

Charakterisierung des murinen Fc γ RII bei Entzündung und Autoimmunität

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

Genehmigte Dissertation von
Dipl.-Biol. Iska Janssen-Graalfs
geboren am 2. 12. 1967
in Hannover

2000

Referent:

Prof. Dr. W. Müller

Abt. Physiol. Chemie

Med. Hochschule Hannover

Koreferent:

Prof. Dr. R. E. Schmidt

Abt. Klin. Immunologie

Med. Hochschule Hannover

Tag der Promotion:

28. Juni 2000

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1995 bis Oktober 1999 in der Arbeitsgruppe von PD. Dr. J. E. Gessner, Abteilung Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leiter: Prof. Dr. R. E. Schmidt) mit Unterstützung der DFG, Projekt Ge 892/5-1 und Projekt Ge 892/2-2 durchgeführt.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlichst bei allen bedanken, die mich bei der Fertigstellung meiner Dissertation unterstützt haben:

Herrn Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können sowie für die Übernahme des Koreferats,

Herrn PD. Dr. J. Engelbert Geßner für die wissenschaftliche Betreuung, seine Diskussionsbereitschaft und seine fachkundigen Tips vor allem in der molekularbiologischen Methodik,

Herrn Prof. Walter H. Müller für die Übernahme des Referats und seine beruhigende Hilfestellung bei der formalen Abwicklung und insbesondere bei der Terminplanung,

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie, die trotz der Arbeit in einem Großraumlabor immer freundschaftlich zusammengehalten haben und für ein entspanntes und lustiges Klima gesorgt haben, Dr. Carsten Schiller für seine wahnsinnige Geduld und noch viel viel mehr, Frank Heusohn für seine - vielleicht manchmal etwas übertriebene - soziale Ader, Dr. Dirk Meyer für zahlreiche Hilfestellungen und die gute Zusammenarbeit, Fabian Löscher dafür, daß er so ein angenehmer Diplomand war und für seine sehr gute Diplomarbeit, Dr. Nelli Chouchakova für ihre hilfsbereite Art, Gundula Wirries für viel Humor und ihr Organisationstalent und Dr. Uli Baumann für seine hervorragenden diplomatischen Eigenschaften und fachlichen Tips im medizinischen Bereich,

Herrn Dr. S. Verbeek für die Kooperation bezüglich der *FcγRIIb1-knock out*-Maus, der Arbeitsgruppe von Herrn PD. Dr. H. Radecke für die gute Zusammenarbeit und die Bereitstellung der murinen Mesangialzellen sowie Herrn Dr. J. Westermann für seine Ratschläge bezüglich der Immunhistochemie,

Dr. Roland Jacobs für den Austausch im Informatikbereich und dem Routinelabor für die geduldige Bereitstellung des Mikrotoms und des Floureszenzmikroskops,

Ellis für die langjährige Freundschaft und ihre kontinuierliche mentale Unterstützung, Ute für die Freundschaft, den Schrebergarten und ihren fachkundigen Beistand als VMTA, Thomas Rafalzyk für die geduldige Digitalisierung unzähliger Dias und meinen Mitmusikern, die für einen spannenden Ausgleich aber auch manchmal für Schlafdefizite gesorgt haben

und ganz besonders meinen Eltern, die mich in jeder Hinsicht (inklusive Endkorrektur!) bei dieser Arbeit unterstützt haben.

Zusammenfassung

Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) spielen eine bedeutende Rolle für das Immunsystem, indem sie das strukturelle und funktionelle Bindeglied zwischen Immunglobulin G (IgG) und der Effektorzelle darstellen und damit zwischen humoralen und zellulären Reaktionen vermitteln. Den Fc γ -Rezeptoren gehören verschiedene Isoformen an, die durch homologe extrazelluläre Domänen ähnliche Ligandenbindungseigenschaften aufweisen, aber durch heterologe zytoplasmatische Domänen unterschiedliche Effektorfunktionen vermitteln. So transduzieren der Fc γ RIII und der Fc γ RI (beides multimere Proteine) über die gemeinsame FcR γ -Kette ein aktivatorisches, der monomere Fc γ RII aber ein inhibitorisches Signal in die Zelle. Die Bedeutung der einzelnen Isoformen läßt sich vor allem anhand verschiedener *knock out*-Mausmodelle aufklären, die in den letzten Jahren generiert worden sind. Hier wurde unter anderem die inhibitorische Funktion des Fc γ RII bei der Glomerulonephritis, der Arthus Reaktion sowie der Passiven Anaphylaxie gezeigt. Interessanterweise spielt der Fc γ RII aber scheinbar bei der Autoimmunen Hämolytischen Anämie (AIHA) keine regulative Rolle. Sowohl der Hämatokritabfall als auch die Erythrophagozytose durch Kupfferzellen der Leber ist in Fc γ RII^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtypmäusen unverändert. Die Möglichkeit, daß der Fc γ RII in der Leber nicht exprimiert wird, konnte durch immunhistochemische Analysen ausgeschlossen werden. Auch eine Expressionsregulation des Fc γ RII oder auch des Fc γ RIII findet in der Leber nicht statt, wie es hingegen in der Niere zu beobachten ist: während der Fc γ RII in der Niere konstitutiv exprimiert wird, kann die Fc γ RIII-Expression erst durch LPS *in vivo* induziert werden. In Primärkulturen muriner Mesangialzellen (MCs) der Niere, die potentiell an der Entwicklung einer Glomerulonephritis beteiligt sind, konnte eine gegensätzliche Regulation der Fc γ RII/Fc γ RIII-Expression sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene nach IFN- γ -Stimulation beobachtet werden. Darüber hinaus reagieren MCs aus Wildtypmäusen im Vergleich zu MCs aus FcR γ ^{-/-}-Mäusen mit einer erhöhten Sekretion der Chemokine KC und MCP-5 auf die Stimulation mit IgG-Immunkomplexen nach Vorinkubation mit IFN γ /LPS, was die mögliche Bedeutung der Fc γ -Rezeptor-Expression auf residenten Mesangialzellen für die Glomerulonephritis unterstützt. Die differente Rolle des Fc γ RII für verschiedene Entzündungsreaktionen könnte in der zelltypspezifischen Expression von zwei alternativ gespeißten Isoformen (Fc γ RIIb1 und Fc γ RIIb2) liegen, deren Funktionsunterschiede bislang noch ungenügend geklärt sind. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde schließlich in dieser Arbeit mit der Herstellung einer Fc γ RIIb1-spezifischen *knock-out*-Maus begonnen, die derzeit als gezielt mutierte Embryonale Stammzelle vorliegt.

Fc γ -Rezeptor, Glomerulonephritis, Autoimmune Hämolytische Anämie

Summary

Fc γ receptors play an essential role in immune regulation as they serve to link immunoglobulin G- (IgG-)mediated responses to cellular effector functions. The members of the Fc γ receptor family are composed of homologous extracellular domains but differ in their cytoplasmic regions, which results in different consequences for the immune reaction. Fc γ RI and Fc γ RIII are multimeric complexes and transduce an activatory signal via the common Fc receptor γ -chain. On the other hand, Fc γ RII is known to play a regulatory role on B cells and mast cells. Several Fc γ receptor deficient mice were generated to provide further insights into the *in vivo*-functions of different Fc γ receptor isoforms. Fc γ RII-deficient mice show augmented inflammatory reactions concerning glomerulonephritis, arthus reaction and passive anaphylaxis. Interestingly, the Fc γ RII seems not to play a regulatory role in autoimmune hemolytic anemia (AIHA). Neither the values of hematocrit nor the erythrophagocytosis of Kupffer cells in the liver differ in Fc γ RII^{-/-} mice in comparison with wildtype mice after inducing an experimental AIHA by the application of anti erythrocyte antibodies. The possibility, that Fc γ RII is not expressed in the liver could be excluded by immunohistochemical analysis. Furthermore, there is no regulation of Fc γ RII or Fc γ RIII expression in the liver as observed in the kidney: while Fc γ RII is constitutively expressed in the kidney, Fc γ RIII is only expressed after LPS induction *in vivo*. In primary cultures of glomerular murine mesangial cells (MCs), potentially involved in glomerulonephritis, IFN γ stimulation leads to opposing effects of Fc γ RII and Fc γ RIII expression, analysed by RT-PCR and immunocytochemistry. Furthermore MCs from wildtype mice secrete KC and MCP-5 after stimulation with IFN γ /LPS and IgG immune complexes, which is significantly reduced in MCs from Fc γ R^{-/-} mice, indicating the relevance of Fc γ receptor expression of mesangial cells for the induction of glomerulonephritis. The reason for the different significance of Fc γ RII for AIHA and glomerulonephritis could be explained by the cell type specific alternatively spliced isoforms of Fc γ RII (Fc γ RIIb1/b1' and Fc γ RIIb2). Since the *in vivo* functions of Fc γ RIIb1 and Fc γ RIIb2 can not be determined by experiments with Fc γ RII^{-/-}-deficient mice in detail, Embryonic Stem cells (ES-cells) were altered by homologous recombination of the alternatively spliced C1 Exon of Fc γ RII. This is thought to lead to the production of a Fc γ RIIb1/b1'-specific knock out mouse. In this work one ES cell clone (C2D6) was obtained with the desired mutation. In cooperation with J. Verbeek, Netherlands, C2D6 cell clones will be transplanted in the near future to generate Fc γ RIIb1/b1'-deficient mice.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Fc-Rezeptoren	1
1.1.1	Der hochaffine Fc γ RI	4
1.1.2	Der niedrigaffine Fc γ RII	6
1.1.3	Der niedrigaffine Fc γ RIII	8
1.2	Fc γ -Rezeptor-abhängige Signaltransduktionswege	10
1.3	Fc γ -Rezeptor <i>knock out</i> -Mausmodelle	11
1.4	Fc γ -Rezeptor-abhängige Autoimmunreaktionen	13
1.4.1	Autoimmune Hämolytische Anämie (AIHA)	13
1.4.2	Glomerulonephritis (GN)	14
1.5	Zielsetzung	17
2	MATERIAL UND METHODEN	18
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterienstämme	18
2.1.2	Chemikalien	18
2.1.3	Feinchemikalien	19
2.1.4	Enzyme	20
2.1.5	Antikörper	20
2.1.6	Verbrauchsmaterialien	20
2.1.7	Nukleinsäuren	21
2.1.8	Mausstämme	24
2.2	Methoden	24
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	24
2.2.1.1	Bakterienkultur	24
2.2.1.1.1	Medien	24
2.2.1.1.2	Übernachtskulturen transformierter Bakterien	25
2.2.1.1.3	Anlegen einer Stammkultur	25
2.2.1.2	Isolierung von Nukleinsäuren	26
2.2.1.2.1	Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA	26
2.2.1.2.2	Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen	28
2.2.1.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA	28
2.2.1.3	Quantitative DNA- und RNA-Analyse	29
2.2.1.4	Restriktionsverdau von DNA	30
2.2.1.5	Gelelektrophoresen	30
2.2.1.5.1	Agarosegelelektrophorese	30

2.2.1.5.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	31
2.2.1.6	Elution von DNA aus Agarosegelen	32
2.2.1.7	Qualitative DNA-Analyse	33
2.2.1.7.1	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten	33
2.2.1.7.2	Immobilisierung von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren auf Nylonmembranen.....	34
2.2.1.7.3	Hybridisierungen	34
2.2.1.7.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	35
2.2.1.8	Qualitative und Quantitative RNA-Analysen.....	36
2.2.1.8.1	RT-PCR.....	36
2.2.1.8.2	Northernblot	36
2.2.1.8.3	<i>RNase Protection Assay</i> (RPA)	37
2.2.1.9	Biochemische DNA-Rekombination (DNA-Klonierung).....	39
2.2.1.9.1	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> (CaCl ₂ -Methode).....	39
2.2.1.9.2	Ligation.....	40
2.2.1.9.3	Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA mittels "calf intestinal alkaline phosphatase" (CIP) Phosphatasereaktion.....	40
2.2.1.9.4	Transformation.....	41
2.2.1.9.5	Visualisierung erfolgreicher Klonierungen mittels α -Komplementation der β - Galaktosidase	41
2.2.2	Zellkultur	42
2.2.2.1	Kultur muriner Zelllinien	42
2.2.2.1.1	Expansion von Zelllinien	42
2.2.2.1.2	Trypsinisierung adhärenter Zellen	43
2.2.2.1.3	Bestimmung der Lebendzellzahl.....	43
2.2.2.1.4	Auftauen von Zellen.....	43
2.2.2.1.5	Einfrieren von Zellen	43
2.2.2.2	Präparation und Kultur primärer muriner Zellen	44
2.2.2.2.1	Präparation und Kultur muriner Embryonaler Fibroblasten (MEF)	44
2.2.2.2.2	Kultur Embryonaler Stammzellen (ES-Zellen).....	47
2.2.2.2.3	Transfektion, Selektion und genomische Analyse Neomycin-resistenter Embryonaler Stammzellen.....	47
2.2.2.2.4	Präparation und Kultur muriner Mesangialzellen (MMC).....	48
2.2.2.2.5	Präparation muriner Peritoneal-Makrophagen.....	49
2.2.3	Proteinchemische Methoden.....	49
2.2.3.1	Biotinylierung von Antikörpern	49
2.2.4	Tierversuche.....	50
2.2.4.1	Induktion einer experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA).....	50
2.2.5	Immunhistochemische und -zytochemische Methoden	50
2.2.5.1	Kryostatschnitte	50
2.2.5.2	Zytopräparate.....	50

2.2.5.3	Immunfärbungen.....	51
2.2.5.3.1	Immunfärbung mit der APAAP-(Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-) Methode.....	51
2.2.5.3.2	Immunfärbungen mit dem <i>EnVision</i> -System	52
2.2.5.3.3	Immunhistochemische Färbungen mit biotinylierten Primärantikörpern.....	53
3	ERGEBNISSE	54
3.1	Entwicklung verschiedener Methoden zur differenziellen Analyse der Fc-Rezeptor-Expression in Zellen und im Gewebe der Maus	54
3.1.1	RT-PCR.....	54
3.1.2	Herstellung von Fc γ -Rezeptor-spezifischen Sonden- <i>templates</i> für die Generierung radioaktiver Sonden	56
3.1.3	Northernblot.....	57
3.1.4	<i>RNase Protection Assay</i> (RPA)	59
3.1.5	Immunzytochemie	62
3.1.6	Immunhistochemie	63
3.2	Die Rolle des Fc γ RII bei der Autoimmunen Hämolytischen Anämie (AIHA) ..	65
3.2.1	Nachweis der Fc γ RII-Expression in der murinen Leber mittels Immunhistochemie	66
3.2.2	Darstellung und Quantifizierung der Erythrophagozytose in der Leber von Fc γ RII ^{-/-} -Mäusen nach Induktion einer AIHA mit dem 105-2H.....	68
3.2.3	Analyse einer möglichen Regulation des Fc γ RIII auf Kupfferzellen bei der experimentellen AIHA	70
3.2.4	Analyse einer möglichen Regulation der Fc γ RII-Expression auf Kupfferzellen bei der experimentellen AIHA	71
3.2.5	Darstellung der Fc γ RII-Expression mit dem anti-Ly-17.2 bei der experimentellen AIHA	72
3.2.6	Immunhistochemische Analyse des Zusammenhanges zwischen Rezeptordichte und Phagozytoserate	74
3.2.7	RT-PCR Analyse der Fc γ RII-Expression in der Leber und in Peritonealmakrophagen...	75
3.3	Glomerulonephritis.....	77
3.3.1	Analyse der Immunkomplexablagerung in der Niere verschiedener Fc γ -Rezeptor-defizienter Mäuse	77
3.3.2	Immunhistochemische Analyse der Fc γ -Rezeptor-Expression in der murinen Niere	79
3.3.3	Analyse der Fc γ -Rezeptor-Expression in murinen Mesangialzellen.....	81
3.3.3.1	Analyse der Fc γ -Rezeptor-Expression in murinen Mesangialzellen nach IFN γ /LPS und TNF α /IL1 β -Stimulation sowie in unstimulierten Zellen.	82
3.3.3.2	Fc γ -Rezeptor-Expression nach separater IFN γ - und LPS-Stimulation.....	86
3.3.3.3	Dosisabhängigkeit der Fc γ -Rezeptor-Expression bezüglich der IFN γ -Stimulation.....	87
3.3.4	Analyse der Chemokin-Expression in murinen Mesangialzellen	89
3.3.4.1	Klonierung der Sonden- <i>templates</i> für die Detektion muriner Chemokine	89

3.3.4.2	RNA-Analysen der Chemokin-Expression von stimulierten Mesangialzellen aus Wildtyp- und FcR γ ^{-/-} -Mäusen.....	90
3.4	Gezielte Mutagenese Embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) mittels homologer Rekombination zur Herstellung von Fc γ RIIb1- <i>knock out</i> -Mäusen	94
4	DISKUSSION.....	101
4.1	Methodische Ansätze zur Unterscheidung einzelner Fc γ Rezeptoren	101
4.2	Die Rolle des Fc γ RII bei der Autoimmunen Hämolytischen Anämie (AIHA)	105
4.3	Glomerulonephritis.....	108
4.3.1	Immunkomplexablagerungen und Fc γ -Rezeptor-Expression in der murinen Niere	109
4.3.2	Fc γ -Rezeptor-Expression in Primärkulturen muriner Mesangialzellen	111
4.3.3	Chemokin-Expression in Primärkulturen muriner Mesangialzellen	114
4.4	Gezielte Mutagenese Embryonaler Stammzellen zur Herstellung von Fc γ RIIb1-defizienten Mäusen.....	116
5	LITERATUR.....	118
6	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	133
7	LEBENS LAUF.....	136
8	PUBLIKATIONS LISTE.....	137

1 Einleitung

1.1 Fc-Rezeptoren

Rezeptoren für den Fc-Teil von Immunglobulinen (Fc-Rezeptoren) sind auf allen Zellen des Immunsystems exprimiert und stellen das funktionelle und strukturelle Bindeglied zwischen Antikörper-vermittelter, humoraler Immunantwort und zellulären Effektorfunktionen dar. Antikörper (Immunglobuline; Ig) erkennen durch ihren Fab-Teil (*fragment antigen binding*) ein spezifisches Epitop eines Antigens und können über ihren Fc-Teil (*fragment crystallizable*) von Fc-Rezeptoren gebunden werden. Es existieren verschiedene Antikörperklassen, die durch unterschiedliche Strukturen ihrer schweren Ketten im Fc-Teil eigene Charakteristika aufweisen. Diese werden von spezifischen Fc-Rezeptorklassen gebunden, welche nach der schweren Kette ihres jeweiligen Liganden bestimmt werden (Fc α R für IgA, Fc δ R für IgD, Fc μ R für IgM, Fc γ R für IgG und Fc ϵ R für IgE) (Ravetch, J.V. und Kinet, J.P., 1991; van de Winkel, J.G. und Capel, P.J., 1993; Hulett, M.D. und Hogarth, P.M., 1994).

Die Fc-Rezeptoren sind Glykoproteine und gehören der Immunglobulin Superfamilie an, die durch Ig ähnliche extrazelluläre Domänen gekennzeichnet sind. Ausnahmen stellen der niedrigaffine Fc ϵ RII dar, der eine lektinähnliche Struktur aufweist (Ikuta, K. et al., 1987) und der neonatale intestinale Transport-Rezeptor (FcRn) der strukturelle Ähnlichkeiten mit MHC Klasse I-Molekülen aufweist (Simister, N.E. und Mostov, K.E., 1989). Während die Struktur und Funktionen von Fc γ -, Fc α - und Fc ϵ -Rezeptoren bereits eingehend untersucht werden, sind für die anderen Fc-Rezeptorklassen (Fc δ R und Fc μ R) noch keine genomischen Sequenzen beschrieben worden.

Der Fc ϵ RI ist ein multimerer Komplex aus einer ligandenbindenden α -Kette, einer β -Kette und einem γ -Ketten-Dimer. Er wird auf Basophilen und Mastzellen exprimiert und ist an IgE-vermittelten allergischen Reaktionen beteiligt, indem seine Aktivierung über die Bindung von monomerem IgE und die nachfolgende Kreuzvernetzung durch das Antigen unter anderem die Ausschüttung von Histamin und Serotonin bewirkt (Parker, C.W., 1987; Burd, P.R. et al., 1989; Ravetch, J.V., 1994).

Der $Fc\alpha R$ ist auf den meisten phagozytierenden Zellen im Blut und in Schleimhautgeweben gefunden worden und seine Aktivierung führt zur Phagozytose, Degranulation, Ausschüttung von Sauerstoffradikalen (*oxidative burst*) und inflammatorischen Mediatoren sowie zur *antibody dependent cellular cytotoxicity* (ADCC) (Kerr, M.A. et al., 1990). Es ist wie der $Fc\epsilon RI$, der $Fc\gamma RI$ und der $Fc\gamma RIII$ mit der signaltransduzierenden γ -Kette assoziiert (Morton, H.C. et al., 1995; van Vugt, M.J. et al., 1996).

Die neben dem $Fc\epsilon R$ am besten untersuchten Fc-Rezeptoren sind die $Fc\gamma$ -Rezeptoren. Sie bestehen aus homologen extrazellulären Domänen und weisen unterschiedliche zytoplasmatische Regionen auf, so daß sie bei ähnlicher Bindung mit ihrem Liganden (IgG) unterschiedliche Effektorfunktionen vermitteln (Abb. 1 und Abb. 2). Hierzu gehört die erleichterte Phagozytose Antikörper-opsonierter Partikel, die Ausschüttung entzündlicher Mediatoren, die Vermittlung der ADCC. Ein Sonderfall stellt der $Fc\gamma RIIB$ dar, der eine immunmodulatorische Funktion übernimmt (Ravetch, J.V. und Kinet, J.P., 1991; van de Winkel, J.G. und Capel, P.J., 1993; Hulett, M.D. und Hogarth, P.M., 1994; Gessner, J.E. et al., 1998).

$Fc\gamma$ -Rezeptoren werden in drei Klassen eingeteilt, den hochaffinen $Fc\gamma RI$ und die niedrigaffinen $Fc\gamma RII$ und $Fc\gamma RIII$. Durch die unterschiedlichen Affinitäten binden die niedrigaffinen $Fc\gamma$ -Rezeptoren ausschließlich Immunkomplexe, wohingegen der $Fc\gamma RI$ auch monomeres IgG binden kann. Des weiteren sind für die drei Rezeptorklassen verschiedene Isoformen charakterisiert worden, die einzelne IgG-Subklassen mit einer unterschiedlichen Affinität binden können. Diese unterschiedlichen Affinitäten, aber auch der variable Aufbau der zytoplasmatischen Domänen, sowie die zelltypspezifische Expression einzelner Isoformen bieten ein breites Spektrum zellulärer Antworten auf die Bindung von IgG. Die Funktionsunterschiede zwischen den Rezeptorklassen beruhen auf verschiedenen Signaltransduktionswegen, die durch bestimmte zytoplasmatische Motive aktiviert werden. Dabei handelt es sich um ein inhibitorisch wirksames Motiv, das sogenannte ITIM (*immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif*) im $Fc\gamma RIIB$ und ein aktivatorisches Motiv, das ITAM (*immunoreceptor tyrosin-based activatory motif*) in der $Fc\gamma RI$ - und $Fc\gamma RIII$ -assoziierten γ -Kette sowie in der cytoplasmatischen Domäne des monomeren $hFc\gamma RIa$ (Bonnerot, C. et al., 1992; Muta, T. et al., 1994). Diese

überlappenden Eigenschaften bezüglich Struktur, Funktion und zellulärer Verteilung erschweren die Analyse und Charakterisierung der einzelnen Fc γ -Rezeptor-Isoformen. Durch geeignete Transfektionsversuche, aber auch durch die in den letzten Jahren erfolgte Generierung von Fc γ -Rezeptor-*knock out*-Mäusen haben zu einer weiteren Aufklärung der Bedeutung der Fc γ -Rezeptor-Isoformen für das Immunsystem geführt (Ravetch, J.V. und Kinet, J.P., 1991; Ravetch, J.V., 1994; Ravetch, J.V., 1997; Gessner, J.E. et al., 1998). Die Charakteristika der drei Fc γ -Rezeptorklassen werden im folgenden einzeln aufgeführt.

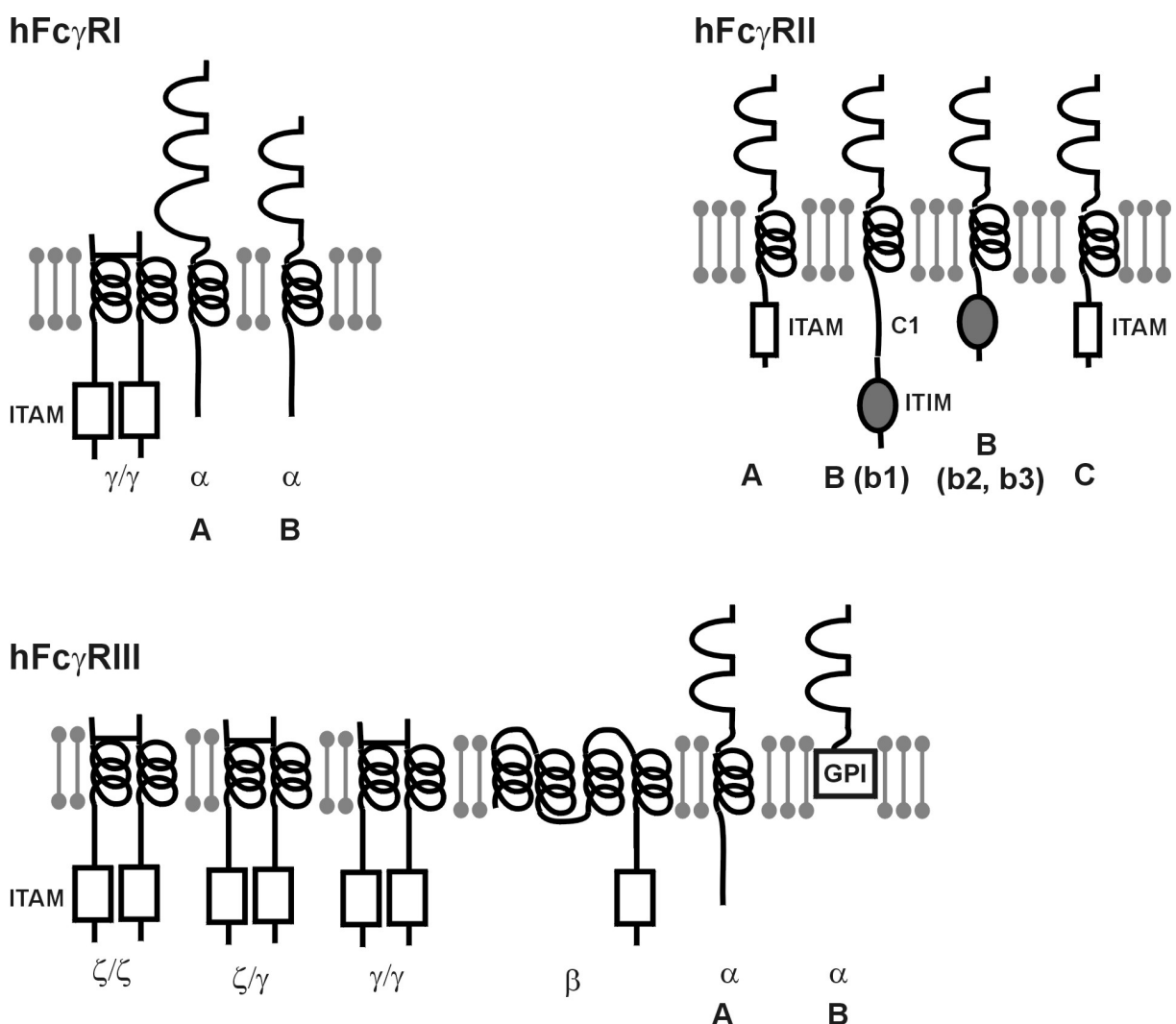


Abb. 1: Proteinstruktur der humanen Fc γ -Rezeptoren (hFc γ R). Die verschiedenen Untereinheiten sind mit griechischen Buchstaben, divergente Gene mit Großbuchstaben und unterschiedliche Spleißprodukte mit Kleinbuchstaben bezeichnet. (ITAM: *immunoreceptor tyrosin activation motif*, ITIM: *immunoreceptor inhibitory motif*, C1: zytosolische Domäne 1).

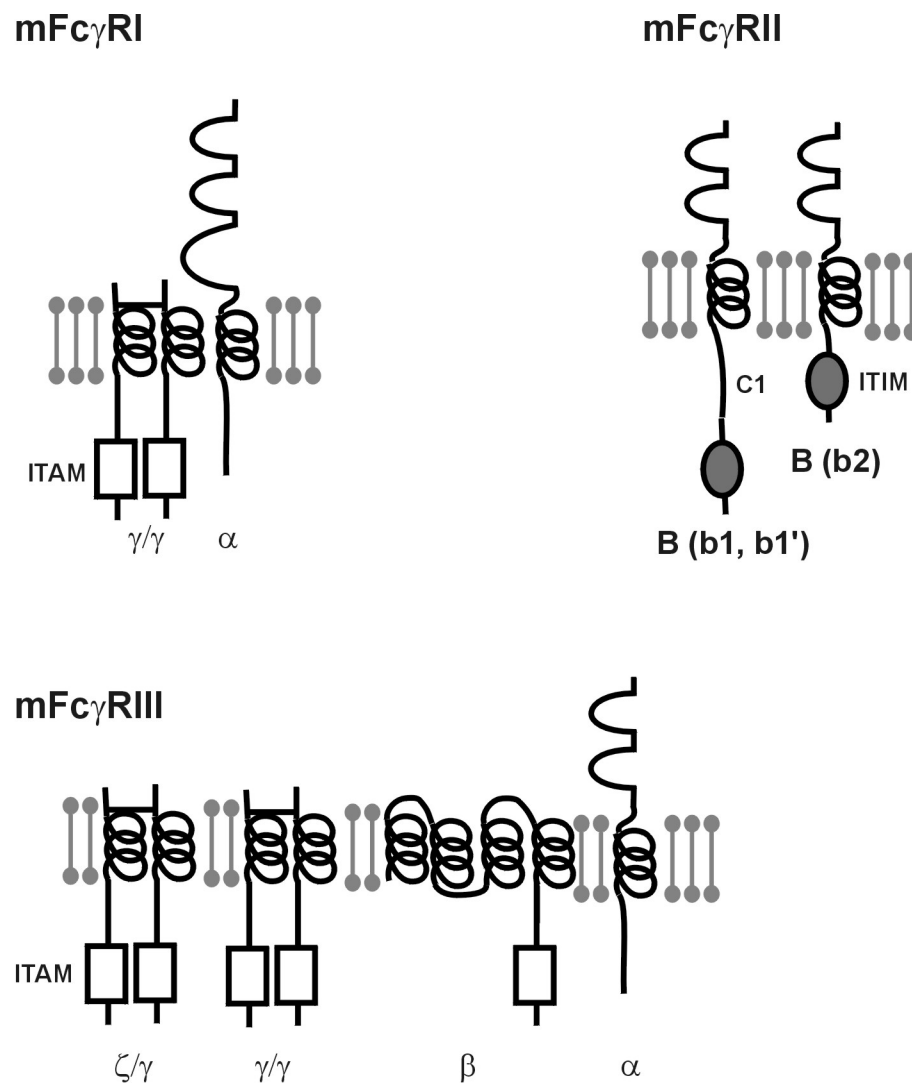


Abb. 2: Proteinstruktur der murinen Fc γ -Rezeptoren (mFc γ R). Die verschiedenen Untereinheiten sind mit griechischen Buchstaben und die unterschiedlichen Spleißprodukte des Fc γ RII mit Kleinbuchstaben bezeichnet. (ITAM: *immunoreceptor tyrosin activation motif*, ITIM: *immunoreceptor inhibitory motif*, C1: zytosmatische Domäne 1).

1.1.1 Der hochaffine Fc γ RI

Der Fc γ RI besteht aus verschiedenen Untereinheiten: der ligandenbindenden α -Kette und einem signaltransduzierenden γ -Ketten-Dimer, das durch Disulfidbrücken miteinander verbunden und identisch mit der zunächst für den Fc ϵ RI beschriebenen γ -Kette ist (Ra, C. et al., 1989) (Abb. 1 und Abb. 2).

Die Fc γ RI α -Kette besteht in ihrem extrazellulären Bereich aus drei Ig-ähnlichen Domänen, wobei die beiden membrandistalen Domänen eine starke Homologie zu den beiden extrazellulären Domänen der niedrigaffinen Fc γ RII und Fc γ RIII aufweisen. Die dritte, membranproximale Domäne wird für die hohe Affinität und die Eigenschaft monomeres IgG binden zu können, verantwortlich gemacht (Allen, J.M. und Seed, B., 1989; Hulett, M.D. et al., 1991). Im Vergleich zum humanen Fc γ RI, für den drei Genloci beschrieben sind (Ernst, L.K. et al., 1992), ist für den murinen Fc γ RI bislang nur ein Genort gefunden worden (Sears, D.W. et al., 1990). Allerdings ist für den humanen Fc γ RI nur eine membranständige Isoform nachgewiesen worden, die vom hFc γ RIA-Gen exprimiert wird. Die Expression der beiden anderen Genloci, hFc γ RIB und hFc γ RIC, führt durch die Existenz eines Stopcodons in der extrazellulären Domäne 3 (EC3) zu löslichen Formen des Rezeptors. Eine beschriebene, membranständige Spleißvariante des B-Gens konnte bislang lediglich in *in vitro*-Transfektionssystemen nachgewiesen werden (Porges, A.J. et al., 1992).

Durch die Verfügbarkeit monoklonaler Antikörper (mAbs) gegen den humanen Fc γ RI ist seine Protein-Expression weitaus besser untersucht als die des murinen Fc γ RI, gegen den bislang keine Antikörper generiert werden konnten. Der hFc γ RI wird auf Monozyten/Makrophagen konstitutiv exprimiert und kann in Neutrophilen, Eosinophilen und Mesangialzellen durch Interferon- γ (IFN γ) induziert werden (van de Winkel, J.G. und Capel, P.J., 1993; Uciechowski, P. et al., 1998). Des Weiteren sind IL-10 und GM-CSF als induzierende Faktoren für die hFc γ RI-Expression beschrieben (te Velde, A.A. et al., 1992; Kerst, J.M. et al., 1993), während IL-4 einen inhibitorischen Einfluß auf seine Expression hat (te Velde, A.A. et al., 1990).

Sowohl der hFc γ RI als auch der mFc γ RI binden mit einer hohen Affinität monomeres IgG2a, während IgG1 vom mFc γ RI nicht gebunden wird und eine IgG1-vermittelte Phagozytose über den Fc γ RI somit auch nicht beobachtet werden kann (Meyer, D. et al., 1998).

1.1.2 Der niedrigaffine Fc γ RII

Der Fc γ RII besteht im Gegensatz zu den beiden anderen Fc γ -Rezeptorklassen aus einer einzelnen α -Kette, die sowohl die ligandenbindenden Domänen, als auch die signaltransduzierenden zytoplasmatischen Bereiche umfaßt. Er ist der am weitesten verbreitete Fc γ -Rezeptor und ist auf Neutrophilen, Basophilen und Eosinophilen Granulozyten, auf Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Langerhans Zellen, Dendritischen Zellen sowie auf B-Zellen und einigen Subpopulationen von T-Zellen zu finden (Unkeless, J.C. et al., 1988; Hulett, M.D. und Hogarth, P.M., 1994; Thomas, R. und Lipsky, P.E., 1994; Fanger, N.A. et al., 1996). Es sind sechs verschiedene Transkriptklassen des humanen Fc γ RII bekannt (a1, a2, b1, b2, b3 und c), die von drei verschiedenen Genen exprimiert werden: hFc γ RIIA, hFc γ RIIB und hFc γ RIIC (Qiu, W.Q. et al., 1990). Diese unterscheiden sich hauptsächlich in ihren zytoplasmatischen Domänen, die im Falle des hFc γ RIIA und hFc γ RIIC ein ITAM und im hFc γ RIIB ein ITIM enthalten (Van Den Herik-Oudijk, I.E. et al., 1994). hFc γ RIIa2 und hFc γ RIIb3 sind lösliche Spleißvarianten, während es sich bei den übrigen Isoformen um membranständige Rezeptoren handelt (Brooks, D.G. et al., 1989; Rappaport, E.F. et al., 1993).

In der Maus existiert nur ein Gen, das zu dem hFc γ RIIB homolog ist, der mFc γ RIIB. Durch alternatives Spleißen werden vom hFc γ RIIB-Gen zwei und vom mFc γ RIIB-Gen mindestens drei Proteine exprimiert, die sich durch die Existenz des C1-Exons unterscheiden. Dabei entsteht eine um 19 Aminosäuren deletierte hFc γ RIIb2-Isoform und eine um 47 Aminosäuren verkürzte murine Fc γ RIIb2-Isoform. Eine weitere Spleißvariante, der mFc γ RIIb1' wird mit einer verkürzten C1-Domäne exprimiert und ist zu dem humanen Fc γ RIIb1 homolog. Er hat ähnliche Eigenschaften wie der mFc γ RIIb1 und wird mit ihm koexprimiert (Latour, S. et al., 1996).

Das alternative Spleißen des mFc γ RII erfolgt teilweise zelltypspezifisch: während man auf Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen beide b1/b1'-Varianten und die b2-Isoform findet, kann auf reifen B-Zellen nur die b1/b1'-Isoformen und auf Makrophagen nur die b2-Isoform nachgewiesen werden (Ravetch, J.V. et al., 1986; Latour, S. et al., 1996). Auch funktionell unterscheiden sich die mFc γ RIIb1/b1'-

Varianten von der b2-Isoform. Während der mFcγRIIb2 die Endozytose von Immunkomplexen vermittelt (Amigorena, S. et al., 1998), wird diese Funktion durch die Insertion der C1-kodierten Sequenzen in der b1/b1'-Isoformen blockiert (Amigorena, S. et al., 1992). Diese Insertion verhindert die Assoziation zu *clathrin-coated pits* während der Rezeptorgekoppelten Endozytose (Miettinen, H.M. et al., 1989).

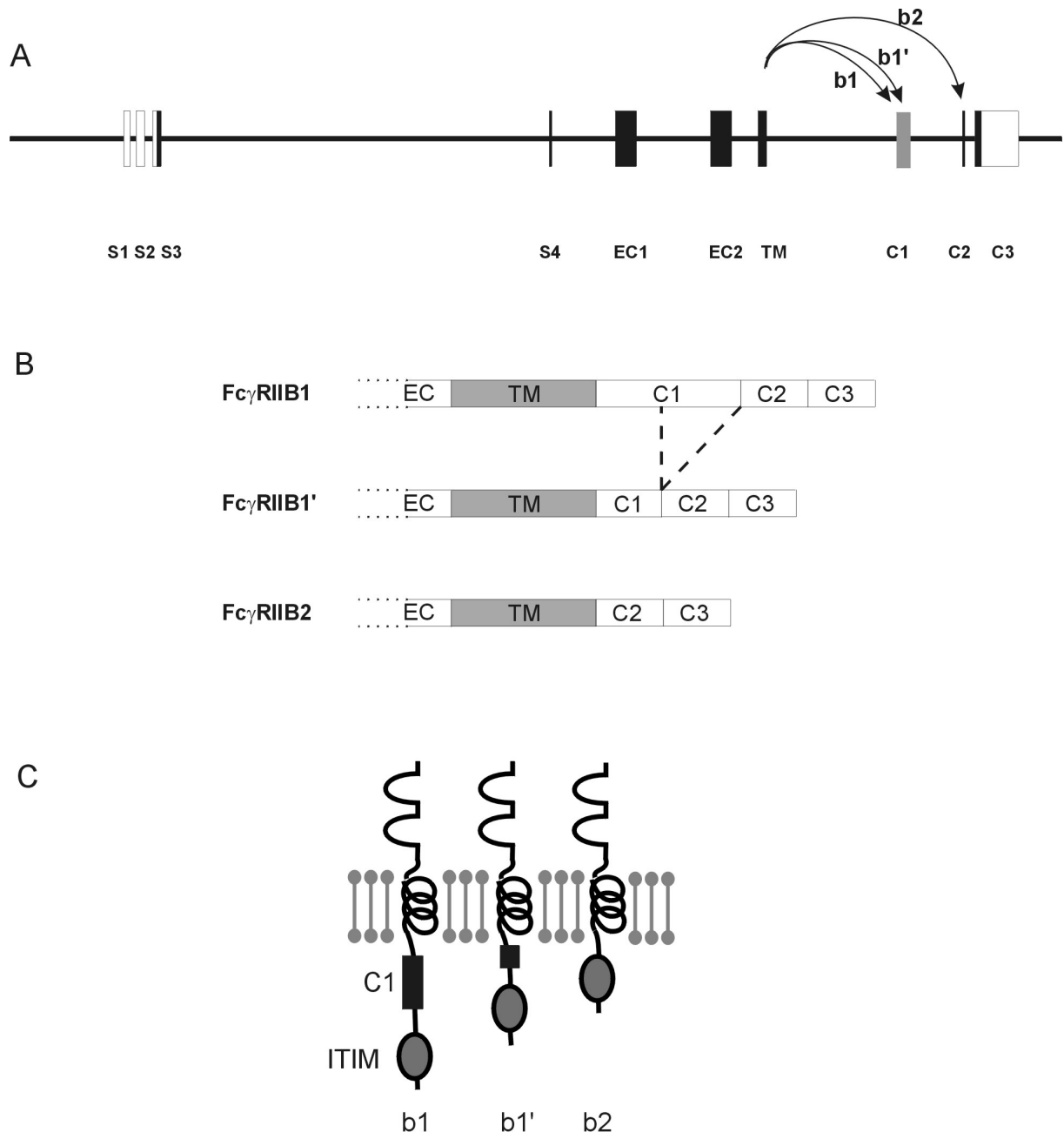


Abb. 3: Alternative Spleißprodukte des murinen FcγRII. Dargestellt ist der Genlocus (A) sowie die RNA- (B) und Proteinstruktur (C) der Spleißvarianten.

In allen Isoformen des mFc γ RII ist im C3-Exon ein inhibitorisches Motiv (ITIM) lokalisiert, das potentiell ein negativ regulierendes Signal transduziert. In verschiedenen Transfektionsstudien wurde für Fc γ RIIb2, aber auch für den Fc γ RIIb1 eine inhibitorische Funktion gezeigt (Amigorena, S. et al., 1992). Dabei inhibiert der Fc γ RII vor allem die aktivatorischen Signale, die über ein ITAM transduziert werden. Ein solches ITAM ist in der Fc-Rezeptor γ -Kette, aber auch in den zytoplasmatischen Domänen des T- und B-Zellrezeptors lokalisiert. So führt z.B. die Kreuzvernetzung des mFc γ RIIb1 mit dem B-Zellrezeptor durch Antikörper oder Immunkomplexe zu einer Inhibierung des Kalzium-Influsses und somit zu einer Modulation der B-Zellaktivierung (Amigorena, S. et al., 1992).

Der im murinen System vorwiegend verwendete Antikörper 2.4G2 (Unkeless, J.C., 1979) bindet in der Nähe der Ligandenbindungsstelle des mFc γ RII, so daß er die Bindung von IgG an den Rezeptor blockiert. Er erkennt aber gleichermaßen den mFc γ RIII, so daß eine Diskriminierung nicht möglich ist. Zwei monoklonale Antikörper (K9.361 und K75.325), die einen Polymorphismus im Ly17-Locus (Fc γ RII/Fc γ RIII der Maus) beschreiben (Holmes, K.L. et al., 1985), sind in unserer Arbeitsgruppe als Fc γ RII-spezifisch charakterisiert worden. Diese binden in ähnlicher Weise wie der 2.4G2 in der Nähe der Ligandenbindungsstelle und kompetitieren sowohl für die Bindung von IgG als auch mit dem 2.4G2 an Fc γ RII, nicht aber an Fc γ RIII (Schiller, C. et al., 2000).

1.1.3 Der niedrigaffine Fc γ RIII

Wie der Fc γ RI ist auch der Fc γ RIII ein multimerer Rezeptor und mit der signaltransduzierenden Fc-Rezeptor γ -Kette assoziiert, die essentiell für die Expression des Rezeptors ist. In T-Zellen und NK-Zellen kann im humanen System das γ -Ketten-Dimer aber auch durch ein Homodimer aus der ζ -Kette des TCR/CD3 Komplexes oder aus γ - ζ -Heterodimeren ersetzt sein (Lanier, L.L. et al., 1989; Ra, C. et al., 1989). Der murine Fc γ RIII kann in Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen als Tetramer mit einer β -Kette exprimiert werden. Die β -Kette besitzt ein ITAM in der zytoplasmatischen Domäne, welches jedoch kein unabhängiges Signal vermittelt.

Die β -Kette hat vielmehr verstärkende Funktion auf die Signalwirkung der γ -Kette (Lin, S. et al., 1996).

Der humane $Fc\gamma RIII$ wird von zwei Genen exprimiert, die zwar auf genetischer Ebene starke Homologien aufweisen, aber in unterschiedlichen Proteinen zelltypspezifisch exprimiert werden. Das $hFc\gamma RIIIA$ -Gen kodiert für ein Transmembranprotein, das in Assoziation mit der γ -Kette auf NK-Zellen, T-Zellen, aktivierten Monozyten/Makrophagen und Mesangialzellen exprimiert wird (Werfel, T. et al., 1989; Uciechowski, P. et al., 1992; Gessner, J.E. et al., 1995). Das $hFc\gamma RIIIB$ -Gen wird als Glycosylphosphatidylinositol-(GPI-)verankerter Rezeptor exprimiert, der ausschließlich auf Neutrophilen und Eosinophilen gefunden wird (Ravetch, J.V. und Perussia, B., 1989; Hartnell, A. et al., 1992).

Für den $mFc\gamma RIII$ existiert, wie für die anderen murinen $Fc\gamma$ -Rezeptoren auch, lediglich ein Gen, das zu dem humanen $Fc\gamma RIIIA$ homolog ist und von dem nur eine Isoform exprimiert wird. Seine extrazellulären Domänen weisen eine hohe Homologie zu denen der $mFc\gamma RIIb$ -Isoformen auf und $mFc\gamma RIII$ wird wie $mFc\gamma RII$ von dem monoklonalen Ratten-Antikörper 2.4G2 erkannt. Des weiteren gibt es keinen monoklonalen Antikörper, der den $Fc\gamma RIII$ spezifisch erkennt. Die Expression des $mFc\gamma RIII$ ist auf NK-Zellen, Neutrophile, Makrophagen/Monozyten, Mastzellen und Mesangialzellen restringiert, wo seine Expression teilweise erst durch $IFN\gamma$ induziert wird. Der $Fc\gamma RIII$ spielt eine wichtige Rolle bei der Bindung und Phagozytose von $IgG1$, $IgG2a$ und $IgG2b$ opsonierten Partikeln durch Makrophagen. Dies ist durch Experimente in $Fc\gamma RIII^{-/-}$ -Mäusen bestätigt worden (Fossati-Jimack, L. et al., 2000).

In $Fc\epsilon RI$ -*knock out*-Mäusen führte die Deletion der α -Kette des $Fc\epsilon RI$ zu einer Hochregulierung und einer erhöhten Aktivität des $Fc\gamma RIII$ auf Mastzellen (Dombrowicz, D. et al., 1997). Dies deutet darauf hin, daß auf Einzelzellebene die jeweiligen α -Ketten der Rezeptoren um die gemeinsame γ -Kette konkurrieren und die Deletion des $Fc\epsilon RI\alpha$ in einer kompensatorischen Hochregulierung des verbleibenden $Fc\gamma RIII$ resultiert.

1.2 Fc γ -Rezeptor-abhängige Signaltransduktionswege

Charakteristisch für alle Fc γ -Rezeptoren ist die Existenz eines inhibitorischen Motivs (ITIM) oder eines aktivatorischen Motivs (ITAM) im zytoplasmatischen Bereich der signaltransduzierenden Untereinheit. Bei dem ITAM handelt es sich um zwei YXXL-Motive, die von einer variierenden Anzahl an Aminosäuren unterbrochen wird, so daß SH2-Domänen enthaltene Proteinkinasen hieran binden können.

