

**Untersuchung der Expression verschiedener
Fc γ -Rezeptoren in glomerulären Mesangiumzellen
der Maus sowie deren Funktion *in vitro* mit Hilfe von
Fc γ RIII-Defektmutanten**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Dipl.-Biol. Eveline Sowa
geboren am 16.12.1969
in Hannover

2000

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med H.H. Radeke am Institut für Pharmakologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leitung Prof. Dr. med. Klaus Resch).

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Walter H. Müller
Korreferent: Prof. Dr. med. Klaus Resch

Tag der Promotion: 04.02.2000

Zusammenfassung

Rezeptoren für den Fc-Teil von Immunglobulin G Antikörpern (Fc γ R) stellen eine Verbindung zwischen dem humoralen und zellulären Immunsystem dar. Eine Kreuzvernetzung der Fc γ R mit IgG-Immunkomplexen führt zu einer Vielzahl von Effektorfunktionen wie der Vermittlung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), der Phagozytose und der Bildung und Freisetzung inflammatorischer Mediatoren. In der Mehrzahl sind entzündliche Erkrankungen der Niere, die Glomerulonephritiden (GN), durch Immunkomplex-Ablagerungen in den Glomeruli gekennzeichnet. In dieser Arbeit wurden Primärkulturen muriner, glomerulärer Mesangiumzellen (MMC) aus Wildtyp- und Fc γ RIII α -/- defizienten Mäusen verwendet, um die Expression und Regulation der niedrig- und hochaffinen Fc γ R detailliert zu untersuchen. In RT-PCR mit nachfolgenden Southern Blot-Analysen wird gezeigt, daß nicht-proliferierende, ruhende MMC konstitutiv nur die mRNA des niedrigaffinen Fc γ RIIb2 transkribierten, während proliferierende MMC die mRNA aller drei Fc γ R-Klassen sowie der assoziierten FcR γ -Ketten schon basal exprimierten. Das T_H1-Lymphokin Interferon- γ (IFN- γ) verursachte eine gegenläufige Regulation der mRNA-Expression in dem Sinne, daß es die inflammatorisch wirksamen Fc γ RI, Fc γ RIII und die FcR γ -Ketten deutlich induzierte und die Expression des inhibitorischen Fc γ RIIb hemmte. Für die niedrigaffinen Fc γ RIIb und Fc γ RIII konnte diese gegenläufige Regulation auch für die Oberflächenexpression gezeigt werden, die mit Zytofärbungen auf Objektträgern und FACScan-Analysen durchgeführt wurde. Alle drei Fc γ -Rezeptoren wurden in unterschiedlichem Ausmaß auch durch die monozytären Faktoren Interleukin-1 β und Tumornekrosefaktor- α , sowie durch Lipopolysaccharide allein und in Kombination induziert. Die funktionelle Aktivierbarkeit der Fc γ R wurde mit hitzeaggregierten IgG untersucht. Immunkomplexe erhöhten die in proliferierenden MMC schon basal auftretende Prostaglandin E₂ (PGE₂) Freisetzung und die mRNA-Expression der CC-Chemokine MCP-1 (Monozyten-Chemotaktisches Protein-1), RANTES („Reguliert durch Aktivierung Normaler T-Zellen Exprimiert und Sezerniert“) und des CXC-Chemokins IP-10 (Interferon-Induzierbares Protein-10). Eine Vorstimulation der MMC mit IFN- γ verstärkte die Wirkung der Immunkomplexe auf die Transkription der Chemokin-Gene noch weiter. Um die Bedeutung der Fc γ -Rezeptorregulation auf Gewebezellen einordnen zu können, wurden zum Vergleich dendritische Zellen im Hinblick auf Fc γ R-vermittelte Effekte bei der IL-12- und Chemokin-Synthese, sowie ihre Aktivierbarkeit durch MMC untersucht. Es zeigte sich, daß Produkte von stimulierten Mesangiumzellen ebenso wie IgG-Immunkomplexe dendritische Zellen zu einer verstärkten IL-12 Sekretion stimulierten. Jedoch reduzierte eine Behandlung mit IFN- γ in diesen Zellen die mRNA Mengen der Chemokine Makrophagen-Inflammatorisches Protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β und MIP-2, allerdings nicht von MCP-1. Zusammenfassend lassen diese Untersuchungen erkennen, daß die Expression von aktivierenden und hemmenden Fc γ -Rezeptoren auf glomerulären Gewebezellen ein fein abgestimmter Prozess ist. Diese Zellen zeigen einerseits unabhängig aber andererseits im Zusammenspiel mit professionellen Immunzellen eine eigene regulative Rolle bei Entzündungsprozessen.

Schlagnworte:

Fc γ -Rezeptoren
Mesangiumzellen
Glomerulonephritis
Chemokine

Abstract

Receptors for the Fc domain of Immunoglobulin G antibodies (Fc γ R) form a molecular link between the humoral and cellular branches of the immune system. Cross-linking of Fc γ R by IgG immune complexes leads to a wide variety of effector functions such as antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC), phagocytosis and the production and secretion of inflammatory mediators.

Most cases of Glomerulonephritis are characterized by immune-complex deposition. In this study primary cultures of murine glomerular mesangial cells (MMC) from wildtype- and Fc γ RIII α -/- deficient mice were used to analyse the expression and regulation of the low- and high-affinity Fc γ Rs. Using RT-PCR with subsequent southern blot experiments, it was demonstrated that non-proliferating MMC express only the mRNA of the low-affinity Fc γ RIIb constitutively, whereas proliferating MMC exhibit basal mRNA expression of all three Fc γ R subtypes, as well as the associated FcR γ -chain. It was shown that T_H1-derived IFN- γ up-regulates the expression of the inflammation-mediating Fc γ RI, Fc γ RIII, and FcR γ -chain, while the synthesis of the inhibitory Fc γ RII is suppressed by this lymphokine. This counter regulatory pattern could also be demonstrated at the level of surface protein expression of the low-affinity Fc γ RIIb and Fc γ RIII by using cell staining techniques and FACScan analysis. Functional activity of Fc γ receptors is shown in experiments with stimulating, heat-aggregated IgG. These immunoglobulin complexes enhance basal release of PGE₂ and synthesis of CC chemokine mRNA, such as MCP-1, RANTES, and IP-10 in proliferating MMC, which can be stimulated by pre-treatment with IFN- γ .

In order to compare the presented data in tissue cells with professional immune cells, Fc γ R-mediated effects on dendritic cell IL-12 and chemokine synthesis, as well as the impact of MMC on these activities was investigated. Immunoglobulin complexes and secreted products of activated mesangial cells were shown to increase dendritic cell IL-12 synthesis. However expression of the chemokines MIP-1 α , MIP-1 β , and MIP-2, but not of MCP-1, was inhibited by IFN- γ .

In conclusion, these studies revealed that expression of activating and inhibitory Fc γ receptors is delicately regulated in glomerular tissue cells, which is both pointing to their independent role albeit intimate interaction with professional immune cells and possibly helps to understand the contribution of glomerular cells to renal inflammation.

Key words:

Fc γ receptors

Mesangial cells

Glomerulonephritis

Chemokines

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	III
ABSTRACT	IV
INHALTSVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII

1 EINLEITUNG **1**

1.1 ENTZÜNDUNG UND MESANGIUMZELLEN	1
1.2 STRUKTUR UND FUNKTION VON FC-REZEPTOREN	2
1.2.1 STRUKTURELLE MERKMALE DER FC-REZEPTOREN	2
1.2.2 FC γ -REZEPTOREN	3
1.2.2.1 Fc γ RI	3
1.2.2.2 Fc γ RII	4
1.2.2.3 Fc γ RIII	5
1.2.3 KLINISCHE UND BIOLOGISCHE BEDEUTUNG VON FC-REZEPTOREN	6
1.2.4 FC γ -REZEPTOREN IN DER GLOMERULONEPHRITIS	8
1.3 ZIELE DER ARBEIT	9

2 MATERIAL **11**

2.1 VERBRAUCHSMATERIAL	11
2.2 GERÄTE	12
2.3 CHEMIKALIEN UND ENZYME	13
2.4 REKOMBINANTE ZYTOKINE, WACHSTUMSFAKTOREN UND ANDERE STIMULANTIEN	16
2.5 ANTIKÖRPER, CDNAS UND OLIGONUKLEOTID-PRIMER	17
2.6 VERWENDETE ZELLEN	21
2.7 ZELLKULTURMEDIEN	22

3 METHODEN **23**

3.1 ZELLKULTUR	23
3.1.1 MAUS-MESANGIUMZELLEN	23
3.1.1.1 Präparation von murinen Mesangiumzellen	23
3.1.1.2 Kultivierung der MMC	23
3.1.2 T-ZELLEN	25
3.1.2.1 IF-12-T _H 1-Zellen	25
3.1.2.2 Milzzellpräparation	25
3.1.3 J774A.1-ZELLEN	26
3.1.4 XS52-ZELLEN	26
3.1.5 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	26
3.1.6 STIMULATIONSBEDINGUNGEN VON MMC	27
3.1.7 ZELLZAHLBESTIMMUNG NACH TRYPANBLAUFÄRBUNG	27

3.2	PRÄPARATION UND ANALYSE VON NUKLEINSÄUREN	28
3.2.1	RNA-ISOLIERUNG	28
3.2.2	AGAROSEGELELEKTROPHORESE UND NORTHERN BLOTTING VON RNA	28
3.2.3	RADIOAKTIVE MARKIERUNG VON CDNA-FRAGMENTEN	30
3.2.4	HYBRIDISIERUNG VON NORTHERN UND SOUTHERN BLOT-MEMBRANEN MIT RADIOAKTIV-MARKIERTEN CDNA-SONDEN	31
3.2.5	RIBONUKLEASE PROTECTION ASSAY	32
3.2.5.1	Sondensynthese (<i>In vitro</i> -Transkription)	32
3.2.5.2	RNA Präparation und Hybridisierung	34
3.2.5.3	RNase Behandlung	34
3.2.5.4	Polyacrylamid-Gel	35
3.2.6	PCR	36
3.2.7	AGAROSEGELELEKTROPHORESE UND SOUTHERN BLOTTING VON DNA	41
3.2.7.1	Agarosegel	41
3.2.7.2	Southern Blotting	41
3.2.8	GELEXTRAKTION UND AUFREINIGUNG VON CDNA-FRAGMENTEN	42
3.2.9	CDNA-ANALYSE MIT RESTRIKTIONSENDONUKLEASEN	42
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE TECHNIKEN	43
3.3.1	PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	43
3.3.2	IMMUNPRÄZIPITATION	43
3.3.3	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	44
3.3.4	WESTERN BLOT	46
3.3.5	DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE ANALYSEN ZUR IMMUNFLUORESZENZ	48
3.3.6	OBJEKTRÄGERFÄRBUNGEN	49
3.3.7	UNTERSUCHUNG VON KULTURÜBERSTÄNDEN IM ELISA	50
3.3.7.1	Biotinylierung des anti-MCP-1- Antikörpers	50
3.3.7.2	Anti-mMCP-1-ELISA	51
3.3.7.3	Anti-PGE ₂ -ELISA	52
3.3.8	HITZEAGGREGATION VON IGG-ANTIKÖRPERN (HAIGG)	53
3.3.9	OUCHTERLONY TEST	53
3.3.10	IL-12-ELISPOT-ASSAY	54
3.3.11	VERSUCHSAUSWERTUNG	56
3.3.11.1	Semi-quantitative Auswertung von Autoradiografien	56
3.3.11.2	Berechnung der Standardabweichung und des Mittelwertes	56
4	ERGEBNISSE	57
4.1	BEDINGUNGEN ZUR INDUKTION DER Fcγ-REZEPTOREN IN MESANGIUMZELLEN	57
4.1.1	DIFFERENTIELLE INDUKTION VON Fc γ R-MRNA	57
4.1.1.1	Induktion von Fc γ RI α -mRNA	58
4.1.1.2	Induktion von Fc γ RII-mRNA	64
4.1.1.3	Induktion von Fc γ RIII α -mRNA	71
4.1.1.4	Induktion von Fc γ -Ketten-mRNA	75
4.1.2	DIFFERENTIELLE INDUKTION VON Fc γ R-PROTEINEN	81
4.1.2.1	Oberflächenexpression von Fc γ -Rezeptoren in Objektträgerfärbungen	81
4.1.2.2	Oberflächenexpression von Fc γ -Rezeptoren in FACScan-Analysen	85

4.2	ÜBERPRÜFUNG DER FUNKTIONALITÄT DER Fcγ-REZEPTOREN AUF MESANGIUMZELLEN	88
4.2.1	INDUKTION DER CHEMOKINEXPRESSION	89
4.2.1.1	Expression der MCP-1-mRNA	89
4.2.1.2	Expression verschiedener Chemokin-mRNA-Spezies	91
4.2.1.3	Expression des CC-Chemokins MCP-1 im Kulturüberstand	94
4.2.2	EXPRESSION VON PROSTAGLANDIN E ₂ IM KULTURÜBERSTAND	95
4.2.3	OBERFLÄCHENEXPRESSION VON MHC KLASSE II-MOLEKÜLEN AUF MMC	96
4.3	UNTERSUCHUNGEN IN DER DENDRITISCHEN ZELLINIE XS52	97
4.3.1	OBERFLÄCHENEXPRESSION VON Fc γ -REZEPTOREN	97
4.3.1.1	Oberflächenexpression von Fc γ RII und Fc γ RII/Fc γ RIII in Objektträgerfärbungen	97
4.3.1.2	Proteinexpression von Fc γ RII in Immunpräzipitation und Western-Blot	98
4.3.2	OBERFLÄCHENEXPRESSION VON MHC KLASSE II MOLEKÜLEN	99
4.3.2.1	Objektträgerfärbung	99
4.3.2.2	FACScan-Analyse	100
4.3.3	EFFEKTE VON MESANGIUMZELLEN AUF DIE IL-12-PRODUKTION	101
4.3.4	FC γ -REZEPTOR VERMITTELTE EFFEKTE	102
4.3.4.1	Synthese des proinflammatorischen Zytokins IL-12	102
4.3.4.2	Expression verschiedener Chemokin-mRNA-Spezies	102
4.3.4.3	Expression des CC-Chemokins MCP-1 im Kulturüberstand	106
5	DISKUSSION	107
5.1	BEDINGUNGEN ZUR INDUKTION VON Fcγ-REZEPTOREN IN MURINEN MESANGIUMZELLEN	108
5.2	FUNKTIONELLE AKTIVIERBARKEIT VON Fcγ-REZEPTOREN AUF MURINEN MESANGIUMZELLEN	116
5.3	UNTERSUCHUNGEN IN DER DENDRITISCHEN ZELLINIE XS52	120
6	LITERATURVERZEICHNIS	125

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (Antikörper-abhängige Zell-vermittelte Zytotoxizität)
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
A-EL-VIS	Automated ELISA-Spot Assay Video Analysis System (automatisiertes ELISPOT-Assay Video Analyse System)
Ak	Antikörper
AP	alkalische Phosphatase
APAAP	Alkalische Phosphatase-anti-Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
BALB/c	Maus-Stamm mit MHCII I-A ^d Hintergrund
BCR	B-Zell-Antigenrezeptor
bFGF	basic fibroblast growth factor
C3	Komplement-Faktor
C57/BL6	Maus-Stamm mit MHCII I-A ^b Hintergrund
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation (Gruppenbezeichnung für humane Antigene)
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie; $3,7 \times 10^{10}$ Zerfälle/Sekunde
cpm	counts per minute (Zerfälle/Minute)
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DC	dendritische Zelle
Diagr.	Diagramm
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTH	delayed type hypersensitivity (Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ)
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked-Immunsorbent Assay (Enzymgekoppelter Immunoassay)
ELISPOT	Enzyme-linked-Immunsorbent Spot-Assay (Enzymgekoppelter Immunoassay mit Spots)
EtBr	Ethidiumbromid
FACScan	Fluorescence Activated Cell Scanner

	(Fluoreszenzaktivierter Zellscanner)
FCS	fetal calf serum (hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum)
Fc γ R	Fc gamma Rezeptor
FcR	Fc-Rezeptor
FITC	Fluorescein-isothiocyanat
FITC-XL	Kreuzvernetzung mit Fluorescein-isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²) bzw. Gramm (Masse)
GAS	Gamma Interferon activated site (Gamma Interferon aktivierende Stelle)
γ -chain	gamma-chain (FcR-gamma-Kette)
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor (Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor)
GN	Glomerulonephritis
GRO β	growth-related oncogene beta (Wachstums-verwandtes Onkogen beta)
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HRP	Horseradish-Peroxidase (Peroxidase aus Meerrettich)
IC	Immunkomplex (aus Antigenen und Antikörpern bestehender Komplex)
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
IF12	Ovalbumin-spezifischer T _H 1-Zell-Klon mit MHCII I-A ^d Hintergrund
IFN- γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-1 β	Interleukin 1 beta
IL-2	Interleukin 2
IL-4	Interleukin 4
IL-10	Interleukin 10
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (Immunrezeptor-Tyrosin-Aktivatorsequenz)
ITIM	Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif (Immunrezeptor-Tyrosin-Inhibitionssequenz)
Jak	Janus-Kinase
KB	Kilobasen
KDa	Kilodalton
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
M	Mol/Liter
mAb	monoclonal Antibody (monoklonaler Antikörper)

MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1 (Monozyten chemoattraktantes Protein-1)
MIP	macrophage inflammatory protein (Entzündungsprotein der Makrophagen)
MMC	murine glomeruläre Mesangiumzellen
MOPS	3-(n-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
mU	milli-Units
MW	Molekulargewicht
MWCO	molecular weight cut off (Durchlaßgröße in Konzentratoren)
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid (Natronlauge)
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
N-terminal	Aminoterminal
NTGN	Nephrotoxische Serum Glomerulonephritis
NZB	New Zealand Black-Maus-Stamm
NZW	New Zealand White-Maus-Stamm
OD	Optische Dichte
OVA	Ovalbumin
OVA-XL-FITC	mit FITC kreuzvernetztes Ovalbumin
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
PDGF	Platelet-derived growth factor
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RANTES	Regulated upon Activation normal T cell Expressed and Secreted (Reguliert durch Aktivierung normaler T-Zellen, exprimiert und sezerniert)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
RPA	Ribonuklease Protection Assay
rpm	rotations per minute (Rotationen pro Minute)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
s.	Siehe
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate (Natriumdodecylsulfat)
SHIP	Phosphatidylinositol (3,4,5) P ₃ 5' Inositol-Phosphatase
SSC	Saline Sodium Citrat (Natriumzitat-Kochsalzlösung)

SSPE	Saline Sodium Phosphat EDTA (Natriumphosphat-EDTA-Kochsalzlösung)
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription (Signalüberträger und Aktivator der Transkription)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
taq-Pol.	DNA-Polymerase aus <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCR	T-Zell-Antigenrezeptor
TE	Tris-EDTA
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
u	Unit (Einheit)
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
WT	Wildtyp
XS52	dendritische Zelllinie aus BALB/c-Mäusen mit MHCII I-A ^d – Hintergrund

Es werden die allgemeinen SI-Einheiten und die chemischen Elementsymbole verwendet.

Für die Abkürzung von Zeitschriftentiteln (Literaturverzeichnis) werden die Abkürzungen der *National Library of Medicine in Publication-List of serials indexed for online users* (U.S. Dept. of Health and Human Services) benutzt.

Symbole für Aminosäuren:

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

1 Einleitung

1.1 Entzündung und Mesangiumzellen

Entzündliche Reaktionen des Organismus sind für eine Reihe von Prozessen verantwortlich, die dafür sorgen sollen, daß der Entzündungsreiz, ausgelöst durch verschiedenste Pathogene wie z.B. bakterielle Mikroorganismen und deren Stoffwechselprodukte, Fremdkörper oder Immunkomplexe, beseitigt oder inaktiviert und die reizbedingte Gewebsschädigung repariert wird. Doch nicht nur die in der klassischen Immunologie als „Entzündungszellen“ bekannten Leukozyten, die in das betroffene Gewebe migrieren, sind involviert. Auch lokale Gewebezellen sind in der Lage, verschiedenste inflammatorische Mediatoren zu bilden und sezernieren und durch Antigenpräsentation zu einer Aktivierung von T-Zellen zu führen [HIROSE et al., 1988; NICKOLOFF & TURKA, 1994; MATYSZAK et al., 1999].

So übernehmen glomeruläre Mesangiumzellen aus der Niere im Kontext renaler Entzündungen eine zentrale Rolle. In Zellkulturen konnte gezeigt werden, daß diese Zellen nach Aktivierung eine Reihe von Zytokinen und andere Mediatoren wie Wachstumsfaktoren, Eicosanoide und reaktive Sauerstoffradikale produzieren können, die für die Initiation und Perpetuation einer Glomerulonephritis (GN) von großer Relevanz sind [SATRIANO et al., 1993; MARTIN et al., 1987; STERZEL et al., 1993; SCHWARZ et al., 1997; RADEKE et al., 1994a]. Diese intrinsischen Mesangiumzellen bilden, umgeben von der glomerulären Kapillarschlinge und Basalmembran, im Glomerulum der Niere ein spezialisiertes Gewebe, zu dem die gelösten Bestandteile des Blutes, das das arterielle Kapillarnetzwerk durchströmt, freien Zugang haben. Dadurch werden Interaktionen mit Zytokinen und Makromolekülen wie Immunkomplexen möglich. Neben der Stützfunktion, die diese, den glatten Muskelzellen ähnlichen Mesangiumzellen im physiologischen Zustand der gesunden Niere mit der Bildung von extrazellulärer Matrix (Fibronectin, Kollagen IV usw.) übernehmen, besitzen sie die Fähigkeit zur Endozytose und zur Kontraktion, mit der die glomeruläre Filtrationsrate beeinflusst werden kann [KASHGARIAN & STERZEL, 1992; RADEKE & RESCH, 1992; STERZEL & RUPPRECHT, 1997]. Durch die Produkte des humoralen und zellulären Immunsystems können sie in einen aktivierten Zustand übergehen, wobei sie mit der Produktion autokrin und parakrin wirksamer Faktoren, sowie mit der Expression von Oberflächenmolekülen wie ICAM-1 oder MHC Klasse II, Eigenschaften professioneller Entzündungszellen annehmen können [STERZEL & RUPPRECHT, 1997; MARTIN et al., 1987; UCIECHOWSKI et al., 1998].

1.2 Struktur und Funktion von Fc-Rezeptoren

1.2.1 Strukturelle Merkmale der Fc-Rezeptoren

Fc-Rezeptoren, die den Fc-Teil von Antikörpern binden, wurden bereits für alle Immunglobulin-Klassen beschrieben, am besten untersucht sind aber die für IgE (Fc ϵ R), IgG (Fc γ R) und IgA (Fc α R). Die Gene und cDNAs für den IgM-Rezeptor (Fc μ R) und den Fc δ R für IgD sind zur Zeit noch nicht bekannt, ihre Existenz ist aber zweifellos nachgewiesen worden.

Die Einteilung der Fc -Rezeptoren in Klassen erfolgt durch ihre Liganden-Spezifität für die schwere Kette der verschiedenen Immunglobulin-Isotypen. Weiterhin berücksichtigt die Nomenklatur strukturelle Differenzen und genetischen Ursprung [RAVETCH & KINET, 1992].

Bei den Fc-Rezeptoren handelt es sich um Glykoproteine, die der Immunglobulin-Supergenfamilie angehören. Sie besitzen eine hochkonservierte ligandenbindende α -Kette, die im extrazellulären Bereich zwei bzw. drei Immunglobulin-ähnliche Domänen besitzt. Diese Domänen sind strukturell aus sieben sog. β -Strängen aufgebaut, die für die spezifische Erkennung der Antikörper-Isotypen zuständig sind. Einen ganz anderen Aufbau besitzen der niedrigaffine Fc ϵ RII, der eine lektinähnliche Struktur aufweist [CONRAD, 1990] und der neonatale Fc γ Rn, der in seiner Struktur dem MHC Klasse I Molekül ähnelt. In neugeborenen Mäusen, Ratten und beim Menschen, wo dieser Rezeptor auch auf der Plazenta zu finden ist, vermittelt er die Aufnahme maternaler IgGs aus der Milch [BURMEISTER et al., 1994; ISRAEL et al., 1997; SIMISTER & STORY, 1997].

Bei einigen der FcR, wie dem IgA-Rezeptor Fc α R, dem hochaffinen IgE-Rezeptor Fc ϵ RI und den hoch- und niedrigaffinen IgG-Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII handelt es sich um hetero-oligomere Komplexe, die neben der ligandenbindenden α -Kette noch zusätzliche Untereinheiten (γ -, ζ - und β -Ketten) benötigen, die die für die Zellaktivierung des Rezeptorkomplexes notwendigen Signaltransduktionsmotive enthalten und auch für die Oberflächenexpression essentiell sind [WIRTHMUELLER et al., 1992; KUROSAKI et al., 1991; ERNST et al., 1993; VAN VUGT et al., 1996].

Der intrazelluläre Teil dieser Ketten enthält hochkonservierte zytoplasmatische Signaltransduktionsmotive, die *Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs* (ITAM), die ebenfalls in den Ketten des T- und B-Zell-Antigenrezeptors vorkommen. Diese ITAMs bestehen aus zwei Paaren von Tyrosin-X-X-Leucin-Phosphoakzeptor-Stellen (YXXL-Sequenzen), die je nach Rezeptor von 7 bis 12 Aminosäuren unterbrochen werden. Durch die simultane Phosphorylierung durch Tyrosin-Kinasen der Src-Familie werden Syk-Kinasen aktiviert und so eine Signalkaskade in der Zelle angeregt, die mehrere Reaktionswege umfaßt. Resultierend kommt es zu einer Aktivierung verschiedener intrazellulärer Substrate. Das spezifische Substrat, das dabei aktiviert wird, hängt vom Zelltyp, der angeregten zellulären Funktion und dem stimulierten Rezeptor ab.

Die Mitglieder der Fc γ RII-Klasse dagegen sind monomere Rezeptoren, die entweder über ein aktivatorisches ITAM zur Signalübertragung verfügen wie der humane Fc γ RIIa oder ein inhibitorisches ITIM Motiv (*Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif*), das nur in den humanen und murinen Fc γ RIIb-Isoformen zu finden ist. Dieses ITIM besteht aus einer 13 Aminosäuren langen Konsensussequenz mit einem hochkonservierten I/L-X-Y-X-X-L Motiv im zytoplasmatischen Teil (C3 Exon) des Fc γ RIIb Rezeptors [MUTA et al., 1994; AMIGORENA et al., 1992]. Durch Kreuzvernetzung mit dem B-Zell-Antigenrezeptor (BCR), dem T-Zell-Antigenrezeptor (TCR) und mit dem Fc γ RIIa, werden deren aktivatorische Signale negativ moduliert [DAËRON et al., 1995a]. Entscheidend für die inhibitorische Wirkung des Rezeptors ist der initiale Schritt der Tyrosin-Phosphorylierung im ITIM durch Mitglieder der Src-Kinasen-Familie. Dadurch werden Tyrosin-Phosphatasen mit SH2-Domänen wie SHP-1 und SHIP aktiviert, die mit verschiedenen phosphorylierten Substraten, die für die aktivatorischen Signale der ITAMs zuständig sind, interagieren und so zu einer Inhibition führen.

1.2.2 Fc γ -Rezeptoren

Humane und murine Fc γ -Rezeptoren werden in drei Klassen eingeteilt: Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII. Während für die humanen Fc γ R acht Gene identifiziert wurden, die auf dem langen Arm von Chromosom 1 kartiert sind [RAVETCH, 1994; VAN DE WINKEL & CAPEL, 1993], werden die murinen Fc γ R-Klassen von jeweils einem Gen codiert, das auf Chromosom 3 (Fc γ RI) oder 1 (Fc γ RII und Fc γ RIII) kartiert ist [OSMAN et al., 1992]. Zu jeder dieser Klasse gehören verschiedene individuelle Rezeptor-Isoformen, die durch Genduplikation und alternatives Spleißen entstanden sind. Bis auf eine Ausnahme (hFc γ RIIIb) handelt es sich bei den Fc γ R um integrale Membranglykoproteine [RAVETCH & KINET, 1992].

1.2.2.1 Fc γ RI

Der murine Fc γ RI ist ein ca. 70 kDa großes, Trypsin-sensitives Glykoprotein, das mIgG2a mit hoher Affinität ($K_a = 10^8 M^{-1}$) bindet und als oligomerer Komplex der α -Kette mit einem Homodimer aus γ -Ketten assoziiert ist. Der Fc γ RI besitzt, im Gegensatz zu den Fc γ R der Klassen II und III, drei Immunglobulin-ähnliche extrazelluläre Domänen. Die zwei zur Zellmembran distal gelegenen Domänen zeigen hohe Homologien zu den anderen Fc γ R-Klassen, binden IgG aber nur mit niedriger Affinität. Verantwortlich für die hochaffine IgG-Bindung des Fc γ RI ist die Anwesenheit der dritten Domäne [HULETT et al., 1991]. Die wichtigsten Eigenschaften der murinen Fc γ -Rezeptoren sind in **Tab. 1.1** aufgeführt.

Der 72 kDa große humane Fc γ RI (CD64) wird dagegen durch drei homologe Gene vertreten (IA, IB und IC), bei denen nur Fc γ RIA für ein intaktes transmembranäres Protein kodiert. Die hFc γ RIB- und hFc γ RIC-Gene verwenden ein Translations-Terminationskodon im dritten extrazellulären (EC3) Exon und kodieren nur für lösliche hFc γ RIB und hFc γ RIC Rezeptoren. Ein durch alternatives Spleißen entstandenes Fc γ Rib2 Transkript, dem die dritte extrazelluläre Domäne fehlt und das IgG mit niedriger Affinität bindet, wurde bisher nur *in vitro* beschrieben [VAN VUGT et al., 1999; PORGES et al., 1992]. Durch die Assoziation des Fc γ RI mit dem γ -Ketten Dimer wird die hochaffine Bindung ($K_a = 10^8$ - $10^9 M^{-1}$) an monomere IgG noch verbessert [MILLER et al., 1996].

	mFc γ RI	mFc γ RII	mFc γ RIII
Moleküle	67-70 kDa	40-60 kDa	40-60 kDa
Gene	1	1	1
Allele	—	2 (Ly17.1/Ly17.2)	—
Assoziierte Untereinheiten	FcR γ -Kette	—	FcR γ -Kette, FcR β -Kette, TCR/CD3 ζ -Kette
Monoklonale Antikörper	—	2.4G2 K9.361 (anti-Ly17.1) K75.325 (anti-Ly17.2)	2.4G2
Affinität für IgG (K_a)	$10^8 M^{-1}$	$<10^7 M^{-1}$	$<10^7 M^{-1}$
Spezifität für mIgG	2a \gg 1, 2b, 3	1=2a=2b \gg 3	1=2a=2b \gg 3
Expression	Makrophagen Mesangialzellen	b1: B-Zellen, T-Zell-Subtypen, frühe fetale Thymozyten b2: Makrophagen, Mesangialzellen b1/b2: Mast-Zellen, Basophile, Eosinophile b3: Makrophagen	Makrophagen, Mast-Zellen, Neutrophile, Eosinophile, Mesangialzellen, NK-Zellen, $\gamma\delta$ -T-Zellen, frühe fetale Thymozyten
Funktion	ADCC, Phagozytose	b1: Capping, Apoptose, neg. Regulation von B-Zell und Mast-Zell Aktivierung b2: Endozytose, Phagozytose, Antigen-Präsentation	ADCC, Antigen-Präsentation, Phagozytose, Degranulation, Freisetzung von Mediatoren

Tab. 1.1: Eigenschaften muriner Fc γ -Rezeptoren

1.2.2.2 Fc γ RII

Von den drei Genen des humanen Fc γ RII (CD32) (A, B und C) werden sechs verschiedene mRNAs (a1, a2, b1, b2, b3 und c) transkribiert. Der hFc γ RIIb1 Rezeptor enthält alle drei intrazytoplasmatischen Exons (C1-C3). Dem hFc γ RIIb2

fehlen 19 Aminosäuren des ersten Exons C1, da die Exon-kodierende RNA durch alternatives Spleißen nicht zum Protein translatiert wird. Das dritte Transkript, hFcγRIIb3, unterscheidet sich vom hFcγRIIb2 durch ein zusätzlich fehlendes S2 Exon, das für das Signalpeptid kodiert. Es liegt in löslicher Form vor. Die humanen FcγRII Isoformen vermitteln über ihren zytoplasmatischen Teil unterschiedliche Funktionen. Der hFcγRIIA wird überwiegend auf phagozytierenden Zellen (Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen) exprimiert und initiiert dort durch sein ITAM Phagozytose, ADCC und Zell-Aktivierung. Die humanen und die hochhomologen murinen FcγRIIB-Transkripte besitzen dagegen ein inhibitorisches ITIM, das über die Fähigkeit zur Kontrolle der ITAM-induzierten Signaltransduktionen verfügt und deren aktivatorischen Signale negativ moduliert. So wird durch Co-Ligation des FcγRIIB mit dem B-Zellrezeptor die B-Zell-Aktivierung, Proliferation und auch die Antikörperproduktion inhibiert [AMIGORENA et al., 1992].

Bei dem murinen FcγRII handelt es sich um ein 40-60 kDa großes Glykoprotein, dessen Gene hochhomolog zum humanen FcγRIIB sind. Der mFcγRII vermag IgG nur mit niedriger Affinität zu binden, d.h., daß es unter physiologischen Bedingungen nur zu einer selektiven Interaktion mit multivalenten Immunkomplexen (IC) kommt. In der Maus gibt es im Gegensatz zum Menschen keine aktivatorischen FcγRIIA Rezeptoren, sondern nur vier Isoformen, die durch Zelltyp-spezifisches alternatives Spleißen der TM- und/oder C1-kodierenden Exons des FcγRIIB Transkripts entstehen. FcγRIIb1 und b2 unterscheiden sich durch eine 47 Aminosäuren lange Insertion im zytoplasmatischen C1 Exon, die dem FcγRIIb2 fehlt. Ein weiteres Transkript kodiert für die Isoform FcγRIIb1', die eine 19 Aminosäure lange Insertion besitzt, die für das 5'-Ende des ersten C1 Exons kodiert. Dies weist darauf hin, daß diese Form homolog zu humanen FcγRIIb1 ist [LATOUR et al., 1996]. Dem FcγRIIb3-Rezeptor fehlen die Sequenzen des transmembranen (TM) und des ersten C1 Exons und er wird von Makrophagen als löslicher Rezeptor freigesetzt. FcγRIIb1 wird vor allem von Zellen der lymphoiden Linie exprimiert. Durch die Insertion des C1 Exons besitzt dieser Rezeptor die Fähigkeit zum „*capping*“ [AMIGORENA et al., 1992], wodurch er durch unmittelbare Nähe zum BCR Aktivierungsprozesse regulieren kann. Mit dieser Insertion verfügt er aber vermutlich nicht über die Fähigkeit, IC über „*clathrin-coated pits*“ zu endozytieren und Antigene zu präsentieren, wozu aber der FcγRIIb2, der vor allem von myeloiden Zellen exprimiert wird, befähigt ist [AMIGORENA et al., 1992].

1.2.2.3 FcγRIII

Der humane FcγRIII (CD16) ist ein stark glykosyliertes und heterogenes Protein mit einem Molekulargewicht von 50-80 kDa. Dieser niedrigaffine Rezeptor wurde bisher in zwei Isoformen gefunden: hFcγRIIIA und hFcγRIIIB. Das hFcγRIIIA-Gen kodiert für

ein membrandurchspannendes Molekül, während Fc γ RIIB durch einen Glykosylphosphatidylinositol-(GPI)-Anker an der Membran befestigt ist. Der hFc γ RIIA benötigt für seine Oberflächenexpression sowie für die Signaltransduktion zusätzliche Untereinheiten wie die γ -Ketten des Fc ϵ RI und/oder die CD3 ξ -Kette, eine Untereinheit des TCR [ERNST et al., 1993; WIRTHMUELLER et al., 1992; KUROSAKI et al., 1991]. Durch die nichtkovalente Assoziation der γ - und ζ -Kette mit der α -Kette, die im ER stattfindet, wird der FcR-Komplex vor Degradation geschützt [KUROSAKI et al., 1991]. Außerdem soll durch die Assoziation des hFc γ RIIIa mit den γ -Ketten die intermediäre Bindungsaffinität des Rezeptors, die höher ist als bei der hFc γ RIIIb-Isoform und dem hFc γ RII, aber niedriger als beim hFc γ RI, zustande kommen [MILLER et al., 1996].

Der murine Fc γ RIII, der ein Molekulargewicht von 40-60 kDa besitzt, wird von einem einzigen Gen kodiert, das hochhomolog zum humanen Fc γ RIII ist [RAVETCH & KINET, 1991]. Die beiden Rezeptoren sind daher in ihrer Struktur, der Funktion und auch der zellulären Expression sehr ähnlich. Der mFc γ RIII wurde zuerst als ein Fc γ RII-Rezeptormolekül identifiziert, da er mit demselben monoklonalen anti-Fc γ RII/Fc γ RIII Antikörper 2.4G2 reagiert [RAVETCH et al., 1986; WEINSHANK et al., 1988]. Diese Bindung kommt zustande, weil der mFc γ RIII in seiner extrazellulären Domäne 95% Sequenzhomologie zum mFc γ RII aufweist, die transmembranen und zytoplasmatischen Domänen aber sind unterschiedlich aufgebaut [RAVETCH & KINET, 1991]. Auch die Bindungseigenschaften des mFc γ RIII sind identisch mit denen des mFc γ RII [WEINSHANK et al., 1988; GESSNER et al., 1998]. Die mFc γ RIII α -Kette wird entweder in Assoziation mit einem γ -Ketten Dimer oder mit $\beta\gamma_2$ - und $\gamma\zeta$ -Ketten exprimiert [KUROSAKI et al., 1992]. Außerdem ist der mFc γ RIII, wie im humanen System, der einzige Fc γ R auf NK-Zellen, wo er zur ADCC führt. Einen über GPI-Anker mit der Zellmembran verbundenen mFc γ RIIIb wie auf humanen Neutrophilen ist in der Maus nicht zu finden.

1.2.3 Klinische und biologische Bedeutung von Fc-Rezeptoren

FcR, die auf allen Zellen des Immunsystems exprimiert werden, übernehmen bei der Regulation der Immunantwort wichtige Rollen, indem sie eine Verbindung zwischen den humoralen Antikörper-Antigen-Interaktionen mit den zellulären Effektorfunktionen herstellen.

Durch eine Kreuzvernetzung von mindestens zwei FcR-Molekülen wird eine Vielzahl von Effektor-Funktionen wie die Vermittlung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), die Clearance von Immunkomplexen, die Phagozytose pathogener Erreger und die Freisetzung entzündlicher Mediatoren und Zytokine eingeleitet [RAVETCH & KINET, 1991; VAN DE WINKEL & CAPEL, 1993]. Der Fc γ RIIB übernimmt mit der Regulation der lymphozytären Proliferation und der

Antikörperproduktion eine Sonderstellung (s.o.) Diese vielfältigen biologischen Aktivitäten erklären sich durch die strukturelle Heterogenität und differentiellen Expressionsmuster der Fc γ R auf verschiedenen Zellen des hämatopoetischen Systems [VAN DE WINKEL & CAPEL, 1993]

Obwohl verschiedene biologische Funktionen bekannt sind, die von den Fc-Rezeptoren ausgelöst werden, ist ihre spezifische Rolle *in vivo* nur eingeschränkt bekannt. Das liegt zum einen daran, daß durch die überlappenden Expressionsmuster der FcR auf den Effektorzellen die Aktivierungswege einzelner Rezeptorklassen schwer definierbar sind, zum anderen können weitere biologische Mechanismen zur Interaktion mit IC, wie den Komponenten des Komplementsystems, nicht von den FcR-Funktionen differenziert werden. Mit Hilfe von kürzlich etablierten *knock-out* (KO) Maus-Modellen, bei denen einzelne oder mehrere Ketten der Fc γ R durch *gene targeting* deletiert wurden, ist es möglich geworden, die Beteiligung der FcR an mehreren pathogenetischen Reaktionen zu klären.

Durch die Entwicklung der γ -Ketten defizienten Maus konnte die *in vivo* Rolle des Fc ϵ RI bei der Entwicklung von allergischen Reaktionen geklärt werden. Diese Mäuse zeigen ebenso wie die für die α -Kette des Fc ϵ RI deletierten Mäuse keine IgE-vermittelte systemische oder kutane Anaphylaxie (PCA) [TAKAI et al., 1994; DOMBROVICZ et al., 1993]. Doch auch Mäuse, die defizient für IgE sind, zeigen anaphylaktische Reaktionen [OETTGEN et al., 1994], was auf eine Mitwirkung von IgG-IC und den kooperierenden Fc γ R hinweisen könnte. In Fc γ RIII-defizienten Mäusen konnte diese Beteiligung des niedrigaffinen Fc γ RIII bestätigt werden, da keine IgG-vermittelte Mastzell-Degranulation und PCA erfolgt, wohl aber eine IgE-abhängige PCA [HAZENBOS et al., 1996]. Fc γ RII-defiziente Mäuse zeigen dagegen verstärkte humorale und anaphylaktische Reaktionen [TAKAI et al., 1996].

Auch bei der Untersuchung der Hypersensibilitätsreaktionen vom Typ II zeigen die γ -Ketten defizienten Mäuse reduzierte Reaktionen. Diese Tiere sind nicht fähig, eine experimentelle idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP) oder autoimmunhämolytische Anämie (AIHA) zu entwickeln [CLYNES & RAVETCH, 1995].

Ursache für die Etablierung der Hypersensibilitätsreaktion vom Typ III ist die Deposition von IgG-IC an bestimmten Stellen im Gewebe, wie es bei verschiedenen Autoimmunerkrankungen (Vaskulitiden, Glomerulonephritiden, Systemischem Lupus erythematodes (SLE) und rheumatoider Arthritis) beobachtet wird. Die Arthus Reaktion, das experimentelle Modell der IgG-IC vermittelten Entzündungsreaktion, äußert sich durch Ödeme, Hämorrhagien und Neutrophileninfiltration. In γ -Ketten-KO-Mäusen konnte keine Arthus Reaktion in der Haut ausgelöst werden [SYLVESTRE & RAVETCH, 1994]. Die Abwesenheit von infiltrierten Neutrophilen indiziert dabei die relevante Rolle, die Fc γ R bei der Initiierung der inflammatorischen Kaskade, die zur

chemotaktischen Anlockung dieser Zellen führt, einnimmt [RAVETCH, 1994]. Auch in Fc γ RIII α -defizienten Mäusen zeigt sich eine eingeschränkte Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ III [HAZENBOS et al., 1996].

Wurde das bisherige Modell der Arthus Reaktion mit einer Aktivierung der Komplement-Kaskade [COCHRANE et al., 1970] und nachfolgender Gewebeschädigung durch aktivierte Neutrophile erklärt, so zeigte der Einsatz der γ -Ketten- und Fc γ RIII-defizienten Mäuse die primäre Bedeutung, über die vor allem der Fc γ RIII bei der Auslösung von Entzündungsreaktionen des Typs III verfügt. Diese Ergebnisse werden durch die Untersuchungen an Mäusen mit genetischen Defizienzen der Komplementfaktoren C3, C4 und C5 unterstrichen, die in der Arthus Reaktion keine Unterschiede im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen zeigen [SYLVESTRE et al., 1996].

1.2.4 Fc γ -Rezeptoren in der Glomerulonephritis

Die meisten Glomerulonephritiden (GN) treten sekundär als Komplikationen von außerhalb der Niere lokalisierten Systemerkrankungen und Infektionen auf, aber auch nach Medikamenten, Giften u.a.. Es gibt verschiedene Mechanismen, die für die Ablagerung von Antikörper-Antigen-IC verantwortlich sein könnten. Zum einen kann eine ladungsabhängige Bindung an die durch Heparinsulfat-Proteoglycane anionisch geladene glomeruläre Basalmembran (GBM) oder die Matrix erfolgen, zum anderen können auch spezifische Bindungen der Antikörperkomponente im IC an niedrig-affine Fc-Rezeptoren eine Rolle spielen.

Nahezu alle Formen der humanen GN werden durch immunologische Mechanismen mediiert [ABRASS, 1997]. In verschiedenen Tier-Modellen von immunologisch-induzierten experimentellen GN wurden die involvierten immunpathogenetische Mechanismen untersucht. In der murinen Anti-GBM-Nephritis oder auch nephrotoxischen Serum GN (NTGN), wurde nach der Bindung der Anti-GBM-Antikörper an die GBM eine renale Schädigung ausgelöst [HEBERT et al., 1997]. Transgene Mäuse mit einer Defizienz der γ -Ketten, die für die Oberflächenexpression und Signaltransduktion der hoch- und niedrigaffinen Fc ϵ RI, Fc γ RI und Fc γ RIII Rezeptorkomplexe verantwortlich sind [TAKAI et al., 1994], zeigten in dem Modell der NTGN trotz Deposition der Anti-GBM-Antikörper und des Komplement-Faktors C3, eine deutlich abgeschwächte akute Phase der NTGN mit der Abwesenheit von infiltrierten Zellen (Neutrophilen) im Glomerulum [SUZUKI et al., 1998; PARK et al., 1998], während in Mäusen, die defizient für den inhibitorisch wirkenden Fc γ RII sind, eine leicht verstärkte Reaktion zu beobachten war [SUZUKI et al., 1998]. Auch in einem weiteren Maus-Modell zur Autoimmun-GN, bei dem γ -Ketten-defiziente Mäuse in Mäuse mit NZB/NZW-Hintergrund, die spontan Lupus nephritis etablieren, rückgekreuzt wurden, wurde ebenfalls trotz Ablagerung von IC und C3 in der Niere keine inflammatorische Kaskade initiiert [CLYNES et al., 1998].

In diesen Tierversuchen von IC-assoziierten Glomerulonephritiden mit Fc γ -Rezeptor-knock-out (KO)-Mäusen konnte also eindeutig eine Beteiligung von Fc γ RI und Fc γ RIII tragenden Zellen bei der Initiation der inflammatorischen Kaskade, der Infiltration von Entzündungszellen des peripheren Blutes und der Gewebeschädigung zugeordnet werden. Der inhibitorische Fc γ RII besitzt dagegen eher protektive Eigenschaften bei der Entwicklung einer GN [SUZUKI et al., 1998].

Dabei könnten die intrinsischen Mesangiumzellen wichtige Funktionen übernehmen. In mehreren Studien wurde gezeigt, daß diese Zellen Rezeptoren für den Fc-Teil von IgG exprimieren [GÓMEZ-GUERRERO et al., 1994; RADEKE et al., 1994a; SANTIAGO et al., 1991a; UCIECHOWSKI et al., 1998]. Bei einer Stimulation von Mesangiumzellen mit IgG-IC wurden verschiedene inflammatorische Faktoren wie IL-6, IL-8, CSF-1 und MCP-1 exprimiert [GÓMEZ-GUERRERO et al., 1994; RADEKE et al., 1994a ; HORA et al., 1992; SATRIANO et al., 1993; UCIECHOWSKI et al., 1998]. Die Mesangiumzellen besitzen also die Fähigkeit nach Fc-Rezeptor-Vernetzung chemotaktisch wirkenden Substanzen zu sezernieren und sind so in der Lage, bei der Migration und Aktivierung von Leukozyten im pathogenen renalen Entzündungsgeschehen einen aktiven Prozeß einzunehmen.

1.3 Ziele der Arbeit

Die Rolle von Fc γ -Rezeptoren in verschiedenen pathogenetischen Reaktionen ist eindeutig bewiesen worden, wobei besonders Fc γ RIII durch die Bindung von IgG-Immunkomplexen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Leukozyten spielt. In GN können dabei lokale Gewebezellen wie die intrinsischen glomerulären Mesangiumzellen relevante Funktionen übernehmen. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, daß sie nach Fc γ -Rezeptor-Kreuzvernetzung verschiedenste inflammatorisch wirksame Mediatoren einschließlich Chemokinen freisetzen [GÓMEZ-GUERRERO et al., 1994; RADEKE et al., 1994a ; HORA et al., 1992; SATRIANO et al., 1993; UCIECHOWSKI et al., 1998].

