migration belegen [277]. In seinen Experimenten zeigte er, dass KSRP die Reifung der miRNA-198 in der 3'UTR des *follicle-stimulating-like 1* (FSTL1)-Transkript begünstigt. Dadurch entscheide die Anwesenheit von KSRP, ob eine funktionelle FSTL-mRNA entstehe oder nicht. Die vollständige Transkription der FSTL1-mRNA habe wiederum einen positiven Einfluss auf die Stimulierung der KC-Migration, während die Reifung von miRNA-198 die KC-Migration verhindere. Dies lässt die Vermutung zu, dass in Abwesenheit von KSRP die Biogenese der miRNA-198 verhindert werden würde und das daraus resultierende FSTL-Transkript die Migration fördere. Der exakte Mechanismus sei jedoch noch nicht bekannt. In unseren Experimenten muss jedoch berücksichtigt werden, dass das Chemokin KC extern zu den Immunzellen hinzugefügt wurde, was möglicherweise Einfluss auf das Migrationsverhalten nehmen könnte.

Des Weiteren konnte KSRP in der Literatur mit regulierenden Effekten auf das Migrationsverhalten bestimmter Zelltypen in Verbindung gebracht werden. Dabei wurden vor allem entartete maligne Krebs- und Tumorzellen betrachtet [278, 279]. Wie bereits in Kapitel 1.2 erwähnt, reguliert KSRP die Expression des c-myc Protoonkogens und zählt daher als FU-BP2 zu den Mitgliedern der (*far upstream sequence element*) FUSE-BP-Familie. So konnte in humanen Leberkarzinomzellen die Koexpression von FU-BP1 und FU-BP2 als ein kombiniertes und regulatorisches Zusammenspiel auf posttranskriptioneller Ebene, mit funktionellem Einfluss auf die Zellteilung und Mobilität dargestellt werden. Malz *et. al* beschreibt, dass FU-BP1 hauptsächlich regulierenden Einfluss auf die Proliferation habe, während FU-BP2 für die Migration verantwortlich sei [278, 279]. Weiterhin soll die FU-BP2-Expression in dem regulatorischen Zusammenspiel Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von FU-BP1 ausüben und es somit negativ regulieren. Zudem wird KSRP mit erhöhter Migration von Osteosarkomzellen in Verbindung gebracht, was durch die regulierte Expression von c-myc die Pathogenese von Osteosarkoma begünstigt [278, 279].

Das bisher besser erforschte regulatorische RNA-BP HuR beeinflusst positiv die mRNA-Stabilität von  $\beta$ -Actin. Dieses BP ist in der Zelle sowohl für die Modularität extrazellulärer Matrix als auch für die Migration der Zellen verantwortlich [280, 281]. Auch KSRP scheint in der posttranskriptionellen Regulation mit  $\beta$ -Actin-mRNA assoziiert zu sein, jedoch wird die exakte Relevanz derzeit noch diskutiert. KSRP wird vor allem in den Neuronen mit dem Transport von  $\beta$ -Actin-mRNA in Verbindung gebracht [282].

Unter anderem beschreibt Gu *et. al*, dass KSRP die zytoplasmatische Lokalisierung der  $\beta$ -Actin mRNA in Fibroblasten und Neuronen fördere und somit zur deren mRNA-Stabilität beitrage [283].

Berichten zufolge, begünstigt KSRP die Migration von bestimmten Zellen [278, 279]. Ob dieser Effekt allerdings auch auf Immunzellen übertragbar ist oder in spezifischen Zelltypen auch negative Migrations-Effekte auslöst, lässt sich aufgrund fehlender und detaillierter Untersuchungen nicht gesichert beantworten. Die Migrationseffizienz einzelner Immunzellen wird zudem durch den Reifungszustand bestimmt. Die Aktivierung von Immunzellen veranlasst die Entwicklung zum maturierten Phänotyp, der wiederum Einfluss auf die Funktionalität ausübt [74]. Dadurch kommt es unter anderem zur Expression von unterschiedlicher Oberflächenmolekülen wie Chemokinrezeptoren, Adhäsionsmolekülen oder Aktivierungsmarkern, die Migrationsverhalten beeinflussen können [284-286].

### 5.2.3 Reifungszustand von Immunzellen

In dieser Arbeit wurde der Reifungszustand von APC durch fluoreszenz-basierte Detektion von Antikörpern gegen die Aktivierungsmarker bestimmt (Kapitel 3.3). Im Zuge einer LPS-bedingten Aktivierung sollte geklärt werden, ob die Ausreifung der Immunzellen unter dem regulatorischen Einfluss von KSRP steht und ob die Abwesenheit von KSRP funktionelle Zellveränderungen verursacht.

Knochenmark-differenzierte M $\phi$  und DC zeigen unter Kontrollbedingungen sowie nach 24-stündiger Stimulation mit LPS keine Veränderungen in der Expression der Aktivierungsrezeptoren zwischen den Genotypen (Abb. 12 und Abb. 14). Somit scheint KSRP keinen Einfluss auf die Regulation der Reifungsmarker in Knochenmark-differenzierten Immunzellen zu haben.

Immunzell-Populationen aus der Milz von KSRP-defizienten Mäusen, wie beispielsweise CD11b positive Zellen, zeigten Genotyp-spezifisch nach 24-stündiger LPS Stimulation eine signifikant erhöhte Expression des kostimulatorischen Aktivierungsmarkers CD86, während für andere Populationen wie CD11c und CD19 positive Zellen

## Diskussion

---

eine tendenziell erhöhte Expression des Aktivierungsmarkers CD86 zu beobachten war (Abb. 21). In TTP-defizienten Mäusen konnte bereits demonstriert werden, dass in Abwesenheit des regulierenden BP in unstimulierten DC eine verringerte Expression von kostimulatorischen Molekülen (CD40 u. CD86) gegenüber von Kontroll-DC vorhanden war [58]. Somit scheint TTP kostimulatorische Moleküle zu regulieren. Allerdings sollten hier in unseren Untersuchungen die stimulierten Milzzellen nicht mit den unstimulierten DC verglichen werden, da auch in Untersuchungen von Bros *et. al* die stimulierten TTP-defizienten DC im Vergleich zu WT DC keine Unterschiede in der Expression der Reifungsmarker zeigten.

Im Überstand von KSRP-defizienten Milzzellen konnte nach LPS-Stimulation auch signifikant erhöhte IFN- $\gamma$  Mengen im Vergleich zu Kontroll-Milzzellen nachgewiesen werden (Abb. 32). Es ist bekannt, dass auch IFN- $\gamma$  stimulierend auf bestimmte Immunzellpopulationen wirken kann, wie bspw. Makrophagen oder CD11b<sup>+</sup> myeloide Suppressorzellen (*myeloid-derived suppressor cells*, MDSC) und da insbesondere die KSRP-defiziente CD11b<sup>+</sup> Zellpopulation signifikant höhere CD86-Expressionslevel aufweist, liegt der Verdacht nahe, dass die Kombination aus LPS und erhöhten IFN- $\gamma$  Mengen für die erhöhte Reifung der myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellpopulation verantwortlich sein könnten (Abb. 21) [287]. Um genauere Aussagen zur Identität der CD11b<sup>+</sup> Subpopulation tätigen zu können, wären FACS- Untersuchungen mit einer größeren Auswahl immun-spezifischer Oberflächenmarker notwendig.

Die Expression des CD86-Moleküls auf der Oberfläche von APC ist essentiell für die Koaktivierung von T-Zellen und wurde aus diesem Grund in folgenden Experimenten mit untersucht [288].

### 5.2.3.1 Reifungszustand von Immunzellen nach CAIA-Behandlung

Betrachtet man den Reifungszustand einzelner Milzzellpopulationen am fünften und am neunten Tag nach der AK-Applikation im CAIA-Modell, so war CD86 vorrangig in Kontroll-KSRP-defizienten Milzzellpopulationen gegenüber den WT Kontroll-Zellen tendenziell höher exprimiert (Anhang: Abb. 72 u. Abb. 73). Am fünften Tag nach der CAIA-Induktion nahm die Frequenz der LPS- & AK-behandelten Milzzellen im Vergleich zur stimulierten AK-unbehandelten Kontroll-Milzzellen deutlich ab, während am



neunten Tag die Expression von CD86-aktivierten Milzzellpopulationen von LPS- & AK-behandelten MZ wieder präsent auf vergleichbarem Level zu stimulierten Kontrollzellen detektiert wurden. Für diese Unterschiede konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Genotypen nachgewiesen werden. Am fünften Tag nahm zwar die Gesamtanzahl der AK-behandelten Immunzellen in der Milz zu (Abb. 51 u. Abb. 52), jedoch ließen sich diese nur verringert aktivieren (Anhang: Abb. 73). Am neunten Tag befanden sich in der Milz von AK-behandelten Mäusen ähnlich wenige Zellen (Abb. 49 u. Abb. 50), die jedoch verstärkt auf die LPS-Aktivierung reagierten und mit einer höheren Frequenz CD86-Moleküle exprimierten (Anhang: Abb. 72). Eine mögliche Ursache für diese unterschiedliche CD86-Expression (zwischen dem fünften und neunten Tag) könnte sein, dass die bereits aktivierten Immunzellpopulationen, die unter Umständen sensibler auf LPS-Aktivierung reagiert hätten, bereits aus der Milz heraus migriert sind. Nichtsdestotrotz, liefern diese Ergebnisse keine eindeutigen Beweise für die erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 in KSRP-defizienten Mäusen.

Dennoch gibt es Publikationen, bei denen der Einfluss von RNA-BP auf die Expression kostimulatorischer Faktoren in Immunzellen aufgezeigt werden konnte [289]. So wurde bspw. gezeigt, dass HuR die Aktivierung von Zellen durch eine Erhöhung der CD83-Expression beeinflusst [289]. Wie bereits erwähnt wurde in einem anderen Modell in TPP-defizienten DC ohne Einfluss von Stimulanzien eine verringerte Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD86 im Vergleich zu WT DC nachgewiesen [58]. Nach der Stimulierung der Zellen konnten keine veränderten Expressionsmuster zwischen den Genotypen festgestellt werden, weshalb aktuell eine indirekte Beeinflussung des regulatorischen RNA-BP TTP auf die Expression der Aktivierungsmarker diskutiert wird. Des Weiteren geht man davon aus, dass ähnlich wie bei HuR und TTP, die das gleiche Ziel-Molekül binden (TNF- $\alpha$ -mRNA) und dadurch in einer Wechselwirkung agieren, auch andere regulatorische RNA-BP als „Ersatz“ von KSRP in die Regulation von Oberflächenmolekülen eingreifen könnten [290, 291].

### 5.3 Einfluss von KSRP-KO auf das Zytokinmuster

Des Weiteren werden insbesondere T-Zellen während homöostatischer Prozesse sowie während einer Immunantwort in ihrer Funktion durch soluble Mediatoren beeinflusst. Das Zytokinmilieu ist dabei entscheidend für Wachstum, Differenzierung sowie Proliferation der Zellen und steuert zusätzlich die Aktivierung und die Suppression der Zellen [235].

Immunzellen sind demzufolge in der Lage, über das produzierte und sezernierte Zytokinprofil mit umliegenden Immunzellen zu kommunizieren, sowie die Immunreaktion zu verstärken oder zu beenden. Die posttranskriptionale Regulation dieser Zytokine steht unter der Kontrolle von RNA-BP und kann somit für die korrekte Steuerung der Immunantwort von essentieller Bedeutung sein [95]. Daher kann auch anhand der produzierten bzw. sezernierten Zytokine, die funktionelle Beteiligung der einzelnen Immunzelltypen nachgewiesen werden. Da T-Zellen im Regelfall durch APC aktiviert und durch APC sezernierte Zytokine angesteuert werden, wurden mit Hilfe von CBA-Analysen (Kapitel 3.3.4) das Zytokinmuster von KSRP-defizienten APC untersucht (Kapitel 4.4). Die Aktivierung und Stimulation der Milzzellen erfolgte für 24 Stunden mit LPS (Kapitel 3.2.6). Die Untersuchungen zeigten, dass stimulierte Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen signifikant höhere Mengen an IFN- $\gamma$  produzieren (Abb. 32) als Milzzellen aus WT-Tieren. Entgegen der ursprünglichen Erwartung, gab es keinen Genotyp-spezifischen Unterschied in der Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-6, obwohl eine Überexpression dieser pro-inflammatorischen Zytokinen in Abwesenheit von KSRP in der Literatur beschrieben wurde [35, 45, 215]. Über den Einfluss von KSRP auf die IFN- $\gamma$  mRNA-Stabilität ist aktuell nur wenig bekannt, jedoch konnte TTP als negativer Regulator der IFN- $\gamma$  mRNA-Stabilität beschrieben werden [292, 293]. Der Einfluss von KSRP auf die IFN- $\gamma$  mRNA-Stabilität wird in Kapitel 5.3.1 und 5.3.2 näher betrachtet.

In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch nur tendenziell höhere Mengen pro-inflammatorischer Zytokine in der Milz von KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nachgewiesen werden. Während in Voruntersuchungen die IL-6-Produktion einen signifikanten Unterschied aufwies (Abb. 31), konnte dieses Ergebnis in weiteren ausführlicheren Untersuchungen statistisch nicht mehr bestätigt werden (Abb. 32).

Mit Hilfe von weiteren Untersuchungen kam es zur Dekomplexierung, bei der die Zelltypen aufgetrennt und separat voneinander auf unterschiedliche Weise stimuliert werden sollten (Kapitel 3.2.6), wodurch genauere Aussagen über die Zytokin-produzierenden Zelltypen getroffen werden konnten. So ließen sich signifikant höhere Mengen an IL-10 in Überständen von KSRP KO BM-DC im Vergleich zu WT BM-DC nachweisen (Abb. 33 B), während in Überständen von Makrophagen keine Genotyp-spezifischen Unterschiede zu beobachten waren (Abb. 34). KSRP scheint zelltypspezifisch die Zytokinproduktion in APC auf Proteinebene zu modulieren. Auch T-Lymphozyten wurden mit Hilfe des MACS-Systems (Kapitel 3.2.5.2) nach CD4 und CD8 positiven Subpopulationen separiert und polyklonal stimuliert, um Anhand des Zytokinmusters das intrinsische Potential der KSRP KO T-Zellen zu ermitteln (Kapitel 4.6.3).

### 5.3.1 TH<sub>1</sub>-assoziierte Zytokin Produktion

Zu den typischen TH<sub>1</sub>-assoziierten Zytokinen zählen unter anderem TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12 und insbesondere IFN- $\gamma$ . Es wurden keine großen Unterschiede in der Zytokin Produktion für TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  zwischen den Genotypen nachgewiesen, aber sehr wohl bei dem Leitzytokin IFN- $\gamma$  (Abb. 32, Abb. 33, Abb. 34, Abb. 40).

In naiven Milzzellen aus KSRP-defizienten Mäusen wurde mehr IFN- $\gamma$  generiert, wobei dieser Unterschied im Verlauf der CAIA nicht mehr vorhanden war (Abb. 32 u. Abb. 53). Im Gegensatz dazu zeigten isolierte und polyklonal stimulierte T-Zellen (Kapitel 3.2.5.1 u. 3.2.6) signifikant geringere Mengen an IFN- $\gamma$  im Zell-Überstand von KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT-Tieren (Abb. 40). Auch dieser Unterschied zwischen den Genotypen ist in der Betrachtung der Zytokinproduktion von polyklonal stimulierten T-Zellen aus CAIA-behandelten Mäusen nicht mehr statistisch signifikant (Abb. 54). IFN- $\gamma$  kann neben seiner Hauptfunktion als pro-inflammatorisches Zytokin auch anti-inflammatorische Effekte, beziehungsweise immunsuppressive Eigenschaften aufweisen. Zu den pro-inflammatorischen Funktionen zählt vor allem die Aktivierung von M1-Makrophagen und die Induktion der TH<sub>1</sub>-Entwicklung [294-296]. In einem nicht ganz so verbreiteten Krankheitsmodell, der Proteoglykan-induzierten Arthritis

## Diskussion

---

(PGIA), konnten Finnegan *et al.* demonstrieren, dass eine Neutralisation von IFN- $\gamma$  zu einem abgeschwächten Krankheitsverlauf führt [297]. Aktuellere Publikationen zeigen jedoch auch den protektiven Effekt von IFN- $\gamma$ . Insbesondere wird hervorgehoben, dass IFN- $\gamma$  nicht einfach als pro- oder anti-inflammatorisches Zytokin definiert werden sollte, sondern seine Funktion abhängig von der involvierten Phase in einer Immunreaktion und von den beteiligten Immunzellen betrachtet werden muss [295, 298-300]. In dem eingesetzten CAIA-Krankheitsmodell ist die aktive Beteiligung von M1-Makrophagen, sowie die TH<sub>1</sub>-vermittelte Immunreaktion für die Entstehung und den Schweregrad der Erkrankung notwendig [165-167]. Die signifikant verringerte IFN- $\gamma$  Produktion in naiven KSRP-defizienten Gesamt-T-Zellen sowie die signifikant erhöhte IL-4 Produktion deuten bereits auf eine geringere Aktivität der TH<sub>1</sub> Population hin (Abb. 40). Auch im Verlauf der CAIA war die signifikant erhöhte IFN- $\gamma$ -Produktion von KSRP-KO APC nicht mehr zu beobachten (Abb. 53 A). Bisher unbekannte Faktoren scheinen somit die IFN- $\gamma$  Produktion in APC während der Krankheitsprogression zu beeinflussen. Laut Literatur wird IFN- $\gamma$  im CAIA-Modell überwiegend im Synovium von erkrankten Tieren durch TH<sub>1</sub> T-Zellen sezerniert und dient insbesondere der Aktivierung und Rekrutierung von M1-Makrophagen, die wiederum die Inflammation durch die Produktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine verstärken [301].

Aus dem Zytokinmuster von CAIA-behandelten und restimulierten T-Zellen geht hervor, dass der anti-inflammatorische Faktor IL-10 in KSRP-defizienten Mäusen gegenüber den WT Mäusen mit hoher Signifikanz verstärkt exprimiert wird (Abb. 54 B). IL-10 besitzt ein breites Wirkungsspektrum und ist unter anderem in der Lage, die IFN- $\gamma$  Produktion zu beeinflussen [302-304]. Daher liegt die Vermutung nahe, dass in KSRP-defizienten Mäusen das durch T-Zellen sezernierte IL-10, die Genexpression beeinflusst, wodurch weniger pro-inflammatorische Makrophagen und Monozyten aktiviert werden können. Dies könnte wiederum zu einer Verbesserung der Krankheitssymptomatik führen. Um diese Hypothese experimentell zu überprüfen, könnte man in den Pfoten von KSRP-defizienten Mäusen auf mRNA-Ebene sowohl die IFN- $\gamma$  als auch die T-bet (Transkriptionsfaktor für TH<sub>1</sub>-Zellen) Menge im Vergleich zu WT Mäusen bestimmen, um so zusätzlich eine verringerte TH<sub>1</sub>-Aktivität, durch die bspw. geringere T-bet Menge in KSRP-KO T-Zellen gegenüber den Kontroll-T-Zellen, bestätigen zu können.

Die KSRP-defizienten CD8<sup>+</sup> T-Zellen zeigten im Überstand signifikant geringere IFN- $\gamma$  Mengen im Vergleich zu den Kontroll-Zellen (Abb. 44), während CD4<sup>+</sup> KO T-Zellen keine Unterschiede in der IFN- $\gamma$ -Produktion zwischen den Genotypen aufzuweisen schienen (Abb. 45 A u. Abb. 46 A).

Es sieht also danach aus, dass die CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen aus KSRP-defizienten Mäusen aufgrund von verringerter IFN- $\gamma$  Produktion in ihrer Funktionalität eingeschränkt sein könnten. Dies könnte die verringerte Symptomatik (AI) in KSRP-defizienten Mäusen gegenüber den WT Mäusen erklären, da die zelluläre Immunantwort während der Arthritis-Entwicklung möglicherweise verringert war [305]. Die Symptomatik in der Pathogenese von CAIA-behandelten Mäusen aufgrund von CD8<sup>+</sup> T-Zell Defizienz wurde auch von Sheikh *et. al* beschrieben [306]. In dieser Publikation konnte gezeigt werden, dass durch den Einsatz eines kleinen molekularen Inhibitors (STA-21) unter anderem die Anzahl an CD8<sup>+</sup> T-Zellen reduziert werden kann, was zu einem verbesserten klinischen Verlauf der Arthritis bei CAIA-Mäusen führt.