Nach Kreuzvernetzung der Rezeptoren durch Immunkomplexe wird dabei das ITIM oder ITAM phosphoryliert, was dann zu einer Aktivierung weiterer signaltransduzierender Proteine führt (Reth, M., 1989; Muta, T. et al., 1994; Weiss, A. und Littman, D.R., 1994). Das ITAM in der Fc-Rezeptor γ -Kette bewirkt so eine aktivatorische Signaltransduktion des Fc γ RI, des Fc γ RIII und des Fc ϵ RI. Ein solches ITAM ist auch in der hFc γ RII α -Kette und in den signaltransduzierenden Ketten des BCRs und des TCRs identifiziert worden (Cambier, J.C. et al., 1994). Die Phosphorylierung des ITAMs erfolgt durch Tyrosinkinasen der src-Familie, wonach das phosphorylierte ITAM weitere Tyrosinkinasen der syk-Familie rekrutiert und aktiviert (Cambier, J.C., 1995), die wiederum verschiedene Signaltransduktionswege, wie z.B. den RAS-Weg aktivieren. Ferner wird durch aktiviertes syk die Phospholipase C γ 1 (PLC γ 1) aktiviert, die über die Bildung von Inositoltrisphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DG) aus Phosphoinositolbisphosphat (PIP2) an der Ausschüttung intrazellulär gespeicherten Kalziums beteiligt ist (Agarwal, A. et al., 1993; Benhamou, M. et al., 1993; Kiener, P.A. et al., 1993; Kurosaki, T. et al., 1994; Takata, M. et al., 1994).

Ein inhibitorisches Motiv, das ITIM, konnte im Fc γ RIIB identifiziert werden, ist aber auch im auf B-Zellen exprimierten CD22 und in *killer inhibitory receptors* (KIRs) enthalten (Doody, G.M. et al., 1995; Fry, A.M. et al., 1996). Über die Kreuzvernetzung mit Molekülen, die ihrerseits ein ITAM enthalten, wird das ITIM phosphoryliert, gefolgt von der Rekrutierung der Inositol-Phosphatase SHIP zur Zellmembran (Ono, M. et al., 1996). Dabei inhibiert SHIP u.a. auch den über die Tyrosinkinase Btk aktivierten extrazellulären Kalziuminflux in Mastzellen und B-Zellen (Bolland, S. et al., 1998; Kawakami, Y. et al., 1999). Es katalysiert die Umsetzung des Membran Phospholipides PI(3,4,5)P3 zu PI(3,4)P2 (Damen, J.E. et al., 1996)

und inaktiviert somit das für die Btk-Aktivierung nötige PIP3. In der B-Zelle führt dies zu einer Regulation der durch die über den B-Zellrezeptor aktivierten Antikörperproduktion. Dies stellt einen negativen Rückkopplungsmechanismus dar, da die entstehenden Immunkomplexe den mFc γ RII mit dem B-Zellrezeptor kreuzvernetzen. In der Mastzelle führt die Aktivierung des mFc γ RII durch Kreuzvernetzung mit dem Fc ϵ RI (Daëron, M. et al., 1995) und dem Fc γ RIII (Takai, T. et al., 1996) zu einer Regulation der Serotoninsekretion. Eine weitere Phosphatase, die Phosphotyrosinphosphatase 1c (PTP1c) wird durch das ITIM der verschiedenen KIRs und des CD22 aktiviert. Zunächst glaubte man, daß sie auch durch die Bindung an das ITIM des Fc γ RII phosphoryliert werden kann (Pani, G. et al., 1995), später wurde jedoch gezeigt, daß es sich hierbei aber um separate Signaltransduktionswege durch verschiedene ITIMs handelt (Gupta, N. et al., 1997; Ono, M. et al., 1997).

1.3 Fc γ -Rezeptor *knock out*-Mausmodelle

In den letzten Jahren sind verschiedene Fc γ -Rezeptor-defiziente Mäuse generiert worden, die zu einer weiteren Aufklärung der *in vivo*-Funktionen einzelner Isoformen geführt haben. Insbesondere die Deletion der Fc-Rezeptor γ -Kette, die zu Defekten in allen mit der γ -Kette assoziierten Molekülen führt (Fc ϵ RI, Fc γ RI und Fc γ RIII), resultiert in erheblichen Konsequenzen für das Immunsystem, speziell bei Entzündungsreaktionen (Takai, T. et al., 1994). Die ADCC von NK-Zellen ist in diesen Mäusen vollständig unterdrückt, Mastzellen zeigen keine IgE-abhängige Serotoninausschüttung mehr und Makrophagen sind nicht mehr in der Lage, IgG-opsonierte Partikel zu phagozytieren. Experimente in verschiedenen Entzündungsmodellen belegen die Beteiligung dieser Rezeptoren bei Typ I-, II- und III-Hypersensitivitäten. Sowohl die aktive systemische Anaphylaxie als auch die IgG- und IgE-abhängige passive Anaphylaxie als Beispiel für Typ I-Reaktionen können in dem FcR γ ^{-/-}-Mausmodell nicht mehr induziert werden (Miyajima, I. et al., 1997). Des Weiteren sind diese Tiere gegen eine IgG2a-induzierte Autoimmune Hämolytische Anämie (AIHA) sowie eine Thrombozytopenie (ITP) resistent (Clynes, R. und Ravetch, J.V., 1995). Schließlich sind sie auch vor Typ III-Reaktionen, wie der passiven reversen Arthus Reaktion oder der Autoimmunen Glomerulonephritis

geschützt (Sylvestre, D.L. und Ravetch, J.V., 1994; Clynes, R. et al., 1998; Park, S.Y. et al., 1998).

Bei der Fc γ RIII *knock out*-Maus ist die ligandenbindende α -Kette des Rezeptors deletiert worden. Die anderen Fc γ -Rezeptoren sind in dieser Maus nicht beeinträchtigt, so daß hier die *in vivo*-Funktion des Fc γ RIII isoliert betrachtet werden kann. Wie auch in der FcR γ ⁻-Maus ist keine ADCC in NK-Zellen mehr zu beobachten, da hier der Fc γ RIII als einziger Fc γ -Rezeptor exprimiert wird (Hazenbos, W.L. et al., 1996). Bei Experimenten mit der AIHA zeigt sich, daß diese Mäuse vor einer IgG1-abhängigen AIHA geschützt sind, während die IgG2a-abhängige AIHA nur zum Teil reduziert ist (Meyer, D. et al., 1998). Mittlerweile ist es in anderen experimentellen Studien eindeutig gezeigt, daß IgG1-vermittelte Immunreaktionen auf den Fc γ RIII restringiert sind (Hazenbos, W.L. et al., 1998; Schiller, C. et al., 2000). Ferner zeigt sich anhand dieser Maus, daß neben dem Fc ϵ RI der Fc γ RIII auf Mastzellen eine Rolle bei Entzündungsreaktionen spielt. So zeigt sich, daß eine IgG-vermittelte Degranulation von Mastzellen dieser Tiere inhibiert ist, und auch *in vivo* ist in diesen Mäusen die passive Kutane Arthus Reaktion, bei der Mastzellreaktionen eine Rolle spielen, eingeschränkt (Hazenbos, W.L. et al., 1996; Baumann, U. et al., 2000).

In der Fc γ RII-defizienten Maus sind alle membranständigen Isoformen dieser Rezeptorklasse deletiert, da sie alle von einem Gen durch alternatives Spleißen exprimiert werden. Alle Isoformen besitzen das ITIM im zytoplasmatischen Bereich und haben somit potentiell eine inhibitorische Funktion. Tatsächlich ist in Mäusen, denen der Fc γ RII fehlt, eine erhöhte Antikörperproduktion *in vitro* und *in vivo* zu beobachten, was die Bedeutung des Fc γ RII für die Regulation der über den BCR vermittelten Aktivierung von B-Zellen bestätigt. Allerdings kommt es nicht zu einer völlig unkontrollierten Antikörperproduktion, so daß offensichtlich alternative inhibitorische Mechanismen zum Tragen kommen. Hierbei könnte z.B. CD22, das auf B-Zellen exprimiert wird und ebenfalls über ein ITIM verfügt, eine inhibitorische Rolle spielen (Doody, G.M. et al., 1995). CD22-defiziente Mäuse zeigen ebenfalls eine erhöhte Antikörpersekretion, was diese These unterstützt (O'Keefe, T.L. et al., 1996; Nitschke, L. et al., 1997). Sowohl eine IgG- als auch eine IgE-abhängige Serotoninsekretion aus Mastzellen der Fc γ RII⁻-Mäuse ist im Vergleich zu Zellen aus

Wildtypmäusen stark erhöht (Takai, T. et al., 1996). Diese Beobachtungen werden durch *in vivo*-Untersuchungen der Mastzell-Funktion mittels der passiven Anaphylaxie mit IgE- und IgG-Antikörpern unterstützt (Takai, T. et al., 1996; Ujike, A. et al., 1999). Ferner ist eine verstärkte Phagozytose durch Peritoneal-Makrophagen (Clynes, R. et al., 1999) zu beobachten, aber interessanterweise scheint der Fc γ RII keine inhibitorische Rolle bei der AIHA zu spielen (s.1.4.1) (Schiller, C. et al., 2000).

1.4 Fc γ -Rezeptor-abhängige Autoimmunreaktionen

1.4.1 Autoimmune Hämolytische Anämie (AIHA)

Die AIHA ist durch die Existenz anti-erythrozytärer Antikörper gekennzeichnet, die zu einer Zerstörung der Erythrozyten und damit zur Hämolyse mit einem deutlichen Hämatokritabfall führen. Die Pathogenese beim Menschen ist nur unzureichend verstanden, kann aber durch die Verfügbarkeit eines Mausmodells, der NZB- (*new zealand black*-) Maus, die neben anderen Autoimmundefekten auch antierythrozytäre Autoantikörper produziert, besser untersucht werden. Durch die Herstellung monoklonaler Antikörper aus Myelomfusionen mit B-Zellen dieser Mäuse konnten neben nicht-pathogenen Antikörpern auch pathogene Antikörper isoliert werden, die in anderen Mausspezies eine AIHA induzieren (Shibata, T. et al., 1990). Neben ihrer Spezifität ist vor allem auch die schwere Kette, also der Isotyp, der Immunglobuline entscheidend für die Pathogenität der einzelnen mAbs.

So konnten neben agglutinierenden mAbs, wie dem 31-9D (IgM) auch mAbs isoliert werden, die eine Fc γ -Rezeptor-abhängige Anämie induzieren. Diese sind vom IgG1-Subtyp (105-2H) oder vom IgG2a-Subtyp (34-3C) und weisen identische Antigenspezifitäten auf. In Wildtypmäusen induzieren diese Antikörper eine AIHA, die durch einen Hämatokritabfall und eine Erythrophagozytose durch Kupfferzellen in der Leber gekennzeichnet ist. In Fc γ RIII-defizienten Mäusen kann mit dem 105-2H keine AIHA mehr induziert werden und eine durch den 34-3C-induzierte AIHA nimmt in diesen Mäusen einen abgeschwächten Verlauf (Meyer, D. et al., 1998). Fc γ -Ketten-defiziente Mäuse sind sowohl vor einer IgG1- als auch vor einer IgG2a-induzierten AIHA geschützt und auch NOD-Mäuse, die einen natürlichen Defekt im Fc γ RI tragen, und in die der defekte Fc γ RIII Genlocus eingekreuzt wurde, zeigen mit beiden

Antikörpern einen abgeschwächten Verlauf, was sich durch den Einsatz von Cobra-Venom-Faktor (Komplement-Inhibitor) noch steigern läßt (Schiller, C. et al., 2000). Interessanterweise unterscheidet sich die Intensität der AIHA mit den beiden Antikörpern in Fc γ RII-defizienten Mäusen nicht von der in Wildtypmäusen, so daß der Fc γ RII hierbei offensichtlich keine inhibitorische Funktion hat, da man bei Wegfall des inhibitorischen Rezeptors mit einem gesteigerten Verlauf gerechnet hatte (Schiller, C. et al., 2000). Eine mögliche Begründung für diese Beobachtungen könnte in der Expression des Fc γ RII liegen, der möglicherweise entweder gar nicht in den Kupfferzellen exprimiert wird, oder nach Aktivierung herunterreguliert ist.

1.4.2 Glomerulonephritis (GN)

Bei der Autoimmunen Glomerulonephritis handelt es sich um eine entzündliche Reaktion in der Niere, die in den Glomeruli lokalisiert ist. Sie ist durch die Ablagerung von Immunkomplexen, eine Einwanderung von Granulozyten, Makrophagen und T-Zellen, eine Zerstörung der zellulären Struktur und der Basalmembran sowie durch die Proliferation und Aktivierung von Mesangialzellen gekennzeichnet. Die Ablagerung von Immunkomplexen könnte für die Induktion und Aufrechterhaltung einer Glomerulonephritis von Bedeutung sein, da durch sie zahlreiche Immunreaktionen über das Komplementsystem und Fc-Rezeptoren aktiviert und reguliert werden. Ein Beispiel für eine Antikörper-induzierte Glomerulonephritis ist das humane *Goodpasture's syndrome*, das durch Autoantikörper gegen die glomeruläre Basalmembran gekennzeichnet ist. Die abgelagerten Immunkomplexe können aber auch außerhalb des Glomerulums präformiert sein, wie es beim Systemischen Lupus Erythematoses (SLE) durch das Auftreten von Autoantikörpern unterschiedlichster Spezifität der Fall ist (Radeke, H.H. und Resch, K., 1992). Eine Bindung der Immunkomplexe könnte hierbei entweder unspezifischer Natur sein oder über die spezifische Bindung an Fc-Rezeptoren zustande kommen (Couser, W.G., 1985).

Die Mesangialzelle ist die potentielle Zelle im Glomerulum, die an der Entwicklung der Immunkomplex-induzierten Glomerulonephritis beteiligt zu sein scheint, da sie in der Lage ist, über ihre Fc-Rezeptoren Immunkomplexe zu binden. Mesangialzellen sind Knochenmark-unabhängige, mesenchymale Zellen, die muskelzellähnliche

Strukturen aufweisen (Mené, P. et al., 1989). Für humane Mesangialzellen ist die durch IFN- γ und LPS stimulierte Induktion von Fc γ RI α , Fc γ RIII α und der assoziierten γ -Kette gezeigt worden (Radeke, H.H. et al., 1994; Gessner, J.E. et al., 1995; Uciechowski, P. et al., 1998). In murinen Mesangialzellen wurde bislang die Expression des Fc γ RIII beschrieben (Hora, K. et al., 1992). Mesangialzellen werden durch eine Reihe von Faktoren stimuliert, wie auch durch proinflammatorische Zytokine wie IFN γ und TNF α oder bakterielle Komponenten wie z.B. LPS. Nach ihrer Aktivierung reagieren Mesangialzellen mit der Ausschüttung entzündlicher Mediatoren wie z.B. Sauerstoffradikale, Stickoxide und verschiedene Zytokine und durch ein Ungleichgewicht in der Sezernierung von Matrix-Proteinen und Matrix-degradierenden Enzymen könnten sie letztendlich zu der glomerulären Sklerose beitragen (Radeke, H.H. und Resch, K., 1992). Ihre Immunkompetenz zeigen die Mesangialzellen zudem in der Fähigkeit, auf bestimmte Stimuli wie z.B. LPS oder IFN γ mit der Sekretion von Chemokinen zu reagieren.

Chemokine sind chemotaktische Proteine, die für die Einwanderung von Leukozyten in die Glomeruli verantwortlich gemacht werden. Es sind 7-14 kDa kleine, Heparin-bindende Proteine, die durch bestimmte Konsensussequenzen im N-Terminus ihrer Aminosäurestruktur charakterisiert und eingeteilt werden (Oppenheim, J.J. et al., 1991). Diese Einteilung erfolgt nach der Anordnung von konservierten Cysteinmotiven und man unterscheidet vier Klassen, CXC, CC, C (Kelner, G.S. et al., 1994) und CX₃C (Bazan, J.F. et al., 1997). CC-Chemokine, wie z.B. JE/MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein*), MCP-5, MIP-1 α (*monocyte inflammatory protein*), MIP-1 β und RANTES (*regulated upon activation, normal T expressed and secreted*) wirken in erster Linie chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen. CXC-Chemokine werden anhand der Existenz eines Glutamat-Leucin-Arginin (ELR)-Motivs in zwei Subklassen eingeteilt. Während ELR enthaltende CXC-Chemokine (MIP-2 und KC im murinen und IL-8 im humanen System) die Aktivierung von Neutrophilen und ihre directionale Migration induzieren (Oquendo, P. et al., 1989; Bozic, C.R. et al., 1995), rekrutiert das nicht-ELR enthaltende Chemokin IP-10 (IFN γ -*inducible protein*) Monozyten, T-Zellen und NK-Zellen (Taub, D.D. et al., 1993; Taub, D.D. et al., 1995).

Sowohl $\text{IFN}\gamma$ und $\text{TNF}\alpha$, als auch IgG-Immunkomplexe induzieren die Sekretion von MCP-1 in Primärkulturen von murinen Mesangialzellen (Hora, K. et al., 1992; Satriano, J.A. et al., 1993). In humanen Mesangialzellen konnte eine $\text{IFN}\gamma$ -, $\text{TNF}\alpha$ - und $\text{IL1}\beta$ -abhängige Induktion von MCP-1 beobachtet werden (Grandaliano, G. et al., 1994), während nach der Vorstimulation mit $\text{IFN}\gamma$ /LPS die Inkubation mit IgG-Komplexen zu einer erhöhten IL-6-Produktion führte (Radeke, H.H. et al., 1994). Für weitere Chemokine, wie RANTES und IP-10 wurde sowohl in murinen (Gomez-Chiarri, M. et al., 1993; Wolf, G. et al., 1993) als auch humanen (Schwarz, M. et al., 1997) MCs eine aktivierungsabhängige Induktion beobachtet.

Die primäre Bedeutung von Fc γ -Rezeptoren belegen Untersuchungen in FcR γ -Ketten-defizienten Mäusen. Die Einkreuzung des defekten Genlocus für die FcR γ -Kette in NZB/W F1-Mäuse, die spontan eine schwere Glomerulonephritis entwickeln, führt zu einem kompletten Schutz gegen die Erkrankung (Clynes, R. et al., 1998). Auch die Induktion einer Glomerulonephritis durch anti-Basalmembran-Antikörper ist im Gegensatz zu Wildtypmäusen in FcR γ -KO-Mäusen nicht möglich (Park, S.Y. et al., 1998). In der FcR γ ^{-/-}-Maus sind die beiden aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII deletiert, während in einem weiteren Mausmodell, der Fc γ RII^{-/-}-Maus, der eher inhibitorisch wirkende Fc γ RII fehlt. Induziert man in diesen Mäusen eine Nephritis durch die Applikation von anti-Basalmembran-Antikörpern, entwickeln sie eine verstärkte glomeruläre Entzündungsreaktion im Vergleich zu Wildtypmäusen (Suzuki, Y. et al., 1998). In weiteren Experimenten konnte in Fc γ RII^{-/-}-Mäusen eine Glomerulonephritis durch die Immunsierung mit Typ IV-Kollagen, das einen Bestandteil der Basalmembran darstellt, induziert werden, was bei Wildtypmäusen nicht beobachtet werden kann. Bei dem humanen *Goodpasture's* Syndrom (GPS) sind Autoantikörper gegen die $\alpha 3$ -Domäne des C-IV charakterisiert worden, so daß insbesondere in diesem Modell eine Beteiligung des inhibitorischen Fc γ RII beim GPS vermutet werden kann (Nakamura, A. et al., 2000).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Fc γ RII bei Entzündungs- und Autoimmunreaktionen näher untersucht werden. Diese Aufgabenstellung beinhaltete:

1. die Etablierung verschiedener Methoden zur Unterscheidung der unterschiedlichen Fc γ -Rezeptor-Isoformen,
2. die Analyse des Expressionsmusters des Fc γ RII sowie der weiteren Fc γ -Rezeptor-Isoformen in Leber und Niere,
3. die Aufklärung der Rolle von Fc γ -Rezeptoren bei der Glomerulonephritis sowie
4. die Herstellung einer Fc γ RIIb1-defizienten *knock out*-Maus, die als Isoform-spezifische Defekt-Mutante die bislang zur Verfügung stehenden Fc γ -Rezeptor-*knock out*-Mausmodelle vervollständigen sollte.

Zur Bearbeitung dieser Fragestellungen standen verschiedene Fc γ -Rezeptor-defiziente Mausstämme und zwei unlängst als Fc γ RII-spezifisch charakterisierte Antikörper (Ly-17.1/2) zur Verfügung. Des weiteren sollten molekularbiologische Methoden etabliert werden, die eine Unterscheidung der einzelnen Isoformen ermöglichen. Um über die Funktion des Fc γ RII genauere Aussagen treffen zu können, sollte eine Analyse der weiteren Fc γ -Rezeptor-Isoformen mit einbezogen werden, da der Fc γ RII potentiell inhibitorisch auf die aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI/RIII) wirkt. Die Rolle des Fc γ RII bei der AIHA ist derzeit noch ungenügend aufgeklärt. Die eingehende Analyse seiner Expression in der Leber sollte daher zur weiteren Aufklärung beitragen. Schließlich standen Primärkulturen muriner Mesangialzellen zur Verfügung, deren Bedeutung für die Glomerulonephritis näher betrachtet werden sollte.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Alle Klonierungen und Präparationen rekombinanter Plasmide wurden in dem E.coli K12 Bakterienstamm XL1 blue (Stratagene) durchgeführt.

2.1.2 Chemikalien

Nachfolgend sind die verwendeten Chemikalien und ihre Bezugsquellen aufgelistet:

Acrylamid	Roth
Agarose DNA Grade	Biomol
Agarose	Serva
Ammoniumpersulfat	Sigma
Bromphenolblau	Serva
Dithiothreitol	Gibco BRL
Harnstoff	Sigma
Harnstoff	Biomol
LB-Agar	Gibco BRL
LB-Medium	Gibco BRL
N, N, N', N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	BioRad
Phenol	Roth
RNAzol	Wak-Chemie
Sephadex G50	Pharmacia
Tris Enzyme Grade	Biomol
Tris Ultra Pure	Biomol

Alle nicht aufgelisteten Chemikalien stammten in p.A. Qualität von der Firma Merck, Darmstadt.

2.1.3 Feinchemikalien

6-(Biotinamido)hexanoyl-	
N-hydroxysuccinimid Ester	Sigma
Ampicillin	Serva
Bromphenolblau	Serva
Desoxynucleosidtriphosphate	Promega
Diaminobenzidin (DAB)	Sigma
<i>Fast Red</i> -Substratsystem	DAKO
Glycergel	DAKO
Hämatoxyllin	Sigma
IPTG	Boehringer
L-Glutamin	Gibco
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Natriumpyruvat	Gibco
Nucleosidtriphosphate	Promega
Penicillin / Streptomycin	Gibco
Rinderserumalbumin	Serva
Salmon Sperm DNA	Serva
Sigmacote	Sigma
Streptavidin-HRP	DAKO
Tetracyclin	Boehringer
Trypsin	Gibco
XGal	Boehringer
Zellkulturmedium DMEM	Gibco
γ -Methacryloxypropyltrimethoxysilan	Sigma

Radioaktiv markierte Substanzen

$[\alpha^{32}\text{P}]\text{dCTP}$, $[\gamma^{32}\text{P}]\text{UTP}$ und $[\gamma^{32}\text{P}]\text{ATP}$ stammten von Amersham

2.1.4 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Boehringer
AMV Reverse Transkriptase	Promega
T4 DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4 DNA-Polymerase	MBI Fermentas
E.coli DNA-Polymerase (Klenow-Fragment)	Promega
RNase-Inhibitor (RNasin)	Promega
Restriktionsenzyme	Gibco, Sigma, Biolabs, MBI Fermentas
Taq-Polymerase	Promega

2.1.5 Antikörper

FcγRII/RIII (2.4G2)	Pharmingen
Mac-1 (M1/70)	Pharmingen
I-A ^b (M5/115.15.2)	Pharmingen
BM8	Dianova
F4/80	Dianova
anti-Ly-17.1	Medac
anti-Ly-17.2	Medac
Kaninchen-anti-Ratten-Ig	DAKO
APAAP	DAKO

2.1.6 Verbrauchsmaterialien

0,5mL und 1,5 mL Reaktionsgefäße	Sarstedt
15 mL und 50 mL Reaktionsröhrchen	Falcon
3MM Filterpapier	Whatman
90 mm Petrischalen	Greiner
<i>Chamber Slides</i>	Nunc
Dialyseschläuche	Roth
Einfriergefäße	Nunc

Kanülen	B. Braun
Multiwell-Platten	Greiner, Nunc
Nitrozellulose Membranen	Schleicher & Schuell
Nylon Membranen	Amersham
Pipetten	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Röntgenfilme BioMax MR	Kodak
Spritzen	B. Braun
Thioglykollat	Sigma
Zellkulturflaschen (10 mL 250 mL)	Greiner
Zellkulturpetrischalen	Falcon

2.1.7 Nukleinsäuren

Oligonukleotide:

Bei allen hier aufgelisteten Oligonukleotiden handelt es sich um Maus-spezifische Primer, mit Ausnahme der Tubulin Primer, die spezieübergreifend hybridisieren. Die mit den Primern generierten PCR-Produkte wurden teilweise zur Sondengenerierung in einen T-Vektor kloniert (pGEM-T, Promega)

- RI s** FcγRI-spezifischer *sense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-TGC CAG GCC TCC CGC AGA GTC-3'
 Pos. 348 (Sears, D.W. et al., 1990)
- RI as** FcγRI-spezifischer *antisense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-CAC TTC TAA CTT GCT GAA AGG AA-3'
 Pos. 1061 (Sears, D.W. et al., 1990)
- RII TME** FcγRII-spezifischer *sense*-Primer zur mRNA-Detektion aller membranständigen Isoformen in der RT-PCR mit integrierter EcoRI-Restriktionsschnittstelle.
 5'-GAA TTC CAA GTC CAG CAG GTC TTT ACC-3'
 Pos. 12896 (Hogarth, P.M. et al., 1991)

- RII C3 EX** Fc γ RII-spezifischer *antisense*-Primer zur mRNA-Detektion aller membranständigen Isoformen in der RT-PCR
 5'-CAG TTC CCA CGT TGC TGC AGT C-3'
 Pos. 16855 (Hogarth, P.M. et al., 1991)
- RIII s** Fc γ RIII-spezifischer *sense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-ATGTTTCAGAATGCACACTCTGG-3'
 Pos. 64 (Ravetch, J.V. et al., 1986)
- RIII as** Fc γ RIII-spezifischer *antisense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-TCACTTGTCTTGAGGAGCCTGG-3'
 Pos. 828 (Ravetch, J.V. et al., 1986)
- γ -chain s** *sense*-Primer zur mRNA-Detektion der Fc-Rezeptor γ -chain in der RT-PCR
 5'-CCA GGA TGA TCT CAG CCG-3'
 Pos. 38 (Ra, C. et al., 1989)
- γ -chain as** *antisense*-Primer zur mRNA-Detektion der Fc-Rezeptor γ -chain in der RT-PCR
 5'-TTA ACG GAG ATG GGG ACC TGC C-3'
 Pos. 451 (Ra, C. et al., 1989)
- KC 5'** KC-spezifischer *sense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-GAG CTT GAA GGT GTT GCC-3'
 Pos. 145 (Oquendo, P. et al., 1989)
- KC 3'** KC-spezifischer *antisense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-TTG AAC GTC TCT GTC CCG-3'
 Pos. 843 (Oquendo, P. et al., 1989)
- MIP-2 5'** MIP-2-spezifischer *sense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-TCA ATG CCT GAA GAC CCT GC-3'
 Pos. 154 (Tekamp-Olson, P. et al., 1990)
- MIP-2 3'** MIP-2-spezifischer *antisense*-Primer zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
 5'-CAT GAA AGC CAT CCG ACT GC-3'
 Pos. 807 (Tekamp-Olson, P. et al., 1990)

- MCP-5 5'** MCP-5-spezifischer *sense*-Primer mit integrierter Kpn-Restriktionsschnittstelle zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
5'-CGC GGT ACC ATG AAG ATT TCC ACA CT-3'
Pos. 33 (Sarafi, M.N. et al., 1997)
- MCP-5 3'** MCP-5-spezifischer *antisense*-Primer mit integrierter Kpn-Restriktionsschnittstelle zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
5'-GCC GGA TCC TCA GCC TAG ACA TGA AGG TT- 3'
Pos. 347 (Sarafi, M.N. et al., 1997)
- MCP1 5'** MCP-1-spezifischer *sense*-Primer mit integrierter Kpn-Restriktionsschnittstelle zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
5'-CGC GGT ACC ATG CAG GTC CCT GTC AT-3'
Pos. 89 (Kawahara, R.S. und Deuel, T.F., 1989)
- MCP1 3'** MCP-1-spezifischer *antisense*-Primer mit integrierter EcoRI-Restriktionsschnittstelle zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
5'-GAG AAT TCC TAG TTC ACT GTC ACA-3'
Pos. 536 (Kawahara, R.S. und Deuel, T.F., 1989)
- Tub s** speziesübergreifender *sense*-Primer zur Amplifikation β -Tubulin-spezifischer Sequenzen zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
5'-TTCCCTGCCCAGCTSAANGCNGACCTNCGCAAG-3'
Pos. 802 (Wang, D. et al., 1986)
- Tub as** speziesübergreifender *antisense*-Primer zur Amplifikation β -Tubulin-spezifischer Sequenzen zur mRNA-Detektion in der RT-PCR
5'-CATGCCCTCGCCNGTGTACCAGTGNANGAAGGC-3'
Pos. 1287 (Wang, D. et al., 1986)
- EC2 int s** *sense*-Primer zur PCR-Amplifikation eines 1,67 kb großen Fc γ RII-spezifischen DNA-Fragmentes aus genomischer DNA
5'-GGA ATC GCA TCC CCA TCT CAG-3'
Pos. 11727 (Hogarth, P.M. et al., 1991)
- Tm INT as** *antisense*-Primer zur PCR-Amplifikation eines 1,67 kb großen Fc γ RII-spezifischen DNA-Fragmentes aus genomischer DNA mit eingefügter HindIII-Restriktionsschnittstelle
5'-AAG CTT GTG CGG TAC ACA CCA TAG CCC-3'
Pos. 13396 (Hogarth, P.M. et al., 1991)

Sonstige:

pGEM-T (bakterieller Klonierungsvektor)	Promega
pKS+ (bakterieller Klonierungsvektor)	Stratagene
1 kb Leiter (DNA-Molekulargewichtsstandard)	Gibco
100 bp Leiter	Gibco

2.1.8 Mausstämme

Die Mausstämme C57Bl/6 und Balb/c wurden von Charles River/Deutschland erworben. Die Mausstämme 129 und MRL stammen von Jackson Laboratories/USA. Fc γ RIII-*knock out*-Mäuse sowie deren Kontrollen wurden im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gezüchtet und in den C57Bl/6 Stamm zurückgekreuzt. Fc γ RII-*knock out*-Mäuse wurden von Toshiyuki Takai, Tohoku Universität, Japan, zur Verfügung gestellt. FcR γ -Ketten und Fc γ RII/FcR γ -Ketten doppel-*knock out*-Mäuse wurden von Taconics, Germantown, New York, erhalten.

Alle Tiere hatten einen 12 Stunden Hell-Dunkelrhythmus und erhielten eine Standarddiät für Mäuse (Altromin) und Leitungswasser ad libitum.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterienkultur

2.2.1.1.1 Medien

Alle mikrobiologischen Medien wurden autoklaviert. Ampicillin bzw. Tetracyclin wurden nach einer Abkühlung auf 50°C zugesetzt. Da alle in dieser Arbeit

verwendeten Plasmide das β -Lactamase Gen für die Ampicillinresistenz enthalten, erfolgte die Positivselektion transformierter Bakterien ausnahmslos mit 50 $\mu\text{g/mL}$ Ampicillin.

LB-Medium (pH 7,5): 1,0% Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 1,0% NaCl

LB-Agar: 1,0% Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 1,0% NaCl
 1,5% Agar

SOC-Medium: 2,0% Trypton
 1,0% Hefeextrakt
 0,1% NaCl
 20 mM Glucose

2.2.1.1.2 Übernachtkulturen transformierter Bakterien

5 mL LB_{AMP} -Medium wurden entweder mit einer Bakterienkolonie einer Agarplatte oder mit 10 μL einer Stammkultur angeimpft und bei 37°C und 250 rpm üN geschüttelt. Diese Kultur wurde entweder für die Minipräparation von Plasmid-DNA oder zum Animpfen größerer Kulturen (250 mL-Kulturen für die präparative Plasmidpräparation) verwendet.

2.2.1.1.3 Anlegen einer Stammkultur

810 μL einer Übernachtkultur wurden mit 190 μL 80%igem Glycerin vermischt und bei -80°C eingefroren.

2.2.1.2 Isolierung von Nukleinsäuren

2.2.1.2.1 Präparation und Reinigung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte im allgemeinen durch eine Lyse der Bakterien mit NaOH, einer anschließenden Präzipitation der Zelltrümmer mit Kaliumazetat, einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion und einer abschließenden Ethanolfällung.

2.2.1.2.1.1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-(PCI-)Extraktion

Durch die PCI-Extraktion werden die Proteine aus einer DNA-Proteinlösung entfernt. Hierzu wurde die Lösung nach Zugabe von einem gleichen Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) kräftig gemischt. Zur Phasentrennung wurde 5 min zentrifugiert. Nach der Zentrifugation enthält die Interphase die Proteine und die obere, wässrige Phase die DNA, die mit einer Pipette abgenommen werden kann.

2.2.1.2.1.2 Ethanolfällung

Die DNA wurde mit einem 2,5fachen Volumen an Ethanol und gegebenenfalls mit einem 0,1fachen Volumen 3 M Natriumazetat (pH5) bei -20°C für 0,5 - 1 h präzipitiert und 10 min in der Eppendorfszentrifuge bei 14.000 rpm abzentrifugiert.

2.2.1.2.1.3 Analytische Plasmidpräparation

Für die Präparation von ca. 10 µg Plasmid-DNA wurde eine Bakterienkolonie in 5 mL LB_{AMP} inokuliert und üN auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert. 1,5 mL der Bakteriensuspension wurden 1 min bei 14.000 rpm in der Eppendorfszentrifuge pelletiert, in 100 µL Lysispuffer (25 mM Tris pH 8,0; 10 mM EDTA; 50 mM Glucose) resuspendiert und bei RT 5 min inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch 5-minütige Inkubation im Eisbad mit 200 µL 0,2 M NaOH + 1% SDS. Schließlich

wurden die Zelltrümmer mit 150 μ L 3 M Kaliumazetat pH 5,5 im Eisbad für 5 min präzipitiert und in der Eppendorfszentrifuge bei 14.000 rpm 7 - 10 min abzentrifugiert. Durch anschließende PCI-Extraktion wurden die Proteine entfernt. Die DNA wurde durch Ethanol-fällung präzipitiert und in 20 - 50 μ L TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8,0) aufgenommen.

2.2.1.2.1.4 Maxipräparation von Plasmid-DNA über Anionenaustauschsäulen

Die Maxipräparation erfolgt mit dem Plasmid-Kit von QIAGEN und wurde nach dem Anwendungsprotokoll durchgeführt.

Puffer P1 (pH 8,0): 50 mM Tris/HCl
10 mM EDTA
100g/mL RNase A

Puffer P2: 200 mM NaOH
1 % SDS

Puffer P3 (pH 4,8): 2,55 M KAc

Puffer QBT (pH 7,0): 750 mM NaCl
50 mM MOPS
15 % Ethanol
0,15 % Triton X-100

Puffer QC (pH 7,0): 1,0 M NaCl
50 mM MOPS
15 % Ethanol

Puffer QF (pH 8,0): 1,2 M NaCl
50 mM MOPS
15 % Ethanol

250 mL LB_{AMP}-Medium wurden mit einer Übernachtskultur angeimpft und üN bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Die E. coli Zellen wurden bei 4000 rpm bei 4°C 15 min abzentrifugiert (Beckmann Zentrifuge, JA14-Rotor) und in 10 mL Puffer P1 resuspendiert. Nach Inkubation mit 10 mL Puffer P2 bei RT wurden Proteine und Zelltrümmer durch Zugabe von 10 mL Puffer P3 auf Eis 20 min präzipitiert. Während der nachfolgenden Zentrifugation (13.000 rpm, 30 min, 4°C, JA14-Rotor) wurde eine QIAgen Gravity Flow-Säule mit 10 mL Puffer QBT equilibriert. Der Überstand wurde auf die equilibrierte Säule gegeben und 2x mit 30 mL QC gewaschen. Die DNA wurde dann mit 15 mL QF eluiert und mit 35 mL Ethanol in einem 50 mL Falcon-Röhrchen für mind. 1 h bei -20°C präzipitiert. Die DNA wurde schließlich durch Zentrifugation (Beckman-Zentrifuge, 4°C, 2000 rpm, 30 min) pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, ca 10 min luftgetrocknet und in 300 µL TE-Puffer gelöst. Nach der quantitativen DNA-Bestimmung (2.2.1.3) wurde die Konzentration mit TE-Puffer auf 1 µg/µL eingestellt.

2.2.1.2.2 Isolierung genomischer DNA aus Mäuseschwänzen

Für die Isolierung genomischer DNA wurde ein ca. 1 cm grosses Stück vom Schwanz einer mit Äther narkotisierten Maus abgeschnitten und in einem 1,5 mL Reaktionsgefäß bei 56°C in 0,5 mL Proteinase K-Puffer (50 mM Tris pH 8, 12,5 mM EDTA und 0,5% SDS) mit 0,5 mg/mL Proteinase K üN inkubiert, am nächsten Tag mit 0,5 mL Phenol versetzt und langsam vermenget. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 14000 rpm in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert und 100 µL der oberen Phase abgenommen. Diese wurden mit 250 µL Ethanol und 10µL 3M Natriumazetat bei 4°C präzipitiert und mit 300 µL 70%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde schließlich in 300 µL TE-Puffer gelöst.

2.2.1.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA

Adhärente Zellen (MCs, J774, RAW, 80/1) wurden direkt in der Kulturflasche, Suspensionszellen (A20) in einem 50 mL Falcon-Röhrchen mit PBS gewaschen. Auf bis zu 5×10^6 Zellen wurde 1 mL RNazol (Wak-Chemie) zugegeben und die Zellen mit einer Kanüle homogenisiert. Die stark adhärierenden MCs wurden zuvor mit

einem *cellscraper* vom Boden der Kulturflasche gelöst. Für die Isolation von RNA aus Gewebe wurde das Gewebestück in einem Glashomogenisator homogenisiert und dabei auf je 100 mg Gewebe 1 mL RNazol zugegeben. Die homogenisierten Zellen wurden in ein 1,5 mL Gefäß überführt, mit dem 0,1fachen Volumen an Chloroform versetzt, geschüttelt und für 15 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, mit dem gleichen Volumen an Isopropanol versetzt und die RNA für 15 min bei 4°C präzipitiert. Das Präzipitat wurde für 15 min bei 4°C und 14000 rpm pelletiert, das Pellet mit 80% Ethanol gewaschen und in 20-40 µL RNase-freiem ddH₂O aufgenommen.

2.2.1.3 Quantitative DNA- und RNA-Analyse

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die delokalisierten π -Elektronensysteme der konjugierten, aromatischen Purin- und Pyrimidinbestandteile der Nucleinsäuren absorbieren UV-Licht im Wellenlängenbereich zwischen 250 und 270 nm. Für die photometrische Messung wurde die Nucleinsäure-Lösung 1:200 bis 1:1000 verdünnt und die Extinktion bei 260 nm in einer Quarzküvette bestimmt. Ausgehend von einem gleichen prozentualen Anteil der betreffenden Basen in Nucleinsäuren ergeben sich für eine $E_{260} = 1$ folgende Nucleinsäurekonzentrationen:

dsDNA : 50 µg / mL

RNA: 40 µg / mL

Die Konzentration kann somit nach folgender Gleichung bestimmt werden:

$$c = E_{260} \times f \times n \text{ [}\mu\text{g/mL]}$$

c: Konzentration

E_{260} : Extinktion bei 260 nm

f: Verdünnungsfaktor

n: Nucleinsäurekonzentration bei einer Extinktion von 1 (s.o.)

Alternativ hierzu kann die Menge eines DNA-Fragmentes auch durch eine Agarosegelelektrophorese (s. 2.2.1.5.1) visuell bestimmt werden. Hierzu wurde eine bekannte Menge an linearer Plasmid-DNA bekannter Größe in einer Verdünnungsreihe als Referenzgröße eingesetzt und die DNA-Menge durch quantitative Auswertung mit der AIDA-Software bestimmt.

2.2.1.4 Restriktionsverdau von DNA

Der sequenzspezifische Verdau von DNA durch Restriktionsendonukleasen wurde für analytische und präparative Zwecke durchgeführt. Die Reaktion erfolgte je nach Enzym in dem vom Hersteller empfohlenen und mitgelieferten Puffer mit 1-2 U Enzym/ μg DNA. 1 U ist die Menge Enzym, die 1 μg DNA bei der angegebenen Reaktionstemperatur (in der Regel 37°C) in 1 h spaltet.

2.2.1.5 Gelelektrophoresen

2.2.1.5.1 Agarosegelelektrophorese

LB-Puffer (6x): 0,25% Bromphenolblau
30% Glycerin
in TAE-Puffer

TAE-Puffer (1x): 40 mM Tris/Acetat
1 mM EDTA

Für Restriktionsanalysen und die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente wurden 0,7-3%ige Agarosegele verwendet. Das Prinzip der Methode beruht auf den Trenneigenschaften der Agarose und der negativen Gesamtladung der DNA. Abhängig von der Beschaffenheit des DNA-Gemisches (z.B. geschnittene und ungeschnittene, lineare oder zirkuläre DNA, sowie *supercoiled* Plasmide) stellt sich ein Auftrennungseffekt über die zurückgelegte Laufstrecke ein.

Je nach Fragmentgröße der zu trennenden DNA kann die Trenneigenschaft des Gels über die Agarosekonzentration variiert werden:

12-0,8 kbp: 0,7 %

10-0,5 kbp: 1 %

3-0,2 kbp: 1,5 %

2-0,1 kbp: 2 %

Für die Gele wurde die Agarose in 1x TAE-Puffer durch Aufkochen in der Mikrowelle gelöst und mit einer Endkonzentration von 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Diese wurden in den Schlitten der Elektrophoreseapparatur (BioRad) auspolymerisiert. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde der Restriktionsansatz mit der entsprechenden Menge 6x LB-Puffer versetzt und in die Taschen pipettiert. Der Lauf erfolgte bei einer Spannung von 1 - 20 V pro cm Gel-Länge. Als Größenstandard diente die 1kb Leiter bzw. 100 bp-Leiter von Gibco BRL. Durch das interkalierte Ethidiumbromid lassen sich die Banden unter UV-Licht detektieren und gegebenenfalls abfotografieren bzw. mit einer Digitalkamera digitalisieren.

Fragmentgrößen der 1kb Leiter in kbp:

12.216 / 11.198 / 10.180 / 9.162 / 8.144 / 7.126 / 6.108 / 5.090 / 4.072 / 3.054 / 2.036 / 1.636 / 1.018 / 0.506 / 0.396 / 0.344 / 0.298 / 0.201 / 0.154 / 0.134 / 0.075

Fragmentgrößen der 100 bp Leiter in bp:

2072 / 1500 / 1400 / 1300 / 1200 / 1100 / 1000 / 900 / 800 / 700 / 600 / 500 / 400 / 300 / 200 / 100

2.2.1.5.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Für das 8%ige Gel wurden 31 g Harnstoff in 31 mL ddH₂O und 7,5 mL 10x TBE gelöst, mit 11 mL einer Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (38%/2%) sowie 450 µL 10% Ammoniumpersulfat versetzt und unter Vakuum entgast. Nach Zugabe von 75 µL TEMED wurde das Gel zwischen zwei wie folgt vorbehandelten Glasplatten auspolymerisiert: Beide Platten wurden gründlich mit Ethanol gesäubert. Die größere Platte wurde mit 300 µL γ-Methacryloxypropyltrimethoxysilan und die kleinere mit 300 µL Sigmacote eingerieben, um das Anhaften des Gels an der großen Platte und die Trennung der kleinen Platte nach dem elektrophoretischen

Lauf zu gewährleisten. Beide Platten wurden getrocknet und mit Ethanol abschließend erneut gründlich gesäubert. Unter Verwendung von *spacers* wurden die Platten übereinandergelegt und mit Klammern fixiert. Nach dem Einfüllen der Acrylamidlösung wurden zwei Probenkämme mit ihrer stumpfen Seite voran so zwischen den Platten plziert, daß sie etwa 5 mm in die Flüssigkeit tauchten und mit Klammern fixiert. Die Polymerisation erfolgte in horizontaler Lage über 60 min bei RT. Vor dem Gel-Lauf wurden die Kämme entfernt, der Auftragsbereich mit ddH₂O gespült und die Gelplatte in die Elektrophoreseapparatur (BRL, Mod. S2) gespannt. Als Oberpuffer wurde 0,5x TBE und als Unterpuffer 1x TBE (0,09 M Tris/Borat pH 8,0; 1 mM EDTA) verwendet. Die Kämme wurden mit den Spitzen ins Gel zeigend ca. 2 mm tief eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min bei 95°C hitzedenaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Um ein Renaturieren der Proben nach dem Auftrag zu verhindern, wurde das Gel in einem Vorlauf für 60 min bei 1,8 kV und maximal 80 W erwärmt. Der Lauf erfolgte ebenfalls bei 1,8 kV und 80 W bis das Bromphenolblau der neu aufgetragenen Proben bis zum unteren Gel-Ende gewandert war (kurzer Lauf). Durch Zugabe von 100 mL 3 M Natriumazetat in die untere Pufferkammer ca. 30 min vor Laufende wurde im unteren Bereich des Gels die Laufgeschwindigkeit verlangsamt. Hierdurch konnte eine gleichmäßigere Auftrennung der Banden erzielt werden. Nach dem Lauf wurde das Gel von der kleineren Glasplatte getrennt, für 20 min in Fixierungslösung (5% Methanol, 5% Essigsäure) fixiert und anschließend gewässert. Nach dem Trocknen des Gels wurde bei -70°C unter Verwendung von Verstärkerfolien mit einem Kodak BioMax MR-Film exponiert oder nach Exposition auf Phosphoimager-Platten mit dem Phosphoimager (Raytest) ausgewertet.

2.2.1.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick-DNA-Extraktions-Kit von QIAGEN. Hierzu wurde das zu eluierende Fragment unter UV-Licht ausgeschnitten und gewogen. Durch Zugabe einer dreifachen Menge an QX1-Puffer wurde die Agarose bei 50°C für mindestens 5 min solubilisiert. Diese Lösung wurde nachfolgend auf die mitgelieferte Säule gegeben und in der Eppendorf-Zentrifuge 1 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen. Die auf der Säule immobilisierte DNA wurde 2 - 3 x mit 750 µL PE-Puffer

gewaschen. In einem nachfolgenden Zentrifugationsschritt (3 min bei 14.000 rpm) wurde der restliche PE-Puffer abzentrifugiert, um das darin enthaltene Ethanol zu entfernen. Schließlich wurde die DNA durch Zugabe von 50 µL TE-Puffer bzw. ddH₂O in einem letzten Zentrifugationsschritt eluiert.

2.2.1.7 Qualitative DNA-Analyse

Neben dem Restriktionsverdau und der Agarosegelelektrophorese erfolgte die qualitative Analyse von DNA durch Hybridisierungen und Sequenzierungen.

2.2.1.7.1 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten

Herstellung von Sephadex G50-Säulen:

Sephadex G50-Säulen dienen zur Aufreinigung radioaktiv markierter DNA-Sonden von nicht eingebauter Radioaktivität. Die Ausflußöffnung einer 1 mL Einwegspritze wurde mit steriler Glaswolle verstopft und die Spritze anschließend mit in STE (0,1 M NaCl; 10 mM Tris/HCl; 1 mM EDTA) suspendiertem G50-Säulenmaterial gefüllt. In der Heraeus Zentrifuge wurde die Säule 10 min bei 1700 rpm trocken zentrifugiert. Die Säule wurde schließlich mehrfach mit STE gewaschen.