Allerdings wurden die meisten dieser Arbeiten mit Mesangiumzellen aus Ratten und Menschen durchgeführt, so daß trotz vieler neuer *in vivo* Befunde in Fc γ R-KO-Mäusen zur GN über die verschiedenen Induktionsbedingungen der Fc γ -Rezeptoren in diesen Mauszellen noch keine Informationen vorliegen. Daher sollten in der vorliegenden Arbeit erstmalig die differentiellen Expressions- und Regulationsbedingungen der einzelnen Fc γ -Rezeptor-Klassen in Maus-Mesangiumzellen detailliert untersucht werden. In Primärkulturen muriner Mesangiumzellen (MMC) aus WT- und Fc γ RIII γ ^{-/-} (KO)-Mäusen sollte dabei die Synthese der Fc γ R-mRNA unter differierenden Kultivierungsbedingungen von ruhenden im Vergleich zu proliferierenden MMC untersucht werden. Hierbei wurden vorrangig die Effekte des T_H1-Lymphokins IFN- γ und der monozytären Zytokine IL-1 β und TNF- α getestet, die

auf viele andere Mesangiumzell-Funktionen relevante Wirkungen ausüben [RADEKE & RESCH, 1992; MARTIN et al., 1987]. Durch die Verwendung von MMC aus Fc γ RIII-/- (KO)-Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp-Kontrollmäusen sollte neben der Induktion der Fc γ -Rezeptoren auch die funktionelle Aktivierbarkeit besonders des niedrigaffinen Fc γ RIII durch IgG-IC geklärt werden, dem bei der Auslösung von IC-vermittelten Entzündungsreaktionen eine relevante Rolle zugeordnet wird [RADEKE et al., 1994a; CLYNES et al., 1998].

Die Verfügbarkeit von Fc γ RIII defizienten MMC erlaubt möglicherweise auch, die Rolle des in der Maus inhibitorischen Fc γ RII zu verstehen.

Neben diesen Analysen sollte eine dendritische Zelllinie, XS52, im Hinblick auf Fc γ R-vermittelte Effekte auf die IL-12- und Chemokin-Synthese, sowie ansatzweise ihre Aktivierbarkeit durch MMC, im Hinblick auf die Produktion von IL-12, untersucht werden.

2 Material

2.1 Verbrauchsmaterial

Becton-Dickinson, BD, Heidelberg	FACS-5 mL-Röhrchen Falcon Bottle Top Filter (0,2 µm) Falcon 5 mL Röhrchen Falcon Cell Strainer (70 µm Nylon)
Dunn, Asbach	8-Well-Objektträger
Eppendorf, Hamburg	Reaktionsgefäße 2ml Crystal Tips
Greiner, Nürtingen	Einmalpipetten 10 mL
ICN Biomedicals, Mese, USA	Micro-Ouchterlony Kit
Nunc, Wiesbaden	Zellkulturflaschen: 50 mL/25 cm ² , 260 mL/80 cm ² Einmalpipetten 2 mL Zentrifugenröhrchen: 15 mL, 50 mL Kryogefäße 1,8 mL Zellschaber 96 Well Mikrotiterplatten Immuno-Plate MaxiSorb Eimalpetrischalen Chamber Slides
Pharmacia Biotech, Freiburg	PD-10-Säulen
Pierce, Rockford, USA	Slide-A-Lyzer Dialysekammern (MWCO 10.000 kDa, MWCO 3.500 kDa) Centricon Konzentrator (MWCO 10.000 kDa)
Polyfiltronics, Massachusetts, USA	T-Spot ELISPOT-Platten

Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen
Reaktionsgefäße: 0,5 mL; 1,5 mL
Einmalpetrischalen

Schleicher und Schuell, Dassel
Einmal-Filterhalter
Filterpapier
0,2µm Sterilfilter
0,45 mm Sterilfilter

Whatman, Maidstone, England
3MM Papier

2.2 Geräte

A•EL•VIS, Hannover
Automated ELISA-Spot Assay Video
Analysis System

Bachhofer, Reutlingen
UV-Leuchttisch 312 nm

Becton Dickinson, BD, Heidelberg
FACScan
CellFit-Software
LYSIS-Software

**Bethesda Research Laboratory,
Bethesda, USA**
Horizontal-Mini-Gelelektrophorese-
Kammer

Bio-Rad, München
Elektrophoresekammer
Mini-Protean II-slab-cell-System

Dynatech, Denkendorf
MR 5000 ELISA-Reader

**DuPont de Nemours GmbH , Bad
Homburg**
Sorvall RT6000B Kühlzentrifuge

Heraeus, Hanau
Brutschrank, CO₂-Auto-Zero

Jürgens, Hannover
Biometra Hybaid Mini-
Hybridisierungsöfen

Landgraf, Hannover
Thermocycler

neoLab, Heidelberg
Schüttelgerät Reax 2000

Olympus, Tokyo, Japan	Phasenkontrast-Fluoreszenz- Mikroskop
Phase, Lübeck	Fotoapparatur ULWCD Semi Dry Blot Apparatur
Sebia, Paris, Frankreich	Spannungsgerät
Shimadzu, Duisburg	Spektralphotometer UV 160A
Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode/Harz	Laborfuge 2K15 Laborfuge 112
SLT Labinstruments, Österreich	Multistepper 50/100/150/200
Stovall, Greensboro, USA	Bellydancer Schüttelgerät

2.3 Chemikalien und Enzyme

AGS GmbH, Heidelberg	RNA-Clean
Amersham, Braunschweig	Hybond N Nylonmembran ECL- Western blotting detection reagent Methyl- ³ H-Thymidin Rainbow Proteinmarker Restriktionsenzyme
Amresco, USA	Ethidiumbromid
Baker, Deventer, Holland	Chloroform Ethanol Methanol
Biochrom KG, Berlin	Zellkulturmedium Basal Iscove Medium
Biomol, Hamburg	Agarose DNA Grade Harnstoff Tris Enzyme Grade Tris Ultra Pure

Biorad, München	Bradford Reagenz Kaleidoskop Standard
Biowhittaker, Verviers, Belgien	FCS Zellkulturmedium RPMI 1640
Boehringer, Mannheim	Heringssperma-DNA Phosphatase-Komplex Random Hexamers Streptavidin-POD RNase A
Braun, Melsungen	0,9% NaCl
Dako, Hamburg	Fast Red Substratsystem Fast Blue Glycergel Hämalaun Streptavidin-HRP
Fluka, Sigma-Aldrich, Deisenhofen	DMSO (Dimethylsulfoxid)
Gibco, Eggenstein	M-MLV Reverse Transkriptase Taq DNA-Polymerase 10x PCR-Puffer Magnesiumchlorid Zellkulturmedium RPMI 1640 Nicht-essentielle Aminosäuren Natriumpyruvat Penicillin / Streptomycin L-Glutamin Trypsin Desoxynukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
ICN Biomedicals, Mese, USA	Micro-Ouchterlony Kit
Immuno GmbH, Heidelberg	Endobolin
Kodak, Rochester, USA	Röntgenfilm X-Omat AR BioMax MR ECL-Film

Merck, Darmstadt	EDTA (Titriplex) Essigsäure Formaldehyd Formamid Isobutanol Natriumchlorid Natriumhydroxid Natriumhydrogenphosphat
Millipore, Bedrock, USA	Blotmembran Immobilon-P 0,45µm
MWG-Biotech, Ebersberg	Oligonukleotid-Primer
NEN, Boston, MA, USA	($\alpha^{32}\text{-P}$)-dCTP (3000 Ci/mmol) ($\alpha^{32}\text{-P}$)-dUTP (3000 Ci/mmol)
New England Biolabs, Schwalbach	DNA-Molekulargewichtsstandard $\phi\text{X-174/Hae III}$
PharMingen, BD, Heidelberg	RiboQuant, Multi-Probe RNase Protection Assay System
Pharmacia, Uppsala, Schweden	Sephadex G50 Protein G Sepharose (4 fast flow)
Pierce, Rockford, USA	AEC (3-Amino-9-Ethylcarbazol) Biotin FITC
Quiagen, Hilden	Gel Extraction-Kit
Riedel-de Haën, Seelze	Hämatoxillin Natriumcitrat Natriumazid Phenol
Seromed, Berlin	PBS
Serva, Heidelberg	Glycerol Bromphenolblau SDS (Dodecylsulfat) Polyvinylpyrrol

	Dimethylformamid Digitonin
Sigma, Deisenhofen	Aminocaprinsäure β-Mercaptoethanol Biotin Bovines Insulin Bromphenol-Blau BSA (bovines Albumin, Fraktion V) DABCO (Diazobicyclooktan) DMSO (Dimethylsulfoxid) Humanes Transferrin Isopropanol Inkomplettes Freund'sches Adjuvans Lithiumchlorid MCDB 302B-Medium Mineralöl MOPS Ovalbumin (chicken egg, grade VI) Proteinase-Inhibitoren Propidiumiodid RNase A TAE-Puffer TMB (Tetramethylbenzidin) Tween 20 Wasserstoffperoxid
Stratagene, Heidelberg	RNase Inhibitor
Worthington Biochemical Corp., Freehold, USA	Kollagenase Typ IV
 2.4 Rekombinante Zytokine, Wachstumsfaktoren und andere Stimulantien	
Boehringer, Mannheim	murines IFN-γ humanes IL-2
Hoffmann LaRoche, Basel, Schweiz	humanes IL-1β
Phillips, Bissendorf	humanes TNF-α

R&D Systems, Wiesbaden	murines MCP-1
Sigma, Deisenhofen	LPS <small>(E.coli)</small>
Strathmann Biotech, Hannover	murines GM-CSF
TEBU, Frankfurt/Main	murines IL-4 murines IL-10

2.5 Antikörper, cDNAs und Oligonukleotid-Primer

Antikörper

Caltag, Burlingane, USA	<i>mouse monoclonal antibody to mouse CD32/16 (Ly17.1) FcγRII/III</i> (Maus-anti-Maus-FcγRII/III) <i>mouse monoclonal antibody to mouse CD32/16 (Ly17.2) FcγRII/III</i> (Maus-anti-Maus-FcγRII/III)
Dako, Hamburg	EnVision TM <i>Anti-mouse and anti-rabbit labeled polymer alkaline phosphatase</i> (Anti-Maus und -Kaninchen mit alkalischer Phosphatase markierter Polymer) <i>Rabbit-anti-rat (Z494)</i> (Kaninchen-Anti-Ratte, APAAP-Brückenantikörper) <i>Rat-APAAP-mAb (D488)</i> (monoklonaler Ratten-Antikörper, APAAP-markiert)
Dianova, Hamburg	<i>Affini Pure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Mouse IgG, FITC labeled</i> (F(ab') ₂ Ziege-Anti-Maus-IgG+IgM-(H+L)-FITC-markiert) <i>Affini Pure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Rat IgG, FITC labeled</i> (F(ab') ₂ Ziege-Anti-Ratte-IgG-(H+L)-FITC-markiert)

PharMingen, BD, Heidelberg

CD16/32 Fc γ RIII/II receptor Fcblock (2.4G2)
 (Ratte-anti-Maus-Fc γ RII/III)
purified rat-anti-mouse IL-12 (p40/p70)
 (Ratte-anti-Maus-IL12 (p40/p70))
Biotin rat-anti-mouse IL-12 (p40/p70)
 (Ratte-anti-Maus-IL12 (p40/p70)-Biotin-
 markiert)
purified rat-anti-mouse IFN γ
 (Ratte-anti-Maus-IFN γ)
Biotin rat-anti-mouse IFN γ
 (Ratte-anti-Maus-IFN γ -Biotin-markiert)
purified rat-anti-mouse I-A^d
 (Ratte-anti-Maus-MHC II)

R&D Systems, Wiesbaden

goat-anti-murine JE/MCP-1
 (Ziege-anti-Maus-MCP-1)

**The binding site,
Birmingham, UK**

murine IgG, polyklonal

ICN, Lisle

anti-Fibronectin
 anti-Vimentin
 anti-Kollagen IV
 anti-Desmin

Freundlicherweise durch Herrn
 Prof. Dr. V. Kaever
 (Institut für Pharmakologie, MHH,
 Hannover) zur Verfügung gestellt

anti-PGE₂
 PGE₂-Biocytin

Freundlicherweise durch Herrn
 Prof. Dr. A.M. Deelder,
 (Rijks Universität Leiden,
 Niederlande) zur Verfügung gestellt

anti-FITC IgG2b (256-4A1-A)
 anti-FITC IgG1 (256-2F10-A)

cDNAs

Freundlicherweise von Herrn
 Dr. M. Wahl,
 (Inst. f. Pharmakologie, MHH,
 Hannover) zur Verfügung gestellt.

MCP-1-cDNA

Freundlicherweise von Herrn
Dr. J.E. Gessner,
(Inst. f. Immunologie, MHH,
Hannover) zur Verfügung gestellt.

Fc γ R1 α -cDNA

Freundlicherweise von Herrn
Dr. J.E. Gessner,
(Inst. f. Immunologie, MHH,
Hannover) zur Verfügung gestellt.

Fc γ R2-cDNA

Freundlicherweise von Herrn
Dr. J.E. Gessner,
(Inst. f. Immunologie, MHH,
Hannover) zur Verfügung gestellt.

Fc γ R3 α -cDNA

Freundlicherweise von Herrn
Dr. J.E. Gessner,
(Inst. f. Immunologie, MHH,
Hannover) zur Verfügung gestellt.

FcR γ -cDNA

Oligonukleotid-Primer

β -Tubulin Sequenz von Dr. H. J. Mägert, Institut für Peptidforschung,
Hannover

Sense:

5'-TTCCCTGGCCAGCT(GC)AA(AGCT)GC(AGCT)GACCT(AGCT)CGCAAG-3'

Antisense:

5'-CATGCCCTCGCC(AGCT)GTGTACCAGTG(AGCT)A(AGCT)GAAGGC-3'

mFc γ R1 α Sequenz von Dr. J.E. Gessner, Institut für Immunologie, MHH,
Hannover

Sense:

5'-CTCCAGGCCTCCCGCAGAGTC-3'

Antisense:

5'-CGCTTCTAACTTGCTGAAAGGAA-3'

mFc γ R2 Sequenz von Dr. J.E. Gessner, Institut für Immunologie, MHH,
Hannover

Sense:

5'-GCCCAAGTCCAGCAGGTCTTTACCA-3'

Antisense:

5'-CAGTTCACGTTGCTGCAGTC -3'

mFcγRIIIα Sequenz von Dr. J.E. Gessner, Institut für Immunologie, MHH,
Hannover

Sense:

5'-ATGTTTCAGAATGCACACTCTGG-3'

Antisense:

5'-TCACTTGTCTTGAGGAGCCTGG-3'

mFcR-γ Sequenz von Dr. J.E. Gessner, Institut für Immunologie, MHH,
Hannover

Sense:

5'-CCAGGATGATCTCAGCCG-3'

Antisense:

5'-TTAACGGAGATGGGGACCTGCC-3'

Primer für Mycoplasmennachweis

(Ref.: M. Wirth, E. Berthold, M. Grashoff, H. Pfützner, U. Schubert, H. Hauser
Cytotechnology, Vol. 16, pp.67-77, 1994; Sequenzen durch die AG Radeke leicht
modifiziert)

5'-äußere Primer (Myco 9)

5'-CGCCTGAGTAGTACGTTTCGC-3'

5'-CGCCTGAGTAGTACGTACGC-3'

5'-TGCCTGAGTAGTACATTCGC-3'

5'-CGCCTGGGTAGTACATTCGC-3'

5'-CGCCTGAGTAGTATGCTCGC-3'

5'-TGCCTGGGTAGTACATTCGC-3'

5'-innere Primer (Myco 8)

5'-TGGTGCATGGTTGTCGTCAG-3'

5'-TGGTGCACGGTTGTCGTCAG-3'

3'-innere Primer (Myco 5)

5'-GAACGTATTCACCGCAGCATA-3'

5'-GAACGTATTCACCGCGACATA-3'

5'-GAACGTATTCACCGTAGCGTA-3'

5'-GAACGTATTCACCGCAGCGTA-3'

5'-GAACGTATTCACCGCAGTATA-3'

5'-GAACGTATTCACCGCAACATG-3'

5'-GAACGTATTCACCGCGACATG-3'

3'-äußere Primer (Myco 3)

5'-GCGGTGTGTACAAGACCCGA-3'

5'-GCGGTGTGTACAAAACCCGA-3'

5'-GCGGTGTGTACAAAACCCGA-3'

2.6 Verwendete Zellen

BALB/c-MMC

glomeruläre Mesangiumzellen präpariert aus BALB/c -Mäusen, die den MHC-II-Hintergrund I-A^d aufweisen.

C57BL/6-MMC (WT-MMC)

glomeruläre Mesangiumzellen präpariert aus C57BL/6-Mäusen, die den MHC-II Hintergrund I-A^b aufweisen. Freundlicherweise durch Herrn Dr. J.E. Gessner, Inst. für Immunologie, MHH, zur Verfügung gestellt.

FcγRIII -/- (KO)-MMC

glomeruläre Mesangiumzellen präpariert aus C57BL/6-/129-Mäusen, die den MHC-II Hintergrund I-A^b aufweisen. Freundlicherweise durch Herrn Dr. J.E. Gessner, Inst. für Immunologie, MHH, zur Verfügung gestellt.

FcR-γ-chain -/- (KO)-MMC

glomeruläre Mesangiumzellen präpariert aus C57BL/6-/129-Mäusen, die den MHC-II Hintergrund I-A^b aufweisen. Freundlicherweise durch Herrn Dr. J.E. Gessner, Inst. für Immunologie, MHH, zur Verfügung gestellt.

J774A.1

murine Monozyten-Zelllinie

XS52

murine, von Langerhans-Zellen abstammende dendritische Zelllinie aus BALB/c-Mäusen, (MHC-II-Hintergrund I-A^d), freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Gabriele Müller, Inst. für Immunologie, Mainz

IF12

muriner Ovalbumin-spezifischer Th1-Klon aus BALB/c-Mäusen, (MHC-II-Hintergrund I-A^d), generiert und zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. med. H.H. Radeke

2.7 Zellkulturmedien

MMC-Medium:	RPMI 1640 (GIBCO life technologies) 10% FCS 2 mM L-Glutamat 2 mM Natrium-Pyruvat 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (final) 100U/mL / 100µg/mL Penicillin/Streptomycin 45µmol β-Mercaptoethanol (final) 5 µg/mL bovines Insulin
MMC-Medium (ruhende Bedingungen):	MCDB 302B (Sigma, Deisenhofen) 2 mM L-Glutamat 2 mM Natrium-Pyruvat 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (final) 100U/mL / 100µg/mL Penicillin/Streptomycin 45µmol β-Mercaptoethanol (final) 5 µg/mL bovines Insulin
T-Zell-Medium:	RPMI 1640-Medium (BioWhitaker) 10% FCS 2 mM L-Glutamat 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (final) 100U/mL / 100µg/mL Penicillin/Streptomycin
XS52:	Basal Iscove Medium (Biochrom KG) 2,5% FCS 2 mM L-Glutamat 2 mM Natrium-Pyruvat 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (final) 100U/mL / 100µg/mL Penicillin/Streptomycin 5 ng/mL rekombinantes murines GM-CSF
J774A.1:	RPMI 1640 (GIBCO life technologies) 2 mM L-Glutamat 2 mM Natrium-Pyruvat 1% Nicht-essentielle Aminosäuren (final) 100U/mL / 100µg/mL Penicillin/Streptomycin

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Maus-Mesangiumzellen

3.1.1.1 Präparation von murinen Mesangiumzellen

Diese Methode beruht auf dem Prinzip der partiellen Kollagenaseverdauung von isolierten Nierenglomeruli (RADEKE & RESCH, 1992). Von homozygoten Fc γ RIII^{-/-} und FcR γ -Ketten^{-/-} defizienten Mäusen sowie von C57BL/6-Kontrollmäusen wurde Rindengewebe frisch entnommener Nieren präpariert und sofort in eiskalte sterile PBS-Lösung überführt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Nach Entfernung der Nierenkapsel und des Nierenmarks wurde das Rindengewebe homogenisiert und durch Stahlsiebe mit absteigender Porengröße (180, 106) passiert, wobei die Mausglomeruli auf dem letzten Sieb (63 μ m) gesammelt und von kontaminierendem Material befreit wurden. Das Gewebe, das zu 90% aus entkapselten Glomeruli besteht, wurde aufgefangen, gewaschen und mit einer Kollagenaselösung (2 mg/mL Kollagenase Typ IV, Fa. Worthington, Freehold, USA; 184 U/mg, in PBS gelöst) bei 37°C im Wasserbad für 20-25 min bis zur Bildung fädiger Kollagenstrukturen, unter Schwenken inkubiert. Nach zwei Waschzentrifugationsschritten (4°C, 1000 U/min) mit Kulturmedium, das 20% FCS enthält, wurden die angedauten Glomeruli in kleine Kulturflaschen (25 cm²) ausgesät und in dem supplementierten Kulturmedium bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasseratmosphäre bis zum Erscheinen primärer Zellkolonien 4-8 Tage inkubiert. Durch optische Kontrolle mit dem Phasenkontrastmikroskop wurden unerwünschte Zellpopulationen (KM-Makrophagen, Endothel- und Epithelzellen) mit einem Zellschaber vorsichtig entfernt und die Mesangiumzellen bis zur Konfluenz mit 50% konditioniertem Medium (= gewonnener Zellüberstand von MMC) kultiviert. Die Identität der MMC wurde durch Objektträgerfärbungen nachgewiesen (s. 3.3.6). Anders als aus dem Knochenmark (KM) abstammende Makrophagen sind unstimulierte MMC negativ für MHC Klasse II-Antigene und im Unterschied zu anderen glomerulären Zellen deutlich positiv für Myosin und α -Aktin.

Die Passage erfolgte wie unter 3.1.1.2 beschrieben.

Nach der dritten Passage wurde der FCS-Gehalt des Mediums auf 10% reduziert. Die in dieser Arbeit verwendeten MMC wurden zwischen den Passagen 6 und 12 für Experimente benutzt.

3.1.1.2 Kultivierung der MMC

Die Kultivierung der in dieser Arbeit benutzten MMC erfolgte, wenn nicht anders erwähnt, mit supplementiertem Zellkulturmedium RPMI 1640 (Gibco, Eggenstein)

unter Zugabe von 10% FCS hitzeinaktiviertem FCS (30 min bei 57°C), bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und gesättigter Wasseratmosphäre. Die Zellen zeigten adhärentes Wachstum.

Mediumzusätze (Supplementiertes Medium):

L-Glutamat	final 2 mM
Natriumpyruvat	final 2 mM
nicht essentielle AS (NEA)	final 1%
Penicillin/Streptomycin	final 100 U/mL / 100 µg/ml
β-Mercaptoethanol	final 43-45 µmol
Insulin (bovin)	final 5 µg/ml

Das Medium wurde nach 3-5 Tagen zu 50% gewechselt. Nach dem Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert.

Durchführung der Passage:

Der konditionierte MMC-Überstand aus einer Kulturflasche wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1200 rpm (250 x g) zentrifugiert. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend mit 1 mL Trypsin/EDTA-Lösung (final = 0,125% / 0,01%) abgelöst. Nach ca. 2 min Einwirkzeit wurde nach mikroskopischer Kontrolle die Reaktion durch Zugabe von ca. 7 mL Medium mit 10% FCS-Gehalt beendet. Die Zellen wurden in ein Zentrifugenröhrchen überführt und ebenfalls 5 min bei 1200 rpm (250 x g) zentrifugiert. Nach der Zentrifugation erfolgten das Dekantieren des Mediumüberstandes und die Resuspension der Zellen in konditioniertem Medium. Die gewonnene Zellsuspension wurde in neue Kulturflaschen mit 50% frischem supplementiertem Medium und 50% konditioniertem Medium überführt. Nach einer initialen 1:1 Passage wurden die MMC in der Folge je nach Wachstumsgeschwindigkeit 1:2 oder 1:3 passagiert.

Zur Stimulation wurden die Zellen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Um die proliferierenden MMC auf Ruhebedingungen umzustellen, wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend auf supplementiertes serumfreies Medium (MCDB 302B, Sigma, Deisenhofen) umgesetzt. Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte der Zusatz der unterschiedlichen stimulierenden Faktoren für definierte Zeiträume (genaue Stimulationsbedingungen unter "Ergebnisse" in Kapitel 4). Bei Experimenten, die unter proliferativen Bedingungen stattfanden, wurden die Stimuli nach einem Wechsel des 10% FCS-haltigen Mediums zugesetzt.

3.1.2 T-Zellen

3.1.2.1 IF-12-TH1-Zellen

Bei IF-12-Zellen handelt es sich um einen Klon Ovalbumin-spezifischer, I-A^d-restringierter muriner T-Helferzellen. Sowohl auf Antigen-spezifische Stimulation mit dem kompletten Ovalbumin als auch nach Stimulation mit dem immundominanten OVA-Peptid 323-339 weisen diese Zellen das typische Th1-Profil mit der Sekretion von IFN- γ und IL-2 auf, IL-4 und IL-5 sezernieren sie dagegen nicht. Generiert wurden diese Zellen in BALB/c-Mäusen durch H.H. Radeke mittels Ovalbumin-Immunisierung. Die Zellen wurden in RPMI 1640-Medium (Fa. BioWhitaker, Verviers, Belgien) unter Zusatz von FCS (10%), Penicillin/Streptomycin (100 U/mL / 100 μ g/ml), L-Glutamin (2 mM), und einem Mix aus nicht-essentiellen Aminosäuren (NEA, 1%) kultiviert („T-Zell-Medium“). Dazu wurden sie in einem Brutschrank (Heraeus) bei 37°C, 5% CO₂-Begasung und gesättigter Wasserdampfathmosphäre inkubiert. Verwendet wurden 260 mL-Zellkulturflaschen, die mit jeweils 20 mL Medium befüllt wurden, wobei initial die Konzentration der T-Zellen auf $3,5 \times 10^5$ /mL eingestellt wurde. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen auf diese Zellzahl eingestellt, indem sie zunächst in sterilen 50 mL-Zentrifugenröhrchen bei 250 x g abzentrifugiert wurden. Das Medium wurde verworfen, die Zellen in der erwünschten Zellzahl in neuem Medium durch leichtes Schwenken resuspendiert. Es wurden final 5 ng/mL rekombinantes humanes IL-2 (Boehringer, Mannheim) zugegeben, um die Proliferation der Zellen aufrecht zu erhalten. Im Abstand von 4 Wochen erfolgte jeweils eine Restimulation mit Ovalbumin. Dazu mußten entsprechende syngene Stimulatorzellen vorhanden sein, die aus der Milz einer frisch getöteten Maus entnommen wurden (siehe 3.1.2.2.). Zu $3,5 \times 10^5$ T-Zellen wurden 2×10^6 bestrahlte *Feeder*-Zellen gegeben. Nach Zugabe von Ovalbumin (finale Konzentration = 13,5 μ g/ml) wurden die Zellen unter normalen Kulturbedingungen ohne die Zugabe von IL-2 für 6 Tage inkubiert.

3.1.2.2 Milzzellpräparation

Für die Restimulation der T-Zellen wurden *Feeder*-Zellen benötigt. Dazu wurde eine BALB/c-Maus getötet und kurz in ein Gefäß mit 70% Ethanol gelegt, um anhaftende Mycoplasmen und andere Bakterien abzutöten. Anschließend wurde die Milz der Maus unter sterilen Bedingungen entfernt und in eine Petrischale mit „T-Zell-Medium“ gelegt. Mit dem Stempel einer sterilen Spritze erfolgte die Zerstörung der Kapsel, so daß man eine Zellsuspension erhielt. Um nicht-zelluläre größere Bestandteile zu separieren, wurde die Suspension über einen *Cell Strainer*-Einmalfilter gegeben. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 300 x g. Zur Hemmung der Proliferation während der weiteren Kultivierung wurden die Zellen im Gammacell-Bestrahlungsgerät einer γ -Strahlung von 30 Gray ausgesetzt. Zwei weitere

Zentrifugationen bei 200 x g dienen dazu, störende Thrombozyten zu eliminieren. Die Zellen wurden jeweils in T-Zell-Medium resuspendiert. Anschließend konnten die so präparierten Milzzellen zur Restimulation eingesetzt werden.

3.1.3 J774A.1-Zellen

Bei diesen Zellen handelt es sich um eine murine Monozyten-Tumorzelllinie. Sie wurde kultiviert, um sie als Kontrollzellen für RT-PCRs, RPA, FACS-Analysen und Objektträgerfärbungen einzusetzen. Das Kultivierungsmedium besteht aus RPMI 1640 (GIBCO, Eggenstein) unter Zusatz von Penicillin/Streptomycin (100 U/mL / 100 µg/ml), L-Glutamin (2 mM) und FCS (10%). Die Zellen wurden in 260 mL-Zellkulturflaschen bei 37°C (5% CO₂, ges. Wasserdampf) kultiviert und wachsen adhärent am Flaschenboden, von dem sie mit einem Gummischaber leicht abgelöst werden können. Alle zwei Tage erfolgte eine Passage, bei der die Zellen nach dem Ablösen vom Boden neu auf eine Dichte von 5 x 10⁶ Zellen / mL eingestellt und mit neuem Medium versehen wurden.

3.1.4 XS52-Zellen

Zellen dieser murinen, von Langerhans-Zellen abstammenden, dendritischen Zelllinie aus BALB/c-Mäusen, (MHC-II-Hintergrund I-A^d), wurden zum einen als Kontrollzellen für FACS-Analysen und Objektträgerfärbungen eingesetzt, zum anderen auch in Immunpräzipitationen, RPAs, ELISA- und ELISPOT-Assays im Hinblick auf die Stimulierbarkeit durch Immunkomplexe untersucht. Bei diesen Zellen handelt es sich um teilweise in Suspension und teilweise adhärent wachsende Zellen, die durch stärkeres Klopfen an der Zellkulturflasche oder durch einen Gummischaber leicht vom Flaschenboden abgelöst werden können. Alle zwei bis drei Tage erfolgte eine Passage, bei der die Zellen in einer Zelldichte von 3 x 10⁵ Zellen/mL in einem Kultivierungsmedium aus *Basal Iscove* Medium (Biochrom KG, Berlin), FCS (2,5%), Penicillin/Streptomycin (100 U/mL / 100 µg/ml), L-Glutamin (2 mM), NEA (1%) und Natriumpyruvat kultiviert werden, dem final 5 ng/mL rekombinantes murines GM-CSF als Wachstumsfaktor frisch zugesetzt wurden.

3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren wurden die adhärennten Zellen (MMC), wie unter 3.1.1.2 beschrieben, abtrypsiniert und zentrifugiert. Bei den teilweise oder ganz in Suspension wachsenden Zellen (T-Zellen, XS52, J774A.1) wurde das Medium aus dem Überstand aufgefangen, die adhärennten Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert. Die anschließende Resuspension erfolgte in eiskaltem FCS (0,9 mL pro

Kryoröhrchen) unter Zugabe von DMSO (0,1 mL pro Kryoröhrchen, Fa. Sigma, Deisenhofen). Je 1 mL Zellsuspension wurde auf Eis in ein Kryoröhrchen überführt und über Nacht langsam bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Kryogefäße in flüssigem Stickstoff eingelagert.

Zum Auftauen wurden die Kryoröhrchen in der Hand erwärmt, bis die Zellklumpen sich lösten und in ein 15 mL Zentrifugenröhrchen überführt werden konnten. Tropfenweise wurde FCS dazugegeben, worauf eine zehnminütige Zentrifugation bei 1200 rpm (250 x g) bei 4°C folgte.

Die Zellen wurden im entsprechenden FCS-haltigem Medium resuspendiert und in eine kleine (50 mL) oder große (260 mL) Kulturflasche überführt. Nach zwei Tagen wurde das Medium vollständig gewechselt und die Zellen wie beschrieben inkubiert.

3.1.6 Stimulationsbedingungen von MMC

Die Zellen wurden, wie unter 3.1.1.2 beschrieben, bis zur Subkonfluenz kultiviert. Bei Experimenten, die unter proliferativen Bedingungen stattfanden, wurden die Stimuli nach einem Wechsel des 10% FCS-haltigen Mediums zugesetzt. Um die proliferierenden MMC auf Ruhebedingungen umzustellen, wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und anschließend auf serumfreies Medium mit Zusätzen (MCDB 302B, Sigma, Deisenhofen) umgesetzt. Nach 72 Stunden Inkubation erfolgte die Stimulation mit murinem IFN- γ (500-1000 U/ml; Fa. Boehringer, Mannheim), TNF- α (500 U/ml; Fa. Phillips, Bissendorf), rhIL-1 β (10 ng/ml, Hoffmann-La Roche, Basel), murinem IL-10, murinem IL-4 (je 10 ng/mL, Fa. TEBU, Frankfurt/Main), murinem GM-CSF (5 ng/mL), LPS_(E.coli) (10 μ g/mL, Fa. Sigma, Deisenhofen) für definierte Zeiträume von 24 bis 48 Stunden.

3.1.7 Zellzahlbestimmung nach Trypanblaufärbung

Aus einer Zellsuspension wurde ein Aliquot von 20 μ L entnommen und in einem Eppendorfgefäß mit Trypanblau 1:2 verdünnt. Die Zellanzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer. Diese besteht aus 9 Großquadraten, von denen jedes ein Zählvolumen von 0,1 μ L besitzt. Nachdem die Zellsuspension aufgebracht war, wurden 4 Großquadrate ausgezählt und die Zellanzahl folgendermaßen bestimmt:

$$\text{Zellanzahl / mL} = \frac{\text{Zellanzahl aus 4 Quadraten}}{4} \times 2 \text{ (=Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$

$$\text{Gesamtzellanzahl} = \text{Zellanzahl / mL} \times \text{Volumen der Zellsuspension}$$

3.2 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren

3.2.1 RNA-Isolierung

Die Extraktion von RNA aus in Suspension vorliegenden und adhären Zellen erfolgte unter Anwendung des RNA-Clean™ Systems (AGS, Heidelberg; nach CHOMCZYNSKI & SACCHI, 1987) Dabei handelt es sich um eine Kombination aus Guanidinthiocyanat und Phenol, die eine saubere und effiziente Präparation zytosolischer Gesamt-RNA ermöglicht. Zum Schutz vor Ribonukleasen wurden für die RNA-Isolierung nur autoklavierte Materialien verwendet. Nach entsprechender Stimulation wurden die MMC nach dem Abnehmen des Mediumüberstandes in der Kulturflasche zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die adhären Zellen mit 1 mL RNA-Clean versetzt und mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Bei Suspensionszellen wurden die Zellen vor der Zugabe des RNA-Clean bei 1200 rpm (250 x g) für 10 min abzentrifugiert und noch zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellysat wurde in einem 2 mL Eppendorfgefäß mit 0,1 Volumen Chloroform gründlich gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Danach folgte eine Zentrifugation bei 12.000 x g, 4°C für 30 min. Im nächsten Schritt wurde der RNA-haltige wässrige Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt, und die RNA bei -20°C über Nacht (oder für 20 min bei 4°C) gefällt. Nach der Fällung wurde die RNA 30 min bei 12.000 x g, 4°C zentrifugiert, das RNA-Pellet in 1 mL 4M LiCl aufgenommen, gründlich geschüttelt und mit 1 mL eiskaltem Isopropanol versetzt. Es folgte eine zweite Fällung bei -20°C über Nacht. Der LiCl-Fällungsschritt diente zur Erhöhung der Reinheit der RNA durch Entfernung von Polysacchariden. Im Anschluß daran wurde die RNA ein weiteres Mal für 30 min bei 12.000 x g, 4°C zentrifugiert, danach mit 80%igem eiskaltem Ethanol gewaschen, 15 min zentrifugiert, nach Abnehmen des Überstandes 5-10 min luftgetrocknet und in 50 µL sterilem Wasser aufgenommen. Zur Bestimmung der RNA-Menge wurde die gelöste RNA 1:150 verdünnt und anschließend die Extinktion bei 260 und 280 nm im Spektralphotometer gemessen. Dabei entsprach eine Extinktionseinheit bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml. Der Quotient der Extinktionswerte bei 260 und 280 nm diente als Maß für die Reinheit der RNA und lag im Idealfall bei 2. Zur Lagerung wurde die RNA-Lösung mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen 100%igem Ethanol versetzt und bei -20°C gelagert, um Degradation durch Ribonukleasen zu verhindern.

3.2.2 Agarosegelelektrophorese und Northern Blotting von RNA

Für die Elektrophorese und den Northern Transfer von RNA (nach MANIATIS et al. 1989) wurden autoklavierte, RNase-freie Materialien verwendet. In einem 1%igen

Agarose-Gel mit 6% Formaldehyd wurden gleiche Mengen RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Dazu wurde eine spezielle RNA-Flachbett-Elektrophoresekammer (Fa. BIORAD, München) verwendet, die mit 1x MOPS gefüllt wurde.

Vor dem Auftrag wurde die RNA je nach Menge mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 1µg/µL eingestellt. Je 20 µg RNA pro Ansatz wurden eingesetzt und mit 12,5 µL RNA-Probenpuffer versetzt. Es folgte eine Inkubation bei 56°C für 17 min, worauf die RNA-Probe kurz zentrifugiert und mit 6 µL RNA-Stoppuffer versetzt wurde (Zusammensetzung der Puffer siehe unten).

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurde das Gel auf einem UV-Tisch kontrolliert, um die Integrität der RNA sicherzustellen, sowie um die Auftragsmengen anhand der Anfärbungsintensität der 18S und 28S rRNA zu überprüfen.

Lösungen für die RNA-Gelelektrophorese:

10 x MOPS:

- 200 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure
- 50 mM Natriumacetat
- 10 mM EDTA
- mit NaOH auf pH 7 eingestellt

RNA-Stoppuffer:

- 50% Glycerol
- 1 mM EDTA pH 8
- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylencyanol FF

RNA-Probenpuffer (für einen Ansatz):

- 7,5 µL Formaldehyd
- 3 µL 10 x MOPS
- 2 µL Ethidiumbromid (200 ng/ml)

RNA-Gel, große Kammer (360 mL):

- 3,6 g Agarose
- 36 mL 5 x MOPS
- 67,5 mL Formaldehyd
- 260 mL Aqua bidest

Zur Vorbereitung auf den Northern-Transfer wurde das Gel zweimal für je 30 min in sterilem Wasser und anschließend einmal in 10 x SSC für 20 min leicht geschüttelt. Anschließend wurde das Gel mit der Oberseite nach unten auf eine mit Blotpuffer (10 x SSC) gesättigte Whatman-(3MM)-Filterpapierbrücke gelegt. Dabei ragte das Filterpapier an beiden Enden in eine mit Blotpuffer gefüllte Plastikwanne. Auf das Gel

wurde die Nylonmembran gelegt (Hybond N, Fa. Amersham, Braunschweig), darauf eine doppelte Lage auf Gelgröße geschnittenes 3MM-Filterpapier, das zuvor in Blotpuffer getränkt wurde. Vor dem Auflegen wurde die Membran kurz in steriles Aqua bidest. getaucht und für 5 Minuten in Blotpuffer getränkt (Äquibrierung). Das Gel wurde mit einem Rahmen aus Parafilm umgeben und danach eine Einmal-Strampelpeter-Windel aufgelegt. Diese wurde mit einem etwa 1 kg schweren Stahlblock beschwert. Der Parafilm-Rahmen sollte einen direkten Pufferstrom zur Windel verhindern. Luftblasen wurden verhindert, indem einige Male vorsichtig mit einer 10-ml-Pipette über die Filterpapiere gerollt wurde. Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt und nach ca. 18 Stunden beendet. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen, für 10 min bei 95°C getrocknet und anschließend für 90 Sekunden auf dem UV-Leuchttisch bestrahlt, um eine Kreuzvernetzung der RNA mit der Membran zu erreichen. Die Membran wurde anschließend lose in Klarsichtfolie eingepackt und bei 4°C gelagert.

3.2.3 Radioaktive Markierung von cDNA-Fragmenten

Bei der radioaktiven Markierung von cDNA-Fragmenten (Megaprime™ DNA Labelling Kit, Fa. Amersham, Braunschweig) hybridisierten zunächst Primer aus einem Gemisch von Hexanukleotiden aller möglichen Basensequenzen (Random Hexamer Gemisch) an die einzelsträngige Matrizen-DNA. Der komplementäre Strang wurde anschließend durch das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I an die 3'-OH-Gruppen der Primer in 5'-3'-Richtung synthetisiert. Dabei wurde α -³²P-markiertes dCTP (3000 Ci / mmol, Fa. NEN, Boston, USA) in den neu gebildeten DNA-Strang eingebaut.

Markierungsansatz lt. Herstellerprotokoll:

25-50 ng DNA in Tris-EDTA-Puffer (mit Aqua bidest. auf 30,5 μ L auffüllen)
5 μ L Random-Hexamere

Dies wurde 5 min. bei 95°C im Heizblock denaturiert

2,5 μ L AGT-Mix (dATP, dGTP, dTTP, je 1 mM)
5 μ L 10 x Klenow Reaktionspuffer
5 μ L α -³²P-dCTP (10 μ Ci/ μ L)
2 μ L Klenow-Fragment (= 2 U)

Der Ansatz wurde gemixt, kurz anzentrifugiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Um eine unspezifische Bindung radioaktiver Nukleotide an die Blotmembran zu minimieren, wurde überschüssiges α -³²P-dCTP vor dem Gebrauch der Sonde

abgetrennt. Dazu wurden mit TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,6, 1 mM EDTA, pH 8) gefüllte MicroSpin™ S-200 HR-Gelfiltrationssäulen (Fa. Pharmacia) verwendet. Das die markierte DNA enthaltende Eluat wurde 5 min. bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min. auf Eis abgekühlt. Es folgte die Messung des radioaktiven Einbaus im Szintillationszähler (2 µL Probenvolumen) und die Berechnung des Einbaus nach Cerenkov [MANIATIS et al., 1989].

$\text{cpm} \times \text{Eluatvolumen} / \text{Probenvolumen} = \text{Gesamteinbau}$

$\text{Gesamteinbau} / \text{Zielkonzentration} = \text{Volumen der Hybridisierungslösung}$

3.2.4 Hybridisierung von Northern und Southern Blot-Membranen mit radioaktiv-markierten cDNA-Sonden

Die Hybridisierungen wurden nach Maniatis et al. [MANIATIS et al., 1989] vorgenommen. Dabei wurden die Membranen zunächst mit 5 x SSPE gewaschen und anschließend für 2 Stunden bei 42°C mit einer Prähybridisierungslösung inkubiert, um unspezifische Bindungen der Sonde an die Membran zu minimieren. Nach Zugabe der radioaktiv markierten cDNA-Sonde folgte die Hybridisierung für 20-22 h im Hybridisierungsöfen bei 42°C. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit 2 x SSC, 15 min mit Waschlösung I (1 x SSC, 0,1% SDS) bei Raumtemperatur und schließlich 15 min mit Waschlösung II (0,2 x SSC, 0,1% SDS) bei 62°C im Schüttelwasserbad gewaschen, um unspezifische Bindungen zu lösen (Stringenzwäsche). Zwischen den Waschschrritten wurde jeweils die Aktivität der Membranen überprüft. Die noch feuchten Membranen werden in Klarsichtfolie eingeschlagen und in einer Autoradiografiekammer mit Verstärkerfolie mit einem X-Omat AR-Röntgenfilm (Kodak, Rochester, USA) exponiert.

Prähybridisierungslösung:

- 50% Formamid (entionisiert)
- 5 x SSPE
- 5 x Denhardt´s Lösung
- 400 µg/mL gescherte denaturierte Lachssperma-DNA
- 0,5% SDS
- 5% Dextransulfat

20 x SSPE:

- 3 M NaCl
- 200 mM NaH₂PO₄ x H₂O
- 20 mM EDTA
- pH 7,4

50 x Denhardt's Lösung:

- 5g Ficoll
- 5g Polyvinylpyrrolidon
- 5g BSA
- Aqua bidest. ad 500 mL

3.2.5 Ribonuklease Protection Assay

Mit dem *RiboQuant*[®] *Multi-Probe RNase Protection Assay System* von PharMingen, BD, Heidelberg, stand eine hochsensitive und spezifische Methode für die Detektion und Quantifizierung von mRNA Spezies zur Verfügung. Mit dem *Multi-Probe Template Set* mCK-5, ist es möglich, verschiedene Maus-Chemokin mRNA-Spezies und die konstitutiv exprimierten Gene GAPDH und L32 simultan aus einer Probe Gesamt-RNA zu quantifizieren. Die Methode basiert auf einer *in vitro* Transkription, bei der durch die eingesetzte DNA-abhängige Bakteriophagen-Polymerase T7 aus einem Plasmid mit Bakteriophagen Promotor, das als *template* fungiert, eine mit [³²P-UTP]-radioaktiv markierte antisense RNA-Sonde entsteht, die mit der eingesetzten Gesamt-RNA hybridisiert. Einzelstrang-RNA und überschüssige freie Sonde werden durch Zugabe von RNase verdaut. Die zurückgebliebenen "RNase-geschützten" Proben werden aufgereinigt, auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und durch Autoradiografie oder Phosphoimaging quantifiziert. Durch die vergleichende Analyse der Chemokin-mRNA-Menge mit den konstitutiv exprimierten *housekeeping* Gen-Transkripten L32 und GAPDH, kann die Menge der individuellen mRNA zwischen den Proben bestimmt und verglichen werden. Da die "ungeschützte" Sonde noch die flankierenden Sequenzen aus der *multiple cloning site* des Plasmids besitzt, ist die Länge der "geschützten" Probe 29 Nukleotide kürzer und kann daher schneller durch das Gel wandern, als die "ungeschützte" Probe.

Die Technik wurde angewandt, um die Expression bestimmter Chemokine nach Behandlung mit verschiedenen Stimuli und mit Immunglobulin-Immunkomplexen zu analysieren.

3.2.5.1 Sondensynthese (In vitro-Transkription)

Für die *in vitro*-Transkription wurde nach Anleitung des *In Vitro Transcription Kit* von PharMingen zunächst ein Mix aus folgenden Reagenzien in einem RNase-freien Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt:

- 1 µL Rnasin (RNase Inhibitor) (40 U/µL)
- 1 µL GACU Mix (GTP/ATP/CTP: 2,75 mM; UTP: 61µM)
- 2 µL DTT (100mM)
- 4 µL 5 x Transkriptions-Puffer

1 µL	RPA Template Set
5 µL	[α - ³² P] UTP (10 µCi/µL)
5 µL	Aqua bidest.
1 µL	T7 RNA-Polymerase (20 U/µL)

Gesamtvolumen: 20 µL

Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µL RNase-freier DNase (1 U/µL) und Inkubation für 30 min bei 37°C wurde die *in vitro* Transkription beendet. Um die Sonde von vorhandenen Proteinen und Glycerolbestandteilen zu reinigen, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion der Probe durchgeführt.

Dafür wurden folgende Reagenzien in das Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert:

26 µL	20 mM EDTA
25 µL	Tris-gesättigtes Phenol
25 µL	Chloroform:Isoamyl-Alkohol (50:1)
2 µL	Hefe tRNA (2 mg/mL)

Nach Zugabe von 26 µL EDTA wurde 1 µL von der Flüssigkeit abgenommen und die Radioaktivität in ips gemessen (Probenvolumen 1 µL). Die Flüssigkeiten wurden auf einem Vortex-Rüttler bis zur Herstellung einer Emulsion gemischt und bei 14.000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Es bilden sich zwei Phasen, von denen die obere, wässrige Phase vorsichtig abgenommen und in ein neues 1,5 mL Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt wurde. Zu dieser wässrigen Phase wurden 50 µL Chloroform:Isoamyl-Alkohol (50:1) gegeben und der Vorgang wiederholt. Wieder wurde nach der Zentrifugation die wässrige Phase abgenommen und zur Präzipitation mit 50 µL 4 M Ammonium-Acetat und 250 µL eiskaltem Ethanol abs. versetzt und bei -70°C für 30 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C für 30 min bei 14.000 x g. Der Überstand wurde verworfen und das Pelett 1 x mit 100 µL eiskaltem Ethanol (90%) gewaschen und unter den gleichen Bedingungen für 5 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pelett für 5-10 min getrocknet. Die Resuspendierung erfolgte in 50 µL 1 x Hybridisierungs-Puffer. Anschließend erfolgte die Messung des radioaktiven Einbaus (Probenvolumen 1 µL), die Berechnung des Einbaus nach Cherenkov und die Verdünnung der Sonde auf die gewünschte Zielkonzentration mit Hybridisierungs-Puffer.