### 5.3.2 TH<sub>2</sub>-assoziierte Zytokin Produktion

Zu den TH<sub>2</sub>-assoziierten Zytokinen zählen neben IL-4, IL-5 und IL-13 auch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10. IL-10 konnte im Überstand von KSRP-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen in 5-fach höheren Mengen gegenüber den Kontroll-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 45 B), wohingegen bei CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Unterschiede zwischen den Genotypen in der Zytokinproduktion beobachtet werden konnte (Abb. 44 B). Dieser sehr deutliche Unterschied, der auch am neunten Tag nach der CAIA-Behandlung in gesamten, restimulierten T-Zellen beobachtet wurde, könnte wohlmöglich für die verringerte Krankheitssymptomatik verantwortlich sein [245]. Wie bereits erwähnt, wirkt das regulatorische anti-inflammatorische IL-10 immunsupprimierend in dem es bspw. Monozyten und Makrophagen in ihrer pro-inflammatorischen Aktivität inhibiert [88]. Gleichzeitig induziert IL-10 die T<sub>reg</sub>-Differenzierung (s. Kapitel, 5.3.3), die wiederum neben IL-10 mit weiteren suppressiven Zytokinen Immunantworten unterdrücken [307]. Darüber hinaus ist die Überexpression von IL-10 relevant für die TH<sub>2</sub>-Umgebung und zählt daher zu den TH<sub>2</sub> assoziierten Zytokinen [303]. Damit übereinstimmend

## Diskussion

---

wurde im Überstand der gesamten TZ-Population aus KSRP-defizienten Mäusen signifikant höhere Mengen an IL-5 und IL-4 (Abb. 40) nachgewiesen. In MACS isolierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte auch die vorher nur tendenziell erhöhte Expression von IL-13 (Abb. 40) mit einer statistischen Signifikanz bestätigt werden (Abb. 45 F). Diese Zytokine werden von der Subpopulation der TH<sub>2</sub>-Zellen gebildet und sezerniert, sodass diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Abwesenheit von KSRP die T-Zellen zu einer verstärkten TH<sub>2</sub>-Antwort polarisiert. Die Ergebnisse demonstrieren, dass KSRP-defiziente T-Zellen das intrinsische Potenzial besitzen, insbesondere signifikant höhere Mengen an TH<sub>2</sub>-Zytokinen zu sezernieren. Dieser Trend geht jedoch, außer bei IL-10, nach der CAIA-Behandlung und im Verlauf der Erkrankung verloren (Abb. 54). Während im Vergleich zum Wildtyp nur in den isolierten KSRP-defizienten naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant höhere Mengen an IL-10 gemessen wurden (Abb. 45 B), steigt die IL-10 Produktion am fünften Tag erst tendenziell an und ist daraufhin am neunten Tag nach der CAIA-Behandlung mit einer hohen Signifikanz in der gesamten T-Zell-Population sichtbar (Abb. 54 B). Die veränderten Expressionen von IL-4 sowie IL-13 in KSRP-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen könnte indirekt auf die ebenfalls veränderte IL-10-Expression zurückzuführen sein. Gleichzeitig könnte die mRNA-Stabilität von IL-4 und IL-13 unter anderem auch direkt durch KSRP reguliert werden, sodass durch das Fehlen des negativ regulatorischen BP der mRNA-Abbau der genannten Zytokine verringert sein könnte und daher eine erhöhte Menge der TH<sub>2</sub>-assoziierten Zytokinen vorhanden wäre. Dass die Expression der mRNA der oben benannten Zytokine unter der Kontrolle von RNA-BP stehen, konnte bereits für das BP HuR demonstriert werden. HuR scheint durch die positive Regulation der mRNA die Stabilität die Expression der TH<sub>2</sub>-assoziierten Zytokine zu begünstigen [52-54].

Diese dominierende TH<sub>2</sub>-Aktivität in KSRP-defizienten Mäusen kann auch mit der starken Proliferation (Abb. 43) und dem signifikant erhöhten Reifungszustand der CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp-Zellen in Verbindung gebracht werden (Abb. 41). Es konnte eine signifikant höhere Proliferation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden, während CD8<sup>+</sup> T-Zellen keine Unterschiede in der Proliferation zwischen den Genotypen aufwiesen. Auch der erhöhte Reifungszustand der CD4<sup>+</sup> T-Zellen anstatt der CD8<sup>+</sup> T-Zellen bestätigte die verstärkte Aktivität von CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

Des Weiteren muss berücksichtigt werden, dass KSRP in der posttranskriptionalen Regulation der IL-10 mRNA beteiligt sein könnte, da in der 3'UTR des IL-10 mRNA-

Moleküls viele ARE enthalten sind, die von RNA-BP als Zielstruktur genutzt werden können [308, 309]. Tatsächlich konnte der relevante Einfluss der RNA-BP TTP und AUF-1 auf die Degradation des IL-10 mRNA-Transkripts bereits beschrieben werden [310-312]. Tudor *et. al* konnte zeigen, dass TTP für den mRNA-Abbau von IL-10 verantwortlich ist. In seinen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mit p38-mitogenaktivierte Proteinkinase (MAPK) der TTP-vermittelte mRNA-Abbau des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 verhindert wurde und somit nach LPS Stimulation in BM-M $\phi$  eine erhöhte Menge an IL-10 auf mRNA- und Protein-Ebene nachgewiesen werden konnte [304]. Auf der anderen Seite zeigte die Arbeit von Sarkar *et. al*, dass ein weiteres RNA-BP AUF-1 an der 3'UTR des IL-10 mRNA-Moleküls bindet, wobei dieses RNA-BP jedoch primär für die Stabilität des genannten mRNA-Moleküls verantwortlich zu sein scheint [310-312]. Aus diesem Grund sollen genauere Untersuchungen (RNA-Immunpräzipitation (RIP)) klären, ob KSRP ebenfalls an die 3'UTR der IL-10-mRNA binden kann und deren Expression dadurch moduliert. Mit dieser Methode ist der Nachweis der Protein-RNA Interaktion möglich, d.h. ob ein Protein an die RNA bindet und wenn ja, an welche RNA Sequenz [313].

Mit Hilfe der RIP-Technik sollen weitere mRNAs wie bspw. die von IFN- $\gamma$ , präziser analysiert werden und dadurch soll geklärt werden, ob KSRP tatsächlich direkt an die 3'UTR der IFN- $\gamma$ -mRNA bindet und ob diese Interaktion möglicherweise die veränderte Expression (Abb. 44 u. Abb. 53 A) begründet. Ebenfalls könnte KSRP über einen indirekten Mechanismus wie bspw. die Regulation von miRNAs die IFN- $\gamma$  Produktion beeinflussen [292, 293]. Allerdings ist hierzu in der Literatur nicht viel bekannt. IFN- $\gamma$  spielt eine große Rolle bei der Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene wie virale Infektionen, da es neben der Aktivierung von NK Zellen und Makrophagen auch als Differenzierungssignal für T-Zellen fungiert [292]. Da insbesondere die Stabilität des IFN- $\gamma$  mRNA-Transkripts auch durch das regulatorische RNA-BP TTP negativ beeinflusst wird, ist die fehlerfreie Regulation für die IFN- $\gamma$  Expression von enormer Bedeutung. In unseren Experimenten konnte eine veränderte IFN- $\gamma$  Expression nachgewiesen werden (Abb. 44 u. Abb. 53 A), was darauf hindeutet, dass KSRP an der Regulation der IFN- $\gamma$  Expression involviert sein könnte.

Wie bereits erwähnt, soll KSRP einen negativen Einfluss auf die IL-2 Expression ausüben, in dem es die Stabilität der IL-2-mRNA verringert. Dies konnte *in vitro* mit Jurkat Extrakten und in HeLA Zellen gezeigt werden [32]. In T-Zellen wurde der Einfluss von

## Diskussion

---

KSRP noch nicht auf die IL-2 Expression untersucht. In den Proliferationsanalysen von KSRP-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen konnte im Vergleich zu Wildtyp-Zellen auch eine signifikant höhere Proliferationsrate gemessen werden (Abb. 43), was darauf schließen lassen könnte, dass durch die Abwesenheit von KSRP höhere Mengen an IL-2 entstanden sind, die wiederum das Zellwachstum beeinflussen. IL-2 ist nicht nur als Zellwachstumsfaktor für eine stärkere T-Zellproliferation verantwortlich, sondern auch in der Lage die T<sub>reg</sub>-Differenzierung zu begünstigen [247, 314]. In Kapitel 4.6.3 wurde mit Hilfe einer Zeitkinetik die Zytokinproduktion zu früheren Zeitpunkten bestimmt (Abb. 46). Anhand dieser Daten ist deutlich zu erkennen, dass IL-2 im Vergleich zu den anderen untersuchten Zytokinen, bereits nach einer 24 stündigen Stimulation in einer erhöhten Konzentration im T-Zell-Überstand nachgewiesen werden konnte (Abb. 46 G) und bereits nach einer 48 stündigen Stimulation den Sättigungsbereich erreicht. Entgegen der Erwartung, konnten hier keine höheren Mengen an IL-2 im Überstand von KSRP-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen werden. Vermutlich lässt sich das Ergebnis mit dem höheren Bedarf an IL-2 begründen, da der IL-2-Verbrauch der CD4<sup>+</sup> T-Zellen steigt, wenn diese stärker proliferieren (IL-2 wird autokrin wieder verbraucht) [246]. Um diesen Sachverhalt genauer untersuchen zu können, müsste man nach der polyklonalen Stimulation der T-Zellen durch Zugabe eines IL-2 Rezeptor Blockers den autokrinen IL-2-Verbrauch verhindern. Damit sollte man nachweisen können, ob in KSRP-defizienten Mäusen tatsächlich eine höhere Stabilität der IL-2-mRNA, aufgrund des Fehlens von KSRP vorliegt.

Ein weiteres Indiz für die TH<sub>2</sub> polarisierende Immunantwort in den KSRP KO Mäusen ist die Verschiebung der Balance zwischen mDC und pDC, denn in der Arbeit von Mathsuda *et al.* konnte gezeigt werden, dass der Shift zu pDC, der auch in KSRP-defizienten Mäusen nachgewiesen wurde (Abb. 19), zur Ausprägung des TH<sub>2</sub> dominierenden Phänotyp führt [315].



### 5.3.3 Weitere Leitzytokine

Wie bereits erläutert, lassen sich die CD4<sup>+</sup> T-Zellen abhängig von ihrem Zytokinprofil weiter in TH<sub>1</sub> und TH<sub>2</sub> aber auch TH<sub>17</sub>, TH<sub>9</sub> und T<sub>regs</sub> klassifizieren (s. Kapitel 1.3.3). Die verringerte IFN- $\gamma$  Produktion, das primär von TH<sub>1</sub> T-Zell-Subpopulationen produziert wird, und vor allem die erhöhte Produktion von IL-9, IL-10 und IL-13 (Abb. 45) legen eine erhöhte TH<sub>9</sub>-, T<sub>reg</sub>- sowie TH<sub>2</sub>-Aktivität nahe. Um experimentell die Aktivität der jeweiligen T-Zell-Subpopulationen zu bestätigen, bestünde auch die Möglichkeit, auf mRNA-Ebene (qPCR-Analysen) oder per intrazellulärer Antikörper (FACS-Analysen) die Anwesenheit von spezifischen T-Zell differenzierenden Transkriptionsfaktoren (TF) zu überprüfen, um so die bspw. erhöhte TH<sub>2</sub>-Aktivität zu bestätigen. In diesem Fall wäre der Nachweis des Transkriptionsfaktors GATA-3 notwendig. GATA-3 steuert die TH<sub>2</sub>-Differenzierung und ist der Gegenspieler von T-bet, der als TF die TH<sub>1</sub>-Differenzierung begünstigt. Somit ließe sich abhängig von der gemessenen Menge der jeweiligen Transkriptionsfaktoren die Anwesenheit der jeweiligen Subpopulation überprüfen [316].

Die Expression von CD4CD25 (auf der Zelloberfläche) und die Sezernierung von IL-10 ist vor allem für regulatorische T-Zellen charakteristisch [317]. Vor diesem Hintergrund, könnten T<sub>regs</sub> in diesem Kontext als hauptbeteiligte IL-10-Produzenten betrachtet werden. Besonders durch ihre Funktion zur Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz und somit die Unterdrückung der Inflammation, könnten diese T<sub>regs</sub> zur Erklärung der verringerten Krankheitssymptomatik in CAIA-behandelten KSRP KO Mäusen beitragen [307, 318]. Um diese Hypothese zu bestätigen, wäre in diesem Fall das erhöhte Vorkommen des TF Foxp3 in KSRP-defizienten T-Zellen erforderlich, da dieser TF notwendig ist, um zwischen naive T-Zellen und regulatorischen Effektor T-Zellen (T<sub>reg</sub>) zu differenzieren. Wie bereits erwähnt, könnte mit Hilfe der Durchflusszytometrie Foxp3 mit intrazellulären Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern markiert und quantifiziert werden.

Des Weiteren soll erwähnt werden, dass neben der deutlichen TH<sub>2</sub>-Polarisierung, die durch die sezernierten Zytokine wie IL-5, IL-10 und IL-13 charakterisiert wird, auch ein signifikant höherer Anteil an IL-9 im Überstand von stimulierten KSRP-defizienten CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Vergleich zu Kontroll-T-Zellen gemessen wurde (Abb. 40, Abb. 41, Abb. 45, Abb. 46 und Abb. 54). IL-9 wird überwiegend von der Subpopulation der TH<sub>9</sub>

## Diskussion

---

Zellen produziert, sodass eine KSRP-Inaktivierung neben dem TH<sub>2</sub>- wahrscheinlich auch einen TH<sub>9</sub>-Shift zeigt. Funktionell beeinflusst IL-9 das Wachstum der Mastzellen, vermittelt die pulmonale Eosinophilie, die Expansion von B-Zellen und erhöht die bronchiale Hyperreaktionsfähigkeit [319-322]. Diese Faktoren begünstigen und verstärken insbesondere die Entwicklung von Asthma. Des Weiteren konnten IL-9 produzierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen auch mit Autoimmunerkrankungen wie bspw. systematischer Lupus Erythematodes (SLE) oder experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE) in Verbindung gebracht werden. In diesen untersuchten Krankheitsmodellen scheint IL-9 als ein pro-inflammatorisches Zytokin zu fungieren und die Progression der Autoimmunerkrankungen zu fördern [323, 324]. Dieses pleiotrope Erscheinungsbild kann die signifikant erhöhten Level an IL-9 in KSRP-defizienten Mäusen nicht eindeutig mit der abgeschwächten Symptomatik im CAIA-Modell in Einklang bringen. Auch in diesem Fall könnte KSRP über Modulation der mRNA-Stabilität Einfluss auf die IL-9 Expression ausüben, allerdings liegen aktuell über die Regulation der post-transkriptionellen IL-9-Expression keine Ergebnisse vor.

Neben den typischen TH<sub>2</sub>-assoziierten Zytokinen wurden in KSRP-defizienten Kontroll-T-Zellen auch erhöhte Mengen an IL-17 im Überstand detektiert (Abb. 40 und Abb. 54). IL-17 ist nach heutiger Definition ausschließlich als ein pro-inflammatorisches Zytokin zu betrachten und dessen Neutralisation reduziert die Schwere der Inflammation in TH<sub>1</sub>-vermittelten Krankheitsmodellen [325-329]. Da jedoch die IL-17-Produktion mit dem Fortschreiten der Erkrankung in KSRP-defizienten CAIA Mäusen abnimmt, wird dadurch die Progression der Entzündung scheinbar nicht mehr vorangetrieben (Abb. 54). Auch in diesem Fall könnte möglicherweise der signifikant erhöhte IL-10 Anteil entscheidend zur Verringerung der Progression beitragen. Da IL-10 immunsuppressiv wirkt und insbesondere pro-inflammatorische Immunantworten negativ beeinflusst, könnte IL-10 (ähnlich wie bei IFN- $\gamma$  [302-304]) die IL-17-Produktion durch die Verringerung der TH<sub>17</sub>-Zellentwicklung steuern. Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, dass KSRP durch einen direkten oder indirekten Mechanismus die IL-17-mRNA Stabilität beeinflusst und somit durch das Fehlen für die erhöhte IL-17 Menge in KSRP-defizienten Kontroll-Zellen verantwortlich ist (Abb. 40 und Abb. 54). Chen *et al* konnte in seiner Arbeit bereits demonstrieren, dass das positiv regulierende RNA-BP HuR die mRNA-Stabilität von IL-17 erhöht [254]. Es wurde außerdem gezeigt, dass in TH<sub>17</sub> Zellen aus HuR-KO Mäusen signifikant geringere Mengen an IL-17 mRNA und Protein gegenüber Wildtyp TH<sub>17</sub> Zellen vorhanden sind.

### 5.4 KSRP scheint die TH<sub>2</sub>-Antwort zu limitieren

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verringerte Krankheitssymptomatik von KSRP-defizienten Mäusen *in vivo*, wahrscheinlich durch die reduzierte Frequenz an myeloiden CD11b<sup>+</sup> Zellen und den verstärkt polarisierenden TH<sub>2</sub>-Bias, der vor allem in hohen anti-inflammatorischen IL-10 Mengen resultiert, zu begründen ist. Die in diesem Krankheitsmodell notwendigen, beteiligten Immunzellen, weisen einerseits eine erhöhte Mortalitätsrate auf (Abb. 26), aber andererseits eine verringerte zelluläre zytotoxische T-Lymphozyten (CTL)- und TH<sub>1</sub>-Aktivität (Abb. 43, Abb. 44, Abb. 45). Die überschießende TH<sub>2</sub>-Antwort inhibiert die TH<sub>1</sub>-Entwicklung und verringert somit die Rekrutierungen und Beteiligung von involvierten Immunzellen (wie bspw. M1-Makrophagen). Gleichzeitig sind T<sub>reg</sub> Zellen in der Lage, die Expression von pro-inflammatorischen Mediatoren sowie die Progression inflammatorischer Effektorzellen zu supprimieren und fördern unter anderem in Kombination mit IL-5 und IL-10 die Entwicklung von M2-Makrophagen, was ebenfalls zur Verringerung der Pathogenese führen könnte [77, 78].

Die KSRP-defizienten Mäuse scheinen durch den resultierenden TH<sub>2</sub>-Phänotyp in dem CAIA Modell besonders gegen TH<sub>1</sub>-vermittelte Entzündungen geschützt zu sein.

Daher soll mit dem CIA-Modell (siehe Kapitel 1.6.3.1), bei dem die Beteiligung der adaptiven Lymphozyten sowie die dominierende TH<sub>1</sub>-Antwort für die Entwicklung und die Schwere der Erkrankung notwendig ist, der bereits dargestellte polarisierende TH<sub>2</sub>-Phänotyp im KSRP KO Mäusen kontrolliert werden [106, 123, 167, 330].

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurden die C57BL/6 KSRP-defizienten Mäuse mit dem DBA/1 Stamm verpaart, um über Rückkreuzung bis zur zehnten Generation das inaktivierte KSRP-Gen auf DBA/1 Hintergrund zu generieren (Kapitel 3.4.1). Damit soll die Suszeptibilität für das klassische und am besten etablierte Tiermodell CIA gewährleistet werden. Im Vorversuch wurden dazu zur Induktion der CIA aus der Rückkreuzung des DBA/1xC57BL/6<sup>+/-</sup> Stammes die F8 Generation verwendet. In diesem Vorversuch sollte in erste Linie die Induzierbarkeit der CIA für DBA/1xC57BL/6-Mäuse geprüft werden, weshalb der Arthritis-Index phänotypisch analysiert wurde (Kapitel 3.4.5). Hierbei konnte beobachtet werden, dass bei DBA/KSRP-defizienten Mäusen

## Diskussion

---

im Vergleich zu WT Mäusen bereits in der achten Generation eine signifikant verringerte Krankheitssymptomatik vorlag (Abb. 75). Dieser vorläufige Befund bestätigt das für uns unerwartete Ergebnis der verringerten Krankheitssymptomatik im CAIA-Modell. Weiterhin könnte man mit diesen Erkenntnissen schlussfolgern, dass das RNA-BP KSRP nicht nur Einfluss auf die Immunzellen des angeborenen Immunsystems (CAIA-Modell) nimmt, sondern auch für die Regulation der adaptiven Komponenten im Immunsystem (CIA-Modell) verantwortlich sein könnte.

Detailliertere *in vivo* Untersuchungen zur Charakterisierung der Immunzellen der DBA/KSRP-defizienten Mäusen sollten mit der F10 Generation erfolgen.