Die radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit dem *ready-to-go-kit* von Pharmacia. Hierbei handelt es sich um ein Lyophilisat aus Enzym (Klenow-Polymerase), dNTPs, *random*-Primern und Reaktionspuffer. Für die Markierung wurden 40 ng *template*-DNA in einem Volumen von 25 µL ddH₂O zunächst denaturiert und das Lyophilisat für 5 – 60 min mit 20 µL ddH₂O rekonstituiert. Dieses wurde der denaturierten DNA beigemischt und nach Zugabe von 5 µL (50 µCi) [$\alpha^{32}\text{P}$]dCTP wurde der Reaktionsansatz für 5 – 10 min bei 37°C inkubiert. Zur Abtrennung nicht eingebauter Mononukleotide wurde der Reaktionsansatz mit 80 µL STE-Puffer versetzt und auf eine Sephadex G50-Säule gegeben. Diese wurde in der Heraeus Zentrifuge 5 min bei 1700 rpm abzentrifugiert, wonach die nicht eingebauten Mononukleotide in der Säule verbleiben und sich markierte Sonden-Fragmente im Eluat befinden. Die Aktivitäten von Eluat und Säule wurden zur

Bestimmung des Einbaus gemessen. Das Eluat wurde schließlich nochmals denaturiert und in die Hybridisierungslösung gegeben.

2.2.1.7.2 Immobilisierung von elektrophoretisch aufgetrennten Nukleinsäuren auf Nylonmembranen.

Der Transfer der DNA, cDNA (Southernblot) oder RNA (Northernblot) erfolgte mittels Kapillarkraft auf Hybond-N+-Nylonmembranen. Hierzu wurde in einem Gefäß ein Podest aus einer Glasplatte aufgebaut und mit 2 Lagen 3MM-Filterpapier so bedeckt, daß sie die Glasplatten überragen und mit 2 Kanten in den Transferpuffer (0,4 M NaOH) tauchen. Das Gel wurde invertiert auf die Glasplatte gelegt und durch Abschneiden einer Ecke markiert. Die Nylonmembran wurde paßgenau zurechtgeschnitten, ebenfalls markiert und auf das Gel aufgelegt. Hierüber wurden 4 Lagen dünnes Papier geschichtet. Das Gel wurde so mit Parafilm umklebt, daß der Transferpuffer das Gel und die Nylonmembran passieren mußte. Zuletzt folgten mehrere Lagen saugfähige Zellulose, die mit einer Glasplatte und ca. 500 g Gewicht beschwert wurden. Nach dem Transfer UN wurde die Nylonmembran getrocknet und anschließend wurde die DNA zusätzlich durch 1-minütige UV-Bestrahlung (312 nm) kovalent mit der Membran verknüpft.

2.2.1.7.3 Hybridisierungen

Für Hybridisierungen der auf Nylonmembranen fixierten Nukleinsäuren (2.2.1.7.2) mit Klenow-markierten Sonden (s. 2.2.1.7.1) wurden die Membranen für 30 min bei 65°C in Express-Hybridisierungslösung (Clontech) inkubiert. Dieser Lösung wurde anschließend die radioaktiv markierte DNA-Sonde zugesetzt und die Membranen für 1 - 3 h in einem Hybridisierungsöfen bei 65°C hybridisiert. Nach der Hybridisierung wurden die Membranen zweimal in 2x SSC + 0,1% SDS gewaschen und nacheinander in Waschlösungen steigender Stringenz (zweimal 1x SSC + 0,1% SDS; einmal 0,5x SSC + 0,1% SDS) bei 68°C gewaschen. Zwischen den Waschsritten wurde die Aktivität der Membranen mit dem Geiger-Zähler kontrolliert.

Die Membranen wurden im feuchten Zustand in Folie eingelegt und bei -70°C unter Verwendung von Verstärkerfolien mit Kodak Biomax MR-Filmen exponiert oder alternativ mit dem Phosphoimager (Raytest) ausgewertet.

2.2.1.7.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR ist es möglich, aus einem komplexen DNA-Gemisch eine individuelle Sequenz zu amplifizieren, wobei die entsprechende Matrize (*template*) theoretisch nur in einigen wenigen Kopien vorliegen muß (Mullis, K.B. und Faloona, F.A., 1987). Die Spezifität der Synthese ist einerseits von der Auswahl der Primer und zum anderen von der Stringenz der Reaktionsbedingungen abhängig. Die wichtigsten Parameter sind dabei die Hybridisierungstemperatur (*annealing*) und die Mg^{2+} -Konzentration. Die PCR, die im automatisierten Verfahren im PCR-Thermocycler durchgeführt wird, erfolgt durch Denaturierung, Hybridisierung der Primer (*annaeling*) und Synthese des zweiten Stranges (*extension*). Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte kommt es zur exponentiellen Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die PCR für analytische Untersuchungen sowie für die Amplifikation von Hybridisierungsproben und Fc γ RII-spezifischen Fragmenten eingesetzt.

Sofern nicht anders angegeben, erfolgte die PCR nach folgendem Standardprotokoll: Zu 50 μL 10 mM Tris/HCl pH 8,3; 50 mM KCl; 1,5 mM MgCl_2 ; 0,01% Gelatine; 200 μM dNTP; je 20 pmol Primer und 1 - 2 U Taq-Polymerase wurden 1 μg genomische DNA, 1 - 5 ng Plasmid-DNA bzw. 2 – 5 μL cDNA-Lösung aus einem RT-Ansatz pipettiert und die Proben mit 60 μL Paraffinöl überschichtet. Durch 35 aufeinanderfolgende Denaturierungs-, Hybridisierungs- und Elongationsschritte (30 s bei 95°C ; 45 s bei 55°C ; 60 s bei 72°C) und einem terminalen Elongationsschritt von 5 min wurden die gewünschten DNA-Fragmente synthetisiert und amplifiziert. Im Anschluß wurden Spezifität der PCR-Reaktion und korrekte Größe des amplifizierten Produktes gelelektrophoretisch überprüft. Für präparative Zwecke wurde das PCR-Produkt entweder durch PCI-Extraktion und Ethanol-Fällung gereinigt oder wie unter 2.2.1.6 beschrieben, aus dem Agarosegel eluiert.

2.2.1.8 Qualitative und Quantitative RNA-Analysen

2.2.1.8.1 RT-PCR

Die RT-PCR diente zur Analyse von mRNA-Transkripten aus gesamtzellulärer RNA und zur Herstellung von cDNA-Hybridisierungssonden. Bei dieser Methode wird die RNA zunächst durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend mit Hilfe der PCR (s. 2.2.1.7.4) unter Verwendung spezifischer Primer die entsprechenden Sequenzen amplifiziert.

6 – 12 µg Gesamt-RNA wurden mit RNase-freiem ddH₂O in 0,5 µL Reaktionsgefäßen auf ein Volumen von 10 µL gebracht und für 3 min bei 80°C erhitzt. Pro RT-Ansatz wurde ein Reaktionsgemisch aus 6 µL 5x Puffer, 6 µL 25mM MgCl₂, 100 pMol Oligo-dT-Primer, 3 µL 10mM dNTPs, 10 U RNase-Inhibitor (RNasin) und 8 U AMV Reverse Transkriptase in einem Volumen von 20 µL/RT-Ansatz in einem 1,5 µL Reaktionsgefäß angesetzt und je 20 µL mit der abgekühlten RNA vermischt. Die Synthese der cDNA erfolgte für 1,5 h bei 42°C mit einer abschließenden Hitzedenaturierung der Reversen Transkriptase bei 80°C für 10 min. Je 2 – 5 µL des cDNA-Gemisches wurden in einer nachfolgenden PCR-Reaktion wie unter 2.2.1.7.4 beschrieben, eingesetzt und anschließend für analytische Zwecke auf einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Intensität und Spezifität der Banden wurde das Signal durch nachfolgende Southernblothybridisierung weiter verstärkt (2.2.1.7.1 - 2.2.1.7.3). Für präparative Zwecke wurde die spezifische Bande aus dem Agarosegel eluiert und in einen T-Vektor (pGEM-T, Promega) kloniert.

2.2.1.8.2 Northernblot

Elektrophoresepuffer (10fach)	200 mM MOPS
	50 mM Natriumazetat
	10 mM EDTA
	ad 1L H ₂ O, pH 7,0

Samplepuffer (1,33fach)	500 μ L Formamid (deionisiert) 169 μ L Formaldehyd 100 μ L Elektrophoresepuffer (10fach)
Stoppuffer (5fach)	5 mL Elektrophoresepuffer (10fach) 3 mL H ₂ O 1,5 g Ficoll 400 0,25% Bromphenolblau 1h 37°C
1%iges Gel (125 mL)	105 mL H ₂ O 1,25 g Agarose 12,5 mL Elektrophoresepuffer (10fach) 12,5 μ L Ethidiumbromid (10 g/ μ L) 8 mL Formaldehyd

Für die Auftrennung der RNA wurden 4,6 μ L RNA in einer Konzentration von 3 – 4 μ g/ μ L mit 15,4 μ L Samplepuffer versetzt und für 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit 5 μ L Stoppuffer versetzt und auf Eis gestellt. Die Auftrennung erfolgte im 1%igen Agarose/Formaldehydgel bei 4°C für ca. 3h bei 6V/cm Elektrodenabstand. Nach dem gelelektrophoretischen Lauf wurde das Gel wie unter 2.2.1.7.2 beschrieben auf einer Nylonmembran immobilisiert wobei anstelle von NaOH 10x SSC verwendet wurde. Die Membranen wurden anschließend mit Klenow-markierten DNA-Sonden (2.2.1.7.1) wie unter 2.2.1.7.3 aufgeführt hybridisiert.

2.2.1.8.3 *RNase Protection Assay* (RPA)

Der RPA wurde mit dem "RiboQuant Multi-Probe *RNase Protection Assay System*" der Firma Pharmingen durchgeführt. Dieses beinhaltet einen *in vitro*-Transkriptions-Kit und einen RPA-Kit. Die Firma bietet verschiedene Template-Sets zur Detektion muriner und humaner Zytokine an. In dieser Arbeit wurden Sonden aus einem Set für murine Chemokine (mCK-5) synthetisiert und als Größenstandard genutzt.

2.2.1.8.3.1 Synthese der Riboproben

Die Synthese der Riboproben erfolgte mittels einer *in vitro*-Transkription in Gegenwart von ^{32}P -markiertem UTP. Verwendet wurde $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (3000 Ci/mol, 20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$) der Firma Amersham.

In einem 1,5 mL Gefäß wurden 1 μL RNasin (40 U/ μL), 1 μL GACU-Pool (2,75 mM GTP/ATP/CTP; 61 μM UTP), 2 μL DTT (100 μM), 4 μL 5x Transkriptionspuffer, 1 μL DNA-template (mCK-5, Pharmacia, 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) und 5 μL RNase-freies H_2O vermischt und nach Zugabe von 5 μL $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ (100 μCi) und 1 μL T7-RNA-Polymerase (20 U/ μL) für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2 μL RNase-freier DNase (1 U/ μL) gestoppt und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von 26 μL EDTA (20 mM) und 2 μL Hefe-tRNA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) als Fällhilfe wurde 1 μL Aliquot zur Messung der Aktivität entnommen. Die Proteine wurden durch PCI-Extraktion entfernt und die radioaktiv markierte Riboprobe durch Zugabe von 50 μL 4 M Ammoniumazetat und 250 μL Ethanol für 30 min bei -80°C präzipitiert, um nicht eingebaute Nukleotide zu entfernen. Das Präzipitat wurde 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert, mit 90% Ethanol gewaschen und in 50 μL Hybridisierungspuffer aufgenommen. Die Aktivität wurde erneut bestimmt und mit der Gesamtaktivität verglichen. Die Aktivität der Riboproben wurde, soweit nicht anders angegeben, auf 3×10^5 cpm eingestellt. Die Aktivität wurde mit dem Geiger-Zähler in der Einheit [ips] gemessen und auf cpm umgerechnet, wobei die eingesetzte Gesamtaktivität von 100 μCi 2200×10^5 cpm entsprechen. Durch das Verhältnis der Messungen kurz nach Zugabe der Aktivität und nach Aufnahme der RNA im Hybridisierungspuffer läßt sich die Restaktivität in der synthetisierten *antisense*-RNA bestimmen.

2.2.1.8.3.2 Präparation der RNA

Je 30 μg Gesamt-RNA aus Mesangialzellen, 10 μg Gesamt-RNA aus J774-Zellen und 20 μg Hefe-tRNA wurden in ein 0,5 mL Reaktionsgefäß gegeben, im *speed-vac* getrocknet und schließlich in 8 μL Hybridisierungspuffer gelöst.

2.2.1.8.3.3 Hybridisierung und RNase-Verdau

Zur Proben-RNA wurden jeweils 2 μL (6×10^5 cpm bei 3×10^5 cpm/ μL) Riboprobe gegeben und mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Proben wurden für 3 min bei 90°C denaturiert und anschließend langsam im Thermocycler auf eine Endtemperatur von 45°C gebracht und $\ddot{u}\text{N}$ hybridisiert.

Nach Abkühlung auf 37°C wurden 100 μL RNase-Puffer mit RNase A (180 ng/mL) und RNase T1 (600 U/mL) zugegeben und für 45 min bei 30°C inkubiert. Die Proben wurden in 1,5 mL GefäÙe pipettiert, in die 18 μL eines Gemischs aus 390 μL Proteinase K-Puffer, 30 μL Proteinase K (10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) und 30 μL tRNA (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) vorgelegt wurden. Nach einer Inkubation von 15 min bei 37°C wurden die Proteine mittels PCI-Extraktion entfernt, die RNA mit 120 μL Ammoniumazetat und 650 μL Ethanol gefällt und mit 90% Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 5 μL *loading buffer* aufgenommen und nach 3 min Denaturierung bei 90°C mittels PAGE (2.2.1.5.2) aufgetrennt.

2.2.1.9 Biochemische DNA-Rekombination (DNA-Klonierung)

Die DNA-Klonierung beinhaltet im Allgemeinen die Restriktion von Vektor und Fremd-DNA, die Ligation der Fremd-DNA in den Vektor und die Transformation, Transfektion oder Infektion einer Wirtszelle mit der so entstandenen rekombinanten DNA. Die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen erfolgten durch Transformation rekombinanter Plasmide in den mittels der CaCl_2 -Methode kompetent gemachten *E. coli*-Stamm XL1 blue.

2.2.1.9.1 Herstellung kompetenter *E. coli* (CaCl_2 -Methode)

10 μL Zellen (*E. coli* XL1 blue) wurden für eine Vorkultur mit 2 mL LB-Medium $\ddot{u}\text{N}$ bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden 1 mL hiervon in 250 mL LB überführt und bei 37°C inkubiert, bis die Bakteriensuspension eine OD_{600} von 0,3 erreicht hatte (ca. 2,5 h). Die Zellen wurden 10 min auf Eis abgekühlt, 15 min bei 4000 rpm und

4°C zentrifugiert, dekantiert, mit 125 mL 0,1 M CaCl₂ versetzt und erneut 10 min auf Eis gestellt. Die Zellen wurden nochmals bei 4000 rpm und 4°C 10 min abzentrifugiert, dekantiert und in 10 mL 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen. Diese sollte mindestens 4 h auf Eis stehen, bis sie mit 3 mL kaltem sterilem Glycerin (87%) versetzt wird. Die Suspension wurde in 200 µL Aliquots in 1,5 mL Reaktionsgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert. 100 µL dieser Bakteriensuspension wurde zur Ermittlung der Kompetenz mit 10, 50 und 100 pg *supercoiled* Plasmid wie unten beschrieben transformiert und jeweils 1/5 des Transformationsansatzes auf LB-Agar mit 50 µg/mL Ampicillin ausplattiert. Die Kompetenz betrug im Regelfall 1×10^6 - 1×10^7 CFU (*colony forming units*: Anzahl Kolonien/µg *supercoiled* Plasmid).

2.2.1.9.2 Ligation

Bei der Ligationsreaktion wird durch die DNA-Ligase zwischen dem 3'-OH und dem 5'-Phosphat zweier Nukleotide eine Phosphodiesterbindung ausgebildet. Während die *E. coli*-Ligase nur die Verknüpfung von Nukleotiden an kohäsiven komplementären Enden katalysieren kann, ist die aus dem Bakteriophagen T4 isolierte Ligase zusätzlich in der Lage, zwei stumpfe Enden zu ligieren.

Je nach Strategie und Größe der *Insert*-DNA wurden unterschiedliche Mengen an Vektor- und *Insert*-DNA eingesetzt. Bei direktionalen und bidirektionalen Ligationen wurden standardmäßig 100 ng Vektor und 200 ng *Insert* eingesetzt. Die Reaktion erfolgte durch Zugabe von 0,5 U T4-DNA-Ligase üN bei 15°C in Ligationspuffer (40 mM Tris/HCl pH 7,5; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTE; 0,5 mM ATP; 50 µg/mL BSA).

2.2.1.9.3 Dephosphorylierung linearisierter Vektor-DNA mittels "calf intestinal alkaline phosphatase" (CIP) Phosphatasereaktion

Nach der Restriktion von 10 µg Vektor wurde die DNA mit Ethanol gefällt, in 85 µL ddH₂O und 10 µL 10x CIP-Puffer (10 mM ZnCl₂; 10 mM MgCl₂; 100 mM Tris/HCl (pH 8,3)) aufgenommen und mit 5 µL Enzym (1U/µL) für 30 min bei 37°C inkubiert.

Ein zweiter Inkubationsschritt erfolgte durch Zugabe von weiteren 5 μL Enzym, 4 μL ddH₂O und 1 μL 10x CIP-Puffer bei 56°C. Anschließend erfolgte eine Inaktivierung der Phosphatase durch 45-minütige Inkubation mit Proteinase K bei 56°C gefolgt von einer PCI-Extraktion und Ethanol-Fällung.

2.2.1.9.4 Transformation

Maximal 5 μL des Ligationsansatzes wurden mit 100 μL kompetenten *E. coli* (XL1 blue) 30 min auf Eis, 45 s bei 42°C und schließlich 2 min auf Eis inkubiert. Für die Ausbildung der Antibiotikaresistenz (Expression der β -Lactamase bezüglich der Ampicillinresistenz) wurden die Bakterien mit 900 μL LB-Medium versetzt und 45 – 60 min bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. 200 μL der Bakteriensuspension wurden schließlich auf LB-Agar mit 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin zur Selektion erfolgreich transformierter Zellen ausplattiert.

2.2.1.9.5 Visualisierung erfolgreicher Klonierungen mittels α -Komplementation der β -Galaktosidase

Das bakterielle Enzym β -Galaktosidase wird von der *lacZ*-Region des *lac*-Operons codiert und ist durch β -Galaktosid-Analoga, wie das nicht metabolisierbare IPTG, induzierbar. Viele Wirtsbakterien, wie auch XL1 blue, enthalten eine Mutation im β -Galaktosidase Gen (*LacZ* Δ M15), so daß ein funktionsloses Fragment des Enzyms exprimiert wird. Dieses kann aber mittels einer α -Komplementation durch das von vielen Plasmiden codierte N-terminale Fragment der β -Galaktosidase rekonstituiert werden, wenn das Leseraster nicht durch eine Insertion in der *multi cloning site* (MCS) unterbrochen ist. Nur solche Klone, bei denen eine α -Komplementation vorliegt, denen also ein *Insert* fehlt, sind in der Lage, das chromogene Substrat 5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactosid (Xgal) in Galactose sowie blau gefärbtes 5-Bromo-3-Chloro-Indigo zu spalten, und die entsprechenden Kolonien färben sich blau an. Die Klone von Interesse synthetisieren aufgrund der Insertion kein aktives Enzym und ihre Kolonien bleiben weiß.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Kultur muriner Zelllinien

FCS-haltiges Standardkulturmedium

10% FCS (PAA, Standard Fetales Kälberserum)

1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, 10000 U/mL Penicillin, 10000 µg/mL Streptomycin)

1% L-Glutamin (Biochrom, 200 mM)

3,5 µL β-Mercaptoethanol

in 500 mL RPMI 1640 (Biochrom)

pH 7,4

Das Standardkulturmedium wurde für die Kultur der B-Zelllinie A20, der Makrophagenlinien J774 und RAW sowie Mesangialzellen verwendet. Das FCS wurde vor der Zugabe für 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert und mit den weiteren Zusätzen sterilfiltriert. Für die Kultur der Dendritischen Zelllinie 80/1 wurde dieses Medium mit 25 mM HEPES-Puffer pH 7,3; 10 U/mL murinem IL-2 (Boehringer) und 2 µg/mL ConA (Pharmacia) versetzt.

2.2.2.1.1 Expansion von Zelllinien

Die Zellen wurden bei 37° C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert. Suspensionszellen wie die B-Zelllinie A20 wurden zu Beginn mit einer Dichte von 0,2 – 0,5 x 10⁵ Zellen kultiviert. Sie wurden nach ca. 2 – 3 Tagen, wenn die Kultur eine Dichte von maximal 2 x 10⁶ Zellen/mL erreicht hatte, auf das 4 – 5fache Volumen expandiert. Adhärente Zellen wurden in 10 mL Kulturmedium bei einer Zellzahl von 3 Mio. Zellen/250mL Zellkulturflasche kultiviert und bei vollständiger Konfluenz auf 4 – 5 Zellkulturflaschen expandiert. Das Ablösen der Zellen erfolgte entweder mit einem *cellscraper* oder durch eine Trypsinisierung der Zellen. Die Dendritische Zelllinie 80/1 wurde in einem Volumen von 50 mL kultiviert und bereits vor dem Erreichen einer vollständigen Konfluenz weiter expandiert.

2.2.2.1.2 Trypsinisierung adhärenter Zellen

Zum Ablösen adhärenter Zellen wurde das Kulturmedium abgesaugt und durch PBS ersetzt. Nach kurzem Waschen wurde das PBS durch 1,5 mL (250 mL Zellkulturflaschen) Trypsin/EDTA (0,125% / 0,01%) ersetzt und nach ca. 5 min mit dem 10fachen Volumen an Zellkulturmedium inaktiviert.

2.2.2.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Für die Zählung wurden die Zellen mit dem gleichen Volumen einer 1:10 verdünnten Trypanblau-Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer die Lebendzellzahl von mindestens 100 Zellen ausgezählt. Für die Ermittlung der Zellzahl (in Zellen/mL) wurden die diagonal gegenüberliegenden (2x16) Kleinquadrate ausgezählt und mit dem Faktor 10^5 multipliziert.

2.2.2.1.4 Auftauen von Zellen

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden zügig bei 37°C aufgetaut und in 10 mL warmes Kulturmedium überführt. Nach 5-minütigem Abzentrifugieren bei 1000 rpm wurden die Zellen noch einmal in 14 mL Kulturmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen. Suspensionszellen wurden in einer Dichte von 5×10^5 Zellen/mL in Kultur gebracht und adhärenente Zellen in einer Zellzahl von $3 - 5 \times 10^6$ in 250 mL Zellkulturflaschen ausgesät.

2.2.2.1.5 Einfrieren von Zellen

Adhärenente Zellen wurden wie unter 2.2.2.1.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst, mit Medium suspendiert, die Zellzahl bestimmt und bei 1000 rpm abzentrifugiert. Suspensionszellen wurden direkt nach der Zellzahlbestimmung durch Zentrifugation pelletiert. Hiernach wurde das Zellpellet in einer Zelldichte von 10 Mio Zellen/mL in sterilem FCS resuspendiert. Jeweils 0,5 mL der Zellsuspension wurden auf *Cryotubes* verteilt in die jeweils 0,5 mL 20%iges DMSO in FCS vorgelegt wurde.

Die *tubes* wurden zügig verschlossen, geschüttelt und zunächst bei -80°C eingefroren. Zur Langzeitkonservierung wurden sie am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.2.2 Präparation und Kultur primärer muriner Zellen

2.2.2.2.1 Präparation und Kultur muriner Embryonaler Fibroblasten (MEF)

Kulturmedium (MEF-Medium):

10% FCS

1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, 10000 U/mL Penicillin, 10000 $\mu\text{g/mL}$ Streptomycin)

1% L-Glutamin (Biochrom, 200 mM)

5 μL β -Mercaptoethanol

in 500 mL DMEM (Gibco)

Murine Embryonale Fibroblasten werden als sogenannte *Feeder*-Zellen zur Kultur Embryonaler Stammzellen benötigt. Neomycin-resistente Mäuse (freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Rüter, Institut für Molekularbiologie, MHH zur Verfügung gestellt) wurden verpaart und am Tag 12-13 der Schwangerschaft wurden von trächtigen Weibchen die Embryonen entnommen. Hierzu wurden beide Uteri entfernt und in eine mit sterilem PBS gefüllte Petrischale überführt. Die Embryonen wurden aus den Uteri präpariert und in eine zweite Petrischale überführt. In dieser Petrischale wurden Kopf und Leber der Embryonen entfernt, die restlichen hellen Teile der Embryonen in eine dritte Petrischale mit ca. 2 mL PBS und 2 mL Trypsin/EDTA überführt und in kleine Stücke geschnitten. Mit einem kleinen sterilen EK als „Mörserersatz“ wurden die Embryonenstückchen nun weiter zerkleinert und in ein 50 mL Reaktionsröhrchen überführt. Die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen, wonach ein letzter Waschschrift mit MEF-Medium erfolgte. Schließlich wurden die Zellen in einem Volumen von 5mL Medium in einer kleinen Zellkulturflasche (10 mL) ausgesät. Am nächsten Morgen wurden die Zellen sofort überprüft und je nach Dichte gewaschen oder in 2 große Zellkulturflaschen (250 mL) expandiert (Tab. 1).

Zur Expansion der Fibroblasten wurde das Medium restlos abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Durch Zugabe von 0,5 mL (10 mL) bzw. 1,5 mL (250 mL) Trypsin/EDTA wurden die Zellen abgelöst (ca. 5 min), wobei dies im Mikroskop überprüft werden kann. Vor jeder Expansion wurde Zellkulturüberstand für einen Mycoplasmentest entnommen.

Passage	Expansion	Anzahl Flaschen
0		1 (2) 10 mL ZF
1	1:6 (ca.)	2 (4) 250 mL ZF
2	1:5	10 (20) 250 mL ZF
3	1:4	40 (80) 250 mL ZF
4	1:3 – 1:4	120-160 (240-320) 250 mL ZF

Tab. 1: Expansionsschema muriner Fibroblasten. Alternativ werden zu Anfang die Zellen in eine oder zwei (in Klammern) Zellkulturflaschen ausgesät (ZF= Zellkulturflasche).

2.2.2.2.1.1 Einfrieren Embryonaler Fibroblasten:

Einfriermedium:

10% DMSO

45% FCS

45% MEF-Medium

Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.1.2 beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst und mit Medium in ein 50 mL Reaktionsröhrchen überführt. Dabei konnten jeweils 5 Flaschen gepoolt werden. Aus diesen wurde jeweils ein Tropfen für die Zellzahlbestimmung entnommen, bevor die Zellen bei nicht mehr als 200 x g abzentrifugiert wurden. In dieser Zeit wurden jeweils 0,5 mL 20%DMSO/FCS in *Cryotubes* vorgelegt. Das Zellpellet wurde in soviel MEF-Medium resuspendiert, daß eine Zelldichte von 10 Mio Zellen/mL erreicht wurde. Jeweils 0,5 mL der Zellsuspension wurde nun in die *Cryotubes* verteilt, die zügig verschlossen,

geschüttelt und für einen Tag bei -80°C und danach in flüssigem Stickstoff eingefroren wurden.

2.2.2.2.1.2 Auftauen Embryonaler Fibroblasten

Das Auftauen der Fibroblasten erfolgte wie unter 2.2.2.1.4 beschrieben, die jeweiligen Zentrifugationen wurden jedoch bei max. 200 x g durchgeführt.

2.2.2.2.1.3 Vorbereitung der Embryonalen Fibroblasten für die Embryonale Stammzellkultur (ES-Zellkultur)

Ansetzen des Mitomycinmediums:

Der Inhalt eines Vials (2mg) wurde mit einer Spritze (Durchstechen des Plastikstopfens) mit 5 mL MEF-Medium gelöst und in die Spritze aufgezogen. Diese Lösung wurde in 200 mL (Endkonzentration: 10 $\mu\text{g/mL}$) MEF-Medium gegeben und in Aliquots zu 10 und 5 mL eingefroren.

Jeweils ein Cryotube (ca. 5 Mio. Fibroblasten) wurde wie unter 2.2.2.2.1.2 beschrieben aufgetaut und auf eine 250 mL Zellkulturflasche ausplattiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen gewaschen und für einen weiteren Tag kultiviert. Die Mitomycinbehandlung zur Wachstumsarretierung erfolgte am dritten Tag. Hierzu wurde das Medium abgesaugt und durch 5 mL Mitomycinmedium (s.o.) ersetzt. Die Inkubation erfolgte für genau 2,5 h im Brutschrank. Das Mitomycinmedium wurde mit der Pipette abgenommen, separat entsorgt und die Zellen wurden 3x mit PBS gewaschen. Es folgte das Ablösen der Zellen mit Trypsin/EDTA wie unter 2.2.2.1.2 beschrieben. Die Fibroblasten wurden gezählt (2.2.2.1.3) und nach folgendem Schema ausplattiert:

250er Zellkulturflasche	6 Mio Zellen
10er Zellkulturflasche	2,5 Mio Zellen
24-Well-Platte	5 Mio Zellen
96-Well-Platte	2 Mio Zellen
9 cm ² Zellkulturschale	5 Mio Zellen

2.2.2.2.2 Kultur Embryonaler Stammzellen (ES-Zellen)

Kulturmedium (ES-Medium):

15% FCS

1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, 10000 U/mL Penicillin, 10000 µg/mL Streptomycin)

1% L-Glutamin (Biochrom, 200 mM)

5 µL β-Mercaptoethanol

500 U/mL *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF (ESGRO), Gibco)

in 500 mL DMEM (Gibco)

Embryonale Stammzellen aus 129/ola-Mäusen (E14.1) wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Rüter, Institut für Molekularbiologie, Medizinische Hochschule Hannover zur Verfügung gestellt. Um die Pluripotenz der Zellen zu erhalten, wurden sie auf einem Monolayer von wachstumsarretierten, murinen Embryonalen Fibroblasten als *Feeder*-Zellen und in Gegenwart von 500 U/mL *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), kultiviert. Zur Expansion wurden die in Kolonien wachsenden ES-Zellen maximal für 3 Tage auf den *Feeder*-Zellen gehalten und anschließend auf frische *Feeder*-Zellen 1:4 bis 1:5 expandiert. Hierbei wurden die Kolonien mindestens einmal täglich unter dem Mikroskop begutachtet, um die unerwünschte Differenzierung der Zellen zu kontrollieren. Pluripotente, undifferenzierte ES-Zellen weisen keine sichtbaren Zellgrenzen auf, während sich differenzierende Kolonien in Einzelzellen abgrenzen. Das Ablösen der Zellen erfolgte durch Trypsinisieren wie unter 2.2.2.1.2 beschrieben, zur Konservierung wurden sie in einem Medium aus 50% ES-Zellmedium, 40% FCS und 10% DMSO resuspendiert und wie unter 2.2.2.1.5 beschrieben eingefroren.

2.2.2.2.3 Transfektion, Selektion und genomische Analyse Neomycin-resistenter Embryonaler Stammzellen

Zur Generierung homolog rekombinierter ES-Zellklone wurden zunächst 2×10^7 Zellen mit 30 µg Sall-linearisiertem FcγRII C1-Exon-*targeting*-Konstrukt in 500 µL PBS resuspendiert und bei 220V/cm und 400 µF im Elektroporator (Eurogentec)

elektroporiert. Anschließend wurden sie zur Rekonstitution mit antibiotikafreiem ES-Zell-Medium auf 10 vorbereiteten Zellkulturschalen (9 cm²) mit wachstumsarretierten, Neomycin-resistenten *Feeder*-Zellen (2.2.2.2) ausgesät. Die Zellen wurden am nächsten Tag gewaschen und das Medium nach 48 h nach Elektroporation durch Negativselektionsmedium (ES-Zell-Medium + 350 µg/mL G418) ersetzt. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen in Negativ-Positiv-Selektionsmedium (ES-Zell-Medium + 350µg/mL G418 + 2,5 µM Gancyclovir (Cymevene, LaRoche) inkubiert. 10 bis 11 Tage nach der Elektroporation wurden Neomycin/Gancyclovir-resistente Kolonien gepickt und nach Separation in Einzelzellen mit Trypsin/EDTA in jeweils zwei Sets 24-Well Zellkulturplatten mit vorplattierten, wachstumsarretierten *Feeder*-Zellen expandiert. Nach Konfluenz der ES-Zellen wurde eine Platte ohne Ablösen der Zellen direkt in 500 µL Einfriermedium (40% FCS; 50% ES-Zell-Medium; 10% DMSO) bei -80°C bis zur Auswertung der DNA-Analyse aufbewahrt. Die Isolierung genomischer DNA aus ES-Zellen erfolgte direkt in dem zweiten Set der 24-Well Zellkulturschalen. Hierzu wurden sie ün bei 37°C in jeweils 500 µL Proteinase K-Puffer inkubiert und am nächsten Tag wurde die DNA durch Zugabe von 500 µL Isopropanol bei RT auf einem Schüttler gefällt. Die genomischen DNA-Fäden wurden mit einer Eppendorfpipette vorsichtig gefischt und in jeweils 500 µL 70%igem Ethanol gewaschen. Schließlich wurden die DNA-Fäden in 1,5 mL Reaktionsgefäße überführt, zur Beseitigung der Ethanolreste für 10 - 20 min bei 50 °C getrocknet und in 50 µL ddH₂O aufgenommen. Die genomische DNA wurde schließlich mittels Southernblot-Hybridisierung (2.2.1.7.1 bis 2.2.1.7.3) analysiert.

2.2.2.2.4 Präparation und Kultur muriner Mesangialzellen (MMC)

Kulturmedium (MMC-Medium)

10% FCS

1% L-Glutamin (Biochrom, 200 mM)

1% Natrium-Pyruvat (Biochrom, 200 mM)

1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, 10000U/mL / 10000µg/mL

3 µL β-Mercaptoethanol

5 µg/mL bovines Insulin

in 500 mL RPMI 1640

Murine Mesangialzellen wurden aus isolierten Nierenglomeruli durch partiellen Kollagenaseverdau präpariert. Hierzu wurden die entnommenen Nieren von der Nierenkapsel befreit und die Nierenrinde vom Nierenmark getrennt. Das Nierenrindengewebe wurde homogenisiert und durch Siebe mit absteigender Porengröße (180, 106 und 63 μm) passagiert. Die Glomeruli wurden nach der letzten Passage aufgefangen, gewaschen und mit einer Kollagenaselösung (50 mg Kollagenase Typ IV, Fa. Worthington, 184 U/mL, in PBS gelöst) bei 37°C im Wasserbad für 20-25 min bis zur Bildung fädiger Kollagenstrukturen angedaut. Nach zwei Waschzentrifugationsschritten (4°C, 1000 rpm) mit Kulturmedium (MMC-Medium mit 20% FCS), wurden die angedauten Glomeruli in 10 mL Zellkulturflaschen ausgesät und in MMC-Medium bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasseratmosphäre bis zum Erscheinen primärer Zellkolonien inkubiert. Durch optische Kontrolle mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden unerwünschte Zellpopulationen (Knochenmarks-Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen) mit einem Zellschaber vorsichtig entfernt und die Mesangialzellen bis zur Konfluenz mit 50% konditioniertem Medium aus gewonnenem Zellüberstand von MMC und 50% frischem MMC-Medium kultiviert.

2.2.2.2.5 Präparation muriner Peritoneal-Makrophagen

Für die Anreicherung von Makrophagen im Peritoneum wurde den Mäusen vier Tage vor der Isolation 0,5 mL steriles Thioglykollatmedium (3%) i.p. injiziert. Bei Versuchsbeginn wurden die Peritonealzellen nach dem Töten der Mäuse durch Spülen des Peritoneums mit 20 mL sterilem PBS gewonnen, gezählt und nach dreimaligem Waschen im Standardkulturmedium (2.2.2.1) in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/mL aufgenommen. Die Peritoneal-Makrophagen wurden anschließend zur Adhäsion in *Chamber Slides* ausplattiert (300 μL /Kammer).

2.2.3 Proteinchemische Methoden

2.2.3.1 Biotinylierung von Antikörpern

10 μL einer 6-(Biotinamido)hexanoyl-N-hydroxysuccinimid-Ester-Lösung wurden zu 1 mL Antikörper-Lösung (2 mg/mL) gegeben, gemixt und bei RT für 50 min inkubiert.

Die Reaktion wurde dann mit 0,5 mL 1 M Tris, pH 8,0 gestoppt und innerhalb 24-48 h 3x gegen PBS bei 4°C dialysiert.

2.2.4 Tierversuche

2.2.4.1 Induktion einer experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA)

Die Anämie wurden durch intraperitoneale Injektion des aufgereinigten antierythrozytäre Antikörpers 105-2H in einem Volumen von 500 µL pro Maus induziert. Zur Bestimmung der Dosis wurden die Mäuse zunächst gewogen und dann mit der entsprechenden Menge der Antikörper bezogen auf das Körpergewicht (15 µg/g Körpergewicht (KG) zur Induktion einer transienten AIHA) behandelt. Vor der Injektion und nach 2 Tagen wurde den Mäusen etwa 50 bis 75 µL Blut aus dem Retroorbitalplexus entnommen und der Hämatokrit in Standardhämatokritröhrchen (Brand) nach Zentrifugation (Haereaus Biofuge 2) entsprechend den Angaben des Herstellers gemessen.

2.2.5 Immunhistochemische und –zytochemische Methoden

2.2.5.1 Kryostatschnitte

Für die Immunhistologie wurden die Organe in einem Methylbutanbad in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Mikrotom bei -20°C Kammertemperatur und -12°C Objekttemperatur in einer Dicke von 5 µm auf die Objektträger gebracht. Nachdem sie für 20 – 25 h luftgetrocknet waren, wurden sie entweder in Aluminiumfolie verpackt und bei -80° gelagert oder direkt für die Färbungen eingesetzt. Vor der Färbung wurden die Organschnitte mit dem *PAP-Pen* (DAKO) eingekreist, die Objektträger 10 min bei -20°C in Methanol-Aceton (1/1) fixiert und anschließend dreimal in TBS oder PBS gewaschen.

2.2.5.2 Zytopräparate

Adhärente Zellen wurden mit einer Zellzahl von 1×10^5 Zellen/Kammer in *chamber-slides* (Nunc) ausplattiert und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Danach wurden

die Kammeraufsätze entfernt, die Objektträger mit PBS gewaschen und für 10 min bei -20°C in Aceton/Methanol (1:1) fixiert. Nach 3maligem Waschen im PBS- oder TBS-Bad wurden sie für die entsprechenden Färbungen eingesetzt.

2.2.5.3 Immunfärbungen

TBS:

0,05 M Tris/Cl

0,88% NaCl

2.2.5.3.1 Immunfärbung mit der APAAP-(Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase-) Methode

Diese Methode wurde zur spezifischen Färbung von Oberflächenantigenen in Gefrierschnitten und Zytopräparaten mit Rattenantikörpern als Primärantikörper eingesetzt. Der primäre Antikörper wurde hierzu entsprechend Tab. 2 verdünnt und gegebenenfalls mit 1% Mausserum zur Blockade von Fc-Rezeptoren versetzt.

Antikörper	Verdünnung
2.4G2	1:50
BM8	1:50
F4/80	1:100
MHCII	1:50
Mac-1	1:250
Gr-1	1:50

Tab. 2: Verdünnung der einzelnen monoklonalen Ratten-Antikörper für die APAAP-Färbung

Dem Antikörper 2.4G2 (anti-FcγRII/FcγRIII) wurde stattdessen BSA in einer Endkonzentration von 1% zugegeben. Die Antikörperlösung (ca. 100 µL) wurde auf die Gefrierschnitte bzw. Zytopräparate aufgetragen und in der feuchten Kammer für 30 min bei RT inkubiert.

Nach dem Abspülen des Primärantikörpers mit TBS wurden die Objektträger für mind. 1 min in ein TBS-Bad gestellt. Hiernach erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (Kaninchen-anti-Ratten-Ig, DAKO, Z494, 1:100 verdünnt in TBS + 1% BSA) für 30 min und anschließend mit dem tertiären Antikörperkomplex (APAAP, Ratte, DAKO, D488, 1:100 verdünnt in TBS) für ebenfalls 30 min. Die letzten beiden Schritte wurden noch einmal mit einer Inkubationszeit von 15 min wiederholt. Zwischen jedem dieser Schritte wurden die Objektträger zunächst mit TBS gespült und dann für mind. 1 min in ein TBS-Bad gestellt. Um die in besonderem Maße in der Niere und Leber existente endogene Alkalische Phosphatase zu inhibieren, wurden die Schnitte vor der Zugabe des Substrates (*Fast Red* + 1 Tropfen Levamisol/mL Substrat, DAKO) mit Levamisol für 5 min inkubiert. Dabei inhibiert Levamisol spezifisch die endogene, nicht aber die für die Detektion verwendete Alkalische Phosphatase. Je nach Intensität der makroskopisch erkennbaren Rotfärbung der Präparate wurde das Substrat nach 10 – 20 min mit ddH₂O abgespült und für 2 – 5 min mit Hämatoxyllin gegengefärbt. Hiernach wurden die Objektträger mit ddH₂O gespült und 10x in ein 0,2%iges Ammoniakwasserbad getaucht. Nach 5-minütigem Spülen mit Leitungswasser wurden die Präparate mit Glycergel (DAKO) eingebettet.

2.2.5.3.1.1 Darstellung der Erythrozyten in Lebergefrierschnitten mit DAB (Diaminobenzidin) als Substrat

Erythrozyten können durch die Existenz endogener Peroxydase mit DAB dargestellt werden. Für eine Doppelfärbung mit der APAAP-Methode wurde die Substrat-Lösung vor der Zugabe von Levamisol/*Fast Red* auf den Präparaten für 10 min in das braune Präzipitat entwickelt. Hierzu wurden kurz vor der Verwendung 4mL TBS mit 160 µL Diaminobenzidinlösung und 80 µL 3%iges H₂O₂ vermischt, nach der Inkubation mit TBS abgewaschen und 2x für 1 min in ein TBS-Bad gestellt.

2.2.5.3.2 Immunfärbungen mit dem *EnVision*-System

Für Immunfärbungen von Zytopräparaten mit dem murinen mAk anti-Ly-17.2 und dem Ratten mAk 2.4G2 wurde das *EnVision*-System (DAKO) verwendet. Hierbei

handelt es sich um ein Polymer, das kovalent mit Alkalische Phosphatase Molekülen und Sekundärantikörpern gegen Maus-/Ratten-Ig verknüpft ist. Dadurch lässt sich eine sensitivere Färbung erzielen, als mit dem herkömmlichen APAAP-System. Die Zytopräparate wurden nach der Fixierung (s.o.) zunächst mit dem verdünnten Antikörper (anti-Ly-17.2: 1:5, 2.4G2: 1:50) für 30 min inkubiert, danach gut mit TBS gewaschen und 2x für mind. 1 min in ein TBS-Bad gestellt. Anschliessend erfolgte eine 30minütige Inkubation mit zwei bis drei Tropfen der *EnVision*-Gebrauchslösung. Diese wurde wiederum gut mit TBS abgespült und die Objektträger 2x für mindestens 1 min im TBS-Bad gewaschen. Schließlich wurden die Präparate mit dem Substrat (*Fast Red*) für 10 – 20 min entwickelt, mit Hämatoxyllin (2.2.5.3.1) gegengefärbt und mit Glycergel eingedeckt. Hierzu wurde das Glycergel zunächst bei 50°C im Wasserbad geschmolzen, auf die Präparate gegeben und anschließend luftblasenfrei mit einem Deckglas bedeckt.

2.2.5.3.3 Immunhistochemische Färbungen mit biotinylierten Primärantikörpern

Zur Blockade endogenen Biotins in Leber und Niere wurden die Kryostatschnitte zunächst mit dem *Biotin-Block* von DAKO behandelt. Dieses beinhaltet eine Biotinlösung, mit der für 10 min inkubiert wird und eine Streptavidinlösung, die bei einer weiteren 10 minütigen Inkubation das endogene Biotin absättigt. Die folgenden Schritte erfolgten mit Reagenzien aus dem *ARK-Kit* von DAKO. Auf eine Biotinylierung der Primärantikörper mit dem mitgelieferten anti-Maus-Antikörper mußte jedoch verzichtet werden, da zur Blockade nicht gebundener Immunglobuline Mausserum verwendet wird, das die zu detektierenden Fc-Rezeptoren im Gewebe unspezifisch absättigen würde. Aus diesem Grund wurden die Primärantikörper direkt biotinyliert. Diese wurden 1:500 in PBS verdünnt und für 15 min auf das Präparat gegeben. Nach einem gründlich Waschschrift mit TBS + 500 µL Tween 20 wurde sekundär mit Streptavidin konjugierter Peroxydase für 15 min inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift wurde das Substrat (DAB) für 5 min aufgetragen und die Präparate wurden gegebenenfalls mit Hämatoxyllin gegengefärbt.

3 Ergebnisse

3.1 Entwicklung verschiedener Methoden zur differentiellen Analyse der Fc γ -Rezeptor-Expression in Zellen und im Gewebe der Maus

In dieser Arbeit wurden verschiedenen Ansätze etabliert, in denen die Expression des Fc γ RII vergleichend zu den anderen Mitgliedern der Fc γ R-Familie untersucht werden konnten. Dazu zählten auf mRNA-Ebene die RT-PCR, der Northernblot und der *RNase Protection Assay* (RPA) und auf Proteinebene vornehmlich die Immunzyto- und Immunhistochemie. Im folgenden werden die Vorversuche für die Etablierung der einzelnen Methoden aufgezeigt.

3.1.1 RT-PCR

Die RT-PCR stellt eine besonders sensitive Methode zur Analyse von RNA-Transkripten dar. Zur Amplifikation von Fc-Rezeptor-spezifischen cDNA-Sequenzen wurden die eingesetzten Primer so gewählt, daß sie nicht in den homologen Bereichen der Fc-Rezeptor-Untereinheiten hybridisieren.

	sense-Primer	antisense-Primer	Fragmentlänge [bp]	PCR-Bedingungen (abweichend vom Standardprotokoll)
Fc γ RI	RI s, Pos. 348	RI as, Pos. 1061	714	-
Fc γ RIIb1	RII TME, Pos. 12896*	RII C3 EX, Pos. 16855*	659	-
Fc γ RIIb1'	„	„	575	-
Fc γ RIIb2	„	„	518	-
Fc γ RIII	RIII s, Pos. 64	RIII as, Pos. 828	765	59°C Hybridisierungstemperatur
FcR γ	γ -chain s, Pos. 38	γ -chain as, Pos. 451	414	
Tubulin	Tub s, Pos. 802	Tub as, Pos. 1287	485	25 Zyklen

Tab. 3: Verwendete RT-PCR-Primer und PCR-Bedingungen zur Detektion der verschiedenen Fc γ -Rezeptor-cDNAs sowie des Tubulin-Standards. Sequenz, sowie Literaturquellen der verwendeten Primer sind unter 2.1.7 angegeben. *= Die Positionen entsprechen den angegebenen Positionen der genomischen DNA-Sequenz (Hogarth, P.M. et al., 1991).

Zur Detektion der drei verschiedenen Isoformen des Fc γ RII wurden Primer verwendet, die die gespleißten Bereiche flankieren. Sie lassen sich daher in einem Ansatz nachweisen und sind anhand ihrer Fragmentlänge unterscheidbar. Für quantitative Analysen wurde ein Primerpaar zur Amplifikation von β -Tubulin als Standardgröße eingesetzt. In Tab. 3 sind die einzelnen Fragmentlängen der PCR-Produkte, die Positionen der Primer und die vom Standardprotokoll abweichenden Amplifikationsbedingungen angegeben.