Berechnung des radioaktiven Einbaus nach Cherenkov:

$$\text{cpm} \times (\text{Einbau vorher/nachher}) / \text{Probenvolumen} = \text{Gesamteinbau}$$
$$\text{Gesamteinbau/Zielkonzentration} = \text{Verdünnungsfaktor}$$

3.2.5.2 RNA Präparation und Hybridisierung

Pro Probenansatz wurden 5 µg in Wasser gelöste Gesamt-RNA in 0,5 µL Reaktionsgefäße vorgelegt und in der Vakuum-Zentrifuge getrocknet. Jede Probe wurde in 8 µL Hybridisierungs-Puffer resuspendiert. Zu diesem Ansatz wurden 2 µL der auf die entsprechende Konzentration ($mCK-5 = 3,0 \times 10^5$ cpm/µL) verdünnten radioaktiven Sonde gegeben. Um Verdunstung und Rückfluß zu vermeiden, wurde jeder Ansatz mit 50 µL Mineralöl überschichtet und im Thermocycler für 12-16 Stunden wie folgt inkubiert:

Segment 1: 90 °C, 2 min; 88°C, 1 min; 86°C, 1 min; 84°C, 1 min; 82°C, 1 min; 80°C, 1 min; 78°C, 1 min; 76°C, 1 min; 74°C, 1 min; 72°C, 1 min; 70°C, 1 min; 68°C, 1 min; 66°C, 1 min

Segment 2: 56°C, 12-16 Stunden

Segment 3: 37°C, 15 min

3.2.5.3 RNase Behandlung

Nach Beendigung des Programms wurden die Proben aus dem Thermocycler herausgenommen und 100 µL eines aus 2,5 mL 1 x RNase Puffer und 6 µL RNase A + T1 Mix (A: 800 ng/µL; T1: 250 U/µL) hergestellten RNase-Cocktails (für 20 Proben) unter das Mineralöl in die wässrige Phase pipettiert. Es folgte eine Inkubation im Thermocycler für 45 min bei 30°C. In der Zwischenzeit wurde ein Proteinase K-Mix (für 20 Proben) hergestellt:

390 µL 1 x Proteinase K Puffer
30 µL Proteinase K (10 mg/mL)
30 µL Hefe tRNA (2 mg/mL)

Von diesem Proteinase K-Mix wurden je 18 µL in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße vorgelegt und die mit RNase verdauten Proben (ohne Mineralöl) in diese Proteinase K Lösung überführt. Es folgte eine Inkubation für 15 min bei 37°C. Anschließend wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion mit 65 µL Tris-gesättigtem Phenol und 65 µL Chloroform-Isoamylalkohol durchgeführt. Die Flüssigkeiten wurden gut gemischt und für 5 min bei 14.000 x g zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen, in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben, mit 120 µL 4 M Ammonium-Acetat und 650 µL eiskaltem Ethanol abs. versetzt und für 30 min bei -70°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C für 5 min bei 14000 x g. Der Überstand wurde verworfen, das Pelett mit 100 µL eiskaltem Ethanol (90%) gewaschen und anschließend unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pelett komplett getrocknet, bevor es in 5 µL 1 x Probenpuffer resuspendiert wurde. Vor dem Probenauftrag auf

das Polyacrylamid-Gel wurden die Proben für 5 min bei 90°C denaturiert und anschließend auf Eis aufbewahrt.

3.2.5.4 Polyacrylamid-Gel

Ein Satz Gel-Platten (>40 cm lang) wurde gründlich mit Aqua bidest und Ethanol gereinigt. Anschließend wurde die große Platte mit 300 µL γ -Methacryoxypropyltrimethoxylisan und die kleine Platte mit 300 µL *Sigmacote* eingerieben, um das Anhaften des Gels an der großen Platte und die Trennung von der kleinen Platte nach dem elektrophoretischen Lauf zu gewährleisten. Beide Platten wurden getrocknet, wieder gereinigt, mit einem 0,4 mm "spacer" getrennt übereinandergelegt und mit Klammern fixiert. Zur Analyse der RNA wurde ein 8%iges Polyacrylamid-Gel verwendet: 31 g Harnstoff wurden in 31 mL Aqua bidest und 7,5 mL 10 x TBE gelöst, mit 11 mL einer Acrylamid/Bisacrylamid-Stammlösung (38% / 2%), sowie 450 µL 10% APS (Ammonium-Persulfat) versetzt und unter Vakuum entgast. Nach Zugabe von 75 µL TEMED wurde das Gel rasch zwischen die zwei vorbereiteten Glasplatten gegossen. Nach dem einfüllen der Acrylamid-Lösung wurden beide Probenkämme mit der stumpfen Seite voran so zwischen den Platten plaziert, daß sie etwa 5 mm in die Flüssigkeit tauchten und mit Klammern fixiert. Nach ca. 1 Stunde bei RT war das Gel in horizontaler Lage auspolymerisiert. Vor dem Gellauf wurden die Kämme entfernt, der Auftragsbereich mit Aqua bidest gespült und die Gelplatte in die Elektrophoreseapparatur (BRL, Mod. S2) gespannt. Als Oberpuffer wurde 0,5 x TBE und als Unterpuffer 1 x TBE (0,09 M Tris/Borat pH 8,0; 1 mM EDTA) verwendet. Die Kämme wurden mit den Spitzen ins Gel zeigend ca. 2 cm tief eingesetzt. Vor dem Auftragen wurden die Proben für 5 min bei 90°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, bis die Geltemperatur 50°C betrug. Nun konnten die Proben und auch eine Verdünnung der Sonde als Größenmarker in die Probenaschen aufgetragen und bei einer konstanten Stromstärke von 80 Watt aufgetrennt werden. Durch Zugabe von 100 mL 3 M Natriumacetat in die untere Pufferkammer ca. 1 Stunde vor Laufende wurde im unteren Bereich des Gels die Laufgeschwindigkeit verlangsamt, so daß eine gleichmäßigere Auftrennung der Banden erzielt werden konnte. Der Lauf wurde beendet, wenn die Bromphenolblau-Bande das Ende des Gels erreicht hatte. Danach wurde die kleine Platte entfernt, das Gel zuerst für 20 min in Fixierungslösung (5% Methanol, 5% Essigsäure) gelegt, in Aqua dest. gewässert und anschließend im Heizofen bei 50°C getrocknet. Die Radioaktivität wurde in einem Phosphoimager quantifiziert oder bei -70°C unter Verwendung von Verstärkerfolien mit einem Kodak BioMax MR Film exponiert.

3.2.6 PCR

Der PCR-Prozeß ist eine sehr effektive Methode zur *in-vitro*-Amplifikation von DNA-Segmenten durch mehrere Inkubationsschritte bei unterschiedlichen Temperaturen. Diese Technik macht sich die Eigenschaften der aus Archaeobakterien isolierten DNA-Polymerasen zunutze, die in mehreren aufeinanderfolgenden Zyklen auch nach Hitzedenaturierung der DNA bei 95°C noch biologische Aktivität aufweisen und DNA vervielfältigen können.

In unserer Arbeitsgruppe ist eine Methode etabliert, mit der sich die Bedingungen der PCR-Methodik so gestalten lassen, daß eine Semi-Quantifizierung der PCR-Ergebnisse möglich ist. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Ausgangsmenge RNA wurden in Parallelansätzen Primer für β -Tubulin und die jeweilige gesuchte cDNA verwendet. Bei β -Tubulin handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Genprodukt, das auch nach unterschiedlichen Stimulationsbedingungen keine Veränderungen in der cDNA-Ausbeute zeigt. Diese Methode erlaubt es, durch einen Vergleich der Ethidiumbromid-gefärbten β -Tubulin-cDNA-Banden Aussagen über die RNA-Ausgangsmengen zu treffen.

Um die semi-quantitative Technik zu verbessern und DNA-Mengen vergleichen zu können, wurde dann das Verfahren einer "Batch"-PCR benutzt, das heißt, die reverse Transkription wurde in einem mindestens doppelten Ansatz durchgeführt und das Produkt im Anschluß auf mehrere Amplifikationsansätze aufgeteilt. Von diesen wurde einer als Kontrollansatz mit Primern für β -Tubulin versehen. Den weiteren Ansätzen wurden die entsprechenden anderen Primer (Fc γ RI, Fc γ RII etc.) beigegeben. Für die β -Tubulin-Kontrollansätze wurden die Zykluszahlen so ausgetestet, daß die auf das Gel aufgetragene cDNA-Menge nicht im Plateau, sondern im ansteigenden Teil der Färbeintensität lag. Dazu wurden bei gleichen RNA-Mengen unterschiedliche Zykluszahlen (28 - 40 Zyklen) in der PCR eingesetzt und die synthetisierten cDNA-Mengen in einem analytischen DNA-Gel verglichen. Die optimale Zykluszahl für β -Tubulin lag bei 28 Zyklen, während sie für z.B. den Fc γ -Rezeptor I bei 40 Zyklen lag.

Die Polymerase-Ketten-Reaktion mit einer vorgeschalteten reversen Transkription (RT-PCR) wurde in einem Thermocycler der Firma Landgraf, Hannover, durchgeführt. Dazu wurde im ersten Schritt die aus den entsprechenden Zellen gewonnene RNA (pro Ansatz wurde 1,5 μ g RNA aus MMC und 0,5 μ g RNA aus J774A.1 eingesetzt) durch eine reverse Transkription in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben, welche dann im zweiten Schritt mit Hilfe von Taq-DNA-Polymerase amplifiziert wurde. Die so gewonnene DNA konnte anschließend in Agarosegelelektrophoresen analysiert werden.

A) Reverse Transkription

5 x RT-PCR-Puffer (1 x)	4 µL
dNTP-Mix je 10 mM (ATP, GTP, CTP, TTP)	4 µL
DTT (1mM)	2 µL
Oligo d(T) ₁₆ (2,5µM)	1 µL
RNase Inhibitor (1 U/µL)	1 µL
steriles Aqua bidest.	6,5 µL
RNA (0,5-1,5 µg)	1 µL
Reverse Transkriptase (1 U/µL)	0,5 µL

Gesamtvolumen: 20 µL

Um Verdunstung und Rückfluß zu vermeiden, wurde der Ansatz mit 50 µl Mineralöl (Sigma) überschichtet und wie folgt im Thermocycler inkubiert:

Segment 1: 23°C, 10 min
 Segment 2: 37°C, 60 min
 Segment 3: 95°C, 5 min
 Segment 4: 4°C, 5 min

B) DNA-Amplifikation

Für den zweiten Reaktionsschritt wurde in einem weiteren Mikroreaktionsgefäß ein zweiter Master-Mix angesetzt, der je nach Primerpaar optimierte Mengen von MgCl₂ enthält:

Reaktionsansatz für β-Tubulin (2,1 mM MgCl₂):

10 x PCR-Puffer (1 x)	10 µL
50 mM MgCl ₂ -Lösung (2,1 mM)	3 µL
dNTP-Mix je 10 mM (ATP, GTP, CTP, TTP)	8 µL
steriles Aqua bidest.	56,5 µL
Primer-Mix sense+antisense (je 0,2 µM)	3 µL
RT-Template	19 µL
Taq-DNA-Polymerase	0,5 µL

Gesamtvolumen: 100 µL

Reaktionsansatz für Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, FcR γ -Kette (1,5 mM MgCl₂):

10 x PCR-Puffer (1 x)	10 μ L
50 mM MgCl ₂ -Lösung (0,9 mM)	1,8 μ L
dNTP-Mix je 10 mM (ATP, GTP, CTP, TTP)	8 μ L
steriles Aqua bidest.	57,7 μ L
Primer-Mix sense+antisense (je 0,2 μ M)	3 μ L
RT-Template	19 μ L
Taq-DNA-Polymerase	0,5 μ L

Gesamtvolumen: 100 μ L

Nach der erneuten Überschichtung mit 50 μ L Mineralöl folgte eine Inkubation im Thermocycler unter folgenden Bedingungen, die für jedes Primerpaar optimiert worden sind. ("Hot Start" PCR nach Hosta u. Flick, U.S. Biochemical Corporation):

Temperaturprofil für Fc γ RI, Fc γ RII, γ -Kette („cool-down-PCR“):

Segment 1:	95°C, 5 min, 1 Zyklus
Segment 2:	85°C, 5 min, 1 Zyklus; hier Zugabe von 0,5 μ L Taq-DNA-Polymerase (2,5 U)
Segment 3:	95°C, 1 sec, 1 min; 60°C (<i>Annealing</i> -Temperatur), 1 sec, 1 min; 72°C, 2 min; 2 Zyklen
Segment 4:	95°C, 1 sec, 1 min; 59°C (<i>Annealing</i> -Temperatur), 1 sec, 1 min; 72°C, 2 min; 2 Zyklen
Segment 5:	95°C, 1 sec, 1 min; 58°C (<i>Annealing</i> -Temperatur), 1 sec, 1 min; 72°C, 2 min; 2 Zyklen
Segment 6:	95°C, 1 sec, 1 min; 57°C (<i>Annealing</i> -Temperatur), 1 sec, 1 min; 72°C, 2 min; 2 Zyklen
Segment 7:	95°C, 1 sec, 1 min; 56°C (<i>Annealing</i> -Temperatur), 1 sec, 1 min; 72°C, 2 min; 2 Zyklen
Segment 8:	95°C, 1 sec, 1 min; 55°C (<i>Annealing</i> -Temperatur), 1 sec, 1 min; 72°C, 2 min; 30 Zyklen
Segment 9:	60°C, 7 min, 1 Zyklus
Segment 10:	Abkühlung auf 4°C

Temperaturprofil für Fc γ RIII:

Segment 1:	95°C, 5 min, 1 Zyklus
Segment 2:	85°C, 5 min, 1 Zyklus; hier Zugabe von 0,5 μ L Taq-DNA-Polymerase (2,5 U)
Segment 3:	95°C, 1 sec, 1 min; 60°C (<i>Annealing</i> -Temperatur), 1 sec, 1 min; 72°C, 2 min; 2 Zyklen

- Segment 4: 95°C, 1 sec, 1 min; 59°C (*Annealing*-Temperatur), 1 sec, 1 min;
72°C, 2 min; 38 Zyklen
- Segment 5: 60°C, 7 min, 1 Zyklus
- Segment 6: Abkühlung auf 4°C

Temperaturprofil für β -Tubulin:

- Segment 1: 95°C, 5 min, 1 Zyklus
- Segment 2: 85°C, 5 min, 1 Zyklus; hier Zugabe von 0,5 μ L Taq-DNA-Polymerase (2,5 U)
- Segment 3: 95°C, 1 min; 55°C (*Annealing*-Temperatur), 1 min;
72°C, 2 min; 28 Zyklen
- Segment 4: 60°C, 7 min, 1 Zyklus
- Segment 5: Abkühlung auf 4°C

Untersuchung der Zellkultur auf Mykoplasmenkontamination mittels PCR

Mykoplasmen sind Prokaryonten, deren Synthesefähigkeit aufgrund ihres kleinen Genoms sehr beschränkt ist, weswegen sie ausschließlich eine parasitäre Lebensweise haben. Sie gehören zu den häufigsten Kontaminanten in der Gewebekultur, wobei die Kontamination durch den Menschen oder durch Substanzen, die der Zellkultivierung dienen, erfolgen kann. Um zu verhindern, daß die benutzten MMC durch Mykoplasmen kontaminiert und so voraktiviert, bzw. in ihren biochemischen Eigenschaften verändert sind, wurde in regelmäßigen Abständen ein Mycoplasmen-Screening auf der Basis des Nachweises spezifischer Mycoplasmen-DNA durchgeführt. Hierzu wurde zum Amplifizieren der DNA die PCR benutzt, die gegenüber anderer Verfahren den Vorteil hat, daß schon im picomolaren Bereich Mycoplasmen-DNA detektiert werden kann, was etwa dem Genom von 10 - 50 Mycoplasmen pro Probe entspricht. Um möglichst viele Spezies abzudecken, wird das Verfahren einer „*nested PCR*“ angewendet (Ref.: Prof. Dr. Hauser, GBF Braunschweig).

Der Nachweis beruht auf der Amplifikation der DNA, die für die 16S-rRNA kodiert. Dabei sind die Primer so gewählt, daß nur Mykoplasmen, Acholeplasmen und ein Ureaplasma-Stamm erfaßt werden. Das Amplifikationsprodukt wird dann gelelektrophoretisch nachgewiesen. Mit dieser Methode werden mindestens 25 verschiedene Mykoplasmen-Spezies erfaßt. Unter diesen befinden sich 5 Vertreter, die man häufig in Zellkulturen findet.

Für diesem Test wurden die Überstände von in Kultur befindlichen Zellen verwendet. Dazu wurden 1,5 mL Überstand unter sterilen Bedingungen aus der Kulturflasche abgenommen, in 1,5 mL Eppendorf-Gefäße überführt und bei 12.000 x g für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in 100 μ L sterilem Aqua

bidest. resuspendiert und für 3 min bei 95°C im Heizblock inkubiert. Nach dieser Inkubation erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 12.000 x g. Vom Überstand wurden 10 µL in der PCR eingesetzt.

(Methode Prof. Dr. Hauser, GBF Braunschweig)

Reaktionsansatz:

dNTP-Mix: (bestehend aus dATP, dGTP, dCTP und dTTP, jeweils 2 mM)	1 µL
5 x RT-Puffer	4,5 µL
MPM-Primer (Äußere Primer 500-520 bp)	2 µL
Aqua bidest.	27,5 µL
Probe (Überstand)	10 µL
Taq-Polymerase-Gemisch (1 Teil RT-Puffer 5x, 2,5 Teilen Taq-DNA-Polymerase und 6,5 Teilen Aqua bidest.)	5 µL

Gesamtvolumen: 50 µL

Dieser Ansatz wird mit 50 µL Mineralöl überschichtet und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler durchgeführt:

Temperaturprofil:

Segment 1:	90°C, 10 min; 1 Zyklus
Segment 2:	94°C, 30 sec; 67°C, 30 sec; 72°C, 1 min; 30 Zyklen
Segment 3:	72°C, 10 min; 1 Zyklus

Für den zweiten Lauf wurden 10 µL des PCR-Produktes des ersten Laufes eingesetzt, die anderen Substanzen blieben gleich; es wurden statt der MPM-Primer MIP-Primer (innere Primer) zugegeben und unter folgenden Bedingungen im Thermocycler inkubiert.

Temperaturprofil:

Segment 1:	90°C, 10 min; 1 Zyklus
Segment 2:	94°C, 30 sec; 67°C, 30 sec; 63°C, 30 sec; 72°C, 1 min; 30 Zyklen
Segment 3:	72°C, 10 min; 1 Zyklus

3.2.7 Agarosegelelektrophorese und Southern Blotting von DNA

3.2.7.1 Agarosegel

Die gleichen Mengen DNA wurden mit DNA-Probenpuffer versetzt und in einem 1,5-2%igen Agarosegel, dem 0,5 µg/mL Ethidiumbromid hinzugefügt waren, in einer mit TAE-Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt. Parallel zu den Proben wurden Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Nach Beendigung des Laufs wurde das Gel unter ultraviolettem Licht fotografiert, bzw. über ein Video-Imaging-System digitalisiert und im Programm *Molecular Analyst* bearbeitet.

Lösungen für das DNA-Gel:

DNA-Probenpuffer:

- 30% Glycerol
- 20% Sucrose
- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylencyanol FF

TAE-Laufpuffer:

- 40 mM Tris
- 20 mM Eisessig
- 1 mM EDTA, pH 8

3.2.7.2 Southern Blotting

Zur Vorbereitung auf den Southern-Transfer wurde das Gel mit einem Skalpell zurechtgeschnitten und für 45 min in einer Lösung aus 1,5 M NaCl / 0,5 M NaOH bei RT unter leichtem Schütteln denaturiert. Anschließend wurde das Gel kurz in Aqua dest. gewässert und 2 x in einer Lösung aus 1,5 M NaCl / 1 M Tris-HCl, pH 8,0 für je 20 min bei RT neutralisiert.

Mit der Oberseite nach unten wurde das Gel nun auf eine mit Blotpuffer (10 x SSC) gesättigte Whatman-(3MM)-Filterpapierbrücke gelegt. Dabei ragte das Filterpapier an beiden Enden in eine mit Blotpuffer gefüllte Plastikwanne. Auf das Gel wurde die zurechtgeschnittene Nylonmembran gelegt (Hybond N, Fa. Amersham), die zuerst in Aqua bidest. und dann in 10 x SSC äquilibriert wurde. Darauf folgte eine doppelte Lage auf Gelgröße geschnittenes, in Blotpuffer getränktes 3MM-Filterpapier. Das Gel wurde mit einem Rahmen aus zurechtgeschnittenen Röntgenfilmstreifen umgeben und danach eine Einmal-Strampelpeter-Windel aufgelegt. Diese wurde mit einem etwa 1 kg schweren Stahlblock beschwert. Der Röntgenfilm-Rahmen sollte einen direkten Pufferstrom zur Windel verhindern. Luftblasen wurden verhindert, indem einige Male vorsichtig mit einer 10-ml-Pipette über die Filterpapiere gerollt wurde.

Der Transfer wurde über Nacht durchgeführt und nach ca. 18 Stunden beendet. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen, für 10 min bei 95°C getrocknet und anschließend für 90 Sekunden auf dem UV-Leuchttisch bestrahlt, um eine Kreuzvernetzung der RNA mit der Membran zu erreichen. Die Membran wurde anschließend lose in Klarsichtfolie eingepackt und bei 4°C gelagert.

3.2.8 Gelextraktion und Aufreinigung von cDNA-Fragmenten

PCR-Produkte oder cDNA-Fragmente, die aus Plasmiden herausgeschnitten wurden und die als cDNA-Sonden für nachfolgende Hybridisierungsexperimente verwendet werden sollten, wurden unter Verwendung des *Quiquick[®] Gel Extraction Kit* (Fa. Qiagen, Hilden) aus Agarosegelen extrahiert. Dazu wurden die entsprechenden Ethidiumbromid-gefärbten cDNA-Banden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten, die DNA-haltigen Gelstücke in eine Pufferlösung überführt und unter Erwärmung auf 50°C geschmolzen. Anschließend wurde die Lösung auf spezielle Säulen gegeben und zentrifugiert, wobei die DNA am Säulenmaterial adsorbierte. Nach einmaligem Waschen mit 70% Ethanol wurde die Nukleinsäure mittels eines TE-Elutionspuffers von der Säule gelöst und konnte nach Bestimmung des DNA-Gehaltes für Markierungen verwendet werden.

3.2.9 cDNA-Analyse mit Restriktionsendonukleasen

Zum Herausschneiden von cDNA-Fragmenten aus Plasmiden sowie zum Verifizieren der Identität von PCR-Produkten wurden Restriktionsendonukleasen eingesetzt, die an bestimmten, für jedes Restriktionsenzym spezifischen Nukleotidsequenzen den DNA-Doppelstrang spalten. Um aus den Plasmiden die cDNA-Fragmente herauszuschneiden, die in den Hybridisierungsexperimenten als radioaktiv-markierte, spezifische Sondentemplates für MCP-1, Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII und die γ -Kette eingesetzt werden sollten, wurden je 10 μ g Plasmid-DNA mit je 20 U des entsprechenden Restriktionsenzym und einem Restriktionspuffer versetzt und zwei Stunden lang bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, die spezifischen Banden ausgeschnitten und aufgereinigt (s. 3.2.8). Für die Analyse von Fc γ RI α - und FcR γ -cDNA wurden RT-PCR-Produkte der murinen Monozytenzelllinie J774A.1 verwendet, die in den T-Vektor pGEM-T kloniert und mit *Pst* I / *Sac* II (FcR γ -Kette) bzw. *Afl* II/ *Sal* I (Fc γ RI α) wieder aus dem Vektor herausgeschnitten wurden. Sonden für Fc γ RII und Fc γ RIII α wurden aus Fc γ RIIb1- und Fc γ RIII-cDNA generiert, die in den pUC9-Vektor kloniert vorlagen und von J. Ravetch zur Verfügung gestellt wurden. Das Sondentemplate der Fc γ RIIb1-cDNA wurde mittels *Bgl* II/ *Pst* I Verdau generiert. Das entstandene Fragment hybridisiert mit den transmembranen und zytoplasmatischen Domänen, die nicht-homolog mit den extrazellulären Bereichen des Fc γ RIII sind. Die Fc γ RIII-cDNA

wurde mit *Kpn* I/ *Pst* I verdaut, das 600 bp große 3'-Fragment hybridisiert ebenfalls mit den nicht-homologen transmembranen und cytoplasmatischen Domänen. Für die Analyse von MCP-1-mRNA wurden RT-PCR-Produkte der monozytären Zelllinie J774A.1 in den Vektor pGEX-2T kloniert, die mittels *Bam* HI und *Eco* RI aus dem Vektor herausgeschnitten wurden.

3.3 Proteinbiochemische Techniken

3.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Proteingehalt der Lysate, der hitzeaggregierten Antikörper und des verwendeten anti-MCP-1-Antikörpers wurde nach der Methode von M. Bradford bestimmt. Es handelt sich dabei um ein für 96-Well-Platten modifiziertes Verfahren. Die Methode beruht auf der Bindung von *Coomassie Blue* an Proteine. Bei der Bindung dieses Farbstoffes an Protein kommt es zu einer Farbänderung und somit zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums. Die Färbelösung ist aus den Komponenten *Coomassie Brilliant Blue* GT-250, Phosphorsäure (55% v/v) und 15% Methanol zusammengesetzt. Um eine Eichgerade zu erstellen, wurde eine Stammlösung aus bovinem Serumalbumin (BSA) in PBS hergestellt (1 mg/ml), aus der Verdünnungen mit den Konzentrationen 5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35 µg/mL hergestellt worden sind. Um die Proteinkonzentration der unbekanntenen Proben zu ermitteln, wurden jeweils 100 µL unverdünnte, 1:10, bzw. 1:100 mit PBS verdünnte Proben als Doppelwert aufgetragen und mit je 100 µL Färbelösung versetzt. Nach einer 10-15 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte bei 590 nm im EIA-Reader MR 5000 (Dynatech, Denkendorf) abgelesen.

3.3.2 Immunpräzipitation

Bei den teilweise oder ganz in Suspension wachsenden Zellen (XS52, J774) wurde das Medium aus dem Überstand aufgefangen, die adhärennten Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und zentrifugiert. Das Pelett wurde resuspendiert und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Die Zellen wurden für 10 min bei 250 x g, 4°C zentrifugiert und das Zellpelett in 1 mL Immunpräzipitationspuffer aufgenommen und in ein autoklaviertes 2 mL Reaktionsgefäß überführt. Nach einer Inkubation für 45 min bei 4°C wurde für 30 min bei 10.000 x g, 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand abgenommen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde das Lysat 1:100 bis 1:500 verdünnt und ein Bradford-Test durchgeführt. Anschließend wurden 0,5 bis 1 mg/mL Aliquots dieses Lysat mit dem entsprechenden Antikörper, der die murinen FcγRII und FcγRIII erkennt (2.4G2), in der Konzentration von 10 µg Antikörper/mL versetzt und über Nacht im "head over head" Schüttler bei 4°C inkubiert. Im Anschluß daran wurden pro Ansatz 20 µL Protein G Sepharose "4 fast

flow“, die kurz vorher mit PBS/ 0,1% BSA/ 0,05% Natrium-Azid gewaschen wurde, zu den Proben gegeben und für 4 Stunden bei 4°C im “*head over head*” Schüttler inkubiert, damit die Sepharose-*beads* an die Fc-Teile der Antikörper binden können. Es folgten vier Waschschriffe mit frisch angesetztem Waschpuffer, wobei der Überstand jeweils vorsichtig abgenommen und verworfen wurde. Das Pelett wurde mit 30 µL Proben-Puffer nach Laemmli (ohne β-Mercaptoethanol) versetzt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht, wodurch sich die Sepharose-*beads* mit dem Antikörper von den Rezeptor-Proteinen trennen. Die Proben wurden bis zum Gel-Auftrag bei –80°C gelagert.

Lösungen für die Immunpräzipitation:

Lysepuffer:

200 mL 0,5 M EDTA (125 mM)
1,21 g TRIS (10 mM)
8,77 g NaCl (150 mM)
auf pH 7,8 einstellen

Immunpräzipitationspuffer für 1 mL/Ansatz:

959 µL 1% Digitonin (100 mg/10 mL Lysepuffer; frisch eingewogen!)
20 µL PMSF (2 mM)
1 µL Leupeptin (1 mM)
10 µL Iodoacetamid (1 mM)
10 µL Benzamidin (1 mM)

Waschpuffer:

10 mg Digitonin/10 mL Lysepuffer (frisch angesetzt)
200 µL PMSF

Proben-Puffer nach Laemmli, 3-fach (Øβ-ME (Mercaptoethanol))

SDS 6% (v / v)
Glycerol 30% (v / v)
Tris-Puffer, pH 6,8 0,0625 M
Bromphenolblau 0,003% (w / v)
Aqua bidest.

3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die verschiedenen Komponenten eines Gemisches aus Proteinen können durch die Elektrophorese aufgetrennt und näher charakterisiert werden. Um zu vermeiden, daß die unterschiedlichen Ladungsverhältnisse der Proteinkomponenten zu

unterschiedlichem Wanderungsverhalten führen, werden die Proteine auf einem Gel mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgetrennt. Es dient zum einen zur Denaturierung und somit zur Entfaltung der Proteine, zum anderen lagert es sich an die hydrophoben Bereiche der Aminosäureketten an und maskiert mit seiner starken negativen Ladung die Eigenladung der Proteine. Durch diese Effekte kann aus dem Wanderungsverhalten eines Proteins im Polyacrylamidgel auf dessen Größe, bzw. auf die Größe seiner Untereinheiten geschlossen werden (apparentes Molekulargewicht). Um dieses zu optimieren, können die Eigenschaften eines Gels (Porengröße) variiert werden. Zur Analyse der Fc γ -Rezeptor-Proteine war ein 10%iges Gel optimal. Vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel erfolgte eine Fokussierung der Proteine im Sammelgel.

Durchführung:

Trenngel:

Acrylamid / Bisacrylamid (29% / 1%)	3,75 mL
1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8	1,875 mL
Aqua dest.	1,125 mL
SDS (1%)	0,75 mL
APS (Ammoniumperoxidsulfat, 10% w / v)	40 μ L
TEMED (Tetramethyldiamin, 10% v / v)	40 μ L

Nach der Zugabe von TEMED und APS wurde die Trenngel-Lösung rasch zwischen zwei in der Gießvorrichtung angebrachte Glasplatten gegeben. APS bildet in Wasser freie Radikale, die auf die Acrylamidmoleküle übergehen und eine Kettenreaktion auslösen. Bisacrylamid dient zur Vernetzung der Ketten, die Reaktion wird durch TEMED katalysiert. Nach etwa 15 Minuten war das Gel soweit auspolymerisiert, daß das Sammelgel darauf gegossen werden konnte.

Sammelgel:

Acrylamid / Bisacrylamid (29% / 1%)	0,75 mL
0,5 M Tris Puffer, pH 6,8	0,562 mL
SDS (1%)	0,45 mL
Aqua dest.	2,737 mL
APS	48 μ L
TEMED	20 μ L

In das Sammelgel wurde sofort nach dem Gießen der Kamm für die Probestaschen gesteckt. Nach etwa einer Stunde war das Gel auspolymerisiert, das Gel konnte in die Laufkammer gehängt, der Kamm entfernt werden. Die Laufkammer wurde mit Laufpuffer befüllt, der folgende Zusammensetzung hatte:

Laufpuffer:

Glycin (2 M)	460 mL
Tris 2 M	60 mL
SDS (10%, w / v)	48 mL
Aqua dest.	4232 mL

der Puffer wurde auf einen pH = 8,8 eingestellt.

Die in Proben-Puffer nach Laemmli aufgenommenen Immunpräzipitations-Proben (siehe oben) wurden für 10 min. im Heizblock bei 95°C erhitzt. Parallel zu den Proben wurden Molekulargewichtsstandards aufgetragen. Beides wurde wie die Proben vorbehandelt. Zum Fokussieren des Proteins im Sammelgel wurde initial eine Stromstärke von 20 mA angelegt, die nach Eintritt der Proben ins Trenngel auf 40 mA erhöht wurde. Nach etwa 1,5 Stunden wurde der Lauf beendet, wenn die Bromphenolblaubande das Ende des Gels erreicht hatte.

3.3.4 Western Blot

Um zu überprüfen, ob ein bestimmtes Protein in den in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteinfractionen enthalten ist, transferiert man die Proteine aus dem Gel auf eine Polycarbonatmembran und inkubiert sie anschließend mit spezifischen, gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Antikörper. Hierbei stellt die Kombination aus der Immunpräzipitationstechnik (s.o.) und dem Western-Blot eine Möglichkeit zur weiteren Erhöhung der Nachweisspezifität für gering konzentrierte Proteinspezies dar. Mittels verschiedener Techniken können dann die gebundenen Antikörper detektiert werden (*Fast-Red*-Färbung, Elektrochemolumineszenz).

Um die Fcγ-Rezeptoren nachzuweisen, wurde zunächst eine SDS-Gelelektrophorese durchgeführt (siehe oben). Anschließend wurde das Gel aus der Kammer entfernt und geblottet. Dazu wurde zunächst die Blotapparatur aufgebaut. Es wurden insgesamt 18 Filterpapiere (Whatman-Filter, 3MM) in der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Von diesen wurden für 15 Minuten 6 in Puffer A gelegt, 3 in Puffer B und 9 in Puffer C getränkt.

Puffer A (konzentrierter Anodenpuffer):	20% Methanol	
	0,3 M Tris/HCl	pH 10,4
Puffer B (schwacher Anodenpuffer):	20% Methanol	
	0,025 M Tris/HCl	pH 10,4
Puffer C (Kathodenpuffer):	20% Methanol	
	0,04 M Aminocaprinsäure	
	0,025 M Tris/HCl	pH 9,4

Eine Immobilonmembran wurde in der Größe des Gels zurechtgeschnitten, 30 Sekunden lang in Methanol aktiviert, für 5 Minuten in Aqua dest. inkubiert und für 5 Minuten im Puffer B äquilibriert. Es wurde eine SemiDry-Blotapparatur verwendet; die Filterpapiere aus Puffer A wurden auf die Anode gelegt, darauf folgten die in Puffer B getränkten, darauf das Gel und die Immobilonmembran. Auf diese wiederum wurden die 9 in Puffer C getränkten Filterpapiere gelegt. Es war darauf zu achten, daß sich keine Luftblasen zwischen den einzelnen Komponenten des Blots befinden. Das Blotten erfolgte mit einer Stromstärke von 0,8 mA / cm² für 1,5 Stunden. Anschließend wurde die Membran einer Coomassiefärbung unterzogen, analysiert und mit Entfärber (50% Methanol in Aqua dest.) entfärbt. Nach kurzem Waschen der Membran in PBS / Tween-20 (0,05%) wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer (PBS mit 0,05% Tween-20 und 1% BSA) inkubiert, um das unspezifische Binden der Antikörper zu vermeiden. Anschließend wurde der Blocking-Puffer abgegossen und der primäre, Anti-Fc γ RII-Antikörper (Ly-17.2 aus der Maus) in Blockingpuffer 1: 1000 verdünnt (finale Konzentration 1 μ g/mL) zugegeben. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde der Antikörper abgegossen, die Membran viermal für 15 Minuten unter Schwenken mit Waschpuffer (PBS mit 0,05% Tween-20) gewaschen und für eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit einem Meerrettich-Peroxidase (POD) gekoppelten rabbit-anti-mouse (Kaninchen-anti-Maus)-Antikörper (1:1000 verdünnt in PBS / 0,05% Tween-20, 0,1% BSA, entspricht 1 μ g/mL) inkubiert. Anschließend erfolgte wieder viermaliges Waschen in Waschpuffer.

Zur Detektion wurde anschließend die ECL-Reaktion durchgeführt. ECL (Elektrochemolumineszenz) ist definiert als eine Lichtemission, die durch Energieabgabe einer Substanz zustandekommt, die aus einem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückkehrt. Im angewandten System wird diese Energieabgabe durch eine chemische Reaktion verursacht, in der Luminol durch Peroxidase unter Zugabe von Wasserstoffperoxid unter alkalischen Bedingungen oxidiert wird. Dabei wird das Luminol in einen angeregten Zustand versetzt. Zum Erreichen des Grundzustandes wird Licht mit einer Wellenlänge von 428 nm emittiert, das einen Röntgenfilm belichtet.

Verwendet wurde das ECL-System der Firma Amersham. Es besteht aus zwei Komponenten, der Lösung 1 und der Lösung 2. Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper und den erforderlichen Waschschritten wurde die Membran mit 2 mL Lösung 2 bedeckt. Sofort danach wurden 2 mL Lösung 1 zugegeben und die Membran für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Die Flüssigkeit wurde abgegossen, die Membran mit der Proteinseite nach oben auf einem Filterpapier getrocknet. Anschließend wurde sie in der Dunkelkammer in eine Filmkassette gelegt und mit einer Overheadfolie bedeckt, um ein Befeuchten des Films zu vermeiden. Der Film (verwendet wurde ein Kodak BioMax MR-Autoradiografie-Film) wurde mit der glatten, emulsionsbeschichteten Seite auf die Folie gelegt, für 5 Minuten exponiert und entwickelt. Je nach Bandenintensität wurden anschließend unterschiedliche

Expositionszeiten gewählt. Dabei war darauf zu achten, daß die maximale Lichtemission nach etwa 5-10 Minuten, die Halbwertszeit bei etwa 60 Minuten liegt.

3.3.5 Durchflußzytometrische Analysen zur Immunfluoreszenz

Phänotypische Analysen wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz mit FITC-konjugierten Antikörpern, bzw. (F(ab')₂-Fragmenten (Fa. Sigma, Deisenhofen) als zweitem Antikörper durchgeführt. Pro Ansatz wurden 1 - 2 große Zellkulturflaschen (80 cm²) mit MMC (ca. 10⁶ Zellen), bzw. 1-2 kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) mit J774 eingesetzt. Die MMC wurden zweimal mit PBS gewaschen, sanft trypsiniert, mit 10%igem Medium 5 min bei 1500 rpm (300 x g), 4°C zentrifugiert, in 50 mL Medium resuspendiert und anschließend für 60 min mit leicht geöffnetem Deckel unter Schwenken im Brutschrank bei 37°C unter CO₂-Begasung inkubiert. Durch diese Methode könnten von den MMC neue Rezeptoren (z.B. FcγR) an die Zelloberfläche transportiert werden, die vorher durch die Trypsinierung abgelöst wurden. Nach einmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in 1:6 verdünntem Endobolin (100 µL/Ansatz) zum Blockieren unspezifischer Bindungen aufgenommen und auf eine 96-Rundboden-Mikrotiterplatte verteilt. Es folgten die Zugabe der monoklonalen Antikörper gegen Fcγ-Rezeptoren (2.4G2, Fa. PharMingen, Heidelberg (1µg/1x10⁶ Zellen; final 1:500), Ly17.2, Fa. Caltag (1µg/1x10⁶ Zellen; final 1:500), Ly17.1, Fa. Caltag (1µg/1x10⁶ Zellen; final 1:500) und den entsprechenden Isotypkontrollen von irrelevanter Spezifität, die mit PBS/0,1% BSA verdünnt wurden und eine 30minütige Inkubation bei 4°C. Im Anschluß wurde dreimal mit PBS/0,1% BSA bei 1800 rpm (300 x g) für je 3 min gewaschen. Zu jedem Ansatz wurden dann FITC-konjugierte Antikörper gegeben (F(ab')₂ Ziege-Anti-Maus-IgG-(H+L)-FITC 1:200, Ziege-Anti-Ratte-IgG+IgM-(H+L)-FITC 1:200, Fa. Dianova). Es erfolgte eine erneute Inkubation für 30 min bei 4°C. Nach drei weiteren Waschzentrifugationen wurden die Zellen auf Eis in je 500 µl PBS/0,1% BSA aufgenommen, in 5 mL Röhrchen überführt.

Die Ansätze der indirekten Immunfluoreszenz wurden in einem Durchflußzytometer FACScan (Fa. Becton-Dickinson, BD, Heidelberg) analysiert. Die Zellen wurden in einem sogenannten „Gate“ eingegrenzt. Es wurden 10.000 Zellen pro Ansatz ausgewertet, wozu die LYSIS 2.1.-Software der Firma Becton-Dickenson verwendet wurde. Zur Kontrolle der Hintergrund- bzw. Autofluoreszenz wurden Mediumkontrollen, Kontrollen ganz ohne Antikörper, Kontrollen ohne 1. Antikörper und Kontrollen mit Antikörpern desselben Isotyps wie des 1. Antikörpers, aber von irrelevanter Spezifität, gemessen und analysiert. Einfarbenhistogramme stellten die Anzahl der gemessenen Zellen auf der Ordinate und die Fluoreszenzintensität auf der Abszisse einer logarithmischen Skala gegenüber. Die Fluoreszenzintensität ist der Anzahl der vorhandenen Bindungsstellen direkt proportional.

3.3.6 Objektträgerfärbungen

Um die Fc γ -Rezeptoren und MHC II Moleküle auf den MMC und XS52 untersuchen zu können, wurden als Detektionssystem die APAAP- und die *EnVision*TM-AP-Färbung (Fa. Dako, Hamburg) verwendet.

Die APAAP-Methode, die zu den empfindlichsten immunohistochemischen Techniken gehört, ist ein Enzym-Anti-Enzymkomplex-Verfahren, bei dem ein Komplex aus zwei Molekülen alkalischer Phosphatase (AP) und einem dagegen gerichteten Antikörper aufgebaut wird. Der Primärantikörper sowie der Antikörper des Enzym-Immunkomplexes stammen aus derselben Spezies, so daß der sekundäre, auch Brückenantikörper genannte, Antikörper diese beiden miteinander vernetzen kann. Das *EnVision*TM-AP-Färbesystem basiert auf einer neuen Technologie, bei der viele alkalische Phosphatase-Moleküle mit spezifischen Antikörpern an ein Dextran-Rückgrat gekoppelt sind und eine erhöhte Nachweisempfindlichkeit bei gleichzeitig reduzierten Arbeitsschritten erreicht wird.

Als positive Kontrolle für die Färbung wurden XS52 oder J774A.1-Zellen eingesetzt. Zunächst wurden die MMC wie oben beschrieben, mild abtrypsinisiert und anschließend auf 8-Well „*Chamber Slides*“ Objektträgern (Fa. Nunc, Wiesbaden) in einer Zellzahl von 8000 Zellen/Well in einem Volumen von 200 μ L ausgesät. XS52 und J774A.1-Zellen wurden durch einen Gummischaber vom Kulturflaschenboden abgelöst und ebenfalls in der Zelldichte von 8000 Zellen/Well in einem Volumen von 200 μ L als Kontrolle auf denselben Objektträger ausgesät. Durch den Einsatz von „*Chamber Slides*“ stehen pro Objektträger 8 separate Kammern zur Verfügung, wodurch verschiedene Zellen und Stimulationen unter den gleichen Inkubationsbedingungen optimal verglichen werden können. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C im Brutschrank (5% CO₂, gesättigte Wasserdampf-atmosphäre) über Nacht. Am darauffolgenden Tag waren die MMC und Kontrollzellen adhärent und konnten mit den jeweiligen Faktoren für 48 Stunden unter gleichen Bedingungen inkubiert werden (je 400 μ L/Well). Nach dieser Inkubationszeit wurden die Kammern der „*Chamber Slide*“ Objektträger vorsichtig entfernt und die Objektträger dreimal mit TBS/Tween (0,05%) durch vorsichtiges Eintauchen in Färbeküvetten gewaschen. Es erfolgte eine fünfminütige Fixierung in Methanol/Aceton (50/50 v/v) bei Raumtemperatur, nach der erneut dreimal mit TBS/Tween gewaschen wurde, wobei der Einsatz von TBS/Tween als Puffer zu einer effektiven Reduzierung unspezifischer Hintergrundfärbungen führen soll. Im Anschluß daran wurde der erste Antikörper zugegeben (etwa 40 μ L/Well) und die Objektträger für eine halbe Stunde bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Von jedem spezifischen Antikörper wurde auch eine entsprechende Isotypkontrolle von irrelevanter Spezifität eingesetzt. Die Verdünnungen der Antikörper wurden folgendermaßen durchgeführt und erfolgten in PBS/1% BSA/0,05% Azid.

Anschließend erfolgte wieder ein dreimaliger Waschschrift in TBS/Tween. Direkt anschließend erfolgte die Inkubation mit der *EnVision*-Gebrauchslösung oder die Inkubation mit dem Sekundärantikörper der APAAP-Methode (Kaninchen-anti-Ratten-Ig, Z494, Dako, 1:100 verdünnt in TBS + 5% Mausserum) für 30 Minuten. Die nachfolgende Inkubation mit dem tertiären Antikörperkomplex der APAAP-Methode (APAAP, Ratte, Dako, D488, 1:100 verdünnt in TBS/Tween) erfolgte ebenfalls für 30 Minuten. Bei der APAAP-Methode wurden die letzten beiden Schritte mit einer Inkubationszeit von je 15 min. wiederholt. Zwischen diesen Schritten wurden die Objektträger gründlich mit TBS/Tween gespült. Schließlich wurden die Präparate mit dem Substrat *Fast Red* oder *Fast Blue* (Dako, Hamburg) für 10-20 min entwickelt, mit Hämatoxyllin gefärbt und mit Glycergel eingedeckt.

Antikörper	Verdünnung
2.4G2	1:1000
Ly-17.2	1:10
MHC II	1:50

Verwendete Pufferlösung:

TBS (Tris-gepufferte Kochsalzlösung), 0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6:

6,1 g Tris-Base in 50 mL Aqua dest. lösen.

37 mL 1N HCl zufügen,

8,8 g NaCl lösen, mit Aqua dest. ad 1L, pH 7,6

3.3.7 Untersuchung von Kulturüberständen im ELISA

3.3.7.1 Biotinylierung des anti-MCP-1- Antikörpers

Um ein Detektionssystem zu etablieren, mit dessen Hilfe es möglich ist, MCP-1 in Mediumüberständen zu quantifizieren (anti-mMCP-1-ELISA, siehe unten), wurde ein biotinylierter sekundärer anti-MCP-1-Antikörper benötigt. Dazu wurden zunächst 200 µL einer anti-MCP-1-Stammlösung (1mg/mL, in PBS) mit 400 µL NaHCO₃-Lösung, pH 9,0 (Natriumhydrogencarbonat) versetzt. Es erfolgte eine Dialyse über Nacht in einer Dialysekammer (MWCO 10000 kDa, Fa. Pierce, Rockford, USA) über Nacht bei 4°C gegen Natriumhydrogencarbonatpuffer (200 mM NaHCO₃, pH 9,0). Am nächsten Tag wurden diese 600 µL entnommen und in einer Proteinbestimmung nach Bradford (siehe dort) auf ihre Antikörperkonzentration untersucht. 500 µL des Dialyseproduktes (Antikörper-Konzentration circa 30µg/ml) wurden dann in die Biotinylierungsreaktion eingebracht. Dazu wurde dieser Ansatz mit 8 µL Biotin (Fa. Pierce, NHS-LC) 4 mg/mL in DMSO) versetzt. Es erfolgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Danach wurde eine Aufkonzentration in einem

Centricon-Konzentrator (MWCO 10000 kDa) vorgenommen. Dieses Gefäß wurde zunächst mit sterilem PBS mit 0,1 % BSA bei 6500 rpm in der Sorvall-Zentrifuge (ca. 5000 x g) für 15 Minuten bei 4°C vorzentrifugiert. Dieser Schritt wurde nach Zugabe von neuem PBS / BSA wiederholt. Anschließend wurde das Centricon-Röhrchen mit dem gesamten Biotinylierungsansatz befüllt, der vorher mit PBS / BSA (0,1%) / Azid (0,1%) auf 2 mL aufgefüllt worden ist. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 5000 x g für 45 Minuten bei 4°C. Eine Rückzentrifugation unter gleichen Bedingungen für 3 Minuten erbrachte 600 - 700 µL einer Lösung mit biotinyliertem Antikörper erhalten.