Eine weitere Möglichkeit um zu überprüfen, ob KSRP-defiziente Mäuse, begründet durch den TH<sub>2</sub>-Shift, weniger Entzündungen in einem TH<sub>1</sub>-dominierendem Inflamationsmodell vorweisen, wäre die Darstellung eines TH<sub>2</sub>-Inflamationsmodells (Allergie bspw. Asthma), da man hierbei davon ausgehen kann, dass eine verstärkte Reaktion beziehungsweise Symptomatik zu beobachten wäre. In diesem Fall wäre die Erklärung für weniger Entzündungen in der CAIA/CIA, zugleich die Antwort auf die Frage, warum es mehr Inflammation im Allergiemodell gibt.

### 5.5 Einfluss von KSRP-KO auf den Krankheitsverlauf von Asthma bronchiale

Für die Induktion einer TH<sub>2</sub>-dominierenden Inflammation in KSRP-defizienten Mäusen wurde das Asthmodell gewählt (Kapitel 3.4.6). Da die Verengung der Atemwege mit der Atemwegshyperreaktivität korreliert, wurde die funktionelle Einschränkung in der Lunge mit dem Ganzkörperplethysmographen analysiert (Kapitel 3.4.6.1.1) [251, 252].

Die Ergebnisse zeigen in KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen einen deutlich erhöhten Atemwegswiderstand sowohl ohne Stimulus (einen moderat erhöhten PenH-Wert) als auch nach Zugabe der höchsten Methacholin-Dosis einen signifikant erhöhten Unterschied zu anderen Versuchsgruppen (Abb. 55). Dieses Ergebnis spiegelt den Schweregrad der Erkrankung wieder und bestätigt den erwarteten

Effekt in den KSRP-defizienten Tieren, wenn diese wirklich eine TH<sub>2</sub>-Polarisierung vorweisen. Damit konnte die funktionelle Einschränkung der Lungenfunktion, die unter anderem durch die Aktivität der TH<sub>2</sub>-Zellen vorangetrieben wird [149, 331], in KSRP-defizienten Mäusen demonstriert werden.

Darüber hinaus gibt die Betrachtung der zellulären Zusammensetzung der bronchoalveoläre Lavage (BAL) Aufschluss über die Frequenz der analysierten Immunzellen in der Lunge (Kapitel 4.8.2). Unter basalen Bedingungen wurden zwar tendenziell weniger Granulozyten in KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zur Kontroll-Tieren nachgewiesen, jedoch konnte dieser Trend in OVA-behandelten Mäusen nicht weiter bestätigt werden (Abb. 56). OVA-behandelte KSRP-defiziente Mäuse zeigten gegenüber den Wildtyp-Tieren eine signifikant höhere Akkumulation von neutrophilen Granulozyten in der BAL. Dieses Ergebnis deckt sich soweit auch mit den Daten aus dem Migrations-Assay (Abb. 29), bei dem gezeigt werden konnte, dass neutrophile Granulozyten aus KSRP-defizienten Mäusen eine signifikant höhere Motilität in Vergleich zu Kontroll-Zellen aufwiesen. Dieser Zelltyp ist neben den eosinophilen Granulozyten maßgeblich an der asthmatischen Entzündungsreaktion beteiligt [332] und wird hauptsächlich von TH<sub>2</sub>- und TH<sub>17</sub>-Zellen gesteuert [333-335]. Das Asthmodell bestätigt die vorherigen *in vitro* Analysen, dass die T-Zellen in Abwesenheit von KSRP zu einem TH<sub>2</sub> Phänotyp polarisieren. Die daraus resultierende Schwere der Entzündung konnte auch mit Hilfe der H&E gefärbten Lungenschnitten nachgewiesen werden (Kapitel 4.8.3). In den Lungen von OVA-behandelten KSRP-defizienten Tieren, konnte eine deutlich stärkere dunkel bläuliche Färbung (Zellkern-Färbung) um die Bronchien herum beobachtet werden (Abb. 57). Diese Gegebenheit lässt sich durch eine erhöhte Zellfiltration (Migration) erklären. Zusätzlich scheint das Gewebe stärker geschädigt zu sein, was auf den Entzündungsgrad und damit auf die Schwere der Asthmaerkrankung zurückzuführen ist [138]. Als ein weiteres charakteristisches Merkmal für den Schweregrad der Entzündung in der Lunge, ist die Anzahl (Hyperplasie) von becherförmigen Drüsen (Becherzellen), die von Bedeutung für die Mukussekretion sind [336]. Während der Mukus (Schleim) die Epitheloberfläche in den Atemwegen vor Verletzungen schützt und das Entfernen von bakteriellen und zellulären Ablagerungen aus der Lunge unterstützt, erschwert die Übersekretion des Schleims die Atemfunktion durch die Verengung des Atemwegslumen. Mit Hilfe der histologischen PAS-Färbung des Lungengewebes konnten die mukusproduzierenden Becherzellen purpurviolett dargestellt werden (Kapitel 3.4.6.1.5 u. 3.4.6.1.6). Diese Ergebnisse demonstrieren deutlich,

## Diskussion

---

dass in den Lungen der Kontroll-Gruppen der KSRP-defizienten Tiere als auch der Wildtyp-Mäusen keine Becherzellen vorhanden waren (Abb. 58). Die OVA-behandelten Tiere zeigten dagegen eindeutig die Anwesenheit dieser mukusproduzierenden Becherzellen. Hierbei ergab sowohl die qualitative als auch die quantitative Auswertung eine tendenziell höhere Frequenz an Becherzellen in den Lungen der KSRP-defizienten Mäuse (Abb. 59). Somit bekräftigt auch dieses Ergebnis den TH<sub>2</sub>-polarisierenden Effekt in den KSRP-defizienten Mäusen, denn IL-4, IL-5, IL-9 sowie insbesondere der Einfluss von IL-13, erhöhen die Beteiligung von sezernierenden Zellen [337, 338]. Auch der mögliche TH<sub>9</sub>-Shift in den KSRP KO Mäusen, der durch die signifikant erhöhten IL-9 Level angedeutet wird, könnte ein essentieller Initiator bei der Entwicklung von Asthma sein. Dies lässt sich damit erklären, dass die durch IL-9 einhergehende pulmonale Eosinophile sowie die Expansion von B-Zellen die bronchiale Hyperreaktionsfähigkeit entscheidend modulieren [319-322].

Übereinstimmend damit wurde in der Literatur auch der Einfluss von IFN- $\gamma$  auf asthmatischen Reaktionen beschrieben. So wurden einerseits bei Asthmatikern signifikant geringere IFN- $\gamma$  Mengen nachgewiesen. Andererseits bewirkte eine Zugabe von IFN- $\gamma$  in Tierexperimenten eine Reduzierung der IL-4 und IL-5 Mengen einhergehend mit dem signifikanten Rückgang an Granulozyten [339-341].

Zusammenfassend bestätigen die Untersuchungen im Asthmamodell die erwartet stärkere Entzündung, die vermutlich durch den dominierenden TH<sub>2</sub>-Shift in Mäusen mit inaktivierten KSRP-Gen hervorgerufen wird. Damit liegt die Vermutung nahe, dass KSRP zelltypspezifisch an unterschiedlichen posttranskriptionalen Regulationen beteiligt ist. Im Hinblick auf die Immunzellfunktionen und den Einfluss von KSRP in der Pathogenese von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen, wird deutlich, wie komplex und vielseitig die Beteiligung des regulatorischen RNA-BP ist. Neben modulierenden Effekten auf die Migration, Differenzierung sowie auf den Reifungszustand von Immunzellen, werden möglicherweise durch RNA-BP die Expression von löslichen Mediatoren und dadurch vollständige Immunantworten gesteuert. Dies geschieht sowohl durch stabilisierende als auch durch destabilisierende Effekte auf die mRNA von Mediatoren. In *ex vivo* Untersuchungen wurde der destabilisierende Effekt von KSRP für pro-inflammatorische Zytokine beschrieben. Entgegen der Erwartung, wurde im Rahmen dieser Dissertation jedoch vor allem der Einfluss auf T-Zellen durch die Produktion von IL-10, IL-13, IL-9 und IFN- $\gamma$  nachgewiesen. Ob KSRP jedoch direkt oder

nur indirekt an der posttranskriptionalen Regulation beteiligt ist, soll in weiteren spezifischeren Experimenten (Bsp. RIP-Analysen) geklärt werden.

Abschließend soll im folgenden Kapitel eine Zusammenfassung der vorliegenden Arbeit dargelegt werden.

### 6. Zusammenfassung

KSRP „*KH-type splicing regulatory protein*“ ist ein Nukleinsäure-bindendes multifunktionelles Protein, das vor allem die Stabilität von diversen immunrelevanten mRNAs reguliert. Da KSRP in Immunzellen des angeborenen sowie adaptiven Immunsystems exprimiert wird, sollte dessen Beteiligung an den Immunzellfunktionen und der Entwicklung von chronisch-inflammatorischen Erkrankungen im Gesamtorganismus charakterisiert werden.

Die Immunzell-Charakterisierung bzw. -Phänotypisierung erfolgte mit unterschiedlichen Immunzellpopulationen aus Mäusen mit inaktivierten KSRP-Gen mittels FACS-Analysen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die Immunzellfrequenz von myeloiden CD11b<sup>+</sup> Granulozyten vor allem in dem periphereren Blut von KSRP-defizienten Mäusen gegenüber den Kontroll-Tieren deutlich verringert vorlag. Weiterhin zeigten polyklonal stimulierte KSRP-defiziente CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine erhöhte CD25-Expression sowie eine verstärkte Proliferation im Vergleich zu WT T-Zellen. Des Weiteren wurde im Zellüberstand von polyklonal stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen signifikant erhöhte Level an IL-9, IL-10 und IL-13 nachgewiesen, während polyklonal stimulierte KSRP-defiziente CD8<sup>+</sup> T-Zellen deutlich geringere Level an IFN- $\gamma$  im Überstand im Vergleich zu Kontroll-Zellen zeigten. Es muss allerdings noch geklärt werden, ob die veränderte Expression der Zytokine auf einen direkten oder indirekten Einfluss von KSRP zurückzuführen sind.

Um die Relevanz von KSRP für immunologische Erkrankungen zu untersuchen, wurde die Kollagen-Antikörper-induzierte Arthritis (CAIA) als etabliertes Mausmodell für chronisch-inflammatorische Erkrankungen gewählt. In CAIA sind überwiegend Neutrophile und Makrophagen als Effektorzellen an der Pathogenese beteiligt. In dem autoimmunen Mausmodell entwickelten KSRP-defiziente Mäuse im Vergleich zu den WT Mäusen eine deutlich geringere Krankheitssymptomatik. Detaillierte Untersuchungen im CAIA-Modell zeigten eine geringere Infiltration der Pfoten durch Immunzellen einhergehend mit einer verringerten Inflammation in den Pfoten von KSRP-defizienten Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen. Restimulierte T-Zellen aus CAIA-behandelten Mäusen zeigten im Überstand von KSRP-defizienten T-Zellen deutlich erhöhte Mengen an anti-inflammatorischen IL-10 gegenüber WT Zellen.



In Gegensatz zum TH<sub>1</sub>-polarisierenden Inflammationsmodell wurde Asthma bronchiale als TH<sub>2</sub>-dominierendes Allergiemodell gewählt, um die bereits beobachteten Unterschiede der Immunzellfunktion zwischen den Genotypen zu untermauern. In diesem Sinne wurden in OVA-behandelten KSRP-defizienten Mäusen funktionelle Einschränkungen der Lunge, durch einen erhöhten Atemwegswiderstand im Vergleich zu WT Mäusen beobachtet. Mit patho-histologischen Schnitten der Lunge wurde zusätzlich eine stärkere Entzündung, durch eine gesteigerte Zellinfiltration, sowie einer Akkumulation von neutrophilen Granulozyten und mukusproduzierenden Becherzellen in KSRP KO Mäusen im Vergleich zu WT Mäusen nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass KSRP-defiziente Mäuse wahrscheinlich aufgrund ihres TH<sub>2</sub>-Phänotyps im Asthmodell eine stärkere Entzündung hervorrufen, gleichzeitig jedoch in dem CAIA Modell geschützter gegen TH<sub>1</sub>-vermittelte Entzündungen zu sein scheinen. Somit scheint KSRP im Umkehrschluss für die Inhibierung der TH<sub>2</sub>-Antwort verantwortlich zu sein.

### 7. Abstract

The KSRP “KH-type splicing regulatory protein” is a multifunctional nucleic acid-binding protein that seems to regulate the mRNA-stability of many immune-relevant proteins. KSRP is expressed in cells of the innate and adaptive immune system, therefore we wanted to analyze the influence of KSRP on the function of immune cells and on the development of chronic-inflammatory diseases *in vivo*.

We characterized diverse immune cell populations from mice with inactivated KSRP gene by flow cytometry. KSRP-deficient mice showed lower frequencies of myeloid CD11b<sup>+</sup> cells compared to WT cells, primary in the peripheral blood. Isolated and polyclonally stimulated KSRP-deficient CD4<sup>+</sup> T cells showed a stronger proliferation and a higher CD25 expression in comparison to WT T cells. Additionally, polyclonally stimulated KSRP deficient CD4<sup>+</sup> T cells showed increased levels of IL-9, IL-10 and IL-13 in their supernatants compared to WT cells. Supernatants of polyclonally stimulated KSRP-deficient CD8<sup>+</sup> T cells contained lower levels of interferon- $\gamma$  compared to supernatants from WT CD8<sup>+</sup> T cells. There is still a need for clarification, whether the aforementioned changed expression of cytokine is a result of either direct or indirect influence of KSRP.

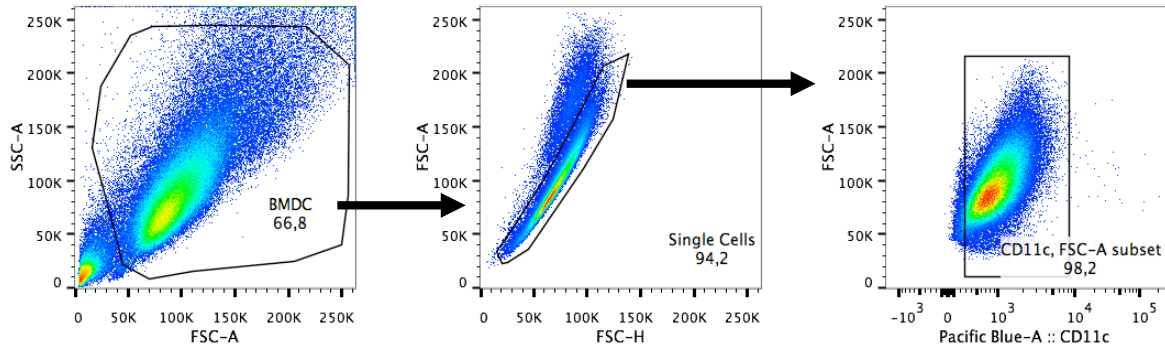
To better understand the impact of KSRP gene inactivation in the pathogenesis of inflammatory diseases, we used collagen antibody-induced arthritis (CAIA) as an approved mouse model for autoimmune disease. In CAIA, pathogenesis is dependent on immune cells like neutrophils and macrophages. In the inflammatory diseases, we observed a much lower arthritis induction in KSRP-deficient mice in comparison to WT mice. Furthermore, we observed less infiltration of immune cells in combination with a decreased expression of pro-inflammatory cytokines in the inflamed joint of KSRP-deficient animals compared to WT animals. Also, in the supernatants of restimulated KSRP-deficient T cells from CAIA treated mice, we measured increased levels of the anti-inflammatory cytokine IL-10.

Analysis of KSRP in a predominantly TH<sub>2</sub>-polarized allergy mouse model was performed to underline the results from the TH<sub>1</sub>-dominated CAIA/CIA inflammatory disease model.

OVA treated KSRP-deficient mice showed functional restrictions of the lung paired with increased airway resistance in comparison to WT mice. Patho-histological sections demonstrated stronger inflammation, caused by a higher cell infiltration as well as a higher accumulation of neutrophils and mucus producing goblet cells in KO mice compared to WT mice.

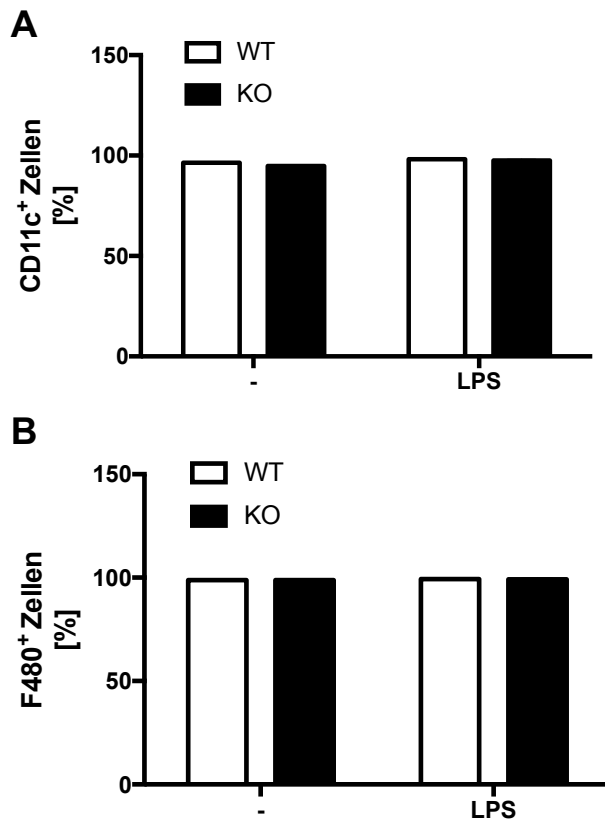
In conclusion, KSRP-deficient mice are susceptible for TH<sub>2</sub>-associated allergy diseases like asthma, while being simultaneously more protected against the induction of TH<sub>1</sub>-mediated inflammatory arthritis. Thus, we assume that KSRP mediated the inhibition of the TH<sub>2</sub> immune response.

8. Anhang



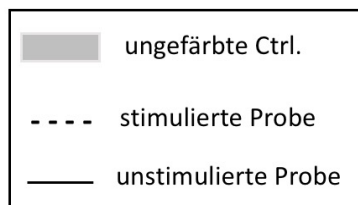
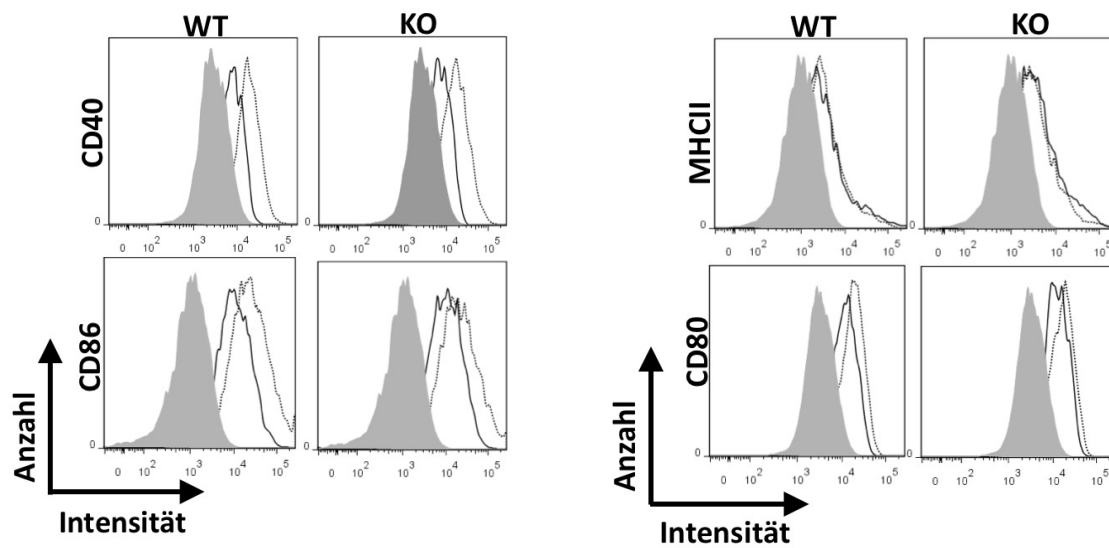
**Abb. 60: Gating-Strategie für durchflusszytometrische Analysen von BM-DC anhand einer Beispielfärbung**

Zu sehen ist eine repräsentative Darstellung der Gating-Strategie einer WT Maus für die Identifizierung von BM-DC. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo. Zuerst wurden die gesamten BMDC eingegrenzt, um Zellen vom Zellschrott zu separieren. Die Zellen wurden nach den angegebenen Achsen-Parametern aufgetrennt. Die eingegrenzte Population mit dem Pfeil erscheint jeweils im folgenden Diagramm. Im zweiten Schritt wurden die Dubletten „ausgegatet“, damit es nicht zur Verfälschung der Daten kommt. Im dritten Schritt wurden die Pacific-Blue gekoppelten CD11c<sup>+</sup>Zellen (DC Zell-Oberflächenmarker) gegen den FSC-A aufgetrennt und die zusehende Population zur Darstellung des prozentualen Anteils eingegrenzt.