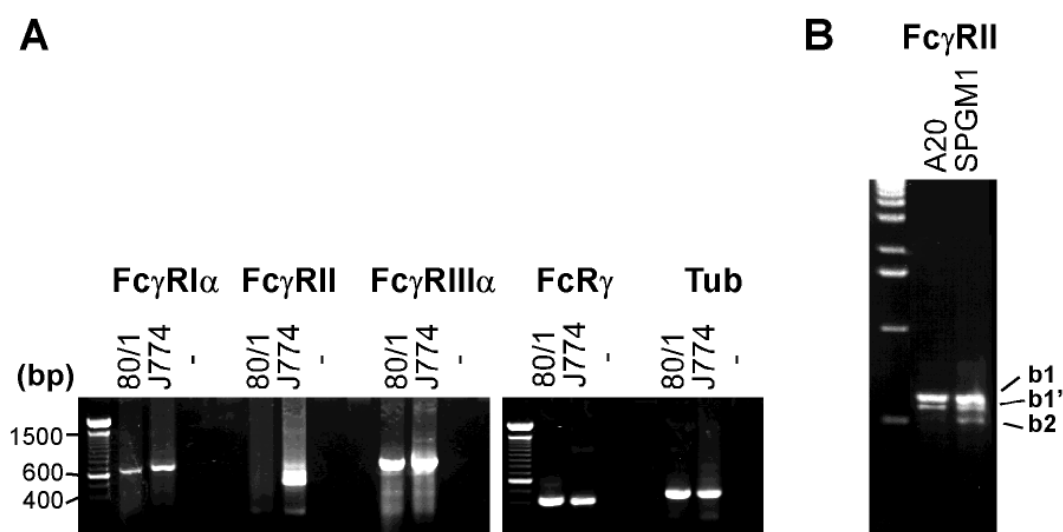


Abb. 4: RT-PCR-Analyse. Die verwendeten Primer, die erwarteten Fragmentlängen sowie die PCR-Bedingungen sind in Tab. 3 aufgeführt. **A: Analyse aus gesamtzellulärer RNA der Zelllinien J774 und 80/1.** Als Größenstandard diente die 100 bp-Leiter von Gibco, verwendet wurde ein 1,5 %iges Agarosegel. Die RT-Reaktion (2.2.1.8.1) erfolgte aus jeweils 0,5 μ g (J774) bzw. 1 μ g (80/1) gesamtzellulärer RNA pro PCR-Ansatz. **B: RT-PCR mit Fc γ RII-spezifischen Primern aus gesamtzellulärer RNA der Zelllinien A20 und SPGM1.** Als Größenstandard diente die 1 kbp-Leiter von Gibco. Die RT-Reaktion (2.2.1.8.1) erfolgte aus jeweils 1 μ g gesamtzellulärer RNA pro PCR-Ansatz.

Das optimierte Ergebnis der RT-PCR-Analyse für die Detektion der verschiedenen Fc γ -Rezeptor-mRNA-Transkripte ist in Abb. 4A mit Gesamt-RNA der Dendritischen Zelllinie 80/1 und der Makrophagenzelllinie J774 dargestellt. Von der J774-Makrophagenzelllinie ist bekannt, daß sie den Fc γ RIIb2 (Ravetch, J.V. et al., 1986), in geringen Mengen auch den Fc γ RIIb1 (Latour, S. et al., 1996), den Fc γ RI (Quilliam, A.L. et al., 1993), den Fc γ RIII (Ravetch, J.V. und Kinet, J.P., 1991; Hulett, M.D. und

Hogarth, P.M., 1994) und somit auch die FcR γ -Kette exprimiert. Pro Analyse wurden 0,5 μ g gesamtzellulärer RNA aus der J774-Zelllinie und 1 μ g aus 80/1 Zellen eingesetzt. Während die J774 Zelllinie alle untersuchten Fc-Rezeptor-Transkripte bis auf die Fc γ RIIb1'-Isoform exprimiert, sind in den 80/1 Zellen keine Transkripte der drei Fc γ RII-Isoformen, aber alle weiteren cDNAs der Fc γ -Rezeptor Familie nachweisbar. Die B-Zelllinie A20 (Abb. 4B) exprimiert die Fc γ RIIb1/b1' Varianten und die frühe B-Zelllinie SPGM1 zusätzlich die b2-Isoform.

3.1.2 Herstellung von Fc γ -Rezeptor-spezifischen Sonden-*templates* für die Generierung radioaktiver Sonden

Fc γ -Rezeptor-spezifische Sonden-*templates* wurden für die Hybridisierung von auf Nylonmembranen immobilisierter cDNA und RNA hergestellt. Fc γ RII- und Fc γ RIII α -spezifische Sonden wurden aus Fc γ RIIb1- und Fc γ RIII-cDNA generiert. Diese lagen kloniert in pUC9- bzw. pUC12-Vektoren vor und wurden freundlicherweise von J. Ravetch zur Verfügung gestellt. Um eine Kreuzhybridisierung zwischen Fc γ RII und Fc γ RIII α in den homologen extrazellulären Bereichen zu vermeiden, wurde für die Sondenmarkierung ein 905 bp großes Fragment der Fc γ RIIb1-cDNA mittels BglII/PstI-Verdau aufgereinigt, das mit einem kurzen Bereich der EC2, dem TM-Exon und den zytoplasmatischen Domänen hybridisiert. Für Fc γ RIII-spezifische Sequenzen wurde ein 612 bp langes 3'-Fragment der cDNA mittels KpnI/PstI - Verdau generiert, das ebenfalls in den nicht homologen Bereichen des TM/C-Exons hybridisiert (Abb. 5A).

Zur Analyse von Fc γ RI α - und FcR γ -RNA bzw. cDNA wurden die unter 3.1.1 amplifizierten RT-PCR-Produkte aus J774 RNA verwendet, die in den T-Vektor pGEM-T kloniert, zur Sondenmarkierung mit AflIII/SalI (Fc γ RI α) bzw. SacII/PstI (FcR γ) wieder aus dem Vektor geschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt wurden. Zur Detektion eines β -Tubulin-Standards diente ein RT-PCR-Produkt, das mit gesamtzellulärer RNA aus der Makrophagenzelllinie J774 als *template* generiert und nach Aufreinigung über ein Agarosegel direkt für die Sondenmarkierung eingesetzt wurde (Abb. 5B).

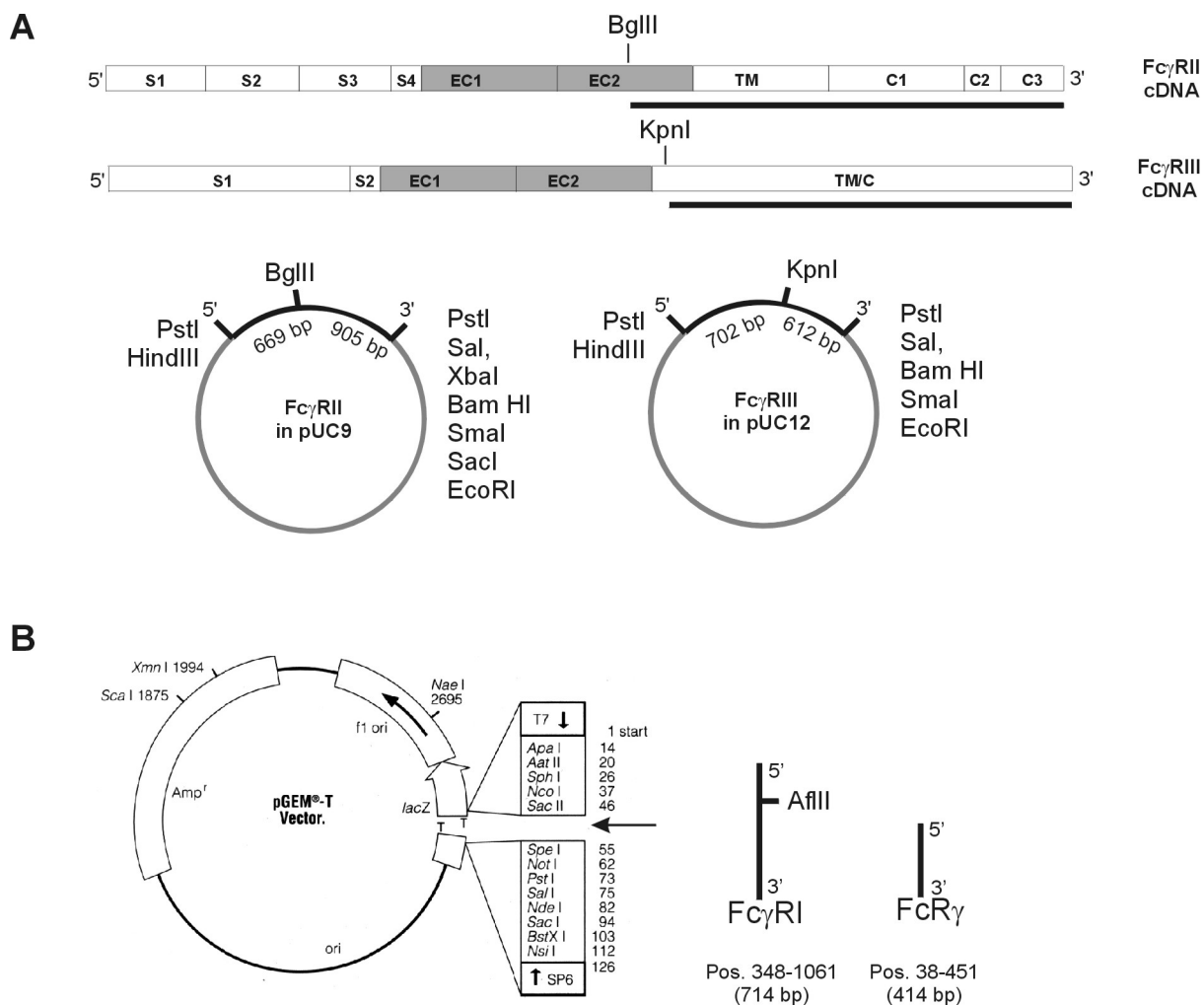


Abb. 5: Ausrichtung und Struktur der Fc γ -Rezeptor-spezifischen Sonden-templates in den angegebenen Klonierungsvektoren. Dargestellt sind die relevanten Restriktionsschnittstellen der *multi cloning sites* und der *Inserts*. **A: Struktur der Fc γ RII/RIII-cDNAs, ihre Ausrichtung in den angegebenen Vektoren sowie die Auswahl der hybridisierenden Bereiche.** Um eine Kreuzhybridisierung zwischen Fc γ RII und Fc γ RIII zu vermeiden, wurden möglichst große Bereiche der nicht homologen transmembranen und zytoplasmatischen Regionen gewählt. Die homologen Bereiche (EC1 und EC2) sind grau dargestellt. **B: Ausrichtung und Struktur der cDNA-templates, kloniert in pGEM-T.** Die Herstellung der cDNAs ist unter 3.1.1 beschrieben. Für Fc γ RI wurde ein Teilbereich amplifiziert (von EC2 bis TM/C) und die cDNA der FcR γ -Kette liegt vollständig vor.

3.1.3 Northernblot

Die Northernblot-Analyse ist für die Quantifizierung von mRNA besonders geeignet, durch die geringere Sensitivität im Vergleich zur RT-PCR aber hauptsächlich zur Detektion von Transkripten mit ausreichender Expressionsrate verwendbar. Der in Abb. 6 gezeigte Northernblot wurde mit jeweils 10 μ g gesamtzellulärer RNA aus den

Zelllinien J774 und A20 durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten 10 µg Hefe-tRNA. Die Herstellung der jeweiligen Fc γ R-spezifischen DNA-Sonden ist in Kapitel 3.1.2 beschrieben und die radioaktive Markierung mit [α^{32} P]dCTP erfolgte wie unter 2.2.1.7.1 beschrieben mit dem *ready-to-go-kit* (Promega) durch die Klenow-Polymerase.

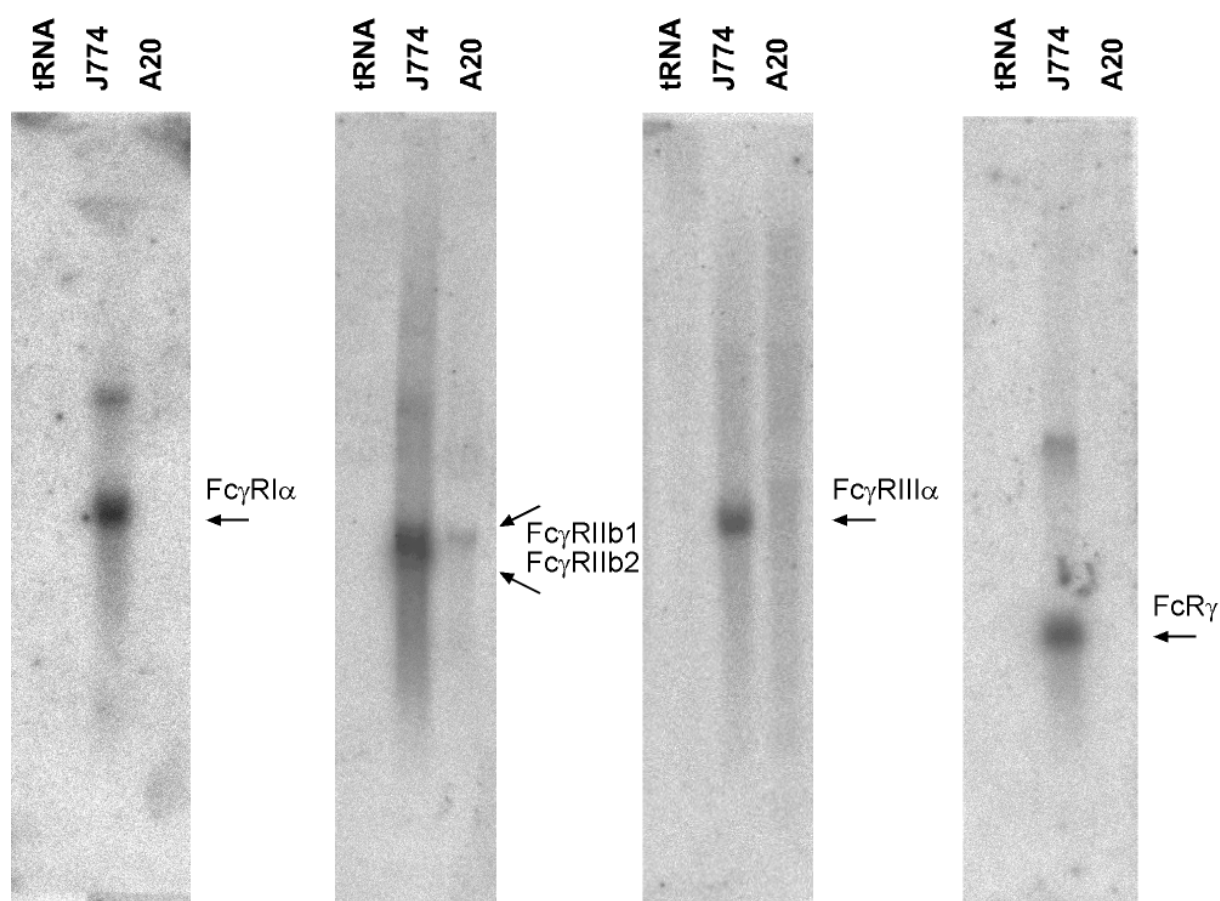


Abb. 6: Northernblot-Analyse einzelner Fc γ -Rezeptor-Untereinheiten aus gesamtzellulärer RNA der Zelllinien J774 und A20. Gezeigt sind die Autoradiogramme mit den angegebenen Fc γ R-spezifischen cDNA-Sonden.

Alle untersuchten Fc γ -Rezeptor-Klassen lassen sich in der J774 Zelllinie nachweisen. Eine Unterscheidung der einzelnen Fc γ RII-Isoformen ist aufgrund ihrer geringfügigen Größenunterschiede nicht möglich. Die B-Zelllinie A20 exprimiert den Fc γ RIIb1/b1' (Latour, S. et al., 1996), seine Expressionsdichte ist aber deutlich geringer als in J774 Zellen. Die zusätzliche Bande, die mit der Fc γ RI α -Sonde hybridisiert, ist in einer von Sears et al. veröffentlichten Northernblot-Analyse von J774-Zellen ebenfalls beschrieben, aber nicht weiter charakterisiert worden (Sears, D.W. et al., 1990).

Aufgrund ihrer Größe kann es sich aber nicht um eine Spleißvariante des Fc γ RI handeln. Auch die zusätzliche Bande, die mit der FcR γ -Sonde hybridisiert, kann keiner möglichen Spleißvariante zugeordnet werden.

3.1.4 RNase Protection Assay (RPA)

Zum Nachweis von Fc γ R-Transkripten aus Gesamt-RNA mittels des RPAs wurden Sonden-*templates* generiert, die alle Fc γ -Rezeptor-Isoformen in einem Ansatz detektieren. Um dies zu gewährleisten, wurden cDNA-*templates* zur Herstellung der *antisense*-RNAs so kloniert, daß sich alle RNA-Sonden mit derselben RNA Polymerase (T7) transkribieren lassen und die entstehenden radioaktiv markierten RNA-Fragmente (ungeschützte Sonden sowie geschützte Produkte nach RNase-Verdau) eine unterschiedliche Größe aufweisen. In Tab. 40 sind die Größen der einzelnen RNA-Fragmente aufgeführt.

	Sonde [Nt]	geschützt [Nt]
Sonde FcR γ (Pos. 37-454) (Ra, C. et al., 1989)	464	
geschützt FcR γ		418
Sonde Fc γ RIII (Pos. 750-1068) (Ravetch, J.V. et al., 1986)	369	
geschützt Fc γ RIII		320
Sonde Fc γ RII (Pos. 946-1136) (Ravetch, J.V. et al., 1986)	239	
geschützt Fc γ RIIb1		192
geschützt Fc γ RIIb1'		178
Sonde Fc γ RI (Pos. 660-772) (Sears, D.W. et al., 1990)	161	
Sonde β -Tubulin (Pos. 1006-1095) (Wang, D. et al., 1986)	140	
geschützt Fc γ RIIb2		121
geschützt Fc γ RI		113
geschützt β -Tubulin		90

Tab. 4: Bandengrößen der Fc γ R-spezifischen *antisense*-RNA-Sonden, ihrer gewählten cDNA-Bereiche sowie der geschützten RNA-Fragmente nach RNase Verdau.

Die Bereiche der *cDNA-templates* wurden so gewählt, daß sie nicht in den homologen Bereichen der verschiedenen $Fc\gamma$ -Rezeptor-Isoformen hybridisieren. Sie wurden hierzu mittels PCR generiert, deren *sense*-Primer eine BamHI und deren *antisense*-Primer eine BglII-Schnittstelle angefügt wurden. BamHI und BglII erzeugen kompatible Überhänge, lassen sich aber nach Ligation nicht wieder mit BamHI schneiden, so daß nach Klonierung der PCR-Produkte in die BamHI-Schnittstelle des pKS⁺-Vektors die BamHI-Schnittstelle für eine Linearisierung des Plasmides geeignet ist (Abb. 7). Nach Klonierung wurden die Ausrichtungen der *Inserts* mittels BamHI/XbaI Verdaus überprüft und diejenigen Plasmide, deren *Inserts* in *antisense*-Ausrichtung zum T7-Promoter lagen, expandiert und mittels Sequenzierungen überprüft (Loescher, F., 1999).

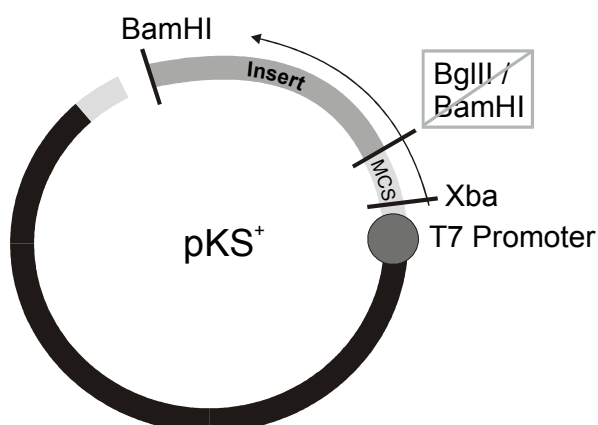


Abb. 7: Klonierung der *cDNA-templates* zur Herstellung von $Fc\gamma$ R-spezifischen *antisense*-RNA-Sonden in den pKS⁺-Vektor. Die *Inserts* wurden in *antisense*-Ausrichtung vor den T7-Vektor kloniert und die Plasmide wurden zur Sonden-Generierung mit BamHI linearisiert.

Der in Abb. 8 gezeigte RPA wurde mit jeweils 10 μ g Gesamt-RNA aus der Makrophagenzelllinie J774 durchgeführt (J774, A, B, C). Zur Qualitätskontrolle wurden die durch *in vitro*-Transkription generierten Sonden (Sonden, A, B, C) aufgetragen und als Negativkontrolle dienten 10 μ g Hefe-tRNA (tRNA, C).

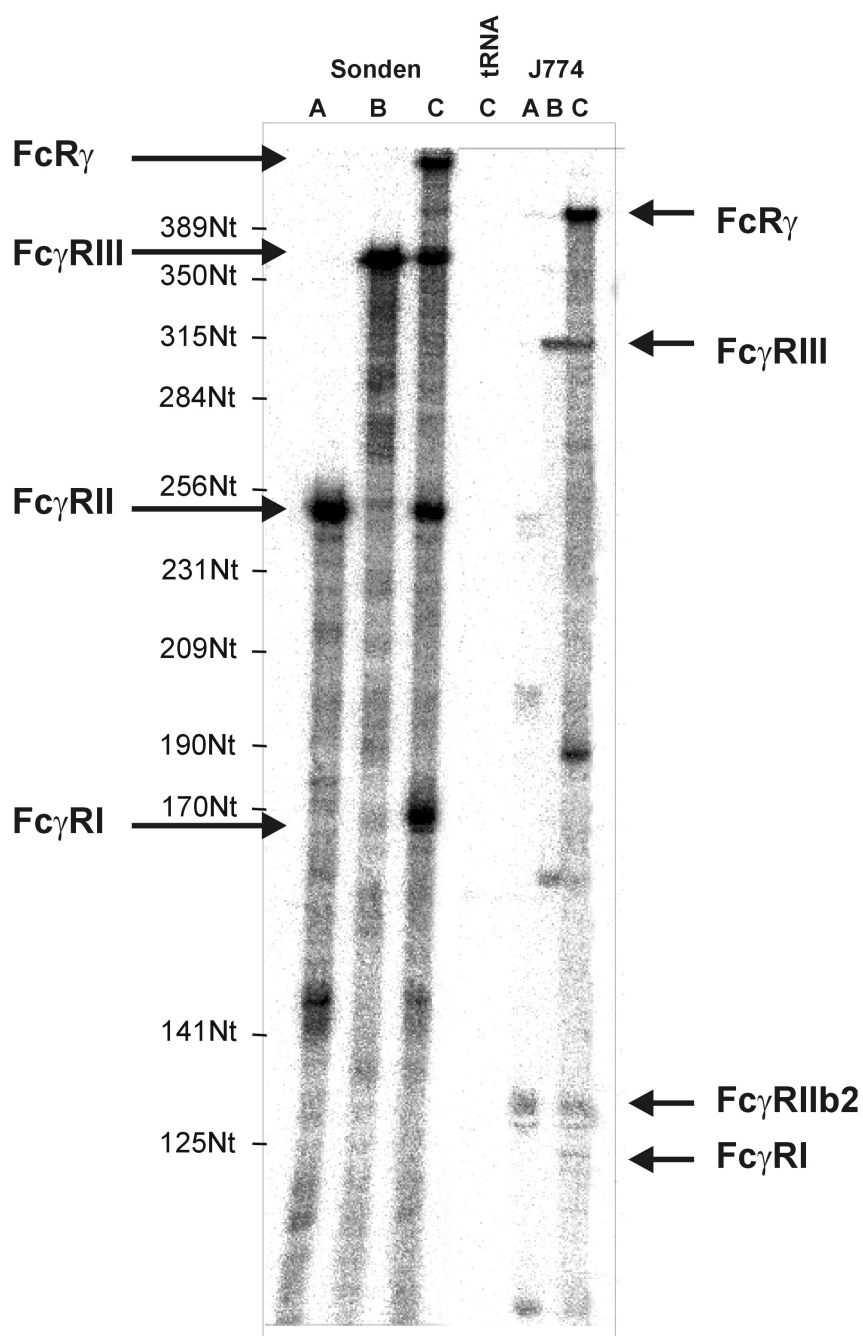


Abb. 8: RNase Protection Assay (RPA) mit J774 Gesamt-RNA als *target* und Fc γ R-spezifischen *antisense*-RNA-Sonden. Als Sonden wurde die Fc γ RII- (A) und die Fc γ RIII- (B) spezifische Sonde einzeln sowie ein Pool zur Detektion aller Fc γ R-Transkripte (C) eingesetzt. Als Negativkontrolle diente tRNA aus Hefe.

Neben spezifischen Signalen für Fc γ RI (113 Nt), Fc γ RIIb2 (121 Nt), Fc γ RIII (320 Nt) und die FcR γ -Kette (418 Nt), sind unspezifische Signale zu erkennen, die aufgrund ihrer Größe jedoch von spezifischen Signalen unterscheidbar sind. Wegen der geringen Fragmentlänge der Fc γ RI-Sonde ist das geschützte Hybridisierungssignal nur schwach ausgeprägt.

3.1.5 Immunzytochemie

Der mAk anti-Ly-17.2 konnte in durchflußzytometrischen Analysen von Zellen mit bekanntem Fc γ -Rezeptor-Expressionsmuster als Fc γ RII-spezifisch charakterisiert werden (Schiller, C. et al., 2000). Abb. 9 zeigt immunzytochemische Analysen verschiedener muriner Primärzellen und Zelllinien mit dem mAk anti-Ly-17.2 als Primärantikörper. Zur Positivkontrolle wurde der mAk 2.4G2 eingesetzt, der beide niedrigaffinen Fc γ -Rezeptoren erkennt. Die Detektion erfolgte mit dem *EnVision*-System von DAKO, das Primärantikörper aus Ratte und Maus sekundär anfärbt (2.2.5.3.2). Der 2.4G2 wurde hierzu 1:50 in TBS verdünnt und mit 1% BSA versetzt. Der anti-Ly-17.2 wurde als Hybridomüberstand des Klons K9.361 1:5 in TBS und 1% BSA eingesetzt.

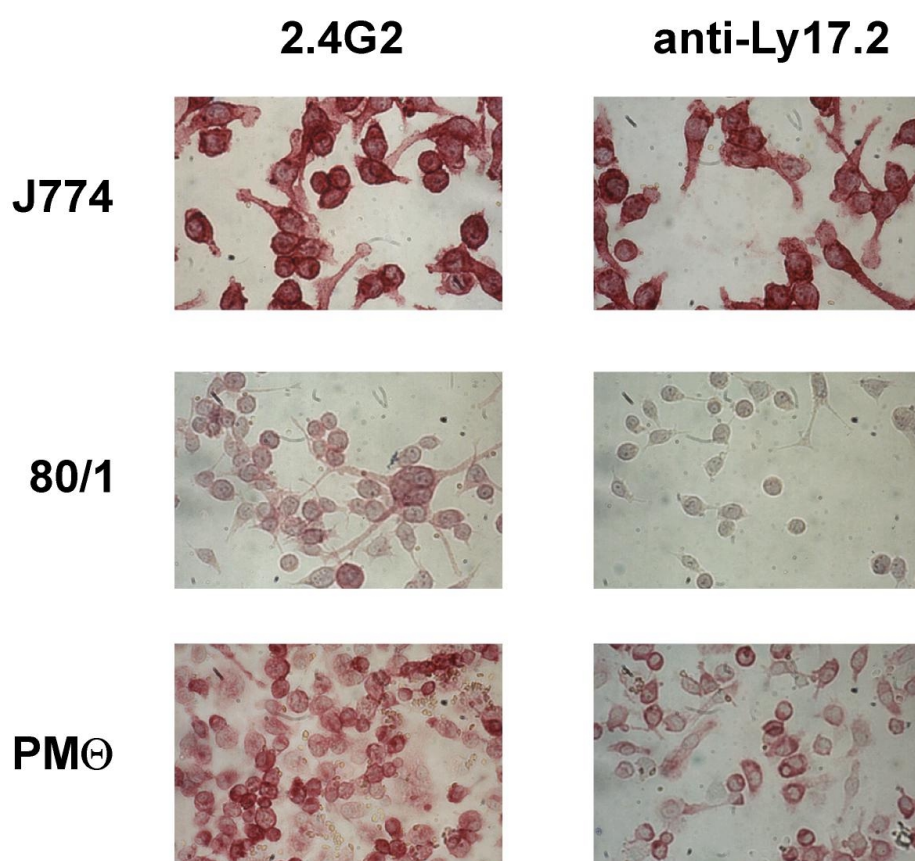


Abb. 9: Immunzytochemische Färbungen (*EnVision*, DAKO). Dargestellt sind Färbungen der Makrophagenzelllinie J774, der Dendritischen Zelllinie 80/1 und Peritoneal-Makrophagen (PM Θ) aus C57Bl/6-Mäusen mit den mAks 2.4G2 und anti-Ly-17.2 (rot). Die Hintergrund (Kern-)Färbung erfolgte mit Hämatoxyllin (400x).

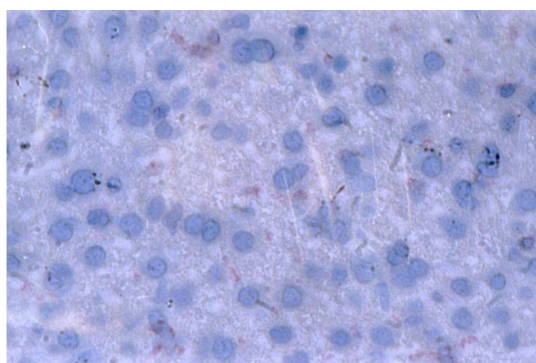
Die murine Makrophagenzelllinie J774 exprimiert sowohl Fc γ RII als auch Fc γ RIII, während die Dendritische Zelllinie 80/1 in der RT-PCR Analyse für den Fc γ RII negativ ist (s. 3.1.1). Dieses Expressionsmuster läßt sich auf Proteinebene in der Immunzytochemie mit den mAKs 2.4G2 und anti-Ly-17.2 bestätigen. Die Färbung der 80/1 Dendritischen Zelllinie ist deutlich schwächer als die der J774-Zellen. Dies korreliert mit der im *RNase Protection Assay* beobachteten, geringeren RNA-Expression (Loescher, F., 1999). Peritoneal-Makrophagen aus C57Bl6-Mäusen (anti-Ly-17.2) zeigen mit 2.4G2 eine deutliche Färbung der Fc γ RIII/Fc γ RII-Rezeptoren und sind zu einem geringeren Maße mit dem anti-Ly-17.2 anfärbbar, was den Anteil der Fc γ RII-Expression repräsentiert. Der anti-Ly-17.2 ist demnach für immunzytochemische Methoden geeignet.

3.1.6 Immunhistochemie

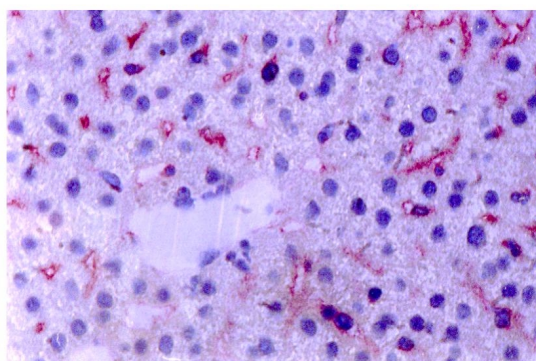
Für immunhistochemische Analysen der Fc γ R-Expression wurde größtenteils das APAAP-System verwendet. Durch die wiederholte Inkubation mit dem Brückenantikörper und dem APAAP-Komplex wird mit diesem System eine Verstärkung des Signals erreicht. Die Verwendung des für die Immunzytochemie bewährten *EnVision*-System (3.1.5) erwies sich für histologische Untersuchungen als nicht geeignet, da durch die polymere Struktur eine zu hohe unspezifische Hintergrundfärbung auftrat. Für Antikörper, die nicht Fc-Rezeptor-spezifisch sind, wurden die Fc-Rezeptoren mit Mausserum blockiert, um die Bindung der Fc-Teile sowohl der monoklonalen Antikörper als auch des APAAP-Komplexes an die Fc-Rezeptoren zu inhibieren. Der Fc γ RII/RIII-spezifische 2.4G2 (Ratte, IgG2b) wurde mit 1% BSA versetzt und die Effizienz der Blockade mittels eines Ratten-IgG2b Kontrollantikörpers überprüft. Durch entsprechende Negativkontrollen (Inkubation ohne Primärantikörper oder Verwendung Fc-defizienter Mäuse) wurde sichergestellt, daß keine unspezifischen Bindungen über den Fc-Teil des APAAP-Komplexes auftraten. Der Zusatz von 1% BSA zum Brückenantikörper blockierte die unspezifische Bindung der Ratten-Fc-Teile aus dem APAAP-Komplex an murine Fc γ -Rezeptoren komplett. Die Verwendung des murinen APAAP-Systems für Primärantikörper aus der Maus führt jedoch zu unspezifischen Bindungen an endogene Immunkomplexe, so daß murine Primärantikörper, wie etwa die anti-Ly-17

Fc γ RII-Antikörper für immunhistochemische Analysen mit dem APAAP-System nicht geeignet sind. In der Leber und speziell auch in der Niere muß zusätzlich mit einer Hintergrundfärbung durch die Existenz endogener Alkalischer Phosphatase gerechnet werden. Diese läßt sich in der Leber komplett durch die Vorinkubation mit Levamisol (DAKO) inhibieren, in der Niere jedoch nur reduzieren. Durch die Verteilung vor allem innerhalb der Tubuli, läßt sich diese jedoch optisch von der spezifischen Färbung unterscheiden. Zur Kontrolle der Aktivität endogener Alkalischer Phosphatase wurden die Präparate allein mit dem Substrat inkubiert.

8 Wo.



10 Wo.



12 Wo.

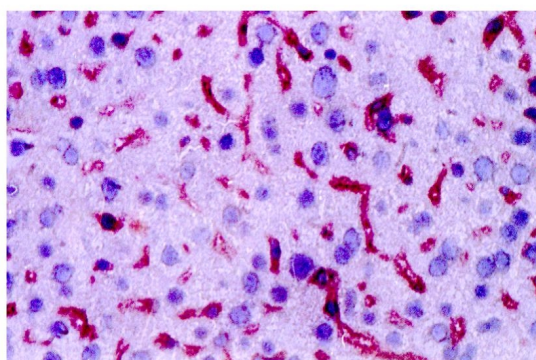


Abb. 10: Immunhistochemische Analyse der altersabhängigen Fc γ RII/RIII-Expression in der Leber von C57Bl/6-Mäusen. Der Primärantikörper (2.4G2) wurde mit dem APAAP-System (rot) und die Kernfärbung durch Hämatoxyllin (blau) dargestellt (400x).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen wurden männliche Mäuse verwendet, die mindestens 12 Wochen alt waren, da zumindest in der Leber die Fc γ -Rezeptor-Expression altersabhängig ist (Ahmed, S.S. et al., 1995). Da Ahmed et al. Mäuse im Alter von 1, 5 und 9 Monaten untersucht haben, war es nötig, das Zeitfenster für jüngere Mäuse weiter einzugrenzen. Abb. 10 zeigt die altersabhängige 2.4G2-Färbung in der Leber von männlichen Tieren im Alter von 8, 10 und 12 Wochen.

Die Fc γ -Rezeptor-Expression in der murinen Leber ist auf Kupfferzellen und Sinusoidalen Endothelzellen lokalisiert (Ahmed, S.S. et al., 1995). Während in 8 Wochen alten Mäusen lediglich eine sehr schwache 2.4G2-Färbung zu beobachten ist, sind nach 10 Wochen etwa 35% der Leberzellen Fc γ -Rezeptor-positiv. Nach 12 Wochen weisen über 50% der Zellen eine Färbung auf (Abb. 10).

Für die in dieser Arbeit durchgeführten immunhistochemischen Analysen wurden daher generell Mäuse verwendet, die mindestens 12 Wochen alt waren.

3.2 Die Rolle des Fc γ RII bei der Autoimmunen Hämolytischen Anämie (AIHA)

Die *in vivo*-Funktion des Fc γ RII bei verschiedenen Entzündungsreaktionen wurde vor allem durch Experimente in der Fc γ RII^{-/-}-Maus aufgeklärt. Seine inhibitorische Rolle konnte bei der Glomerulonephritis, der passiven reversen Arthus Reaktion sowie bei der passiven Anaphylaxie nachgewiesen werden (Takai, T. et al., 1994; Suzuki, Y. et al., 1998; Ujike, A. et al., 1999). Interessanterweise scheint er hingegen bei der AIHA keine regulatorische Funktion zu haben (Schiller, C. et al., 2000). Eine AIHA konnten wir experimentell durch die intraperitoneale Injektion anti-erythrozytärer Antikörper induzieren, die im Labor von Dr. S. Izui aus NZB-Mäusen hergestellt wurden und von Dr. D. Meyer über Protein-A-Säulen kontaminationsfrei aufgereinigt wurden. Dabei kommt es zu einer Opsonierung der Erythrozyten, die dann vor allem durch Kupfferzellen in der Leber phagozytiert und damit aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Diese Anämie läßt sich sowohl durch die Senkung des Hämatokritwertes als auch durch die histologische Untersuchung der Erythrophagozytose in der Leber qualitativ und quantitativ erfassen. Nach Induktion der experimentellen AIHA mit den

beiden anti-erythrozytären Antikörpern 105-2H (IgG1) und 34-3C (IgG2a) zeigt sich ein ähnlicher Hämatokritverlauf in $Fc\gamma RII^{-/-}$ und WT-Mäusen. Auch nach Blockade des $Fc\gamma RII$ mit dem anti-Ly-17.2-Antikörper in C57Bl/6-Mäusen lassen sich in diesem Modell keine signifikanten Unterschiede zu nicht blockierten Tieren beobachten. Mit denselben Antikörpern lassen sich aber die beschriebenen protektiven Effekte der $Fc\gamma RIII$ -Defizienz in *knock out*-Mäusen zeigen (Meyer, D. et al., 1998; Schiller, C. et al., 2000).

3.2.1 Nachweis der $Fc\gamma RII$ -Expression in der murinen Leber mittels Immunhistochemie

Eine mögliche Begründung dafür, daß der $Fc\gamma RII$ bei der AIHA offensichtlich keine inhibitorische Funktion hat, könnte darin liegen, daß er entweder nicht auf Kupfferzellen exprimiert wird, oder nach Aktivierung der Kupfferzellen durch die Induktion der AIHA herunterreguliert wird. Zunächst wurde daher anhand immunhistochemischer Analysen von Kryostatschnitten untersucht, ob beide niedrigaffinen $Fc\gamma$ -Rezeptoren ($Fc\gamma RII$ und $Fc\gamma RIII$) in der murinen Leber exprimiert werden.

Da für eine optimale Immunfärbung von Kryostatschnitten lediglich der Rattenantikörper 2.4G2 zur Verfügung steht, der beide niedrigaffinen $Fc\gamma$ -Rezeptoren gleichermaßen erkennt ($Fc\gamma RII$ und $Fc\gamma RIII$), wurden zur Analyse $Fc\gamma RII^{-/-}$ und $Fc\gamma RIII^{-/-}$ -Mäuse verwendet. Als Negativkontrolle dienten $Fc\gamma RII^{-/-}/FcR\gamma^{-/-}$ -Mäuse, die keine $Fc\gamma$ -Rezeptoren mehr exprimieren. Die Mäuse wurden im Alter von 12 – 14 Wochen getötet und für die Immunhistochemie wurden die Organe in einem Methylbutanbad in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Im Mikrotom wurden sie bei -20°C Kammertemperatur und -12°C Objekttemperatur in einer Dicke von 5 μm auf die Objektträger gebracht. Die Immunfärbungen zur Detektion des 2.4G2 (1:50) erfolgten wie unter 2.2.5.3.1 beschrieben mit dem APAAP-System von DAKO (rot) und für die Kernfärbung wurde mit Hämatoxyllin (blau) gegengefärbt (Abb. 11).

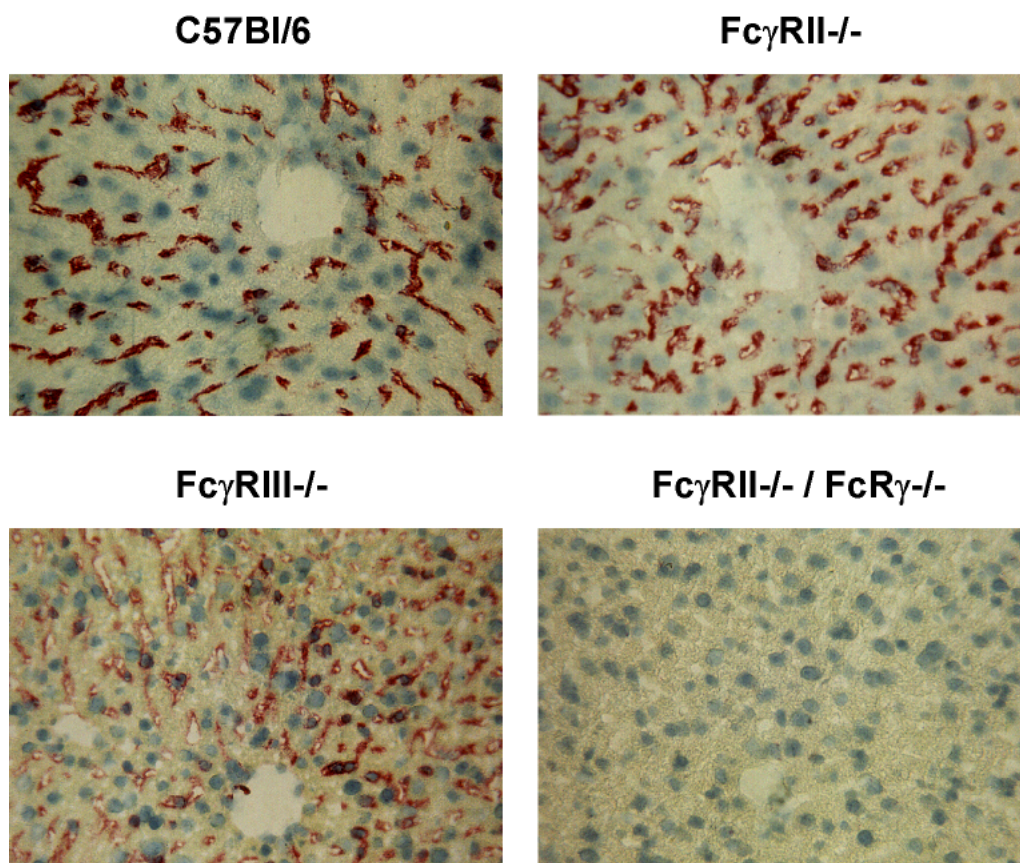


Abb. 11: Immunhistochemie von Leber-Kryostatschnitten mit dem mAk 2.4G2. (400x). Der mAk 2.4G2 wurde mit der APAAP-Färbung visualisiert (rot), die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxyllin (blau).

Da sowohl in der Leber von $Fc\gamma RIII^{-/-}$ als auch von $Fc\gamma RII^{-/-}$ -Mäusen eine positive Färbung mit annähernd gleicher Intensität zu beobachten ist, kann daraus geschlossen werden, daß die beiden niedrigaffinen Rezeptoren in etwa gleicher Menge in der murinen Leber exprimiert werden. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei den 2.4G2-positiven Zellen in der Leber um Kupfferzellen und Sinusoidale Endothelzellen (Ahmed, S.S. et al., 1995). Da sich in allen hier gezeigten Schnitten mit Ausnahme der Negativkontrolle eine vergleichbare Anzahl und Verteilung positiver Zellen zeigt, kann man davon ausgehen, daß sowohl auf den phagozytierenden Kupfferzellen als auch auf Sinusoidalen Endothelzellen $Fc\gamma RII$ und $Fc\gamma RIII$ koexprimiert werden.

3.2.2 Darstellung und Quantifizierung der Erythrophagozytose in der Leber von FcγRII^{-/-}-Mäusen nach Induktion einer AIHA mit dem 105-2H

Am Tag zwei nach Induktion der AIHA läßt sich die Erythrophagozytose in der Leber immunhistochemisch visualisieren und quantifizieren. Hierzu wurden jeweils fünf FcγRII-defiziente und Wildtypmäuse mit dem mAk 105-2H in einer subletalen Dosierung von 15 µg/g Körpergewicht (KG) behandelt und parallel der Hämatokritwert bestimmt. Dieser betrug anfänglich bei Wildtyptieren durchschnittlich 50% und sank am Tag zwei auf 41,2% ab. FcγRII-defiziente Tiere zeigten anfänglich einen Hämatokritwert von 49%, der dann auf 39% fiel (Abb. 12B).

Die immunhistochemische Analyse der Erythrophagozytose erfolgte mit verschiedenen Makrophagen-spezifischen Antikörpern und einer Darstellung der Phagozytoseaktivität mit Diaminobenzidin, das durch die endogene Peroxydaseaktivität von Erythrozyten zu einem braunen Farbstoff umgesetzt wird. Verwendet wurden hierzu der mAk BM8 und der mAk F4/80, die ausgereifte Gewebsmakrophagen und damit auch Kupfferzellen spezifisch erkennen, sowie Mac-1, das erst nach Aktivierung auf Kupfferzellen exprimiert wird (Hashimoto, S. et al., 1996). In Abb. 12A ist exemplarisch die Erythrophagozytose mit dem mAk F4/80 dargestellt. Die rot gefärbten Kupfferzellen, in deren Zytoplasma sich braun gefärbte Erythrozyten befinden, sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Unterschiede zu Leberschnitten von induzierten Mäusen, die mit dem BM8 oder dem Mac-1 gefärbt wurden, ließen sich hierbei nicht feststellen. In Immunhistologien von nicht behandelten Mäusen zeigten sich wie erwartet durchschnittlich nur basale Werte von ca. 20 Mac-1-positiven Kupfferzellen/mm² Lebergewebe (nicht gezeigt).

Die Quantifizierung der Erythrophagozytose in der Leber erfolgte durch Auszählen von Mac-1/Benzidin doppelt-positiven Zellen (Abb. 12C). Hierzu wurden mindestens 100 Mac-1-positive Zellen von jeweils fünf verschiedenen Schnitten und jeweils fünf verschiedenen Mäusen gezählt.