3.3.7.2 Anti-mMCP-1-ELISA

Um die Expression von MCP-1 von MMC nach funktioneller Aktivierung mit HA1gG zu untersuchen, wurde ein ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) durchgeführt. Das Prinzip dieses Tests ist, das von den MMC in den Kulturüberstand sezernierte MCP-1 mittels polyklonaler Antikörper nachzuweisen. Dazu wird eine Mikrotiterplatte mit anti-MCP-1-Antikörper beschichtet, an die das nachzuweisende MCP-1 bindet. Durch einen sekundären biotinylierten Antikörper wird das gebundene MCP-1 dann detektiert. Durch Zugabe von Streptavidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase (SBP) bildet sich ein stabiler Komplex zwischen dem Biotin des 2. Antikörpers und dem Streptavidin. Nach einer oxidativen Reaktion des Substrates TMB (Tetramethylbenzidin, Fa. Sigma, Deisenhofen) durch die Peroxidase entsteht ein wasserlöslicher blauer Farbkomplex, der nach Zugabe von Schwefelsäure in eine gelbe Farbe umgesetzt wird. Dabei ist die Gelbfärbung um so intensiver, je mehr MCP-1 gebunden wurde. Die Detektion erfolgt dann im ELISA-Reader bei 450 nm.

Zunächst wurde der anti-MCP-1 Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/mL in Coating-Puffer (=100 mmolarer Bicarbonat- Puffer, pH 9,6) verdünnt. Anschließend wurde eine 96-well-Mikrotiterplatte (Nunc-Immuno-Plate MaxiSorb, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 100 µL/well beschichtet. Es erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit je 200 µL Waschpuffer (PBS, pH 7,0 mit 0,05% Tween 20) gewaschen und gut ausgeschlagen. Es erfolgte die Zugabe von jeweils 200 µL Blocking Puffer (PBS mit 1% BSA), um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Zum Blocken wurde die Platte dann 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte abermals ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Zur Erstellung der Eichreihe wurde eine MCP-1-Stammlösung (10 µg/mL in PBS) verwendet, die zunächst mit Medium (bzw. PBS / 1% BSA) 1:1000 vorverdünnt wurde. Durch eine 1:2-Verdünnung erhielt man 5000 pg/mL; serielle Verdünnungen wurden durchgeführt, um 2500, 1000, 500, 250, 100, 25 und 5 pg/mL zu erhalten. Jeweils 100 µL wurden in jedes Well pipettiert, für den Leerwert wurden 100 µL Zellmedium (bzw. PBS / 1% BSA) eingesetzt. Die Kulturüberstände der MMC wurden 1:50 bis 1:300 in Medium verdünnt und auch jeweils 100 µL aufgetragen. Die Platte wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst wieder dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem sekundären biotinyliertem Antikörper. Dazu wurden 100 μL /Well des Antikörpers in einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zugegeben und vier Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden 150 μL /Well des Detektionspuffers (2 μL Streptavidin-POD in 10 mL PBS / 1% BSA) zugegeben; es erfolgte eine Inkubation für 1-2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde wieder ein dreimaliger Waschschrift durchgeführt. Danach erfolgte die TMB-Färbung (Tetramethylbenzidin, Sigma). Dazu wurden 2 mg TMB in 2 mL DMSO gelöst und in 20 mL Substratpuffer gegeben. Nach Zugabe von 2 μL H_2O_2 (30%) wurden je 150 μL in jedes Well gegeben. Nach einer 10- bis 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Färbereaktion durch Zugabe von je 50 μL /Well 1M Schwefelsäure gestoppt. Es erfolgte dann die Messung der OD_{450} im ELISA-Reader (Dynatech, Denkendorf).

3.3.7.3 Anti-PGE₂-ELISA

Um zu überprüfen, ob die MMC nach funktioneller Aktivierung mit HAIGG vermehrt Prostaglandin E₂ exprimieren, wurden Anti-PGE₂-ELISAs durchgeführt. Das Prinzip des Tests ist, das von Zellen in den Überstand sezernierte Prostaglandin E₂ mittels monoklonaler Antikörper nachzuweisen. Er beruht auf der Kompetition einer auf der Mikrotiterplatte gebundenen definierten Menge BSA-PGE₂ durch das im Zellüberstand befindliche PGE₂. Je mehr PGE₂ im Überstand vorhanden ist, desto weniger Antikörper können an das gebundene BSA-PGE₂ binden. Der Fc-Teil dieses monoklonalen primären Antikörpers wird dann durch einen sekundären biotinylierten Antikörper detektiert. Durch Zugabe von Streptavidin-Biotin-Meerrettich-Peroxidase (SBP) bildet sich ein stabiler Komplex zwischen dem Biotin des 2. Antikörpers und dem Streptavidin. Nach der oxidativen Umsetzung des Substrates TMB Tetramethylbenzidin (Fa. Sigma, Deisenhofen) durch die Peroxidase entsteht ein wasserlöslicher Farbkomplex, der im ELISA-Reader bei 450 nm detektiert werden kann. Dabei ist eine hohe optische Dichte ein Maß für eine geringe PGE₂-Konzentration im Überstand.

Durchführung:

Zunächst wurden die 96-well-Mikrotiterplatten (Nunc-Immuno-Plate MaxiSorb, Fa. Nunc, Wiesbaden) mit 150 μL /well Anti-Maus IgG (1:2000 in Coating-Puffer verdünnt) beschichtet. Es erfolgte eine Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Platte dreimal gewaschen und gut ausgeschlagen. Es erfolgte die Zugabe von 50 μL /Well monoklonalem PGE₂-Antikörper (1:200 in PBS / BSA 0,1% verdünnt), 50 μL /Well Probe, bzw. Eichreihenstandarts und 50 μL /Well PGE₂-Biocytin (1:200 in PBS / BSA 0,1% verdünnt).

Zur Erstellung der Eichreihe wurde eine PGE₂-Stammlösung (2 µg/mL in Ethanol abs.) verwendet, die zunächst mit Probenmedium 1:80 (entspr. = 1250 pg/Well) verdünnt wurde. Durch weitere 1:2-Verdünnungen erhielt man 625; 313; 156; 78; 39; 19,5; 9,6; 4,8; 2,4; 1,2 pg/Ansatz. Für den Leerwert wurden 50 µL PBS / BSA 0,1%, 50 µL Medium und 50 µL PGE₂-Biocytin (1:200) eingesetzt, für den Maximalwert (totale Bindung) wurden 50 µL anti-PGE₂-Antikörper (1:200 in PBS / BSA 0,1% verdünnt), 50 µL Medium und 50 µL PGE₂-Biocytin (1:200 in PBS / BSA 0,1% verdünnt) verwendet. Diese Ansätze wurden dreimal gewaschen und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Detektionssystem. Dazu wurden 150 µL/Well Streptavidin POD-Konjugat (1:50000 in PBS/BSA 0,1%) zugegeben und eine Stunde lang bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschschrift wurden 150 µL/Well Substratpuffer (Tetramethylbenzidin, Sigma) und H₂O₂ zugegeben. Nach einer Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Färbereaktion durch Zugabe von je 50 µL/Well 2M Schwefelsäure gestoppt. Dann folgte die Messung der OD₄₅₀ im ELISA-Reader (Dynatech, Denkendorf).

3.3.8 Hitzeaggregation von IgG-Antikörpern (HAIG)

Um die Fcγ-Rezeptoren auf den untersuchten Zellen für die funktionellen Tests stimulieren zu können, wurden IgG-Antikörper hitzeaggregiert. Die dafür verwendeten polyklonalen gemischten IgG (Fa. The binding site, Birmingham, UK) wurden zunächst über Nacht in einer Dialysekammer (MWCO 10.000 kDa, Fa. Pierce, Rockford, USA) bei 4°C gegen PBS dialysiert, wodurch das toxische Natrium-Azid aus der Antikörper-Lösung entfernt wurde. Am nächsten Tag wurden die Antikörper für 30 min bei 63°C inkubiert, 5 min bei 12.000 x g, 4°C, zentrifugiert, um die partikulären Aggregate zu entfernen und anschließend die Antikörperkonzentration in einer Protein-Bestimmung nach Bradford untersucht. Die Antikörper wurden aliquotiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

3.3.9 Ouchterlony Test

Um die optimale Konzentration von mit FITC-Partikeln vernetztem Ovalbumin (OVA-XL-FITC) im Verhältnis zu den entsprechenden Anti-FITC-Antikörpern bei der Bildung von Antikörper-Antigen-Immunkomplexen zu bestimmen, die zur Stimulation von Fcγ-Rezeptoren verwendet werden können, wurde ein Micro-Ouchterlony Test durchgeführt. Dafür wurde das Antigen (OVA-XL-FITC) in verschiedenen Verdünnungen in das jeweils zentrale Well der Platte und die unterschiedlichen Verdünnungen der murinen Anti-FITC-Antikörper der Subklassen IgG1 und IgG2b in die umgebenden wells in einem Volumen von 10 µL befüllt. Das beladene Gel wurde für 48 Stunden in einer feuchten Kammer und absoluter Ebene bei Raumtemperatur,

unter Kontrolle der Präzipitationslinien, inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurde das Gel mit mit Aqua dest. angefeuchtetem Filterpapier bedeckt, mit saugfähigem Papier und abschließend einer Glasplatte bedeckt und mit einem Gewicht von ca. 10 g/cm² Gel für 5 min beschwert. Dieser Vorgang wurde mit 10 min Dauer wiederholt. Nachdem das Gel (mit Kammer) für 15 min in PBS gewässert wurde, gefolgt von zwei Preßschritten für jeweils 10 min, erfolgten nach einem Waschschrift für 15 min in Aqua dest., wieder zwei Preßschritten für jeweils 10 min. Das bei 50°C für 15 min getrocknete Gel wurde für ca. 10 min in einer 0,25%igen *Coomassie-Blue* Lösung gefärbt, um die Präzipitationslinien sichtbar zu machen. Durch eine anschließende Entfärbung mit 45% Ethanol, 45% Aqua dest. und 10% Essigsäure wurde der Hintergrund des Gels entfärbt und die Proteinlinien optimal sichtbar gemacht.

3.3.10 IL-12-ELISPOT-Assay

Um die Interaktionen von T-Zellen, dendritischen Zellen oder anderen professionellen antigenpräsentierenden Zellen aus der Milz und auch MMC *in vitro* in verschiedenen Fragestellungen genau untersuchen zu können, bietet sich der in unserer Arbeitsgruppe etablierte ELISPOT-Test (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Spot-Assay*) an. Bei diesem Assay werden die eingesetzten Zellen für bestimmte Zeiträume in einer sterilen 96-Well-Mikrotiterplatte mit speziellen Polycarbonatmembraneinsätzen unter Zellkulturbedingungen kultiviert. Die von den agierenden T-Zellen bzw. dendritischen Zellen nach Stimulation sezernierten Zytokine bleiben auf der vor der Kultur mit spezifischen Antikörpern steril beschichteten Platte als Einzelzell-„Spots“ haften und werden nach dem Abwaschen der Zellen und Inkubation mit einem sekundären biotinyliertem Antikörper detektiert. Durch die Zugabe von Streptavidin-HRP (Meerrettichperoxidase), bildet sich ein stabiler Komplex zwischen dem Biotin des 2. Antikörpers und dem Streptavidin. Das Substrat AEC wird durch die Peroxidase oxidiert und es bildet sich ein rötlich-brauner Farbkomplex. Die Auswertung der Platten erfolgte mit der von Prof. Dr. med. H.H. Radeke entwickelten automatischen Auswertesoftware A•EL•VIS.

Durchführung:

Zuerst wurde der jeweilige 1. Antikörper in der entsprechenden Konzentration in sterilem PBS verdünnt und eine sterile T-Spot ELISPOT-Platte (Fa. Polyfiltronics, Massachusetts, USA) mit 100 µL/Well beschichtet. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht wurde die Platte dreimal mit je 200 µL sterilem PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe von jeweils 200 µL Blocking Puffer (steriles PBS mit 1% BSA), um unspezifische Bindungen zu vermeiden. Zum Blocken wurde die Platte für 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte abermals ein dreimaliges Waschen mit sterilem PBS. Nun wurden die Zellen z.T. für 72 Stunden

vorstimulierten MMC oder XS52 in der erforderlichen Konzentration sowie die verschiedenen Stimuli, bzw. Zellkultivierungsüberstände in die Platte pipettiert und je nach Versuchsansatz für 24 oder 48 Stunden in der Platte kultiviert.

Nach diesen Inkubationszeiten wurde die Platte dreimal mit PBS und anschließend dreimal mit PBS/ 0,05%Tween gewaschen, worauf die Platte mit dem in PBS/ 0,05% Tween/1%BSA verdünnten sekundären biotinylierten Antikörper in den ermittelten Konzentrationen beschichtet wurde. Nach einer Inkubation bei 4°C über Nacht wurde die Platte dreimal mit PBS/ 0,05%Tween gewaschen.

Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Detektionspuffer. Dazu wurden 100 µL/Well Streptavidin-HRP, 1:2000 in PBS/ 0,05% Tween/1%BSA verdünnt, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem dreimaligen Waschen mit PBS erfolgte die Färbung mit AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol). Dazu wurde das AEC 1:30 in 0,1 M Acetatpuffer verdünnt und durch einen Einmalfilter mit der Porengröße von 0,45 µm filtriert. Nach Zugabe von H₂O₂ (30%) in einer Verdünnung von 1:2000 wurden 200 µL der Substratlösung in jedes Well gegeben. Nach einer 15- bis 60-minütigen Inkubation wurde das AEC abgeschlagen und die Platte gründlich mit Aqua dest. gewaschen. Vor der Auswertung mit A•EL•VIS wurden die Platten gründlich getrocknet und lichtgeschützt aufbewahrt. Leider kann bei AEC der Oxidationsprozeß weiter fortschreiten, so daß es bei starker Lichteinwirkung zum Ausbleichen des Reaktionsproduktes kommt. Die gefärbten ELISPOT-Platten müssen daher unbedingt im Dunkeln gelagert werden.

AEC-Substratlösung:

4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol in 1mL N,N-Dimethylformamid lösen

Acetat-Puffer, 0,1 M, pH 5,2:

210 mL 0,1 N Essigsäure (5,75 mL Eisessig in 1L Aqua dest.)

790 mL 0,1 M Na-Acetat (13,61 g Natriumacetat trihydrat in 1 L Aqua dest.), pH 5,2

Antikörper für den IL-12-ELISPOT:

1. Antikörper:

purified rat-anti-mouse IL-12 (p40/p70) (Fa. PharMingen, BD, Heidelberg),
finale Konzentration: 6 µg/mL

2. Antikörper:

Biotin rat-anti-mouse IL-12 (p40/p70) (Fa. PharMingen, BD; Heidelberg),
finale Konzentration: 2 µg/mL

3.3.11 Versuchsauswertung

3.3.11.1 Semi-quantitative Auswertung von Autoradiografien

Zur densitometrischen Bestimmung der relativen Intensitäten der spezifischen RNA- oder DNA-Banden wurden die Autoradiografien mit Hilfe des Videosystems GelDoc 1000 und der Software Molecular Analyst der Fa. BIO-RAD, München, semi-quantitativ ausgewertet. Dazu wurden die Autoradiografien auf einem Leuchttisch mit Weißlicht transilluminiert, über das Videosystem aufgezeichnet und gespeichert. Unter Verwendung der Analysesoftware wurden die Intensitäten der spezifischen Banden als Schwärzung pro Flächeneinheit gemessen, mit den Kontroll-Autoradiografien (β -Tubulin bzw. GAPDH) abgeglichen und als *Units* (Einheiten) grafisch dargestellt. Wenn schon konstitutive Expressionen bei den Untersuchungen aufgetreten waren, wurde teilweise der basal vorhandene Mediumwert mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

3.3.11.2 Berechnung der Standardabweichung und des Mittelwertes

Bei den meisten Meßpunkten wurden mindestens 3 Ansätze gleichzeitig, aber getrennt aufgearbeitet und ausgewertet, sowie mehrere unabhängige Versuche durchgeführt.

Der Mittelwert, das arithmetische Mittel der Meßwerte, berechnet sich nach folgender Formel:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

mit

x_i	= i -ter Meßwert
\bar{x}	= arithmetischer Mittelwert
n	= Zahl der Meßwerte

Die Standardabweichung, das lineare Maß für die mittlere Streuung der Meßwerte, berechnet sich folgendermaßen:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

mit

x_i	= i -ter Meßwert
\bar{x}	= arithmetischer Mittelwert
n	= Zahl der Meßwerte

Die Standardabweichung sind als Fehlerbalken in den Graphiken eingetragen, bzw. in den Tabellen und Diagrammen vermerkt.

4 Ergebnisse

4.1 Bedingungen zur Induktion der Fc γ -Rezeptoren in Mesangiumzellen

4.1.1 Differentielle Induktion von Fc γ R-mRNA

Da über die Expression der unterschiedlichen Fc γ -Rezeptor-Klassen in murinen glomerulären Mesangiumzellen (MMC) und auch über ihre differentielle Induktion noch nicht viel bekannt ist, wurde zunächst die Anwesenheit von mRNA der Fc γ -Rezeptor-Klassen in den MMC von Wildtyp- und im Vergleich auch Fc γ RIII-/-defizienten Mäusen unter verschiedenen Induktionsbedingungen untersucht.

Um der *in vivo* Situation nicht-proliferierender Mesangiumzellen möglichst nahe zu kommen, wurden für diese Experimente z.T. serumfrei kultivierte, wachstumsarrestierte Zellen verwendet, die keinen Zellzyklus durchlaufen. Die Zellen wurden dafür nach einer 72-stündigen Ruhephase unter definierten Mediumbedingungen (s. 3.1.1.2) mit verschiedenen Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und den Kombinationen dieser Faktoren, sowie teilweise auch IL-4, IL-10 und LPS_{E.coli} stimuliert. Weiterhin wurden die Untersuchungen auch mit proliferierenden Mesangiumzellen (10% FCS) durchgeführt, die ebenfalls mit den o.g. Zytokinen und ihren Kombinationen, sowie mit dem Endotoxin LPS_{E.coli} stimuliert wurden. Anschließend wurde eine Gesamt-RNA-Isolation durchgeführt (s. 3.2.1) und zunächst versucht, die Fc γ R-mRNA mittels der Northern Blot-Methode (s. 3.2.2 - 3.2.4) nachzuweisen. Auch die Präparation von Poly-A-mRNA aus diesen Zellen erwies sich als schwierig und Fc γ R-mRNA konnte mit Northern Blot-Hybridisierungen ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Da sich diese Methoden aufgrund der niedrigen Expressionsrate der Fc γ R-mRNA als nicht sensitiv genug erwiesen haben, wurden die mRNAs der Fc γ R-Klassen durch die Anwendung von „batch“-RT-PCRs (s. 3.2.6), die dafür mit unterschiedlichen MgCl₂- und Primer-Konzentrationen, sowie mit verschiedenen *Annealing*-Temperaturen optimiert werden mußten, untersucht. Um die Expression der Fc γ R-mRNA in den Mesangiumzellen zu ermitteln, wurde dafür der RT-Ansatz von jedem Stimulationspunkt vor dem PCR-Amplifikationsschritt aufgeteilt und diese mit 28 Zyklen für β -Tubulin und je 40 Zyklen für die unterschiedlichen Fc γ R-Klassen eingesetzt. Anschließend wurden von allen Ansätzen die gleichen Mengen des PCR-Amplifikationsproduktes im 2%igen Agarose-Ethidiumbromidgel aufgetrennt. Als positive Kontrolle wurde jeweils die mRNA von J774-Zellen in der RT-PCR mitamplifiziert.

In verschiedenen Vorversuchen wurde gezeigt, daß diese murine Monozytenzelllinie die mRNAs der verschiedenen Fc γ R-Klassen schon basal ohne zusätzliche Stimulation in größeren Mengen exprimieren kann und auch im Northern Blot detektierbar ist. Da besonders ruhende MMC auch nach 40 PCR-Durchläufen keine

bis eine sehr geringe Expression der Fc γ R-mRNA aufwiesen, wurden zur Erhöhung der Detektierbarkeit der RT-PCR-Banden Southern Blots und Hybridisierungen mit den Fc γ R-spezifischen 32 P-markierten cDNA-Sonden (s. 3.2.7, 3.2.4) durchgeführt. Gleichzeitig dienten diese Southern Blots als weitere Kontrolle, daß die in der RT-PCR hochamplifizierten Produkte tatsächlich den spezifischen Fc-Rezeptor-mRNAs entsprechen.

Ein Problem bei den Auswertungen stellt sicherlich die angewendete RT-PCR-Technik dar, mit der Quantifizierungen im Gegensatz zu Northern Blots nur bedingt qualitativ durchzuführen sind. Die in mehreren unabhängigen Experimenten auftretenden Schwankungen sind Ausdruck interexperimenteller Variabilitäten. Einen besseren Überblick als die exemplarisch gezeigten Autoradiogramme geben daher die Tabellen und Übersichtsdiagramme, in denen alle einzelnen RT-PCR-Experimente ausgewertet (wenn sinnvoll, mit Standardabweichungen) zusammenfassend dargestellt wurden.

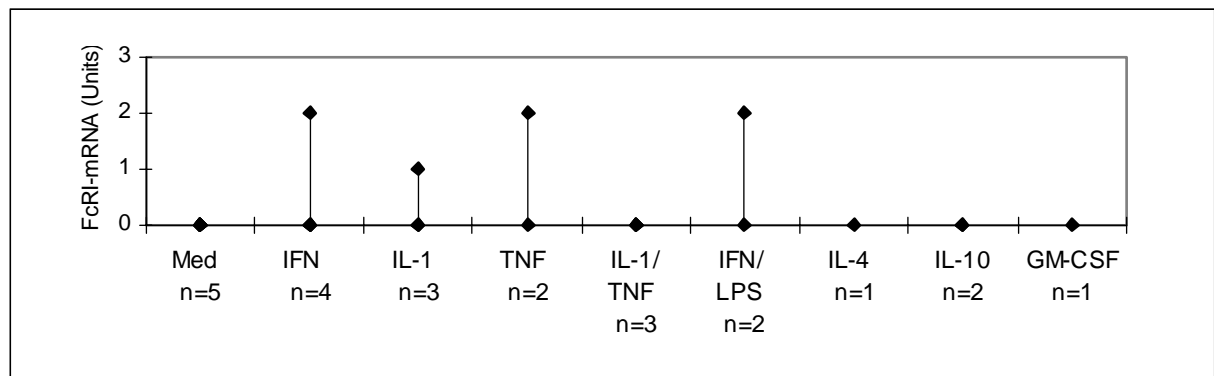
4.1.1.1 Induktion von Fc γ R α -mRNA

4.1.1.1.1 Induktion von Fc γ R α -mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Während für MMC die Expression des hochaffinen IgG-Rezeptors in der Literatur bisher noch nicht gezeigt worden ist, konnte kürzlich erstmalig eine IFN- γ -induzierte Fc γ RI-mRNA Transkription in nicht-zyklisierenden humanen MC nachgewiesen werden [UCIECHOWSKI et al., 1998]. Um die Expression der Fc γ R α -Ketten-mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Mesangiumzellen aus Wildtyp-Mäusen zu untersuchen, wurden von der RNA aus WT-MMC, die mit verschiedenen Faktoren für 48 Stunden stimuliert worden waren, RT-PCR-Experimente mit spezifischen Fc γ R α - und β -Tubulin-Oligonukleotidprimern durchgeführt. Die anschließenden Southern Blot-Analysen mehrerer RT-PCR-Untersuchungen zeigten, daß die mRNA für diesen Fc γ -Rezeptor basal nicht exprimiert wurde. Auch durch die Stimulation mit den Zytokinen IFN- γ , TNF- α und der Kombination IFN- γ mit LPS sowie durch IL-1 β , konnte der Fc γ R α nur in einem der durchgeführten Versuche induziert werden. Daher fehlt hier eine exemplarische Abbildung, die möglichen Tendenzen sind aber in **Tab. 4.1** und **Diagr. 4.1** aufgezeigt.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IL-1 β / TNF α	IFN- γ / LPS	IL-4	IL-10	GM-CSF
Versuchszahl: n	5	4	3	2	3	2	1	2	1
Trend	∅	(↑)	(↑)	(↑)	∅	(↑)	∅	∅	∅
Mittelwerte \pm SD	0 (keine Fc γ RI α mRNA amplifizierbar)	0,5 \pm 1,0	0,3 \pm 0,5	-	-	-	-	-	-

Tabelle 4.1: Regulation der Fc γ RI α -mRNA-Expression in ruhenden Wildtyp-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RI α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. In **Diagr. 4.1** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der ruhenden WT-MMC nach 48-stündiger Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL) und Kombinationen dieser Faktoren mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung.



Diagr. 4.1: Regulation der Fc γ RI α -mRNA-Expression in ruhenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.1**.

4.1.1.1.2 Induktion von Fc γ RI α -mRNA unter proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Da Untersuchungen in humanen Mesangiumzellen eine Induktion der Fc γ RI α -mRNA Transkription nach Stimulation mit den T-Helfer-Lymphokinen IL-10 und IFN γ zeigten [UCIECHOWSKI et al., 1998], wurden in den murinen MC neben anderen Faktoren wie IL-1 β , TNF- α und LPS diese Zytokine ebenfalls zur Untersuchung der differentiellen Regulation der Fc γ RI α -mRNA Transkription eingesetzt. Für die Untersuchung der Expression unter proliferierenden Bedingungen wurden Mesangiumzellen aus Wildtyp-Mäusen für 24 Stunden und 48 Stunden mit verschiedenen Faktoren stimuliert.

Wie in der **Abb. 4.1** sowie den Auswertungen in der **Tab. 4.2** und in dem **Diagr. 4.2** dargestellt, ergaben die Untersuchungen, daß die Fc γ RI α -mRNA bei WT-MC unter proliferierenden Bedingungen basal schon vorhanden war und durch eine Reihe von

Faktoren wie das Th1-Zytokin IFN- γ und ebenfalls durch die Monokine IL-1 β , sowie durch TNF- α , LPS und IL-10 induzierbar war. Ein synergistischer Effekt von Kombinationen dieser Faktoren war nicht nachweisbar. Bei einem Vergleich der WT- zu Fc γ RIII-KO-MMC Fc γ RI-mRNA-Expression war auffallend, daß Fc γ RIII-KO-MMC größtenteils höhere basale mRNA-Werte aufwiesen, was experimentell durch kürzere Expositionszeiten der Southern Blot-Autoradiografien im Vergleich zu WT-MMC ausgeglichen wurde. Ein Problem bei diesen Auswertungen stellt sicherlich die angewendete der RT-PCR-Technik dar, die kleinste Schwankungen amplifiziert. Einen besseren Überblick gibt daher die **Tab. 4.2**, in der die einzelnen RT-PCR-Experimente ausgewertet als durchschnittliche Ergebnisse (teilweise mit Standardabweichungen) aufgeführt sind und auch das **Diagr. 4.2**, in dem die Streuungen der Einzelwerte dargestellt sind. Demnach war das Zytokin IL-1 β in drei Versuchen ein deutlicher Induktor für die Fc γ RI α -mRNA, zeigte aber deutliche Schwankungen bei der Induktionshöhe verglichen mit dem Mediumwert. IFN- γ führte dagegen konsistent zu einer Induktion der Fc γ RI α -mRNA. Auch für TNF- α zeigte sich ein hoher Durchschnittswert, der aber durch einen extremen Einzelwert zustande gekommen war. Daher ist der relative Intensitätsanstieg der ausgewerteten Banden bei TNF- α in der Tabelle auch in Klammern dargestellt. Eine Kombination von TNF- α mit IL-1 β zeigte ebenfalls keine deutlichen Erhöhungen der Fc γ RI α -mRNA Expression. In den untersuchten Zeitpunkten 24 oder 48 Stunden waren keine signifikanten Unterschiede in der Fc γ RI α -mRNA Induktion feststellbar.

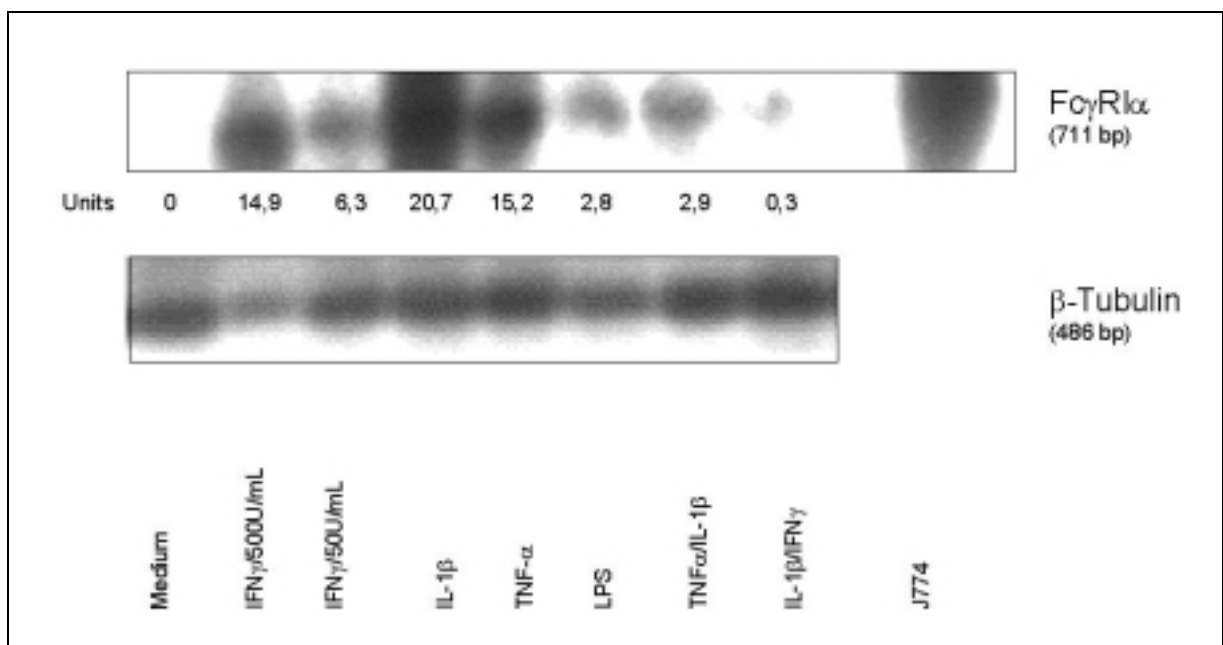
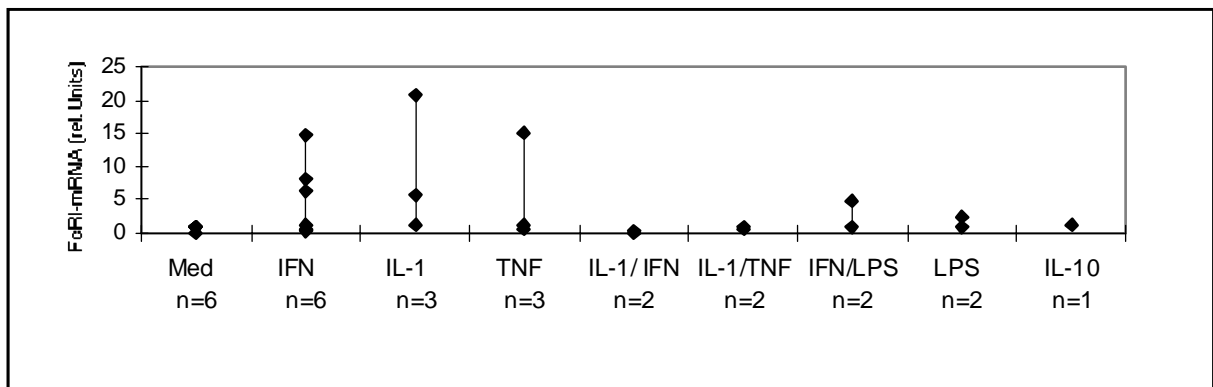


Abb. 4.1: Regulation der Fc γ RI α -mRNA-Expression durch verschiedene Faktoren. Aus proliferierenden WT-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (50 und 500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), bzw. den angegebenen Kombinationen die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ RI α -Primern eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Pro Probe wurde 1,5 μ g

isolierte Gesamt-RNA revers transkribiert, in der PCR amplifiziert, je 15 μ L der PCR-Amplifikationsprodukte auf einem 2%igen Agarose-Gel aufgetrennt und anschließend eine Southern Blot-Hybridisierung mit spezifischen 32 P-markierten cDNA-Sonden für $Fc\gamma R1\alpha$ und β -Tubulin durchgeführt. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten $Fc\gamma R1\alpha$ -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IFN- γ / IL-1 β	IL-1 β /TNF α	IFN- γ /LPS	LPS	IL-10
Versuchszahl: n	6	6	3	3	2	2	2	2	1
Trend	$\uparrow\downarrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	\uparrow	\uparrow	$\uparrow\uparrow$	\uparrow	(\uparrow)
Mittelwerte \pm SD	0,82 \pm 1,22 Fc $\gamma R1\alpha$ -mRNA nicht immer exprimiert	4,3 \pm 4,2	11,2 \pm 13,57	7,5 \pm 11,8	1,8	1,8	2,8	1,65	

Tab. 4.2: Regulation der $Fc\gamma R1\alpha$ -mRNA-Expression in proliferierenden Wildtyp-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten $Fc\gamma R1\alpha$ -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. In **Diagr. 4.2** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der proliferierenden WT-MMC nach 24- oder 48-stündiger Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL) und Kombinationen dieser Faktoren mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung.



Diagr. 4.2: Regulation der $Fc\gamma R1\alpha$ -mRNA-Expression in proliferierenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.2**.

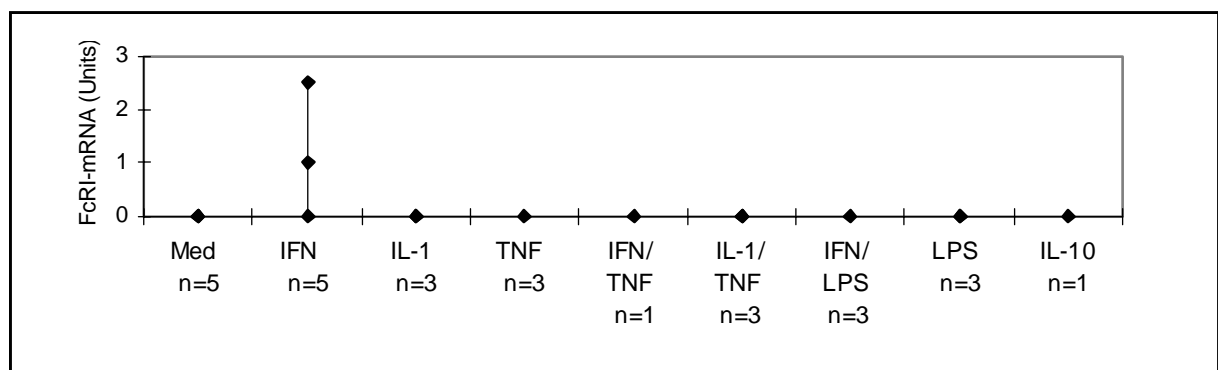
4.1.1.1.3 Induktion von $Fc\gamma R1\alpha$ -mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in $Fc\gamma R111$ -/- (KO)-Mesangiumzellen

Die Southern Blot-Analyse der RT-PCR-Experimente und Vergleiche mehrerer Untersuchungen zeigten, daß die mRNA für diesen $Fc\gamma$ -Rezeptor basal nicht exprimiert und durch das Th1-Zytokin IFN- γ ebenfalls nicht sicher, d.h. nur in zwei von fünf der durchgeführten Experimente induziert wurde. Die Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-10 und LPS und die Kombinationen IL-1 β /TNF- α und IFN- γ /LPS zeigten keine

Induktion des Fc γ RI-mRNA-Transkripts. Daher können hier nur die Trends der Ergebnisse in **Tab. 4.3** und **Diagr. 4.3** dargestellt werden.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IFN- γ /TNF α	IL-1 β /TNF α	IFN- γ /LPS	LPS	IL-10
Versuchszahl: n	5	5	3	3	1	3	2	2	1
Trend	∅	(↑)	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
Mittelwerte \pm SD	0 (keine Fc γ RI α -mRNA amplifizierbar)	0,7 \pm 1	-	-	-	-	-	-	-

Tab. 4.3: Regulation der Fc γ RI α -mRNA-Expression in ruhenden Fc γ RIII α -(KO)-MMC durch verschiedene Faktoren. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RI α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. In **Diagr. 4.3** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der ruhenden Fc γ RIII α -(KO)-MMC nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL) und Kombinationen dieser Faktoren und RT-PCR-Analysen mit anschließender Southern Blot-Hybridisierung.



Diagr. 4.3: Regulation der Fc γ RI α -mRNA-Synthese in nicht-proliferierenden Fc γ RIII α -(KO)-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.3**.

4.1.1.1.4 Induktion von Fc γ RI α -mRNA unter proliferierenden Bedingungen in Fc γ RIII α -/- (KO)-Mesangiumzellen

Anders als die Untersuchungen der ruhenden Fc γ RIII α -/- (KO)- und WT-MC, bei denen basal noch keine Fc γ RI-mRNA nachweisbar war, wurde unter proliferierenden Bedingungen die Fc γ RI-mRNA schon unter Mediumbedingungen exprimiert (**Abb. 4.2, Tab. 4.4** und **Diagr. 4.4**). Ebenso wie bei den WT-MMC wurde die Fc γ RI-mRNA-Expression mit den Faktoren IFN- γ , IL-1 β und IL-10 induziert. Eine Kombination der beiden stimulierenden Zytokine IFN- γ und IL-1 β zeigte keine synergistische Steigerung der α -Ketten-mRNA Transkription des Fc γ RI. Fc γ RIII α -/- (KO)- und WT-

MMC weisen also keine Unterschiede bei der Regulation der Fc γ RI-mRNA Expression unter zyklisierenden Bedingungen auf.

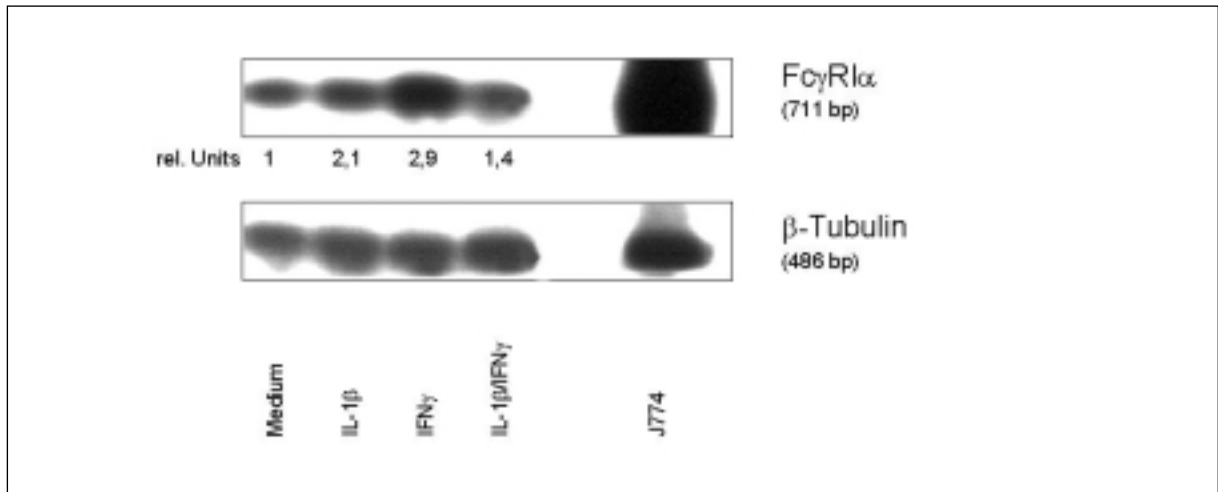
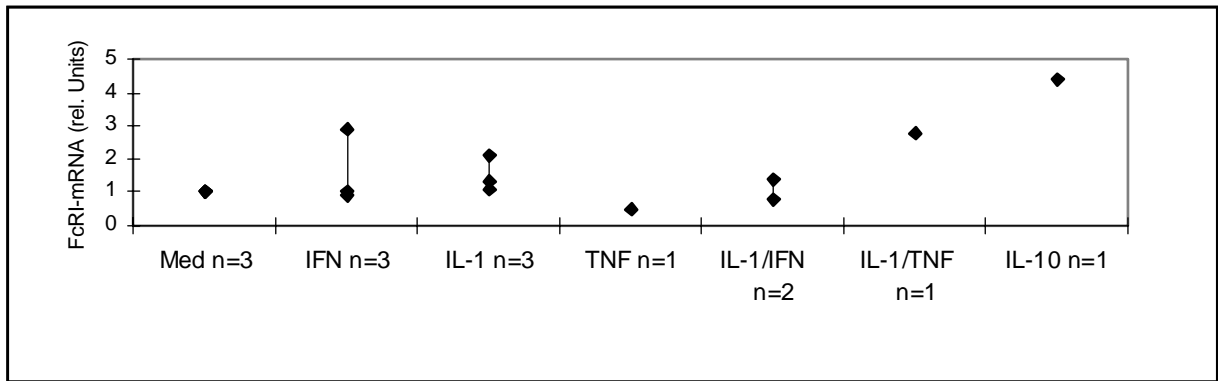


Abb. 4.2: Regulation der Fc γ RI α -mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), und der Kombination IFN- γ /IL-1 β die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ RI α -Primern eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Die auf einem 2%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Produkte wurden einer Southern Blot-Hybridisierung mit radioaktiv markierten cDNA-Sonden für Fc γ RI α und β -Tubulin unterzogen. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RI α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IFN- γ / IL-1 β	IL-1 β /TNF α	IL-10
Versuchszahl: n	3	3	3	1	2	1	1
Trend	\Leftrightarrow	$\uparrow\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	(\downarrow)	$\uparrow\uparrow$	($\uparrow\uparrow$)	($\uparrow\uparrow\uparrow$)
Mittelwerte \pm SD	1 \pm 0	1,6 \pm 1,1	1,5 \pm 0,5		1,1		
	(Fc γ RI α -mRNA immer amplifizierbar)						

Tab. 4.4: Regulation der Fc γ RI α -mRNA-Expression in proliferierenden Fc γ RIII-/(KO)- MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RI α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.4** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der proliferierenden Fc γ RIII-/(KO)-MMC nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-10 (10 ng/mL) und Kombinationen dieser Faktoren mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung.



Diagr. 4.4: Regulation der FcγRI α -mRNA-Synthese in proliferierenden FcγRIII $^{-/-}$ (KO)-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus Tab. 4.4.

4.1.1.2 Induktion von FcγRII-mRNA

4.1.1.2.1 Induktion von FcγRII-mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Um die FcγRII-mRNA Expression unter wachstumsarretierten Bedingungen zu untersuchen, wurden Mesangiumzellen aus Wildtyp-Mäusen mit verschiedenen Faktoren stimuliert. Nach der Gesamt-RNA-Extraktion wurden ebenfalls RT-PCR-Experimente mit spezifischen FcγRII- und β -Tubulin-Oligonukleotidprimern durchgeführt. Eine anschließende Überprüfung der RT-PCR-Banden erfolgte in Southern Blot Analysen mit der spezifischen-cDNA für FcγRIIb1. Die FcγRIIb1-cDNA besitzt die 141 bp lange Insertion im cytoplasmatischen Exon, die dem FcγRIIb2 fehlt und kodiert für 47 Aminosäuren. Die FcγRIIb1-cDNA kann daher beide Spleißvarianten (FcγRIIb1 und FcγRIIb2) erkennen. MMC exprimierten die FcγRIIb2-Form des Rezeptors, die ein 500 bp großes RT-PCR-Produkt bildete.

Humane MC zeigten unter serumfreien Wachstumsbedingungen sowohl basal als auch nach Stimulation mit IL-1 β und IFN γ /LPS keine Expression von hFcγRII-mRNA. [RADEKE et al., 1994a]. Es war daher interessant herauszufinden, ob sich die mRNA-Induktionsbedingungen für den inhibitorischen FcγRIIb in der Maus von denen im humanen System unterscheiden. In früheren Untersuchungen in Ratten- und Maus-MC konnte in Northern Blot Analysen der FcγRII ebenfalls noch nicht nachgewiesen werden [HORA et al., 1992; SANTIAGO et al., 1991b]. In der **Abb. 4.3** war eine differentielle Induktion der FcγRII-mRNA in WT-MMC zu erkennen, die durch die Auswertungen verschiedener RNA-Präparationen und RT-PCR-Analysen mit anschließender Southern Blot Hybridisierung (**Tab. 4.5** und **Diagr. 4.5**) noch bestätigt wurde. Die FcγRII-mRNA wurde in WT-MMC unter ruhenden Bedingungen schon basal exprimiert. Eine Stimulation mit IL-1 β induzierte die Transkription der FcγRII-mRNA deutlich. Auch das Zytokin TNF α alleine und die gleichzeitige Inkubation von

TNF α mit IL-1 β , sowie das Th2-Zytokin IL-4 führten zu einer Transkriptionserhöhung. Faktoren wie IFN γ , IL-10 und GM-CSF regulierten dagegen die Transkription im Vergleich zum Mediumwert gar nicht bzw. führten zu einer Herunterregulation der Fc γ RII-mRNA. Die Kombination von IFN- γ mit LPS jedoch führte zu einer Stimulation der Rezeptor-mRNA, LPS scheint also die negativ regulierenden IFN- γ -Effekte aufzuheben.

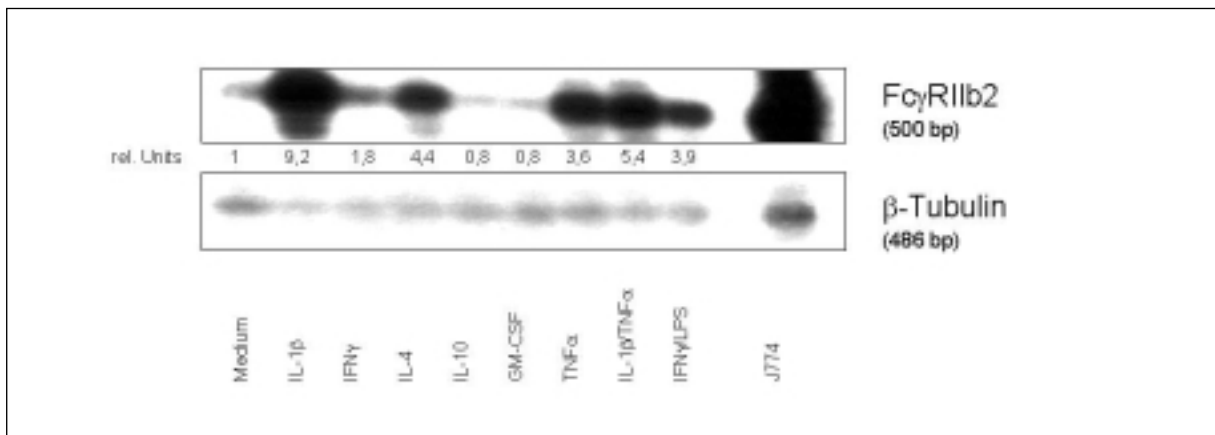
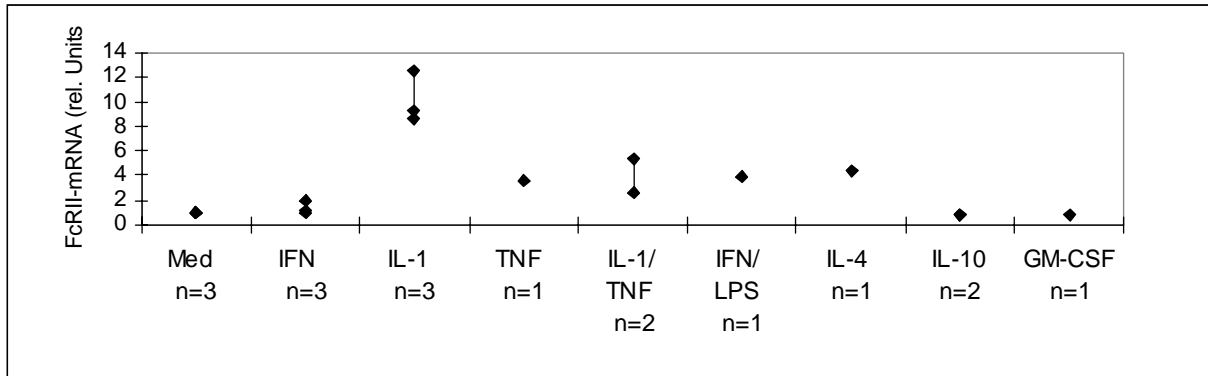


Abb. 4.3: Regulation der Fc γ RII-mRNA-Expression durch verschiedene Faktoren. Aus nicht-proliferierenden WT-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-4 (10 ng/mL), IL-10 (10 ng/mL), GM-CSF (5 ng/mL), bzw. den angegebenen Kombinationen IL-1 β /TNF- α und IFN- γ /LPS (LPS (10 μ g/mL), die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ RII-Primern (RT-PCR-Produkt: 500 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Gezeigt werden die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für Fc γ RIIb1 und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIIb2-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IL-1 β / TNF α	IFN- γ / LPS	IL-4	IL-10	GM-CSF
Versuchszahl: n	3	3	3	1	2	1	1	2	1
Trend	\leftrightarrow	\leftrightarrow	$\uparrow\uparrow\uparrow$	($\uparrow\uparrow$)	$\uparrow\uparrow$ (\uparrow)	($\uparrow\uparrow$)	($\uparrow\uparrow\uparrow$)	\downarrow	(\downarrow)
Mittelwerte \pm SD	1 \pm 0	1,3 \pm 0,59	10,1 \pm 2,1		4			0,8	
	(Fc γ RII mRNA immer vorhanden)								

Tab. 4.5: Regulation der Fc γ RII-mRNA-Expression in nicht-proliferierenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIIb-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.5** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der ruhenden WT-MMC nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-10 (10 ng/mL), IL-4 (10 ng/mL), GM-CSF (5 ng/mL) und den Kombinationen IL-1 β /TNF- α und IFN- γ /LPS mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung mit der Fc γ RIIb1- und β -Tubulin-spezifischen cDNA.