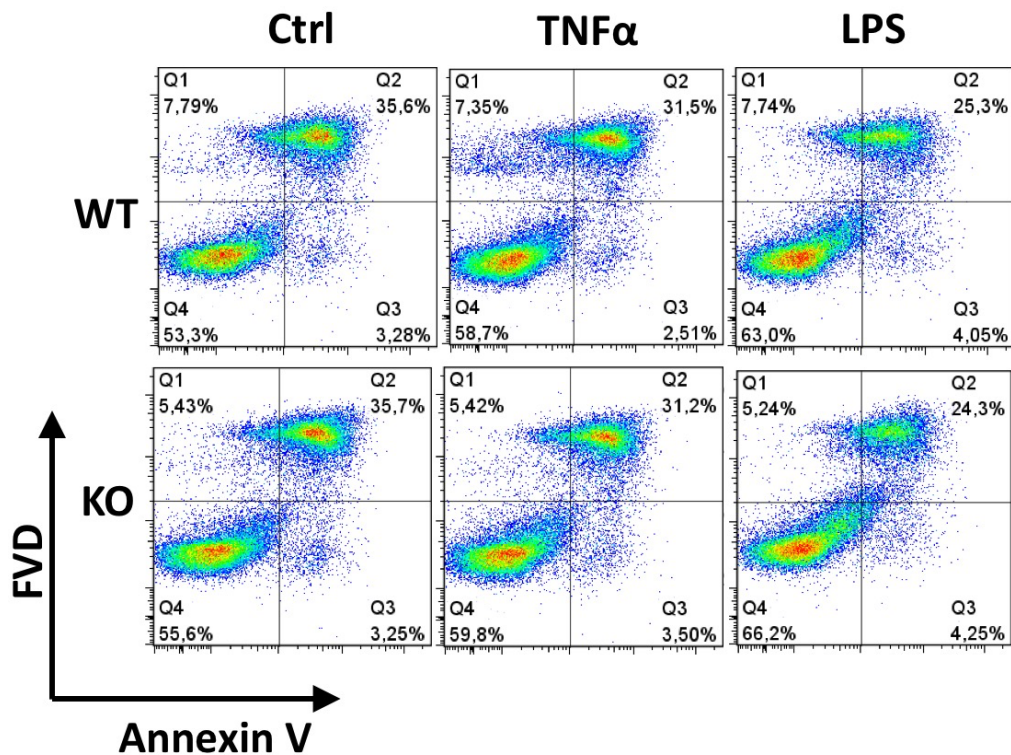
**Abb. 61: Zellfrequenz-Analysen aus Knochenmark differenziierten BM-DC und BM-Mφ in KO und WT Mäusen**

In Teilabbildung A ist der prozentuale Anteil der CD11c<sup>+</sup> Zellen (BM-DC) ohne Stimulus (-) und nach 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS dargestellt. Teilabbildung B zeigt den prozentualen Anteil der F480<sup>+</sup> Zellen (Makrophagen) ohne Stimulus (-) und nach 24-stündiger Inkubation mit 100 ng/ml LPS. Die Expression der Oberflächenmarker wurden mittels Durchflusszytometrie analysiert. Die Immunzell-Frequenzen aus KSRP<sup>+/-</sup> (WT) Mäusen werden als weiße Balken abgebildet, während schwarze Balken den KSRP<sup>-/-</sup> (KO) Mäusen zuzuordnen sind. Die Daten repräsentieren den Mittelwert als % + SEM von 3-4 individuellen Mäusen pro Gruppe und Genotyp.



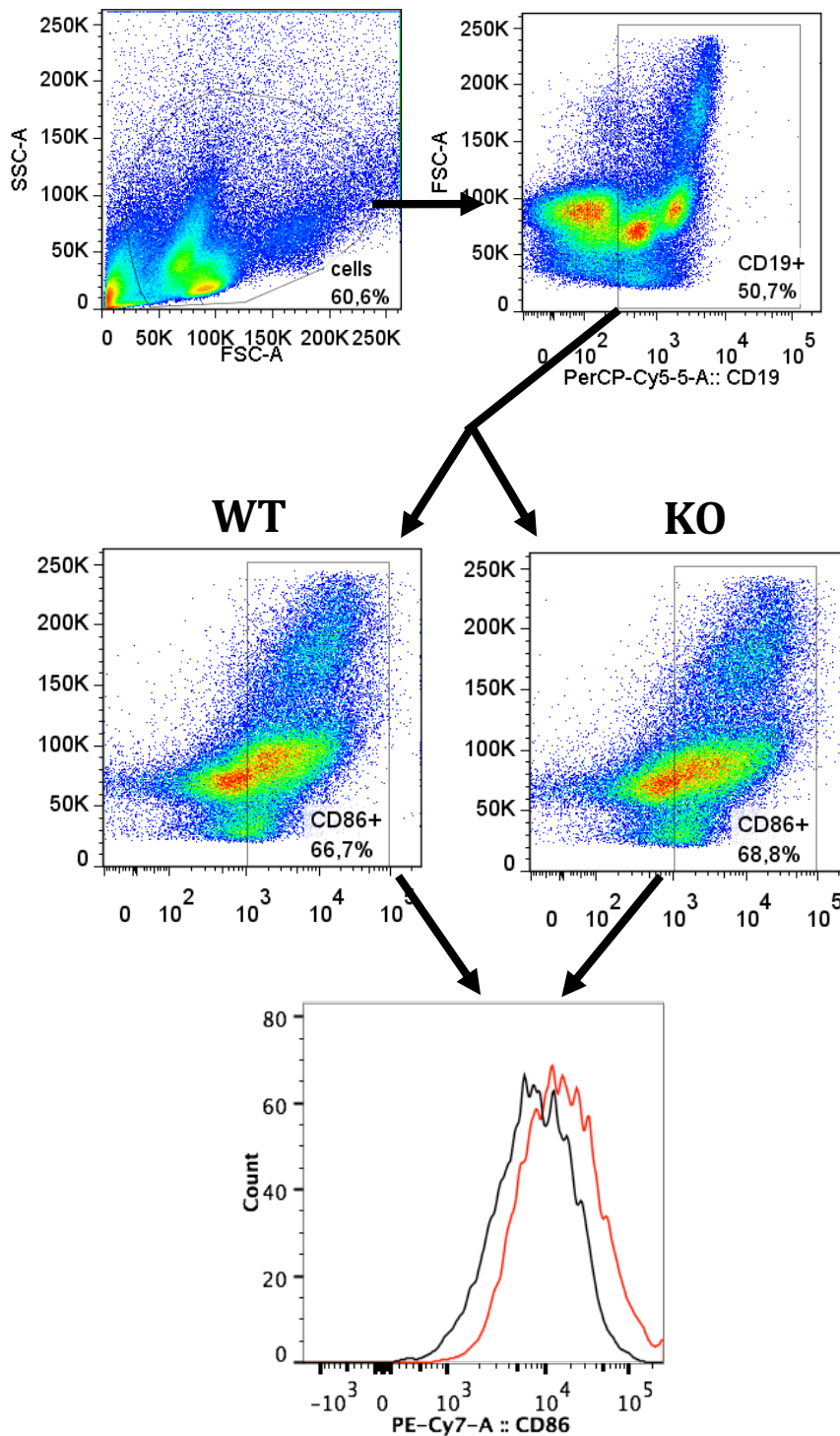
**Abb. 62: Expression von Aktivierungsmarkern auf BM-M $\phi$  aus KSRP-defizienten und WT Mäusen**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten eines repräsentativen Durchgangs von jeweils drei durchgeführten Messungen. Die Histogramme zeigen Fluoreszenzintensitäten von den verwendeten Aktivierungsmarkern CD40, CD86, CD80 und MHCII. Die grau ausgefüllte Kurve stellt die ungefärbte Kontrolle (Ctrl) dar, während die gestrichelte Linie, die stimulierte und die durchgängige schwarze Linie, die unstimulierte Probe darstellt.



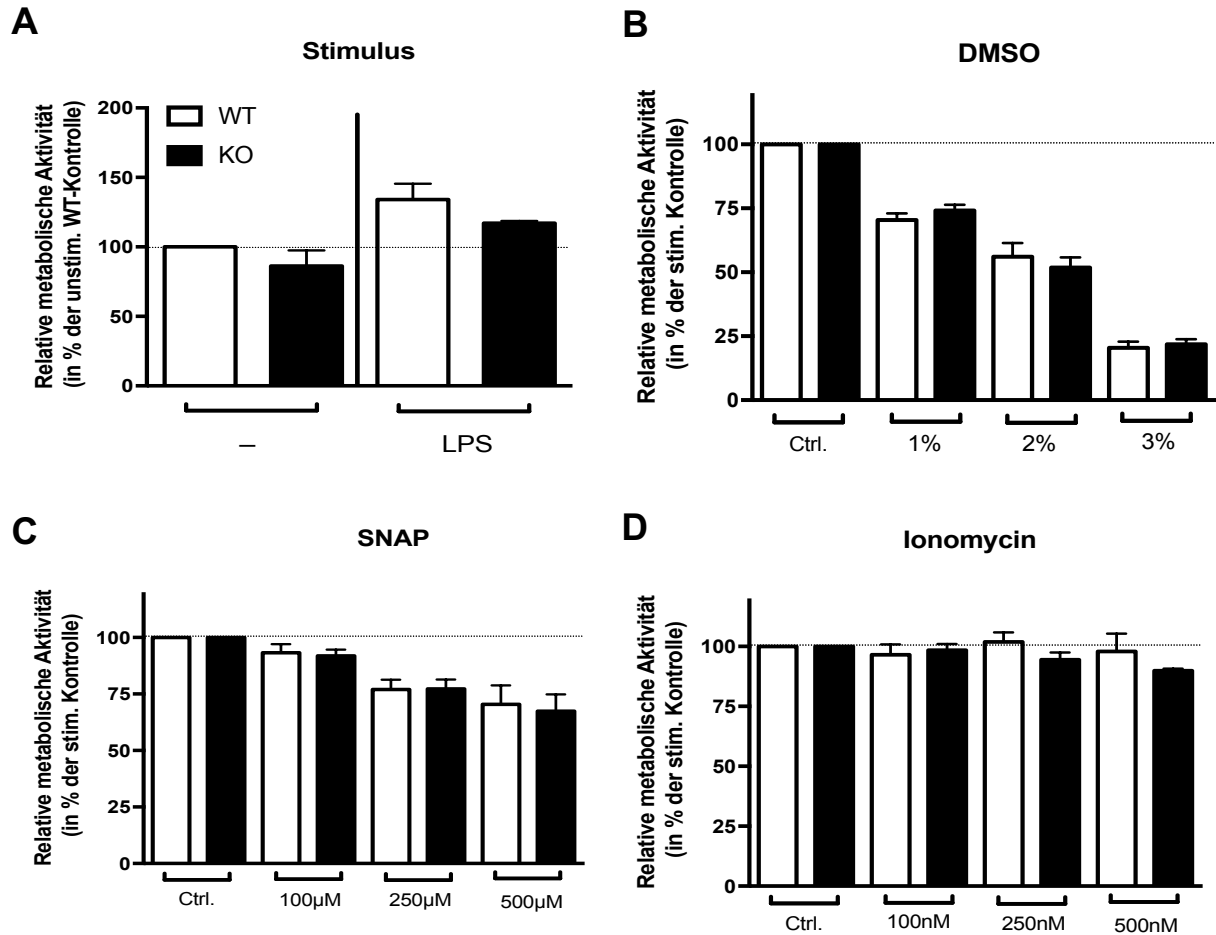
**Abb. 63: Repräsentative FACS-Analysen der Viabilität von Milzzellen**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten von Milzzellen aus WT und KO Mäusen unter basalen Bedingungen (Ctrl) und nach 24-stündiger Behandlung mit (20ng/ml) TNF- $\alpha$  und (100ng/ml) LPS. Die Detektion von FVD (fixable viability dye), sowie von Annexin V erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei sind die lebenden Zellen im ersten Quadranten (Q4) dargestellt. Zu sehen ist ein repräsentativer Durchgang von drei durchgeführten Messungen. Die Auswertung dieser Daten erfolgte mit FlowJo.



**Abb. 64: Gating-Strategie für durchflusszytometrische-Analysen mit Beispielfärbung zur Expression des kostimulatorischen Moleküls CD86 auf Milzzellen**

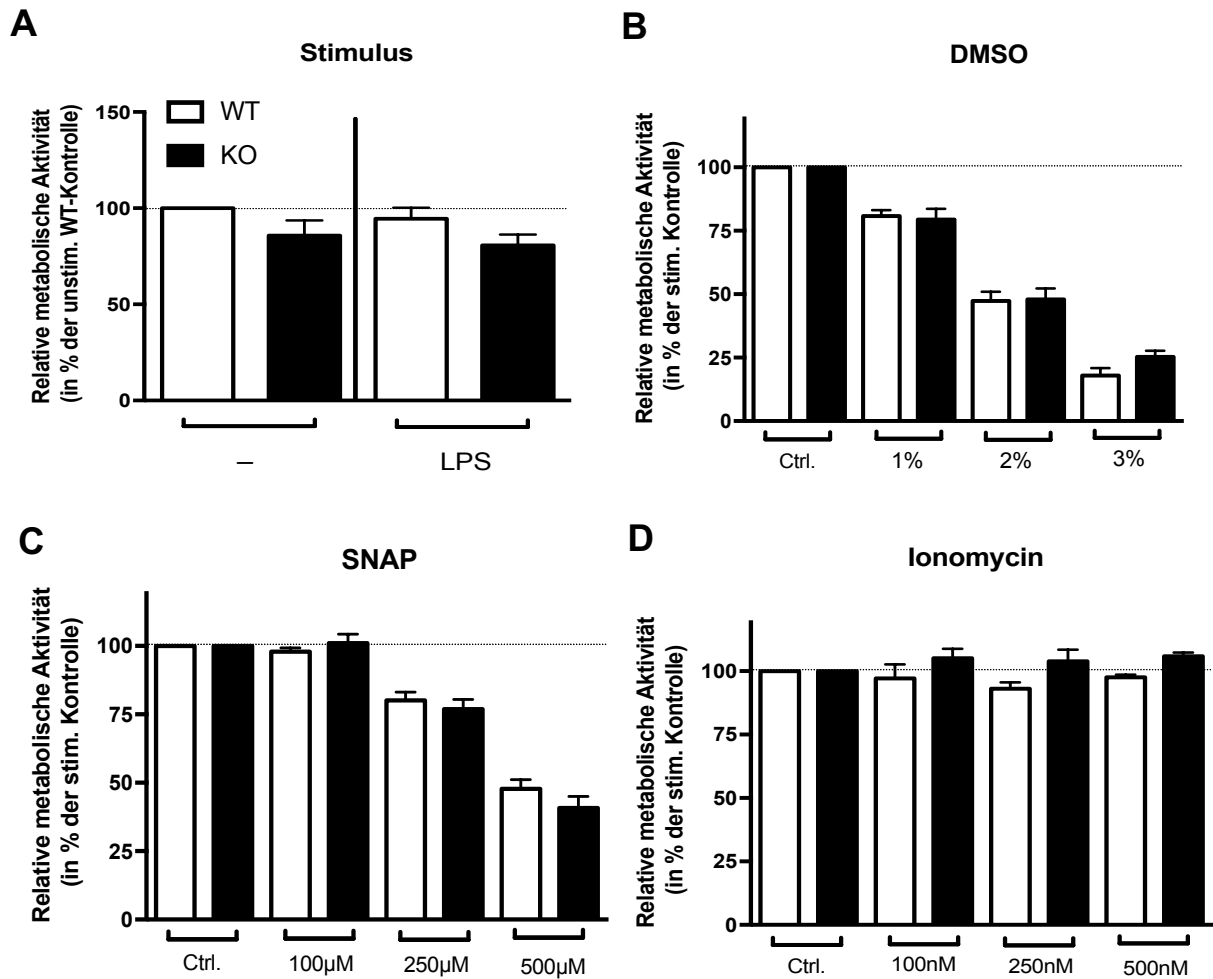
Zu sehen ist eine repräsentative Darstellung der Gating-Strategie von einer Wildtyp sowie einer KO-Maus. Zuerst wurden die gesamten Milzzellen eingegrenzt, um Zellen vom Zellschrott zu separieren. Die Zellen wurden nach den angegebenen Achsen-Parametern aufgetrennt. Die eingegrenzte Population mit dem Pfeil erscheint jeweils im folgenden Diagramm. Im nächsten Schritt wurden die PerCP-Cy5.5 gekoppelten CD19<sup>+</sup> Zellen (B-Zell-Oberflächenmarker) gegen den FSC-A dargestellt und die CD19<sup>+</sup> Population entsprechend eingegrenzt. Von diesen CD19<sup>+</sup> Population wurden alle Zellen die den Aktivierungsmarker CD86<sup>+</sup> exprimieren ebenfalls als Population eingegrenzt und von WT und KO Mäusen im Histogramm dargestellt, umso das Expressionsniveau und die Intensität zu vergleichen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit FlowJo.



**Abb. 65: Metabolische Aktivitäts-Analysen von Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen aus WT und KO Mäusen**

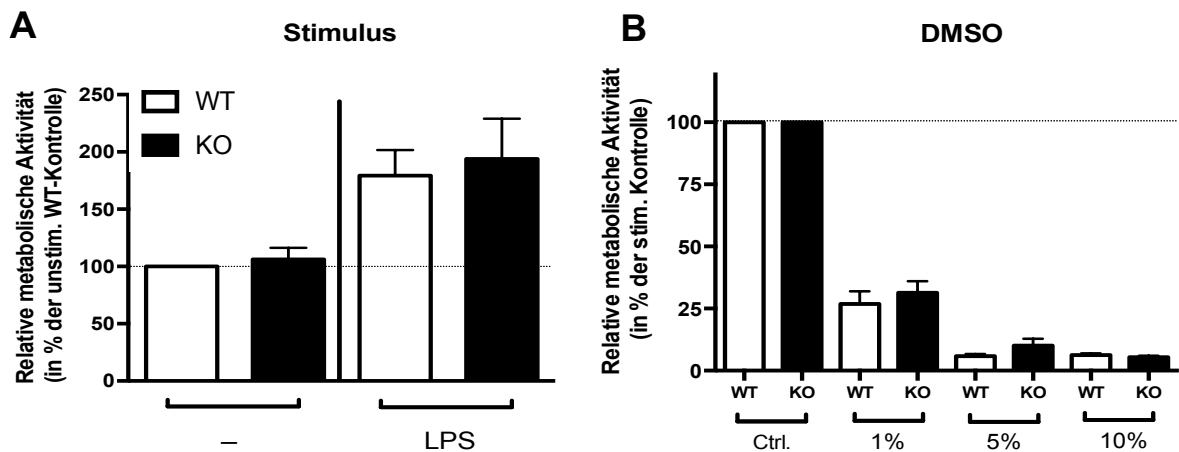
Dargestellt ist die metabolische Aktivität von unbehandelten (-) Knochenmark-abgeleiteten Vorläuferzellen und nach 24-stündiger Behandlung mit LPS (A), mit verschiedenen Konzentrationen an DMSO (B), SNAP (C) und Ionomycin (D). Bei unbehandelten WT Vorläuferzellen ist die metabolische Aktivität als 100% definiert und dient damit als Kontrollwert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet + Standardfehler von jeweils 3 untersuchten Mäusen bestimmt.