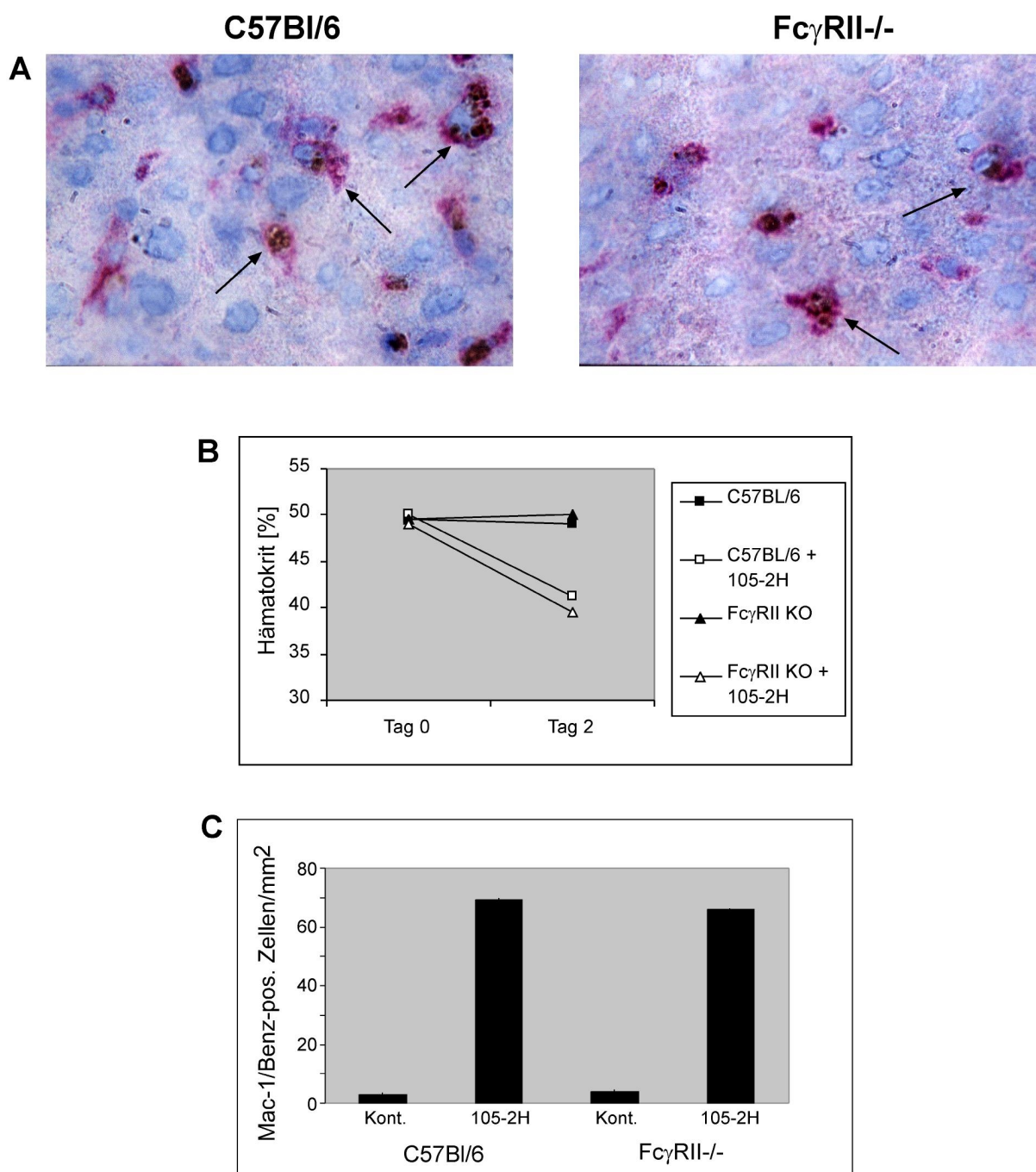


Abb. 12: Induktion der AIHA mit dem 105-2H (IgG1). Zur Induktion wurden 15 µg/g KG intraperitoneal injiziert. **A: Erythrophagozytose am Tag zwei nach Applikation des 105-2H in der Leber von WT- (C57BI/6) und FcγRII^{-/-}-Mäusen.** Als Primärantikörper diente der mAk F4/80, der als Makrophagen-spezifischer Antikörper Kupferzellen färbt und sekundär mit der APAAP-Methode visualisiert wurde (rot). Die Erythrozyten wurden mit Diaminobenzidin (DAB) dargestellt (braun) und als Kernfärbung diente Hämatoxillin (blau) (1000x). **B: Hämatokritwerte am Tag null und Tag zwei nach Induktion.** Dargestellt sind jeweils unbehandelte (schwarz) und behandelte Mäuse (weiss). WT-Mäuse sind durch Quadrate, FcγRII^{-/-}-Mäuse durch Dreiecke gekennzeichnet. **C: Quantifizierung der Erythrophagozytose in der murinen Leber.** Hierzu wurden die Leberschnitte mit Mac-1/Benzidin wie angegeben gefärbt und doppelt-positive Zellen ausgezählt.

Unbehandelte Tiere zeigten lediglich eine geringe Phagozytose (2,9 Zellen/mm² bei WT-Mäusen und 4,1 Zellen/mm² bei Fc γ RII^{-/-}-Mäusen), während behandelte Mäuse eine Phagozytose von 69,3 Zellen/mm² (WT) bzw. 65,9 Zellen/mm² (Fc γ RII) aufwiesen. Es ließen sich also keine signifikanten Unterschiede in der Erythrophagozytose durch Kupfferzellen von WT- und Fc γ RII^{-/-}-Mäusen beobachten. Damit korrelieren die durchschnittlichen Phagozytosewerte mit den Hämatokritwerten der verschiedenen Tiere und geben keine weiteren Aufschlüsse über die Rolle des Fc γ RII bei der experimentellen AIHA.

3.2.3 Analyse einer möglichen Regulation des Fc γ RIII auf Kupfferzellen bei der experimentellen AIHA

Eine weitere Erklärungsmöglichkeit dafür, daß der Fc γ RII keine inhibitorische Funktion bei der experimentellen AIHA übernimmt, wäre die mögliche Regulation der Fc γ RII/Fc γ RIII-Expression auf aktivierten Kupfferzellen. Um dies zu untersuchen wurden zunächst Leberschnitte von Fc γ RII^{-/-}-Mäusen am Tag null und Tag zwei nach Induktion der AIHA mit dem mAk 105-2H analysiert. Dabei handelte es sich um dieselben Mäuse, die auch für die unter 3.2.2 beschriebenen Experimente analysiert wurden. Die Kryostatschnitte wurden mit dem 2.4G2 gefärbt, der in den Fc γ RII-defizienten Mäusen den verbleibenden Fc γ RIII färbt. In Abb. 13 sind die immunhistochemischen Analysen von behandelten und unbehandelten Tieren dargestellt. Obwohl hier zwar scheinbar eine intensivere Färbung bei anämischen Tieren zu beobachten ist, läßt sich bezüglich der Anzahl positiver Zellen kein signifikanter Unterschied ermitteln. Während in Kontrolltieren 53,9% der Hepatozyten Fc γ RIII-positiv sind, sind es in induzierten Tieren 54,3%.

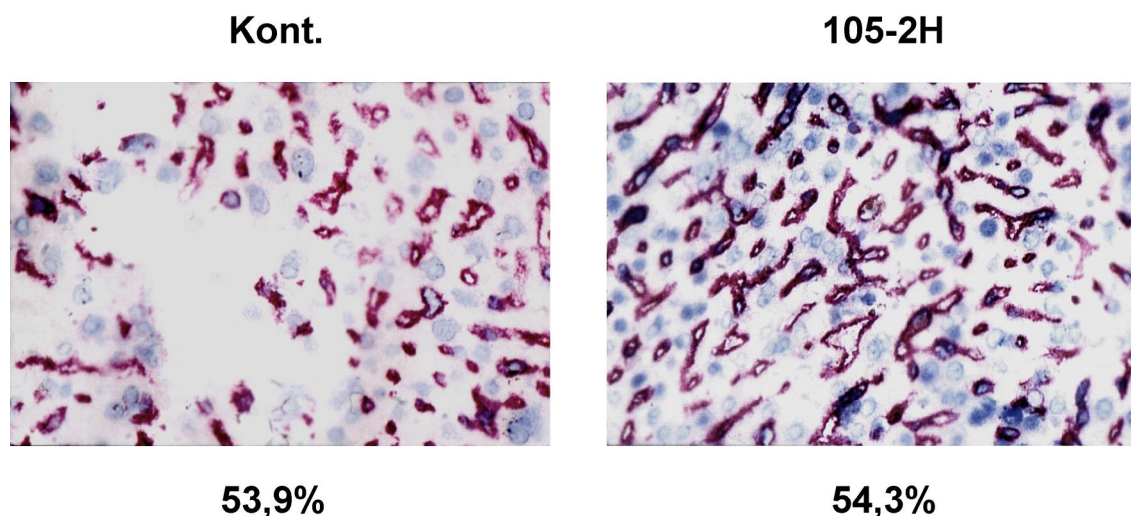
Fc γ RII^{-/-}

Abb. 13: Expression des Fc γ RIII in Fc γ RII^{-/-}-Mäusen nach Induktion einer AIHA mit dem 105-2H. Dargestellt sind Kryostatschnitte der Leber von behandelten (105-2H) sowie unbehandelten (Kont.) Mäusen am Tag zwei nach Induktion einer IgG1-abhängigen AIHA. Verwendet wurde der 2.4G2, der den verbleibenden Fc γ RIII erkennt. Zur Darstellung des Antikörpers wurde das APAAP-System (rot) und zur Kernfärbung Hämatoxillin verwendet (blau) (400x).

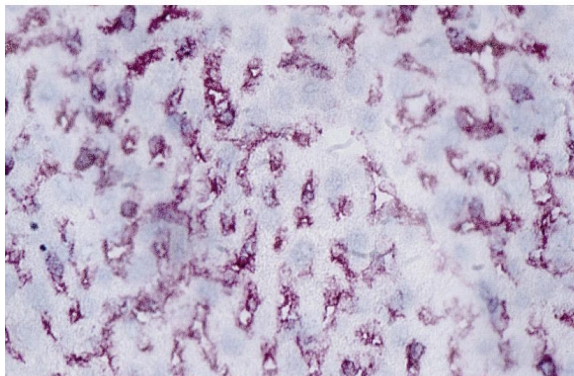
3.2.4 Analyse einer möglichen Regulation der Fc γ RII-Expression auf Kupfferzellen bei der experimentellen AIHA

Um eine mögliche Expressionsregulation des Fc γ RII nach der Induktion einer AIHA mit Hilfe immunohistochemischer Methoden mit dem 2.4G2 als Primärantikörper analysieren zu können, wurden Leberschnitte von Fc γ RIII^{-/-}-Mäusen untersucht, die zur Anämieinduktion den 34-3C erhalten haben. Da Fc γ RIII-defiziente Mäuse vor der IgG1-induzierten Anämie komplett geschützt sind, ist der 105-2H (IgG1) für diese Fragestellung nicht geeignet. Eine AIHA läßt sich aber (wenn auch im Vergleich zu WT-Tieren reduziert) mit dem IgG2a-Antikörper 34-3C induzieren, so daß sich hier die Expressionsregulation des Fc γ RII durch eine Immunfärbung mit dem 2.4G2 analysieren läßt. Für diese Analyse wurden kryokonservierte Organe von vorangegangenen Versuchen freundlicherweise von Dr. D. Meyer zur Verfügung gestellt. Diese Mäuse erhielten zur Anämieinduktion den 34-3C in einer subletalen

Dosierung von 5 µg/g KG und wurden am Tag zwei zur Organentnahme getötet (Meyer, D. et al., 1998).

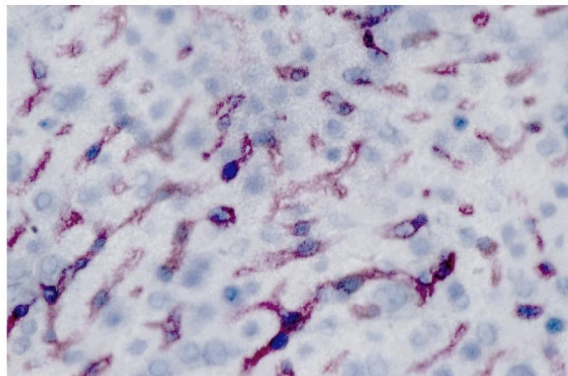
FcγRIII^{-/-}

Kont.



55,2%

34-3C



53,1%

Abb. 14: Expression des FcγRII in FcγRIII^{-/-}-Mäusen nach Induktion einer AIHA mit dem 34-3C. Dargestellt sind Kryostatschnitte der Leber von behandelten (34-3C) sowie unbehandelten (Kont.) Mäusen am Tag zwei nach Anämieinduktion. Verwendet wurde der 2.4G2, der den verbleibenden FcγRII erkennt. Zur Darstellung des Antikörpers wurde das APAAP-System (rot) und zur Kernfärbung Hämatoxyllin verwendet (blau) (400x).

Die in Abb. 14 dargestellte immunhistochemische Analyse der Leber von anämischen FcγRIII^{-/-}-Mäusen zeigt eine geringfügige Reduktion des verbleibenden FcγRII (53,1% im Vergleich zu 55,2% bei unbehandelten Mäusen). Die Färbung mit dem 2.4G2 ist zudem in den behandelten Mäusen etwas schwächer als in den Kontrolltieren, aber immer noch deutlich ausgeprägt.

3.2.5 Darstellung der FcγRII-Expression mit dem anti-Ly-17.2 bei der experimentellen AIHA

Der anti-Ly-17.2 eignet sich in FACS-Analysen und immunzytochemischen Färbungen zur spezifischen Detektion des FcγRII. In der Immunhistochemie ist die Verwendung des anti-Ly-17.2 ungünstig, da es sich um einen Mausantikörper handelt. Mit einem murinen APAAP-System würden bereits vorhandene, endogene Immunglobuline in den Geweben parallel mit angefärbt. Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurde der anti-Ly-17.2 direkt biotinyliert, in einer Konzentration von 1:500

auf die Präparate gegeben, mit Streptavidin gekoppelter Peroxydase (DAKO) inkubiert und mit Diaminobenzidin gefärbt. Dies bietet zusätzlich die Möglichkeit, mit dem APAAP-System und einem Rattenantikörper eine Immundoppelfärbung durchzuführen. Hierzu wurde zunächst endogenes Biotin mit dem Biotin-Blocking-System (DAKO) blockiert und endogene Peroxydase mit dem Peroxydase-Inhibitor (DAKO) inhibiert. Die Schnitte wurden danach mit einem anti-MHC-Klasse II mAk (anti-I-A^b; M5/115.15.2; Ratte; 1:50) inkubiert, da zumindest für den F4/80 bekannt ist, daß er das 2.4G2-Epitop maskiert (Ahmed, S.S. et al., 1995). Es folgten die einzelnen Schritte der APAAP-Färbung wie unter 2.2.5.3.1 beschrieben bis auf die Zugabe des Substrates (*Fast Red*) und danach die Inkubation mit dem biotinylierten Antikörper gegen Fc γ -Rezeptoren (Ly-17.2 oder 2.4G2), der mit dem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat sekundär wie unter 2.2.5.3.3 angegeben gefärbt wurde. Nach der Inkubation mit Levamisol zur Blockade endogener Alkalischer Phosphatase wurde zunächst das *Fast Red* und nach einem Waschschrift mit TBS die Biotinlösung aufgetragen. Schließlich erfolgte die Kernfärbung mit Hämatoxyllin. Durch geeignete Negativkontrollen (Inkubationen ohne ersten Primärantikörper, ohne biotinylierten Primärantikörper, ohne APAAP und ohne Streptavidin-Peroxydase-Konjugat) wurde das Auftreten von Hintergrundfärbungen kontrolliert (nicht gezeigt). Für die in Abb. 15 dargestellten Doppelfärbungen wurden WT-Mäuse (C57Bl/6) sowie Fc γ RII-defiziente Mäuse verwendet. Zusätzlich wurden WT-Mäuse verwendet, die mit 15 μ g 105-2H/g KG zur Anämieinduktion behandelt wurden und eine deutliche Erythrophagozytose zeigten. Alle Schnitte wurden mit einem Anti-I-A^b Antikörper gefärbt (rot) und entweder mit biotinyliertem 2.4G2 oder Ly-17.2 inkubiert (braun). Die Spezifität des biotinylierten anti-Ly-17.2 ist anhand des Leberschnittes der Fc γ RII^{-/-}-Maus gezeigt, der sich zwar mit dem 2.4G2 anfärben läßt, da dieser den verbleibenden Fc γ RIII erkennt, aber nicht mit dem anti-Ly-17.2. Hier ist lediglich die MHC Klasse II-Expression (anti-I-A^b) an dem roten Präzipitat zu erkennen.

Obwohl sich eine Reduktion des Fc γ RII nach Anämieinduktion in WT-Mäusen erkennen läßt, ist aber auch die 2.4G2- (Fc γ RII/RIII)-Färbung etwas schwächer in den behandelten Mäusen ausgeprägt als in nicht behandelten Mäusen. Allerdings ist in den Kontrollmäusen eine intensivere Ly-17.2-Expression als Fc γ RII/RIII-Expression zu beobachten, was sich in anämischen Mäusen eher umgekehrt darstellt, so daß sich hier eine - wenn auch undeutliche - Reduktion des Fc γ RII zeigt.

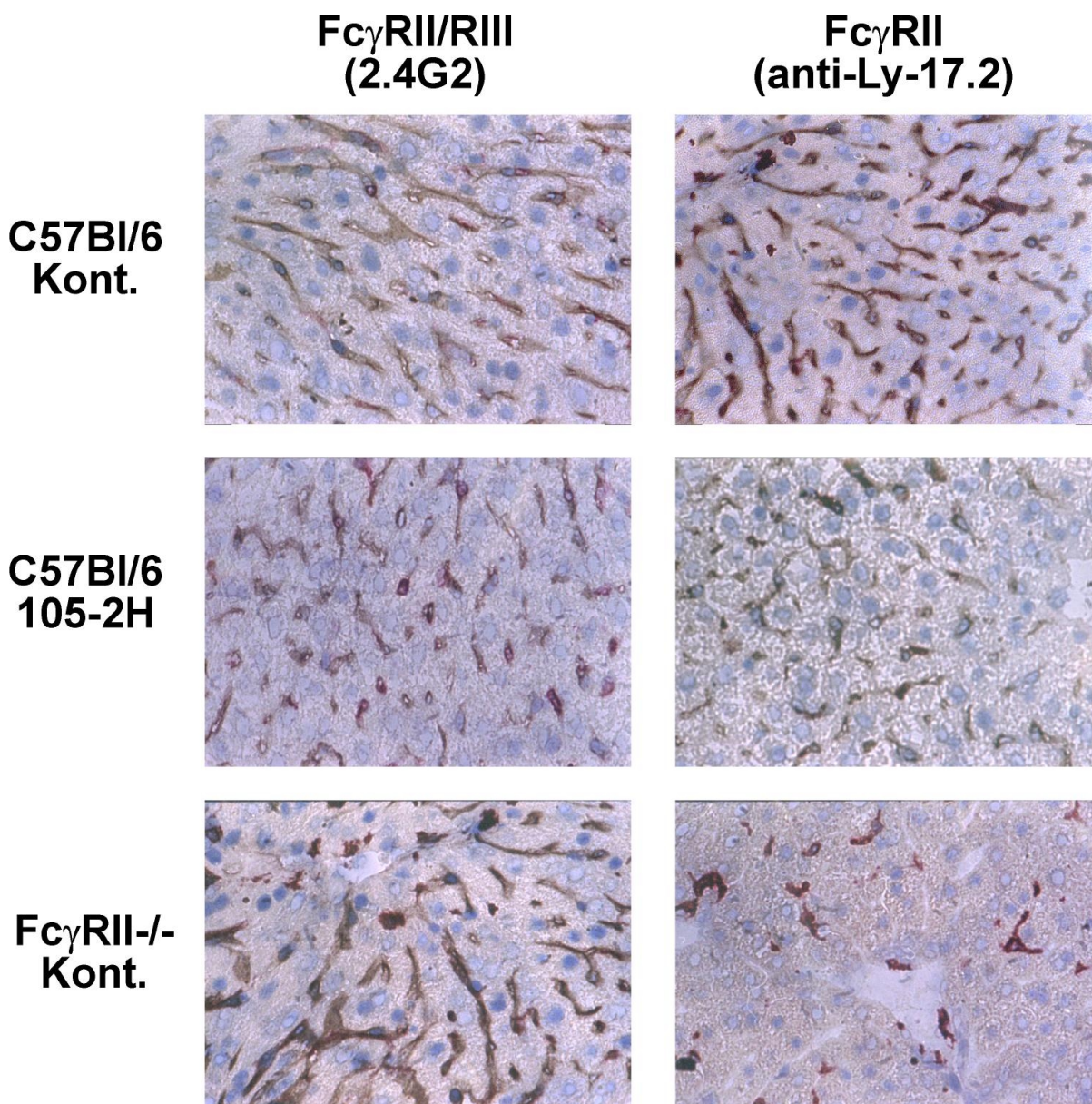


Abb. 15: Immunhistochemische Doppelfärbungen von Leberschnitten zur Analyse des Fc γ RII bei der AIHA. Alle Schnitte wurden mit einem anti-I-A^b Antikörper (rot) und wie angegeben mit biotinyliertem 2.4G2 oder anti-Ly-17.2 (braun) gefärbt.

3.2.6 Immunhistochemische Analyse des Zusammenhanges zwischen Rezeptordichte und Phagozytoserate

Der Einfluß der Rezeptordichte auf die Phagozytoseleistung der Kupfferzellen wurde anhand von Wildtypmäusen unterschiedlichen Alters ermittelt, da bei Mäusen zwischen 8 und 12 Wochen eine zunehmende Fc γ -Rezeptor-Expression beobachtet werden kann (Abb. 10). Aus zuvor erhobenen Daten, die freundlicherweise von Dr. D. Meyer zur Verfügung gestellt wurden, konnten auch bei Mäusen im Alter von

6 Wochen ähnliche Phagozytoseraten am Tag zwei nach Anämieinduktion (ermittelt in Mac-1/Benzidin doppelt-positiven Hepatozyten, s. 3.2.2) wie bei älteren Mäusen beobachtet werden.

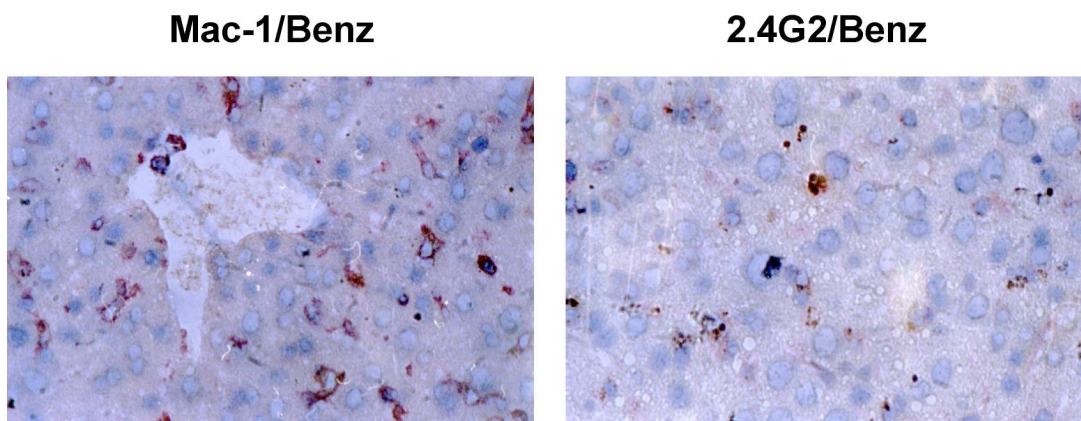


Abb. 16: Erythrophagozytose in der Leber von 8 Wochen alten, anämischen C57Bl/6-Mäusen. Zur Anämieinduktion wurden die Mäuse mit dem 105-2H wie beschrieben behandelt (Meyer, D. et al., 1998). Kryostatschnitte der Leber wurden mit Mac-1 oder 2.4G2 inkubiert und mit dem APAAP-System sekundär gefärbt (rot). Zusätzlich wurden die Erythrozyten mit Diaminobenzidin dargestellt (braun) und die Kernfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (blau) (400x).

Abb. 16 zeigt die Erythrophagozytose von 6 Wochen alten Wildtypmäusen, die zuvor zur Anämieinduktion 15 µg/g KG 105-2H intraperitoneal injiziert bekamen. Es handelt sich hierbei um einen sequenziellen Kryostatschnitt derselben Leber, die auf demselben Objektträger mit den beiden mAks gefärbt wurden. Eine deutliche Erythrophagozytose ist durch die Darstellung der Kupferzellen mit dem anti-Mac-1 mAk und der Erythrozytenfärbung mittels Diaminobenzidin zu erkennen, obwohl die FcγRII/RIII-Expression unterhalb der APAAP-Nachweisgrenze liegt (Färbung mit dem 2.4G2).

3.2.7 RT-PCR Analyse der FcγRII-Expression in der Leber und in Peritonealmakrophagen

Eine weitere Begründung dafür, daß der FcγRII in Kupferzellen keine inhibitorische Funktion auf die Phagozytoserate zeigt, wohl aber inhibitorisch auf die Phagozytose von Peritoneal-Makrophagen wirkt, wäre eine unterschiedliche Expression der verschiedenen Spleißvarianten des FcγRII. Dies würde voraussetzen, daß die

Fc γ RIIb2-Isoform allgemein keine inhibitorische Funktion übernimmt (was jedoch bislang nicht ausreichend geklärt ist) und in der Leber ausschließlich die b2-Isoform, in Peritoneal-Makrophagen aber zusätzlich die b1-Isoform exprimiert wird. Mögliche Expressionsunterschiede der verschiedenen Isoformen wurden daher mittels RT-PCR untersucht. Hierzu wurde Gesamt-RNA aus homogenisiertem Lebergewebe und Peritoneal-Makrophagen einer C57Bl/6-Maus isoliert und mit Fc γ RII-spezifischen Primern analysiert, die gleichzeitig alle membranständigen Isoformen detektieren.

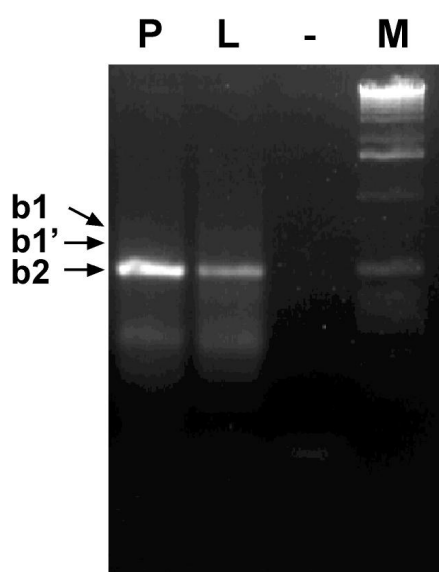


Abb. 17: RT-PCR Analyse von Gesamt-RNA aus Peritonealmakrophagen und homogenisiertem Lebergewebe einer C57Bl/6-Maus. Verwendet wurden Fc γ RII-spezifische Primer, die alle membranständigen Isoformen des Fc γ RII amplifizieren. P = Peritoneal-Makrophagen, L = Leber, - = Negativkontrolle, M = Marker (1kb Leiter).

Die in Abb. 17 dargestellte RT-PCR Analyse zeigt sowohl in Peritoneal-Makrophagen als auch in der Leber die ausschließliche Expression der Makrophagen-spezifischen Fc γ RIIb2-Isoform. Die beobachteten Unterschiede bezüglich der inhibitorischen Funktion des Fc γ RII auf die Phagozytoseleistung von Peritoneal-Makrophagen und Kupfferzellen der Leber lassen sich also anhand dieser Analyse nicht mit einer Expression unterschiedlicher Fc γ RII-Isoformen erklären.

3.3 Glomerulonephritis

Bei der Glomerulonephritis handelt es sich um eine Entzündungsreaktion in der Niere, die durch Immunkomplexablagerungen im Glomerulum gekennzeichnet ist. Durch die Ablagerung von Immunkomplexen könnten lokale Effektorzellen aktiviert werden, welche ihrerseits durch die Ausschüttung von chemotaktischen Mediatoren eine Entzündung initiieren. Hierbei wäre es sowohl denkbar, daß die Ablagerung unspezifischer Natur wäre als auch, daß sie durch die spezifische Bindung an Fc-Rezeptoren zustandekommt (Couser, W.G., 1985). *In vivo*-Analysen mit Fc-Rezeptor-defizienten Mausstämmen haben gezeigt, daß die aktivatorischen FcR (Fc γ RI und Fc γ RIII) essentiell an der Entwicklung einer spontanen, in NZB/W F1-Mäusen beobachteten Glomerulonephritis (Clynes, R. et al., 1998) bzw. an einer anti-GBM-Ak-induzierten Glomerulonephritis beteiligt sind (Park, S.Y. et al., 1998). Der Fc γ RII spielt im Gegensatz dazu eine inhibitorische Rolle, da in der Fc γ RII-defizienten Maus nach einer mit anti-GBM-Ak-induzierten GN verstärkte Entzündungsreaktionen in der Niere zu beobachten sind (Suzuki, Y. et al., 1998; Nakamura, A. et al., 2000).

3.3.1 Analyse der Immunkomplexablagerung in der Niere verschiedener Fc γ -Rezeptor-defizienter Mäuse

Um die Lokalisation der Immunglobulinablagerungen in der Niere verschiedener Fc γ -Rezeptor-defizienter Mausstämmen zu untersuchen, wurden Kryostatschnitte von Nieren mit Cy-3-markierten anti-Maus-Ig-Antikörpern inkubiert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Parallel hierzu wurden Nierenschnitte immunhistochemisch untersucht. Sowohl in Wildtypmäusen (Abb. 18A) als auch in allen zur Verfügung stehenden Fc γ -Rezeptor-defizienten Mausstämmen (Fc γ RII^{-/-}, Fc γ RIII^{-/-}, FcR γ ^{-/-} und FcR γ ^{-/-}/Fc γ RII^{-/-}) (nicht gezeigt), lassen sich Immunglobuline in der Niere mittels Immunfluoreszenz detektieren. Teilweise ist in den verschiedenen Fc γ R-defizienten Nieren eine intensivere Fluoreszenz zu beobachten, insbesondere bei Fc γ RII-defizienten und Fc γ RII/FcR γ -doppeltdefizienten Mäusen (nicht gezeigt). Positive Signale sind vorrangig im Glomerulum lokalisiert und insbesondere entlang der Basalmembran zu finden.

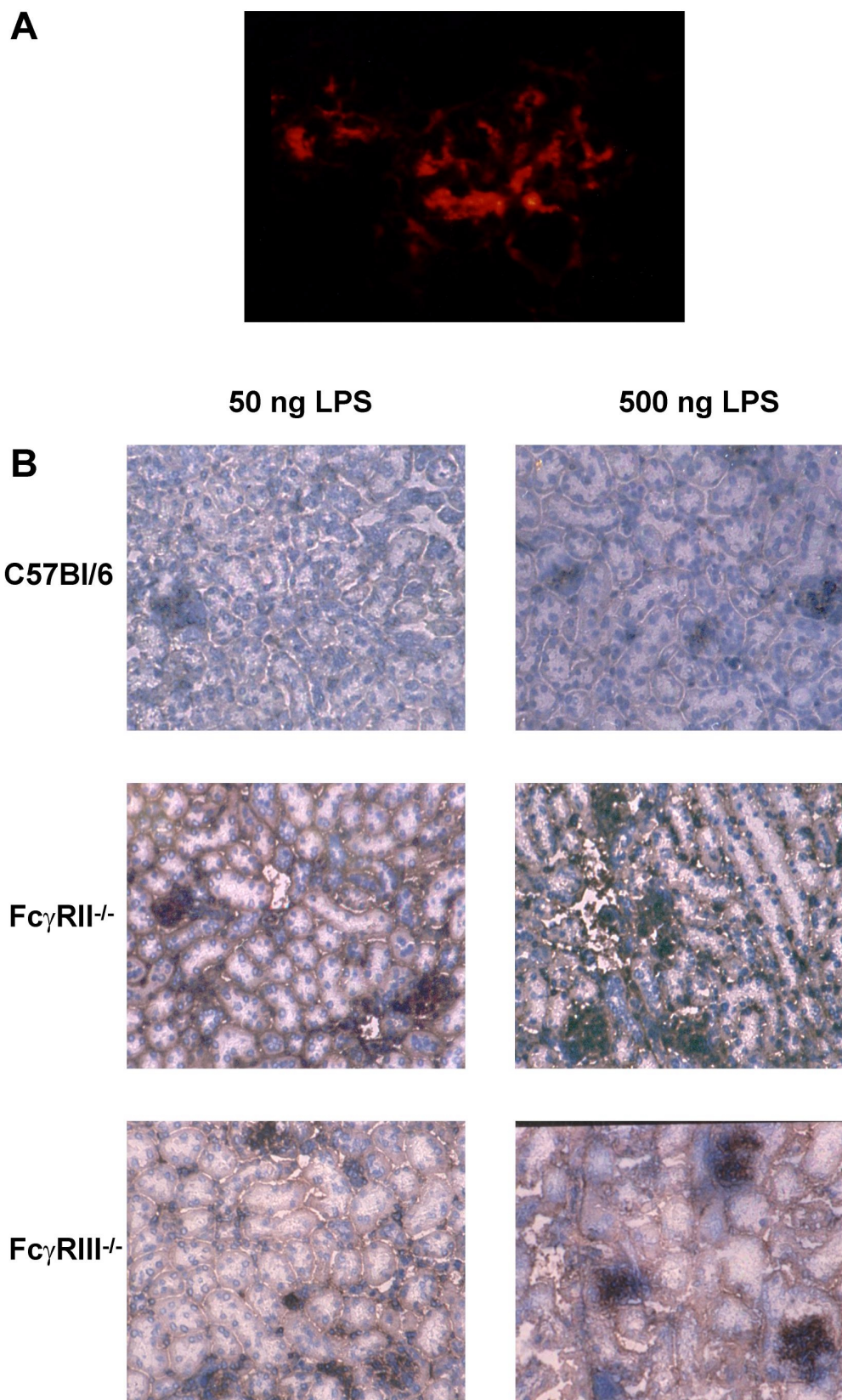


Abb. 18: Darstellung der Immunglobuline in der murinen Niere nach LPS-Induktion. A: Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Glomerulums. Die Darstellung der Immunglobuline erfolgte durch einen Cy-3-markierten anti-Maus-Ig-Ak (Dianova) (1000x). **B: PAP-Färbungen.** Endogenes Immunglobulin wurde mit einem Peroxydase-gekoppelten anti-Maus-Ig-Ak und DAB als Substrat visualisiert (braun). Hintergrundfärbung: Hämatoxylin (blau) (400x).

Abb. 18B zeigt Nierenschnitte verschiedener Mäuse, die mit 50 bzw. 500 ng LPS (ip) behandelt wurden. Die Schnitte wurden mit biotinylierten α -Maus-Ig-Antikörpern inkubiert. Als Sekundärreagenz diente Streptavidin-gekoppelte *horse raddish peroxydase* aus dem ARK[®]-Kit von DAKO und als Substrat Diaminobenzidin. Positive Signale sind an einem braunen Präziptat zu erkennen und die blaue Kernfärbung wurde durch Inkubation mit Hämatoxillin erzielt. In LPS-stimulierten Mäusen zeigt sich 12 Stunden nach der Injektion von 500 ng LPS eine leicht erhöhte Immunglobulinablagerung im Vergleich zu Mäusen, die mit 50 ng LPS behandelt wurden. In der Niere von Fc γ RII^{-/-}- und Fc γ RIII^{-/-}-Mäusen lassen sich zudem höhere Immunglobulinmengen detektieren als in Wildtypmäusen (C57Bl/6). Sie sind hier auch ausserhalb der Glomeruli entlang der Tubuli lokalisiert (Abb. 18B).

3.3.2 Immunhistochemische Analyse der Fc γ -Rezeptor-Expression in der murinen Niere

Im folgenden wurden zunächst immunhistochemische Untersuchungen an Kryostatschnitten der Niere durchgeführt, um die Lokalisation der Fc-Rezeptor-Expression zu untersuchen. Da der für immunzytochemische Untersuchungen (3.1.5) verwendete anti-Ly-17.2 Antikörper (Fc γ RII-spezifisch) ein Mausantikörper ist, eignet er sich nur bedingt für immunhistochemische Analysen von Mausgewebe. Für die folgenden Untersuchungen konnte daher lediglich der 2.4G2 eingesetzt werden, der die beiden niedrigaffinen Fc γ R (Fc γ RII und Fc γ RIII) erkennt. Durch die Verfügbarkeit einzelner Fc γ -Rezeptor-defizienter Mäuse lässt sich jedoch auch mit dem 2.4G2 der jeweils verbleibende niedrigaffine Fc γ R anfärben (Fc γ RII in der Fc γ RIII^{-/-}-Maus und *vice versa*). Für die immunhistochemische Analyse des Fc γ RI steht kein monoklonaler Antikörper zur Verfügung. Für die in Abb. 19 dargestellte Analyse wurden Kryostatschnitte von Wildtypmäusen (C57Bl/6), Fc γ RII- und Fc γ RIII-defizienten Mäusen sowie von Mäusen, die keinen Fc γ -Rezeptor exprimieren (Fc γ RII^{-/-}/Fc γ R^{-/-}), verwendet.

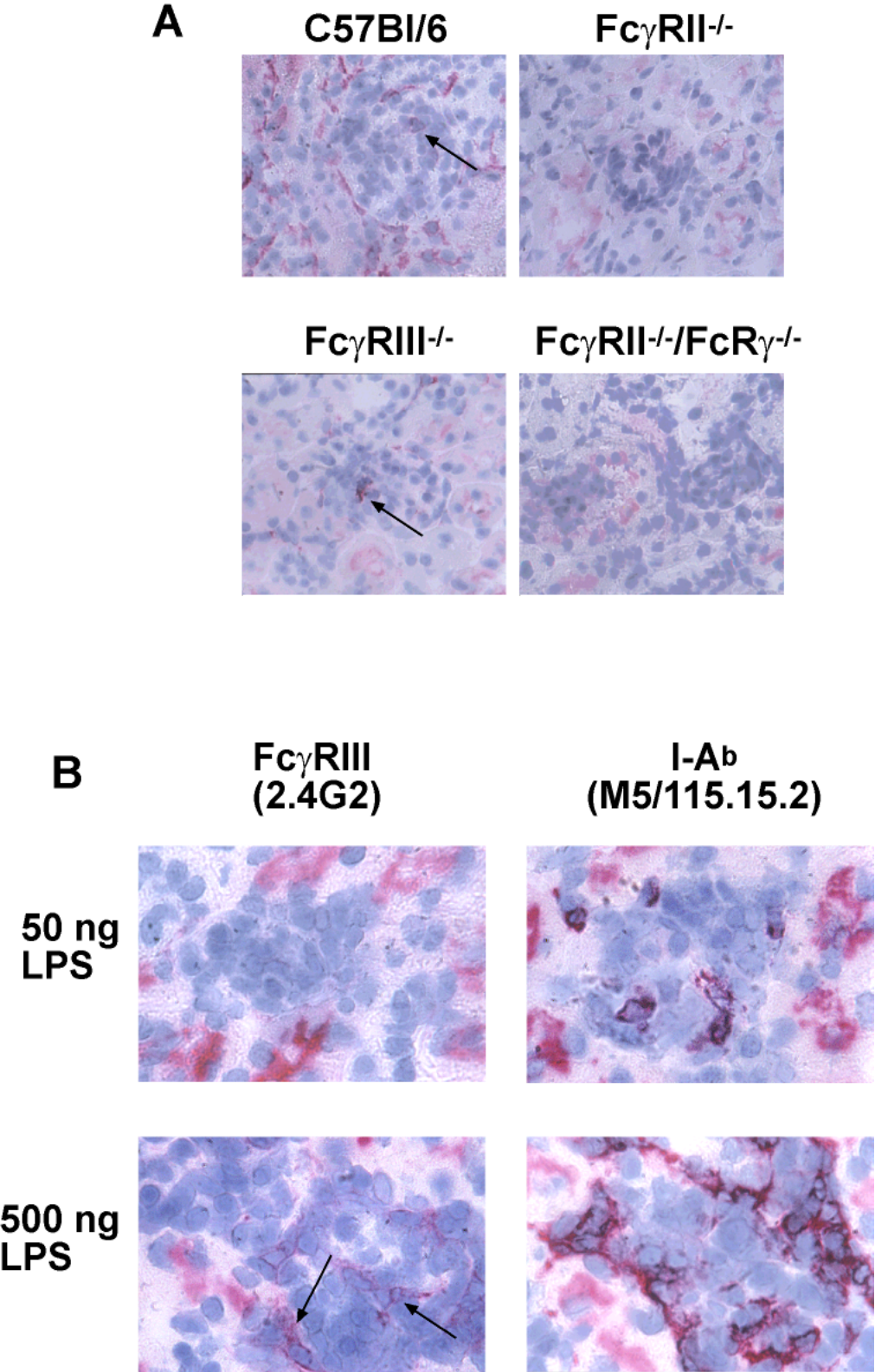


Abb. 19: Immunhistochemische Analyse der Fc γ RII/RIII-Expression in der murinen Niere. Weitere Erklärungen im Text. (A: 400x; B: 1000x)

Abb. 19A zeigt die Fc γ -Rezeptor-Expression in den verschiedenen Tieren. Spezifische Antikörperbindungen sind durch ein rotes Präzipitat visualisiert und hier durch Pfeile gekennzeichnet. Im Vergleich zur unspezifischen Färbung z.B. innerhalb der Tubuli, die durch die Existenz endogener Alkalischer Phosphatase hervorgerufen wird, sind spezifische Färbungen direkt um die Zellkerne (blau) lokalisiert. Sie weisen zudem eine dunklere Färbung auf. Wildtyptiere und Fc γ RIII-defiziente Mäuse zeigen eine positive Reaktion sowohl innerhalb als auch außerhalb der Glomeruli, während Fc γ RII^{-/-}- und Fc γ RII^{-/-}/FcR γ ^{-/-}-Mäuse keine spezifische 2.4G2-Färbung in der Niere aufweisen. Aus diesen Daten kann geschlossen werden, daß lediglich der Fc γ RII in der murinen Niere konstitutiv exprimiert wird. Behandelt man Fc γ RII-defiziente Mäuse mit 500 ng LPS (i.p), zeigen sich nach 24 h in einigen Glomeruli 2.4G2-positive Zellen (Abb. 19B), was für eine Induktion des Fc γ RIII spricht.

Um die Fc γ -Rezeptor-exprimierenden Zellen innerhalb der Glomeruli näher zu charakterisieren wurde in einem nächsten, sequenziellen Schnitt gegen MHC Klasse II-Moleküle gefärbt (I-A^b), da es sich hierbei sowohl um eingewanderte, aus dem Knochenmark stammende Makrophagen, als auch um residente, muskelzellähnliche Mesangialzellen handeln könnte. Mesangialzellen sind im ruhenden Zustand MHC Klasse II-negativ, können diese Moleküle aber nach Aktivierung exprimieren, so daß die in der Abb. 19B gezeigte MHC-II-Färbung keinen näheren Aufschluß über die Identität dieser Zellen gibt. Auch bei der beobachteten erhöhten MHC II-Expression kann es sich entweder um eingewanderte, antigenpräsentierende Zellen (APCs) oder um eine Expressionsinduktion residenter Zellen handeln. Durch die Möglichkeit, primäre Mesangialzellen zu präparieren und in Kultur zu bringen, wurden im folgenden RNA- und Protein-Analysen an Primärkulturen muriner Mesangialzellen durchgeführt.

3.3.3 Analyse der Fc γ -Rezeptor-Expression in murinen Mesangialzellen

Mesangialzellen sind mesenchymalen Ursprungs und in der extrazellulären Matrix des Glomerulums der Niere lokalisiert. Verschiedene Hinweise sprechen dafür, daß sie eine zentrale Rolle bei der Entwicklung verschiedener Formen der

Glomerulonephritis spielen. Sowohl humorale Immunreaktionen, wie die Ablagerung von Immunkomplexen und die Aktivierung von Komplement, als auch zelluläre Reaktionen wie die Einwanderung von Granulozyten, Monozyten und T-Zellen sowie die Proliferation von Mesangialzellen können bei dieser Form der Nierenentzündung beobachtet werden (Radeke, H.H. und Resch, K., 1992). Für humane Mesangialzellen (HMC) ist die Expression von Fc γ RI, Fc γ RIII und der assoziierten FcR γ -Kette nachgewiesen worden (Radeke, H.H. et al., 1994; Uciechowski, P. et al., 1998). Darüber hinaus wurde eine Aktivierbarkeit der Zellen durch Immunkomplexe gezeigt, die sich nach Vorstimulation durch IFN γ /LPS in der induzierten Sekretion von IL-6 äußert (Radeke, H.H. et al., 1994). Für murine Mesangialzellen konnte bislang nur die Expression von Fc γ RIII gezeigt werden (Hora, K. et al., 1992). Die Mesangialzelle als lokale, immunkompetente Zelle sollte in den folgenden Analysen bezüglich ihrer Fc-Rezeptor-Expression und Chemokinsekretion näher charakterisiert werden, um die Entzündungsmechanismen, die bei einer Glomerulonephritis beteiligt sind, besser verstehen zu können. Die nachfolgend beschriebenen Untersuchungen erfolgten in Kooperation mit dem Institut für Molekularpharmakologie, Hannover. Hier wurde von H.H. Radeke und Mitarbeitern u. a. auch die Präparation und Kultur von murinen Mesangialzellen durchgeführt. Selektive Kulturbedingungen gewährleisteten die Eliminierung von Endothel- und Epithelzellen sowie von Makrophagen.

3.3.3.1 Analyse der Fc γ -Rezeptor-Expression in murinen Mesangialzellen nach IFN γ /LPS und TNF α /IL1 β -Stimulation sowie in unstimulierten Zellen.

In humanen Mesangialzellen kann die Expression von Fc γ RI und Fc γ RIII durch IFN γ und LPS induziert werden (Radeke, H.H. et al., 1994; Uciechowski, P. et al., 1998). Abb. 20 zeigt das Autoradiogramm einer RT-PCR-Analyse und immunzytochemische Analysen proliferierender muriner Mesangialzellen nach unterschiedlichen Stimulationsbedingungen. Die Zellen wurden aus Mäusen mit einem Mischhintergrund aus 129sv und C57Bl6 isoliert und in der achten Kulturpassage für die Gewinnung von Gesamt-RNA und für die Proteinanalysen mittels Immunzytochemie verwendet.

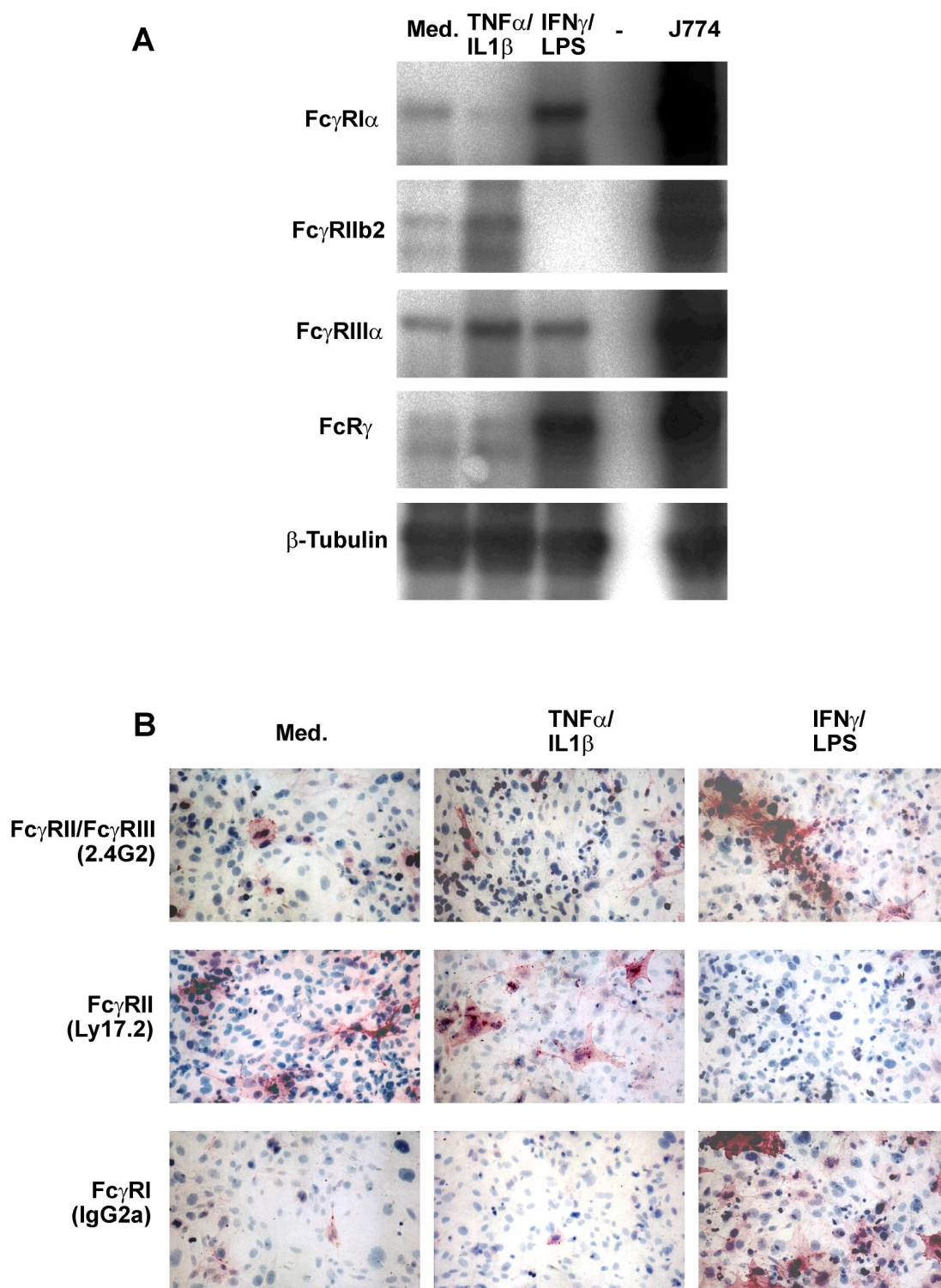


Abb. 20: Fc γ -Rezeptor-Expression in murinen Mesangialzellen (Präparation Sept. '97). Die Stimulation erfolgte mit 1000U/mL IFN γ und 10 μ g LPS sowie mit jeweils 500U/mL TNF α und IL1 β für 48h. **A: Autoradiogramm einer RT-PCR von gesamtzellulärer RNA.** Als Sonden dienten die unter 3.1.2 beschriebenen Fc γ -Rezeptor-spezifischen cDNA-Fragmente. Die Nylonmembranen wurden nach der Hybridisierung für 18 h auf Phosphoimagerplatten exponiert und mit dem Phosphoimager ausgewertet. **B: Immunzytochemie von Mesangialzellen derselben Passage.** Die Immunfärbung der angegebenen Primärantikörper erfolgte wie unter 2.2.5.3.2 beschrieben mit dem *EnVision*-System von DAKO.