Diagr. 4.5: Regulation der FcγRII-mRNA-Expression in ruhenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.5**.

4.1.1.2.2 Induktion von FcγRII-mRNA unter proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Unter proliferierenden Bedingungen zeigte sich für die WT-MMC, wie schon unter ruhenden Kultivierungsbedingungen, eine eindeutig differentielle Induktion der FcγRII-mRNA Expression (**Abb. 4.4, Diagr. 4.6** und **Tab. 4.6**). Die schon unter basalen Bedingungen gefundene FcγRII-mRNA-Synthese wurde durch IL-1β und Kombinationen dieses Faktors mit TNF-α und teilweise auch mit IFN-γ eindeutig erhöht. Ebenfalls induzierend auf die FcγRII-mRNA-Menge wirkte die Inkubation mit LPS, wogegen TNF-α und IFN-γ als Einzelfaktoren eher keine bis herunterregulierende Effekte auf die Transkription dieses Fcγ-Rezeptors ausübten.

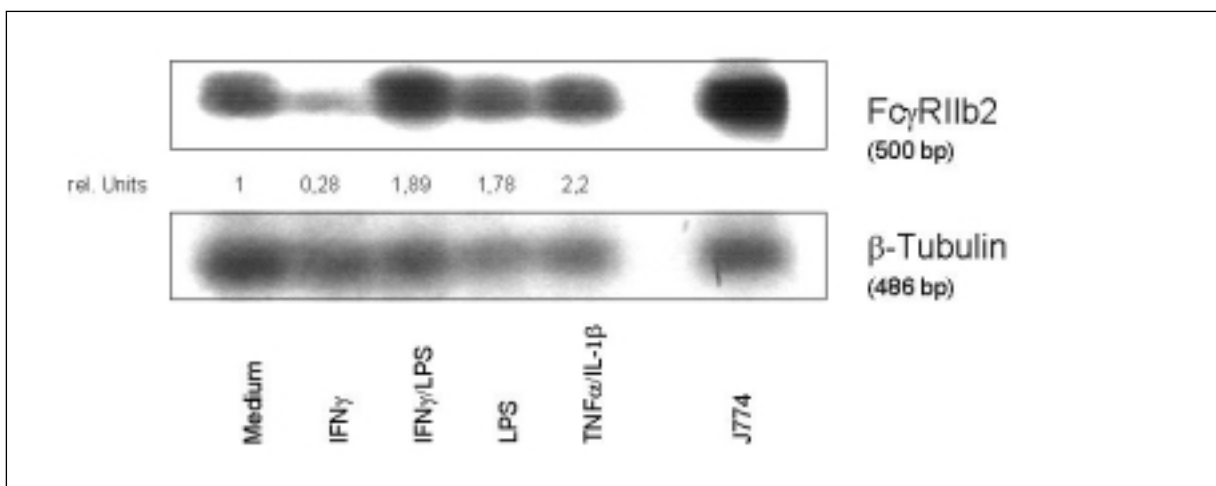
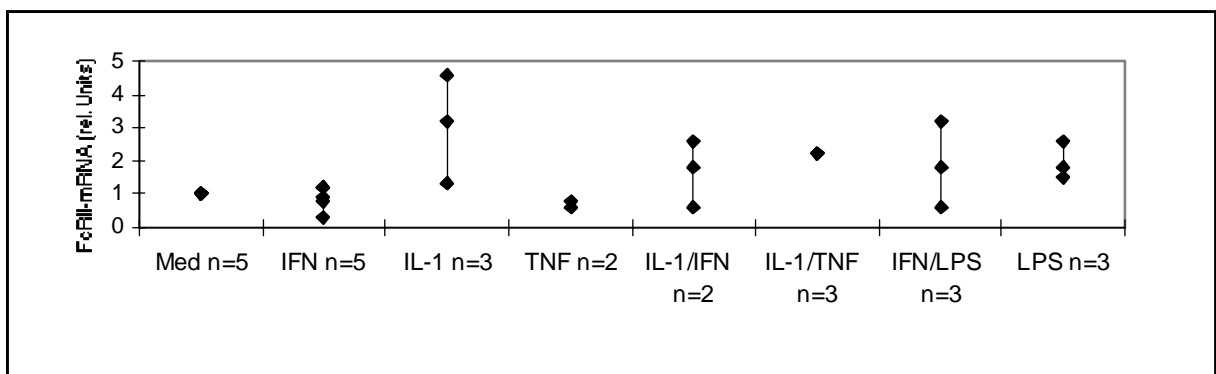


Abb. 4.4: Regulation der FcγRII-mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus wachsenden WT-MMC wurde nach Stimulation mit IFN-γ (500 U/mL), IL-1β (10 ng/mL), LPS (10 μg/mL), bzw. den angegebenen Kombinationen IFN-γ/LPS und IL-1β/TNF-α (TNF-α: 500 U/mL), die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen FcγRII-Primern (RT-PCR-Produkt: 500 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β-Tubulin-Primern durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcγRIIb1 und β-Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μL des entsprechenden

PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIIb2-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IL-1 β /IFN- γ	IL-1 β /TNF α	IFN- γ /LPS	LPS
Versuchszahl: n	5	5	3	2	2	3	3	3
Trend	\leftrightarrow	$\downarrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	\leftrightarrow	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$
Mittelwerte \pm SD	1,0 \pm 0	1,0 \pm 0,63	2,9 \pm 1,68	0,7	1,5	2,2 \pm 0,9	1,7 \pm 3,1	1,96 \pm 0,5
	(Fc γ RII-mRNA immer amplifizierbar)							

Tab. 4.6: Regulation der Fc γ RII-mRNA-Expression in proliferierenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIIb2-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.6** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der proliferierenden WT-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL) und den angegebenen Kombinationen. Nach der RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung mit den Fc γ RIIb1- und β -Tubulin-spezifischen cDNA, wurde der Mittelwert aus den densitometrischen Quantifizierungen der hybridisierten Fc γ RIIb2-Banden/ β -Tubulin-Banden berechnet und teilweise die Standardabweichung mit abgebildet.



Diagr. 4.6: Regulation der Fc γ RII-mRNA-Synthese in proliferierenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.6**.

4.1.1.2.3 Induktion von Fc γ RII-mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Fc γ RIII $^{-/-}$ (KO)-Mesangiumzellen

In Fc γ RIII $^{-/-}$ KO-MMC war die Fc γ RIIb2-mRNA wie bei den WT-MMC unter ruhenden Bedingungen basal in zwei von drei Experimenten schon vorhanden. Eine Stimulation dieser Rezeptor-mRNA, von nicht-zyklisierenden Zellen ausgehend, erfolgte nur mit IL-1 β und Kombinationen von IL-1 β mit TNF- α . IFN- γ zeigten noch deutlicher als bei den WT-MMC eine Herunterregulation des Fc γ RIIb-Transkripts

(Tab. 4.7, Diagr. 4.7). In der Abb. 4.5 konnte auch nach Inkubation mit IL-1 β keine Stimulation beobachtet werden, was eine interexperimentelle Schwankung darstellt, da IL-1 β auch als Einzelfaktor in anderen Versuchen immer stimulierend wirkte.

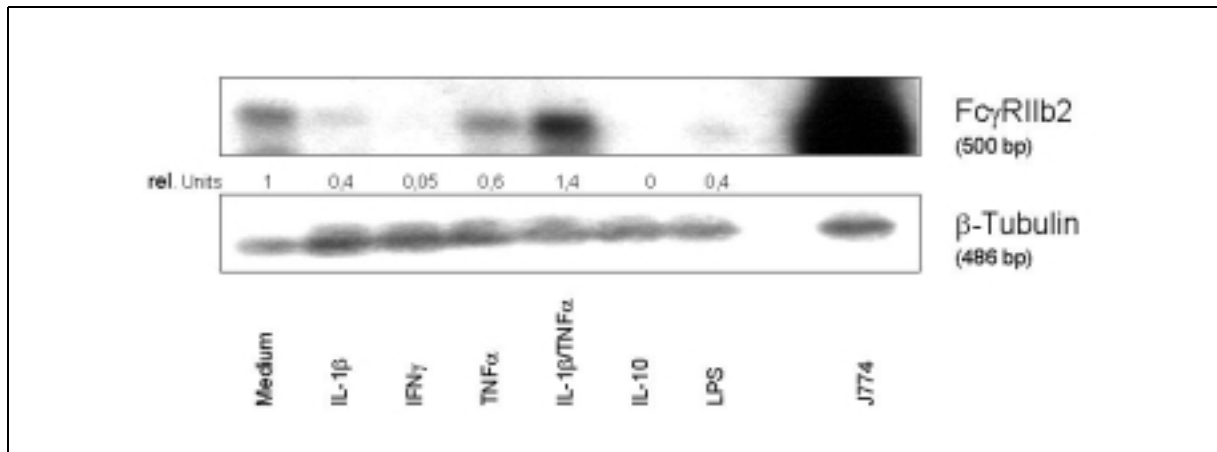
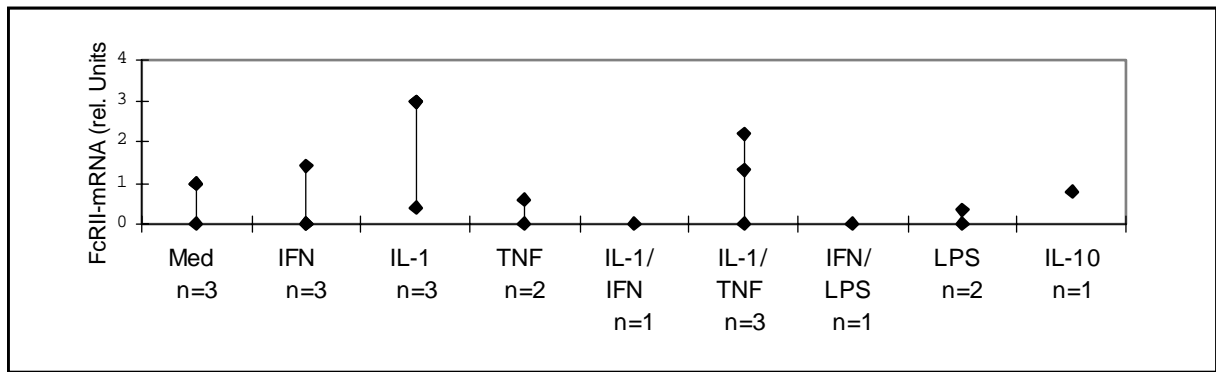


Abb. 4.5: Regulation der Fc γ R1I-mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus nicht-prolierierenden Fc γ R1I-KO-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-10 (10 ng/mL), LPS (10 μ g/mL) bzw. der Kombination IL-1 β /TNF- α die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ R1I-Primern (RT-PCR-Produkt: 500 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt (RT-PCR-Produkt: 486 bp). Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Abgebildet sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für Fc γ R1Ib1 und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ R1Ib2-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IL-1 β /IFN- γ	IL-1 β /TNF α	IFN- γ /LPS	LPS	IL-10
Versuchszahl: n	3	3	3	2	1	3	1	2	1
Trend	$\uparrow\downarrow$	\downarrow	$\uparrow\uparrow\uparrow$	\leftrightarrow	\emptyset	$\uparrow\uparrow\uparrow$	\emptyset	\downarrow	\downarrow
Mittelwerte \pm SD	0,67 \pm 0,58 (Fc γ R1I-mRNA nicht immer amplifizierbar)	0,46 \pm 0,8	2,1 \pm	0,6		1,5 \pm 0,6		0,2	0,4

Tab. 4.7: Regulation der Fc γ R1I-mRNA-Expression in ruhenden Fc γ R1I-KO-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ R1Ib2-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. In Diagr. 4.7 wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der nicht-prolierierenden Fc γ R1I-KO-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL) und den angegebenen Kombinationen mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung.



Diagr. 4.7: Regulation der FcγRII-mRNA-Synthese in ruhenden FcγRIII-KO MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.7**.

4.1.1.2.4 Induktion von FcγRII-mRNA unter proliferierenden Bedingungen in FcγRIII^{-/-} (KO)-Mesangiumzellen

Auch unter proliferierenden Kultivierungsbedingungen führte die Inkubation mit IFN-γ zu einer Herunterregulation der FcγRIIb2-mRNA, während IL-1β als Einzelfaktor und in Kombination mit TNF-α, nicht aber in Kombination mit IFN-γ, deutlich stimulierend wirkte (**Tab. 4.8**, **Diagr. 4.8** und **Abb. 4.6**). Die leicht stimulierende Wirkung von IL-10 auf die mRNA-Expression des FcγRIIb2 wurde nur in einem Versuch gezeigt, unter ruhenden Bedingungen führte der Faktor weder bei den WT- noch bei den FcγRIII-KO-MMC zu einer verstärkten Transkription.

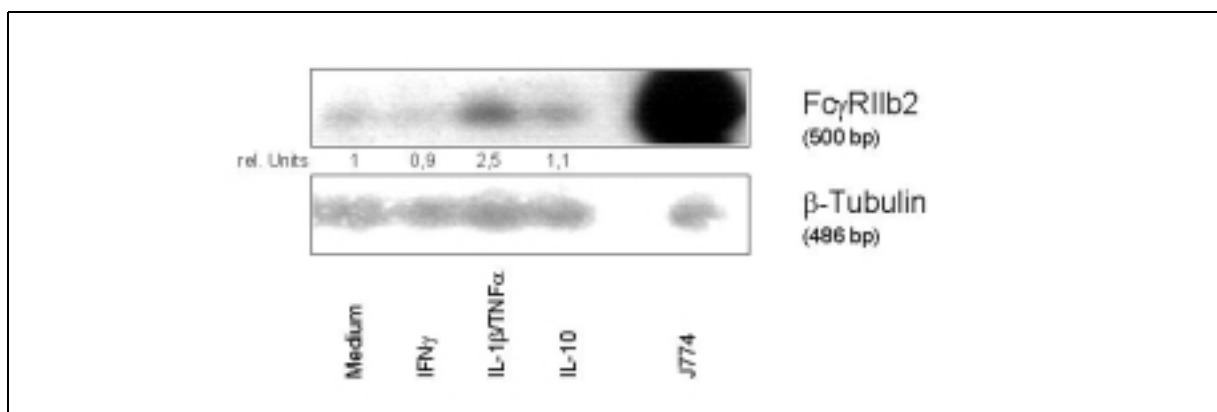
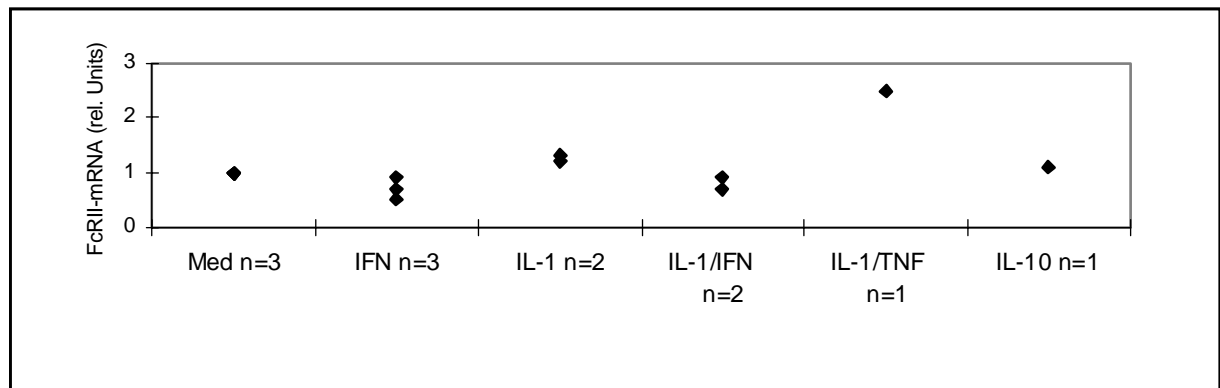


Abb. 4.6: Regulation der FcγRII-mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus proliferierenden FcγRIII-KO-MMC wurde nach Stimulation mit IFN-γ (500 U/mL), IL-10 (10 ng/mL) und der Kombination IL-1β (10 ng/mL) mit TNF-α (500 U/mL) die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen FcγRIIb-Primern (RT-PCR-Produkt: 500 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β-Tubulin-Primern durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde eine Amplifikation mit J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcγRIIb1 und β-Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 µL des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcγRIIb2-Banden/β-Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	IFN- γ / IL-1 β	IL-1 β /TNF α	IL-10
Versuchszahl: n	3	3	2	2	1	1
Trend	\Leftrightarrow	\Downarrow	$\Uparrow\Uparrow$	\Downarrow	$(\Uparrow\Uparrow\Uparrow)$	(\Uparrow)
Mittelwerte \pm SD	1,0 \pm 0 (Fc γ RII-mRNA immer amplifizierbar)	0,7 \pm 0,2	1,2	0,8		1,5 \pm 0,6

Tab. 4.8: Regulation der Fc γ RII-mRNA-Expression in proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIIb2-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.8** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-10 (10 ng/mL) und den angegebenen Kombinationen mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung.



Diagr. 4.8: Regulation der Fc γ RII-mRNA-Synthese in proliferierenden Fc γ RIII-KO MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.8**.

4.1.1.2.5 Zusammenwirken von IL-1 β und IFN- γ bei der Fc γ RII-mRNA-Induktion in proliferierenden Fc γ RIII-/- (KO)-Mesangiumzellen

Bei der Fc γ RII-mRNA-Expression war durch Inkubation mit IL-1 β und IFN- γ ein gegenläufiger Effekt bei der Induktion dieses Rezeptors zu erkennen. Um den Mechanismus der Regulation zu untersuchen, wurden die Fc γ RIII-/- (KO)-MMC mit den einzelnen Faktoren und ihren Kombinationen für definierte Zeiträume inkubiert und anschließend die Fc γ RII-mRNA-Expression analysiert (**Abb. 4.7**). Die mit IL-1 β vorstimulierten und anschließend mit IFN- γ behandelten Zellen wiesen dabei die gleiche Fc γ RII-mRNA-Menge auf wie die nur mit IL-1 β inkubierten Zellen. IFN- γ war also nicht in der Lage, die durch IL-1 β induzierten Effekte bei der mRNA-Transkription zu modulieren. Ein ebensolches Ergebnis zeigte sich nach

Vorstimulation mit IFN- γ , wo IL-1 β die herunterregulierenden Effekte des Th1-Zytokins nicht aufheben konnte. Eine Inkubation der Fc γ RIII-/- (KO)-MMC mit Kombination der Einzelfaktoren für die untersuchten Zeiträume wies höhere Expressionswerte als IFN- γ alleine und niedrigere Werte als IL-1 β auf, was eine gegenseitige Beeinflussung der zur gleichen Zeit gegebenen Faktoren andeuten könnte.

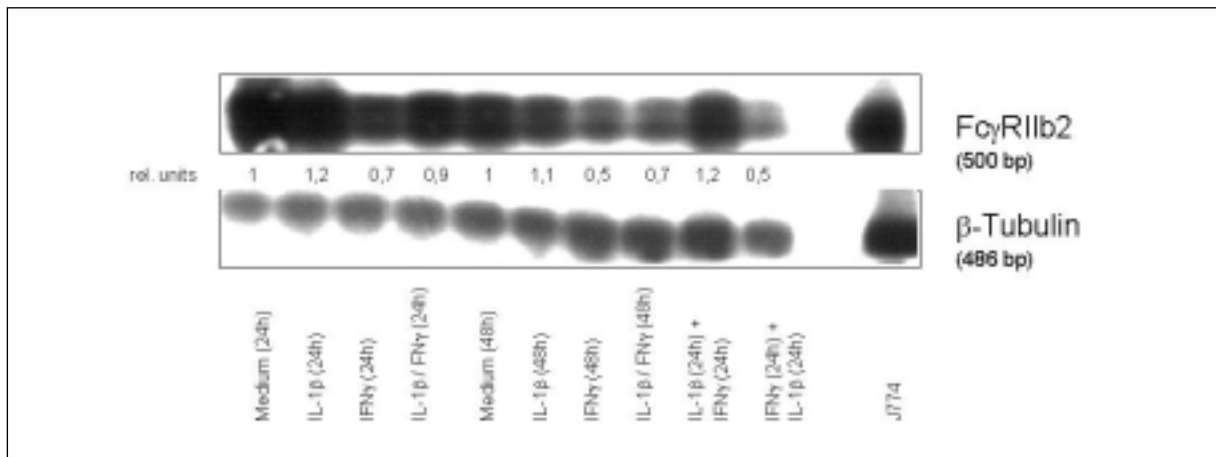


Abb. 4.7: Zusammenwirken von IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL) bei der Regulation der Fc γ RII-mRNA-Synthese. Proliferierende Fc γ RIII-/- (KO)-MMC wurden für 24 oder für 48 Stunden mit den o.g. Faktoren sowie deren Kombinationen stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Oligonukleotid-Primern für Fc γ RIIb und β -Tubulin als interner Standard eingesetzt. Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den 32 P-markierten spezifischen cDNAs für Fc γ RIIb2 und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Die Zahlen repräsentieren die Resultate der densitometrischen Quantifizierung der Autoradiografien. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

4.1.1.3 Induktion von Fc γ RIII α -mRNA

4.1.1.3.1 Induktion von Fc γ RIII α -mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Ebenso wie der murine Fc γ RI besteht der Fc γ RIII aus mehreren Untereinheiten und ist als oligomerer Rezeptorkomplex mit signalübertragenden γ - und ζ -Ketten assoziiert. In Daten zu humanen MC konnte unter wachstumsarretierten Bedingungen eine Induzierbarkeit der Fc γ RIII α -Ketten-mRNA mit IFN- γ /LPS gezeigt werden [RADEKE et al., 1994a].

In Ratten- und Maus-MC wurde dieser niedrig-affine Fc γ RIII unter proliferierenden Voraussetzungen ebenfalls schon nachgewiesen, wo er durch CSF-1, IFN- γ und db-cAMP stimuliert wurde [HORA et al., 1992; SANTIAGO et al., 1991b].

Im Gegensatz zur Fc γ RIIb-mRNA wurde die Transkription der Fc γ RIII α -mRNA unter nicht-zyklisierenden Bedingungen nur in vier von sieben RNA-Präparationen schon

basal exprimiert, konnte aber durch IFN γ und Kombinationen von IFN- γ mit LPS oder TNF- α deutlich stimuliert werden (**Abb. 4.8, Diagr. 4.9** und **Tab. 4.9**). IL-1 β zeigte in mehreren Versuchen keine stimulierenden Effekte auf diese ruhenden Zellen.

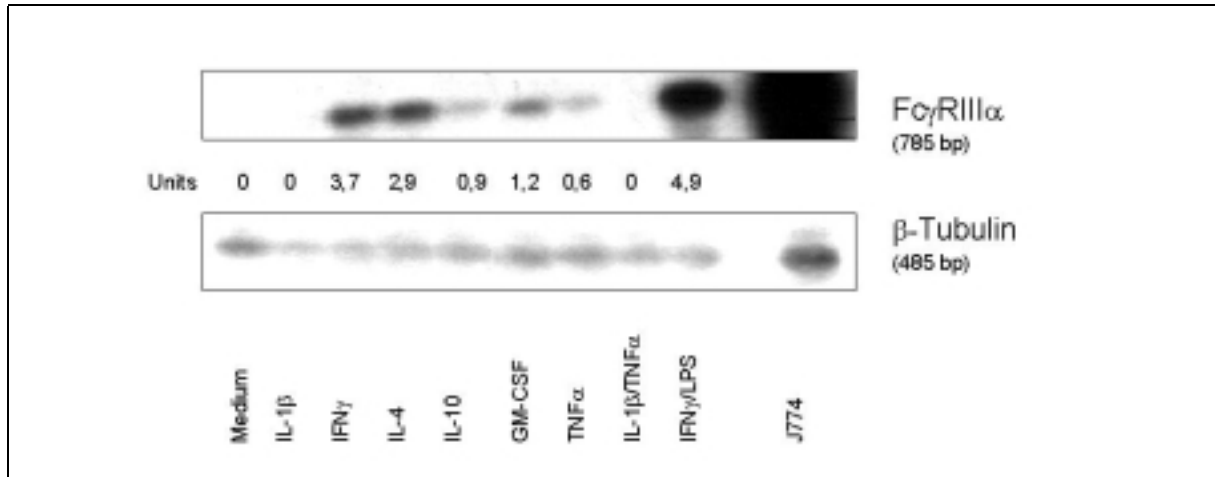
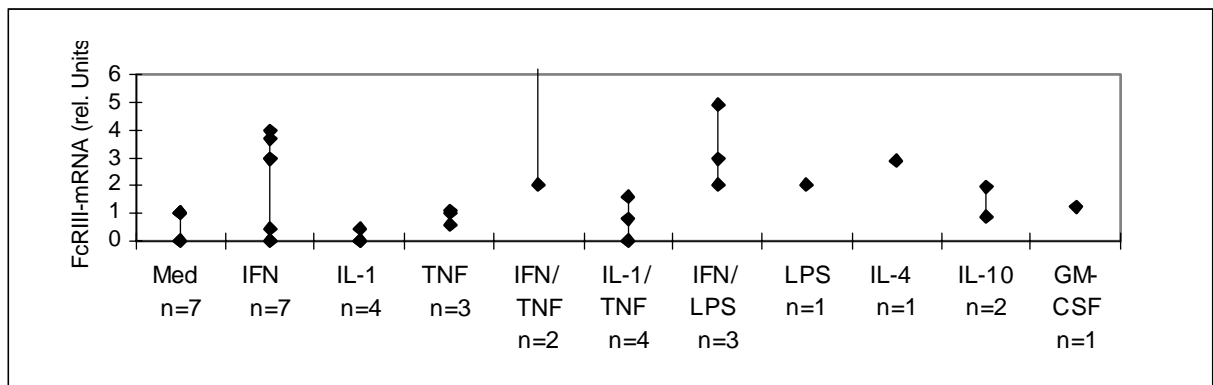


Abb. 4.8: Regulation der Fc γ RIII α -mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus nicht-proliferierenden WT-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-4 (10 ng/mL), IL-10 (10 ng/mL), GM-CSF (5 ng/mL), bzw. den angegebenen Kombinationen IL-1 β /TNF- α und IFN- γ /LPS (LPS: 10 μ g/mL), die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ RIII α -Primern (RT-PCR-Produkt: 785 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt (RT-PCR-Produkt: 486 bp). Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für Fc γ RIII α und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Weiterhin abgebildet sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIII α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IFN- γ / TNF α	IL-1 β / TNF α	IFN- γ / LPS	LPS	IL-4	IL-10	GM- CSF
Versuchszahl: n	7	7	4	3	2	4	3	1	1	2	1
Trend	↓↑	↑↑↑↑	↓	↑	↑↑↑↑	↑	↑↑↑↑	↑↑	↑↑	↑↑	(↑)
Mittelwerte \pm SD	0,4 \pm 0,53*	2,1 \pm 1,8	0,3 \pm 0,5	0,9 \pm 0,29	3,4	0,9 \pm 0,7	2,8 \pm 0,61			2,6	
	Fc γ RIII α -mRNA nicht immer amplifizierbar										

Tab. 4.9: Regulation der Fc γ RIII α -mRNA-Expression in nicht-proliferierenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIII α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.9** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der ruhenden WT-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL), IL-4 (10 ng/mL), GM-CSF (5 ng/mL) und den angegebenen Kombinationen mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für Fc γ RIII α und β -Tubulin.



Diagr. 4.9: Regulation der Fc γ RIII α -mRNA-Synthese in nicht-proliferierenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.9**.

4.1.1.3.2 Induktion von Fc γ RIII α -mRNA unter proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Eine Untersuchung der Fc γ RIII α -mRNA-Expression bei wachsenden WT-MMC zeigte sich ein leicht verändertes Induktionsmuster zu den WT-MMC unter nicht-zyklisierenden Bedingungen. Während bei ruhenden MMC die Transkription der Rezeptor-mRNA durch IL-1 β -Inkubation nicht moduliert wurde, zeigten die proliferierenden Zellen eine Hochregulation mit diesem Monokin alleine und in Kombinationen mit TNF- α und IFN- γ (**Abb. 4.9, Diagr. 4.10** und **Tab. 4.10**). Auch die Einzelfaktoren IFN- γ , TNF- α , LPS und IL-10 haben deutliche Induktionseffekte auf die Transkription der Fc γ RIII α -mRNA, die aber bei verschiedenen RNA-Präparationen in ihrer Stimulationsstärke schwanken.

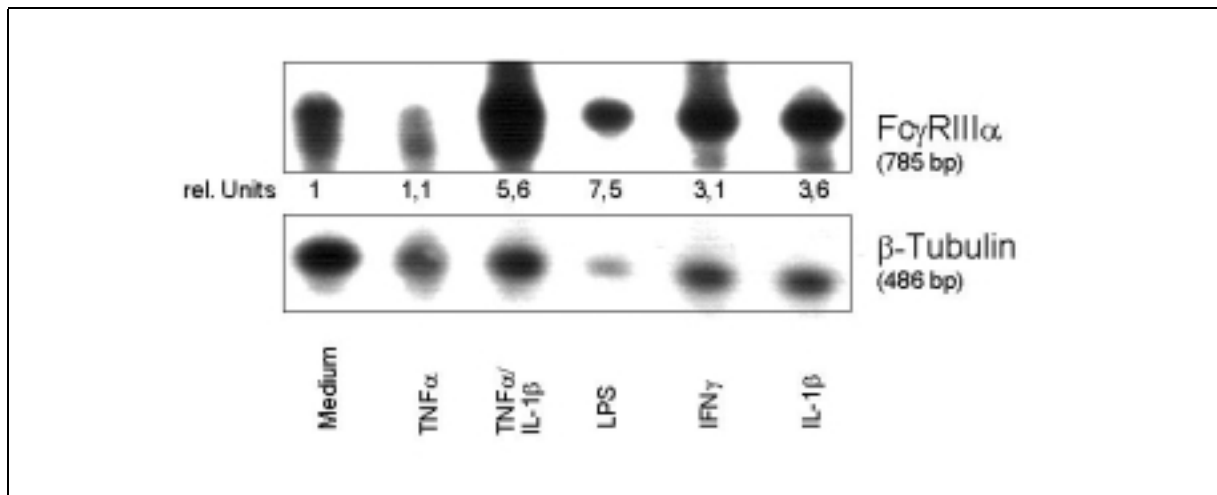
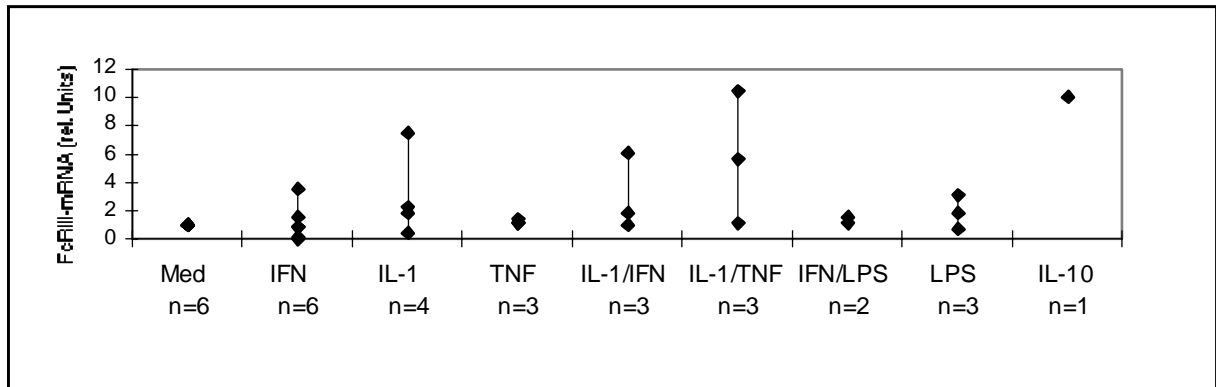


Abb. 4.9: Regulation der Fc γ RIII α -mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus proliferierenden WT-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL) und der angegebenen Kombinationen IL-1 β /TNF- α die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ RIII α -Primern (RT-PCR-Produkt: 785 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt (RT-PCR-Produkt: 486 bp). Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für Fc γ RIII α und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Weiterhin abgebildet sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIII α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IFN- γ /IL-1 β	IL-1 β /TNF α	IFN- γ /LPS	LPS	IL-10
Versuchszahl: n	6	6	4	3	3	3	2	3	1
Trend	\leftrightarrow	$\uparrow\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	\uparrow	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow$	\uparrow	$\uparrow\uparrow\uparrow$	$(\uparrow\uparrow\uparrow\uparrow)$
Mittelwerte \pm SD	1,0 \pm 0	1,2 \pm 1,25	3 \pm 3,1	1,3 \pm 0,2	3 \pm 2,7	5,8 \pm 4,6	1,4	1,87 \pm 1,2	
	Fc γ RIII α -mRNA immer amplifizierbar								

Tab. 4.10: Regulation der Fc γ RIII α -mRNA-Expression in proliferierenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten Fc γ RIII α -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.10** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der proliferierenden WT-MMC nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL) und den angegebenen Kombinationen mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für Fc γ RIII α und β -Tubulin.



Diagr. 4.10: Regulation der Fc γ RIII α -mRNA-Synthese in proliferierenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus Tab. 4.10.

4.1.1.4 Induktion von Fc γ -Ketten-mRNA

4.1.1.4.1 Induktion von Fc γ -mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Für die Expression auf der Zelloberfläche und für die Signaltransduktion in die Zelle benötigen der Fc γ RI und der Fc γ RIII die Assoziation von γ -Ketten zu den ligandenbindenden α -Ketten [WIRTHMUELLER et al., 1992; KUROSAKI et al., 1991; ERNST et al., 1993]. Die γ -Ketten-mRNA war zwar basal vorhanden, wurde aber in ruhenden WT-MMC nicht sicher induziert. Eine Transkriptionserhöhung der mRNA erfolgte nur nach Stimulation mit IFN- γ und IL-1 β , sowie der Kombination von IL-1 β mit TNF- α (Abb. 4.10, Diagr. 4.11 und Tab. 4.11).

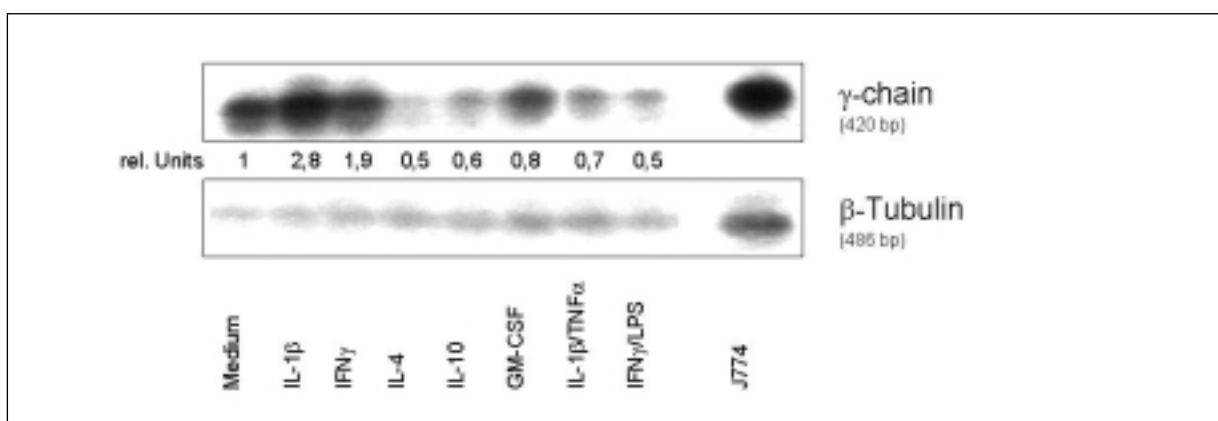
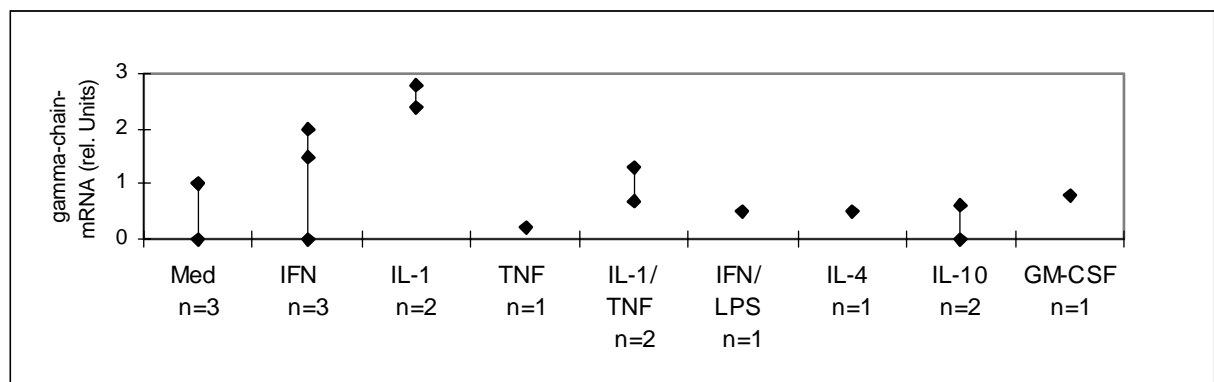


Abb. 4.10: Regulation der Fc γ -Ketten-mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus nicht-proliferierenden WT-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-4 (10 ng/mL), IL-10 (10 ng/mL), GM-CSF (5 ng/mL), bzw. den angegebenen Kombinationen IL-1 β /TNF- α und IFN- γ /LPS (LPS: 10 μ g/mL), die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ -Primern (RT-PCR-Produkt: 420 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt (RT-PCR-Produkt: 486 bp). Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA

mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcR γ -*chain*- und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Weiterhin abgebildet sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -*chain*-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IL-1 β / TNF α	IFN- γ / LPS	IL-4	IL-10	GM-CSF
Versuchszahl: n	3	3	2	1	2	1	1	2	1
Trend	$\downarrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow$	$\uparrow\uparrow\uparrow$	(\downarrow)	\uparrow	(\leftrightarrow)	(\leftrightarrow)	\downarrow	(\leftrightarrow)
Mittelwerte \pm SD	0,67 \pm 0,57 (FcR γ -mRNA nicht immer amplifizierbar)	1,2 \pm 1,0	2,4		1			0,3	

Tab. 4.11: Regulation der FcR γ -mRNA-Expression in ruhenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.11** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der WT-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-10 (10 ng/mL), IL-4 (10 ng/mL), GM-CSF (5 ng/mL) und Kombinationen dieser Faktoren (LPS: 10 μ g/mL) und RT-PCR-Analysen mit anschließender Southern Blot-Hybridisierungen mit den spezifischen cDNAs für FcR γ -*chain* und β -Tubulin.



Diagr. 4.11: Regulation der FcR γ -mRNA-Synthese in ruhenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.11**.

4.1.1.4.2 Induktion von FcR γ -mRNA unter proliferierenden Bedingungen in Wildtyp-Mesangiumzellen

Unter Wachstumsbedingungen mit 10% FCS im Kulturmedium zeigte sich bei der Expression der γ -Ketten-mRNA ein ähnliches Expressionsmuster wie bei nicht-zyklisierenden MMC. Die γ -Kette wurde weitestgehend konstitutiv exprimiert und zeigte nur geringe Regulationen. Auch hier waren nur die Zytokine IL-1 β , IFN- γ , die

Kombination dieser Faktoren, sowie die Kombination von IFN- γ mit LPS, aber nicht LPS alleine stimulierend (**Abb. 4.11**, **Diagr. 4.12** und **Tab. 4.12**).

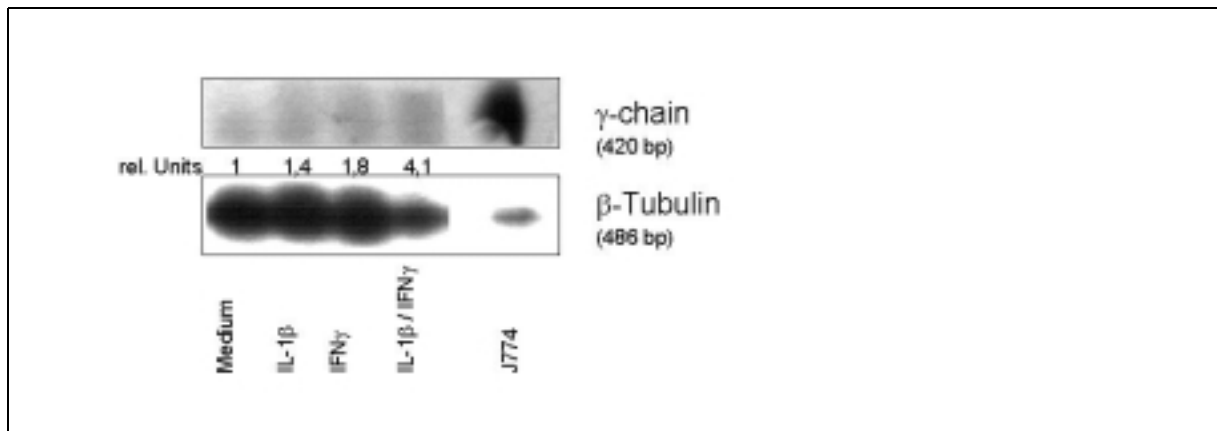
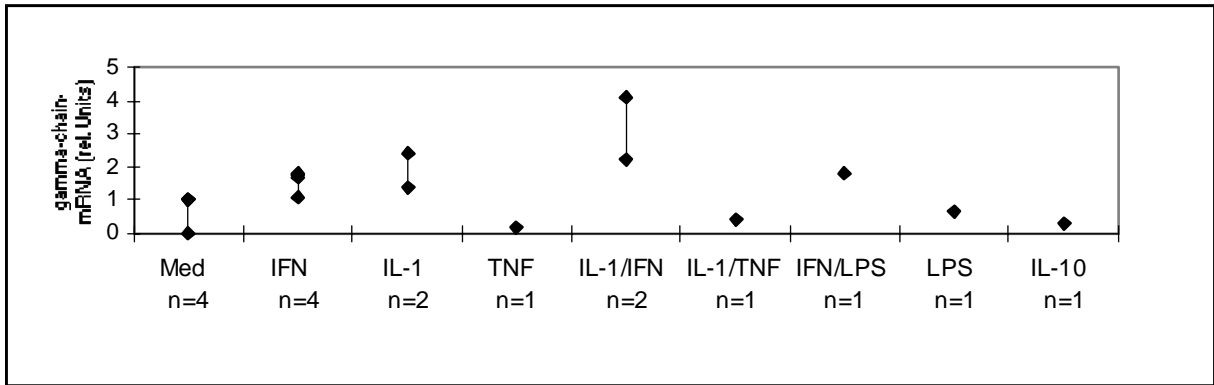


Abb. 4.11: Regulation der FcR γ -Ketten-mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus proliferierenden WT-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10ng/mL) und der Kombination IL-1 β /IFN- γ die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ RIII α -Primern (RT-PCR-Produkt: 420 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt (RT-PCR-Produkt: 486 bp). Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcR γ -*chain*- und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Weiterhin abgebildet sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -*chain*-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IFN- γ /IL-1 β	IL-1 β /TNF α	IFN- γ /LPS	LPS	IL-10
Versuchszahl: n	4	4	2	1	2	1	1	1	1
Trend	↓↑	↑↑↑	↑↑↑	(↓)	↑↑↑↑		(↑↑↑)		
Mittelwerte \pm SD	0,75 \pm 0,5	1,6 \pm 0,3	1,9	0,2	2,6	0,42	1,8	0,67	0,33
	FcR γ -mRNA nicht immer amplifizierbar								

Tab. 4.12: Regulation der FcR γ -mRNA-Expression in proliferierenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. In **Diagr. 4.12** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der WT-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL) und den angegebenen Kombinationen mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcR γ und β -Tubulin.



Diagr. 4.12: Regulation der FcR γ -mRNA-Synthese in proliferierenden WT-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.12**.

4.1.1.4.3 Induktion von FcR γ -mRNA unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Fc γ RIII $^{-/-}$ (KO)-Mesangiumzellen

Fc γ RIII-KO-MMC zeigten bei mehreren durchgeführten Untersuchungen der FcR γ -Ketten-mRNA unter wachstumsarretierten Zuständen keine basale Expression dieser signaltransduzierenden Kette wie in **Diagr. 4.13**, **Tab. 4.13** und **Abb. 4.12** zu sehen ist. Nach Inkubation mit den Faktoren IFN- γ , IL-1 β , TNF- α , IL10 und LPS erfolgte eine Induktion der FcR γ -Ketten-mRNA, wobei IFN- γ am eindeutigsten stimulierend war.

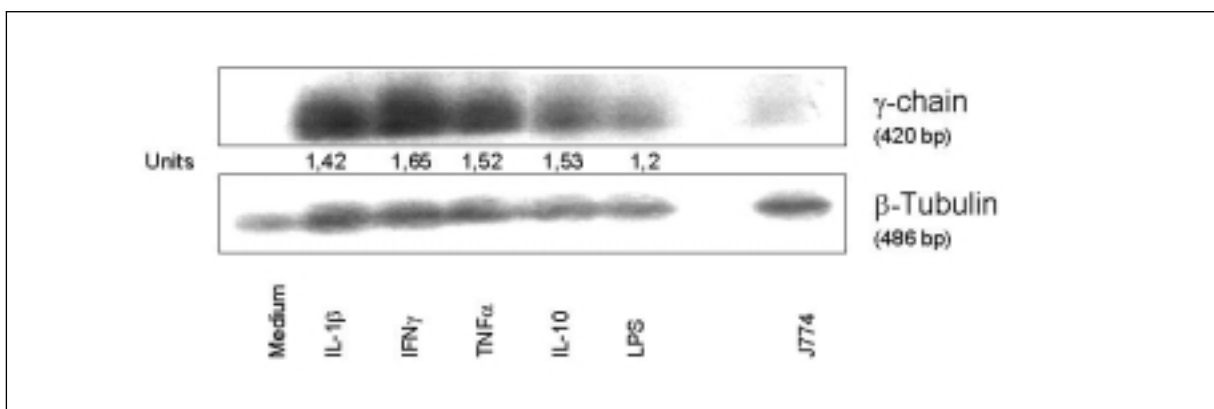
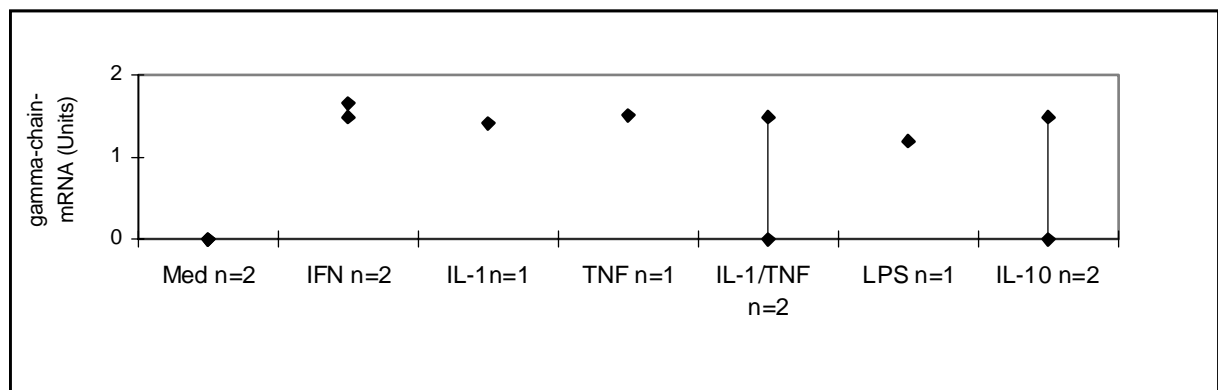


Abb. 4.12: Regulation der FcR γ -Ketten-mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus nicht-proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), IL-10 (10 ng/mL) und LPS (10 μ g/mL) die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen Fc γ RIII α -Primern (RT-PCR-Produkt: 420 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern durchgeführt. Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcR γ -*chain*- und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Weiterhin abgebildet sind die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -*chain*-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	TNF α	IL-1 β /TNF α	LPS	IL-10
Versuchszahl: n	2	2	1	1	2	1	2
Trend	∅	↑↑↑↑	(↑↑↑↑)	(↑↑↑↑)	↑↑	(↑↑)	↑↑
Mittelwerte \pm SD	0 (keine FcR γ - mRNA amplifizierbar)	1,6			0,8		0,75

Tab. 4.13: Regulation der FcR γ -mRNA-Expression in nicht-proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Werte und Tendenzen der relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. In **Diagr. 4.13** wurden die Einzelwerte dieser Versuchsergebnisse grafisch dargestellt. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der Fc γ RIII-KO-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), TNF- α (500 U/mL), LPS (10 μ g/mL), IL-10 (10 ng/mL), den angegebenen Kombinationen. Nach der RT-PCR-Analyse wurden Southern Blot-Hybridisierungen mit den FcR γ - und β -Tubulin-spezifischen cDNAs durchgeführt.