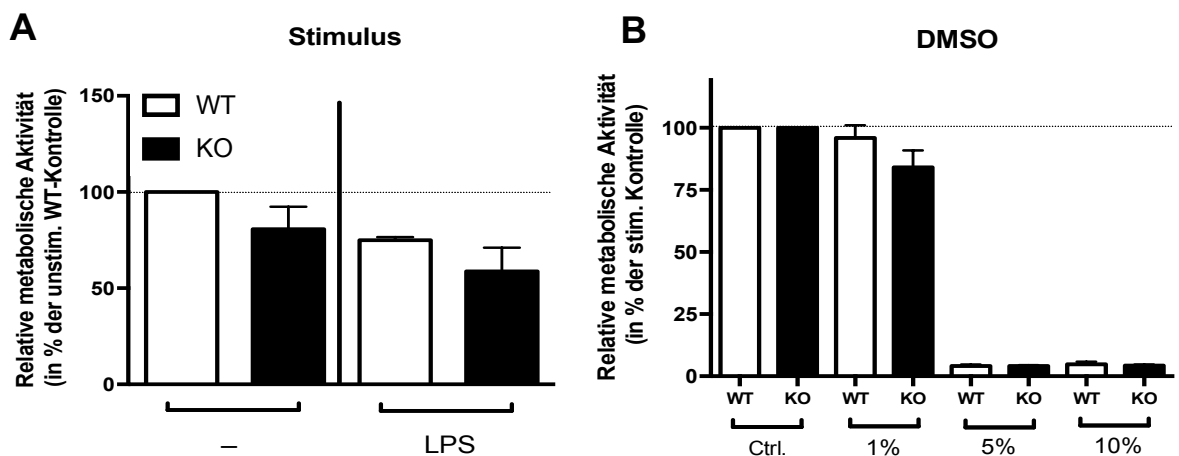
**Abb. 66: Metabolische Aktivitäts-Analysen von Milzzellen aus WT und KO Mäusen**

Dargestellt ist die metabolische Aktivität von unbehandelten (-) Milzzellen und nach 24-stündiger Behandlung mit LPS (A), mit verschiedenen Konzentrationen an DMSO (B), SNAP (C) und Ionomycin (D). Bei unbehandelten WT Milzzellen ist die metabolische Aktivität als 100% definiert und dient damit als Kontrollwert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet + Standardfehler von jeweils 3 untersuchten Mäusen bestimmt.



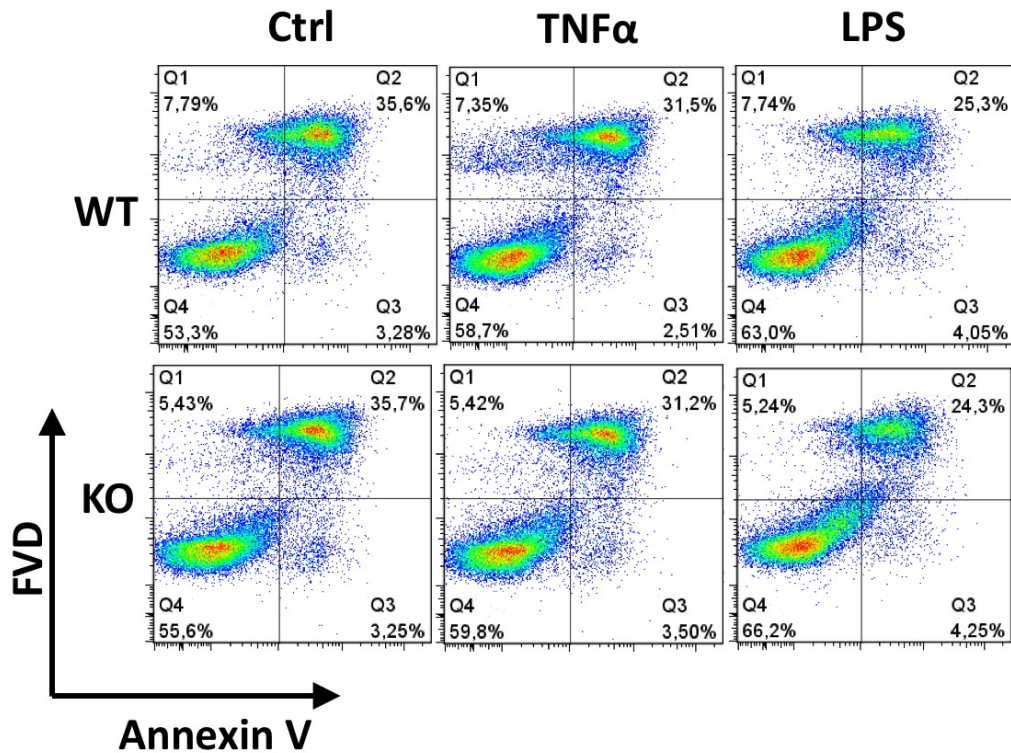
**Abb. 67: Metabolische Aktivitäts-Analysen von BM-Mφ aus WT und KO Mäusen**

Dargestellt ist die metabolische Aktivität von unbehandelten (-) und nach 24-stündiger behandelte BM-Mφ mit LPS (A). In Teilabb. B ist die metabolische Aktivität von BM-Mφ unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an DMSO dargestellt. Bei unbehandelten WT BM-Mφ ist die metabolische Aktivität als 100% definiert und dient damit als Kontrollwert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet + Standardfehler von jeweils 3 untersuchten Mäusen pro Genotyp bestimmt.



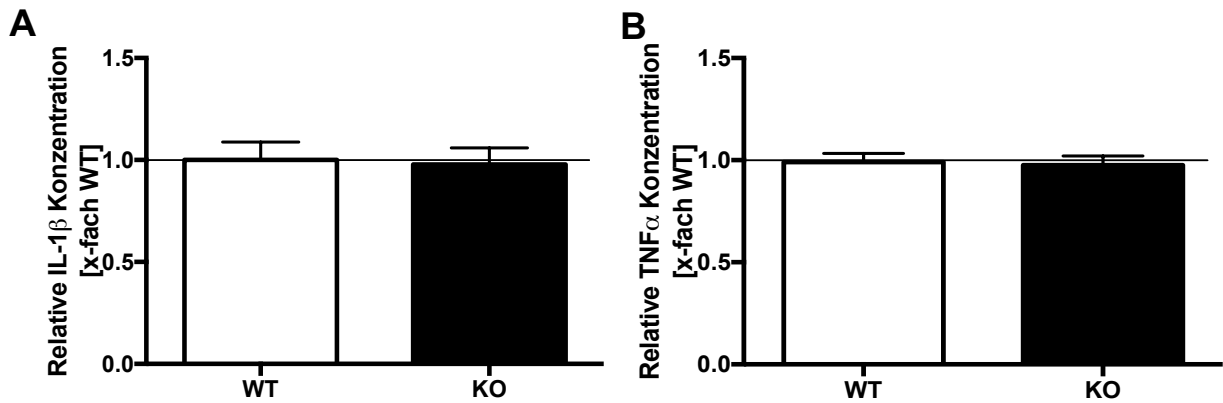
**Abb. 68: Metabolische Aktivitäts-Analysen von BM-DC aus WT und KO Mäusen**

Dargestellt ist die metabolische Aktivität von unbehandelten (-) und nach 24-stündiger behandelte BM-DC mit LPS (A). In Teilabb. B ist die metabolische Aktivität von BM-DC unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen an DMSO dargestellt. Bei unbehandelten WT BM-DC ist die metabolische Aktivität als 100% definiert und dient damit als Kontrollwert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet + Standardfehler von jeweils 3 durchgeführten Mäusen pro Genotyp bestimmt.



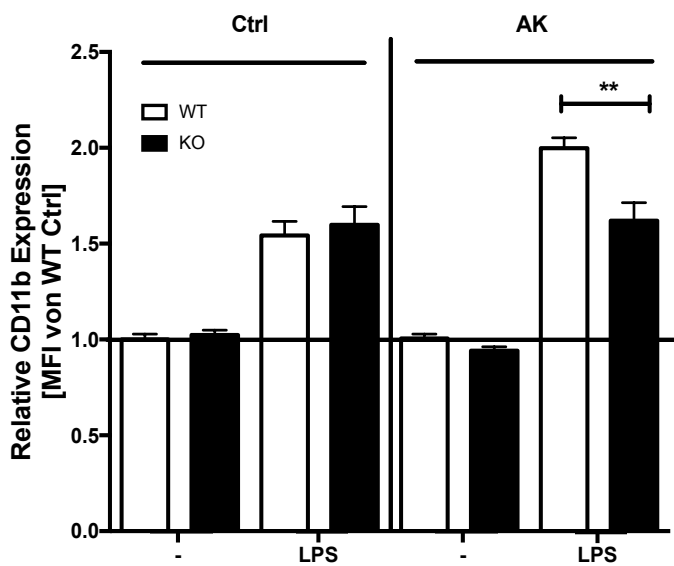
**Abb. 69: Repräsentative FACS-Analysen der Viabilität von Milzzellen**

Dargestellt sind primäre FACS-Daten von Milzzellen aus WT und KO Mäusen unter basalen Bedingungen (Ctrl) und nach 24-stündiger Behandlung mit (20ng/ml) TNF- $\alpha$  und (100ng/ml) LPS. Die Detektion von FVD (fixable viability dye), sowie von Annexin V erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Hierbei sind die lebenden Zellen im ersten Quadranten (Q4) dargestellt. Zu sehen ist ein repräsentativer Durchgang von drei durchgeführten Messungen. Die Auswertung dieser Daten erfolgte mit FlowJo.



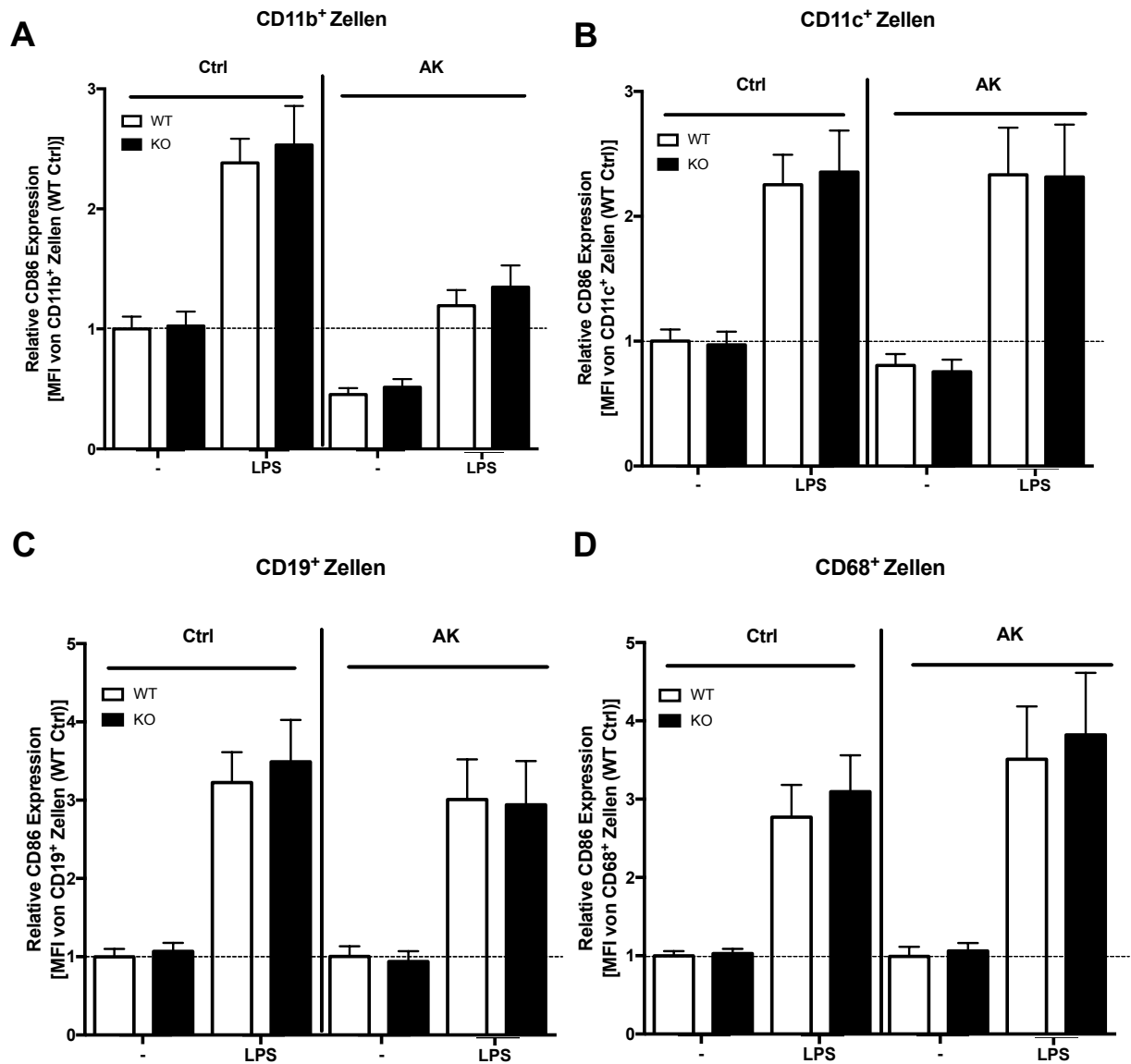
**Abb. 70: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen aus KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Konzentration von IL-1 $\beta$  (A) und TNF- $\alpha$  (B) aus dem Überstand polykonal stimulierter T-Zellen. Nach Aufreinigung durch Nylonwolle, wurden die Zellen für 90 Std. mit anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) und anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) polykonal stimuliert. Die Zytokinmessung wurde mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience durchgeführt. Die Daten wurden auf die jeweilige Zytokinkonzentration in WT Mäusen normiert und repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 15-25 untersuchten Mäusen pro Genotyp.



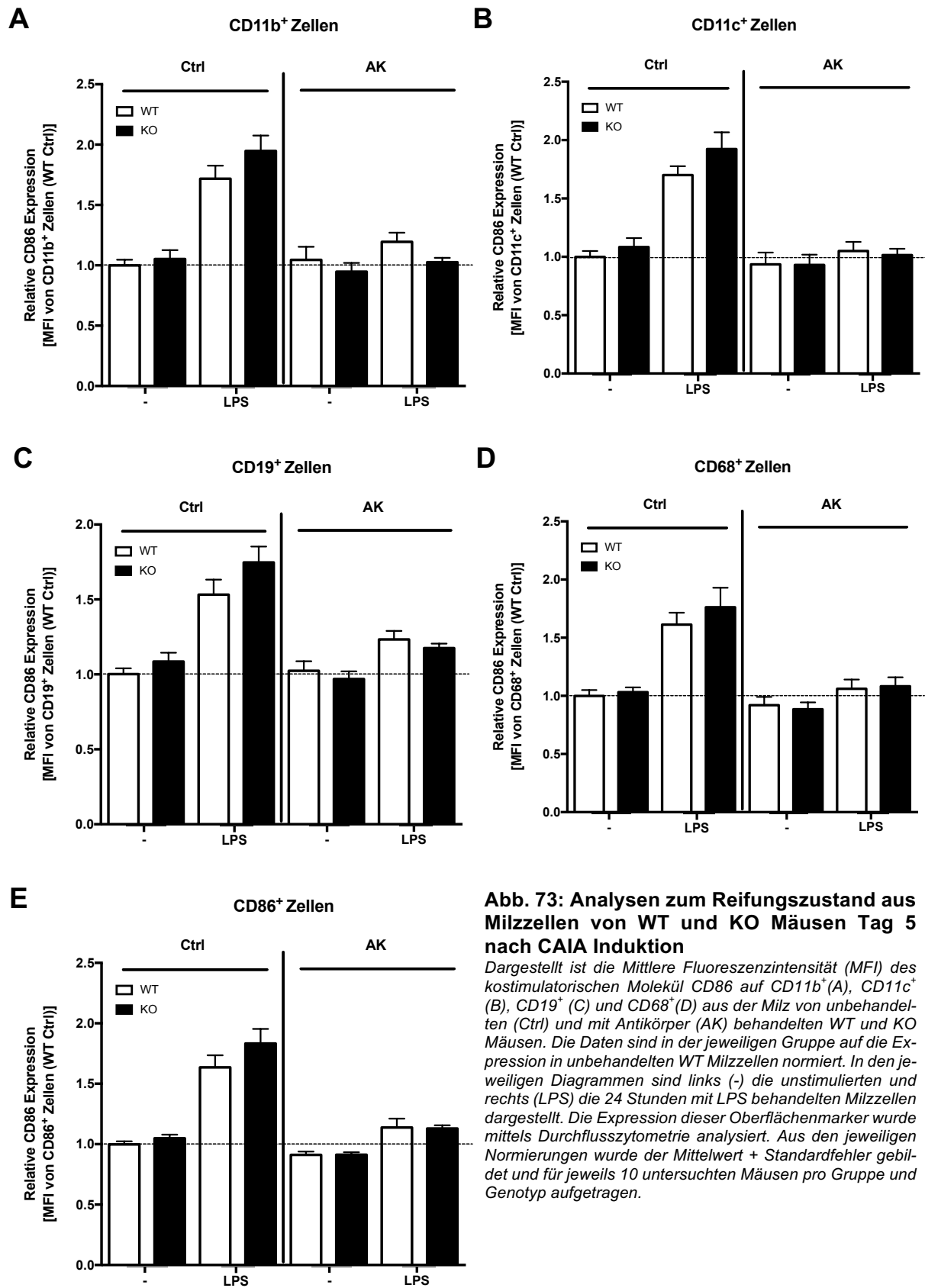
**Abb. 71: Zellfrequenz-Analysen aus Milzzellen von WT und KO Mäusen nach CAIA Tag 9**

Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von CD11b<sup>+</sup> (myeloiden) Zellen aus der Milz von unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in unbehandelten WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet + Standardfehler gebildet und für jeweils 10-15 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp aufgetragen. Statistik: \*\*p < 0,01; T-Test.



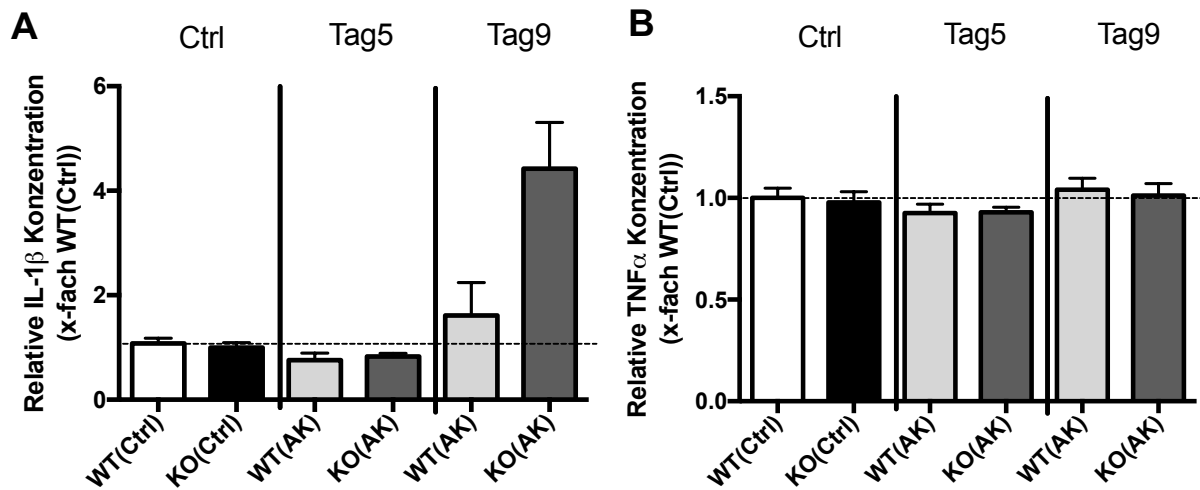
**Abb. 72: Analysen zum Reifungszustand aus Milzzellen von WT und KO Mäusen Tag 9 nach CAIA Induktion**

Dargestellt ist die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des kostimulatorischen Molekül CD86 auf CD11b<sup>+</sup> (A), CD11c<sup>+</sup> (B), CD19<sup>+</sup> (C) und CD68<sup>+</sup> (D) aus der Milz von unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in unbehandelten WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert gebildet + Standardfehler gebildet und für jeweils 10-15 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp aufgetragen.