In Analogie zu früheren Untersuchungen mit HMC (Radeke, H.H. et al., 1994; Uciechowski, P. et al., 1998) erwies sich die Expressionsrate der einzelnen Fc γ -Rezeptor-Transkripte als so gering, daß ein Nachweis mittels Northernblot aufgrund der geringen Sensitivität mit den in dieser Arbeit analysierten Primärkulturen muriner Mesangialzellen nicht möglich war (nicht gezeigt). Die Agarosegele verschiedener RT-PCR-Analysen zeigten abhängig von der Präparation und der Passage der MMCs nur schwache oder keine Banden, folglich mußte eine Verstärkung der Signale mittels Immobilisation auf Nylonmembranen und einer anschließenden Hybridisierung mit Fc-Rezeptor-spezifischen Sonden (s. 3.1.2) erreicht werden. Als Positivkontrolle für die RT-PCR wurde jeweils 1 μ g gesamtzellulärer RNA aus der Makrophagenzelllinie J774 verwendet. Die jeweiligen PCR-Analysen der Mesangialzellen erfolgte mit cDNA, die aus jeweils 2 μ g gesamtzellulärer RNA generiert wurde. Immunzytochemische Nachweise erfolgten mit dem *EnVision*-System von DAKO (s. 2.2.5.3.2).

Neben der bereits beschriebenen Expression der Fc γ RIII α -Kette zeigt die RT-PCR-Analyse mRNA-Transkripte für alle Fc γ -Rezeptorklassen nach unterschiedlichen Stimulationsbedingungen. Der Fc γ RII wird in diesen Zellen in der für Makrophagen-spezifischen b2-Isoform exprimiert. Aufgrund von Voruntersuchungen an MMCs mit verschiedenen Zytokinen zur Induktion von Fc γ -Rezeptoren wurde hier eine 48stündige Stimulation mit IFN γ /LPS (1000U/mL und 10 μ g/mL) sowie mit TNF α /IL1 β (je 500U/mL) gewählt. Die Voruntersuchungen zeigten, wie auch in der hier dargestellten Analyse, neben der Induzierbarkeit der aktivatorischen Fc γ R durch IFN γ /LPS, die stärkste Induktion der Fc γ RIII α -Kette nach kombinierter Stimulation mit TNF α /IL1 β . Eine Induktion der für die Protein-Expression des Fc γ RIII-Komplexes essentiellen FcR γ -RNA (Ra, C. et al., 1989) ist jedoch nur nach Stimulation mit IFN γ /LPS zu beobachten, so daß nach TNF α /IL1 β -Stimulation keine erhöhte Protein-Expression des Fc γ RIII zu erwarten wäre. Die in Abb. 20B dargestellte immunzytochemische Analyse bestätigt, daß eine induzierte Protein-Expression der aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren (Fc γ RI und Fc γ RIII) nur nach IFN γ /LPS-Stimulation erreicht werden kann. Die Expression des inhibitorischen Fc γ RII wird hier gegensätzlich zu den aktivatorischen Rezeptoren reguliert. Durch die kombinierte

Gabe von IFN γ /LPS kann sowohl auf RNA-Ebene als auch auf Proteinebene eine vollständige Reduktion der Fc γ RII-Expression beobachtet werden.

Dieselben Zellen wurden zusätzlich nach separater IFN γ - sowie LPS-Stimulation immunzytochemisch untersucht (Abb. 21). Aufgrund der nur in begrenzter Menge vorhandenen Zellen dieser Passage mußte auf eine RT-PCR-Analyse verzichtet werden. Die Behandlung mit LPS induziert Fc γ RI und Fc γ RIII, aber auch Fc γ RII, während IFN γ komplett inhibierend auf die Fc γ RII-Expression wirkt. Da sich mit dem Fc γ RII-spezifischen anti-Ly-17.2-mAk keine Färbung der Zellen nach IFN γ -Stimulation detektieren läßt, muss die 2.4G2-Färbung auf mit IFN γ behandelten Zellen Fc γ RIII-spezifisch sein. Die aktivatorischen Fc γ R lassen sich also sowohl mit IFN γ als auch LPS induzieren.

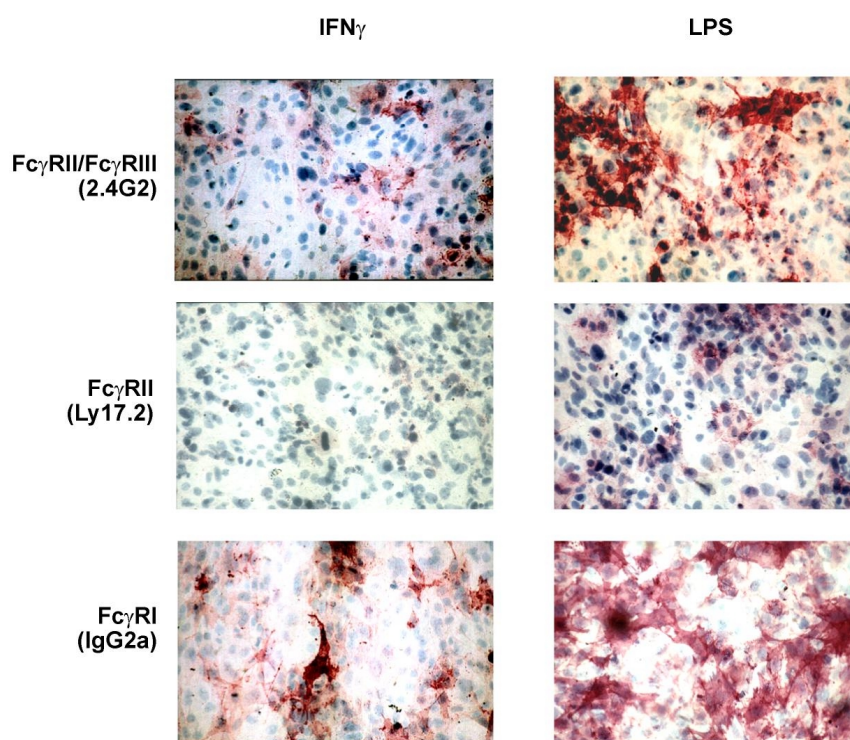


Abb. 21: Immunzytochemische Analyse muriner Mesangialzellen nach IFN γ - sowie LPS-Stimulation. Die Immunfärbung der angegebenen Primärantikörper erfolgte wie unter 2.2.5.3.2 beschrieben mit dem *EnVision*-System von DAKO.

3.3.3.2 Fc γ -Rezeptor-Expression nach separater IFN γ - und LPS-Stimulation

Um die separate Wirkung von IFN γ und LPS weiter zu untersuchen, wurden frisch aufgetaute Mesangialzellen der in 3.3.3.1 untersuchten Präparation (September 1997) bis zur 10. Passage expandiert und mittels RT-PCR analysiert. Abb. 21 zeigt das Ergebnis nach separater und kombinierter IFN γ - und LPS-Stimulation unter proliferierenden Bedingungen (10% FCS).

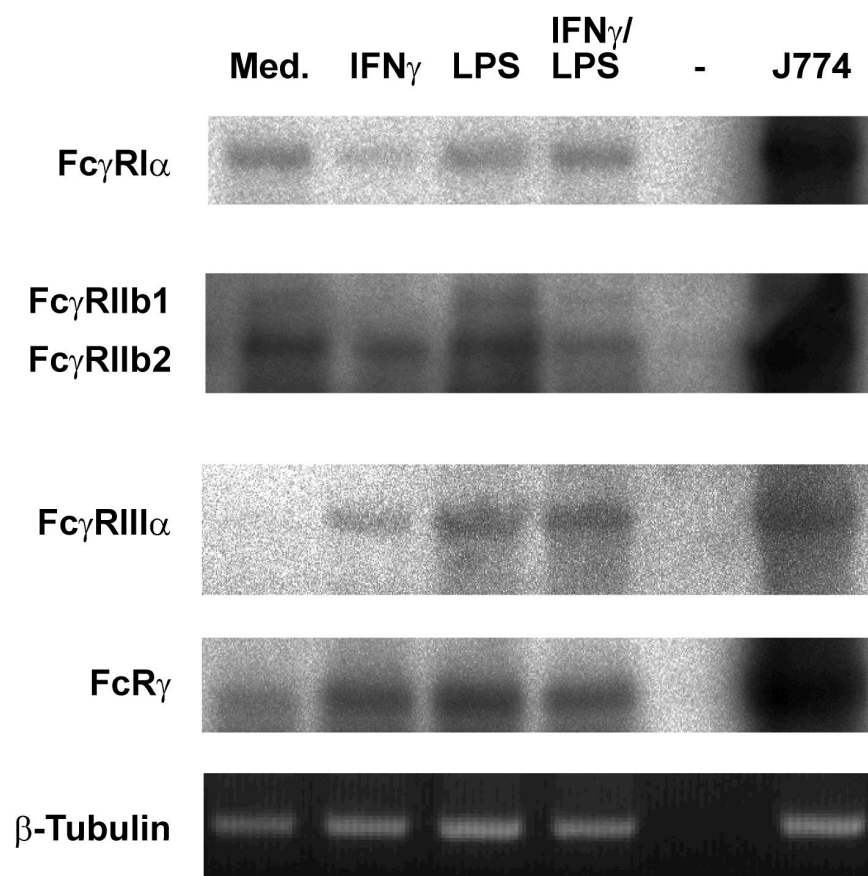


Abb. 22: Fc γ -Rezeptor-Expression nach separater und kombinierter IFN γ - und LPS-Stimulation. Gezeigt ist das Autoradiogramm einer RT-PCR-Analyse mit den angegebenen Fc γ -Rezeptor-spezifischen Primern. Für die β -Tubulin-Expression ist das 2%ige Agarosegel gezeigt. Die Stimulation erfolgte für 48h mit 1000U IFN γ und 10 μ g/mL LPS.

Auch in der 10. Passage der Primärkultur muriner Mesangialzellen sind mittels RT-PCR alle Fc γ -Rezeptorklassen nachweisbar. Zusätzlich zur Fc γ RIIb2-Isoform ist hier auch die in B-Zellen zelltypspezifisch exprimierte Fc γ RIIb1-Isoform detektierbar. Ein

solches Expressionsmuster wird unter bestimmten Bedingungen auch in unreifen Makrophagen, in Mastzellen, in den Makrophagenlinien J774 und Raw sowie in Vorläufer-B-Zellen beobachtet (Latour, S. et al., 1996, eigene Analysen, nicht gezeigt). Die Inhibition des Fc γ RII und die Induktion der FcR γ -Kette durch IFN γ /LPS sind in dieser Präparation nicht so deutlich ausgeprägt wie in der in Abb. 20A gezeigten RT-PCR-Analyse. Durch die separate IFN γ -Stimulation ist diesbezüglich ein vergleichbares Expressionsmuster zu beobachten. Die separate LPS-Stimulation erhöht hingegen die Fc γ RII-Expression im Vergleich zur basalen Expression in nicht-stimulierten Zellen. Die FcR γ -Kette zeigt bei allen Stimulationsbedingungen eine vergleichbare Induktion, während für die Fc γ RIII α -Kette nach separater LPS-Stimulation und nach kombinierter IFN γ /LPS-Stimulation das intensivste Signal zu beobachten ist. Die Fc γ RI-Expression ist in dieser Analyse so gering, daß eine quantitative Aussage nicht getroffen werden kann.

3.3.3.3 Dosisabhängigkeit der Fc γ -Rezeptor-Expression bezüglich der IFN γ -Stimulation

Um die Reproduzierbarkeit der oben dargestellten Ergebnisse und gleichzeitig die dosisabhängige IFN γ -Wirkung zu untersuchen, wurde für den folgenden Versuch eine alternativ präparierte Kultur muriner Mesangialzellen verwendet (Feb. '98). Bei diesen Zellen handelte es sich ebenfalls um Wildtypzellen, die aus Mäusen mit einem 129sv/C57Bl6-Mischhintergrund präpariert wurden. Für die in Abb. 23 gezeigte RT-PCR-Analyse wurde gesamtzelluläre RNA aus proliferierenden Zellen der 10. Passage nach 48-stündiger Stimulation isoliert.

Die Fc γ RIII α -Kette zeigt eine dosisabhängige Induktion durch IFN γ . Diese Induktion kann durch die kombinierte Gabe mit LPS noch weiter gesteigert werden. Für die Reduktion der Fc γ RII-Transkripte kann keine Dosisabhängigkeit beobachtet werden, da bereits bei 500U/mL IFN γ die maximale Inhibition erreicht ist. Die basale Expressionsrate der Fc γ RII-Transkripte kann durch kombinierte Gabe von IFN γ /LPS in dieser RT-PCR zwar reduziert werden. Sie ist aber nicht vollständig inhibiert, wie es z.B. die RT-PCR-Analyse in Abb. 20B zeigt. Die Expression der Fc γ RIIb1-Isoform ist in dieser Präparation deutlich höher als die der unter 3.3.3.1 und 3.3.3.2

analysierten Präparation. Die FcR γ -Kette ist hier so gering exprimiert, daß auf eine quantitative Beurteilung verzichtet werden sollte. Ein Transkript für die Fc γ RI α -Kette ist nur nach kombinierter Stimulation mit IFN γ /LPS detektierbar.

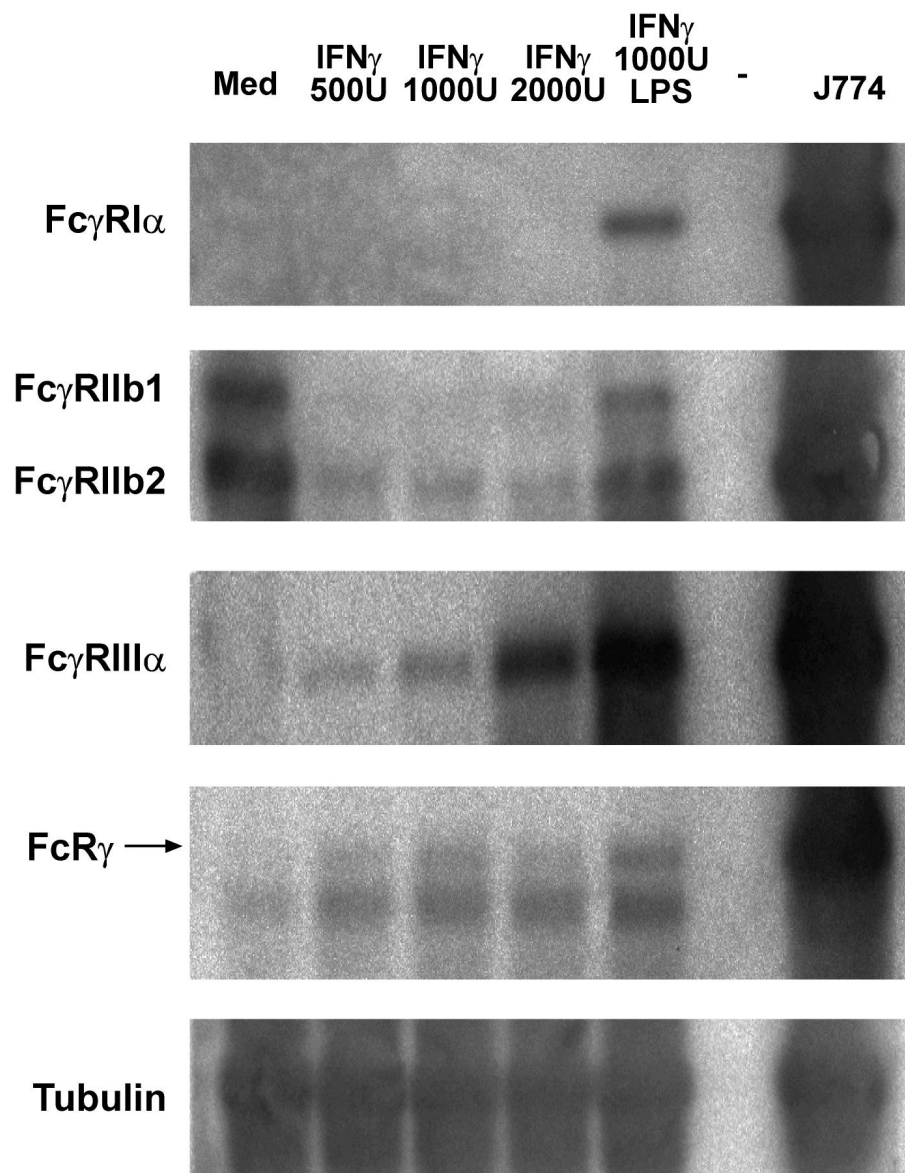


Abb. 23: Fc γ -Rezeptor-Expression nach Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen an IFN γ sowie nach kombinierter Stimulation mit IFN γ /LPS für 48 Stunden. Gezeigt ist das Autoradiogramm einer RT-PCR-Analyse mit spezifischen Primern für die angegebenen Fc γ -Rezeptor Untereinheiten sowie Primern für β -Tubulin als Standard.

3.3.4 Analyse der Chemokin-Expression in murinen Mesangialzellen

Funktionelle Analysen primärer Kulturen muriner und humaner MCs haben gezeigt, daß sowohl durch die Stimulation mit IFN γ oder LPS als auch mit IgG-Immunkomplexen die Expression verschiedener Chemokine und Zytokine induziert wird. Die Chemokin-Sekretion von Mesangialzellen könnte einen initialen Schritt von Entzündungsreaktionen in der Niere darstellen, da hierdurch Monozyten, Granulozyten und T-Lymphozyten an den Ort der Entzündung gelockt werden. Zur Untersuchung der Chemokin-Expression in murinen Mesangialzellen wurde die RT-PCR (s. 2.2.1.8.1) sowie der *RNase Protection Assay* (s. 2.2.1.8.3) verwendet.

3.3.4.1 Klonierung der Sonden-*templates* für die Detektion muriner Chemokine

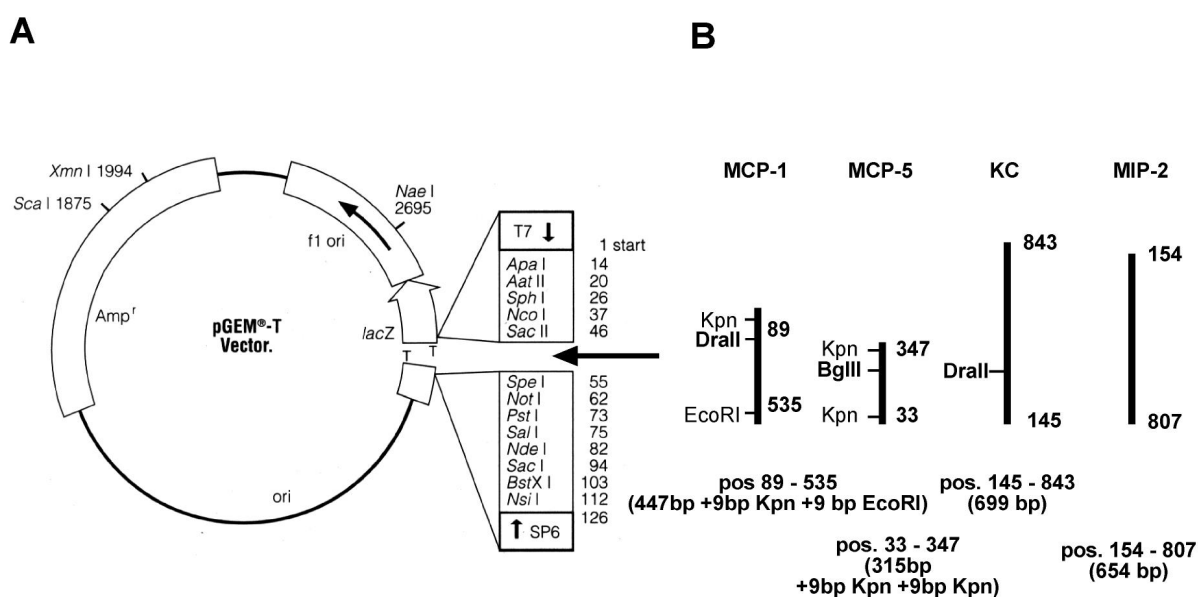


Abb. 24: Klonierung muriner Chemokine in den pGEM-T-Vektor. A: Design des T-Vektors. Der Vektor enthält das lacZ-Gen für das blau/weiß-Screening erfolgreich klonierter Bakterienkolonien sowie das Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion erfolgreich transformierter Bakterien. Die *multi cloning region* ist von den Primersequenzen T7 und SP6 flankiert, die für die Sequenzierungen verwendet wurden. Der Thymidin-Überhang erlaubt das direkte Klonieren von PCR-Produkten, da durch die Taq-Polymerase ein Adenin-Überhang generiert wird. **B: Orientierung und Länge der einzelnen Chemokin-spezifischen Inserts.** Dargestellt sind zusätzlich die Positionen der für die RT-PCR verwendeten Primer sowie die relevanten Restriktionsschnittstellen.

Die Sonden-*templates* für die in dieser Arbeit untersuchten Chemokine JE (MCP-1), MCP-5, KC und MIP-2 wurden aus RT-PCR-Produkten generiert. Hierzu wurden die amplifizierten DNA-Fragmente aus dem Agarosegel eluiert und in den T-Vektor pGEM-T (Promega) kloniert. Als *target*-cDNA diente in der RT-Reaktion umgeschriebene gesamtzelluläre RNA aus J774-Zellen (JE/MCP-1, MCP-5 und MIP-2) bzw. aus murinen Mesangialzellen (KC).

Die in Abb. 24 dargestellten Sonden-*templates* wurden durch Restriktionsanalysen sowie durch Sequenzierungen überprüft. Die angegebenen Positionsnummern entsprechen den veröffentlichten cDNA Sequenzen (Kawahara, R.S. und Deuel, T.F., 1989; Oquendo, P. et al., 1989; Tekamp-Olson, P. et al., 1990; Sarafi, M.N. et al., 1997). Für die radioaktive Markierung mit der Klenow-Polymerase wurden sie aus dem Vektor geschnitten und über ein Agarosegel aufgereinigt. Hierzu wurde die Sonde für MCP-1 mit EcoRI/KpnI, die für MCP-5 mit KpnI und die Sonden für KC und MIP-2 mit PstI/SacII verdaut.

3.3.4.2 RNA-Analysen der Chemokin-Expression von stimulierten Mesangialzellen aus Wildtyp- und FcR γ ^{-/-}-Mäusen

Um die Fc γ -Rezeptorabhängigkeit der Chemokin-Expression zu untersuchen, wurden Mesangialzellen aus Wildtypmäusen und FcR γ ^{-/-}-Mäusen mit IFN γ /LPS stimuliert. Sowohl unstimulierte als auch stimulierte Zellen wurden danach für 12 h mit hitzeaggregiertem IgG inkubiert. Die kombinierte Gabe von IFN γ /LPS wurde für eine Vorstimulation gewählt, da die vorangegangenen Analysen muriner MCs die stärkste Induktion der FcR γ -Kette und somit auch der aktivatorischen Fc-Rezeptoren (Fc γ RI und Fc γ RIII) nach dieser Stimulation gezeigt haben. Abb. 25 zeigt einen *RNase Protection Assay* (RPA) dieser Zellen, der mit einem Sonden-Mix für murine Chemokine durchgeführt wurde (mCK-5, Pharmingen). Dieser enthält Sonden-*templates* für die Chemokine Ltn, RANTES, Eotaxin, MIP-1 β , MIP-1 α , MIP-2, IP-10, MCP-1 und TCA-3, die durch die unterschiedliche Größe sowohl der unverdauten Sonden als auch der geschützten RNA-Hybride voneinander unterscheidbar sind und in einem einzelnen Ansatz eingesetzt werden können (Tab. 5). Die Sonden-*templates* für die *house keeping genes* L32 und GAPDH ermöglichen die relative

Quantifizierung der einzelnen Chemokin RNAs. Hierzu wurden die PAGE Gele nach dem elektrophoretischen Lauf auf dem Phosphoimager digitalisiert und mit der AIDA-Software ausgewertet.

Template	Sonde [Nt]	geschützt [Nt]
Ltn	389	360
RANTES	350	321
Eotaxin	315	286
MIP-1 β	284	255
MIP-1 α	256	227
MIP-2	231	202
IP-10	209	180
MCP-1	190	161
TCA-3	170	141
L32	141	112
GAPDH	125	96

Tab. 5: Bandengrößen der Sonden und geschützten RNA-Hybride des mCK-5 *Template*-Sets

In den Mesangialzellen der Wildtyp- (WT-)Mäuse lassen sich, wie bereits beschrieben (Gomez-Chiarri, M. et al., 1993; Satriano, J.A. et al., 1993; Wolf, G. et al., 1993), die Chemokine RANTES, IP-10 und MCP-1 durch Stimulation mit IFN γ und/oder LPS induzieren (Abb. 25A). Die Expressionsinduktion dieser Chemokine durch IFN γ /LPS scheint unabhängig von der FcR γ -Kette zu sein, da sie sich in MCs von FcR γ ^{-/-}-Mäusen ebenso induzieren lassen. Eine weitere Induktion von RANTES ist in WT-Mäusen, aber nicht in FcR γ -defizienten Mäusen nach zusätzlicher Stimulation mit hitzeaggregiertem IgG zu beobachten. Die IP-10-Expression ist in den MCs der FcR γ -defizienten Mäusen insgesamt höher als in denen der WT-Mäuse und lässt sich hier noch weiter durch die Zugabe von IgG-Immunkomplexen steigern. Auch die MCP-1-Produktion ist in MCs von FcR γ ^{-/-}-Mäusen höher als in den hier untersuchten Mesangialzellen von WT-Mäusen.

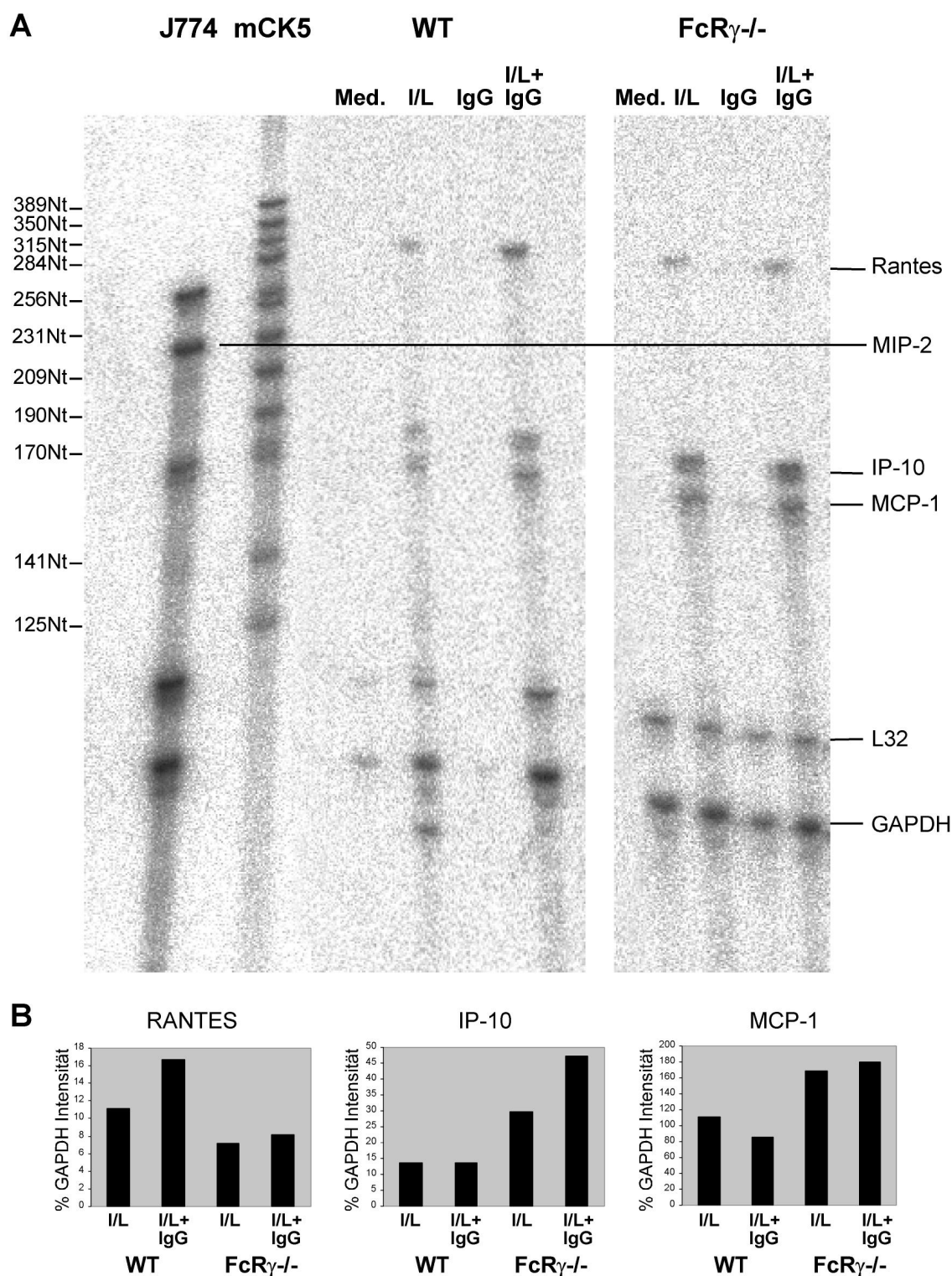


Abb. 25: RNase Protection Assay von MCs aus Wildtypmäusen (WT) und FcR γ -defizienten Mäusen (FcR γ ^{-/-}). A: Autoradiogramm des RPAs. Proliferierende Mesangialzellen von Wildtypmäusen (C57Bl/6 / 129) wurden in der 8. Passage und MCs aus FcR γ ^{-/-}-Mäusen in der 7. Passage nach Präparation für 48h mit IFN γ /LPS stimuliert und jeweils unstimulierte (Med) und stimulierte (I/L) Zellen wurden danach für 12 h mit 100 μ g hitzeaggregiertem IgG/mL Kulturmedium inkubiert. Pro Ansatz wurde jeweils 20 μ g Gesamt-RNA der verschiedenen MC-Präparationen und J774-Zellen eingesetzt. Die Hälfte des RPA-Ansatzes wurde nach Hybridisierung, RNase-Verdau und Fällung auf ein 8%iges PAGE-Gel aufgetragen. Als Größenmarker diente der unverdaute Sonden-Mix

für murine Chemokine (mCK-5). **B: Quantifizierung des RPAs.** Ermittelt wurde die prozentuale Intensität der Banden für RANTES, IP-10 und MCP-1 bezogen auf die jeweilige GAPDH-Bande. Die Auswertung erfolgte mit der AIDA-Software von Raytest, berücksichtigt wurden jeweils die Werte nach IFN γ /LPS- Stimulation.

Eine RT-PCR-Analyse mit MCP-1-spezifischen Primern zeigte ebenfalls keine weitere Expressionsinduktion dieses Chemokins durch IgG-Immunkomplexe. Für MIP-2, dessen mRNA Menge für Mesangialzellen, nicht aber für J774, unterhalb der Nachweisgrenze des RPAs liegt, war ebenfalls in einer RT-PCR-Analyse die Expression in MCs der FcR γ -defizienten Mäuse höher als in Wildtypmäusen. Eine erhöhte MIP-2 Produktion nach Inkubation mit IgG-Komplexen war nicht zu beobachten (nicht gezeigt).

Um weitere Chemokine zu untersuchen, die nicht im mCK-5 *template*-Set enthalten sind, wurden mit KC- und MCP-5-spezifischen Primern RT-PCR-Analysen durchgeführt. Diese wurden mit jeweils 2 μ g Gesamt-RNA der oben beschriebenen Mesangialzellpräparationen angesetzt. KC ist ein CXC-Chemokin, das chemotaktisch auf Neutrophile wirkt und dem humanen Gro- α homolog ist (Oquendo, P. et al., 1989; Moser, B. et al., 1990). Beide sind funktionell dem Prototypen der CXC-Chemokine, dem humanen IL-8, ähnlich. MCP-5, ein CC-Chemokin, ist ein Homolog des JE/MCP-1. Es wurde bislang nur in der Maus identifiziert und zeigt chemotaktische Wirkung auf Monozyten, Eosinophile und T-Lymphozyten (Sarafi, M.N. et al., 1997).

Abb. 26 zeigt das Ergebnis der RT-PCR-Analyse dieser Chemokine. Beide lassen sich in Mesangialzellen aus Wildtypmäusen mit IFN γ /LPS stimulieren und zeigen eine weitere Induktion durch die zusätzliche Stimulation mit hitzeaggregiertem IgG. In den MCs aus FcR γ ^{-/-}-Mäusen läßt sich diese Induktion mit IFN γ /LPS zu einem deutlich geringeren Maße erreichen und mit IgG-Komplexen nicht weiter steigern.

Während sich KC in den WT-Zellen mit hitzeaggregiertem IgG ohne vorherige IFN γ /LPS Stimulation induzieren läßt, ist im Vergleich dazu kein Signal in Zellen der FcR γ ^{-/-}-Mäuse detektierbar. MCP-5 wird nur nach Vorstimulation mit IFN γ /LPS durch IgG-Komplexe induziert. Dieses Ergebnis deutet auf eine Fc γ -Rezeptor-abhängige Expression der Chemokine KC und MCP-5 in murinen Mesangialzellen hin, die

Fc γ RI- und/oder Fc γ RIII-spezifisch ist, da in der FcR $\gamma^{-/-}$ -Maus diese beiden Rezeptoren fehlen.

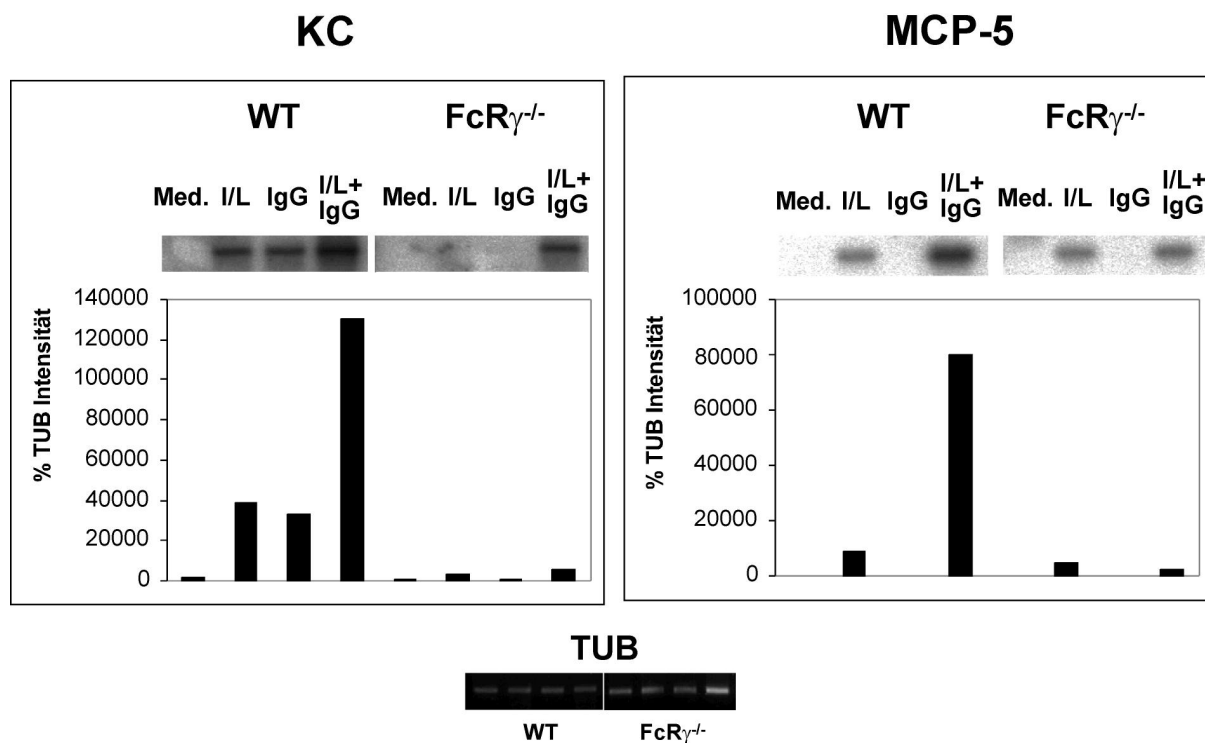


Abb. 26: Expression der Chemokine KC und MCP-5 in murinen Mesangialzellen. Die Analyse erfolgte mittels RT-PCR mit derselben RNA-Präparation, die für den RPA (Abb. 25) verwendet wurde. Zur Signalverstärkung wurden die PCR-Fragmente auf Nylonmembranen immobilisiert und mit den in Kapitel 3.3.4.1 beschriebenen Sonden hybridisiert. Die quantitative Auswertung wurde mit der AIDA-Software durchgeführt und in das prozentuale Verhältnis zur jeweiligen Intensität der Tubulinbande auf dem Agarosegel umgerechnet.

3.4 Gezielte Mutagenese Embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) mittels homologer Rekombination zur Herstellung von Fc γ RIIb1-knock out-Mäusen

Um die *in vivo*-Funktion des Fc γ RIIb1 analysieren zu können, wurde in dieser Arbeit ein Embryonaler Stammzellklon generiert, der eine spezifische Defizienz dieser Isoform aufweisen soll. Da die Fc γ RIIb2-Isoform des Rezeptors durch alternatives Spleißen des C1-Exons entsteht, besteht die Strategie in der gezielten Deletion dieses Exons auf genomischer Ebene. Dadurch würde nur noch die b2-Isoform

exprimiert werden, wenn das alternative Spleißen wie in der Wildtypmaus gewährleistet bleibt. Die Generierung einer *knock out*-Maus mittels *gene targeting* beinhaltet die genetische Veränderung durch homologe Rekombination zwischen einem exogenen, mutierten und dem endogenen Genabschnitt einer murinen ES-Zelle. Diese wird mit einer Blastozyste fusioniert, die dann in den Uterus einer pseudoträchtigen Maus transplantiert wird. Bei den Nachkommen handelt es sich um chimäre Tiere, die zwei voneinander getrennte Genome tragen. Da die ES-Zelle pluripotent ist, kann sie in jede Zellpopulation und somit auch zu Keimzellen differenzieren, die dann die Mutation an die Nachkommen weitergeben (Thomas, K.R. und Capecchi, M.R., 1987; Capecchi, M.R., 1989; Thompson, S. et al., 1989). Der exogene Genabschnitt, das *targeting*-Konstrukt, wurde bereits in der vorangegangenen Diplomarbeit kloniert (Abb. 27C und D) (Janssen-Graalfs, I.R., 1995) und in dieser Arbeit weiter optimiert (Abb. 27E und F). Die homologen DNA-Abschnitte wurden hierzu aus genomischer DNA einer 129/ola-Maus mittels PCR-Amplifikation gewonnen, da für eine erfolgreiche homologe Rekombination eine größtmögliche Homologie zwischen endogenem und exogenem Genabschnitt erforderlich ist (te Riele, H. et al., 1992) und die ES-Zellen einen 129/ola Hintergrund haben. PCR-Mutationen wurden durch Sequenzierungen ausgeschlossen und die für das Spleißen nötigen Sequenzen (Donor-, Akzeptor- und Verzweigungsstelle des C1-Exons) wurden deletiert, so daß keine zusätzlichen Sequenzen im entstehenden FcγRIIb2-Transkript integriert werden. Die für die Selektion erfolgreich integrierter Konstrukte erforderliche Neomycin-Resistenzkassette ist von zwei loxP-Sequenzen flankiert, die ein nachträgliches Herausschneiden der Neomycin-Resistenzkassette ermöglichen. Hierbei handelt es sich um Erkennungssequenzen der Bakteriophagen Rekombinase Cre, die Abschnitte, die zwischen den loxP-Sequenzen lokalisiert sind, durch Rekombination deletiert. Dieses System läßt sich ebenfalls in ES-Zellen anwenden (Gu, H. et al., 1993). Hierfür kann entweder die mutierte ES-Zelle mit dem Cre-Gen transfiziert oder die generierte Maus mit einer Cre-transgenen Maus gekreuzt werden.

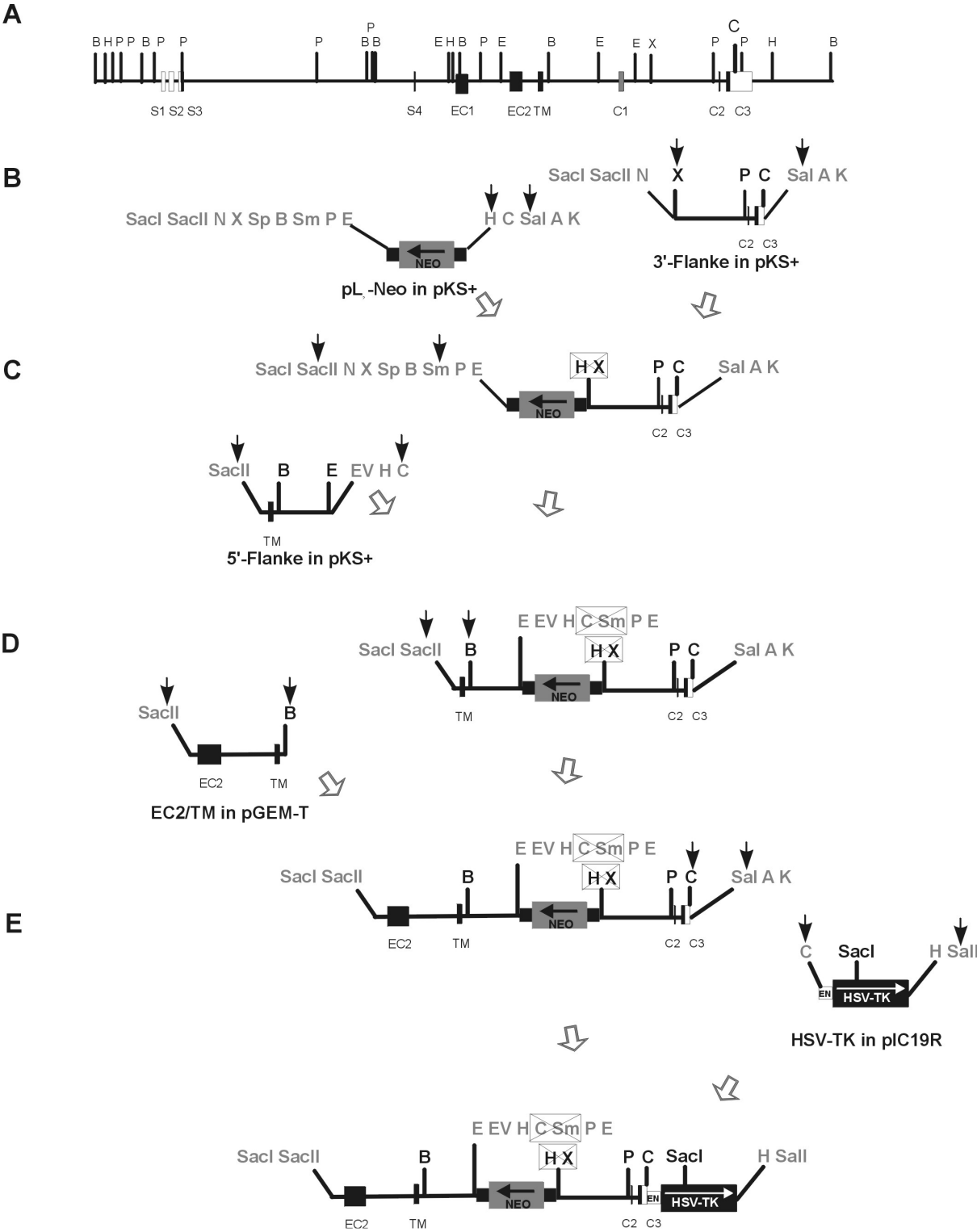
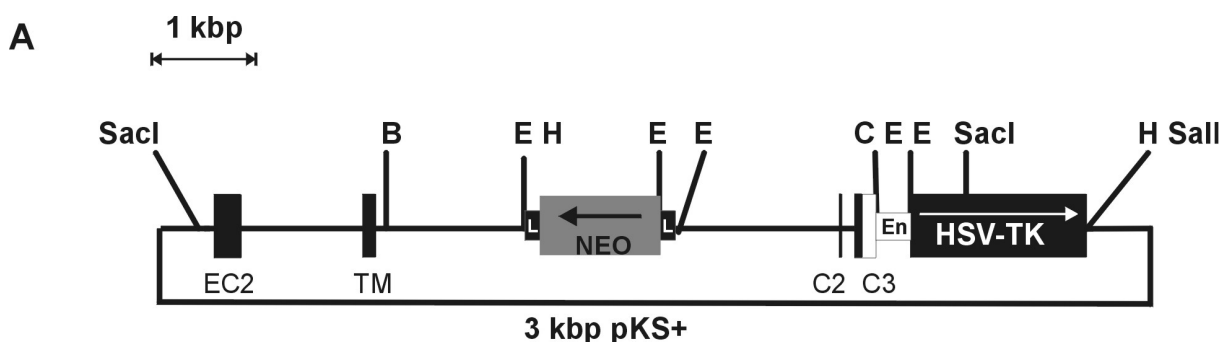


Abb. 27: Klonierungsstrategie des *FcγRIIb1* targeting-Konstruktes. A: Restriktionskarte des *FcγRII*-Gens. B-E Klonierungsstrategie. B = BamHI, H = HindIII, E = EcoRI, P = PstI, C = ClaI, A = ApaI, N = NotI, Sal = Sall Sp = SpeI, EV = EcoRV, K = KpnI X = XbaI, Sm = SmaI. Weitere Erklärungen im Text.