Diagr. 4.13: Regulation der FcR γ -mRNA-Synthese in nicht-proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus **Tab. 4.13**.

4.1.1.4.4 Induktion von FcR γ -mRNA unter proliferierenden Bedingungen in Fc γ RIII-/- (KO)-Mesangiumzellen

Unter proliferierenden Bedingungen exprimierten Fc γ RIII-/- (KO)-MMC schon konstitutiv große Mengen der γ -Ketten mRNA, die durch die eingesetzten Faktoren wie IFN- γ , IL-1 β , IL-10 und den Kombinationen IFN- γ /IL-1 β und IL-1 β /TNF- α nur gering reguliert wurde (**Abb. 4.13, Tab. 4.14** und **Diagr. 4.14**). Dabei ist IFN- γ der einzige Faktor, der die hohe basale mRNA-Expression noch verstärken konnte.

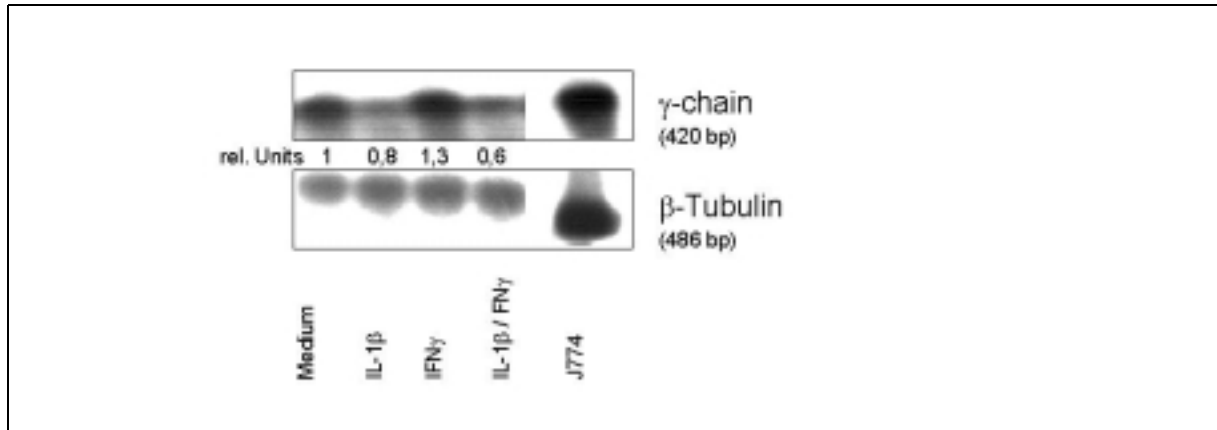
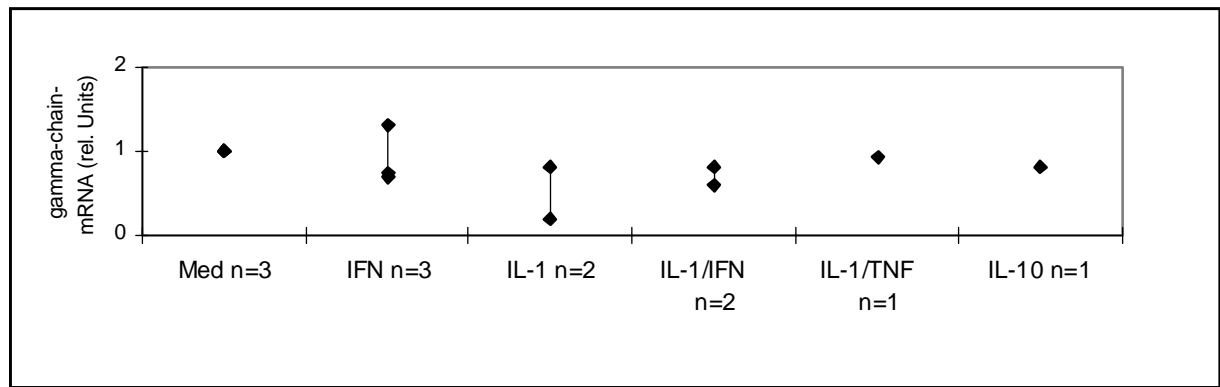


Abb. 4.13: Regulation der FcR γ -Ketten-mRNA-Synthese durch verschiedene Faktoren. Aus proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC wurde nach Stimulation mit IFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL) und der Kombination IL-1 β /IFN- γ die Gesamt-RNA präpariert, die in RT-PCR-Experimenten mit spezifischen FcR γ -Primern (RT-PCR-Produkt: 420 bp) eingesetzt wurde. Als interner Standard wurde eine Amplifikation mit β -Tubulin-Primern. Als positive Kontrolle wurde J774A.1-mRNA mitamplifiziert. Dargestellt sind die positiven Banden der Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcR γ -*chain* und β -Tubulin nach der elektrophoretischen Auftrennung von 15 μ L des entsprechenden PCR-Produktes im 2%igen Agarosegel. Weiterhin abgebildet sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -*chain*-Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

Stimulation	Med	IFN- γ	IL-1 β	IL-1 β /IFN- γ	IL-1 β /TNF α	IL-10
Versuchszahl: n	3	3	2	2	1	1
Trend	\Leftrightarrow	$\uparrow\uparrow\uparrow$	\downarrow	\downarrow	(\Leftrightarrow)	(\Leftrightarrow)
Mittelwerte \pm SD	1 \pm 0 (FcR γ -mRNA immer amplifizierbar)	0,92 \pm 0,33	0,5	0,7		

Tab. 4.14: Regulation der FcR γ -mRNA-Expression in proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der hybridisierten FcR γ -Banden/ β -Tubulin-Banden entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen. Die Daten stammen aus verschiedenen RNA-Präparationen der Fc γ RIII-KO-MMC nach Stimulation mit mIFN- γ (500 U/mL), IL-1 β (10 ng/mL), IL-10 (10 ng/mL) und den angegebenen Kombinationen (TNF- α : 500 U/mL) Kombinationen mit anschließender RT-PCR-Analyse und Southern Blot-Hybridisierung mit den spezifischen cDNAs für FcR γ und β -Tubulin.



Diagr. 4.14: Regulation der Fc γ -mRNA-Expression in proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC. Grafische Darstellung der einzelnen Versuchsergebnisse aus Tab. 4.14.

4.1.2 Differentielle Induktion von Fc γ R-Proteinen

Neben der mRNA-Expression der Fc γ -Rezeptoren wurde versucht, die Existenz der Fc γ -Rezeptor-Moleküle auf der Zelloberfläche mittels verschiedener Protein-Nachweismethoden zu zeigen. Ein Problem für den Nachweis der Rezeptorproteine stellt das Fehlen spezifischer Antikörper dar. So gibt es im Maussystem nur einen Fc γ RII und Fc γ RIII gleichzeitig erkennenden Antikörper, mAb 2.4G2 und zwei anti-Ly-17 mAb, die die allelen Formen des Fc γ RII erkennen, die auf verschiedenen Mausstämmen vertreten sind [HOLMES et al., 1985]. In der Literatur sind die beiden Ly-17.1/2 Antikörper bisher immer als anti-Fc γ RII/III Antikörper beschrieben worden, Versuche von Schiller et al. [SCHILLER et al., 1998] haben aber eine Spezifität der Antikörper für die polymorphen Formen des Fc γ RII ohne Kreuzreaktivität für andere Fc γ R gezeigt. Für den Fc γ RI sind noch keine spezifischen Antikörper beschrieben, weshalb dieser Rezeptor auf Proteinebene nicht nachweisbar ist.

Da in proliferierenden MMC eine höhere Fc γ RII- und Fc γ RIII-mRNA-Expression detektiert wurde als in ruhenden Zellen, wurden diese Protein-Expressionsuntersuchungen mit wachsenden MMC und Stimulationen über 48 Stunden durchgeführt.

4.1.2.1 Oberflächenexpression von Fc γ -Rezeptoren in Objektträgerfärbungen

Eine Methode zum Nachweis der Fc γ -Rezeptor-Moleküle auf der Zelloberfläche stellt die Objektträgerfärbung dar. Dafür wurden zunächst Versuche zur Oberflächenfärbung der Fc γ -Rezeptor-Proteine mit der monozytären Maus-Zelllinie J774A.1 durchgeführt, die mit dem anti-Fc γ RII/III Antikörper, mAb 2.4G2 oder mit dem anti-Fc γ RII Antikörper, Ly17.2, unter Verwendung des APAAP-Methode (Dako, Hamburg) positiv angefärbt werden konnten (s. 3.3.6.). Diese Enzym-Anti-Enzykomplex-Techniken mußte für die MMC aber optimiert werden, da die

gewünschten Färbeergebnisse zunächst ausblieben. Eine Optimierung erfolgte durch Einsatz verschiedener Antikörperverdünnungen, Fixierungsmethoden, Puffersysteme und Chromogene. Unter den optimierten Bedingungen wurde auch die *EnVision*TM-AP-Methode zum Nachweis der Fc γ R-Proteine angewendet, die eine hohe Nachweisempfindlichkeit besitzt. Das *EnVision*TM-AP-Färbesystem basiert auf einer neuen Technologie, bei der viele alkalische Phosphatase-Moleküle mit spezifischen Antikörpern an ein Dextran-Rückgrat gekoppelt sind.

Eine Anfärbung mit dem anti-Ly17.1 Antikörper auf den Fc γ RIII^{-/-} KO-MMC, bei dem es sich um einen Maus-Antikörper der IgM Subklasse handelt, konnten keine positiven Ergebnisse erzielt werden, da keines der sekundären Detektionssysteme diese Subklasse gebunden hat.

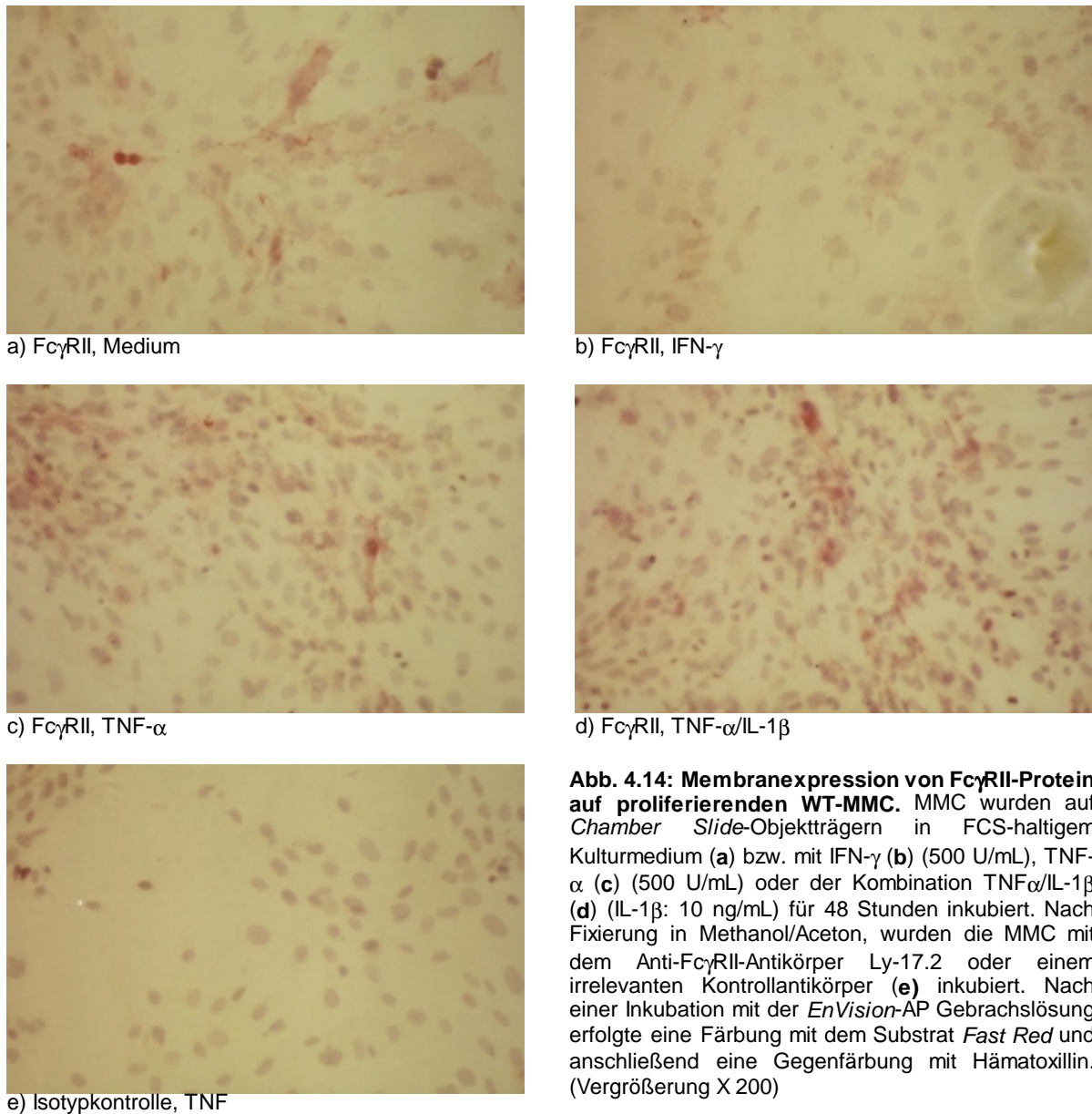
4.1.2.1.1 Immunfärbung von Fc γ RII

Um die Oberflächenexpression von Fc γ RII Molekülen auf den WT-MMC zu untersuchen, wurden die WT-MMC in einer definierten Zelldichte auf „*Chamber Slide*“-Objektträger ausgesät, die adhärenzten MMC für 48 Stunden stimuliert, mit dem Fc γ RII-spezifischen Antikörper Ly-17.2 und der *EnVision*TM-AP-Technik angefärbt. Die Zellen zeigten je nach Passage unterschiedliches Proliferationsverhalten, so daß die Zelldichte in manchen Färbungen zu dicht war, so daß eine Quantifizierung sich als extrem schwierig erwies. Durch eine Verringerung der Zellzahl konnte ein besseres Ergebnis erzielt werden.

Die **Abb. 4.14** zeigt die auf mRNA-Ebene gefundenen herunterregulierenden Effekte von IFN- γ im Vergleich zum Mediumwert auf die Expression von Fc γ RII auch auf Proteinebene. Die Stimulationen mit TNF- α und TNF- α /IL-1 β führten zu einer erhöhten Rezeptordichte auf der Zelloberfläche im Vergleich zum unstimulierten Mediumwert unter FCS-Bedingungen. Die gemittelten Ergebnisse der Auszählungen positiv angefärbter MMC aus mehreren Objektträgerfärbungen sind in der **Tab. 4.15** dargestellt.

Stimulation	Med	IFN- γ	TNF α	IL-1 β /TNF α
Versuchszahl: n	6	6	6	3
Trend	↑	↓	↑↑↑	↑↑↑↑
Mittelwerte in %	13,2	9,6	15,8	18

Tab. 4.15: Fc γ RII-Proteinexpression auf proliferierenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse der prozentualen Anfärbungen mehrerer unabhängiger Immunfärbungen mit dem Anti-Fc γ RII-Antikörper Ly-17.2. Die MMC wurden in definierter Zelldichte auf *Chamber slide*-Objektträger ausgesät und nach Erreichen der Adhärenz für 48 Stunden mit IFN- γ (500 U/mL), TNF- α (500 U/mL) oder der Kombination TNF α /IL-1 β (IL-1 β : 10 ng/mL) stimuliert.



4.1.2.1.2 Immunfärbung von Fc γ RII/III

Die auf „*Chamber Slide*“-Objektträger ausgesäten und adhärenierten MMC wurden für 48 Stunden stimuliert und mit dem Fc γ RII/Fc γ RIII-spezifischen 2.4G2 und der *EnVision*TM-AP-Technik angefärbt. Die Immunfärbung zeigte schon unter Mediumbedingungen durch die angefärbten Zellen auf WT-MMC eine Expression der Rezeptoren, die durch 48-stündige Stimulation mit IFN- γ , TNF- α und TNF- α /IL-1 β verstärkt wurde (**Abb. 4.15 und Tab. 4.16**). Ausgehend von diesen Beobachtungen und den Färbungen der Fc γ RII-Oberflächenrezeptoren mit Ly-17.2, könnte man Rückschlüsse auf die Proteinexpression von Fc γ RIII ziehen. Demnach war IFN- γ der beste Induktor für Fc γ RIII, gefolgt von TNF- α /IL-1 β und TNF- α .

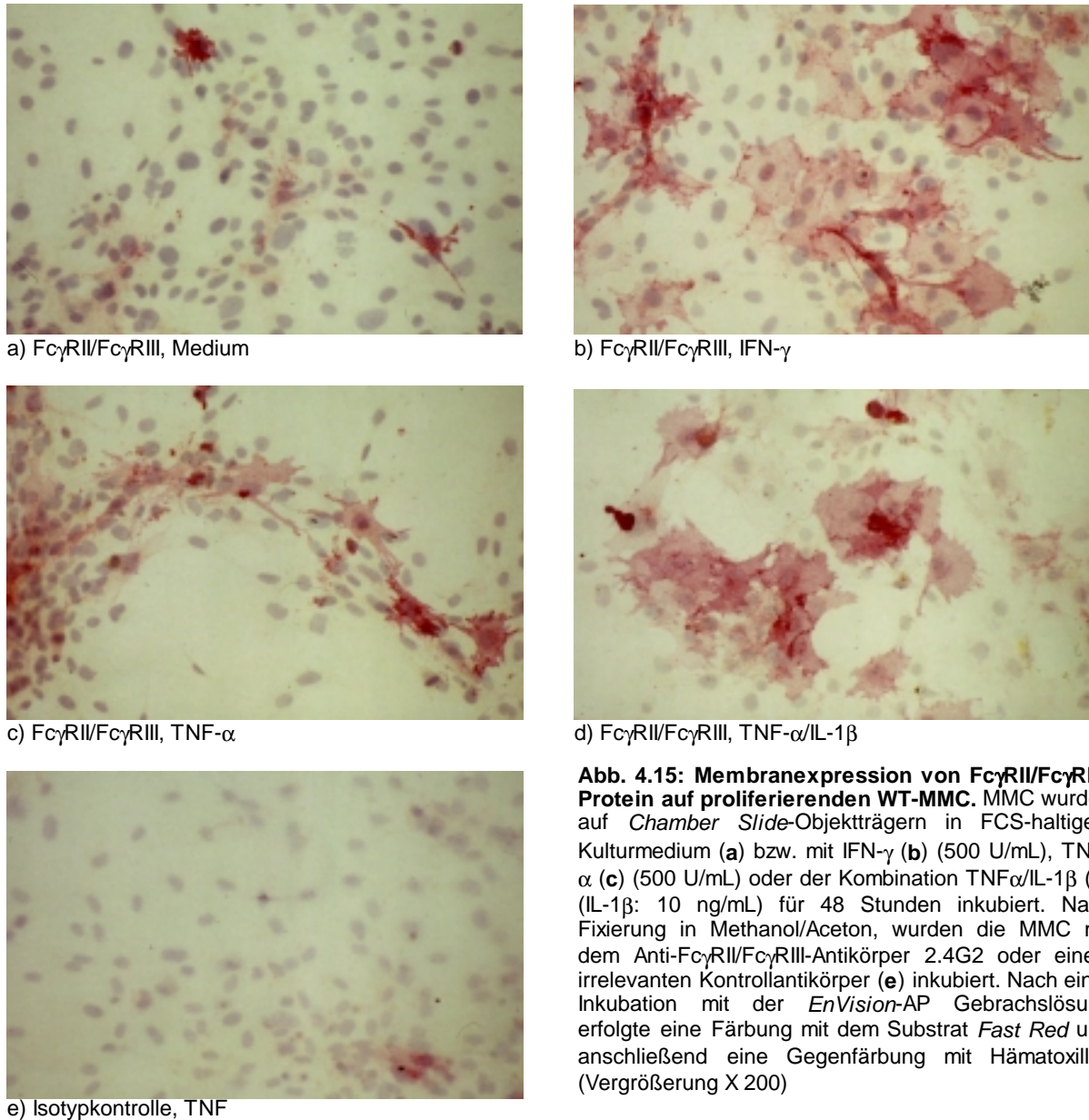


Abb. 4.15: Membranexpression von Fc γ RII/Fc γ RIII-Protein auf proliferierenden WT-MMC. MMC wurden auf *Chamber Slide*-Objektträgern in FCS-haltigem Kulturmedium (a) bzw. mit IFN- γ (b) (500 U/mL), TNF- α (c) (500 U/mL) oder der Kombination TNF α /IL-1 β (d) (IL-1 β : 10 ng/mL) für 48 Stunden inkubiert. Nach Fixierung in Methanol/Aceton, wurden die MMC mit dem Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-Antikörper 2.4G2 oder einem irrelevanten Kontrollantikörper (e) inkubiert. Nach einer Inkubation mit der *EnVision*-AP Gebrachslösung erfolgte eine Färbung mit dem Substrat *Fast Red* und anschließend eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin. (Vergrößerung X 200)

Stimulation	Med	IFN- γ	TNF α	IL-1 β /TNF α
Versuchszahl: n	7	7	7	3
Trend	↑	↑↑	↑↑	↑↑↑
Mittelwerte in %	10	17,9	18,6	23

Tab. 4.16: Fc γ RII/Fc γ RIII-Proteinexpression auf proliferierenden WT-MMC. Dargestellt sind die gemittelten Ergebnisse der prozentualen Anfärbungen mehrerer unabhängiger Immunfärbungen mit dem Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-Antikörper 2.4G2. Die MMC wurden in definierter Zelldichte auf *Chamber slide*-Objektträger ausgesät und nach Erreichen der Adhärenz für 48 Stunden mit IFN- γ (500 U/mL), TNF- α (500 U/mL) oder der Kombination TNF α /IL-1 β (IL-1 β : 10 ng/mL) stimuliert.

4.1.2.2 Oberflächenexpression von Fc γ -Rezeptoren in FACScan-Analysen

Neben Objektträgerfärbungen wurde mit Hilfe der FACScan-Methode versucht, Fc γ R-Moleküle auf der Zelloberfläche der MMC nachzuweisen. Aufgrund der durch eine PCR-Amplifikation von 40 Zyklen nachweisbaren mRNA-Synthese für Fc γ RII und Fc γ RIII war eine relativ geringe Rezeptorenexpression zu erwarten. Ein weiteres Problem bei der Nachweisbarkeit der Fc γ R-Proteine auf der MMC-Zelloberfläche stellt neben dem Fehlen klassenspezifischer Antikörper die Trypsinsensitivität der Fc γ -Rezeptoren dar. Für Fc γ R auf Ratten-MC ist ebenso wie für murine Fc γ RI und Fc γ RIII eine Trypsinempfindlichkeit beschrieben worden [GESSNER et al., 1996; RADEKE & RESCH, 1992]. Da es sich bei MMC aber um stark adhärenzte Zellen handelt, mußten diese für die Versuche erst mit Trypsin vom Zellkulturflaschenboden abgelöst werden. Eine hier neu angewandte Methode, bei der die sanft abtrypsinieren Zellen für 1 Stunde im Kulturmedium unter Schwenken im Brutschrank bei 37°C unter CO₂-Begasung inkubiert wurden, könnte aber zu einer Erhöhung der Anzahl der Oberflächenmoleküle führen (s. 3.3.5.).

4.1.2.2.1 Oberflächenexpression von Fc γ RII mit der FACScan-Methode

Da beim Fc γ RII auf verschiedenen Mausstämmen zwei allele Formen auftreten, die sich durch ihre Bindungsspezifität für die monoklonalen Antikörper Ly-17.1/2 unterscheiden, wurden zum Nachweis der Fc γ RII-Oberflächenmoleküle auf Fc γ RIII-KO-MMC Ly-17.1 Antikörper der Immunglobulinklasse IgM und für C57BL/6-WT-MMC Ly-17.2 Antikörper der Immunglobulinklasse IgG verwendet.

Bei den Fc γ RIII-KO-MMC zeigte sich bei der FACScan-Analyse mit Ly-17.1 im Vergleich zur Mediumkontrolle, die schon einige Rezeptormoleküle aufweist, ein leichter Rückgang der Fluoreszenzintensität nach 48-stündiger Inkubation mit IFN γ und ein Anstieg der Intensität nach Stimulation mit TNF α und der Kombination IL-1 β /TNF α . Diese Daten zur Proteinsynthese des Fc γ RII auf MMC bestätigen somit die auf mRNA-Ebene gefundene differentielle Induktion der Fc γ RII-Expression durch TNF α und der Kombination IL-1 β /TNF α sowie die hemmenden Wirkungen von IFN γ auf die Induktion dieses Fc γ -Rezeptors (**Abb. 4.16**).

Auch bei den WT-MMC Untersuchungen konnte ein herabregulierender Effekt vom Mediumwert mit IFN γ und ein Anstieg der Fluoreszenzintensität nach TNF α -Stimulation gezeigt werden (**Abb. 4.17**).

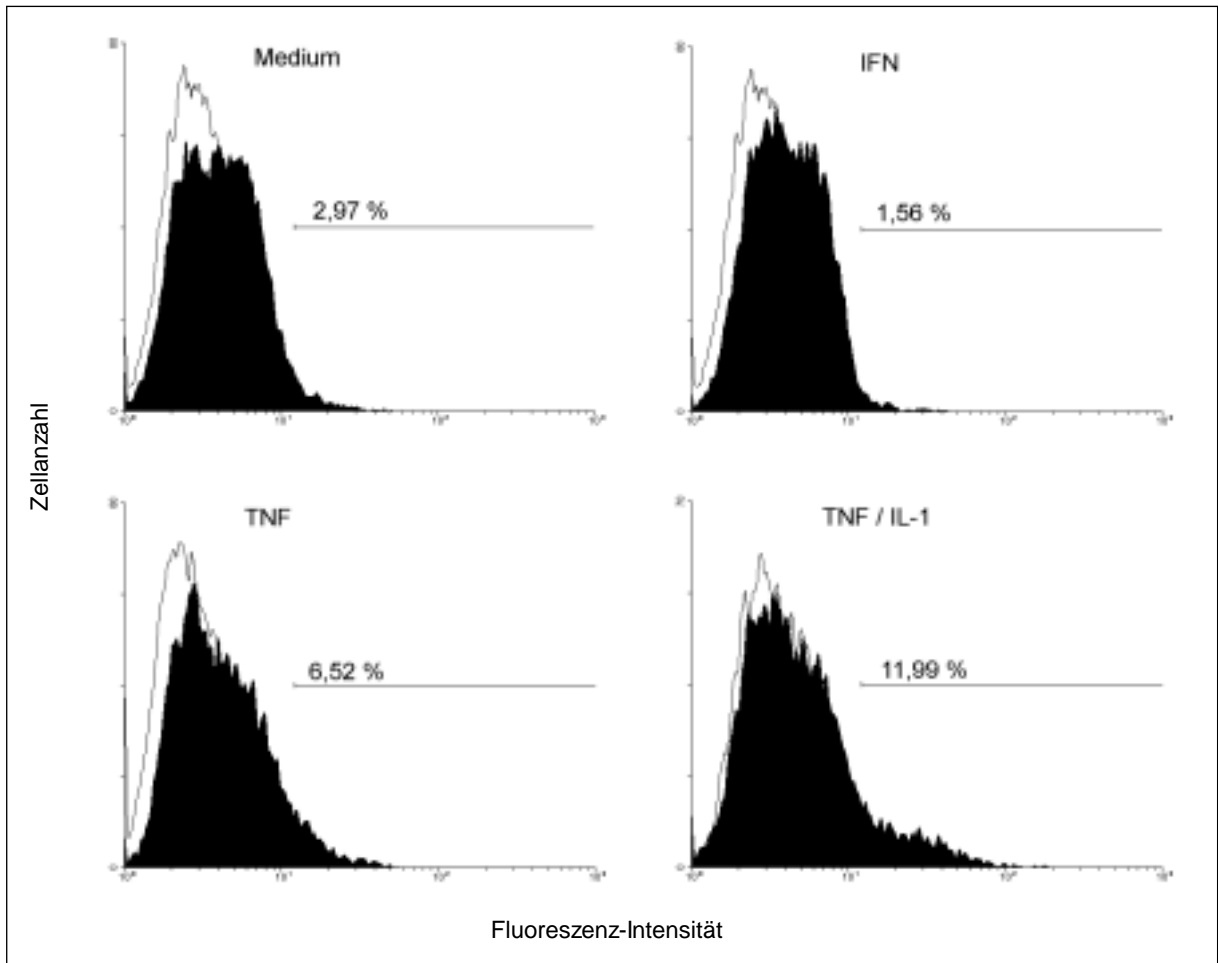


Abb. 4.16: FACScan-Analyse der Fc γ RII-Expression auf Fc γ RIII-(KO)-MMC-Oberflächen. Verwendet wurden Zellen, die für 48 Stunden ohne bzw. mit IFN- γ (500 U/mL), TNF- α (500 U/mL) oder der Kombination TNF α /IL-1 β (IL-1 β : 10 ng/mL) inkubiert worden waren. Die Messung der Fc γ RII-Oberflächenmoleküle erfolgte mittels eines monoklonalen Anti-Fc γ RII-Antikörpers (*mouse-anti-mouse*) Ly-17.1. Zur Detektion wurde ein FITC-gekoppelter sekundärer Antikörper (*goat-anti-mouse*) eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen wurde im FACScan untersucht. Die ungefüllten Linien repräsentieren die Histogramme der Zellen, die mit dem Kontrollantikörper inkubiert wurden. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitätswerte der im Markerbereich befindlichen Zellen.

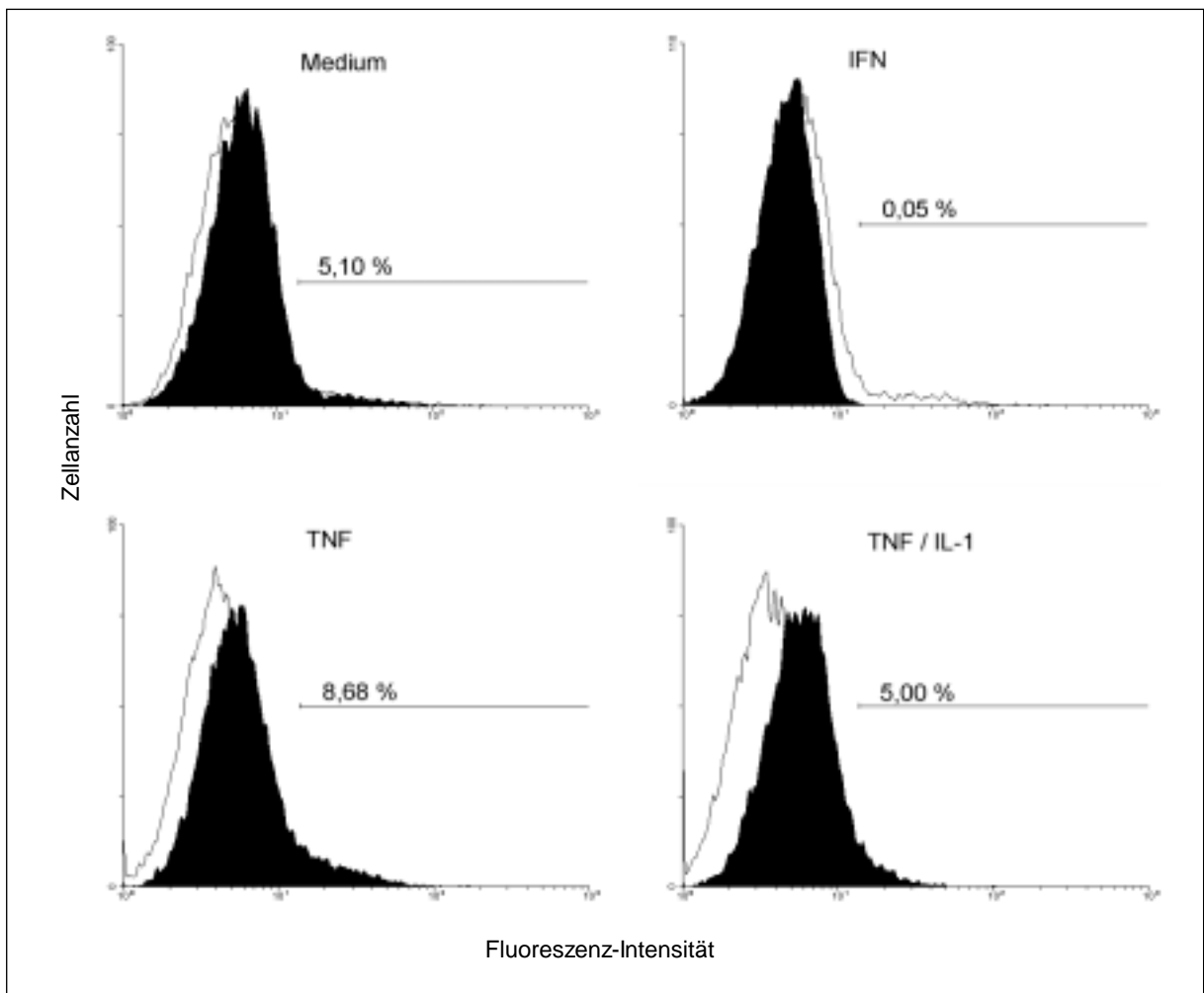


Abb. 4.17: FACScan-Analyse der Fc γ RII-Expression auf WT-MMC-Oberflächen. Verwendet wurden Zellen, die für 48 Stunden ohne bzw. mit IFN- γ (500 U/mL), TNF- α (500 U/mL) oder der Kombination TNF α /IL-1 β (IL-1 β : 10 ng/mL) inkubiert worden waren. Die Messung der Fc γ RII-Oberflächenmoleküle erfolgte mittels eines monoklonalen Anti-Fc γ RII-Antikörpers (mouse-*anti*-mouse) Ly-17.2. Zur Detektion wurde ein FITC-gekoppelter sekundärer Antikörper (*goat-anti*-mouse) eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen wurde im FACScan untersucht. Die ungefüllten Linien repräsentieren die Histogramme der Zellen, die mit dem Kontrollantikörper inkubiert wurden. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitätswerte der im Markerbereich befindlichen Zellen.

4.1.2.2.2 Oberflächenexpression von Fc γ RII / Fc γ RIII mit der FACScan Methode

Bei den WT-MMC ist mit dem monoklonalen 2.4G2 im Vergleich zur Mediumkontrolle ein geringer Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Stimulation mit IFN- γ zu erkennen (**Abb. 4.18**).

Wenn man davon ausgeht, daß 2.4G2 Fc γ RII und Fc γ RIII gleichzeitig binden kann, könnte zur Ermittlung der tatsächlichen Fc γ RIII-Expression die Subtraktion der Fc γ RII-Expression, die mit Ly-17.2 detektiert wurde, einen tendenziellen Aufschluß

geben. IFN- γ ist demnach ein deutlicher Induktor des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche von MMC.

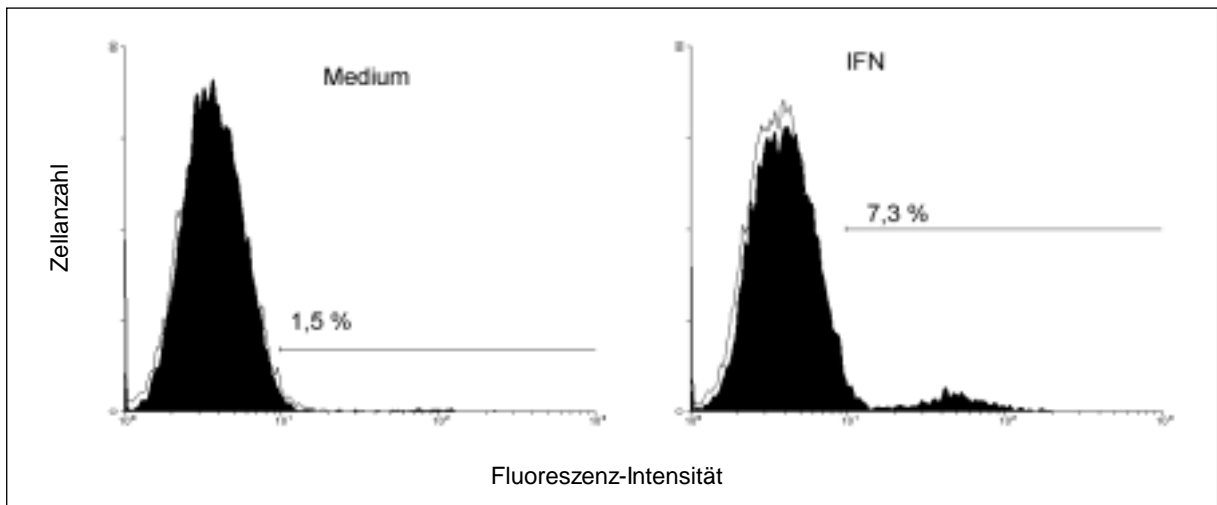


Abb. 4.18: FACS-Scan-Analyse der Fc γ RII/Fc γ RIII-Expression auf WT-MMC-Oberflächen. Verwendet wurden Zellen, die für 48 Stunden ohne bzw. mit IFN- γ (500 U/mL) inkubiert worden waren. Die Messung der Fc γ RII-Oberflächenmoleküle erfolgte mittels eines monoklonalen Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-Antikörpers (*rat-anti-mouse*) 2.4G2. Zur Detektion wurde ein FITC-gekoppelter sekundärer Antikörper (*goat-anti-rat*) eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen wurde im FACS-Scan untersucht. Die ungefüllten Linien repräsentieren die Histogramme der Zellen, die mit dem Kontrollantikörper inkubiert wurden. Dargestellt sind die Fluoreszenzintensitätswerte der im Markerbereich befindlichen Zellen.

4.2 Überprüfung der Funktionalität der Fc γ -Rezeptoren auf Mesangiumzellen

Zellen des Immunsystems und lokale Gewebezellen in der Niere können über die spezifischen Rezeptoren für den Fc-Teil der Immunglobuline mit Immunkomplexen interagieren. Wie in Abschnitt 4.1.1 und 4.1.2 gezeigt werden konnte, sind die MMC zu einer mRNA- und Oberflächenexpression der Fc γ -Rezeptoren für IgG befähigt. In humanen und Nager-MC konnte gezeigt werden, daß eine Aktivierung über Fc γ RIII bzw. Fc γ RI zu einer Synthese von Zytokinen führt [RADEKE et al., 1994; UCIECHOWSKI et al., 1998; HORA et al., 1992].

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurden MMC nach der Induktion der Rezeptorexpression mit IgG-Immunkomplexen stimuliert und auf die daraus resultierenden Effekte untersucht. Da in wachsenden MMC nach Stimulation höhere Fc γ R-mRNA-Expressionen detektiert wurden und unter diesen Bedingungen auch der Nachweis von Oberflächenproteinen möglich war, wurden diese Studien von proliferierenden MMC ausgehend durchgeführt.

4.2.1 Induktion der Chemokinexpression

4.2.1.1 Expression der MCP-1-mRNA

Studien mit Maus-, Ratten- und humanen MC zeigten eine Fc γ R-vermittelte Induktion des CC-Chemokins MCP-1 [HORA et al., 1992; SATRIANO et al., 1993; UCIECHOWSKI et al., 1998]. Um eine Fc γ RIII-abhängige Induktion dieses CC-Chemokins auf MMC zu ermitteln, wurden MMC aus WT- im Vergleich zu MMC aus Fc γ RIII-/- (KO)-Mäusen untersucht. Da unter proliferierenden Bedingungen auch ohne Stimulation sowohl Fc γ RIII-, Fc γ RII- als auch Fc γ RI-mRNA exprimiert wurde (s. 4.1.1 und 4.1.2), wurden die Versuche von diesen Basalbedingungen ausgehend durchgeführt. Die unter Mediumbedingungen kultivierten MMC wurden für 6 Stunden mit Antigen-freien Immunkomplexen (hitzeaggregierte murine anti-FITC-IgG-Antikörper der Subklassen IgG1 und IgG2b) und mit *in vitro* präformierten Antigen-Antikörper-Komplexen, bestehend aus anti-FITC-Antikörpern und kreuzvernetztem Ovalbumin, das mit FITC markiert (OVA-XL-FITC) wurde, inkubiert (s. 3.3.9). Die beiden eingesetzten Antikörper-Subklassen IgG1 und IgG2b sollen dabei eine höhere Affinität zu den beiden niedrigaffinen Fc γ -Rezeptoren besitzen als zum hochaffinen Fc γ RI [GESSNER et al., 1998]. Die anschließende Northern Blot-Analyse ergab bei beiden untersuchten MMC schon unter den basalen Kultivierungsbedingungen in FCS-haltigem Medium einen Anstieg der MCP-1-mRNA-Expression nach Kreuzvernetzung und Aktivierung mit den IgG (**Abb. 4.19**). Dabei zeigten die WT-MMC eine stärkere MCP-1-mRNA Induktion als die Fc γ RIII-KO-MMC, was bei den WT-MMC auf Aktivierungseffekte, die über Fc γ RI und Fc γ RIII laufen, bei den Fc γ RIII-KO-MMC nur auf eine Aktivierung nach Fc γ RI-Kreuzvernetzung hindeuten könnte. Fc γ RI sind also in der Lage, auch Immunkomplexe aus den IgG-Subklassen IgG1 und IgG2b zu binden und darüber hinaus aktiviert zu werden.

Um die optimalen Verhältnisse der Antigen-Antikörper-Bindung für den Einsatz zur Fc γ R-vermittelten MCP-1-Induktion zu bestimmen, wurde zunächst ein Ouchterlony-Test mit den OVA-XL-FITC-Antigenen und anti-FITC-IgG1/2b-Antikörpern durchgeführt. Wie in **Abb. 4.20** zu erkennen, waren die effektivsten Verdünnungsverhältnisse in der Geldiffusion, erkennbar an den deutlichsten Präzipitationslinien, für den anti-FITC-IgG1 (c= 400 μ g/mL) und OVA-XL-FITC (c= 125 μ g/mL) in dem Verhältnis 3,2:1 und für den anti-FITC-IgG2b (c= 500 μ g/mL) und OVA-XL-FITC (c= 250 μ g/mL) in dem Verhältnis 2:1.

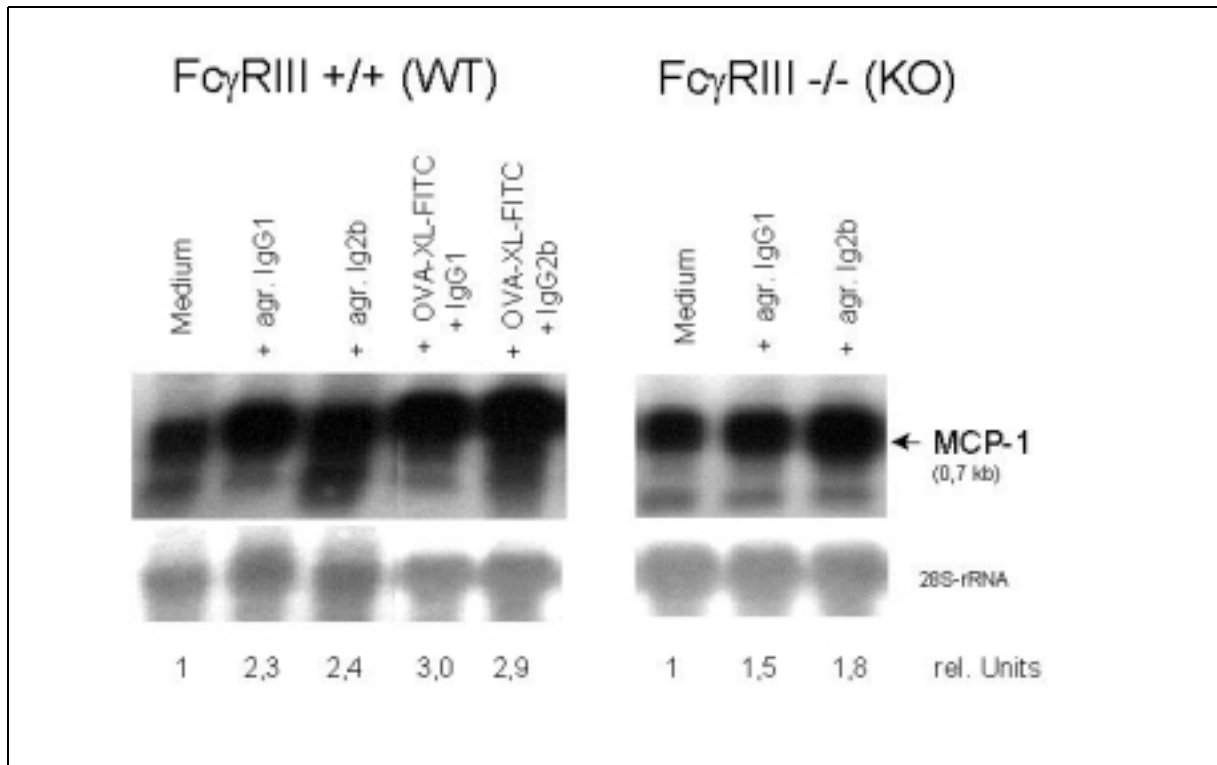


Abb. 4.19: Induktion von MCP-1 mRNA-Expression durch Kreuzvernetzung von $Fc\gamma R$. Proliferierende MMC aus WT- und $Fc\gamma RIII^{-/-}$ (KO)-Mäusen wurden für 6 Stunden mit hitzeaggregierten murinen anti-FITC-IgG-Antikörpern der Subklassen IgG1 und IgG2b und mit in vitro präformierten Antigen-Antikörper-Komplexen bestehend aus anti-FITC-Antikörpern und kreuzvernetztem, mit FITC markiertem Ovalbumin (OVA-XL-FITC) inkubiert. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde diese elektrophoretisch aufgetrennt (20 μ g je Spur), geblottet und einer Northern Blot-Hybridisierung mit einer spezifischen cDNA für murines MCP-1 unterzogen. Dargestellt sind die relativen Intensitätsanstiege, die aus den Ergebnissen der densitometrischen Quantifizierung der MCP-1-Banden gegen die 28S-rRNA entstanden sind. Der Mediumwert wurde mit 1 gleichgesetzt und die entsprechenden Intensitätsanstiege auf diesen Mediumwert bezogen.