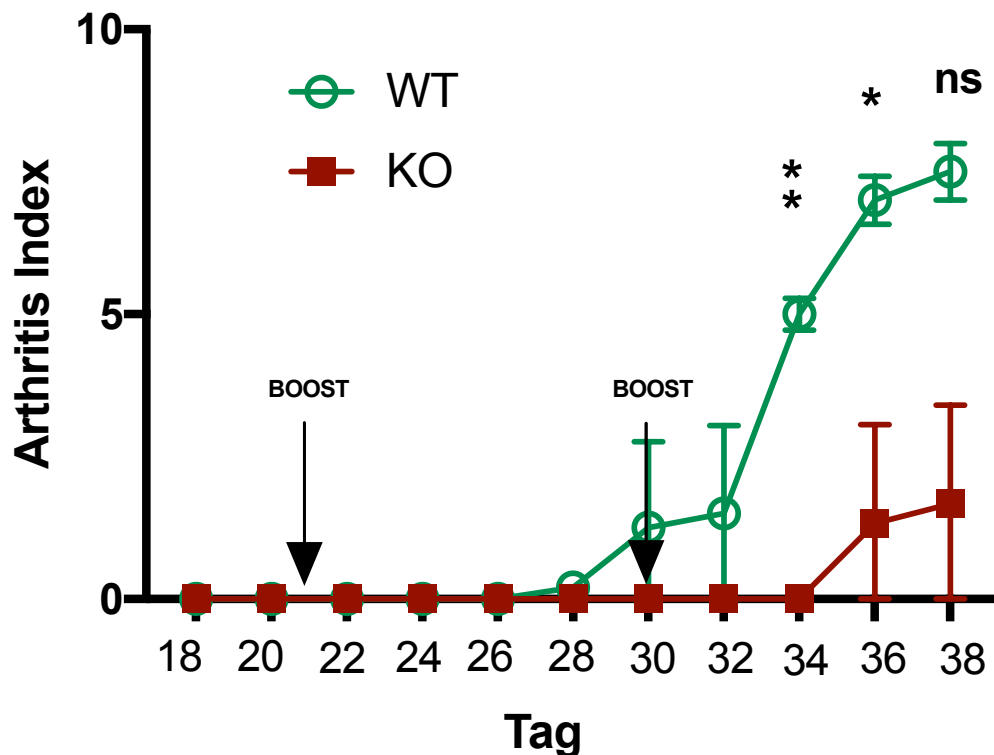
**Abb. 73: Analysen zum Reifungszustand aus Milzzellen von WT und KO Mäusen Tag 5 nach CAIA Induktion**

Dargestellt ist die Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) des kostimulatorischen Molekül CD86 auf CD11b<sup>+</sup> (A), CD11c<sup>+</sup> (B), CD19<sup>+</sup> (C) und CD68<sup>+</sup> (D) aus der Milz von unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Daten sind in der jeweiligen Gruppe auf die Expression in unbehandelten WT Milzzellen normiert. In den jeweiligen Diagrammen sind links (-) die unstimulierten und rechts (LPS) die 24 Stunden mit LPS behandelten Milzzellen dargestellt. Die Expression dieser Oberflächenmarker wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Aus den jeweiligen Normierungen wurde der Mittelwert + Standardfehler gebildet und für jeweils 10 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp aufgetragen.



**Abb. 74: Zytokinmuster-Analysen von T-Zellen nach CAIA-Behandlung**

Dargestellt ist die Konzentration von IL-1 $\beta$  (A) und TNF- $\alpha$  (B) aus dem Überstand polyklonal stimulierter T-Zellen. Nach Aufreinigung durch Nylonwolle, wurden die T-Zellen für 90 Std. mit anti-CD3 (1 $\mu$ g/ml) und anti-CD28 (2 $\mu$ g/ml) polyklonal stimuliert. Dabei handelt es sich um T-Zellen aus unbehandelten (Ctrl) und mit Antikörper (AK) behandelten WT und KO Mäusen. Die Zytokinmessung wurde mit Hilfe des CBA Flex Set der Firma DB Bioscience durchgeführt. Die Daten wurden auf die jeweilige Zytokinkonzentration in WT-Mäusen normiert und repräsentieren den Mittelwert + Standardfehler von jeweils 15-28 untersuchten Mäusen pro Gruppe und Genotyp.



**Abb. 75: Darstellung des Arthritis-Index für KO und WT Mäusen**

Dargestellt ist die Entwicklung des Arthritis-Index von CIA in WT und KO Mäusen. Die Mäuse wurden an Tag 0 mit 50  $\mu$ l CII-Lsg. (bestehend aus 1:1 mit Hühner-Kollagen II 100 $\mu$ g und CFA) im Schwanzansatz intradermal immunisiert. Die Immunisierung (boost) wurde an Tag 21 und 31 wiederholt. Die Entwicklung des klinischen Arthritis-Phänotyps wurde ab dem Tag 18 bis Tag 38 dokumentiert und als Mittelwert des Arthritis-Index dargestellt (AI,  $\pm$  Standardfehler). (Statistik; ns: nicht signifikant; \* $p$  < 0,05; \*\* $p$  < 0,01; T-Test)

**9. Danksagung**



**10. Erklärung**

Ich versichere hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die im Literaturverzeichnis angegebenen Quellen benutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder noch nicht veröffentlichten Quellen entnommen sind, sind als solche kenntlich gemacht. Die Zeichnungen oder Abbildungen in dieser Arbeit sind von mir selbst erstellt oder mit einem entsprechenden Quellennachweis versehen worden.

---

Ort, Datum

---

Rudolf Käfer

### 11. Literaturverzeichnis

1. Natoli, G., *Specialized chromatin patterns in the control of inflammatory gene expression*. Curr Top Microbiol Immunol, 2011. **349**: p. 61-72.
2. Newman, R., J. McHugh, and M. Turner, *RNA binding proteins as regulators of immune cell biology*. Clin Exp Immunol, 2016. **183**(1): p. 37-49.
3. Frangou, E.A., G.K. Bertsias, and D.T. Boumpas, *Gene expression and regulation in systemic lupus erythematosus*. Eur J Clin Invest, 2013. **43**(10): p. 1084-96.
4. Tuller, T., et al., *Common and specific signatures of gene expression and protein-protein interactions in autoimmune diseases*. Genes Immun, 2013. **14**(2): p. 67-82.
5. Liu, R.Y., et al., *Activation of p38 mitogen-activated protein kinase is required for tumor necrosis factor- $\alpha$ -supported proliferation of leukemia and lymphoma cell lines*. J Biol Chem, 2000. **275**(28): p. 21086-93.
6. Falvo, J.V., et al., *Epigenetic control of cytokine gene expression: regulation of the TNF/LT locus and T helper cell differentiation*. Adv Immunol, 2013. **118**: p. 37-128.
7. Zhang, Y., *Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination*. Genes Dev, 2003. **17**(22): p. 2733-40.
8. Roeder, R.G., *The complexities of eukaryotic transcription initiation: regulation of preinitiation complex assembly*. Trends Biochem Sci, 1991. **16**(11): p. 402-8.
9. de Klerk, E. and P.A. t Hoen, *Alternative mRNA transcription, processing, and translation: insights from RNA sequencing*. Trends Genet, 2015. **31**(3): p. 128-39.
10. Moore, M.J. and N.J. Proudfoot, *Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation*. Cell, 2009. **136**(4): p. 688-700.
11. Grosso, A.R., et al., *Tissue-specific splicing factor gene expression signatures*. Nucleic Acids Res, 2008. **36**(15): p. 4823-32.
12. Darnell, J.E., Jr., *Reflections on the history of pre-mRNA processing and highlights of current knowledge: a unified picture*. RNA, 2013. **19**(4): p. 443-60.
13. Yaniv, K. and J.K. Yisraeli, *Defining cis-acting elements and trans-acting factors in RNA localization*. Int Rev Cytol, 2001. **203**: p. 521-39.
14. Newbury, S.F., *Control of mRNA stability in eukaryotes*. Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 1): p. 30-4.
15. Min, H., et al., *A new regulatory protein, KSRP, mediates exon inclusion through an intronic splicing enhancer*. Genes Dev, 1997. **11**(8): p. 1023-36.
16. Kelemen, O., et al., *Function of alternative splicing*. Gene, 2013. **514**(1): p. 1-30.
17. Moore, M.J. and P.A. Sharp, *Evidence for two active sites in the spliceosome provided by stereochemistry of pre-mRNA splicing*. Nature, 1993. **365**(6444): p. 364-8.
18. Wagner, S.D. and J.A. Berglund, *Alternative pre-mRNA splicing*. Methods Mol Biol, 2014. **1126**: p. 45-54.

19. Hall, M.P., S. Huang, and D.L. Black, *Differentiation-induced colocalization of the KH-type splicing regulatory protein with polypyrimidine tract binding protein and the c-src pre-mRNA*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(2): p. 774-86.
20. He, L., A. Weber, and D. Levens, *Nuclear targeting determinants of the far upstream element binding protein, a c-myc transcription factor*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(22): p. 4558-65.
21. Danckwardt, S., et al., *p38 MAPK controls prothrombin expression by regulated RNA 3' end processing*. Mol Cell, 2011. **41**(3): p. 298-310.
22. Lellek, H., et al., *Purification and molecular cloning of a novel essential component of the apolipoprotein B mRNA editing enzyme-complex*. J Biol Chem, 2000. **275**(26): p. 19848-56.
23. Ruggiero, T., et al., *LPS induces KH-type splicing regulatory protein-dependent processing of microRNA-155 precursors in macrophages*. FASEB J, 2009. **23**(9): p. 2898-908.
24. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
25. Su, L.C., et al., *Role of microRNA-155 in rheumatoid arthritis*. Int J Rheum Dis, 2017. **20**(11): p. 1631-1637.
26. Chou, C.F., et al., *KSRP ablation enhances brown fat gene program in white adipose tissue through reduced miR-150 expression*. Diabetes, 2014. **63**(9): p. 2949-61.
27. Lin, Y.Y., et al., *KSRP and MicroRNA 145 are negative regulators of lipolysis in white adipose tissue*. Mol Cell Biol, 2014. **34**(12): p. 2339-49.
28. Giovarelli, M., et al., *H19 long noncoding RNA controls the mRNA decay promoting function of KSRP*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(47): p. E5023-8.
29. Briata, P., et al., *KSRP, many functions for a single protein*. Front Biosci (Landmark Ed), 2011. **16**: p. 1787-96.
30. Trabucchi, M., et al., *The RNA-binding protein KSRP promotes the biogenesis of a subset of microRNAs*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 1010-4.
31. Briata, P., et al., *Diverse roles of the nucleic acid-binding protein KHSRP in cell differentiation and disease*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2016. **7**(2): p. 227-40.
32. Gherzi, R., et al., *A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery*. Mol Cell, 2004. **14**(5): p. 571-83.
33. Chen, C.Y. and A.B. Shyu, *AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation*. Trends Biochem Sci, 1995. **20**(11): p. 465-70.
34. Chen, C.Y., et al., *AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs*. Cell, 2001. **107**(4): p. 451-64.
35. Dhamija, S., et al., *Interleukin-1 activates synthesis of interleukin-6 by interfering with a KH-type splicing regulatory protein (KSRP)-dependent translational silencing mechanism*. J Biol Chem, 2011. **286**(38): p. 33279-88.
36. Gao, M., et al., *A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements*. EMBO J, 2001. **20**(5): p. 1134-43.
37. Anderson, P., *Post-transcriptional control of cytokine production*. Nat Immunol, 2008. **9**(4): p. 353-9.
38. Anderson, P., *Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(1): p. 24-35.

## Literaturverzeichnis

---

39. Szostak, E. and F. Gebauer, *Translational control by 3'-UTR-binding proteins*. Brief Funct Genomics, 2013. **12**(1): p. 58-65.
40. Bollig, F., et al., *Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(3): p. 665-70.
41. Haneklaus, M., et al., *The RNA-binding protein Tristetraprolin (TTP) is a critical negative regulator of the NLRP3 inflammasome*. J Biol Chem, 2017. **292**(17): p. 6869-6881.
42. Gratacos, F.M. and G. Brewer, *The role of AUF1 in regulated mRNA decay*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2010. **1**(3): p. 457-73.
43. Quijada, L., et al., *Expression of the human RNA-binding protein HuR in Trypanosoma brucei increases the abundance of mRNAs containing AU-rich regulatory elements*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(20): p. 4414-24.
44. Khabar, K.S., *Post-transcriptional control during chronic inflammation and cancer: a focus on AU-rich elements*. Cell Mol Life Sci, 2010. **67**(17): p. 2937-55.
45. Winzen, R., et al., *Functional analysis of KSRP interaction with the AU-rich element of interleukin-8 and identification of inflammatory mRNA targets*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(23): p. 8388-400.
46. Linker, K., et al., *Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(15): p. 4813-27.
47. Li, X., et al., *KSRP: a checkpoint for inflammatory cytokine production in astrocytes*. Glia, 2012. **60**(11): p. 1773-84.
48. Nguyen-Chi, M. and D. Morello, *[Aberrant regulation of mRNA 3' untranslated region in cancers and inflammation]*. Med Sci (Paris), 2008. **24**(3): p. 290-6.
49. Lin, W.J., et al., *Posttranscriptional control of type I interferon genes by KSRP in the innate immune response against viral infection*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(16): p. 3196-207.
50. Briata, P., et al., *Functional and molecular insights into KSRP function in mRNA decay*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(6-7): p. 689-94.
51. Beisang, D. and P.R. Bohjanen, *Perspectives on the ARE as it turns 25 years old*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2012. **3**(5): p. 719-31.
52. Yarovinsky, T.O., et al., *Early exposure to IL-4 stabilizes IL-4 mRNA in CD4+ T cells via RNA-binding protein HuR*. J Immunol, 2006. **177**(7): p. 4426-35.
53. Casolaro, V., et al., *Posttranscriptional regulation of IL-13 in T cells: role of the RNA-binding protein HuR*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(4): p. 853-9 e4.
54. Stellato, C., et al., *Coordinate regulation of GATA-3 and Th2 cytokine gene expression by the RNA-binding protein HuR*. J Immunol, 2011. **187**(1): p. 441-9.
55. Gubin, M.M., et al., *Conditional knockout of the RNA-binding protein HuR in CD4(+) T cells reveals a gene dosage effect on cytokine production*. Mol Med, 2014. **20**: p. 93-108.
56. Zhou, H., et al., *RNA-binding proteins in neurological diseases*. Sci China Life Sci, 2014. **57**(4): p. 432-44.
57. Carballo, E. and P.J. Blakeshear, *Roles of tumor necrosis factor-alpha receptor subtypes in the pathogenesis of the tristetraprolin-deficiency syndrome*. Blood, 2001. **98**(8): p. 2389-95.
58. Bros, M., et al., *The RNA binding protein tristetraprolin influences the activation state of murine dendritic cells*. Mol Immunol, 2010. **47**(5): p. 1161-70.

59. Bollmann, F., et al., *Endothelial dysfunction in tristetraprolin-deficient mice is not caused by enhanced tumor necrosis factor-alpha expression*. J Biol Chem, 2014. **289**(22): p. 15653-65.
60. Taylor, G.A., et al., *A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency*. Immunity, 1996. **4**(5): p. 445-54.
61. Lu, J.Y., N. Sadri, and R.J. Schneider, *Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs*. Genes Dev, 2006. **20**(22): p. 3174-84.
62. Sarkar, S., et al., *RNA-binding protein AUF1 regulates lipopolysaccharide-induced IL10 expression by activating IkkappaB kinase complex in monocytes*. Mol Cell Biol, 2011. **31**(4): p. 602-15.
63. Xia, Z., et al., *Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) regulates target mRNA stabilization in the mouse testis*. FEBS Lett, 2012. **586**(19): p. 3299-308.
64. Qiang, X., et al., *Cold-inducible RNA-binding protein (CIRP) triggers inflammatory responses in hemorrhagic shock and sepsis*. Nat Med, 2013. **19**(11): p. 1489-1495.
65. Massberg, S., et al., *Immunosurveillance by hematopoietic progenitor cells trafficking through blood, lymph, and peripheral tissues*. Cell, 2007. **131**(5): p. 994-1008.
66. Li, C.L. and G.R. Johnson, *Murine hematopoietic stem and progenitor cells: I. Enrichment and biologic characterization*. Blood, 1995. **85**(6): p. 1472-9.
67. Laird, D.J., U.H. von Andrian, and A.J. Wagers, *Stem cell trafficking in tissue development, growth, and disease*. Cell, 2008. **132**(4): p. 612-30.
68. Janeway, C.A., Jr. and R. Medzhitov, *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 197-216.
69. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Regulation of adaptive immunity by the innate immune system*. Science, 2010. **327**(5963): p. 291-5.
70. Kafasla, P., A. Skliris, and D.L. Kontoyiannis, *Post-transcriptional coordination of immunological responses by RNA-binding proteins*. Nat Immunol, 2014. **15**(6): p. 492-502.
71. Palm, N.W. and R. Medzhitov, *Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity*. Immunol Rev, 2009. **227**(1): p. 221-33.
72. Flores-Romo, L., *In vivo maturation and migration of dendritic cells*. Immunology, 2001. **102**(3): p. 255-62.
73. Randolph, G.J., V. Angeli, and M.A. Swartz, *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 617-28.
74. Alvarez, D., E.H. Vollmann, and U.H. von Andrian, *Mechanisms and consequences of dendritic cell migration*. Immunity, 2008. **29**(3): p. 325-42.
75. Adams, S., D.W. O'Neill, and N. Bhardwaj, *Recent advances in dendritic cell biology*. J Clin Immunol, 2005. **25**(3): p. 177-88.
76. Mosser, D.M. and J.P. Edwards, *Exploring the full spectrum of macrophage activation*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(12): p. 958-69.
77. Italiani, P. and D. Boraschi, *From Monocytes to M1/M2 Macrophages: Phenotypical vs. Functional Differentiation*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 514.
78. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.

## Literaturverzeichnis

---

79. Benoit, M., B. Desnues, and J.L. Mege, *Macrophage polarization in bacterial infections*. J Immunol, 2008. **181**(6): p. 3733-9.
80. Chen, X. and P.E. Jensen, *The role of B lymphocytes as antigen-presenting cells*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2008. **56**(2): p. 77-83.
81. Kaminski, D.A., et al., *Advances in human B cell phenotypic profiling*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 302.
82. Cerutti, A., I. Puga, and M. Cols, *New helping friends for B cells*. Eur J Immunol, 2012. **42**(8): p. 1956-68.
83. Parkin, J. and B. Cohen, *An overview of the immune system*. Lancet, 2001. **357**(9270): p. 1777-89.
84. 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, 2002. **168**(5): p. 2173-81.
85. Cerutti, A., *The regulation of IgA class switching*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(6): p. 421-34.
86. Mauri, C., et al., *Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells*. J Exp Med, 2003. **197**(4): p. 489-501.
87. Stenvinkel, P., et al., *IL-10, IL-6, and TNF-alpha: central factors in the altered cytokine network of uremia--the good, the bad, and the ugly*. Kidney Int, 2005. **67**(4): p. 1216-33.
88. Fiorentino, D.F., et al., *IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages*. J Immunol, 1991. **147**(11): p. 3815-22.
89. Horiuchi, T., et al., *Transmembrane TNF-alpha: structure, function and interaction with anti-TNF agents*. Rheumatology (Oxford), 2010. **49**(7): p. 1215-28.
90. Piguet, P.F., et al., *Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease*. J Exp Med, 1987. **166**(5): p. 1280-9.
91. Tracey, K.J. and A. Cerami, *Tumor necrosis factor, other cytokines and disease*. Annu Rev Cell Biol, 1993. **9**: p. 317-43.
92. Giroir, B.P., T. Brown, and B. Beutler, *Constitutive synthesis of tumor necrosis factor in the thymus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(11): p. 4864-8.
93. Vilcek, J. and T.H. Lee, *Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions*. J Biol Chem, 1991. **266**(12): p. 7313-6.
94. Dayer, J.M., B. Beutler, and A. Cerami, *Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts*. J Exp Med, 1985. **162**(6): p. 2163-8.
95. Salerno, F. and M.C. Wolkers, *T-cells require post-transcriptional regulation for accurate immune responses*. Biochem Soc Trans, 2015. **43**(6): p. 1201-7.
96. Carpenter, S., et al., *Post-transcriptional regulation of gene expression in innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2014. **14**(6): p. 361-76.
97. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes*. Nature, 1996. **383**(6603): p. 787-93.
98. Smith, K.A., *Interleukin-2: inception, impact, and implications*. Science, 1988. **240**(4856): p. 1169-76.
99. Luckheeram, R.V., et al., *CD4(+)T cells: differentiation and functions*. Clin Dev Immunol, 2012. **2012**: p. 925135.