Das *targeting*-Konstrukt wurde in dieser Arbeit noch um Sequenzen, die das EC2-Exon umfassen, erweitert (Abb. 27D). Diese wurden mittels PCR-Amplifikation mit den Primern „EC2 int s“ und „TM int as“ (2.1.7) aus 1µg genomischer 129/ola DNA generiert und in den T-Vektor pGEM-T kloniert. Die PCR wurde wie unter 2.2.1.7.4 beschrieben mit einer Elongationszeit von 200s und unter Zugabe von 5U Taq-Extender (Stratagene) im beigefügten Taq-Extender-Puffer durchgeführt. Durch anschließende Sequenzierungen konnten Mutationen durch die Taq-Polymerase ausgeschlossen werden. Die direktionale Klonierung erfolgte dann über die interne BamHI-Schnittstelle und die SacII-Schnittstellen der *multi cloning sites*. Da der Großteil der transfizierten *targeting*-Konstrukte an irgendeiner Stelle im Genom integriert, aber nicht durch homologe Rekombination die gewünschte Mutation inseriert und eine Selektion durch die Neomycin-Resistenzkassette und die Zugabe von Geneticin (G418) auch die unerwünschten Klone erfaßt, wurde schließlich das Konstrukt noch durch eine HSV-TK-Kassette erweitert. Diese dient der Positivselektion erfolgreich rekombinierter ES-Zellklone. Bei Integration des linearisierten Konstruktes wird das komplette Konstrukt inseriert, inklusive der HSV-TK-Kassette. Findet jedoch eine Rekombination über die homologen Flanken des Konstruktes statt, wird die HSV-TK-Kassette deletiert. Durch Zugabe von Gancyclovir, das durch das TK-Gen in ein toxisches Produkt umgewandelt wird, werden solche Klone angereichert, die erfolgreich rekombiniert sind (Mansour, S.L. et al., 1988). Eine solche Anreicherung findet in der Regel um den Faktor 10 statt. Das TK-Gen wurde freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Rüter, Medizinische Hochschule Hannover, zur Verfügung gestellt. Es lag kloniert im pIC19R-Vektor vor, der identisch zu den pUC-Vektoren ist, aber über eine alternative *poly linker*-Sequenz verfügt. Dem TK-Gen ist ein duplizierter Polyoma Virus Enhancer vorgeschaltet (PYF441), der für eine hohe Transkriptionsrate des TK-Gens sorgt. Das TK-Gen wurde inklusive des Enhancers über ClaI und Sall direktional in das *targeting*-Konstrukt kloniert (Abb. 27E).

Die Integrität des *targeting*-Konstruktes wurde mittels Restriktionsanalyse überprüft (Abb. 28). Zusammen mit vorangegangenen Restriktionsanalysen des in Abb. 27C dargestellten Konstruktes, die zusätzlich durch *Southernblot*-Hybridisierungen ergänzt wurden (Janssen-Graalfs, I.R., 1995) und Sequenzierungen der FcγRII-

spezifischen Flanken konnte die korrekte Klonierung des Konstruktes bestätigt werden.



B

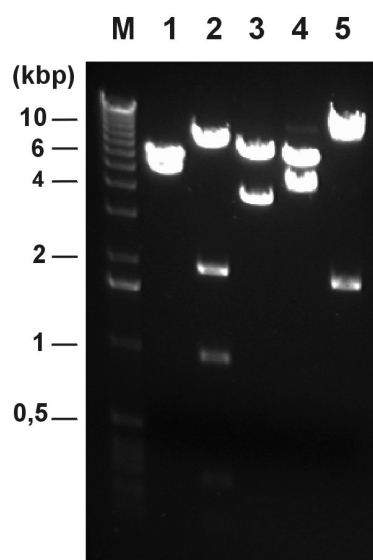


Abb. 28: Restriktionsanalyse des *FcγRIIb1-targeting*-Konstruktes. A: Restriktionskarte mit den relevanten Schnittstellen. E = EcoRI, H = HindIII, B = BamHI, C = ClaI, Neo = Neomycin-Resistenzgen, HSV-TK = Herpes Simplex Virus–Thymidinkinase, L = LoxP, En = Enhancer. B: Restriktionsanalyse. M = Marker (1 kb Leiter), 1 = HindIII, 2 = EcoRI, 3 = Sacl, 4 = BamHI/Sall, 5 = Sall/ClaI

Zunächst wurden Embryonale Stammzellen wie unter 2.2.2.2.3 beschrieben mit dem in Abb. 27D dargestellten Konstrukt (ohne HSV-TK-Gen) mittels Elektroporation transfiziert. Hierzu wurde das Konstrukt mit Sall linearisiert und in PBS aufgenommen. Nach der Selektion wurden insgesamt ca. 450 ES-Zellkolonien gepickt und mittels *Southernblot*-Hybridisierung analysiert. Dazu wurde die genomische DNA mit HindIII geschnitten und mit der in Abb. 29A dargestellten

Sonde, die außerhalb der Sequenzen des *targeting*-Konstruktes liegt, hybridisiert. Nach erfolgreicher homologer Rekombination sollte zusätzlich zu der 9 kbp großen HindIII-Bande des Wildtyps eine zweite Bande von 4 kbp mit dieser Sonde hybridisieren, da die Rekombination auf nur einem Allel stattfindet. In keinem der 450 untersuchten ES-Zellklone konnte eine erfolgreiche homologe Rekombination festgestellt werden, so daß zur Anreicherung erfolgreich homolog rekombinierter Klone das *targeting*-Konstrukt um die HSV-TK-Kassette wie oben beschrieben erweitert wurde. Nach zwei weiteren Transfektionen mit diesem Konstrukt wurden jeweils ca. 150 Klone untersucht, von denen sich einer als homolog rekombiniert erwies (Klon C2D6). In Abb. 29 B und C sind *Southernblot*-Analysen des Klons dargestellt. Ein *shift* der 9 kbp großen HindIII-Wildtyp-Bande zu 4 kbp zeigt die erfolgreiche Rekombination eines Allels. Der *shift* der BamHI-Bande von nur 0,1 kbp ist durch die ungenügende Auftrennung nur schlecht zu erkennen. Außerdem wurde mit einer Neomycin-spezifischen Sonde überprüft, ob zusätzlich zum homolog rekombinierten Allel weitere Integrationen des *targeting*-Konstruktes im Genom stattgefunden haben (Abb. 29C). Die schwache 9 kbp große HindIII-Bande wurde ebenfalls in allen nicht homolog rekombinierten Klonen beobachtet. Hierbei handelt es sich wahrscheinlich um genomische Sequenzen aus den für die ES-Zellkultur notwendigen *Feeder*-Zellen, die für diese Analysen zu einem geringen Anteil die genomische ES-Zell-DNA kontaminieren. Der ES-Zellklon C2D6 wurde nochmals rekloniert und der Klon C2D6.6 wurde schließlich expandiert und für die Langzeitlagerung in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Derzeit wird von unserer Kooperationsgruppe (J. Verbeek, Leiden) die Blastozystenfusion und -transplantation durchgeführt.

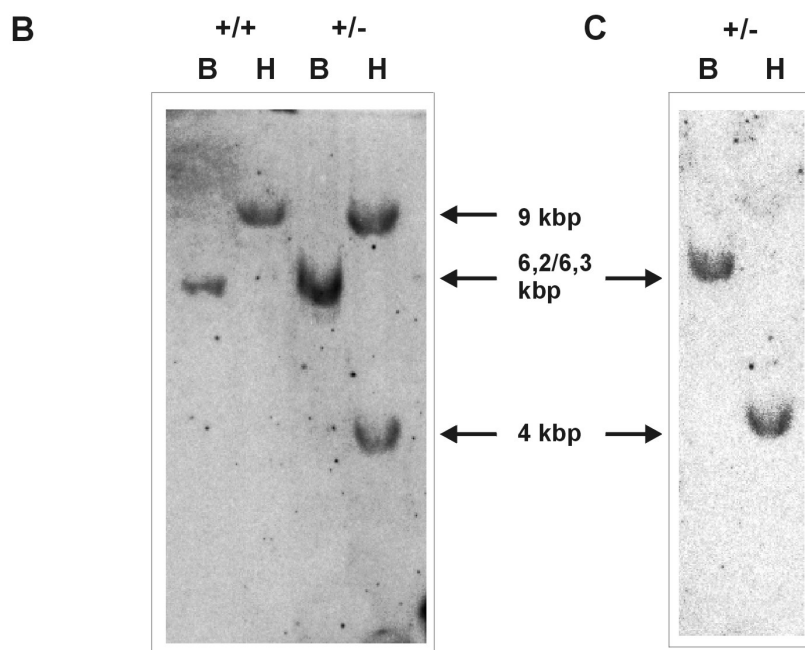
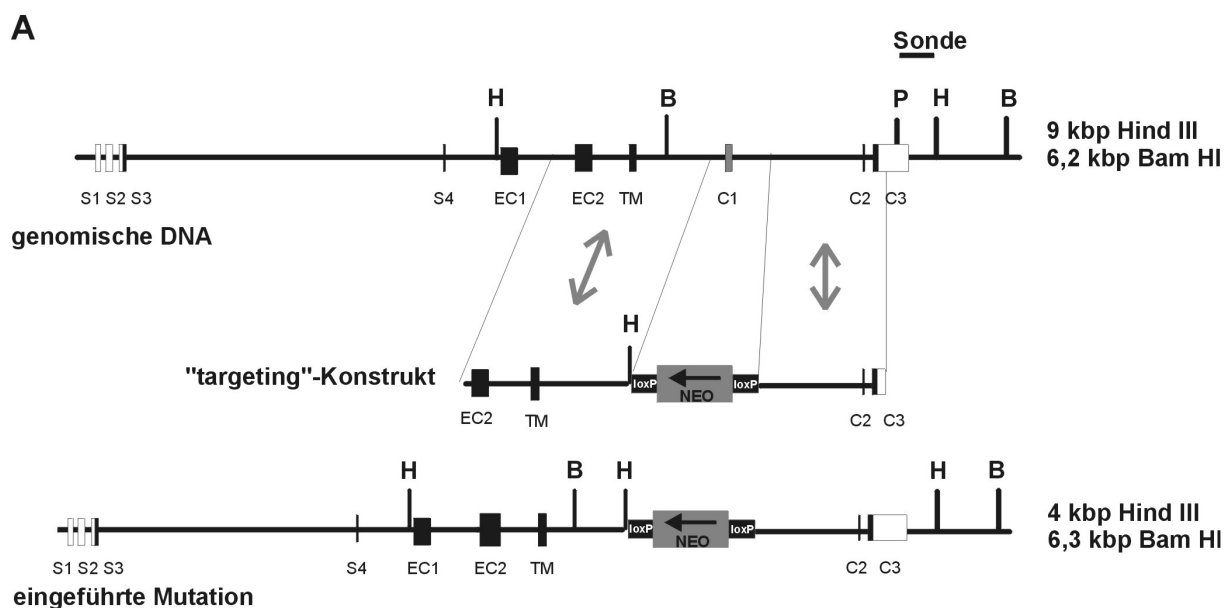


Abb. 29: Deletion des Fc γ RII-C1-Exons mittels Homologer Rekombination in ES-Zellen.
A: Genlocus des Fc γ RII-Gens, *targeting*-Konstrukt und Allel nach Einführung der Mutation.
B: *Southernblot*-Analyse des rekombinierten Klon C2D6 (+/-) und eines Klons mit zwei Wildtypallelen (+/+). Genomische DNA wurde mit HindIII (H) und BamHI (B) verdaut und mit der in A dargestellten Sonde hybridisiert. Die eingeführte Mutation ist durch einen *shift* der HindIII Bande von 9 kbp zu 4 kbp detektierbar. Ein *shift* der BamHI-Bande um nur 0,1 kbp ist nur undeutlich zu erkennen.
C: *Southernblot*-Hybridisierung des Klons C2D6 mit einer Neomycin-spezifischen Sonde.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Rolle des Fc γ RII bei Entzündung und Autoimmunität untersucht. Hierfür wurde einerseits die experimentelle Autoimmune Hämolytische Anämie (AIHA) und andererseits die Glomerulonephritis als Beispiel einer Fc γ -Rezeptor-abhängigen Autoimmun- bzw. Entzündungsreaktion zur Analyse der Beteiligung von Fc γ -Rezeptoren bei Immunreaktionen näher betrachtet. Schließlich wurde mit der Generierung einer Fc γ RIIb1-defizienten Maus begonnen, die zum Zeitpunkt des Abschlusses der Arbeit als homolog rekombinierte Embryonale Stammzelle vorlag. Da zumindest der Fc γ RIIb1 regulatorisch auf die aktivatorischen Funktionen des Fc γ RI und Fc γ RIII wirkt (Daeron, M. et al., 1995), war es nötig, die Analyse dieser Isoformen mit einzubeziehen.

4.1 Methodische Ansätze zur Unterscheidung einzelner Fc γ Rezeptoren

In Teilen dieser Arbeit wurde die Expression der verschiedenen Fc γ -Rezeptor-Isoformen in Gewebe und Zellen der Maus auf RNA- und Proteinebene untersucht. Durch die hohe Homologie insbesondere der beiden niedrigaffinen Fc γ -Rezeptorklassen Fc γ RII und Fc γ RIII war es bislang schwierig, exakte Aussagen über die Funktion und das Expressionsverhalten einzelner Isoformen zu treffen. Eine Diskriminierung dieser beiden Klassen ist aber von besonderer Bedeutung, da diese zwar die verschiedenen IgG-Subklassen teilweise in ähnlicher Weise binden, aber durch unterschiedliche zytoplasmatische Domänen und damit anderen Signaltransduktionswegen divergente Effektorfunktionen vermitteln. Durch die Verfügbarkeit von Fc γ R-defizienten Mausstämmen lassen sich heute aber die einzelnen Isoformen separat betrachten und ihre *in vivo*-Funktionen genauer bestimmen. Zellen und Gewebeschnitte dieser Mausstämme dienten in dieser Arbeit hauptsächlich zur Analyse der Expression verschiedener Isoformen. Bislang stand lediglich ein monoklonaler Antikörper (2.4G2) zur Proteinanalyse von Fc γ -Rezeptoren der Maus zur Verfügung, der beide niedrigaffinen Fc γ Rs in gleichem Maße erkennt. In jüngsten Untersuchungen konnten jedoch die anti-Ly-17 Antikörper, anti-Ly-17.1 und anti-Ly-17.2, als Fc γ RII-spezifisch charakterisiert werden und stehen somit für

die Analyse der membranständigen Fc γ RII-Isoformen (b1/b1' und b2) zur Verfügung (Schiller, C. et al., 2000). Schließlich ist durch RNA-Analysen ein Rückschluss auf die Protein-Expression der Rezeptorklassen möglich. Hierbei muss allerdings berücksichtigt werden, daß zumindest die Oberflächen-Expression des Fc γ RIII von der Existenz der γ -Ketten-mRNA abhängig ist (Ra, C. et al., 1989; Takai, T. et al., 1994).

RNA-Analysen erfolgten in dieser Arbeit mit Hilfe der RT-PCR. Diese Methode ist besonders sensitiv, aber für quantitative Aussagen umstritten. Abb. 4A zeigt eine RT-PCR-Analyse aus der Makrophagenzelllinie J774 und der Dendritischen Zelllinie 80/1. Die Analyse zeigt, wie bereits beschrieben, spezifische Signale für den Fc γ RIIb2 (Ravetch, J.V. et al., 1986) in geringen Mengen auch den Fc γ RIIb1 (Latour, S. et al., 1996), den Fc γ RI (Quilliam, A.L. et al., 1993), den Fc γ RIII (Ravetch, J.V. und Kinet, J.P., 1991; Hulett, M.D. und Hogarth, P.M., 1994) und die FcR γ -Kette. Die Fc γ RII-spezifischen Primer sind so gewählt, daß sich die drei membranständigen Isoformen anhand der Fragmentgrößen unterscheiden lassen (Abb. 4B). Während J774-Zellen sowohl die Fc γ RIIb2-Isoform, als auch in geringerem Maße die b1-Isoform exprimieren, kann keine Fc γ RII-Isoform auf 80/1 Zellen detektiert werden. Immunzytochemische Analysen mit dem anti-Ly-17.2-mAk bestätigen die Fc γ RII-Defizienz dieser Zelllinie auf Proteinebene (Abb. 9). Die quantitativen Unterschiede in der Expression der Fc γ RIII α -mRNA lassen sich mit dem *RNase Protection Assay* bestätigen (nicht gezeigt). Dieser wurde für die Analyse der Fc γ R-Expression in unserer Arbeitsgruppe entwickelt und enthält ein *Template*-Set zur Detektion der verschiedenen Fc γ R-Untereinheiten (Abb. 8), zeigte sich aber für die im folgenden gezeigten Analysen der Fc γ -Rezeptor-Expression in Mesangialzellen durch eine ungenügende Sensitivität als nicht geeignet (Loescher, F., 1999). Ferner wurden für die Signalverstärkung von RT-PCR-Produkten cDNA-Sequenzen als Sonden-*templates* eingesetzt, die entweder bereits vorlagen (Fc γ RIIb1 und Fc γ RIII, J. Ravetch), oder mittels RT-PCR und Klonierung in T-Vektoren generiert wurden. Bei der Aufreinigung dieser Sonden wurde darauf geachtet, daß sie nicht in homologen Bereichen der Zielsequenzen hybridisieren und somit auch für die Northernblot-Analyse geeignet sind. Abb. 6 zeigt eine Northernblot-Analyse mit den verwendeten cDNA-Sonden von Gesamt-RNA der J774- und A20-Zelllinien. Unspezifische Banden,

die mit der Fc γ RI- und der FcR γ -Sonde bei J774-RNA auftreten, können aufgrund ihrer Größe keiner möglichen Spleißvariante zugeordnet werden. Obwohl für den humanen Fc γ RI drei Genloci (Fc γ RIA, Fc γ RIB und Fc γ RIC) bekannt sind, von denen aber zwei Loci zu einer löslichen Form exprimiert werden und auch noch kein Protein nachgewiesen werden konnte (Ernst, L.K. et al., 1992; Hulett, M.D. und Hogarth, P.M., 1994), können hier keine verkürzten Transkripte detektiert werden, die auf homologe murine Gene schließen lassen könnten. Ferner ist für die humane Fc γ RIA-Isoform eine Spleißvariante beschrieben worden, die ebenfalls zu einem verkürzten Transkript führt (Ernst, L.K. et al., 1992). Auch hier ist in der murinen J774-Zelllinie kein mögliches Homolog vorhanden.

Für die Immunhistochemische und -zytochemische Analyse muriner Fc γ -Rezeptoren wurden in dieser Arbeit verschiedene Antikörper mit unterschiedlichen Färbemethoden getestet. Der 2.4G2 (Fc γ RII/RIII-spezifisch) läßt sich sowohl in der Zytochemie als auch in der Histochemie verwenden (Abb. 9 und Abb. 10). Er kann sowohl mit dem *EnVision*-System (DAKO) als auch mit der APAAP-Färbung spezifisch detektiert werden. Als biotinylierter Antikörper läßt er sich mit dem Biotin-Streptavidin-System nachweisen, wobei HRP als Enzym und Diaminobenzidin als Substrat diente (Abb. 15). Als Kontrollen dienten hierbei entweder Zellen mit bekanntem Expressionsmuster oder Kryostatschnitte von verschiedenen Fc γ R-defizienten Mäusen. Durch die Verwendung der Fc γ RII/FcR γ -defizienten Maus stand eine geeignete Negativkontrolle für Färbungen mit dem 2.4G2 zur Verfügung. Immunhistochemische Analysen an verschiedenen Organen dieser Mäuse deuten ferner darauf hin, daß keine weiteren homologen Isoformen der bereits bekannten Fc γ RII und Fc γ RIII Klassen existieren, die sich mit dem 2.4G2 nachweisen ließen (nicht gezeigt). Der Fc γ RII läßt sich mit dem Ly-17.2-mAk auf Zytopräparaten mit dem *EnVision*-System spezifisch nachweisen (Abb. 9): die Fc γ RII-defiziente Zelllinie 80/1 läßt sich mit dem 2.4G2, aber nicht mit dem anti-Ly-17.2 anfärben. J774-Zellen und Peritoneal-Makrophagen aus C57Bl/6-Mäusen sind hier erwartungsgemäß positiv in der anti-Ly-17.2-Färbung. Zur Detektion des Fc γ RI steht bislang kein monoklonaler Antikörper zur Verfügung. Es ist jedoch bekannt, daß monomeres IgG2a präferenziell vom Fc γ RI gebunden wird (Ravetch, J.V. und Kinet, J.P., 1991), so daß der Nachweis mit einem Kontrollantikörper dieser Subklasse möglich wäre. Der in Abb. 20B erfolgte Nachweis des Fc γ RI mit einem IgG2a-Antikörper ist aufgrund

fehlender Kontrollen als nicht gesichert anzusehen. Diese Färbungen korrelieren aber mit der in Abb. 20A gezeigten RT-PCR-Analyse. Als mögliche Negativkontrolle hätten sich Mastzellen angeboten, die neben dem Fc ϵ RI ausschließlich die niedrigaffinen Fc γ -Rezeptoren exprimieren. Auf die kontaminationsfreie Isolation von Mastzellen aus dem Knochenmark wurde jedoch in dieser Arbeit verzichtet.

In dieser Arbeit ist es erstmalig gelungen, den Fc γ RII spezifisch in Wildtypmäusen immunhistochemisch zu detektieren. Während die Fc γ RII-spezifischen anti-Ly-17-Antikörper zwar für die Detektion in der FACS-Analyse (Schiller, C. et al., 2000) und in der Immunzytochemie (Abb. 9) geeignet sind, können diese Antikörper in der Immunhistochemie nicht mit Nachweisverfahren verwendet werden, die durch Sekundärantikörper den Primärantikörper detektieren, da es sich bei den anti-Ly-17-Antikörpern um Mausantikörper handelt. Diese Sekundärantikörper, wie sie z.B. im APAAP-, PAP- oder *EnVision*-System verwendet werden, würden endogene Immunglobuline ebenso detektieren und damit zu einer starken Hintergrundfärbung führen. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Ly-17.2 biotinyliert und mit Streptavidin-gekoppelter Peroxidase sekundär inkubiert. Die Schwierigkeit bei dem Biotin-Streptavidin Detektionsverfahren besteht aber in der Existenz endogenen Biotins vor allem in Leber und Niere, so daß hier eine Biotin-Blockierung nötig war. Mit den unter 3.2.5 beschriebenen Blockierungs- und Färbeschritten konnten zudem Doppelfärbungen mit dem APAAP-System und einem Primärantikörper aus der Ratte erfolgreich durchgeführt werden.

Die Expression von Fc γ RII/RIII in der murinen Leber ist altersabhängig und erreicht das Maximum bei 5 Monaten (Ahmed, S.S. et al., 1995). Um ein exakteres Bild bei jüngeren Mäusen zu erhalten, wurden 8, 10 und 12 Wochen alte Mäuse hinsichtlich der 2.4G2-Färbung in der Leber untersucht (Abb. 10). Erst nach 12 Wochen ist die maximale Expressionsrate der niedrigaffinen Fc γ R auf ca. 50% der Leberzellen erreicht, die sich auf Sinusoidale Endothel- und Kupferzellen erstreckt. Dabei scheinen Fc γ RII und Fc γ RIII in ähnlicher Weise altersabhängig exprimiert zu werden, wie Färbungen mit dem 2.4G2 an Leberschnitten von Fc γ RII- und Fc γ RIII-defizienten Mäusen demonstrierten (nicht gezeigt). Ferner tritt die 2.4G2-Färbung zunächst auf Kupferzellen auf und weitet sich später auf Sinusoidale Endothelzellen aus. Dabei ist die rein morphologische Unterscheidung dieser beiden Zellpopulationen schwierig.

Durch die zusätzliche Darstellung von phagozytierten Erythrozyten in Kupfferzellen mittels Diaminobenzidin in jungen Mäusen kann die anfängliche Expression von Fc γ RII/RIII jedoch den zur Phagozytose fähigen Kupfferzellen zugeordnet werden. Sinusoidale Endothelzellen können zwar endozytieren, sind aber nicht in der Lage zu phagozytieren (van der Laan-Klamer, S.M. et al., 1985).

4.2 Die Rolle des Fc γ RII bei der Autoimmunen Hämolytischen Anämie (AIHA)

In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, warum der Fc γ RII zwar in verschiedenen Entzündungsreaktionen wie z.B. der Glomerulonephritis, der Arthus Reaktion sowie der PCA eine inhibitorische Funktion übernimmt (Takai, T. et al., 1996; Suzuki, Y. et al., 1998; Ujike, A. et al., 1999), aber bei der AIHA scheinbar keine regulatorische Rolle spielt. Peritoneal-Makrophagen aus Fc γ RII-defizienten Mäusen zeigen eine erhöhte Phagozytoserate im Vergleich zu Wildtypmäusen (Schiller, C. et al., 2000), Mastzellen aus Fc γ RII^{-/-}-Mäusen reagieren mit einer erhöhten Degranulation auf die IgG- und IgE-vermittelte Aktivierung (Takai, T. et al., 1996). Andererseits scheinen Kupfferzellen der Leber, die durch die Erythrophagozytose maßgeblich an der AIHA beteiligt sind, keine gesteigerte Phagozytosefähigkeit durch die Deletion eines inhibitorischen Fc γ RII aufzuweisen. Dies konnte in dieser Arbeit durch immunhistochemische Analysen bestätigt werden (Abb. 12). Kupfferzellen unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht von anderen Makrophagen. So sind z.B. murine Kupfferzellen nicht in der Lage, Sauerstoffradikale zu produzieren (Lepay, D.A. et al., 1985) und stellen, nachdem sie aus Knochenmarkzellen zu Kupfferzellen differenziert sind, ihre Mac-1-Expression ein (Takezawa, R. et al., 1995). Innerhalb der Population von Kupfferzellen können verschiedene Subpopulationen charakterisiert werden, die sich z.B. in der Fähigkeit unterscheiden, TNF α und Stickoxyde zu produzieren (ten Hagen, T.L. et al., 1996). Des Weiteren sind sie durch *colony stimulating Factors* (CSFs) stimulierbar, was unter anderem in einer induzierten Mac-1-Expression resultiert (Hashimoto, S. et al., 1996). Unterschiede in der Fc γ -Rezeptor-Expression zwischen Kupfferzellen und anderen Makrophagenpopulationen wie den Peritoneal-Makrophagen oder eine differenzielle Regulation der Fc γ -Rezeptor-Expression wären daher eine

naheliegende Begründung für die fehlende inhibitorische Funktion des Fc γ RII bei der AIHA.

Zunächst wurde daher in dieser Arbeit die Fc γ -Rezeptor-Expression in der murinen Leber immunhistochemisch untersucht (Abb. 11). Durch die Verwendung von Fc γ RII- und Fc γ RIII-defizienten Mäusen konnten unter Einsatz des mAk 2.4G2 (anti Fc γ RII/RIII) die beiden niedrigaffinen Fc γ R, wie auch schon unter 3.3.2 gezeigt, isoliert betrachtet werden. Da in Fc γ RIII^{-/-}-Mäusen eine deutliche Färbung mit dem 2.4G2 zu erkennen ist, muß man davon ausgehen, daß der verbleibende Fc γ RII in der murinen Leber exprimiert wird. Im Gegensatz zum Expressionsmuster der Niere, in der im naiven Tier keine Fc γ RIII-Expression detektierbar ist (Abb. 19), wird dieser Rezeptor in der Leber exprimiert. Des weiteren kann anhand der Verteilung und Anzahl 2.4G2-positiver Hepatozyten geschlossen werden, daß Fc γ RII und Fc γ RIII auf Kupfferzellen und Sinusoidalen Endothelzellen (SECs) koexprimiert werden. Die Population der Kupfferzellen stellen etwa 10% der Hepatozyten dar, hier sind aber sowohl in Fc γ RII^{-/-}- als auch in Fc γ RIII^{-/-}-Mäusen ca. 50% der Zellen 2.4G2-positiv. Diese Differenz wird am wahrscheinlichsten durch Sinusoidale Endothelzellen repräsentiert, da diese Zellpopulation in der Leber als ebenfalls 2.4G2-positiv beschrieben wurde. (Ahmed, S.S. et al., 1995).

Auch eine gegensätzliche Regulation der Fc γ RII/Fc γ RIII-Expression, wie sie für Mesangialzellen in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist in der murinen Leber nicht deutlich erkennbar. In Fc γ RII-defizienten Mäusen wurde für die Fragestellung einer möglichen Fc γ RIII-Expressionsregulation eine experimentelle AIHA mit dem 105-2H (IgG1) induziert. Wie bereits zuvor gezeigt (Schiller, C. et al., 2000), läßt sich kein signifikanter Unterschied im Hämatokritwert am Tag zwei nach Anämieinduktion beobachten (Abb. 12B). Auch die Erythrophagozytose in der Leber ist bei Fc γ RII-defizienten Mäusen nicht erhöht (Abb. 12C), so daß diese Werte mit den beobachteten Hämatokritwerten korrelieren. Während in anämischen Mäusen die 2.4G2-Färbung etwas intensiver erscheint als in nicht behandelten Tieren, bleibt jedoch die Anzahl Fc γ RIII-positiver Zellen in etwa gleich (von 53,9% auf 54,3%, Abb. 13). Eine mögliche Inhibition der Fc γ RII-Expression wurde anhand von Fc γ RIII^{-/-}-Mäusen analysiert, die zur Anämieinduktion mit dem mAk 34-3C (IgG2a) behandelt

wurden (Abb. 14). Auch hier läßt sich keine deutliche Abnahme des Anteils 2.4G2-positiver Zellen registrieren (von 55,2% auf 53,1%), man kann jedoch eine geringfügige Intensitätsabnahme der Färbung beobachten. Dieses Ergebnis konnte durch die spezifische Fc γ RII-Färbung mit dem anti-Ly-17.2 in Wildtypmäusen bestätigt werden (Abb. 15). Die Rezeptordichte des Fc γ RII nimmt hier etwas deutlicher ab, als in Abb. 14 zu beobachten ist. Es läßt sich zwar eine Reduktion der 2.4G2-Färbung nach Anämieinduktion beobachten, allerdings ist die anti-Ly-17.2-Färbung in unbehandelten Tieren stärker als die 2.4G2-Färbung. Erst während der Anämie wird die Ly-17-2-Färbung etwas schwächer als die 2.4G2-Färbung. Durch die Doppelfärbung mit einem anti-MHC Klasse II Antikörper lassen sich hier zusätzlich die Kupfferzellen darstellen, die nach Anämieinduktion keine komplette Expressionsreduktion des Fc γ RII aufweisen. Hier mußte die Doppelfärbung mit dem anti-MHC Klasse II-Antikörper durchgeführt werden, da alle für die Detektion der Kupfferzellen zur Verfügung stehenden Antikörper mit dem 2.4G2- oder Ly-17.2-Epitop überlappen. Insgesamt ist in allen durchgeführten immunhistochemischen Analysen nach Induktion einer AIHA eine leichte Expressionsinduktion des Fc γ RIII und eine Expressionsreduktion des Fc γ RII zu beobachten. Der Anteil der Fc γ RIII oder Fc γ RII exprimierenden Zellen bleibt jedoch annähernd gleich und die Rezeptordichte scheint keinen Einfluß auf die Phagozytoseleistung der Kupfferzellen zu haben. Auch bei einer Rezeptordichte, die unterhalb der APAAP-Nachweisgrenze liegt, findet immer noch eine Phagozytose durch die Kupfferzellen statt, die in etwa der von Kupfferzellen mit einer höheren Rezeptordichte entspricht (Abb. 16).

Sowohl in Kupfferzellen als auch in Peritoneal-Makrophagen wird ausschließlich die Fc γ RIIb2-Isoform exprimiert (Abb. 17). Die beobachteten Unterschiede zwischen diesen beiden Makrophagenpopulationen sind also nicht darauf zurückzuführen, daß Peritoneal-Makrophagen zusätzlich die Fc γ RIIb1-Isoform exprimieren, die eine nachweislich inhibitorische Funktion übernimmt. Ob der Fc γ RIIb2 tatsächlich inhibitorisch wirkt, ist derzeit noch umstritten. Einerseits führten Transfektionsuntersuchungen sowohl mit der b1- als auch mit der b2-Isoform in der Fc γ RII-defizienten B-Zelllinie IIA1.6 zu einer Regulation der B-Zellaktivierung (Amigorena, S. et al., 1992). Die strukturellen Unterschiede der beiden Isoformen sprechen allerdings eher für die Annahme, daß es sich bei der b2-Isoform um einen inerten Rezeptor handelt. Der Fc γ RIIb2 verbleibt nicht wie der Fc γ RIIb1 an der

Zelloberfläche, sondern wird nach Kreuzvernetzung endozytiert. Bindungsstudien mit Peptiden der cytoplasmatischen Bereiche zeigten, daß b1-spezifische Sequenzen an Bestandteile der Zellmembran binden können (Phosphatidylserin, Phosphatidylcholin und PIP2), während die b2-spezifischen Sequenzen keine Bindung zeigen (Chen, L. et al., 1999). Der initiale Schritt der inhibitorischen Funktion des Fc γ RII liegt darin, die Inositolphosphatase SHIP an die Zellmembran zu rekrutieren. SHIP inhibiert dort die für den Kalzium-Influx nötige Btk. Dies würde implizieren, daß eine Assoziation mit der Zellmembran für die regulatorische Funktion des Fc γ RII essentiell ist und der Fc γ RIIb2 nach erfolgter Endozytose diese Funktion nicht mehr übernehmen kann. Mastzellen, die an der Entwicklung der PCA maßgeblich beteiligt sind, exprimieren neben der b2- auch die b1-Isoform. Hier konnte sowohl für die Mastzelle *in vitro* als auch für die PCA *in vivo* die inhibitorische Funktion des Fc γ RII nachgewiesen werden. Das gleiche gilt für die B-Zelle, die ausschließlich die b1/b1'-Isoformen exprimiert. Auch hier konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die regulatorische Rolle des Fc γ RII bestätigt werden (Takai, T. et al., 1996). Es bleibt daher zu klären, warum in Peritoneal-Makrophagen trotz ausschließlicher Expression der b2-Isoform eine Inhibition durch den Fc γ RII beobachtet werden kann. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre einerseits die vorhandene Expression der Fc γ RIIb1-Isoform in Peritoneal-Makrophagen, die unterhalb der Nachweisgrenze der RT-PCR liegt und trotz der geringen Expressionsdichte funktionell wirksam ist. Andererseits wäre der Unterschied zwischen Kupfferzellen und Peritoneal-Makrophagen auch mit einer divergenten Ausstattung der signaltransduzierenden Moleküle oder mit der extrem hohen Phagozytosekapazität von Kupfferzellen zu erklären. Schließlich wäre es aber auch denkbar, daß der Fc γ RII den Schwellenwert der Aktivierung einer Zelle reguliert, wie es auch für CD22 gezeigt wurde. Dieser Schwellenwert könnte bei beiden Zellpopulationen durch weitere, bislang unbekannte Mechanismen unterschiedlich beeinflusst werden.

4.3 Glomerulonephritis

Die autoimmune Glomerulonephritis ist durch Immunkomplexablagerungen in den Nierenglomeruli gekennzeichnet. Über die Immunkomplexe könnten verschiedene Entzündungskaskaden aktiviert werden, wie etwa das Komplementsystem oder die

zelluläre Ausschüttung von proinflammatorischen Mediatoren über die Bindung von IgG an Effektorzellen durch ihre Fc γ -Rezeptoren. Bislang wurde das Komplementsystem präferentiell für die Entzündungsreaktionen verantwortlich gemacht, da in verschiedenen Modellen die Komplementdepletion zu einer Abschwächung der Zerstörung glomerulärer Strukturen führte (Couser, W.G., 1985). Durch die Generierung verschiedener Fc γ -Rezeptor-defizienter Mausmodelle wurde jedoch die Signifikanz des Komplementsystems für die Glomerulonephritis, aber auch für andere Entzündungsmodelle, wie etwa die Arthus-Reaktion oder die Autoimmune hämolytische Anämie, relativiert (Sylvestre, D.L. und Ravetch, J.V., 1994; Takai, T. et al., 1994; Hazenbos, W.L. et al., 1996; Clynes, R. et al., 1998; Meyer, D. et al., 1998; Park, S.Y. et al., 1998). Trotz der Präsenz von Komplementfaktoren in den Glomeruli ist in FcR γ -defizienten Mäusen die spontane, in NZB/W F1-Mäusen entstehende, oder anti-GBM-induzierte Glomerulonephritis nicht zu beobachten.

4.3.1 Immunkomplexablagerungen und Fc γ -Rezeptor-Expression in der murinen Niere

Immunkomplexablagerungen können entlang der Basalmembran und im Mesenterium beobachtet werden (Abb. 18A). Diese Ablagerungen können aber auch in Fc γ RII^{-/-}- und Fc γ RIII^{-/-}-Mäusen beobachtet werden, hier sogar in einem höheren Maße als in WT-Mäusen (Abb. 18B). Fc γ RII^{-/-}-Mäuse weisen einen erhöhten Serumspiegel an Immunglobulinen auf, der die beobachtete verstärkte Ablagerung von Immunkomplexen erklären könnte (Takai, T. et al., 1996). Als Grund hierfür kann die fehlende regulatorische Wirkung des Fc γ RIIb1 auf die Antikörperproduktion von B-Zellen angenommen werden, da der Fc γ RIIb1 inhibierend auf die aktivierende Signaltransduktion über den BCR wirkt (Amigorena, S. et al., 1992). Die erhöhte Immunkomplexablagerung in Fc γ RIII-defizienten Mäusen korreliert ebenfalls mit einer beobachteten erhöhten Serumkonzentration an IgG (Dr. D. Meyer, mündliche Mitteilung), welche mit einer veränderten IgG-Homöostase in diesen Mäusen erklärt werden könnte. Da in Fc γ RIII^{-/-}- und Fc γ RII^{-/-}-Mäusen keine erhöhte Suszeptibilität für eine spontane Glomerulonephritis oder auch andere Autoimmunreaktionen beobachtet wird, scheint das Ausmaß von Immunkomplexablagerungen oder der

Serumspiegel von IgG nicht in einem direkten Zusammenhang mit der Induktion einer Glomerulonephritis zu stehen. Vermutlich führt erst die Aktivierung der Effektorzellen über ihre Fc γ -Rezeptoren zur Initialisierung einer Entzündung. Diese Ergebnisse und die in Abb. 18A gezeigte Lokalisation von Immunkomplexen sprechen eher für eine unspezifische Bindung von Immunkomplexen im Glomerulum, die über elektrostatische Wechselwirkungen mit der Basalmembran zustande kommen könnte. Zudem zeigte die Immunfluoreszenzmikroskopie mit Cy-3 markiertem anti-Maus-Ig von Fc γ RII/FcR γ -doppelt-defizienten Mäusen ebenfalls eine höhere IC-Ablagerung als Wildtypiere (nicht gezeigt).

Immunhistochemische Analysen an Kryostatschnitten von Nieren verschiedener Mäuse zeigen, daß lediglich der Fc γ RII im Glomerulum exprimiert wird (Abb. 19A). Hier wurden Mäuse verwendet, die mindestens 12 Wochen alt waren, da zumindest in der Leber erst zu diesem Zeitpunkt eine für die APAAP-Färbung ausreichende Expression von Fc-Rezeptoren wird (s. 3.1.6). Die Färbungen erfolgten mit dem Ratten-Antikörper 2.4G2, der beide niedrigaffinen Fc-Rezeptoren erkennt, an Schnitten von WT-Mäusen, Fc γ RII^{-/-}, Fc γ RIII^{-/-} und Fc γ RII^{-/-}/FcR γ ^{-/-}-Mäusen. Die beiden niedrigaffinen Fc γ R konnten so diskriminiert werden und mit der doppelt-defizienten Maus stand eine geeignete Negativkontrolle zur Verfügung. Eine Färbung ist lediglich in WT-Mäusen und Fc γ RIII-defizienten Mäusen zu beobachten, was auf eine konstitutive Expression des Fc γ RII schließen läßt. Der Fc γ RIII wird nicht exprimiert, da in den Schnitten der Fc γ RII^{-/-}-Mäuse keine Färbung zu beobachten ist. Durch die intraperitoneale Injektion von 500 ng LPS ist jedoch der Fc γ RIII in Fc γ RII-defizienten Mäusen induzierbar (Abb. 19B). Um welche Zellpopulation es sich bei den Fc γ -Rezeptor-exprimierenden Zellen im Glomerulum handelt ist nur schwer zu beurteilen, da es sich sowohl um residente Mesangialzellen als auch um eingewanderte Makrophagen handeln könnte, die sich morphologisch nicht klar unterscheiden lassen. Ruhende Mesangialzellen sind zwar MHC Klasse II-negativ (Radeke, H.H. und Resch, K., 1992), exprimieren diese Moleküle aber nach ihrer Aktivierung, so daß aus der Färbung mit einem anti-I-A^b-Antikörper (M5/115.15.2) kein Rückschluß auf die Identität der Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zellpopulation getroffen werden kann. In jüngsten Untersuchungen konnte jedoch gezeigt werden, daß Fc γ -Rezeptor exprimierende, eingewanderte Makrophagen essentiell an der Entwicklung einer Glomerulonephritis beteiligt sind. Während bestrahlte NZB/W F1-

Mäuse nach Knochenmarktransplantation aus Wildtyp-Spendertieren eine spontane Glomerulonephritis entwickeln, sind Mäuse, die Knochenmark aus $FcR\gamma^{-/-}$ -Mäusen erhalten haben, komplett geschützt (J. V. Ravetch, unveröffentlichte Daten).

4.3.2 $Fc\gamma$ -Rezeptor-Expression in Primärkulturen muriner Mesangialzellen

Anhand von Primärkulturen muriner Mesangialzellen sollte geklärt werden, welche Rolle sie bei der Glomerulonephritis spielen. Durch ihre immunkompetenten Eigenschaften (vergl. 1.4.2) könnten sie potentiell an der Glomerulonephritis beteiligt sein und über die Expression von $Fc\gamma$ -Rezeptoren als Effektorzellen nach Aktivierung durch Immunkomplexe und Ausschüttung von Entzündungsmediatoren die Einwanderung von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen bewirken. Da sie diese Eigenschaften erst nach ihrer Aktivierung erlangen und die induzierte $Fc\gamma$ -Rezeptor Expression für humane Mesangialzellen gezeigt werden konnte (Radeke, H.H. et al., 1994; Uciechowski, P. et al., 1998), wurde zunächst die $Fc\gamma$ -Rezeptor-Expression nach Stimulation durch verschiedene Zytokine mittels RT-PCR analysiert. Insgesamt war die Expressionsdichte der einzelnen $Fc\gamma R$ -mRNAs zu gering, um sie mit Hilfe des Northernblots nachweisen zu können. Unter den verschiedenen getesteten Zytokinen und Mediatoren erwiesen sich vor allem $IFN\gamma$ und LPS, aber auch $IL1\beta$ und $TNF\alpha$ als kompetente Stimuli für die Induktion der $Fc\gamma RI\alpha$ - und $Fc\gamma RIII\alpha$ -mRNA. Die Induktion der $Fc\gamma RIII\alpha$ -Kette durch $IL1\beta/TNF\alpha$ führt wie erwartet nicht zu einer induzierten Protein-Expression des $Fc\gamma RIII$ -Komplexes (Abb. 20B), da die essentielle $FcR\gamma$ -Kette nicht induziert wird. Die deutlichste Stimulation der $FcR\gamma$ -Kette, die für die Expression des $Fc\gamma RIII$ und zumindest für die aktivatorische Funktion des $Fc\gamma RI$ essentiell ist, kann durch die kombinierte Gabe von $IFN\gamma$ und LPS beobachtet werden. Diese Mediatoren können daher zu einer effektiven Protein-Expression der aktivatorischen $Fc\gamma$ -Rezeptoren ($Fc\gamma RI$ und $Fc\gamma RIII$) führen und wurden für die weiteren Experimente eingesetzt. Der $Fc\gamma RII$ wird hierzu gegensätzlich reguliert. Sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene ist eine Reduktion des Rezeptors zu beobachten (Abb. 20). Mit dem murinen anti-Ly-17.2-mAk ($Fc\gamma RII$) ist in den unstimulierten Mesangialzellen eine intensivere Färbung zu beobachten, als mit dem 2.4G2 ($Fc\gamma RII/Fc\gamma RIII$). Dies liegt vermutlich daran, daß das zur Detektion verwendete *EnVision*-System den Maus-mAk besser bindet als den Ratten-mAk.

Die separate Stimulation mit LPS induziert alle Fc γ -Rezeptor-Untereinheiten. Dies läßt sich sowohl mit Hilfe der RT-PCR (Abb. 22), als auch durch die Immunzytochemie (Abb. 21) zeigen. Des weiteren läßt sich der LPS-Effekt *in vivo* anhand von immunhistochemischen Analysen zeigen (3.3.2, Abb. 19B). Die alleinige Gabe von IFN γ ist für die Inhibition des Fc γ RII verantwortlich. Dieser Effekt überlagert die durch LPS vermittelte Induktion des Fc γ RII. Dies kann dadurch gezeigt werden, daß es bei einer kombinierten Gabe ebenfalls zu einer Reduktion der Fc γ RII-mRNA kommt (Abb. 22). LPS zeigte in einigen Analysen einen synergistischen Effekt auf die durch IFN γ vermittelte Induktion von Fc γ RI α , Fc γ RIII α und die FcR γ -Kette. Des weiteren konnte eine Dosisabhängigkeit der Fc γ RIII α -Expression bezüglich der IFN γ -Stimulation beobachtet werden (Abb. 23). Die modulatorische Wirkung von IFN γ auf die hier beobachtete expressionsinduzierende Wirkung von LPS deutet ferner darauf hin, daß beide Mediatoren unterschiedliche Signaltransduktionswege aktivieren müssen, die in einer unterschiedlichen Rekrutierung verschiedener Transkriptionsfaktoren resultieren.

IFN γ und LPS induzieren in Makrophagen eine Reihe von Genen, darunter auch MHC Klasse II-Moleküle und verschiedene sekretorische Proteine (Adams, D.O. und Hamilton, T.A., 1984). Nach der Bindung von IFN γ an seinen Rezeptor werden verschiedene Tyrosinkinase aktiviert, die den zytoplasmatischen Transkriptionsfaktor STAT1 phosphorylieren. Dadurch wird STAT1 aktiviert und gelangt in den Nucleus, wo er als aktivierender Transkriptionsfaktor an eine *IFN γ -activated consensus sequenz* (GAS) im Promoter verschiedener Gene binden kann (Schindler, C., 1995). Eine ähnliche Region, die *IFN γ response region* (GRR), ist z.B. auch im Promoterbereich des humanen Fc γ RI charakterisiert worden (Pearse, R.N. et al., 1991; Pearse, R.N. et al., 1993). LPS und IFN γ können aber auch die Expression DNA bindender Proteine wie IRF-1 und IRF-2 (*IFN γ responsive factor*) induzieren (Hayes, M.P. und Zoon, K.C., 1993; Barber, S.A. et al., 1995). Während IRF-1 in erster Linie ein aktivierender Transkriptionsfaktor ist (Pine, R. et al., 1990) wirkt IRF-2 generell als inhibierender Transkriptionsfaktor (Nelson, N. et al., 1993), was einen möglichen Mechanismus für die durch IFN γ -vermittelte Inhibition der Fc γ RII-Expression darstellen könnte. Die Mechanismen, die zur LPS-vermittelten

Expressionsinduktion verschiedener Gene führen, sind weitaus unklarer und teilweise widersprüchlich (Gao, J. et al., 1997; Yamaoka, K. et al., 1998).

Verschiedene Passagen und Präparationen muriner Mesangialzellen weisen ein variables Expressionsmuster der einzelnen Fc γ -Rezeptor-Untereinheiten auf. Je nach Kulturdauer konnten Unterschiede in der allgemeinen Expressionsdichte der Fc γ -Rezeptoren beobachtet werden. Insgesamt nimmt die Transkriptionsrate der Fc γ -Rezeptor-mRNAs mit zunehmender Passagenhöhe ab. In einer hier nicht gezeigten RT-PCR-Analyse und einem *RNase Protection Assay* von Mesangialzellen der 18. Passage sind keine Transkripte mehr nachweisbar. Diese Zellen zeigten jedoch eine extrem hohe Wachstumsgeschwindigkeit, was die Inhibition der Transkription von Genen, die nicht an der Zellteilung beteiligt sind, erklären könnte.

Die Fc γ RIIb1-Isoform ist in der 10. Passage der Präparation vom September '97 schwach exprimiert (Abb. 22), in der 10. Passage der Präparation vom Februar '98 ist eine deutliche Bande zu erkennen (Abb. 23), aber in der 8. Passage der Präparation vom September '97 fehlt sie wiederum vollständig (Abb. 20).