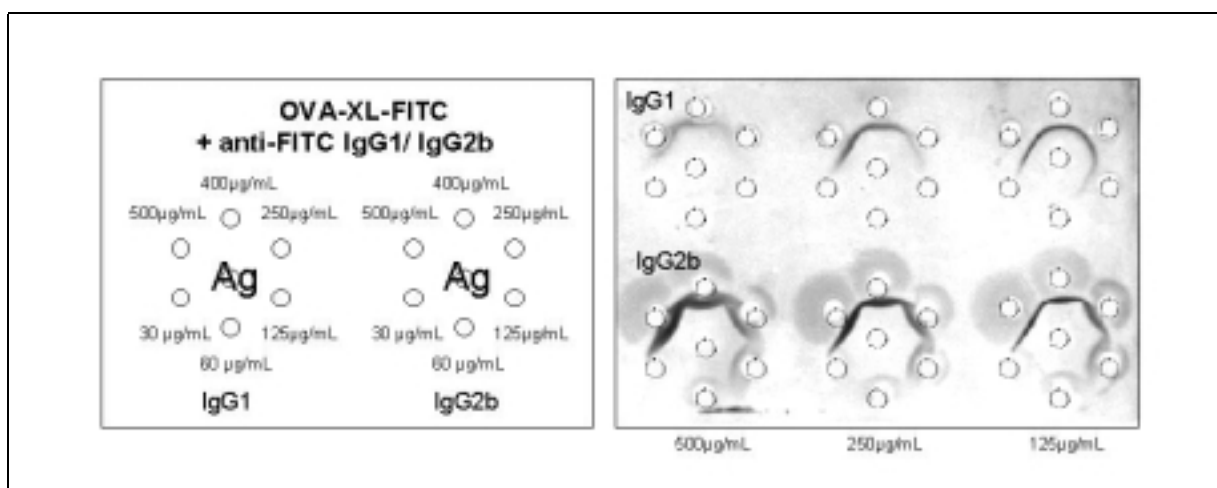


Abb. 4.20: Ouchterlony-Geldiffusionstest mit FITC-Partikeln vernetztem Ovalbumin (OVA-XL-FITC) und spezifischen anti-FITC-Antikörpern aus der Maus. Ein Ouchterlony-Agarosegel (ICN Biomedicals, Mese, USA) wurde in den zentralen Löchern mit je 10 μ L in absteigenden Konzentrationen des Antigens OVA-XL-FITC (500 μ g/mL bis 125 μ g/mL) und in den umgebenden Wells mit den Verdünnungen der Anti-FITC-Antikörper IgG1 und IgG2b (500 μ g/mL bis 30 μ g/mL) befüllt. Nach 48-stündiger Diffusion bei Raumtemperatur wurden die Präzipitationslinien mit Coomassie-Blue Lösung sichtbar gemacht.

4.2.1.2 Expression verschiedener Chemokin-mRNA-Spezies

Um die Fc γ R-vermittelte Induktion von weiteren Chemokin-mRNA-Spezies zu untersuchen, wurden die Zellen zunächst für 48 Stunden mit den Zytokinen IFN- γ und TNF- α stimuliert, um Fc γ R zu induzieren. Für die Versuche standen MMC aus WT-, Fc γ RIII-/(KO)- und γ -chain-/(KO)-Mäusen mit unterschiedlichen Fc γ R-Oberflächenexpressionen zur Verfügung. Es folgte eine Inkubation der Zellen mit hitzeaggregierten IgG-IC (HAlgG) für weitere 12 Stunden. Nach der RNA-Präparation wurde ein *RNase Protection Assay* (Fa. PharMingen, BD, Heidelberg) mit dem mCK-5 *Multi-Probe Template Set* zur Detektion neun verschiedener Maus C-, CC- und CXC-Chemokin-mRNA-Spezies (Lymphotactin, RANTES, Eotaxin, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, IP-10, MCP-1 und TCA-3) und der konstitutiv exprimierten mRNA von GAPDH und L32 durchgeführt (s. 3.2.5).

MMC konnten von den neun untersuchten Chemokin-mRNA-Spezies RANTES-, IP-10- und MCP-1-mRNA exprimieren, die durch die unterschiedlichen Vorinkubationen und auch durch die eingesetzten Immunkomplexe unterschiedlich stimuliert wurden (**Abb. 4.21**).

So wurde die MCP-1-mRNA von MMC schon basal exprimiert und durch IFN- γ und mehr noch nach TNF- α Vorstimulation deutlich stimuliert (**Diagr. 4.15**). Dabei exprimierten die WT-MMC eine größere Menge mRNA dieses CC-Chemokins als die KO-MMC. Eine Stimulation mit HAlgG für 12 Stunden führte nur bei WT-MMC unter allen Vorstimulations-Bedingungen zu einer erhöhten MCP-1-mRNA, die nach TNF- α Inkubation weniger deutlich als nach Stimulation mit IFN- γ oder unter Mediumbedingungen ausfiel. Fc γ RIII-/(KO)- MMC zeigten dagegen nach 48-stündiger Vorstimulation mit TNF- α keine Verstärkung der mRNA-Synthese nach IgG-Inkubation wie es unter den anderen beiden Grundbedingungen zu beobachten war. Die Menge der exprimierten MCP-1-mRNA bei γ -chain-/(KO)-MMC fiel noch niedriger aus als bei den Fc γ RIII-/(KO)-MMC, war aber durch HAlgG jeweils leicht stimulierbar.

Die Expression der IP-10 mRNA wurde bei allen MMC durch die Vorinkubation mit IFN- γ für 48 Stunden am stärksten stimuliert, bei WT-MMC, für die auch die 48-stündige TNF- α Behandlung einen stimulierenden Effekt hatte, dabei aber deutlich mehr als bei den beiden KO-MMC. Weiterhin ist bei allen untersuchten MMC nach HAlgG-Inkubation für 12 Stunden eine Erhöhung der IP-10-mRNA-Menge nach IFN- γ Stimulation zu erkennen (**Diagr. 4.16**).

RANTES-mRNA wurde bei allen untersuchten proliferierenden MMC schon basal synthetisiert und durch die Vorinkubation mit IFN- γ dabei deutlicher stimuliert als mit TNF- α . Die zusätzliche Inkubation mit HAlgG zur Fc γ R-Aktivierung führte besonders nach IFN- γ Vorinkubation zu einer starken Erhöhung der RANTES-mRNA-Expression, die unter den anderen Vorinkubationsbedingungen nur minimal ausfiel. Auch diese CC-Chemokin-mRNA, die u.a. chemotaktisch auf T-Zellen einwirken

kann, wurde bei WT-MMC in größeren Mengen synthetisiert als bei den KO-MMC (**Diagr. 4.17**).

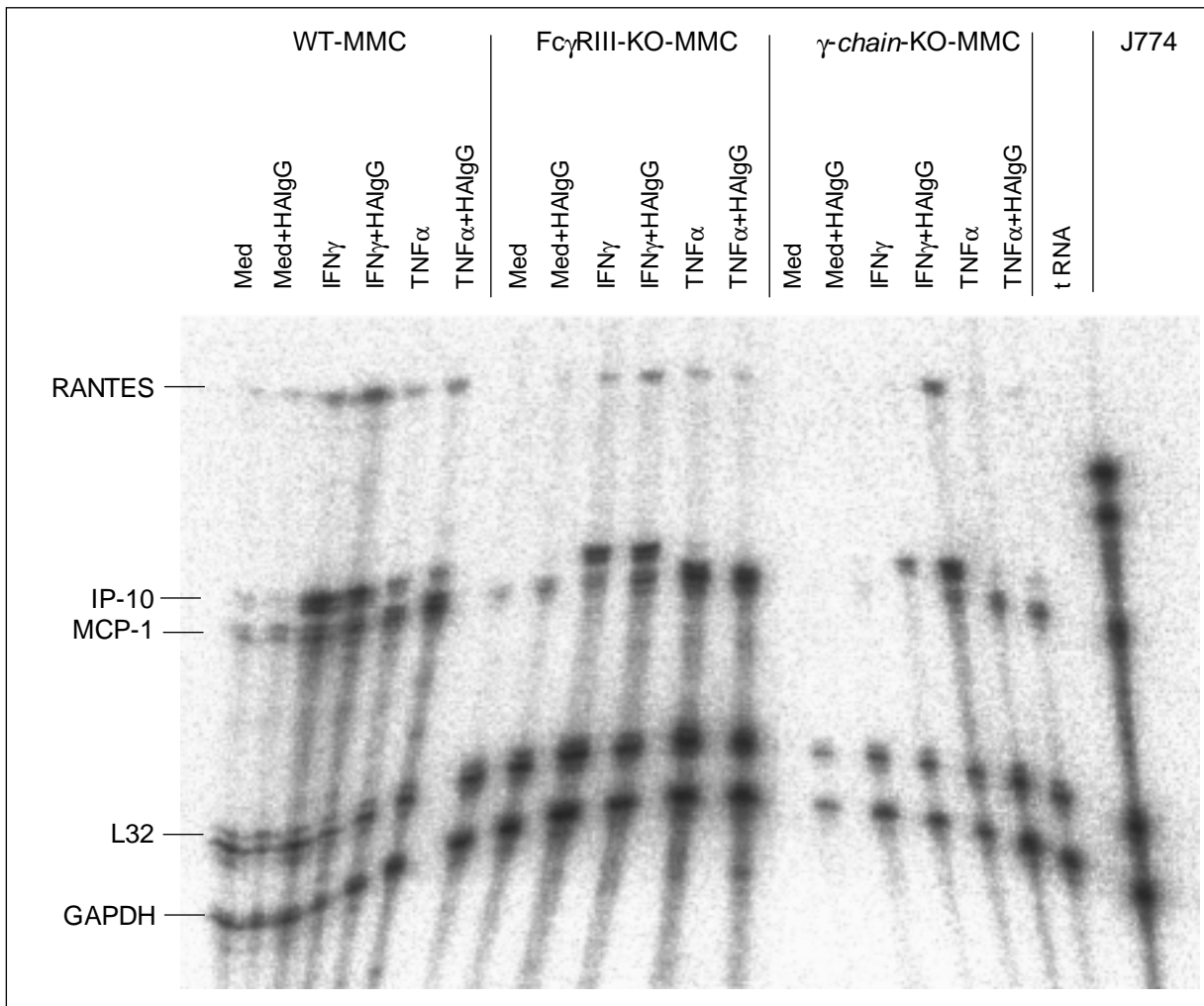
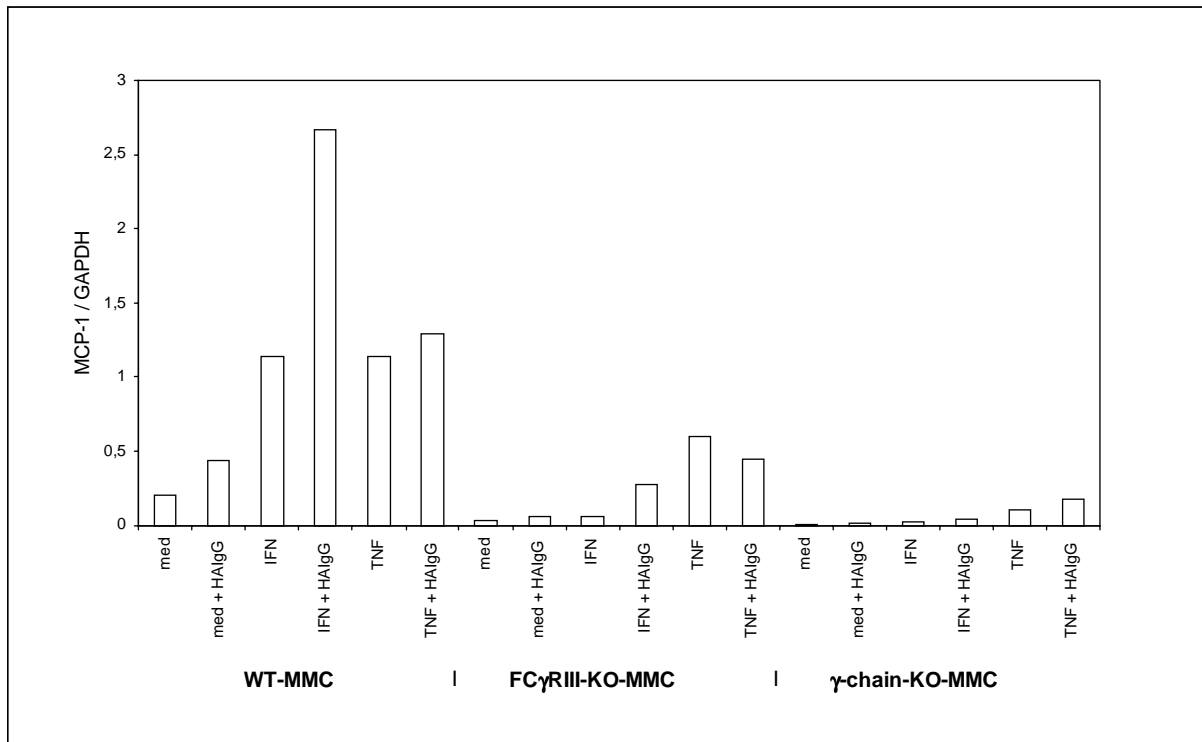
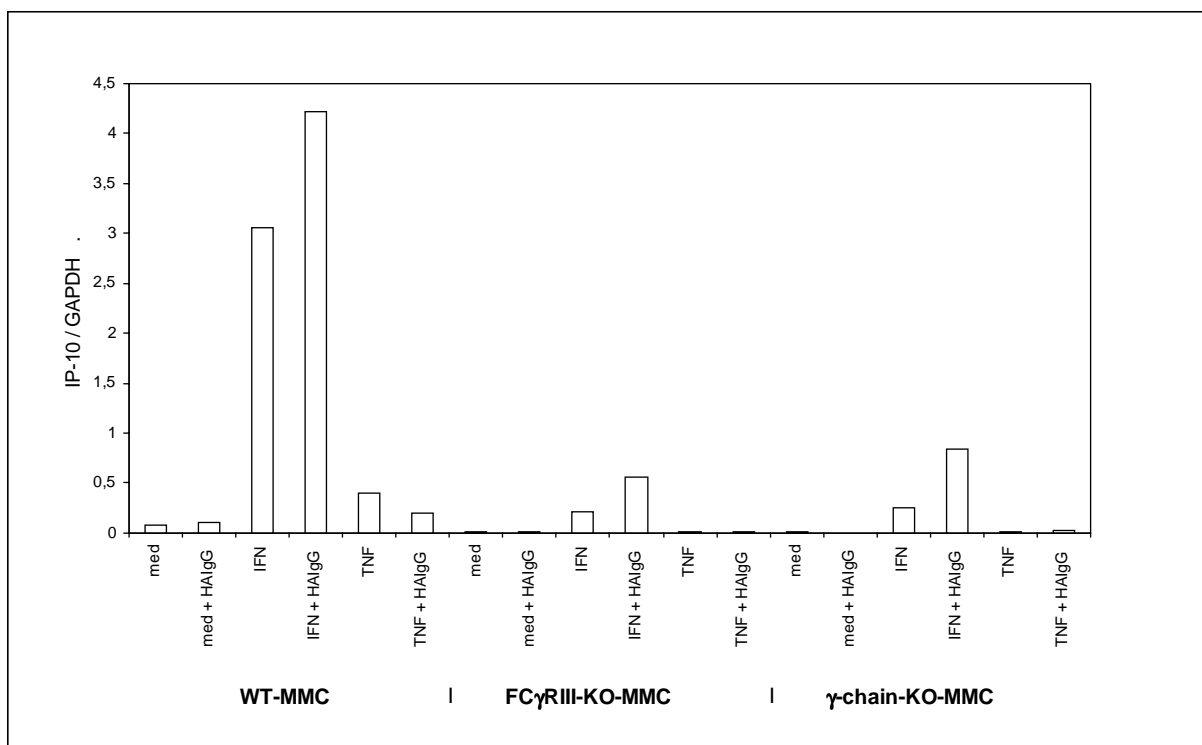


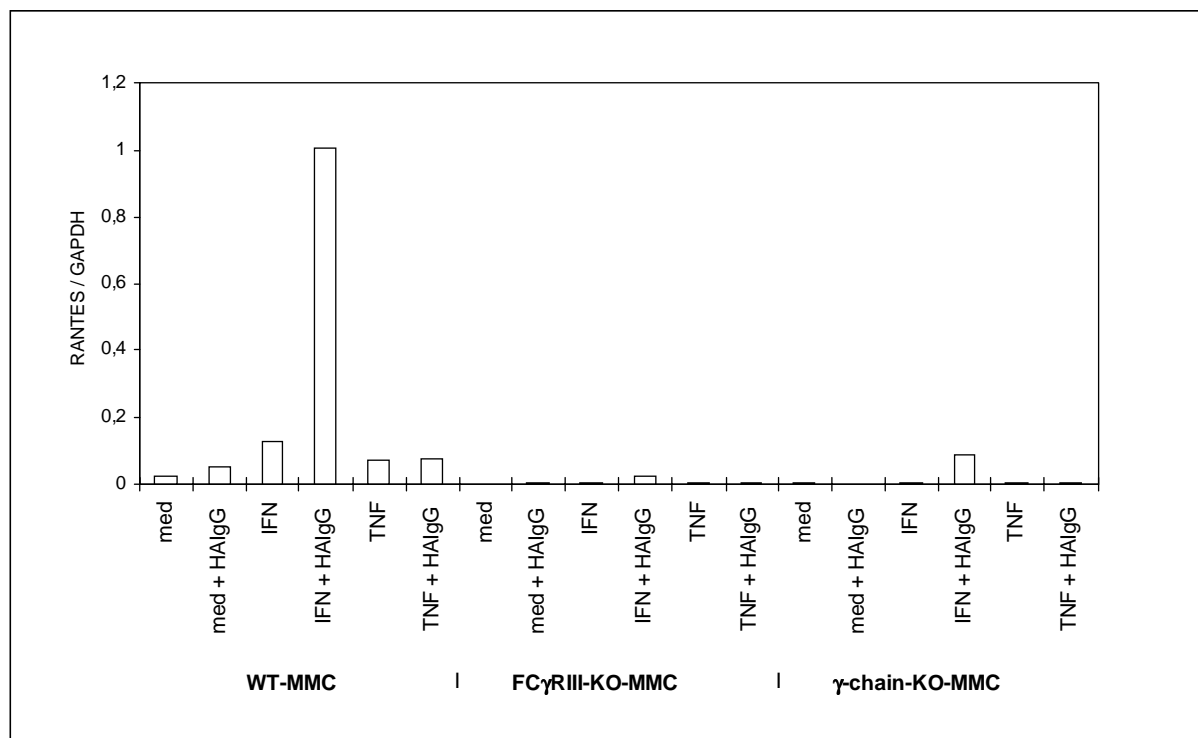
Abb. 4.21: Induktion von Chemokin-mRNA in MMC durch verschiedene Zytokine und HA1gG. Proliferierende MMC wurden in FCS-haltigem Medium inkubiert, bzw. zur Fc γ R-Induktion mit IFN- γ oder TNF- α (je 500 U/mL) für 48 Stunden vorstimuliert. Es folgte eine 12-stündige Stimulation mit HA1gG (50 μ g/mL). Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit 5 μ g RNA pro Probe ein *RNase Protection Assay* (RPA) mit dem mCK-5 *Multi-Probe Template Set* durchgeführt. RNA aus der monozytären Maus-Zelllinie J774A.1 wurde als positive und t-RNA als negative Kontrolle eingesetzt. Es folgte ein Auftrag der Proben auf einem 8%igen Polyacrylamid-Gel und eine Quantifizierung im Phosphoimager. In den nachfolgenden **Diagr. 4.15 - 4.17** sind die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierungen der Chemokin-Banden gegen die GAPDH-Banden grafisch dargestellt.



Diagr. 4.15: Induktion von MCP-1-mRNA in MMC durch verschiedene Zytokine und HA1gG. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der MCP-1-Banden gegen die GAPDH-Banden sind grafisch dargestellt.



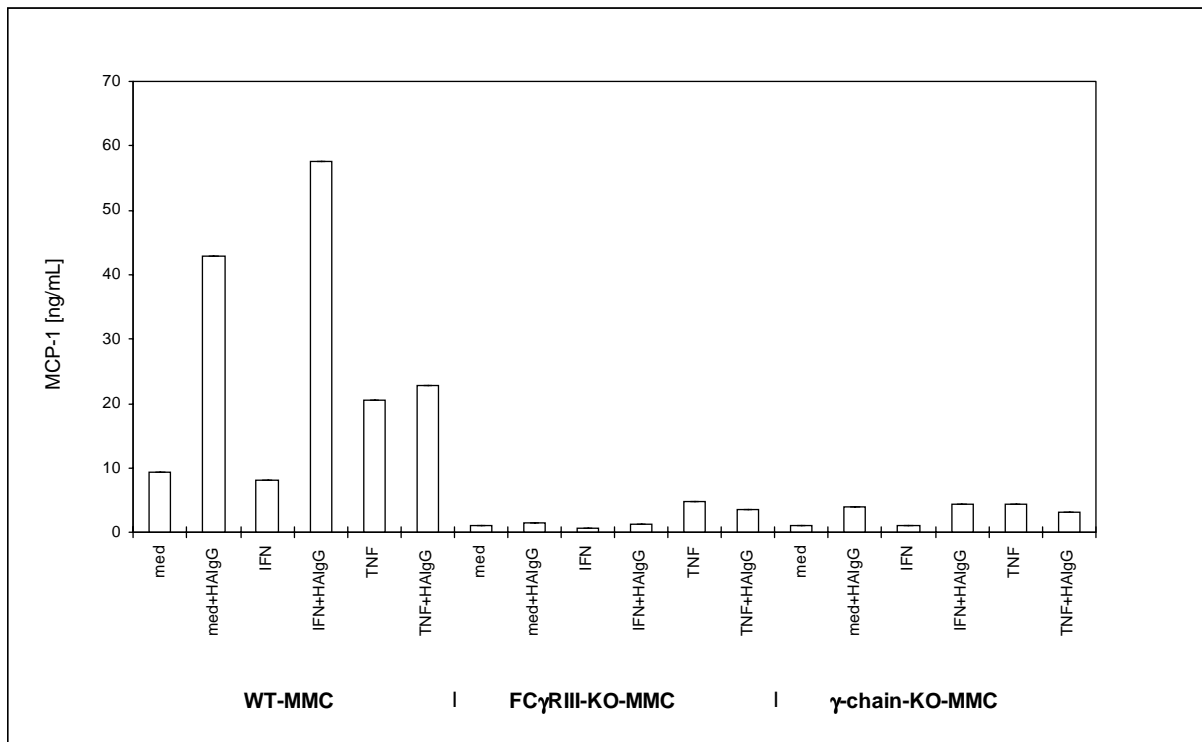
Diagr. 4.16: Induktion von IP-10-mRNA in MMC durch verschiedene Zytokine und HA1gG. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der IP-10-Banden gegen die GAPDH-Banden sind grafisch dargestellt.



Diagr. 4.17: Induktion von RANTES-mRNA in MMC durch verschiedene Zytokine und HA1gG. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der RANTES-Banden gegen die GAPDH-Banden sind grafisch dargestellt.

4.2.1.3 Expression des CC-Chemokins MCP-1 im Kulturüberstand

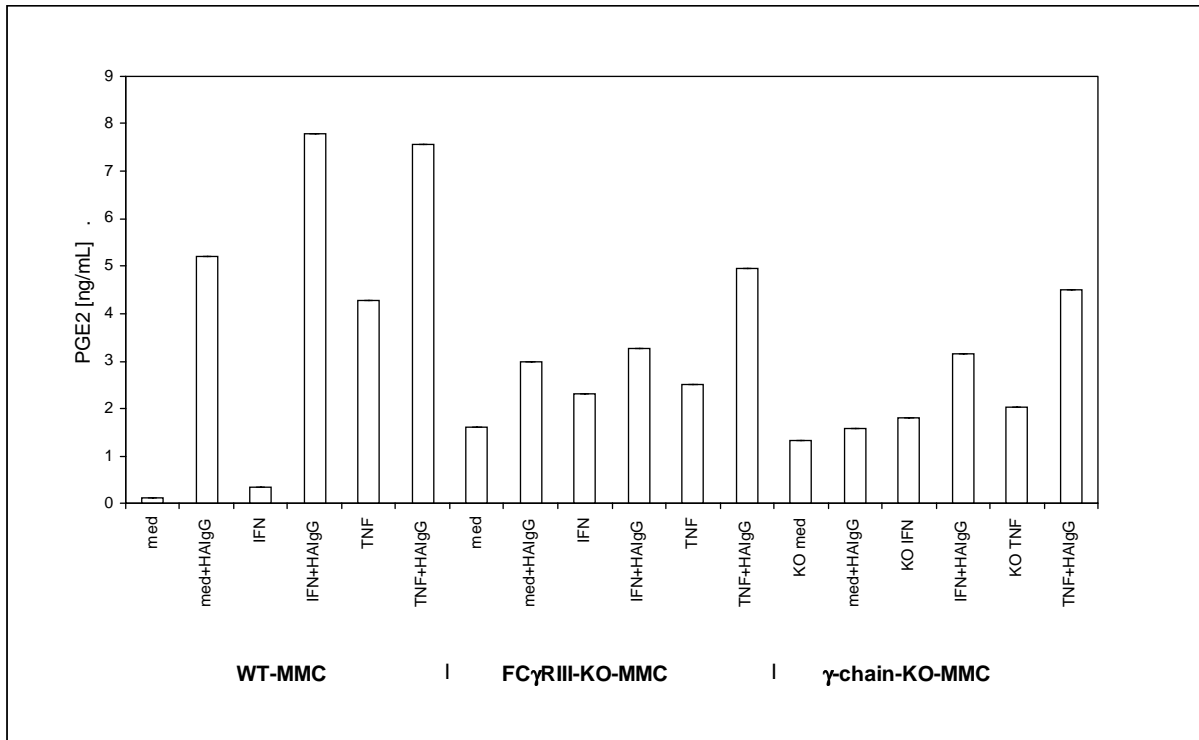
Nach den Beobachtungen der MCP-1-mRNA-Induktionen durch FcγR-Kreuzvernetzung mit HA1gG, wurden Überstände von für 48 Stunden vorstimulierten und für 12 Stunden mit HA1gG inkubierten MMC im ELISA-Verfahren auf den Gehalt an MCP-1-Protein untersucht (s. 3.3.7.2). Auch hier konnte beobachtet werden, daß WT-MMC deutlich mehr MCP-1 sezernierten als FcγR-KO-MMC (**Diagr. 4.18**). So führte, bezogen auf eine standardisierte Zellzahl, die TNF- α -Vorstimulation bei den WT-MMC schon zu einer Konzentration von 20 ng/mL, bei den FcγRIII-KO-MMC dagegen nur zu einem Wert von 5 ng/mL und bei den γ -chain-KO-MMC zu einer Konzentration von 4,3 ng/mL. Die nachfolgende Stimulation mit HA1gG zeigte nach Vorstimulation mit TNF- α nur bei WT-MMC eine Erhöhung der Proteinmenge, bei den FcγRIII-/(KO)-MMC sank die Konzentration leicht ab. Von Grundbedingungen mit FCS-haltigem Medium oder nach Stimulation mit IFN- γ ausgehend, wurde besonders bei WT-MMC und auch bei den FcγRIII-/(KO)-Zellen eine deutliche Induktion der Protein-Synthese nach Stimulation mit HA1gG beobachtet.



Diagr. 4.18: Sezernierung von MCP-1 in MMC-Kulturüberständen nach Vorstimulation mit IFN- γ und TNF- α und Inkubation mit HA1gG. Überstände proliferierender WT- und Fc γ RIII-/- (KO)-MMC, die in FCS-haltigem Medium bzw. mit IFN- γ und TNF- α (je 500 U/mL) für 48 Stunden vorstimuliert und anschließend für 12 Stunden mit HA1gG inkubiert worden waren, wurden im MCP-1-spezifischen ELISA untersucht.

4.2.2 Expression von Prostaglandin E2 im Kulturüberstand

Neben der Expression und Freisetzung von Chemokinen nach Fc γ R-Kreuzvernetzung mit HA1gG wurden Überstände von MMC im ELISA-Verfahren auf den Gehalt des Entzündungsmediators PGE₂ untersucht (s. 3.3.7.3). Dabei konnte beobachtet werden, daß WT- und noch stärker Fc γ RIII-/- (KO)- und γ -chain-KO-MMC, bezogen auf eine standardisierte Zellzahl, schon unter FCS-Bedingungen PGE₂ sezernierten. Eine 48-stündige Vorstimulation mit IFN- γ und noch stärker mit TNF- α führte zu einer weiteren Induktion dieses Cyclooxygenase-Produkts (**Diagr. 4.19**). Die anschließende 12-stündige Inkubation mit HA1gG erzeugte unter allen Vorstimulationsbedingungen bei WT- eine stark erhöhte und bei Fc γ RIII-/- (KO)- und γ -chain-KO-MMC eine mäßig erhöhte PGE₂-Freisetzung.



Diagr. 4.19: Sezernierung von PGE₂ in MMC-Kulturüberständen nach Vorstimulation mit IFN- γ und TNF- α und Inkubation mit HA1gG. Überstände proliferierender WT-, FC γ RIII-/- und γ -chain-KO-MMC, die in FCS-haltigem Medium bzw. mit IFN- γ und TNF- α (je 500 U/mL) für 48 Stunden vorstimuliert und anschließend für 12 Stunden mit HA1gG inkubiert worden waren, wurden im PGE₂-spezifischen ELISA untersucht.

4.2.3 Oberflächenexpression von MHC Klasse II-Molekülen auf MMC

MMC können durch Produkte zellulärer Immunreaktionen in einen aktivierten Zustand versetzt werden, in dem sie viele Eigenschaften professioneller Immunzellen annehmen können. Der Einfluß verschiedener Zytokine führte auf normalerweise MHC Klasse II negativen Mesangiumzellen zu einer Expression dieses Oberflächenmoleküls [MARTIN et al., 1987]. Objekträgerfärbungen zum Nachweis von MHC Klasse II-Molekülen wurden zum einen durchgeführt, um Kontaminationen der MMC-Primärkulturen mit I-A-positiven Makrophagen auszuschließen, zum anderen, um die Induktion dieses Oberflächenmoleküls, das für die Antigenpräsentation notwendig ist, mit IFN- γ zu zeigen. Dafür wurde ein Anti-MHC II-Antikörper eingesetzt, der unter Verwendung der APAAP-Methode (s. 3.3.6) (Dako, Hamburg) BALB/c-MMC nach 48-stündiger Vorstimulation mit IFN- γ positiv anfärben konnte, während die Mediumkontrolle negativ ausfiel. Das eingesetzte Färbesubstrat war *Fast Blue*, als Gegenfärbung wurde Hämalaun benutzt (**Abb. 4.22**).

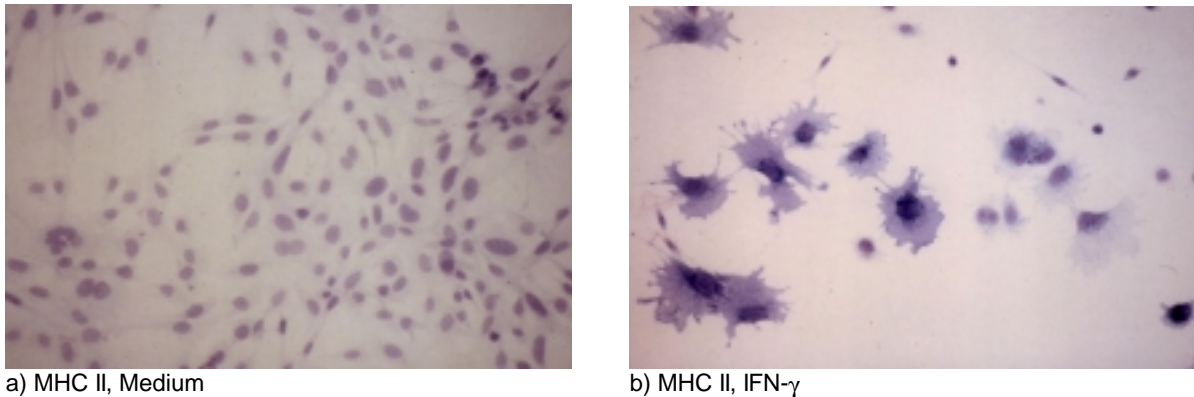


Abb. 4.22: Oberflächenexpression von MHC Klasse II Protein auf MMC. MMC wurden auf Chamber *Slide-Objektträgern* ausgesät und am nächsten Tag für 48 Stunden in Kulturmedium (**a**) oder mit IFN- γ (**b**) (500 U/mL) inkubiert. Nach Fixierung in Methanol/Aceton, wurden die MMC mit dem Anti-MHC II Antikörper inkubiert. Nach einer Immunfärbung mit der APPAP-Methode und dem Substrat *Fast Blue*, erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun. (Vergrößerung X 200)

4.3 Untersuchungen in der dendritischen Zelllinie XS52

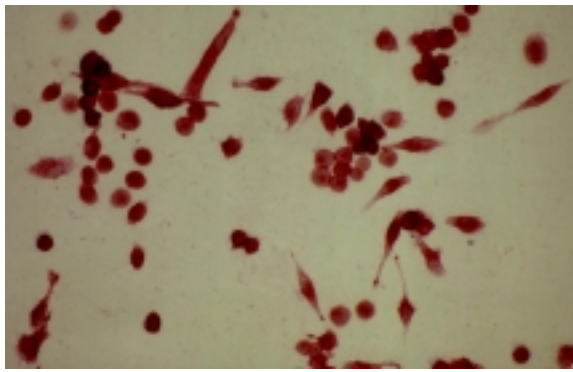
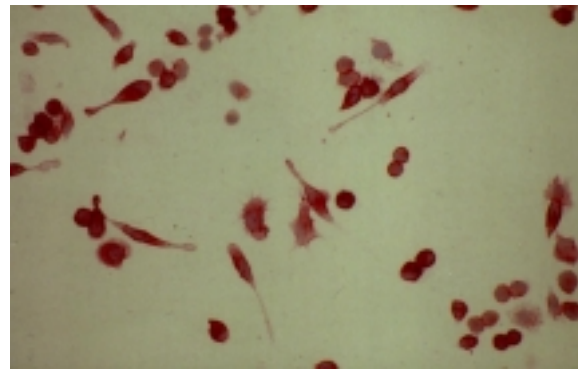
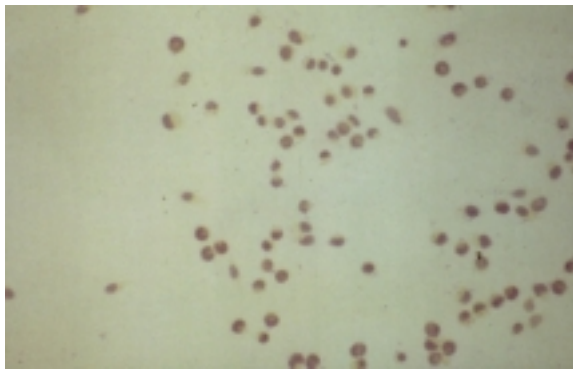
Die dendritische Zelllinie XS52 wurde als Vergleich zu den MMC untersucht, um die Reaktivität einer „professionellen“ antigenpräsentierenden Zelle, die im inflammatorischen Geschehen einer Nierenentzündung von Relevanz sein könnte, zu testen.

4.3.1 Oberflächenexpression von Fc γ -Rezeptoren

Dendritische Zellen sind eine Gruppe professioneller Antigen-präsentierender Zellen, die konstitutiv bestimmte Oberflächenmoleküle exprimieren können, die für den Mechanismus der Antigenpräsentation wichtig sind.

4.3.1.1 Oberflächenexpression von Fc γ RII und Fc γ RII/Fc γ RIII in Objektträgerfärbungen

Bei einer Untersuchung der Fc γ -Rezeptor-Expression durch Objektträgerfärbungen mit dem Anti-Fc γ RII-Antikörper Ly-17.2 und dem Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-Antikörper 2.4G2 konnte beobachtet werden, daß die murine dendritische Zelllinie XS52 schon konstitutiv positive Färbungen für die Fc γ RII- und Fc γ RIII-Rezeptorproteine aufweist (**Abb. 4.23**).

a) Fc γ RII, Mediumb) Fc γ RII/Fc γ RIII, Medium

c) Isotypkontrolle

Abb. 4.23: Oberflächenexpression von Fc γ RII- und Fc γ RIII-Proteinen auf XS52. XS52-DCs wurden auf *Chamber Slide*-Objektträgern ausgesät und für 48 Stunden in Kulturmedium inkubiert. Nach Fixierung in Methanol/Aceton wurden die XS52 mit dem Anti-Fc γ RII-Antikörper Ly-17.2 (a), dem Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-Antikörper 2.4G2 (b) oder einem irrelevanten Kontrollantikörper (c) inkubiert. Nach einer Inkubation mit der *EnVision*-AP Gebrauchslösung erfolgte eine Färbung mit dem Substrat *Fast Red* und anschließend eine Gegenfärbung mit Hämatoxyllin. (Vergrößerung X 200).

4.3.1.2 Proteinexpression von Fc γ RII in Immunpräzipitation und Western-Blot

Um zu untersuchen, ob sich die Proteinexpression des Fc γ RII, wie in der Literatur bei dendritischen Zellen beschrieben [BANCHEREAU & STEINMAN, 1998], auch bei den XS52-DCs durch die Inkubation mit Zytokinen ändert, wurde eine Immunpräzipitation mit dem Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-Antikörper 2.4G2 und ein anschließender Western-Blot mit dem Anti-Fc γ RII-Antikörper Ly-17.2 durchgeführt (s. 3.3.2 – 3.3.4). Wie in der **Abb. 4.24** zu erkennen, waren nach der ECL-Reaktion drei Banden zu erkennen, die apparente Molekulargewichte von ca. 50, 80 und 220 kDa aufwiesen. Bei der 45 bis 60 kDa großen Bande, die durch die Glykosylierung entsteht, handelt es vermutlich um das Fc γ RII-Protein, für das in der Literatur Molekulargewichte von 40-60 kDa angegeben werden [GESSNER et al., 1998; RAVETCH & KINET, 1991]. Diese Fc γ RII-Bande wurde durch die Inkubation mit IFN- γ schwächer, während TNF- α und die Kombination IFN- γ /LPS die Proteinexpression verstärkten.

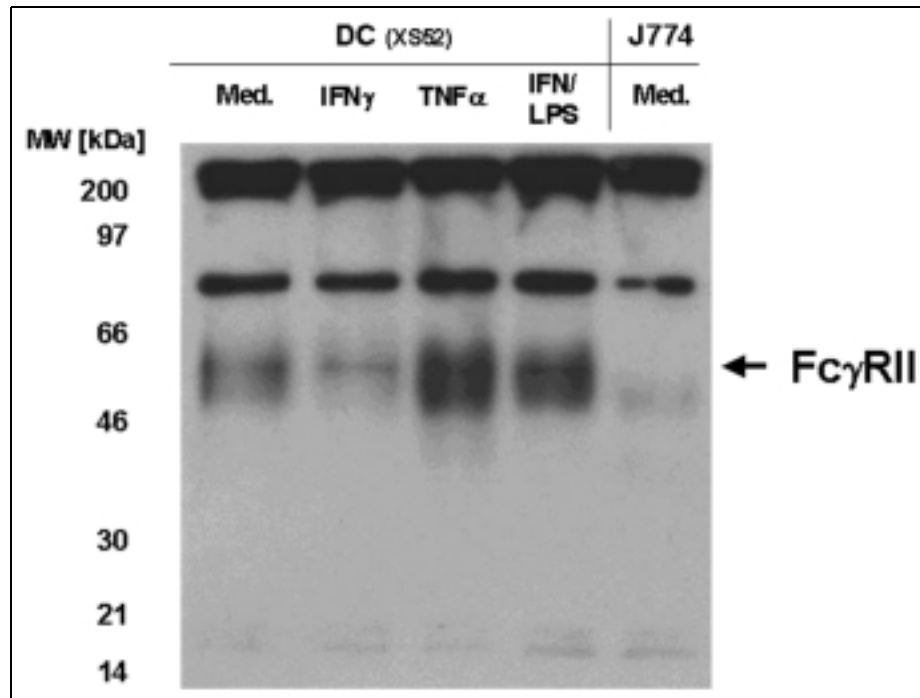
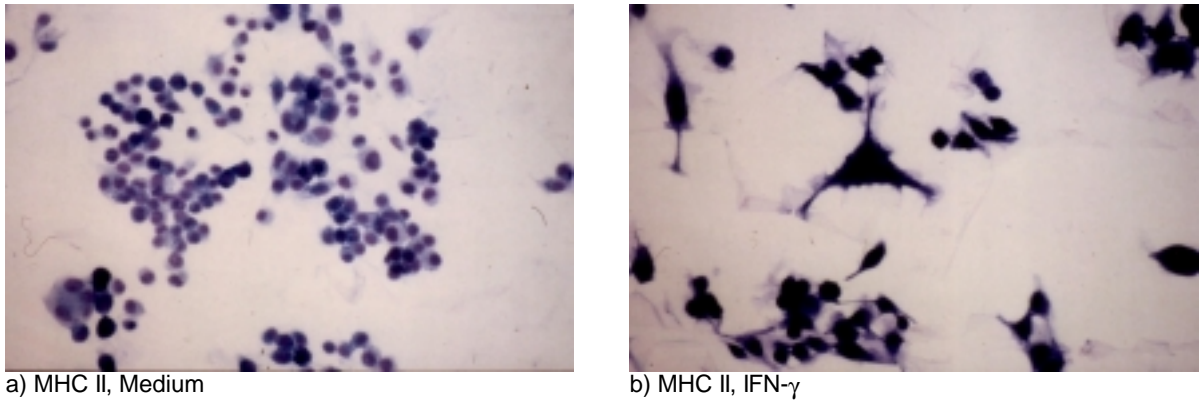


Abb. 4.24: Western-Blot-Analyse der Immunpräzipitation von Fc γ RII-Protein auf XS52. XS52-DCs wurden für 48 Stunden in Kulturmedium inkubiert bzw. mit IFN- γ (500 U/mL), TNF- α (500 U/mL) und der Kombination IFN- γ mit LPS (10 ng/mL) stimuliert. Es folgte eine Immunpräzipitation der Zellysate mit dem Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-mAk 2.4G2. Die Überstände der Anti-Fc γ RII/Fc γ RIII-mAk-gekoppelten *beads* wurden auf ein 10%iges SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetragen, auf eine Immobilon-P-Membran transferiert (Elektroblot) und mit dem Anti-Fc γ RII-mAk Ly-17.2 angefärbt. Der Nachweis erfolgte mittels eines POD-markierten sekundären Antikörpers in einer ECL-Reaktion.

4.3.2 Oberflächenexpression von MHC Klasse II Molekülen

4.3.2.1 Objektträgerfärbung

Dendritische Zellen werden durch eine typische Zellmorphologie und neben anderen typischen Markern (NLDC-145, CD11c) durch ihre konstitutive Oberflächenexpression von MHC Klasse II Molekülen charakterisiert. Eine Objektträgerfärbung von XS52-DCs zeigte, daß diese Zellen ebenfalls eine basale Expression der MHC Klasse II Moleküle aufweisen, die durch Stimulation mit IFN- γ noch verstärkt wurde (**Abb. 4.25**).



a) MHC II, Medium

b) MHC II, IFN- γ

Abb. 4.25: Oberflächenexpression von MHC Klasse II Protein auf XS52. XS52-DCs wurden auf Chamber Slide-Objektträgern ausgesät und am nächsten Tag für 48 Stunden in Kulturmedium (a) oder mit IFN- γ (b) (500 U/mL) inkubiert. Nach Fixierung in Methanol/Aceton wurden die XS52 mit dem Anti-MHC II Antikörper inkubiert. Nach einer Immunfärbung mit Hilfe der APPAP-Methode mit dem Substrat *Fast Blue*, erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämalaun. (Vergrößerung X 200)

4.3.2.2 FACScan-Analyse

Neben Objektträgerfärbungen wurden die MHC Klasse II Moleküle auf der Zelloberfläche der XS52-DCs mit Hilfe der FACScan-Methode nachgewiesen. Im Vergleich zur Mediumkontrolle konnte nach 48-stündiger Inkubation mit IFN- γ ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenzintensität beobachtet werden (**Abb. 4.26**).

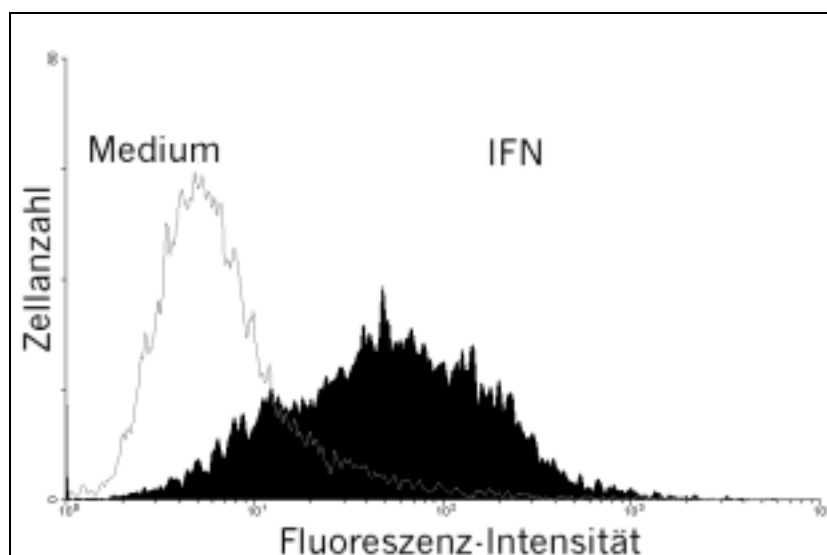
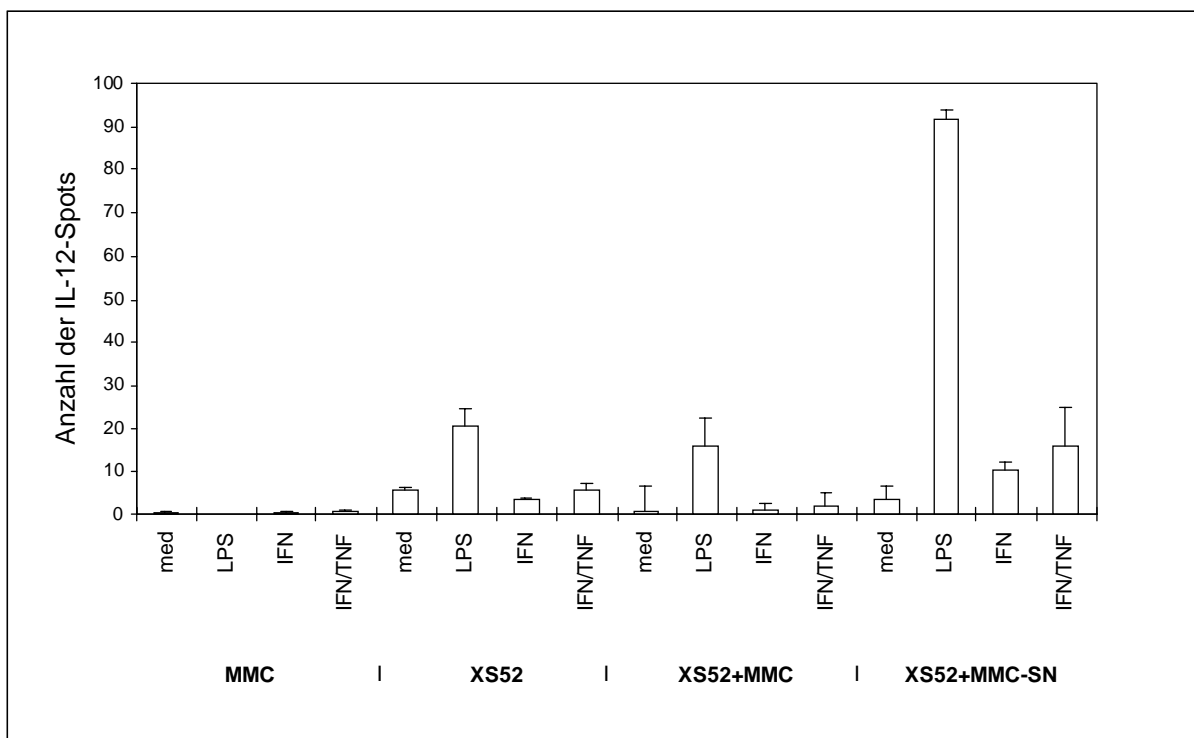


Abb. 4.26: FACScan-Analyse der MHC Klasse II Expression auf XS52-Oberflächen. Verwendet wurden Zellen, die für 48 Stunden ohne bzw. mit IFN- γ (500 U/mL) inkubiert worden waren. Die Messung der MHC II-Oberflächenmoleküle erfolgte mittels eines monoklonalen Anti-MHC II-Antikörpers (*rat-anti-mouse*). Zur Detektion wurde ein FITC-gekoppelter sekundärer Antikörper (*goat-anti-rat*) eingesetzt. Die Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen wurde im FACScan untersucht. In dem dargestellten Histogramm zeigt die Kurve der IFN- γ stimulierten Zellen (ausgefüllte Linie) im Vergleich mit der Kontrollkurve (Medium) eine deutliche Verschiebung nach rechts.