100. Mosmann, T.R., et al., *Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins*. 1986. *J Immunol*, 2005. **175**(1): p. 5-14.
101. Flesch, I.E., et al., *Early interleukin 12 production by macrophages in response to mycobacterial infection depends on interferon gamma and tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*, 1995. **181**(5): p. 1615-21.
102. Zhu, J., H. Yamane, and W.E. Paul, *Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)*. *Annu Rev Immunol*, 2010. **28**: p. 445-89.
103. Kaplan, M.H., M.M. Hufford, and M.R. Olson, *The development and in vivo function of T helper 9 cells*. *Nat Rev Immunol*, 2015. **15**(5): p. 295-307.
104. Ivanov, I.I., et al., *The orphan nuclear receptor ROR $\gamma$  directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. *Cell*, 2006. **126**(6): p. 1121-33.
105. O'Garra, A., L. Steinman, and K. Gijbels, *CD4+ T-cell subsets in autoimmunity*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(6): p. 872-83.
106. Hirahara, K. and T. Nakayama, *CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm*. *Int Immunol*, 2016. **28**(4): p. 163-71.
107. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-70.
108. Simon, H.U., *Neutrophil apoptosis pathways and their modifications in inflammation*. *Immunol Rev*, 2003. **193**: p. 101-10.
109. Niggli, V., *Signaling to migration in neutrophils: importance of localized pathways*. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003. **35**(12): p. 1619-38.
110. Durr, M.C., et al., *Neutrophil chemotaxis by pathogen-associated molecular patterns--formylated peptides are crucial but not the sole neutrophil attractants produced by Staphylococcus aureus*. *Cell Microbiol*, 2006. **8**(2): p. 207-17.
111. Kobayashi, S.D., et al., *Neutrophils in the innate immune response*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 2005. **53**(6): p. 505-17.
112. Fahy, J.V., et al., *Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation*. *J Allergy Clin Immunol*, 1995. **95**(4): p. 843-52.
113. Jatakanon, A., et al., *Neutrophilic inflammation in severe persistent asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, 1999. **160**(5 Pt 1): p. 1532-9.
114. Gibson, P.G., J.L. Simpson, and N. Saltos, *Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8*. *Chest*, 2001. **119**(5): p. 1329-36.
115. Foley, S.C. and Q. Hamid, *Images in allergy and immunology: neutrophils in asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, 2007. **119**(5): p. 1282-6.
116. Kamradt, T. and N.A. Mitchison, *Tolerance and autoimmunity*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(9): p. 655-64.
117. Germain, R.N., *T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(5): p. 309-22.
118. Swat, W., et al., *Clonal deletion of immature CD4+8+ thymocytes in suspension culture by extrathymic antigen-presenting cells*. *Nature*, 1991. **351**(6322): p. 150-3.
119. Schwartz, R.H., *T cell clonal anergy*. *Curr Opin Immunol*, 1997. **9**(3): p. 351-7.
120. Goodnow, C.C., et al., *Induction of self-tolerance in mature peripheral B lymphocytes*. *Nature*, 1989. **342**(6248): p. 385-91.

## Literaturverzeichnis

---

121. Romagnani, S., *The role of lymphocytes in allergic disease*. J Allergy Clin Immunol, 2000. **105**(3): p. 399-408.
122. Larche, M., C.A. Akdis, and R. Valenta, *Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(10): p. 761-71.
123. Asano, M., et al., *Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 387-96.
124. Myasoedova, E., et al., *Epidemiology of rheumatoid arthritis: rheumatoid arthritis and mortality*. Curr Rheumatol Rep, 2010. **12**(5): p. 379-85.
125. Choy, E.H. and G.S. Panayi, *Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis*. N Engl J Med, 2001. **344**(12): p. 907-16.
126. Cutolo, M., et al., *Estrogens and autoimmune diseases*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1089**: p. 538-47.
127. Voulgari, P.V., *Emerging drugs for rheumatoid arthritis*. Expert Opin Emerg Drugs, 2008. **13**(1): p. 175-96.
128. Scott, D.L., F. Wolfe, and T.W. Huizinga, *Rheumatoid arthritis*. Lancet, 2010. **376**(9746): p. 1094-108.
129. Gravallesse, E.M. and S.R. Goldring, *Cellular mechanisms and the role of cytokines in bone erosions in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(10): p. 2143-51.
130. Edwards, C.J. and C. Cooper, *Early environmental factors and rheumatoid arthritis*. Clin Exp Immunol, 2006. **143**(1): p. 1-5.
131. Vassilopoulos, D. and L.H. Calabrese, *Virally associated arthritis 2008: clinical, epidemiologic, and pathophysiologic considerations*. Arthritis Res Ther, 2008. **10**(5): p. 215.
132. Gorman, J.D. and L.A. Criswell, *The shared epitope and severity of rheumatoid arthritis*. Rheum Dis Clin North Am, 2002. **28**(1): p. 59-78.
133. Newton, J.L., et al., *A review of the MHC genetics of rheumatoid arthritis*. Genes Immun, 2004. **5**(3): p. 151-7.
134. Firestein, G.S., *Evolving concepts of rheumatoid arthritis*. Nature, 2003. **423**(6937): p. 356-61.
135. Pap, T., et al., *Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Arthritis Res, 2000. **2**(5): p. 361-7.
136. Martel-Pelletier, J. and J.P. Pelletier, *Is osteoarthritis a disease involving only cartilage or other articular tissues? Eklém Hastalıklar Cerrahisi*, 2010. **21**(1): p. 2-14.
137. The-World-Health-Organization, *Asthma Fact sheets*. Updated April 2017: p. <http://www.who.int/respiratory/asthma/en/>.
138. Holgate, S.T., *Pathogenesis of asthma*. Clin Exp Allergy, 2008. **38**(6): p. 872-97.
139. Fuhlbrigge, A.L., *Asthma severity and asthma control: symptoms, pulmonary function, and inflammatory markers*. Curr Opin Pulm Med, 2004. **10**(1): p. 1-6.
140. Murphy, D.M. and P.M. O'Byrne, *Recent advances in the pathophysiology of asthma*. Chest, 2010. **137**(6): p. 1417-26.
141. Beeh, K.M. and R. Buhl, *[Pathogenesis of bronchial asthma--unveiling new therapeutic prospects]*. Med Klin (Munich), 2001. **96**(1): p. 15-25.
142. Humbert, M., et al., *The immunopathology of extrinsic (atopic) and intrinsic (non-atopic) asthma: more similarities than differences*. Immunol Today, 1999. **20**(11): p. 528-33.



143. Kim, H.Y., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, *The many paths to asthma: phenotype shaped by innate and adaptive immunity*. Nat Immunol, 2010. **11**(7): p. 577-84.
144. Busse, W.W. and R.F. Lemanske, Jr., *Asthma*. N Engl J Med, 2001. **344**(5): p. 350-62.
145. Galli, S.J., M. Tsai, and A.M. Piliponsky, *The development of allergic inflammation*. Nature, 2008. **454**(7203): p. 445-54.
146. Bloemen, K., et al., *The allergic cascade: review of the most important molecules in the asthmatic lung*. Immunol Lett, 2007. **113**(1): p. 6-18.
147. Galli, S.J. and M. Tsai, *IgE and mast cells in allergic disease*. Nat Med, 2012. **18**(5): p. 693-704.
148. Georas, S.N., et al., *T-helper cell type-2 regulation in allergic disease*. Eur Respir J, 2005. **26**(6): p. 1119-37.
149. Bosnjak, B., et al., *Treatment of allergic asthma: modulation of Th2 cells and their responses*. Respir Res, 2011. **12**: p. 114.
150. Temann, U.A., et al., *IL9 leads to airway inflammation by inducing IL13 expression in airway epithelial cells*. Int Immunol, 2007. **19**(1): p. 1-10.
151. Oboki, K., et al., *Th17 and allergy*. Allergol Int, 2008. **57**(2): p. 121-34.
152. Doe, C., et al., *Expression of the T helper 17-associated cytokines IL-17A and IL-17F in asthma and COPD*. Chest, 2010. **138**(5): p. 1140-7.
153. Schnyder-Candrian, S., et al., *Interleukin-17 is a negative regulator of established allergic asthma*. J Exp Med, 2006. **203**(12): p. 2715-25.
154. Akdis, M., et al., *TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection*. J Allergy Clin Immunol, 2012. **129**(6): p. 1438-49; quiz1450-1.
155. Montoliu, L. and C.B. Whitelaw, *Using standard nomenclature to adequately name transgenes, knockout gene alleles and any mutation associated to a genetically modified mouse strain*. Transgenic Res, 2011. **20**(2): p. 435-40.
156. Nandakumar, K.S. and R. Holmdahl, *Arthritis induced with cartilage-specific antibodies is IL-4-dependent*. Eur J Immunol, 2006. **36**(6): p. 1608-18.
157. MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT, *Warum erforschen Wissenschaftler Mäuse?* Updated 2018. **Fakten**: p. <https://www.mpg.de/10888547/warum-erforschen-wissenschaftler-maeuse>
158. Cho, Y.G., et al., *Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis*. Autoimmun Rev, 2007. **7**(1): p. 65-70.
159. Hegen, M., et al., *Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis*. Ann Rheum Dis, 2008. **67**(11): p. 1505-15.
160. Moore, A.R., *Collagen-induced arthritis*. Methods Mol Biol, 2003. **225**: p. 175-9.
161. Snir, O., et al., *Multifunctional T cell reactivity with native and glycosylated type II collagen in rheumatoid arthritis*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(8): p. 2482-8.
162. Ellis, J.S., et al., *Adjuvant composition determines the induction of type II collagen-induced arthritis*. Scand J Immunol, 1992. **36**(1): p. 49-56.
163. Nandakumar, K.S. and R. Holmdahl, *Efficient promotion of collagen antibody induced arthritis (CAIA) using four monoclonal antibodies specific for the major epitopes recognized in both collagen induced arthritis and rheumatoid arthritis*. J Immunol Methods, 2005. **304**(1-2): p. 126-36.

## Literaturverzeichnis

---

164. Seki, N., et al., *Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity.* J Immunol, 1988. **140**(5): p. 1477-84.
165. Boissier, M.C., et al., *Biphasic effect of interferon-gamma in murine collagen-induced arthritis.* Eur J Immunol, 1995. **25**(5): p. 1184-90.
166. Germann, T., et al., *Administration of interleukin 12 in combination with type II collagen induces severe arthritis in DBA/1 mice.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(11): p. 4823-7.
167. Mauritz, N.J., et al., *Treatment with gamma-interferon triggers the onset of collagen arthritis in mice.* Arthritis Rheum, 1988. **31**(10): p. 1297-304.
168. Moder, K.G., et al., *Prevention of collagen induced arthritis in mice by treatment with an antibody directed against the T cell receptor alpha beta framework.* Autoimmunity, 1992. **11**(4): p. 219-24.
169. Corthay, A., et al., *Collagen-induced arthritis development requires alpha beta T cells but not gamma delta T cells: studies with T cell-deficient (TCR mutant) mice.* Int Immunol, 1999. **11**(7): p. 1065-73.
170. Svensson, L., et al., *B cell-deficient mice do not develop type II collagen-induced arthritis (CIA).* Clin Exp Immunol, 1998. **111**(3): p. 521-6.
171. Pan, M., et al., *Resistance to development of collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is due to a defect in secondary, but not in primary, immune response.* J Clin Immunol, 2004. **24**(5): p. 481-91.
172. Wooley, P.H., et al., *Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates.* J Exp Med, 1981. **154**(3): p. 688-700.
173. Backlund, J., et al., *C57BL/6 mice need MHC class II Aq to develop collagen-induced arthritis dependent on autoreactive T cells.* Ann Rheum Dis, 2013. **72**(7): p. 1225-32.
174. Gonzalez-Gay, M.A., et al., *Protective role of major histocompatibility complex class II Ebd transgene on collagen-induced arthritis.* J Exp Med, 1994. **180**(4): p. 1559-64.
175. Nandakumar, K.S., L. Svensson, and R. Holmdahl, *Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes.* Am J Pathol, 2003. **163**(5): p. 1827-37.
176. Nandakumar, K.S. and R. Holmdahl, *Antibody-induced arthritis: disease mechanisms and genes involved at the effector phase of arthritis.* Arthritis Res Ther, 2006. **8**(6): p. 223.
177. Nandakumar, K.S., et al., *Collagen type II (CII)-specific antibodies induce arthritis in the absence of T or B cells but the arthritis progression is enhanced by CII-reactive T cells.* Arthritis Res Ther, 2004. **6**(6): p. R544-50.
178. Udalova, I.A., A. Mantovani, and M. Feldmann, *Macrophage heterogeneity in the context of rheumatoid arthritis.* Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(8): p. 472-85.
179. Shinagawa, K. and M. Kojima, *Mouse model of airway remodeling: strain differences.* Am J Respir Crit Care Med, 2003. **168**(8): p. 959-67.
180. Melgert, B.N., et al., *Female mice are more susceptible to the development of allergic airway inflammation than male mice.* Clin Exp Allergy, 2005. **35**(11): p. 1496-503.
181. Gueders, M.M., et al., *Mouse models of asthma: a comparison between C57BL/6 and BALB/c strains regarding bronchial responsiveness, inflammation, and cytokine production.* Inflamm Res, 2009. **58**(12): p. 845-54.

182. Renz, H., et al., *Aerosolized antigen exposure without adjuvant causes increased IgE production and increased airway responsiveness in the mouse*. J Allergy Clin Immunol, 1992. **89**(6): p. 1127-38.
183. Besnard, A.G., et al., *Inflammasome-IL-1-Th17 response in allergic lung inflammation*. J Mol Cell Biol, 2012. **4**(1): p. 3-10.
184. Wakashin, H., et al., *IL-23 and Th17 cells enhance Th2-cell-mediated eosinophilic airway inflammation in mice*. Am J Respir Crit Care Med, 2008. **178**(10): p. 1023-32.
185. Murdoch, J.R. and C.M. Lloyd, *Resolution of allergic airway inflammation and airway hyperreactivity is mediated by IL-17-producing  $\gamma\delta$ T cells*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **182**(4): p. 464-76.
186. Unkeless, J.C., *Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors*. J Exp Med, 1979. **150**(3): p. 580-96.
187. Scheicher, C., et al., *Dendritic cells from mouse bone marrow: in vitro differentiation using low doses of recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol Methods, 1992. **154**(2): p. 253-64.
188. Lutz, M.B., et al., *An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow*. Journal of immunological methods, 1999. **223**(1): p. 77-92.
189. Boyum, A., *Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Introduction*. Scand J Clin Lab Invest Suppl, 1968. **97**: p. 7.
190. Gunzer, M., et al., *Two-step negative enrichment of CD4+ and CD8+ T cells from murine spleen via nylon wool adherence and an optimized antibody cocktail*. J Immunol Methods, 2001. **258**(1-2): p. 55-63.
191. Denizot, F. and R. Lang, *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. J Immunol Methods, 1986. **89**(2): p. 271-7.
192. Boin, F., et al., *Flow cytometric discrimination of seven lineage markers by using two fluorochromes*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188916.
193. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. J Immunol, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
194. Martin, S.J., et al., *Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl*. J Exp Med, 1995. **182**(5): p. 1545-56.
195. Morgan, E., et al., *Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology*. Clin Immunol, 2004. **110**(3): p. 252-66.
196. Brand, D.D., A.H. Kang, and E.F. Rosloniec, *Immunopathogenesis of collagen arthritis*. Springer Semin Immunopathol, 2003. **25**(1): p. 3-18.
197. Courtenay, J.S., et al., *Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice*. Nature, 1980. **283**(5748): p. 666-8.
198. Campbell, I.K., J.A. Hamilton, and I.P. Wicks, *Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis*. Eur J Immunol, 2000. **30**(6): p. 1568-75.

## Literaturverzeichnis

---

199. Kikawada, E., D.M. Lenda, and V.R. Kelley, *IL-12 deficiency in MRL-Fas(lpr) mice delays nephritis and intrarenal IFN-gamma expression, and diminishes systemic pathology*. J Immunol, 2003. **170**(7): p. 3915-25.
200. Nandakumar, K.S. and R. Holmdahl, *Collagen antibody induced arthritis*. Methods Mol Med, 2007. **136**: p. 215-23.
201. Haggerty, J.M., et al., *Segmentation of epidermal tissue with histopathological damage in images of haematoxylin and eosin stained human skin*. BMC Med Imaging, 2014. **14**: p. 7.
202. Welsch, U. and U. Schumacher, *Lectin histochemical observations on the bronchial glands and the goblet cells of the airway epithelium of marine diving mammals*. Acta Histochem Suppl, 1988. **36**: p. 255-61.
203. Kumar, R.K. and P.S. Foster, *Modeling allergic asthma in mice: pitfalls and opportunities*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **27**(3): p. 267-72.
204. Nials, A.T. and S. Uddin, *Mouse models of allergic asthma: acute and chronic allergen challenge*. Dis Model Mech, 2008. **1**(4-5): p. 213-20.
205. Shin, Y.S., K. Takeda, and E.W. Gelfand, *Understanding asthma using animal models*. Allergy Asthma Immunol Res, 2009. **1**(1): p. 10-8.
206. Schwarze, J., et al., *IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2997-3004.
207. Hamelmann, E., et al., *Development of eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness requires interleukin-5 but not immunoglobulin E or B lymphocytes*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(4): p. 480-9.
208. Jain, V.V., et al., *CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma*. J Allergy Clin Immunol, 2002. **110**(6): p. 867-72.
209. Hamelmann, E. and E.W. Gelfand, *Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness*. Int Arch Allergy Immunol, 1999. **120**(1): p. 8-16.
210. Temelkovski, J., et al., *An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen*. Thorax, 1998. **53**(10): p. 849-56.
211. Maxeiner, J.H., et al., *A method to enable the investigation of murine bronchial immune cells, their cytokines and mediators*. Nat Protoc, 2007. **2**(1): p. 105-12.
212. McMillan, S.J. and C.M. Lloyd, *Prolonged allergen challenge in mice leads to persistent airway remodelling*. Clin Exp Allergy, 2004. **34**(3): p. 497-507.
213. Baum, S., *The PAS Reaction for Staining Cell Walls*. CSH Protoc, 2008. **2008**: p. pdb prot4956.
214. Fang, Y.O. and U. Welsch, *A histochemical study of the distribution of lectin binding sites in the developing oocytes of the lancelet Branchiostoma belcheri*. Cell Tissue Res, 1995. **280**(2): p. 427-34.
215. Bollmann, F., et al., *Resveratrol post-transcriptionally regulates pro-inflammatory gene expression via regulation of KSRP RNA binding activity*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(20): p. 12555-69.
216. Lin, K.K. and M.A. Goodell, *Detection of hematopoietic stem cells by flow cytometry*. Methods Cell Biol, 2011. **103**: p. 21-30.
217. Till, J.E. and C.E. Mc, *A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells*. Radiat Res, 1961. **14**: p. 213-22.

218. Adachi, Y., et al., *Immature dendritic cells (CD11c+ CD3- B220- cells) present in mouse peripheral blood*. Immunobiology, 2002. **206**(4): p. 354-67.
219. Smeaton, T.C., *Migration of polymorphonuclear neutrophils and macrophages from bone marrow to the peritoneal cavity after (3H)-thymidine labelling of rat tibial bone marrow in vivo*. Aust J Exp Biol Med Sci, 1984. **62 ( Pt 4)**: p. 453-63.
220. Corkum, C.P., et al., *Immune cell subsets and their gene expression profiles from human PBMC isolated by Vacutainer Cell Preparation Tube (CPT) and standard density gradient*. BMC Immunol, 2015. **16**: p. 48.
221. Doeing, D.C., J.L. Borowicz, and E.T. Crockett, *Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods*. BMC Clin Pathol, 2003. **3**(1): p. 3.
222. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, 2004. **172**(5): p. 2731-8.
223. Haley, P.J., *Species differences in the structure and function of the immune system*. Toxicology, 2003. **188**(1): p. 49-71.
224. Gordon, S. and P.R. Taylor, *Monocyte and macrophage heterogeneity*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(12): p. 953-64.
225. Mebius, R.E. and G. Kraal, *Structure and function of the spleen*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(8): p. 606-16.
226. Tiron, A. and C. Vasilescu, *[Role of the spleen in immunity. Immunologic consequences of splenectomy]*. Chirurgia (Bucur), 2008. **103**(3): p. 255-63.
227. Arch, R.H., R.W. Gedrich, and C.B. Thompson, *Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death*. Genes Dev, 1998. **12**(18): p. 2821-30.
228. Ashkenazi, A., *Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily*. Nat Rev Cancer, 2002. **2**(6): p. 420-30.
229. MacEwan, D.J., *TNF receptor subtype signalling: differences and cellular consequences*. Cell Signal, 2002. **14**(6): p. 477-92.
230. MacEwan, D.J., *TNF ligands and receptors--a matter of life and death*. Br J Pharmacol, 2002. **135**(4): p. 855-75.
231. Suzuki, T., et al., *Mechanisms involved in apoptosis of human macrophages induced by lipopolysaccharide from Actinobacillus actinomycetemcomitans in the presence of cycloheximide*. Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 1856-65.
232. Choi, K.B., et al., *Lipopolysaccharide mediates endothelial apoptosis by a FADD-dependent pathway*. J Biol Chem, 1998. **273**(32): p. 20185-8.
233. Wlodkovic, D., et al., *Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death*. Methods Cell Biol, 2011. **103**: p. 55-98.
234. Zlotnik, A. and O. Yoshie, *Chemokines: a new classification system and their role in immunity*. Immunity, 2000. **12**(2): p. 121-7.
235. Borish, L.C. and J.W. Steinke, 2. *Cytokines and chemokines*. J Allergy Clin Immunol, 2003. **111**(2 Suppl): p. S460-75.
236. Ozaki, K. and W.J. Leonard, *Cytokine and cytokine receptor pleiotropy and redundancy*. J Biol Chem, 2002. **277**(33): p. 29355-8.