Während die basale Fc γ -Rezeptor-Expression variiert, kann in allen in dieser Arbeit durchgeführten RT-PCR-Analysen übereinstimmend eine Reduktion des inhibitorischen Fc γ RII durch die Inkubation mit IFN γ beobachtet werden. Die aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren und ihre assoziierte γ -Kette werden im allgemeinen diesbezüglich gegensätzlich zur Fc γ RII-Expression reguliert. Insbesondere aber der *in vivo* beobachtete Induktionseffekt von LPS auf die Fc γ RIII-Expression, als auch die konstitutive Expression des Fc γ RII (3.3.2, Abb. 19), läßt sich anhand der *in vitro*-Analysen von kultivierten Mesangialzellen bestätigen, was die Bedeutung der Fc γ -Rezeptor-Expression auf Mesangialzellen für die Glomerulonephritis unterstützt.

Die in ausgereiften Makrophagen zelltypspezifisch exprimierte b2-Isoform des Fc γ RII ist in allen Passagen und Präparationen muriner Mesangialzellen basal vorhanden, während die b1-Isoform sehr viel schwächer, bzw. nicht detektierbar ist. Besonders stark ist sie jedoch in der Mesangialzellpräparation vom Februar 1998 exprimiert. Eine mögliche Begründung hierfür wäre der Altersunterschied der verwendeten Mäuse, da bei nicht vollständig ausdifferenzierten Makrophagen, wie z.B. der

Zelllinien J774 und RAW 264,7, neben der b2-Isoform auch die b1-Isoform exprimiert wird (Latour, S. et al., 1996). Auch in der Vorläufer B-Zell-ähnlichen Zelllinie SPGM1, die durch die Inkubation mit IL-3 zu Makrophagen differenzieren kann (Martin, M. et al., 1993), kann eine Koexpression der beiden Isoformen b1 und b2 beobachtet werden (Abb. 4B). Tatsächlich handelte es sich bei den Mesangialzellen, die eine deutliche Fc γ RIIb1-mRNA exprimierten, um eine Präparation aus jüngeren Mäusen (4 – 6 Wochen). Dies würde aber voraussetzen, daß die Zellen der Primärkultur in ihrem Differenzierungs- oder Entwicklungsstadium arretiert wären. Schließlich wäre auch das artifizielle System der Zellkultur eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Expressionsmuster der b1-Isoform, wie es auch für die anderen Fc γ -Rezeptor-Isoformen beobachtet werden kann.

4.3.3 Chemokin-Expression in Primärkulturen muriner Mesangialzellen

Aktivierte Mesangialzellen sind in der Lage verschiedene Chemokine zu sezernieren und könnten hierdurch die Einwanderung und Aktivierung von Monozyten, Granulozyten und T-Zellen in das Glomerulum initiieren. In dieser Arbeit wurde daher die Chemokin-Expression von Primärkulturen muriner Mesangialzellen nach Aktivierung durch verschiedene Mediatoren untersucht. Da die kombinierte Stimulation mit IFN γ /LPS zur deutlichsten Expressionsinduktion der beiden aktivatorischen Fc γ Rs (Fc γ RI und Fc γ RIII) auf Mesangialzellen führte, wurden diese Mediatoren für funktionelle Analysen eingesetzt. Eine weitere Stimulation der Zellen erfolgte mit hitzeaggregiertem IgG, um die Fc γ -Rezeptorabhängigkeit zu untersuchen. Hierzu wurden Mesangialzellen aus Wildtypmäusen (C57Bl/6) und FcR γ -Kette-defizienten Mäusen, die auf einen C57Bl/6-Hintergrund zurückgekreuzt wurden (Takai, T. et al., 1994), verglichen. Wie bereits bekannt, wird die Expression von RANTES, IP-10 und MCP-1 in Mesangialzellen durch IFN γ und/oder LPS induziert (Gomez-Chiarri, M. et al., 1993; Satriano, J.A. et al., 1993; Wolf, G. et al., 1993). Dies läßt sich auch im *RNase Protection Assay* reproduzieren (Abb. 25). Für MCP-1 ist eine weitere Expressionssteigerung durch die Stimulation mit IgG-Komplexen beschrieben worden (Hora, K. et al., 1992; Satriano, J.A. et al., 1993), die sich in dieser Arbeit nicht reproduzieren ließ. Dies läßt sich jedoch mit den unterschiedlichen Kultur- und Stimulationsbedingungen erklären. Während in der

Arbeit von Hora et al. nicht-proliferierende Mesangialzellen für die Stimulation verwendet, die IgG-Aggregate für eine vierstündige Inkubation eingesetzt und Mesangialzellen der 3. – 6. Passage analysiert wurden, sind die Mesangialzellen in dieser Arbeit unter proliferierenden Bedingungen (+ 10% FCS), in späteren Passagen und nach 12-stündiger Inkubation mit IgG-Aggregaten untersucht worden. Die Vorstimulation der MCs durch die Gegenwart von FCS im Kulturmedium führt nicht zu einer im *RNase Protection Assay* nachweisbaren MCP-1-mRNA-Expression, diese ist aber in der weit sensitiveren RT-PCR-Analyse detektierbar (nicht gezeigt). Die durch IFN γ /LPS induzierte Expression von RANTES, ein CC-Chemokin, das vorrangig chemotaktisch auf Monozyten/Makrophagen wirkt, läßt sich durch die Stimulation mit hitzeaggregiertem IgG in Mesangialzellen von WT-Mäusen, nicht aber in MCs von FcR γ ^{-/-}-Mäusen induzieren. Ein umgekehrtes Bild ergibt die Analyse von IP-10, das nicht nur eine höhere Expression in mit IFN γ /LPS stimulierten FcR γ ^{-/-}-Mäusen als in WT-Mäusen aufweist, sondern sich auch nur in den FcR γ ^{-/-}-Mäusen durch IgG-Aggregate weiter induzieren läßt. Um die induzierte Expression weiterer Chemokine zu untersuchen, die entweder in dem *template*-Set für die Analyse im RPA nicht vorhanden sind oder unterhalb der Nachweisgrenze des RPAs liegen, wurden RT-PCR-Analysen mit spezifischen Primern für KC und MCP-5 durchgeführt (Abb. 26). Für beide Chemokine ist eine deutliche Fc γ -Rezeptor-abhängige Expressionsinduktion durch die Inkubation mit IgG-Aggregaten zu verzeichnen, die für MCP-5 nur nach Vorstimulation mit IFN γ /LPS, für KC aber auch ohne Vorstimulation zu beobachten ist. Während KC chemotaktisch auf Neutrophile wirkt und MCP-5, RANTES sowie MCP-1 auf Monozyten, rekrutiert IP-10 vorrangig Monozyten, aber auch NK-Zellen und T-Zellen. Die Beobachtung, daß KC Fc-Rezeptor-abhängig, IP-10 aber Fc-Rezeptor-unabhängig exprimiert wird, könnte einen Zusammenhang mit der Tatsache darstellen, daß Neutrophile zuerst am Entzündungsort einwandern und T-Zellen erst in einer späteren Phase zu finden sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß durch eine über Fc γ -Rezeptoren vermittelte Aktivierung von Mesangialzellen der Maus die Chemokine RANTES, KC und MCP-5 sezerniert werden. Damit würden die Mesangialzellen eine zentrale Rolle bei der Initiierung einer Glomerulonephritis spielen, indem sie an der Einwanderung von Leukozyten in das Glomerulum beteiligt sein könnten.

4.4 Gezielte Mutagenese Embryonaler Stammzellen zur Herstellung von Fc γ RIIb1-defizienten Mäusen

In der vorhandenen Fc γ RII *knock out*-Maus sind alle alternativ gespleißten, membranständigen Isoformen des Rezeptors (Fc γ RIIb1, Fc γ RIIb1' und Fc γ RIIb2) deletiert (Takai, T. et al., 1996), so daß sich die *in vivo*-Funktion dieser Rezeptorklasse bei verschiedenen Entzündungsreaktionen aufklären ließ (vergl. 1.3). Die *in vivo*-Funktion der einzelnen Fc γ RII-Isoformen läßt sich in diesem System jedoch nur ungenügend klären. Eine eindeutige inhibitorische Funktion wurde für den Fc γ RIIb1/b1' auf B-Zellen nachgewiesen, wo er als einzige Fc-Rezeptor-Isoform exprimiert wird (Takai, T. et al., 1996). Unklar ist jedoch, wie schon unter 4.2 diskutiert, die Rolle des Fc γ RIIb2 auf Kupferzellen und Peritoneal-Makrophagen. Verschiedene *in vitro*-Studien zeigten für Fc γ RIIb1/b1' und Fc γ RIIb2 eine inhibitorische Funktion und bei diesen Transfektionsexperimenten wurde dem Fc γ RIIb2 zusätzlich eine Rolle bei der Endozytose zugeschrieben, die letztlich in der Präsentation von Antigen resultierte. Fc γ RII-defiziente B-Zellen, die mit der Fc γ RIIb2-Isoform transfiziert wurden, waren in der Lage Antigen-spezifische T-Zellklone zur IL-2 Sekretion zu aktivieren (Amigorena, S. et al., 1992). Weiterführende Studien zeigten, daß hierbei nur ein Teil der Epitope, die nach Internalisation durch den Fc γ RIII präsentiert wurden, auch über die Endozytose über den Fc γ RIIb2 präsentiert werden konnten (Amigorena, S. et al., 1998). Durch den in dieser Arbeit gezielt mutierten ES-Zellklon ist es nunmehr möglich, eine *knock out*-Maus zu generieren, der spezifisch die Fc γ RIIb1/b1'-Isoformen fehlen und nur noch die Fc γ RIIb2-Isoform exprimiert. Darüber hinaus wäre es denkbar, daß die B-Zellen dieser Mäuse durch die genomische Deletion des C1-Exons anstatt der Fc γ RIIb1/b1'-Isoformen die Fc γ RIIb2-Isoform exprimieren, wenn der Spleißvorgang in der B-Zelle vom TM- zum C2-Exon nicht aus unbekanntem Gründen inhibiert ist. Hier wäre zu untersuchen ob, wie *in vitro* beobachtet, über diesen Fc γ -Rezeptor IgG-gebundenes Antigen unspezifisch internalisiert und präsentiert wird. Hierdurch wäre eine unkontrollierte B-Zellaktivierung, die nicht wie im Normalfall über die spezifische Antigenerkennung durch den BCR stattfindet, denkbar. Des weiteren könnten die in Transfektionsstudien beobachteten Unterschiede zwischen Fc γ RIII und Fc γ RII vermittelter Endozytose und Antigenpräsentation an B-Zellen der Fc γ RIIb1/b1'-defizienten Mäuse unter physiologischen Bedingungen weiter analysiert werden. Um

die unter 4.2 diskutierte Rolle des Fc γ RIIb2 auf Kupfferzellen und Peritoneal-Makrophagen zu klären, könnte man Fc γ RII-defiziente Mäuse mit Fc γ RIIb1/b1'-defizienten Mäusen vergleichen, um Unterschiede zwischen diesen beiden Zellpopulationen zu analysieren. Die Möglichkeit, daß die Fc γ RIIb1-Isoform unterhalb der Nachweisgrenze der RT-PCR in Peritoneal-Makrophagen exprimiert wird, aber trotz der geringen Rezeptordichte seine inhibitorische Funktion ausüben kann, könnte hier untersucht werden. Schließlich könnte die Bedeutung der Fc γ RIIb1-Expression in unreifen Makrophagen aufgeklärt werden. Die Fc γ RIIb1/b1'-*knock out*-Maus würde somit zu einem weiteren Verständnis der *in vivo*-Funktionen einzelner Fc γ -Rezeptor-Isoformen beitragen.

5 Literatur

Adams, D.O. und T.A. Hamilton (1984). The cell biology of macrophage activation. *Annu Rev Immunol* **2**: 283-318.

Agarwal, A.; P. Salem und K.C. Robbins (1993). Involvement of p72syk, a protein-tyrosine kinase, in Fc gamma receptor signaling. *J Biol Chem* **268**(21): 15900-15905.

Ahmed, S.S.; H. Muro; M. Nishimura; I. Kosugi; Y. Tsutsi und H. Shirasawa (1995). Fc receptors in liver sinusoidal endothelial cells in NZB/W F1 lupus mice: a histological analysis using soluble immunoglobulin G-immune complexes and a monoclonal antibody (2.4G2). *Hepatology* **22**(1): 316-324.

Allen, J.M. und B. Seed (1989). Isolation and expression of functional high-affinity Fc receptor complementary DNAs. *Science* **243**(4889): 378-381.

Amigorena, S.; C. Bonnerot; J.R. Drake; D. Choquet; W. Hunziker; J.G. Guillet; P. Webster; C. Sautes; I. Mellman et al. (1992). Cytoplasmic domain heterogeneity and functions of IgG Fc receptors in B lymphocytes. *Science* **256**(5065): 1808-1812.

Amigorena, S.; D. Lankar; V. Briken; L. Gapin; M. Viguier und C. Bonnerot (1998). Type II and III receptors for immunoglobulin G (IgG) control the presentation of different T cell epitopes from single IgG-complexed antigens. *J Exp Med* **187**(4): 505-515.

Barber, S.A.; M.J. Fultz; C.A. Salkowski und S.N. Vogel (1995). Differential expression of interferon regulatory factor 1 (IRF-1), IRF-2, and interferon consensus sequence binding protein genes in lipopolysaccharide (LPS)-responsive and LPS-hyporesponsive macrophages. *Infect Immun* **63**(2): 601-608.

Baumann, U.; J. Köhl; T. Tschernig; K. Schwerter-Strumpf; J.S. Verbeek; R.E. Schmidt und E. Gessner (2000). A codominant Role of Fc γ RI/III and C5aR in the Reverse Arthus Reaction. *J. Immunol.* **164**: 1065-1070.

Bazan, J.F.; K.B. Bacon; G. Hardiman; W. Wang; K. Soo; D. Rossi; D.R. Greaves; A. Zlotnik und T.J. Schall (1997). A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* **385**(6617): 640-644.

Benhamou, M.; N.J. Ryba; H. Kihara; H. Nishikata und R.P. Siraganian (1993). Protein-tyrosine kinase p72syk in high affinity IgE receptor signaling. Identification as a component of pp72 and association with the receptor gamma chain after receptor aggregation. *J Biol Chem* **268**(31): 23318-23324.

Bolland, S.; R.N. Pearse; T. Kurosaki und J.V. Ravetch (1998). SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* **8**(4): 509-516.

Bonnerot, C.; S. Amigorena; D. Choquet; R. Pavlovich; V. Choukroun und W.H. Fridman (1992). Role of associated gamma-chain in tyrosine kinase activation via murine Fc gamma RIII. *EMBO J* **11**(7): 2747-2757.

Bozic, C.R.; L.F.J. Kolakowski; N.P. Gerard; C. Garcia-Rodriguez; C. von Uexkull-Guldenband; M.J. Conklyn; R. Breslow; H.J. Showell und C. Gerard (1995). Expression and biologic characterization of the murine chemokine KC. *J Immunol* **154**(11): 6048-6057.

Brooks, D.G.; W.Q. Qiu; A.D. Luster und J.V. Ravetch (1989). Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med* **170**(4): 1369-1385.

Burd, P.R.; H.W. Rogers; J.R. Gordon; C.A. Martin; S. Jayaraman; S.D. Wilson; A.M. Dvorak; S.J. Galli und M.E. Dorf (1989). Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med* **170**(1): 245-257.

Cambier, J.C. (1995). Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J. Immunol.* **155**: 3281-3285.

Cambier, J.C.; C.M. Pleiman und M.R. Clark (1994). Signal transduction by the B cell antigen receptor and its coreceptors. *Annu Rev Immunol* **12**: 457-486.

Capecchi, M.R. (1989). Altering the genome by homologous recombination. *Science* **244**(4910): 1288-1292.

Chen, L.; G.J. Pielak und N.L. Thompson (1999). The cytoplasmic region of mouse Fc gamma RIIb1, but not Fc gamma RIIb2, binds phospholipid membranes. *Biochemistry* **38**(7): 2102-2109.

Clynes, R.; C. Dumitru und J.V. Ravetch (1998). Uncoupling of immune complex formation and kidney damage in autoimmune glomerulonephritis. *Science* **279**(5353): 1052-1054.

Clynes, R.; J.S. Maizes; R. Guinamard; M. Ono; T. Takai und J.V. Ravetch (1999). Modulation of immune complex-induced inflammation in vivo by the coordinate expression of activation and inhibitory Fc receptors. *J Exp Med* **189**(1): 179-185.

Clynes, R. und J.V. Ravetch (1995). Cytotoxic antibodies trigger inflammation through Fc receptors. *Immunity* **3**(1): 21-26.

Couser, W.G. (1985). Mechanisms of glomerular injury in immune-complex disease. *Kidney Int.* **28**: 569-583.

Daeron, M.; S. Latour; O. Malbec; E. Espinosa; P. Pina; S. Pasmans und W.H. Fridman (1995). The same tyrosine-based inhibition motif, in the intracytoplasmic domain of Fc gamma RIIb, regulates negatively BCR-, TCR-, and FcR-dependent cell activation. *Immunity* **3**(5): 635-646.

Daëron, M.; O. Malbec; S. Latour; M. Arock und W.H. Fridman (1995). Regulation of high-affinity IgE receptor-mediated mast cell activation by murine low-affinity IgG receptors. *J Clin Invest* **95**(2): 577-585.

Damen, J.E.; L. Liu; P. Rosten; R.K. Humphries; A.B. Jefferson; P.W. Majerus und G. Krystal (1996). The 145-kDa protein induced to associate with Shc by multiple cytokines is an inositol tetrakisphosphate and phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate 5-phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(4): 1689-1693.

Dombrowicz, D.; V. Flamand; I. Miyajima; J.V. Ravetch; S.J. Galli und J.P. Kinet (1997). Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* **99**(5): 915-925.

Doody, G.M.; L.B. Justement; C.C. Delibrias; R.J. Matthews; J. Lin; M.L. Thomas und D.T. Fearon (1995). A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* **269**: 242-244.

Ernst, L.K.; J.G. van de Winkel; I.M. Chiu und C.L. Anderson (1992). Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* **267**(22): 15692-15700.

Fanger, N.A.; K. Wardwell; L. Shen; T.F. Tedder und P.M. Guyre (1996). Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* **157**(2): 541-548.

Fossati-Jimack, L.; A. Ioan-Facsinay; L. Reininger; Y. Chicheportiche; N. Watanabe; T. Saito; F.M.A. Hofhuis; J.E. Gessner; C. Schiller et al. (2000). Markedly different Pathogenicity of four IgG isotype-switch variants of an anti-erythrocyte autoantibody is based on their capacity to interact in vivo with the low-affinity Fc γ RIII. *J.Exp.Med.*, *in press*.

Fry, A.M.; L.L. Lanier und A. Weiss (1996). Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C. *J Exp Med* **184**(1): 295-300.

Gao, J.; D.C. Morrison; T.J. Parmely; S.W. Russell und W.J. Murphy (1997). An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *J Biol Chem* **272**(2): 1226-1230.

Gessner, J.E.; H. Heiken; A. Tamm und R.E. Schmidt (1998). The IgG Fc receptor family. *Ann Hematol* **76**(6): 231-248.

Gessner, J.E.; H.H. Radeke; P. Uciechowski; K. Resch und R.E. Schmidt (1995). [Activation-dependent expression of Fc gamma-receptors on glomerular mesangial cells]. *Immun Infekt* **23**(2): 67-69.

Gomez-Chiarri, M.; T.A. Hamilton; J. Egido und S.N. Emancipator (1993). Expression of IP-10, a lipopolysaccharide- and interferon-gamma-inducible protein, in murine mesangial cells in culture. *Am. J. Pathol.* **142**(2): 433-439.

Grandaliano, G.; A.J. Valente; M.M. Rozek und H.E. Abboud (1994). Gamma interferon stimulates monocyte chemotactic protein (MCP-1) in human mesangial cells. *J Lab Clin Med* **123**(2): 282-289.

Gu, H.; Y.R. Zou und K. Rajewsky (1993). Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting. *Cell* **73**(6): 1155-1164.

Gupta, N.; A.M. Scharenberg; D.N. Burshtyn; N. Wagtmann; M.N. Lioubin; L.R. Rohrschneider; J.P. Kinet und E.O. Long (1997). Negative signaling pathways of the killer cell inhibitory receptor and Fc gamma RIIb1 require distinct phosphatases. *J Exp Med* **186**(3): 473-478.

Hartnell, A.; A.B. Kay und A.J. Wardlaw (1992). IFN-gamma induces expression of Fc gamma RIII (CD16) on human eosinophils. *J Immunol* **148**(5): 1471-1478.

Hashimoto, S.; M. Yamada; N. Yanai; T. Kawashima und K. Motoyoshi (1996). Phenotypic change and proliferation of murine Kupffer cells by colony-stimulating factors. *J Interferon Cytokine Res* **16**(3): 237-243.

Hayes, M.P. und K.C. Zoon (1993). Priming of human monocytes for enhanced lipopolysaccharide responses: expression of alpha interferon, interferon regulatory factors, and tumor necrosis factor. *Infect Immun* **61**(8): 3222-3227.

Hazenbos, W.L.; J.E. Gessner; F.M. Hofhuis; H. Kuipers; D. Meyer; I.A. Heijnen; R.E. Schmidt; M. Sandor; P.J. Capel et al. (1996). Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* **5**(2): 181-188.

Hazenbos, W.L.; I.A. Heijnen; D. Meyer; F.M. Hofhuis; C.R. Renardel de Lavalette; R.E. Schmidt; P.J. Capel; J.G. van de Winkel; J.E. Gessner et al. (1998). Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *J Immunol* **161**(6): 3026-3032.

Hogarth, P.M.; E. Witort; M.D. Hulett; C. Bonnerot; J. Even; W.H. Fridman und I.F. McKenzie (1991). Structure of the mouse beta Fc gamma receptor II gene. *J Immunol* **146**(1): 369-376.

Holmes, K.L.; R.G.E. Palfree; U. Hammerling und H.C. Morse (1985). Alleles of the Ly-17 alloantigen define polymorphisms of the murine IgG Fc receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 7706-7710.

Hora, K.; J.A. Satriano; A. Santiago; T. Mori; E.R. Stanley; Z. Shan und D. Schlondorff (1992). Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and colony-stimulating factor 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1745-1749.

Hulett, M.D. und P.M. Hogarth (1994). Molecular basis of Fc receptor function. *Adv Immunol* **57**: 1-127.

Hulett, M.D.; N. Osman; I.F.C. McKenzie und P.M. Hogarth (1991). Chimeric Fc receptors identify functional domains of the murine high-affinity receptor for IgG. *J. Immunol.* **147**: 1863-1868.

Ikuta, K.; M. Takami; C.W. Kim; T. Honjo; T. Miyoshi; Y. Tagaya; T. Kawabe und J. Yodoi (1987). Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(3): 819-823.

Janssen-Graalfs, I.R. (1995). Klonierung muriner Fc gamma Rezeptoren. *Diplomarbeit, Universität Hannover.*

Kawahara, R.S. und T.F. Deuel (1989). Platelet-derived growth factor-inducible gene JE is a member of a family of small inducible genes related to platelet factor 4. *J Biol Chem* **264**(2): 679-682.

Kawakami, Y.; J. Kitaura; D. Hata; L. Yao und T. Kawakami (1999). Functions of Bruton's tyrosine kinase in mast and B cells. *J. Leukoc. Biol.* **65**(3): 286-290.

Kelner, G.S.; J. Kennedy; K.B. Bacon; S. Kleyensteuber; D.A. Largaespada; N.A. Jenkins; N.G. Copeland; J.F. Bazan; K.W. Moore et al. (1994). Lymphotoxin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* **266**(5189): 1395-1399.

Kerr, M.A.; R.L. Mazengera und W.W. Stewart (1990). Structure and function of immunoglobulin A receptors on phagocytic cells. *Biochem Soc Trans* **18**(2): 215-217.

Kerst, J.M.; J.G. van de Winkel; A.H. Evans; M. de Haas; I.C. Slaper-Cortenbach; T.P. de Wit; A.E. von dem Borne; C.E. van der Schoot und R.H. van Oers (1993).

Granulocyte colony-stimulating factor induces hFc gamma RI (CD64 antigen)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood* **81**(6): 1457-1464.

Kiener, P.A.; B.M. Rankin; A.L. Burkhardt; G.L. Schieven; L.K. Gilliland; R.B. Rowley; J.B. Bolen und J.A. Ledbetter (1993). Cross-linking of Fc gamma receptor I (Fc gamma RI) and receptor II (Fc gamma RII) on monocytic cells activates a signal transduction pathway common to both Fc receptors that involves the stimulation of p72 Syk protein tyrosine kinase. *J Biol Chem* **268**(32): 24442-24448.

Kurosaki, T.; M. Takata; Y. Yamanashi; T. Inazu; T. Taniguchi; T. Yamamoto und H. Yamamura (1994). Syk activation by the Src-family tyrosine kinase in the B cell receptor signaling. *J. Exp. Med.* **179**: 1725-1729.

Lanier, L.L.; G. Yu und J.H. Phillips (1989). Co-association of CD3 zeta with a receptor (CD16) for IgG Fc on human natural killer cells. *Nature* **342**(6251): 803-805.

Latour, S.; W.H. Fridman und M. Daëron (1996). Identification, molecular cloning, biologic properties, and tissue distribution of a novel isoform of murine low-affinity IgG receptor homologous to human Fc gamma RIIB1. *J Immunol* **157**(1): 189-197.

Lepay, D.A.; C.F. Nathan; R.M. Steinman; H.W. Murray und Z.A. Cohn (1985). Murine Kupffer cells. Mononuclear phagocytes deficient in the generation of reactive oxygen intermediates. *J Exp Med* **161**(5): 1079-1096.

Lin, S.; C. Cicala; A.M. Scharenberg und J.P. Kinet (1996). The Fc(epsilon)RIbeta subunit functions as an amplifier of Fc(epsilon)RIgamma-mediated cell activation signals. *Cell* **85**(7): 985-995.

Loescher, F. (1999). Entwicklung eines *RNase Protection Assays* zur Untersuchung der Fcγ Rezeptorexpression auf murinen Mesangialzellen. *Diplomarbeit, Universität Hannover*.

Mansour, S.L.; K.R. Thomas und M.R. Capecchi (1988). Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes. *Nature* **336**(6197): 348-352.

Martin, M.; A. Strasser; N. Baumgarth; F.M. Cicuttini; K. Welch; E. Salvaris und A.W. Boyd (1993). A novel cellular model (SPGM 1) of switching between the pre-B cell and myelomonocytic lineages. *J Immunol* **150**(10): 4395-4406.

Mené, P.; M.S. Simonson und M.J. Dunn (1989). Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* **69**(4): 1347-1424.

Meyer, D.; C. Schiller; J. Westermann; S. Izui; W. Hazenbos; J.S. Verbeek; R.E. Schmidt und J.E. Gessner (1998). Fc γ RIII (CD16) deficient mice show IgG isotype-dependent protection to experimental autoimmune hemolytic anemia. *Blood* **92**(11): 3997-4002.

Miettinen, H.M.; J.K. Rose und I. Mellman (1989). Fc receptor isoforms exhibit distinct abilities for coated pit localization as a result of cytoplasmic domain heterogeneity. *Cell* **58**(2): 317-327.

Miyajima, I.; D. Dombrowicz; T.R. Martin; J.V. Ravetch; J.P. Kinet und S.J. Galli (1997). Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* **99**(5): 901-914.

Morton, H.C.; I.E. van den Herik-Oudijk; P. Vossebeld; A. Snijders; A.J. Verhoeven; P.J. Capel und J.G. van de Winkel (1995). Functional association between the human myeloid immunoglobulin A Fc receptor (CD89) and FcR gamma chain. Molecular basis for CD89/FcR gamma chain association. *J Biol Chem* **270**(50): 29781-29787.

Moser, B.; I. Clark-Lewis; R. Zwahlen und M. Baggiolini (1990). Neutrophil-activating properties of the melanoma growth-stimulatory activity. *J Exp Med* **171**(5): 1797-1802.

Mullis, K.B. und F.A. Faloon (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods. Enzymol.* **155**: 335-350.

Muta, T.; T. Kurosaki; Z. Misulovin; M. Sanchez; M.C. Nussenzweig und J.V. Ravetch (1994). A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* **369**(6478): 340.

Nakamura, A.; T. Yuasa; A. Ujike; M. Ono; T. Nukiwa; J.V. Ravetch und T. Takai (2000). Fc γ Receptor IIB-deficient mice develop Goodpasture's syndrome upon immunization with type IV collagen: a novel murine model for autoimmune glomerular basement membrane disease. *J. Exp. Med.* **191**(5): 899-905.

Nelson, N.; M.S. Marks; P.H. Driggers und K. Ozato (1993). Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol* **13**(1): 588-599.

Nitschke, L.; R. Carsetti; B. Ocker; G. Kohler und M.C. Lamers (1997). CD22 is a negative reulator of B-cell receptor signaling. *Curr Biol* **7**(7): 133-143.

O'Keefe, T.L.; G.T. Williams; S.L. Davies und M.S. Neuberger (1996). Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* **274**(5288): 798-801.

Ono, M.; S. Bolland; P. Tempst und J.V. Ravetch (1996). Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB. *Nature* **383**(6597): 263-266.

Ono, M.; H. Okada; S. Bolland; S. Yanagi; T. Kurosaki und J.V. Ravetch (1997). Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling. *Cell* **90**(2): 293-301.

Oppenheim, J.J.; C.O. Zachariae; N. Mukaida und K. Matsushima (1991). Properties of the novel proinflammatory supergene intercrine cytokine family. *Annu Rev Immunol* **9**: 617-648.

Oquendo, P.; J. Alberta; D.Z. Wen; J.L. Graycar; R. Derynck und C.D. Stiles (1989). The platelet-derived growth factor-inducible KC gene encodes a secretory protein related to platelet alpha-granule proteins. *J Biol Chem* **264**(7): 4133-4137.

Pani, G.; M. Kozlowski; J.C. Cambier; G.B. Mills und K.A. Siminovitch (1995). Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling [see comments]. *J Exp Med* **181**(6): 2077-2084.

Park, S.Y.; S. Ueda; H. Ohno; Y. Hamano; M. Tanaka; T. Shiratori; T. Yamazaki; H. Arase; N. Arase et al. (1998). Resistance of Fc receptor- deficient mice to fatal glomerulonephritis. *J Clin Invest* **102**(6): 1229-1238.

Parker, C.W. (1987). Fc epsilon receptors. *Methods Enzymol* **150**: 512-524.

Pearse, R.N.; R. Feinman und J.V. Ravetch (1991). Characterization of the promoter of the human gene encoding the high-affinity IgG receptor: transcriptional induction by gamma-interferon is mediated through common DNA response elements. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(24): 11305-11309.

Pearse, R.N.; R. Feinman; K. Shuai; J.r. Darnell JE und J.V. Ravetch (1993). Interferon gamma-induced transcription of the high-affinity Fc receptor for IgG requires assembly of a complex that includes the 91-kDa subunit of transcription factor ISGF3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(9): 4314-4318.

Pine, R.; T. Decker; D.S. Kessler; D.E. Levy und J.E.J. Darnell (1990). Purification and cloning of interferon-stimulated gene factor 2 (ISGF2): ISGF2 (IRF-1) can bind to the promoters of both beta interferon- and interferon-stimulated genes but is not a primary transcriptional activator of either. *Mol Cell Biol* **10**(6): 2448-2457.

Porges, A.J.; P.B. Redecha; R. Doebele; L.C. Pan; J.E. Salmon und R.P. Kimberly (1992). Novel Fc gamma receptor I family gene products in human mononuclear cells. *J Clin Invest* **90**(5): 2102-2109.

Qiu, W.Q.; D. de Bruin; B.H. Brownstein; R. Pearse und J.V. Ravetch (1990). Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination. *Science* **248**(4956): 732-735.

Quilliam, A.L.; N. Osman; I.F. McKenzie und P.M. Hogarth (1993). Biochemical characterization of murine Fc gamma RI. *Immunology* **78**(3): 358-363.

Ra, C.; M.H. Jouvin und J.P. Kinet (1989). Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (Fc epsilon RI) and surface expression of chimeric receptors (rat-mouse-human) on transfected cells. *J Biol Chem* **264**(26): 15323-15327.

Radeke, H.H.; J.E. Gessner; P. Uciechowski; H.J. Mägert; R.E. Schmidt und K. Resch (1994). Intrinsic human glomerular mesangial cells can express receptors for

IgG complexes (hFc gamma RIII-A) and the associated Fc epsilon RI gamma-chain. *J Immunol* **153**(3): 1281-1292.

Radeke, H.H. und K. Resch (1992). The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *Clin. Investig.* **70**: 825-842.

Rappaport, E.F.; D.L. Cassel; D.O. Walterhouse; S.E. McKenzie; S. Surrey; M.A. Keller; A.D. Schreiber und E. Schwartz (1993). A soluble form of the human Fc receptor Fc gamma RIIA: cloning, transcript analysis and detection. *Exp Hematol* **21**(5): 689-696.

Ravetch, J.V. (1994). Fc receptors: rubor redux. *Cell* **78**(4): 553-560.

Ravetch, J.V. (1997). Fc receptors. *Curr Opin Immunol* **9**(1): 121-125.

Ravetch, J.V. und J.P. Kinet (1991). Fc receptors. *Annu Rev Immunol* **9**: 457-492.

Ravetch, J.V.; A.D. Luster; R. Weinshank; J. Kochan; A. Pavlovec; D.A. Portnoy; J. Hulmes; Y.C. Pan und J.C. Unkeless (1986). Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science* **234**(4777): 718-725.

Ravetch, J.V. und B. Perussia (1989). Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* **170**(2): 481-497.

Reth, M. (1989). Antigen receptor tail clue [letter]. *Nature* **338**(6214): 383-384.

Sarafi, M.N.; E.A. Garcia-Zepeda; J.A. MacLean; I.F. Charo und A.D. Luster (1997). Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a structural and functional homologue of human MCP-1. *J Exp Med* **185**(1): 99-109.

Satriano, J.A.; K. Hora; Z. Shan; E.R. Stanley; T. Mori und D. Schlondorff (1993). Regulation of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor-1 by IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells. *J Immunol* **150**(5): 1971-1978.

Schiller, C.; I. Janssen-Graalfs; U. Baumann; K. Schwerter-Strumpf; S. Izui; T. Takai; R.E. Schmidt und J.E. Gessner (2000). Mouse Fc gamma RII is a negative regulator

of Fc gamma RIII in IgG immune complex triggered inflammation but not in autoantibody induced hemolysis. *Eur. J. Immunol.* **30**(2): 481-490.

Schindler, C. (1995). Cytokine signal transduction. *Receptor* **5**(1): 51-62.

Schwarz, M.; H.H. Radeke; K. Resch und P. Uciechowski (1997). Lymphocyte-derived cytokines induce sequential expression of monocyte- and T cell-specific chemokines in human mesangial cells. *Kidney Int* **52**(6): 1521-1531.

Sears, D.W.; N. Osman; B. Tate; I.F. McKenzie und P.M. Hogarth (1990). Molecular cloning and expression of the mouse high affinity Fc receptor for IgG. *J Immunol* **144**(1): 371-378.

Shibata, T.; T. Berney; L. Reininger; Y. Chicheportiche; S. Ozaki; T. Shirai und S. Izui (1990). Monoclonal anti-erythrocyte autoantibodies derived from NZB mice cause autoimmune hemolytic anemia by two distinct pathogenic mechanisms. *Int Immunol* **2**(12): 1133-1141.

Simister, N.E. und K.E. Mostov (1989). An Fc receptor structurally related to MHC class I antigens. *Nature* **337**(6203): 184-187.

Suzuki, Y.; I. Shirato; K. Okumura; J.V. Ravetch; T. Takai; Y. Tomino und C. Ra (1998). Distinct contribution of Fc receptors and angiotensin II-dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int* **54**(4): 1166-1174.

Sylvestre, D.L. und J.V. Ravetch (1994). Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* **265**(5175): 1095-1098.

Takai, T.; M. Li; D. Sylvestre; R. Clynes und J.V. Ravetch (1994). FcR gamma chain deletion results in pleiotrophic effector cell defects. *Cell* **76**(3): 519-529.

Takai, T.; M. Ono; M. Hikida; H. Ohmori und J.V. Ravetch (1996). Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* **379**(6563): 346-349.

Takata, M.; H. Sabe; A. Hata; T. Inazu; Y. Homma; T. Nukada; H. Yamamura und T. Kurosaki (1994). Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca²⁺ mobilization through distinct pathways. *EMBO J* **13**(6): 1341-1349.

Takezawa, R.; Y. Watanabe und T. Akaike (1995). Direct evidence of macrophage differentiation from bone marrow cells in the liver: a possible origin of Kupffer cells. *J Biochem (Tokyo)* **118**(6): 1175-1183.

Taub, D.D.; A.R. Lloyd; K. Conlon; J.M. Wang; J.R. Ortaldo; A. Harada; K. Matsushima; D.J. Kelvin und J.J. Oppenheim (1993). Recombinant human interferon-inducible protein 10 is a chemoattractant for human monocytes and T lymphocytes and promotes T cell adhesion to endothelial cells. *J Exp Med* **177**(6): 1809-1814.

Taub, D.D.; T.J. Sayers; C.R. Carter und J.R. Ortaldo (1995). Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity. *J Immunol* **155**(8): 3877-3888.

te Riele, H.; E.R. Maandag und A. Berns (1992). Highly efficient gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination with isogenic DNA constructs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(11): 5128-5132.

te Velde, A.A.; R. de Waal Malefijt; R.J. Huijbens; J.E. de Vries und C.G. Figdor (1992). IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol* **149**(12): 4048-4052.

te Velde, A.A.; R.J. Huijbens; J.E. de Vries und C.G. Figdor (1990). IL-4 decreases Fc gamma R membrane expression and Fc gamma R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J Immunol* **144**(8): 3046-3051.

Tekamp-Olson, P.; C. Gallegos; D. Bauer; J. McClain; B. Sherry; M. Fabre; S. van Deventer und A. Cerami (1990). Cloning and characterization of cDNAs for murine macrophage inflammatory protein 2 and its human homologues. *J Exp Med* **172**(3): 911-919.

ten Hagen, T.L.; W. van Vianen und I.A. Bakker-Woudenberg (1996). Isolation and characterization of murine Kupffer cells and splenic macrophages. *J Immunol Methods* **193**(1): 81-91.

Thomas, K.R. und M.R. Capecchi (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* **51**(3): 503-512.

- Thomas, R. und P.E. Lipsky (1994). Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol* **153**(9): 4016-4028.
- Thompson, S.; A.R. Clarke; A.M. Pow; M.L. Hooper und D.W. Melton (1989). Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* **56**(2): 313-321.
- Uciechowski, P.; M. Schwarz; J.E. Gessner; R.E. Schmidt; K. Resch und H.H. Radeke (1998). IFN-gamma induces the high-affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur J Immunol* **28**(9): 2928-2935.
- Uciechowski, P.; T. Werfel; R. Leo; J.E. Gessner; J. Schubert und R.E. Schmidt (1992). Analysis of CD16⁺dim and CD16⁺bright lymphocytes--comparison of peripheral and clonal non-MHC-restricted T cells and NK cells. *Immunobiology* **185**(1): 28-40.
- Ujike, A.; Y. Ishikawa; M. Ono; T. Yuasa; T. Yoshino; M. Fukumoto; J.V. Ravetch und T. Takai (1999). Modulation of immunoglobulin (Ig)E-mediated systemic anaphylaxis by low-affinity Fc receptors for IgG. *J Exp Med* **189**(10): 1573-1579.
- Unkeless, J.C. (1979). Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* **150**(3): 580-596.
- Unkeless, J.C.; E. Scigliano und V.H. Freedman (1988). Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* **6**: 251-281.
- van de Winkel, J.G. und P.J. Capel (1993). Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* **14**(5): 215-221.
- Van Den Herik-Oudijk, I.E.; N.A. Westerdal; N.V. Henriquez; P.J. Capel und J.G. Van De Winkel (1994). Functional analysis of human Fc gamma RII (CD32) isoforms expressed in B lymphocytes. *J Immunol* **152**(2): 574-585.
- van Vugt, M.J.; A.F. Heijnen; P.J. Capel; S.Y. Park; C. Ra; T. Saito; J.S. Verbeek und J.G. van de Winkel (1996). FcR gamma-chain is essential for both surface expression and function of human Fc gamma RI (CD64) in vivo. *Blood* **87**(9): 3593-3599.

Wang, D.; A. Villasante; S.A. Lewis und N.J. Cowan (1986). The mammalian beta-tubulin repertoire: hematopoietic expression of a novel, heterologous beta-tubulin isotype. *J. Cell Biol.* **103**(5): 1903-1910.

Weiss, A. und D.R. Littman (1994). Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell* **76**(2): 263-274.

Werfel, T.; P. Uciechowski; P.A. Tetteroo; R. Kurrle; H. Deicher und R.E. Schmidt (1989). Activation of cloned human natural killer cells via Fc gamma RIII. *J Immunol* **142**(4): 1102-1106.

Wolf, G.; S. Aberle; F. Thaiss; P.G. Nelson; A.M. Krensky; E.G. Neilson und R.A. Stahl (1993). TNF alpha induces expression of the chemoattractant cytokine RANTES in cultured mouse mesangial cells. *Kidney Int.* **44**(4): 795-804.

Yamaoka, K.; T. Otsuka; H. Niuro; Y. Arinobu; Y. Niho; N. Hamasaki und K. Izuhara (1998). Activation of STAT5 by lipopolysaccharide through granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production in human monocytes. *J Immunol* **160**(2): 838-845.

6 Abkürzungsverzeichnis

ADCC	antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität
AIHA	Autoimmune Hämolytische Anämie
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
AMP	Ampicillin
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	B-Zellrezeptor
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bp	Basenpaare
Btk	Bruton's Tyrosinkinase
C	zytoplasmatische Domäne
cDNA	<i>copy DNA</i>
CFU	<i>colony forming units</i>
Ci	Curie
CIP	<i>calf intestine phosphatase</i>
DAB	Diaminobenzidin
cpm	Zerfälle pro Minute
ddH ₂ O	doppelt destilliert
ddNTP	Didesoxynucleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	Diacylglycerin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EC	extrazelluläre Domäne
EK	Erlenmeyerkolben
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
Fc	<i>fragment cristallizable</i>
Fc γ R	Fc γ -Rezeptor
FcR γ	Fc-Rezeptor γ -Kette
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm
G-CSF	<i>granulocyte stimulation factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage stimulation factor</i>
GN	Glomerulonephritis
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
h	Stunde(n)
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	<i>interferonγinducable protein</i>
ip	intraperitoneal
IP3	Inositoltrisphosphat
ips	Zerfälle pro Sekunde
IPTG	Isopropylthiogalactosid
ITAM	<i>immunoreceptor tyrosin-based activatory motif</i>

ITIM	<i>immunoreceptor tyrosin-based inhibitory motif</i>
ITP	Idiotypische Thrombozytopenie
k	kilo
KIR	<i>killer cell inhibitory receptor</i>
KO	<i>knock out</i>
L	Liter
lpr	<i>lupus prone</i>
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MC	Mesangialzellen
MCP	<i>monocyte chemoattractant protein</i>
MCS	<i>multi cloning site</i>
M-CSF	<i>macophage stimulation factor</i>
MEF	murine embryonale Fibroblasten
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute(n)
MIP	<i>monocyte inflammatory protein</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n	nano
NOD	<i>non obese diabetic</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
NZB/W	<i>new zealand black/white</i>
OD	Optische Dichte
p	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCI	Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PLC	Phospholipase C
PNK	T4-Polynukleotidkinase
Pos	Position
RANTES	<i>regulated upon activation, normal T expressed and secreted</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA	<i>RNase Protection Assay</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
s	Sekunde(n)
SDS	Natrium Dodezylsulfat
SHIP	<i>SH domain containing inositol phosphatase</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TB	Transkriptionspuffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TENS	Tris-EDTA-NaOH-SDS-Puffer
TM	transmembrane Domäne

TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris (hydroxy-methyl) Methylamin
tRNA	Transfer-RNA
U	units
üN	über Nacht
UTP	Uridintriphosphat
V	Volt
W	Watt
WT	Wildtyp
Xgal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoyl- β -D-Galactosid
μ	Mikro
μ F	μ Farad

7 Lebenslauf

Name: Iska Janssen-Graalfs
Geburtsdatum: 02.12.1967
Geburtsort: Hannover
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Dipl.-Ing. Edo Janssen-Graalfs und Dr. med. Ingrid Janssen-Graalfs, geb. Simonsen

Werdegang:

1974 - 1978: Grundschule Friesenschule, Hannover
1978 - 1980: Orientierungsstufe Lüerstraße, Hannover
1980 - 1988: Gymnasium Sophienschule, Hannover
19.5.1988: Abitur
1988 - 1995: Studium der Biologie an der Technischen Universität Hannover, der Tierärztlichen Hochschule Hannover sowie der Medizinischen Hochschule Hannover
6.4. - 18.4. 1994: mündliche Diplomhauptprüfung
1.6. 1994
- 28.9. 1995: Diplomarbeit durchgeführt an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abt. Klinische Immunologie (Leiter: Prof. R.E. Schmidt). Thema: Klonierung muriner Fc γ -Rezeptoren
28.9.1995: Abschluß des Studiums der Biologie
seit 18.10.1995: Tätigkeit als wissenschaftliche Angestellte in dem vom DFG geförderten Forschungsvorhaben "FcR-Regulation" mit gleichzeitiger Anfertigung einer Dissertation mit dem Thema "Charakterisierung des murinen Fc γ RII bei Entzündung und Autoimmunität" an der Medizinischen Hochschule Hannover, Abt. Klinische Immunologie, Arbeitsgruppe Molekulare Immunologie

8 Publikationsliste

Schiller, C.; Janssen-Graalfs, I.R.; Baumann, U.; Schwerter-Strumpf, K.; Izui, S.; Takai, T.; Schmidt, R.E. und Gessner J.E. (2000): Mouse Fc γ RII is a negative regulator of Fc γ RIII in IgG immune complex-triggered inflammation but not in autoantibody-induced hemolysis. *Eur. J. Immun.*, **30**(02): 481-490

Janssen-Graalfs, I.R.; Sowa, E.; Radeke, H.H. und Gessner, J.E. (1999): Opposing effects of IFN- γ on the regulated expression of proinflammatory Fc γ RI/Fc γ RIII versus Fc γ RII on mouse glomerular mesangial cells. *Immunobiology*, **200**(3-5): 629

Sowa, E.; Gessner, J.E.; Schwarz, M.; Wahl, M.; Janssen-Graalfs, I.R.; Verbeek, J.S.; Schmidt, R.E.; Resch, K. und Radeke, H.H. (1998): Regulation and relative contribution of Fc γ receptors, CD16 and CD64, to the activation of murine glomerular mesangial cells by immune complexes. *Immunobiology*, **199**(3-5): 668

Gessner, J.E.; Fossati, L.; Janssen-Graalfs, I.R.; Sowa, E.; Verbeek, J.S.; Radeke, H.H.; Schmidt, R.E. und Izui, S. (1998): Murine autoimmune glomerulonephritis does not require Fc γ RIII (CD16) on mesangial cells for disease development. *Immunobiology*, **199**(3-5): 657

Sowa, E.; Gessner, J.E.; Schwarz, M.; Wahl, M.; Janssen-Graalfs, I.R.; Verbeek, J.S.; Schmidt, R.E.; Resch, K. und Radeke, H.H. (1998): Studies toward the function of the Fc gamma receptors, CD16, CD32 and CD64, with Fc gamma RIII deficient mouse glomerular mesangial cells. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 358 (Suppl.):120

Meyer, D.; Janssen-Graalfs, I.R.; Fossati, L.; Wilk, E.; Zielinska-Skowronek, M.; Izui, S.; Gessner, J.E. und Schmidt R.E. (1999): IgG isotype-dependent protection from autoimmune hemolytic anemia in β 2-microglobulin-deficient mice. *Immunobiology*, **200**(3-5): 633

Janssen-Graalfs, I.R.; Schmidt R.E. und J.E. Gessner. (1997): Gene targeting of Fc γ RII as a model to study the in vivo functions of the different Fc receptor isoforms *Immunobiology*, **197**(3-5): 291