## Literaturverzeichnis

---

237. Gershon, R.K. and K. Kondo, *Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes*. Immunology, 1970. **18**(5): p. 723-37.
238. Parnes, J.R., *Molecular biology and function of CD4 and CD8*. Adv Immunol, 1989. **44**: p. 265-311.
239. Romagnani, S., *T-cell subsets (Th1 versus Th2)*. Ann Allergy Asthma Immunol, 2000. **85**(1): p. 9-18; quiz 18, 21.
240. Seder, R.A. and R. Ahmed, *Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation*. Nat Immunol, 2003. **4**(9): p. 835-42.
241. Foy, T.M., et al., *Immune regulation by CD40 and its ligand GP39*. Annu Rev Immunol, 1996. **14**: p. 591-617.
242. Konig, R., L.Y. Huang, and R.N. Germain, *MHC class II interaction with CD4 mediated by a region analogous to the MHC class I binding site for CD8*. Nature, 1992. **356**(6372): p. 796-8.
243. Sprent, J., et al., *T-cell proliferation in vivo and the role of cytokines*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2000. **355**(1395): p. 317-22.
244. Ferber, I.A., et al., *GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels*. Clin Immunol, 1999. **91**(2): p. 134-44.
245. Saraiva, M. and A. O'Garra, *The regulation of IL-10 production by immune cells*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(3): p. 170-81.
246. Diamantstein, T., et al., *Studies on interleukin 2 receptor expression and IL-2 production by murine T cell lymphomas*. Br J Cancer, 1985. **51**(1): p. 23-30.
247. Moon, B.I., T.H. Kim, and J.Y. Seoh, *Functional Modulation of Regulatory T Cells by IL-2*. PLoS One, 2015. **10**(11): p. e0141864.
248. Caplazi, P., et al., *Mouse Models of Rheumatoid Arthritis*. Vet Pathol, 2015. **52**(5): p. 819-26.
249. Xing, J., Y. Wu, and B. Ni, *Th9: a new player in asthma pathogenesis?* J Asthma, 2011. **48**(2): p. 115-25.
250. Zhou, Q., et al., *Relationship of circulating chemerin and omentin levels with Th17 and Th9 cell immune responses in patients with asthma*. J Asthma, 2017: p. 1-9.
251. Blyth, D.I., et al., *Lung inflammation and epithelial changes in a murine model of atopic asthma*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1996. **14**(5): p. 425-38.
252. Epstein, M.M., *Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease?* Int Arch Allergy Immunol, 2004. **133**(1): p. 84-100.
253. Zuurbier, A.E., et al., *Neutrophils enhance eosinophil migration across monolayers of lung epithelial cells*. Clin Exp Allergy, 2001. **31**(3): p. 444-52.
254. Chen, J., et al., *Posttranscriptional gene regulation of IL-17 by the RNA-binding protein HuR is required for initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2013. **191**(11): p. 5441-50.
255. Carballo, E., G.S. Gilkeson, and P.J. Blakeshear, *Bone marrow transplantation reproduces the tristetraproline-deficiency syndrome in recombination activating gene-2 (-/-) mice. Evidence that monocyte/macrophage progenitors may be responsible for TNFalpha overproduction*. J Clin Invest, 1997. **100**(5): p. 986-95.
256. Carballo, E., W.S. Lai, and P.J. Blakeshear, *Evidence that tristetraproline is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability*. Blood, 2000. **95**(6): p. 1891-9.

257. Khabar, K.S., *The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease*. J Interferon Cytokine Res, 2005. **25**(1): p. 1-10.
258. Brooks, S.A. and P.J. Blakeshear, *Tristetraprolin (TTP): interactions with mRNA and proteins, and current thoughts on mechanisms of action*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(6-7): p. 666-79.
259. Kafer, R., et al., *Inactivation of the KSRP gene modifies collagen antibody induced arthritis*. Mol Immunol, 2017. **87**: p. 207-216.
260. Sehnert, B., et al., *Antileukoproteinase: modulation of neutrophil function and therapeutic effects on anti-type II collagen antibody-induced arthritis*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(7): p. 2347-59.
261. Khachigian, L.M., *Collagen antibody-induced arthritis*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2512-6.
262. Zhao, H., et al., *KSRP specifies monocytic and granulocytic differentiation through regulating miR-129 biogenesis and RUNX1 expression*. Nat Commun, 2017. **8**(1): p. 1428.
263. Jiang, W., et al., *Spleen contributes to restraint stress induced changes in blood leukocytes distribution*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 6501.
264. Bailey, M.T., et al., *Repeated social defeat increases the bactericidal activity of splenic macrophages through a Toll-like receptor-dependent pathway*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007. **293**(3): p. R1180-90.
265. Rosenberg, S.A., *IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer*. J Immunol, 2014. **192**(12): p. 5451-8.
266. Martin, C.E., et al., *Homeostatic proliferation of mature T cells*. Methods Mol Biol, 2013. **979**: p. 81-106.
267. Cabrera-Perez, J., et al., *Impact of sepsis on CD4 T cell immunity*. J Leukoc Biol, 2014. **96**(5): p. 767-77.
268. Ulivieri, C. and C.T. Baldari, *T-cell-based immunotherapy of autoimmune diseases*. Expert Rev Vaccines, 2013. **12**(3): p. 297-310.
269. Wambre, E., E.A. James, and W.W. Kwok, *Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy*. Curr Opin Immunol, 2012. **24**(6): p. 700-6.
270. Benayoun, L., et al., *Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression in human asthmatic airways: relationship with proliferation, apoptosis, and airway remodeling*. Am J Respir Crit Care Med, 2001. **164**(8 Pt 1): p. 1487-94.
271. Obata, Y., et al., *The epigenetic regulator Uhrf1 facilitates the proliferation and maturation of colonic regulatory T cells*. Nat Immunol, 2014. **15**(6): p. 571-9.
272. Formigli, L., et al., *Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis*. J Cell Physiol, 2000. **182**(1): p. 41-9.
273. Wajant, H., K. Pfizenmaier, and P. Scheurich, *Tumor necrosis factor signaling*. Cell Death Differ, 2003. **10**(1): p. 45-65.
274. Dye, J.R., et al., *B cell receptor cross-talk: exposure to lipopolysaccharide induces an alternate pathway for B cell receptor-induced ERK phosphorylation and NF-kappa B activation*. J Immunol, 2007. **179**(1): p. 229-35.
275. Tough, D.F., S. Sun, and J. Sprent, *T cell stimulation in vivo by lipopolysaccharide (LPS)*. J Exp Med, 1997. **185**(12): p. 2089-94.

## Literaturverzeichnis

---

276. Boucas, J., et al., *Label-Free Protein-RNA Interactome Analysis Identifies Khsrp Signaling Downstream of the p38/Mk2 Kinase Complex as a Critical Modulator of Cell Cycle Progression*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0125745.
277. Sundaram, G.M., et al., *'See-saw' expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing*. Nature, 2013. **495**(7439): p. 103-6.
278. Pruksakorn, D., et al., *Overexpression of KH-type splicing regulatory protein regulates proliferation, migration, and implantation ability of osteosarcoma*. Int J Oncol, 2016. **49**(3): p. 903-12.
279. Malz, M., et al., *Overexpression of far upstream element binding proteins: a mechanism regulating proliferation and migration in liver cancer cells*. Hepatology, 2009. **50**(4): p. 1130-9.
280. Dormoy-Raclet, V., et al., *The RNA-binding protein HuR promotes cell migration and cell invasion by stabilizing the beta-actin mRNA in a U-rich-element-dependent manner*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(15): p. 5365-80.
281. Yamazaki, D., S. Kurisu, and T. Takenawa, *Regulation of cancer cell motility through actin reorganization*. Cancer Sci, 2005. **96**(7): p. 379-86.
282. Tadesse, H., et al., *KH-type splicing regulatory protein interacts with survival motor neuron protein and is misregulated in spinal muscular atrophy*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(4): p. 506-24.
283. Gu, W., et al., *A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of beta-actin mRNA in fibroblasts and neurons*. J Cell Biol, 2002. **156**(1): p. 41-51.
284. Blidberg, K., et al., *Increased neutrophil migration in smokers with or without chronic obstructive pulmonary disease*. Respirology, 2012. **17**(5): p. 854-60.
285. Lyck, R. and G. Enzmann, *The physiological roles of ICAM-1 and ICAM-2 in neutrophil migration into tissues*. Curr Opin Hematol, 2015. **22**(1): p. 53-9.
286. Martin-Granados, C., et al., *A key role for PTP1B in dendritic cell maturation, migration, and T cell activation*. J Mol Cell Biol, 2015. **7**(6): p. 517-28.
287. Greifenberg, V., et al., *Myeloid-derived suppressor cell activation by combined LPS and IFN-gamma treatment impairs DC development*. Eur J Immunol, 2009. **39**(10): p. 2865-76.
288. Nakajima, A. and M. Azuma, *[Costimulatory molecules in autoimmunity: role of CD28/CTLA4-CD80/CD86]*. Nihon Rinsho, 1997. **55**(6): p. 1419-24.
289. Prechtel, A.T., et al., *Expression of CD83 is regulated by HuR via a novel cis-active coding region RNA element*. J Biol Chem, 2006. **281**(16): p. 10912-25.
290. Eberhardt, W., et al., *Modulation of mRNA stability as a novel therapeutic approach*. Pharmacol Ther, 2007. **114**(1): p. 56-73.
291. Hinman, M.N. and H. Lou, *Diverse molecular functions of Hu proteins*. Cell Mol Life Sci, 2008. **65**(20): p. 3168-81.
292. Ogilvie, R.L., et al., *Tristetraprolin mediates interferon-gamma mRNA decay*. J Biol Chem, 2009. **284**(17): p. 11216-23.
293. Savan, R., *Post-transcriptional regulation of interferons and their signaling pathways*. J Interferon Cytokine Res, 2014. **34**(5): p. 318-29.
294. Collart, M.A., et al., *Gamma interferon enhances macrophage transcription of the tumor necrosis factor/cachectin, interleukin 1, and urokinase genes, which are controlled by short-lived repressors*. J Exp Med, 1986. **164**(6): p. 2113-8.



295. Feuerer, M., et al., *Self-limitation of Th1-mediated inflammation by IFN-gamma*. J Immunol, 2006. **176**(5): p. 2857-63.
296. Rep, M.H., et al., *Treatment with depleting CD4 monoclonal antibody results in a preferential loss of circulating naive T cells but does not affect IFN-gamma secreting TH1 cells in humans*. J Clin Invest, 1997. **99**(9): p. 2225-31.
297. Finnegan, A., et al., *IL-4 and IL-12 regulate proteoglycan-induced arthritis through Stat-dependent mechanisms*. J Immunol, 2002. **169**(6): p. 3345-52.
298. Chu, C.Q., et al., *IFNgamma deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen induced arthritis with predominant usage of T cell receptor Vbeta6 and Vbeta8 in arthritic joints*. Ann Rheum Dis, 2003. **62**(10): p. 983-90.
299. Kelchtermans, H., A. Billiau, and P. Matthys, *How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check*. Trends Immunol, 2008. **29**(10): p. 479-86.
300. Lee, J., et al., *Interferon gamma suppresses collagen-induced arthritis by regulation of Th17 through the induction of indoleamine-2,3-deoxygenase*. PLoS One, 2013. **8**(4): p. e60900.
301. Mitamura, M., et al., *T cells are involved in the development of arthritis induced by anti-type II collagen antibody*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(10): p. 1360-8.
302. Ogawa, Y., E.A. Duru, and B.T. Ameredes, *Role of IL-10 in the resolution of airway inflammation*. Curr Mol Med, 2008. **8**(5): p. 437-45.
303. Fiorentino, D.F., M.W. Bond, and T.R. Mosmann, *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones*. J Exp Med, 1989. **170**(6): p. 2081-95.
304. Del Prete, G., et al., *Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production*. J Immunol, 1993. **150**(2): p. 353-60.
305. de Araujo-Souza, P.S., S.C. Hanschke, and J.P. Viola, *Epigenetic control of interferon-gamma expression in CD8 T cells*. J Immunol Res, 2015. **2015**: p. 849573.
306. Ahmad, S.F., et al., *STA-21, a STAT-3 inhibitor, attenuates the development and progression of inflammation in collagen antibody-induced arthritis*. Immunobiology, 2017. **222**(2): p. 206-217.
307. Roncarolo, M.G., et al., *Tr1 cells and the counter-regulation of immunity: natural mechanisms and therapeutic applications*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **380**: p. 39-68.
308. Kishore, R., et al., *Cutting edge: clustered AU-rich elements are the target of IL-10-mediated mRNA destabilization in mouse macrophages*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2457-61.
309. Powell, M.J., et al., *Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression through sequences in the 3'-untranslated region*. J Immunol, 2000. **165**(1): p. 292-6.
310. Tudor, C., et al., *The p38 MAPK pathway inhibits tristetraprolin-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages*. FEBS Lett, 2009. **583**(12): p. 1933-8.
311. Sarkar, S., et al., *AUF1 isoform-specific regulation of anti-inflammatory IL10 expression in monocytes*. J Interferon Cytokine Res, 2008. **28**(11): p. 679-91.
312. Krishnamurthy, P., et al., *Myocardial knockdown of mRNA-stabilizing protein HuR attenuates post-MI inflammatory response and left ventricular dysfunction in IL-10-null mice*. FASEB J, 2010. **24**(7): p. 2484-94.
313. Gagliardi, M. and M.R. Matarazzo, *RIP: RNA Immunoprecipitation*. Methods Mol Biol, 2016. **1480**: p. 73-86.

## Literaturverzeichnis

---

314. Malek, T.R., *The biology of interleukin-2*. Annu Rev Immunol, 2008. **26**: p. 453-79.
315. Matsuda, H., et al., *Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(8): p. 1050-4.
316. Zheng, W. and R.A. Flavell, *The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells*. Cell, 1997. **89**(4): p. 587-96.
317. Cohen, J.L. and B.L. Salomon, *Therapeutic potential of CD4+ CD25+ regulatory T cells in allogeneic transplantation*. Cytotherapy, 2005. **7**(2): p. 166-70.
318. Pellerin, L., et al., *Regulatory T cells and their roles in immune dysregulation and allergy*. Immunol Res, 2014. **58**(2-3): p. 358-68.
319. Renauld, J.C., et al., *Interleukin-9 and its receptor: involvement in mast cell differentiation and T cell oncogenesis*. J Leukoc Biol, 1995. **57**(3): p. 353-60.
320. McLane, M.P., et al., *Interleukin-9 promotes allergen-induced eosinophilic inflammation and airway hyperresponsiveness in transgenic mice*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1998. **19**(5): p. 713-20.
321. Dong, Q., et al., *IL-9 induces chemokine expression in lung epithelial cells and baseline airway eosinophilia in transgenic mice*. Eur J Immunol, 1999. **29**(7): p. 2130-9.
322. Vink, A., et al., *Interleukin 9-induced in vivo expansion of the B-1 lymphocyte population*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1413-23.
323. Li, H., et al., *IL-9 is important for T-cell activation and differentiation in autoimmune inflammation of the central nervous system*. Eur J Immunol, 2011. **41**(8): p. 2197-206.
324. Ouyang, H., et al., *Increased interleukin9 and CD4+IL-9+ T cells in patients with systemic lupus erythematosus*. Mol Med Rep, 2013. **7**(3): p. 1031-7.
325. Chabaud, M., et al., *Human interleukin-17: A T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium*. Arthritis Rheum, 1999. **42**(5): p. 963-70.
326. Lubberts, E., et al., *IL-1-independent role of IL-17 in synovial inflammation and joint destruction during collagen-induced arthritis*. J Immunol, 2001. **167**(2): p. 1004-13.
327. Nakae, S., et al., *Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice*. J Immunol, 2003. **171**(11): p. 6173-7.
328. Komiyama, Y., et al., *IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2006. **177**(1): p. 566-73.
329. Irmiler, I.M., M. Gajda, and R. Brauer, *Exacerbation of antigen-induced arthritis in IFN-gamma-deficient mice as a result of unrestricted IL-17 response*. J Immunol, 2007. **179**(9): p. 6228-36.
330. Berner, B., et al., *Analysis of Th1 and Th2 cytokines expressing CD4+ and CD8+ T cells in rheumatoid arthritis by flow cytometry*. J Rheumatol, 2000. **27**(5): p. 1128-35.
331. Komai, M., et al., *Role of Th2 responses in the development of allergen-induced airway remodelling in a murine model of allergic asthma*. Br J Pharmacol, 2003. **138**(5): p. 912-20.
332. De Vooght, V., et al., *Neutrophil and eosinophil granulocytes as key players in a mouse model of chemical-induced asthma*. Toxicol Sci, 2013. **131**(2): p. 406-18.
333. Venkayya, R., et al., *The Th2 lymphocyte products IL-4 and IL-13 rapidly induce airway hyperresponsiveness through direct effects on resident airway cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 2002. **26**(2): p. 202-8.
334. Wynn, T.A., *IL-13 effector functions*. Annu Rev Immunol, 2003. **21**: p. 425-56.

335. Choy, D.F., et al., *TH2 and TH17 inflammatory pathways are reciprocally regulated in asthma*. *Sci Transl Med*, 2015. **7**(301): p. 301ra129.
336. Tagaya, E. and J. Tamaoki, *Mechanisms of airway remodeling in asthma*. *Allergol Int*, 2007. **56**(4): p. 331-40.
337. Laoukili, J., et al., *IL-13 alters mucociliary differentiation and ciliary beating of human respiratory epithelial cells*. *J Clin Invest*, 2001. **108**(12): p. 1817-24.
338. Shim, J.J., et al., *IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001. **280**(1): p. L134-40.
339. Fukushima, A., et al., *Mice lacking the IFN-gamma receptor or fyn develop severe experimental autoimmune uveoretinitis characterized by different immune responses*. *Immunogenetics*, 2005. **57**(5): p. 337-43.
340. Hohler, T., et al., *A genetic basis for IFN-gamma production and T-bet expression in humans*. *J Immunol*, 2005. **175**(8): p. 5457-62.
341. Finotto, S., et al., *Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet*. *Science*, 2002. **295**(5553): p. 336-8.

### 12. Publikationen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in Fachzeitschriften oder als Kongressbeiträge publiziert.

#### Publikationen

- 2018 The RNA binding protein KSRP affects T cell functions  
**Käfer R**, Schmidtke L, Schrick K, Montermann E, Bros M, Kleinert H, Pautz A.  
zur Publikation eingereicht
- 2018 The KH-type splicing regulatory protein (KSRP) regulates type III interferon expression posttranscriptionally  
Schmidtke L, Schrick K, Saurin S, **Käfer R**, Gather F, Weinmann-Menke J, Kleinert H, Pautz A.  
Biochem J. 2018 Dec 21
- 2017 Inactivation of the KSRP gene modifies collagen antibody induced arthritis  
**Käfer R**, Schrick K, Schmidtke L, Montermann E, Hobernik D, Bros M, Chen CY, Kleinert H, Andrea P.  
Mol Immunol. 2017 Jul; 87:207-216. Epub 2017 May 13.

#### Abstract / Poster

- 2016 The role of the RNA binding protein KH-type splicing regulatory protein (KSRP) in pro-inflammatory gene expression  
**Käfer R**, Schrick K, Schmidtke L, Montermann E, Mitschke S, Bros, Kleinert H, Pautz A.  
46<sup>th</sup> Annual Meeting German Society for Immunology (DGfI), 27-30.11.2016 in Hamburg

**13. Lebenslauf**

**PERSÖNLICHE DATEN**

---

**SCHULISCHE UND AKADEMISCHE AUSBILDUNG**

---