4.3.3 Effekte von Mesangiumzellen auf die IL-12-Produktion

Um zu überprüfen, ob MMC induktive Effekte auf die IL-12-Sekretion von XS52-DCs ausüben können, wurden IL-12-ELISPOT-Assays durchgeführt (s. 3.3.10). Dafür wurden zum einen vorstimulierte MMC ohne Zellkulturmedium der Vorinkubation zusammen mit XS52, sowie nur die Zellkulturmedium-Überstände der vorstimulierten MMC mit den XS52 auf einer ELISPOT-Platte inkubiert. Als Kontrolle der Ansätze wurden jeweils MMC und XS52 alleine mit den entsprechenden Stimuli inkubiert.

Die Auswertung der produzierten IL-12-Spots zeigte, daß MMC alleine, im Gegensatz zu den XS52, nur kleinste Mengen IL-12 produzieren können (**Diagr. 4.20**). Auch in der Kokultur von MMC mit XS52 konnte keine Verstärkung der IL-12-Sekretion im Vergleich zu den XS52 beobachtet werden. Nur die Inkubation mit den Zellkulturüberständen der vorstimulierten MMC (ohne MMC), führte bei den XS52 zu einer deutlichen Induktion der IL-12-Produktion. Aktivierte MMC scheinen also Faktoren zu produzieren, die XS52-DCs zur verstärkten IL-12-Bildung und Sekretion anregen zu können.

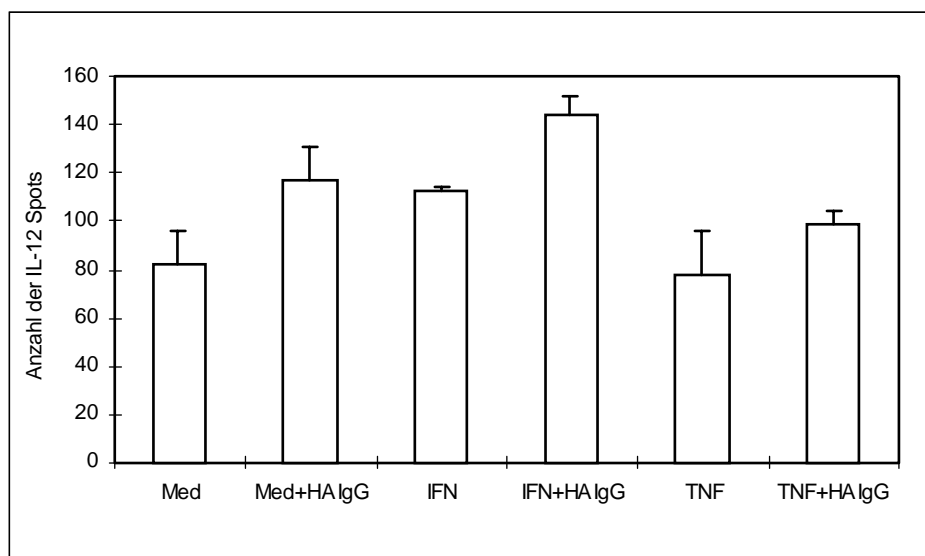


Diagr. 4.20: Effekte von MMC auf die Sekretion von IL-12 durch XS52. MMC wurden für 48 Stunden unter Mediumbedingungen kultiviert oder mit IFN- γ (500 U/mL), IFN- γ /TNF- α (je 500 U/mL) und LPS (10 μ g/mL) stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände der MMC aufgefangen, die MMC von der Zellkulturflasche abgelöst und die MMC, sowie XS52 in auf eine mit einem IL-12-Antikörper *gecoateten* ELISPOT-Platte überführt und dort für 24 Stunden inkubiert. Auf der Platte wurden dafür XS52 und MMC alleine oder die gewaschenen MMC mit den XS52 in Kokultur mit frischen Stimuli und die XS52 mit den Zellkulturüberständen der vorstimulierten MMC inkubiert. Nach der Färbung der IL-12-Zell-Spots wurde die Platte mit dem A-EL-VIS-System ausgewertet.

4.3.4 Fc γ -Rezeptor vermittelte Effekte

4.3.4.1 Synthese des proinflammatorischen Zytokins IL-12

Nachdem gezeigt wurde, daß das Th1-Zytokin IFN- γ deutliche Effekte auf die Fc γ RII- und auch die MHCII-Expression der dendritischen Zelllinie XS52 ausübt, wurde die funktionelle Aktivierbarkeit der Fc γ R-Kreuzvernetzung durch Untersuchung der IL-12-Produktion durch 12-stündige Inkubation mit HAIGG untersucht. Im IL-12-ELISPOT-Assay konnte eine deutliche Steigerung der IL-12-Sekretion nach Stimulation mit HAIGG beobachtet werden, die durch die Vorinkubation mit IFN- γ verstärkt, durch die von TNF- α abgeschwächt wurde (**Diagr. 4.21**).



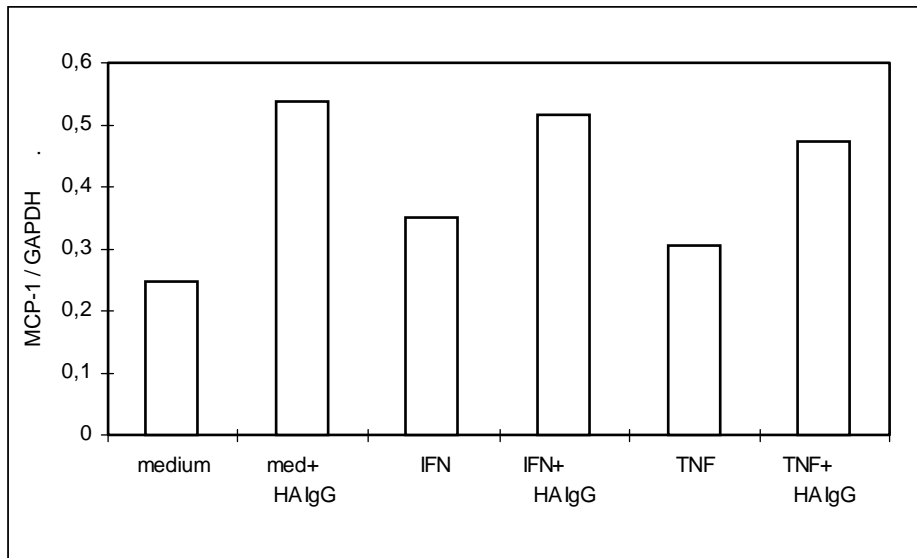
Diagr. 4.21: Sekretion von IL-12 durch XS52. XS52-DCs wurden für 48 Stunden unter Mediumbedingungen kultiviert oder mit IFN- γ und TNF- α (je 500 U/mL) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen auf eine mit einem IL-12-Antikörper *gecoateten* ELISPOT-Platte überführt und für 24 Stunden mit HAIGG inkubiert. Nach der Färbung der IL-12-Zell-Spots wurde die Platte mit dem A-EL-VIS-System ausgewertet.

4.3.4.2 Expression verschiedener Chemokin-mRNA-Spezies

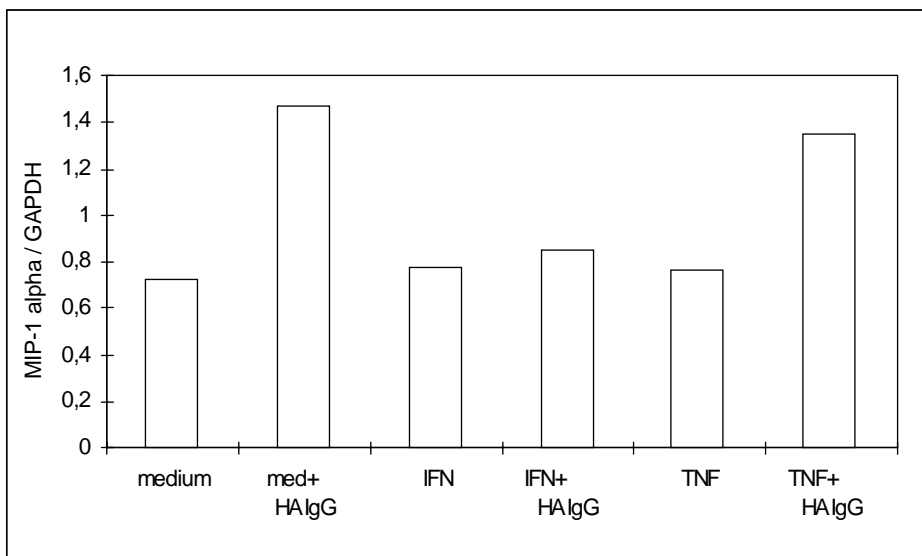
Neben einer verstärkten IL-12-Produktion in XS52 nach Stimulation mit HAIGG, wurde die Chemokin-Expression dieser Zelllinie im *Ribonuklease Protection Assay* (Fa. PharMingen, BD, Heidelberg) mit dem mCK-5 *Multi-Probe Template Set* zur Detektion neun verschiedener Maus C-, CC- und CXC-Chemokin-mRNA-Spezies (Lymphotactin, RANTES, Eotaxin, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, IP-10, MCP-1 und TCA-3) und der konstitutiv exprimierten mRNA von GAPDH und L32 durchgeführt.

Wie die Darstellung der Autoradiografie in **Abb. 4.27** erkennen läßt, wurde von den XS52 schon unter Mediumbedingungen basal die mRNA der Chemokine MCP-1,

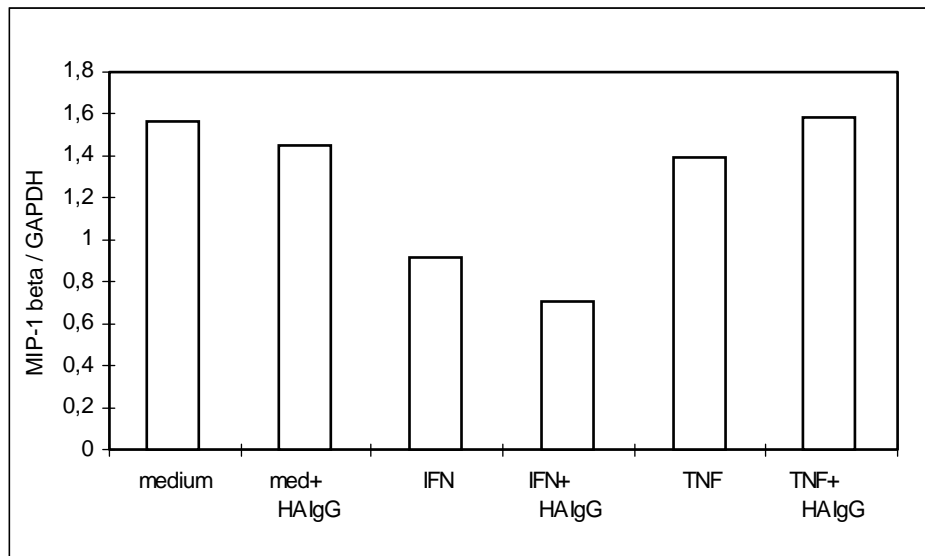
Abb. 4.27 (S. 103): **Induktion von Chemokin-mRNA durch Stimulation mit IFN- γ und TNF- α und Kreuzvernetzung von Fc γ R bei XS52.** Die dendritische Zelllinie XS52 wurde für 48 Stunden in FCS-haltigem Medium bzw. mit IFN- γ und TNF- α (je 500 U/mL) vorstimuliert. Es folgte eine Aktivierung mit hitzeaggregierten IgG (50 μ g/mL) für 12 Stunden. Nach Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit 5 μ g RNA pro Probe ein *Ribonuklease Protection Assay* mit dem mCK-5 *Multi-Probe Template Set* mit nachfolgender Gelelektrophorese durchgeführt. RNA aus der murinen Monozytenzelllinie J774A.1 wurde als positive und t-RNA als negative Kontrolle eingesetzt. In den **Diagr. 4.22-4.25** sind die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der Chemokin-Banden gegen die GAPDH-Banden grafisch dargestellt.



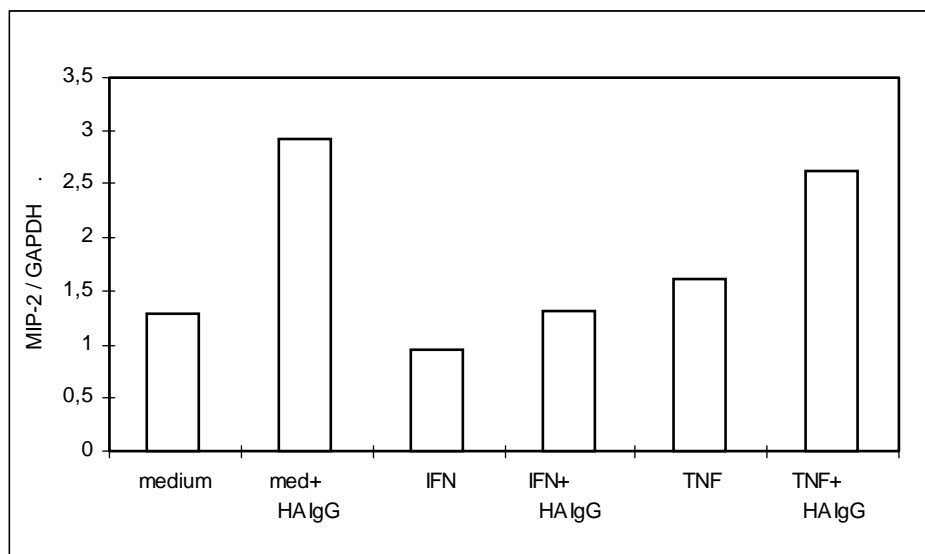
Diagr. 4.22: Expression von MCP-1-mRNA in XS52 durch verschiedene Zytokine und HA IgG. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der MCP-1-Banden gegen die GAPDH-Banden sind grafisch dargestellt.



Diagr. 4.23: Expression von MIP-1 α -mRNA in XS52 durch verschiedene Zytokine und HA IgG. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der MIP-1 α -Banden gegen die GAPDH-Banden sind grafisch dargestellt.



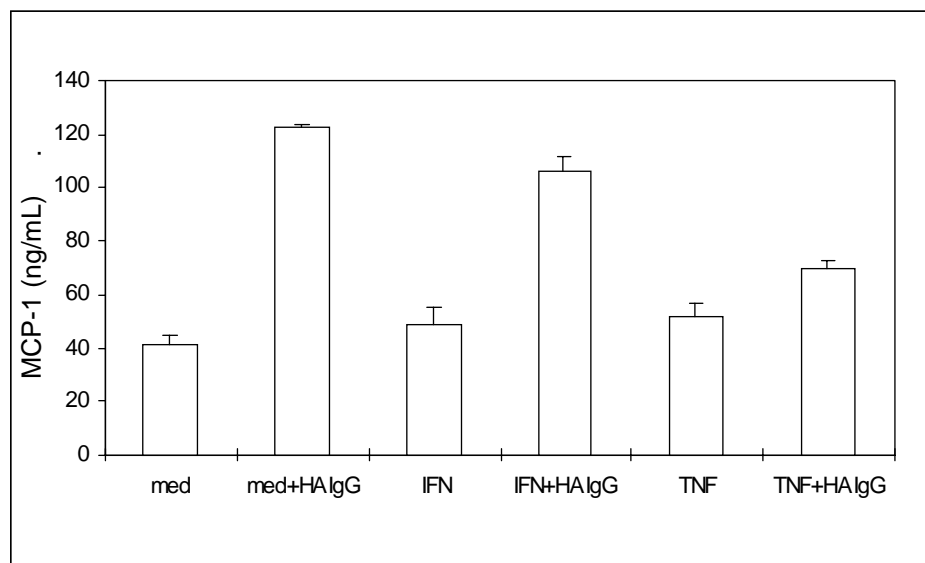
Diagr. 4.24: Expression von MIP-1 β -mRNA in XS52 durch verschiedene Zytokine und HA IgG. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der MIP-1 β -Banden gegen die GAPDH-Banden sind grafisch dargestellt.



Diagr. 4.25: Expression von MIP-2-mRNA in XS52 durch verschiedene Zytokine und HA IgG. Die Ergebnisse der densitometrischen Quantifizierung der MIP-2-Banden gegen die GAPDH-Banden sind grafisch dargestellt.

4.3.4.3 Expression des CC-Chemokins MCP-1 im Kulturüberstand

Neben der Untersuchung der MCP-1-mRNA-Expression im *Ribonuklease Protection Assay* wurden die Kulturüberstände der XS52 im ELISA im Bezug auf eine standardisierte Zellzahl untersucht. Die Sekretion von MCP-1 wurde durch die 48-stündige Vorstimulation mit TNF- α am stärksten erhöht. Eine anschließende Inkubation mit HAIGG führte von Mediumbedingungen ausgehend zu einer deutlichen Steigerung der MCP-1-Konzentration, gefolgt von mit IFN- γ vorstimulierten Zellen. Die Vorinkubation mit TNF- α wies die schwächste Proteininduktion nach HAIGG-Gabe auf (**Diagr. 4.26**).



Diagr. 4.26: Sezernierung einer erhöhten Menge MCP-1 in XS52-Kulturüberständen nach Vorstimulation mit IFN- γ und TNF- α und Inkubation mit HAIGG. Überstände von XS52-Zellen, die in FCS-haltigem Medium bzw. mit IFN- γ und TNF- α (je 500 U/mL) für 48 Stunden vorstimuliert und anschließend für 12 Stunden mit HAIGG (50 μ g/mL) inkubiert worden waren, wurden im MCP-1-spezifischen ELISA untersucht.

5 DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem etablierten *in vitro* Zellkultursystem muriner Mesangiumzellen (MMC) aus Wildtyp- und Fc γ RIII α -/- defizienten Mäusen die Expression und Regulation der niedrig- und hochaffinen Fc γ -Rezeptoren (Fc γ R) detailliert analysiert. Dabei wurden vor allem die Einflüsse von IFN- γ , IL-1 β und TNF- α auf ruhende und proliferierende MMC ermittelt. Außerdem wurden die durch Fc γ -Rezeptor-Stimulation im Vergleich von Wildtyp- und Fc γ RIII-/- (KO)-MMC freigesetzten inflammatorischen Substanzen, die u.a. eine chemotaktische Wirkung auf verschiedene Leukozyten ausüben können, untersucht. Weiterhin von Interesse waren die Auswirkungen von Fc γ R-Kreuznetzungen auf die Chemokin- und IL-12-Synthese einer dendritischen Zelllinie, XS52, die als Modell einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle eingesetzt wurde, sowie ihre Reaktivität in Kokultorexperimenten mit MMC.

Die grundsätzlich wichtigen Befunde dieser Arbeit zeigen, daß murine Mesangiumzellen in der Lage sind, mRNA aller drei Fc γ -Rezeptor-Klassen zu exprimieren. Dabei zeigten sich gegenläufige Regulationen der inflammatorisch wirksamen Fc γ RI und Fc γ RIII und des inhibitorischen ITIM-Rezeptors Fc γ RII. So wurde unter nicht-proliferierenden Bedingungen in Abwesenheit von Zytokinen konstitutiv nur Fc γ RII-mRNA exprimiert. Das proinflammatorische T_H1-Lymphokin IFN- γ bewirkte eine Induktion der mRNA von Fc γ RI α , Fc γ RIII α und FcR γ -Ketten, während gleichzeitig die Transkription und Translation von Fc γ RII herunterreguliert wurde. Eine Stimulation mit dem Monokin IL-1 β und auch teilweise mit TNF- α oder LPS hatte dagegen auf alle Fc γ -Rezeptor-Klassen-mRNAs eine induzierende Wirkung. Für die *in vivo*-Situation könnte dieser gegenläufige Einfluß von IFN- γ wichtige Konsequenzen besitzen. Durch Rezeptorkreuzvernetzung von Fc γ RI und Fc γ RIII mit IgG-Immunkomplexen (IC) waren MMC in der Lage, die inflammatorischen Chemokine MCP-1, RANTES und IP-10 sowie Prostaglandin E₂ verstärkt zu exprimieren bzw. sezernieren. Zusätzlich zeigten Produkte von MMC auch bei der Aktivierung von einer dendritischen Zelllinie, XS52, die als Modell einer professionellen antigenpräsentierenden Zelle eingesetzt wurde, stimulierende Effekte auf die IL-12-Produktion. Die XS52-DCs exprimierten im Gegensatz zu den MMC nach Stimulation mit IgG-IC neben MCP-1 die mRNA der Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und MIP-2, die nach Vorstimulation mit IFN- γ herunterreguliert wurden, was mit den besonderen Eigenschaften von dendritischen Zellen zu erklären ist.

5.1 Bedingungen zur Induktion von Fc γ -Rezeptoren in murinen Mesangiumzellen

Aufgrund der niedrigen Expressionsrate der verschiedenen Fc γ R-mRNA auf den MMC hat sich die Durchführung von Northern Blot-Analysen als nicht empfindlich genug erwiesen. Daher wurde hier die hoch-sensitive RT-PCR-Methode mit spezifischen Oligonukleotid-Primern für die einzelnen Transkripte der murinen Fc γ -Rezeptoren, Fc γ RI α , Fc γ RII, Fc γ RIII α und der mit den Fc γ RI α - und Fc γ RIII α -Ketten assoziierten γ -Ketten angewandt. Zur Verifizierung der RT-PCR-Banden und teilweise zur Erhöhung der Detektierbarkeit, wurden Southern Blot-Hybridisierungen mit Fc γ R-spezifischen ³²P-markierten cDNA-Sonden durchgeführt. Der Einsatz der RT-Technik birgt durch die hohe Nachweisempfindlichkeit gleichzeitig das Problem in sich, auf kleinste Unterschiede der mRNA stark zu reagieren. So kann die prinzipielle Problematik, die bei der Arbeit mit Primärzellkulturen auftritt, wie unterschiedliches Proliferationsverhalten oder Reaktivität auf Stimuli im Laufe von Zellkulturpassagen, durch die Anwendung der RT-PCR-Technik leicht „amplifiziert“ werden. Infolge der so entstehenden interexperimentellen Variabilitäten sind Quantifizierungen der RNA-Expressionen deutlich schwieriger zu validieren als mit Northern Blot-Analysen. Eine weitere Quelle möglicher Schwankungen, die einen quantitativen Vergleich der unterschiedlichen Primärkulturen von MMC erschweren, ergibt sich durch den verschiedenartigen genetischen Hintergrund von WT- und Fc γ RIII-KO-MMC. In den Fc γ RIII-KO-MMC wurde das *Gen-targeting* Konstrukt in embryonalen Stammzellen des 129Sv-Mausstamms homolog rekombiniert und in C57BL/6-Blastozysten eingesetzt. Hier liegt also ein genetisches Mosaik aus den 129- und C57BL/6-Stämmen vor, während die WT-MMC nur aus Mäusen der C57BL/6-Linie stammen.

In Untersuchungen von serumfrei kultivierten WT- und Fc γ RIII-KO-MMC-Primärkulturen, die dem *in vivo* Status dieser Zellen im Glomerulum am nächsten kommen, konnte keine konstitutive Fc γ RI α -mRNA-Synthese detektiert werden. Eine Stimulation mit IFN- γ führte nur in einigen der durchgeführten Versuche zu einer Induktion der Fc γ RI α -mRNA-Transkription und wurde daher nicht sicher nachgewiesen (**Diagr. 4.1, Tab. 4.1** und **Diagr. 4.3, Tab. 4.3**). Diese Befunde stimmen mit denen überein, die bereits in ruhenden humanen Mesangiumzellen gezeigt werden konnten [UCIECHOWSKI et al., 1998]. Weil in der *in vivo*-Situation im Glomerulum vermutlich die gleichzeitige Anwesenheit mehrerer Zytokine eine Rolle spielt und MMC möglicherweise anders reagieren als menschliche Mesangialzellen, wurden neben IFN- γ noch die Einflüsse der Monokine IL-1 β und TNF- α , der T_H2-Zytokine IL-4 und IL-10 sowie LPS untersucht. Dabei zeigten sich nur bei den WT-MMC in einem von drei der durchgeführten Versuche leichte Induktionen der Fc γ RI α -

mRNA-Expression nach Stimulation mit IL-1 β , TNF- α und IFN γ in Kombination mit LPS.

In proliferierenden MMC, die in Medium mit Supplementierung von 10% FCS kultiviert wurden, konnte dagegen eine konstitutive Fc γ RI α -mRNA-Transkription beobachtet werden, die sowohl bei WT- als auch bei Fc γ RIII-KO-MMC deutlich durch IFN- γ und Kombinationen von IFN- γ mit LPS oder IL-1 β verstärkt wurde (**Abb. 4.1, Diagr. 4.2, Tab. 4.2, und Abb. 4.2, Diagr. 4.4, Tab., 4.4**). Die konstitutive Expression des hochaffinen Fc-Rezeptors für monomere IgG auf wachsenden MMC wurde auf humanen Mesangiumzellen unter denselben Bedingungen noch nicht beobachtet [UCIECHOWSKI et al., 1998], klassische Entzündungszellen wie Monozyten und Makrophagen dagegen exprimieren den Fc γ RI schon konstitutiv [RAVETCH & KINET, 1991]. Neben dem proinflammatorischen IFN- γ und dem als anti-inflammatorisch beschriebenen T_H2-Zytokin IL-10, die bei humanen Mesangiumzellen und Makrophagen ebenfalls zu einer Erhöhung der Expression führen [UCIECHOWSKI et al., 1998; RAVETCH & KINET, 1991; VAN DE WINKEL & CAPEL, 1993; SIVO et al., 1993], zeigten bei den untersuchten MMC auch alle anderen eingesetzten Faktoren wie IL-1 β , LPS und Kombinationen von IL-1 β mit TNF- α induktive Wirkungen auf die Fc γ RI α -mRNA Transkription. Die stimulierenden Wirkungen von IFN- γ auf die Expression des Fc γ RI in humanen Zellen wurden durch die Identifizierung einer IFN- γ -responsiven Region (GRR) im hFc γ RI-A Gen-Promotor erklärt, an die auch durch IL-10 induzierte Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie binden [PEARSE et al. 1991; FINBLOOM & WINNESTOCK, 1995]. Für den murinen Fc γ RI ist ein solches cis-DNA-Fragment bisher noch nicht beschrieben worden, aber die starke Induzierbarkeit von Maus-Makrophagen [SIVO et al., 1993] und den MMC durch IFN- γ , läßt auf ähnliche Mechanismen schließen.

Die durch IL-1 β induzierten Resultate, die über andere Signaltransduktionskaskaden als bei IFN- γ vermittelt werden, konnten auf anderen murinen Zellen, den Makrophagen, ebenfalls beobachtet werden [SANTIAGO et al, 1993]. Der Vergleich der Fc γ RI α -mRNA-Expression von WT- und Fc γ RIII-KO-MMC zeigte, daß Fc γ RIII-KO-MMC größtenteils höhere basale mRNA-Werte exprimierten, die aber nicht so starke Induktionen durch die eingesetzten Stimuli aufwiesen wie die WT-MMC, was durch verkürzte Expositionszeiten der Southern Blot-Autoradiografien im Vergleich zu WT-MMC ausgeglichen wurde. Diese Unterschiede könnten durch den verschiedenen genetischen Hintergrund entstanden sein, prinzipiell reagierten die beiden MMC auf die eingesetzten Stimuli aber sehr ähnlich.

Nachdem mehrere Arbeitsgruppen keinen Fc γ RII auf humanen und Nager-Mesangiumzellen detektieren konnten [RADEKE et al, 1994a; HORA et al, 1992], wurde erstmalig gezeigt, daß bereits in ruhenden und noch stärker in proliferierenden MMC aus WT- und aus Fc γ RIII-KO-Mäusen eindeutig die mRNA des als inhibitorischen Rezeptor beschriebenen Fc γ RIIb schon unter den basalen

Bedingungen ohne zusätzliche inflammatorische Stimuli exprimiert wurde (**Abb. 4.3 - 4.6, Diagr. 4.5 - 4.8 und Tab. 4.5 – 4.8**). Dabei handelt es sich bei der exprimierten Fc γ RIIb-Rezeptor-Isoform um die Spleißvariante Fc γ RIIb2, die auch auf Makrophagen und anderen Zellen der myeloiden Linie gefunden wird. Interessanterweise wurde die Fc γ RIIb-mRNA-Transkription nach Inkubation mit IFN- γ und IL-10 herunterreguliert. Ein ähnliches Ergebnis, bei dem die konstitutive Fc γ RII-mRNA-Expression hoch war und eine Inkubation mit IFN- γ keine Transkriptionsverstärkung hervorrief, konnte in murinen Makrophagen gezeigt werden [SANTIAGO et al., 1993]. Wirkte der Einsatz von IFN- γ alleine inhibierend auf die Transkription der Fc γ RIIb2-mRNA, so war durch die kombinierte Stimulation mit LPS, IL-1 β oder TNF- α eine Erhöhung der mRNA-Expression erkennbar. Besonders deutlich waren die IL-1 β -Effekte bei den WT-MMC, die unter wachstumsarretierten Verhältnissen bis zum 10-fachen und unter proliferierenden Bedingungen, bei denen die konstitutive Transkription des Fc γ RIIb2 höher war, bis zum 3-fachen der basalen Expression anstiegen.

Da das T_H1-Lymphokin IFN- γ und das Monokin IL-1 β gegenläufige Effekte bei der Induktion der Fc γ RII-mRNA Synthese aufwiesen, wurden die Wirkungen dieser Faktoren aufeinander genauer untersucht. Eine Vorstimulation mit IL-1 β und anschließende Inkubation mit IFN- γ zeigte bei den Fc γ RIII-KO-MMC keine Herunterregulation der mRNA im Vergleich zum IL-1 β Einzelstimulus (**Abb. 4.7**). Auch eine umgekehrte Vorinkubation mit IFN- γ und nachfolgende Stimulation mit IL-1 β konnte die IFN- γ -induzierte Repression nicht aufheben. Eine Kostimulation mit beiden Faktoren zeigte mittlere Induktions-Werte, die wahrscheinlich auf eine gegenseitige Beeinflussung bei gleichzeitiger Inkubation zurückzuführen sind.

Da auch die Inkubation von IL-10 herunterregulierende Effekte auf die Expression der Fc γ RIIb2-mRNA ausübt und IL-10 und IFN- γ die Expression von Genen über die Aktivierung des Jak/STAT-Signaltransduktionsweges regulieren, könnte diese hemmende Wirkung auf die Existenz von Repressorelementen im Fc γ RIIb-Promotorbereich hinweisen, die von den involvierten Transkriptionsfaktoren besetzt werden könnten. Diese Möglichkeit könnte das Ergebnis, daß die der IFN- γ Vorinkubation folgende Stimulation mit IL-1 β keine induzierende Wirkung mehr besitzt, ebenso versuchsweise erklären, wie eine Verhinderung der Translokation von Transkriptionsfaktoren der IL-1 β -Signaltransduktion in den Nukleus. Ähnlich dem Effekt, den IL-10 auf die LPS-induzierte IL-1 β -, IL-6-, IL-8- und TNF- α -Synthese in humanen Monozyten durch die Blockierung der Freisetzung der inhibitorischen I κ B-Untereinheit aus dem NF- κ B-Komplex bewirkt [WANG et al., 1995]

Die hier gefundenen unterschiedlichen Wirkungen von Zytokinen zeigten deutlich differenzierte Regulationsmechanismen der Fc γ RIIb-mRNA-Synthese in MMC. Aufgrund dieser Befunde und zur Untersuchung der Anwesenheit funktioneller Fc γ RII-Proteine, wurden Objektträgerfärbungen und FACScan-Analysen zur

Detektion der Fc γ RII-Oberflächenexpression durchgeführt. Dafür standen zwei anti-Ly-17.1/2 Antikörper zur Verfügung, die die beiden polymorphen Formen des Fc γ RII ohne Kreuzreaktivität für andere Fc γ R nachweisen [SCHILLER et al, 1998]. Da wegen der relativ geringen mRNA-Expression, die erst nach 40-PCR-Zyklen sichtbar gemacht werden konnte, eine geringe Anzahl an Rezeptormolekülen zu erwarten war, die durch die Zelltrypsinierung noch zusätzlich beeinträchtigt wurde, konnte in FACScan-Analysen nur eine geringe Regulation der Fc γ RII-Oberflächenexpression bei WT-MMC mit dem Anti-Ly-17.2- und bei Fc γ RIII-KO-MMC mit dem Anti-Ly-17.1-Antikörper detektiert werden (**Abb. 4.16 - 4.17**). Dennoch stimmte die tendenziell beobachtete Expression des Fc γ RII mit der auf mRNA-Ebene gefundenen konstitutiven Expression und der durch IFN- γ herunter- und durch TNF- α und TNF- α /IL-1 β heraufregulierten Transkription überein. Da die Trypsinierung zur Ablösung der stark adhärenenten MMC von den Plastikoberflächen der Zellkulturgefäße noch eine weitere Abspaltung von Oberflächenmolekülen zur Folge hat, was den Nachweis der schwach exprimierten Moleküle erschwert, wurden Objektträgerfärbungen durchgeführt. Diese Immunfärbungen konnten nur mit WT-MMC und dem Maus-Anti-Maus-Ly-17.2-IgG-Antikörper durchgeführt werden, weil für den Ly-17.1-Antikörper, bei dem es sich um ein Immunglobulin der IgM-Klasse handelt, kein nachweisendes Färbesystem erhältlich ist. Ly-17.1 erkennt nur die polymorphe Fc γ RII-Form im 129-Mausstamm auf den Fc γ RIII-KO-MMC, während Ly-17.2 die polymorphe Fc γ RII-Form aus dem C57BL/6-Stamm nachweisen kann. Auch die Zytofärbungen der auf Objektträgern angewachsenen und stimulierten WT-MMC zeigten eine konstitutive Expression des Fc γ RII unter proliferierenden Kultivierungsbedingungen, die nach 48-stündiger Stimulation mit IFN- γ abnahm (0,73-fach) und mit TNF- α (1,2-fach) oder TNF- α / IL-1 β (1,36-fach) zunahm (**Abb. 4.14** und **Tab. 4.15**).

Die Expression des niedrigaffinen Fc γ RIII für IgG-Immunkomplexe wurde bereits in mehreren Studien untersucht. So konnte auf proliferierenden humanen und Nager-Mesangiumzellen eine basale Expression dieses Rezeptors nachgewiesen werden, [RADEKE et al., 1994a; SANTIAGO et al., 1991a; HORA et al., 1992], die durch Inkubation mit IFN- γ und CSF-1 auf Ratten-Mesangiumzellen [SANTIAGO et al., 1991b], bzw. IFN- γ in Kombination mit LPS auf humanen Mesangiumzellen [RADEKE et al., 1994a] reguliert wurde. Ähnlich den Fc γ RIII α -mRNA-Expressionsdaten in humanen Mesangiumzellen, die unter nicht-proliferierenden Bedingungen keine konstitutive Transkription des niedrigaffinen Fc γ RIII α nachweisen konnten [RADEKE et al., 1994a], zeigten ruhende MMC basal nur in einigen RNA-Präparationen eine Expression der Fc γ RIII α -mRNA (**Abb. 4.8**, **Diagr. 4.9** und **Tab. 4.9**). Eine Stimulation mit IFN- γ alleine und noch stärker in Kombination mit LPS oder TNF- α führte zu einer deutlichen Induktion der Fc γ RIII α -mRNA-Menge. Während in humanen Mesangialzellen IFN- γ den essentiellen Faktor bei der Transkriptionsverstärkung der

Fc γ RIII α -mRNA darstellt [RADEKE et al., 1994a], führten auch die als Einzelfaktoren eingesetzten Zytokine LPS und TNF- α in MMC zu einer Stimulation. Eine kombinierte Inkubation von IL1 β mit TNF- α erhöhte die Expression der Fc γ RIII α -mRNA in ruhenden MMC im Durchschnitt etwas, während IL-1 β selbst, konform zu den Daten in humanen Mesangiumzellen [RADEKE et al., 1994a], keine induktiven Effekte ausübte, sondern leicht inhibierend wirkte. Diese Unterschiede lassen sich dadurch erklären, daß, obwohl IL-1 β und TNF- α Effekte auf Mesangiumzellen im allgemeinen sehr ähnlich sind und beide Zytokine in die gleichen Signaltransduktionskaskaden involviert sind [FLOEGE & REES, 1997], es doch Unterschiede in ihren biologischen Wirkungen gibt. So z.B. führt TNF- α , aber nicht IL-1 β , zur Apoptose oder Nekrose von Zellen [TRACY & CERAMI, 1994].

Unter proliferierenden Bedingungen wurde die Fc γ RIII α -mRNA in MMC, wie schon in anderen Spezies gezeigt, konstitutiv exprimiert (**Abb. 4.9, Diagr. 4.10 und Tab. 4.10**). Auch bei wachsenden MMC wirkte IFN- γ als Einzelfaktor und in Kombinationen mit IL-1 β und LPS stimulierend. Doch anders, als bei den ruhenden MMC und bei humanen Mesangiumzellen [RADEKE et al., 1994a], führte IL-1 β alleine und in Kombination mit TNF- α , sowie auch TNF- α als Einzelfaktor zu einem Anstieg der Fc γ RIII α -mRNA-Mengen.

Für die Expression auf der Zelloberfläche und für die Weiterleitung von Signalen nach Rezeptorkreuzvernetzung, benötigen die ligandenbindenden α -Ketten von Fc γ RI und Fc γ RIII die Assoziation von ITAM-tragenden γ -Ketten [WIRTHMUELLER et al., 1992; ERNST et al., 1993; VAN VUGT et al., 1996]. Serumfrei kultivierte Fc γ RIII-KO-MMC zeigten konstitutiv noch keine, WT-MMC teilweise eine Expression der γ -Ketten-mRNA (**Abb. 4.10, Diagr. 4.11, Tab. 4.11 und Abb. 4.12, Diagr. 4.13, Tab. 4.13**). Da die α -Ketten-mRNA von Fc γ RI und Fc γ RIII unter diesen Bedingungen ebenfalls größtenteils noch nicht konstitutiv nachgewiesen wurden, wurden die Rezeptorkomplexe der beiden ITAM-Rezeptoren unter diesen Bedingungen wahrscheinlich auch nicht auf der Zelloberfläche exprimiert. Erst die Stimulation mit IFN- γ , aber auch mit IL-1 β , TNF- α , LPS, IL-10 und Kombinationen dieser Faktoren führte, ähnlich der Expression von Fc γ RI α und Fc γ RIII α , zu erhöhten γ -Ketten-mRNA-Mengen in den wachstumsarretierten MMC.

Proliferierende MMC konnten die γ -Ketten-mRNA, wie bereits in humanen Mesangialzellen gezeigt [RADEKE et al., 1994a], schon konstitutiv exprimieren (**Abb. 4.11, Diagr. 4.12, Tab. 4.12 und Abb. 4.13, Diagr. 4.14, Tab. 4.14**). Die Stimulation mit Zytokinen wie IFN- γ und IL-1 β führte bei WT-MMC zu einer leichten Verstärkung der mRNA-Transkription, während bei Fc γ RIII-KO-MMC fast keine Regulation der basal schon hohen γ -Ketten-mRNA-Expression zu erkennen war.

Das Fehlen von Fc γ R-klassenspezifischen Antikörpern im murinen System stellt ein großes Problem beim Nachweis von Fc γ R-Oberflächenproteinen dar. Um die

Oberflächenexpression der stimulatorischen Fc γ -Rezeptoren zu untersuchen, stand als spezifischer Antikörper neben den Anti-Ly-17.1/2-Antikörpern nur ein Fc γ RII und Fc γ RIII gleichzeitig erkennende Antikörper, 2.4G2, zur Verfügung. Die tatsächliche Fc γ RIII-Proteinexpression konnte dabei nur versuchsweise durch Vergleiche von 2.4G2 und Ly-17.2-Färbungen der proliferierenden WT-MMC bestimmt werden. Die Untersuchung von auf Objektträgern adhären und stimulierten MMC mit 2.4G2 zeigte unter Mediumbedingungen eine leichte konstitutive Anfärbung, die mit den Zytokinen IFN- γ , TNF- α und der Kombination TNF- α /IL-1 β deutlich verstärkt werden konnte (**Abb. 4.15** und **Tab. 4.16**). Geht man nun von den Observationen aus, die bei der Untersuchung der Fc γ RII-Oberflächenexpression beobachtet wurden, war bei der Inkubation mit IFN- γ der größte Anstieg der Fc γ RIII-Expression zu erkennen, gefolgt von der Stimulation mit der Kombination TNF- α /IL-1 β und TNF- α .

Bei der Durchführung von FACScan-Analysen konnten aufgrund der oben bereits beschriebenen methodischen Einschränkungen (niedrige Expressionsdichte und Ablösung der Fc γ R von der Zelloberfläche durch die Abtrypsinierung der Zellen) geringfügige Anstiege der Fc γ RII/Fc γ RIII-Oberflächenexpression nach Stimulation mit IFN- γ gezeigt werden (**Abb. 4.18**).

Die Oberflächenexpression von Fc γ RI kann aufgrund des fehlenden spezifischen Antikörpers nur anhand der mRNA-Expressionen von Fc γ RI α - und γ -Kette postuliert werden. Wahrscheinlich ist auch hier IFN- γ der deutlichste Induktor, während TNF- α kaum Wirkungen haben sollte.

Die in den dargestellten Experimenten gezeigten Daten zur Fc γ R-Expression in MMC, sowie die von anderen beschriebenen Resultate in humanen und Ratten MC legen die Vermutung nahe, daß die Transkription von Fc γ R-Genen Spezies-spezifisch reguliert wird, da hier verschiedene Muster in der basalen Expression vorliegen, sowie teilweise unterschiedliche Stimuli Effekte ausüben. Damit stellt sich die Frage der Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf andere Arten. So gibt es Belege dafür, daß Immunkomplex-vermittelte inflammatorische Vorgänge in der Maus eher Fc-Rezeptor abhängig zu sein scheinen als in anderen Tieren, wie z.B. Kaninchen und Meerschweinchen [VEGGERBERG, 1998].

Bestand früher die Hypothese, daß Mesangiumzellen über ihre FcR nur für die *Clearance* Funktionen von Immunkomplexen im Mesangium mitverantwortlich sind, so wird durch die gezeigten Induktionen bzw. Hochregulationen der einzelnen Fc γ R durch inflammatorische Faktoren ihre Rolle als aktive Mitglieder einer glomerulären Entzündung immer deutlicher. Dabei ist von Bedeutung, daß in der Abwesenheit inflammatorischer Zytokine, intrinsische MC unter ruhenden Bedingungen nur den als inhibitorisch beschriebenen Fc γ RII, nicht aber die aktivatorischen ITAM-Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII exprimieren können. Da der murine Fc γ RIIIb2 in Endozytose- und wohl auch Phagozytose-Mechanismen involviert ist [GESSNER et al., 1998], könnte dieser Rezeptor auf den MMC der gesunden Niere *Clearance*-

Funktionen übernehmen und so die mesangialen Strukturen vor der entzündlich-aktiven Deposition von Makromolekülen schützen. So konnte in Ratten-MC eine Fc-Rezeptor-medierte Aufnahme von IC-gecoateten Gold-Partikeln gezeigt werden [NEUWIRTH et al., 1988]. In der Literatur gibt es zahlreiche *in vivo* Untersuchungen mit Fc γ RII-KO-Mäusen, die die schützende Rolle des Rezeptors in verschiedenen IC-vermittelten Entzündungsreaktionen belegen [TAKAI et al., 1996; SUZUKI et al., 1998; PARK et al., 1998]. So konnten in Tierversuchen zur Anti-GBM-GN in Fc γ RII-KO-Mäusen leicht verstärkte glomeruläre Schädigungen beobachtet werden [SUZUKI et al., 1998]. Und auch im Modell der IC-Alveolitis führten niedrigste IgG-IC-Konzentrationen in Fc γ RII-KO-Mäusen zu einer starken inflammatorischen Antwort, während die Wildtyp-Kontrollmäuse keine Entzündungen etablierten [CLYNES et al., 1999]. Die Defizienz des inhibitorischen Fc γ RII auf residenten Zellen scheint also den Grenzwert zu erniedrigen, von dem an IC zu einer Stimulation führen, was seine Rolle in *Clearance*-Funktionen unterstreichen könnte.

Kultivierungsbedingungen mit Supplementierung von 10% FCS führten bei den MMC zur Proliferationsinduktion, die, wie oben beschrieben, alleine schon eine basale Induktion von Fc γ RI und Fc γ RIII und eine verstärkte Expression des Fc γ RIIb bewirkte. Für die *in vivo* Situation in den Glomeruli könnte die Anwesenheit verschiedener Proliferations-induzierender Serumfaktoren wie bFGF und PDGF, die bei einigen renalen Erkrankungen vermehrt exprimiert werden, wichtige Auswirkung haben. So könnten diese mitogenen Faktoren, die autokrin von Mesangiumzellen selber [FRANCKI et al., 1995; FLOEGE et al., 1994a] oder parakrin durch andere intrinsische renale Zellen [FLOEGE et al., 1994b; FRANK et al., 1993] produziert werden, dazu führen, daß MMC auch ohne weitere entzündliche Zytokine die inflammatorische Kaskade nach Fc γ -Rezeptor-Kreuzvernetzung initiieren könnten. Die Inkubation der MMC mit verschiedenen Faktoren von professionellen Immunzellen zeigte aber, daß diese das Expressionspotential der einzelnen Fc γ R entscheidend zu modulieren vermögen. Eine Stimulation mit dem T_H1 Lymphozytenprodukt IFN- γ führte bei den untersuchten ruhenden und auch proliferierenden MMC zu deutlich gegenregulatorischen Mechanismen der Expressionen der aktivatorischen Fc γ RIII und Fc γ RI im Vergleich zum sog. inhibitorischen Fc γ RIIb. T-Zell-Produkte könnten also für den Verlauf einer GN relevante Funktionen übernehmen. So konnte in verschiedenen GN-Formen, wie auch der IC-assoziierten GN, ein initialer T-Zell-vermittelter Mechanismus, der zu einer Infiltration von Entzündungszellen wie Makrophagen führt, für den Verlauf glomerulärer Entzündungen verantwortlich gemacht werden [KITCHING et al., 1999a; HUANG et al., 1997; MERKEL et al., 1996]. Es wurde postuliert, daß sensitivierte Gedächtnis-T-Zellen vor anderen Immunzellen in die Glomeruli einwandern, mit lokal deponierten Antigenen reagieren könnten, die von dendritischen Zellen (DC) oder Makrophagen präsentiert und durch eine DTH-Reaktion zu einer Sekretion von

Zytokinen wie IFN- γ aktiviert werden [RADEKE & RESCH, 1992; UCIECHOWSKI et al., 1998].

Für die Verhältnisse in der Niere *in vivo* könnte dies bedeuten, daß das sezernierte IFN- γ auf den MMC zu einer Herunterregulation der basalen Fc γ RII-Expression und gleichzeitigen Induktion der Fc γ -Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII, sowie der akzessorischen Oberflächenmoleküle MHC Klasse II (**Abb. 4.22**) und ICAM-1 [MARTIN et al., 1987; UCIECHOWSKI et al., 1998] führen kann. Durch diese Regulation von aktivatorischen und inhibitorischen Fc γ R könnte es nun zu einer Reaktion mit kleinsten Mengen kontinuierlich deponierter IgG-IC kommen, die über die Signaltransduktionskaskade der ITAM-Rezeptoren die Bildung und Freisetzung verschiedener inflammatorischer Faktoren wie z.B. IL-6, IL-8, CSF-1 und MCP-1 [RADEKE et al., 1994a; UCIECHOWSKI et al., 1998; HORA et al., 1992] bewirkt, die zu einer Anlockung von Neutrophilen, Makrophagen und weiteren T-Zellen führt. Daß bei diesen Vorgängen Fc γ RI und Fc γ RIII mit ihren aktivatorischen ITAM-Motiven in den assoziierten γ -Ketten beteiligt sind, wurde in zahlreichen Veröffentlichungen mit γ -chain-KO-Mäusen eindeutig bewiesen [SUZUKI et al., 1998; PARK et al., 1998; CLYNES et al., 1998]

Die Infiltration von Makrophagen und auch Neutrophilen, die durch IFN- γ zu einer massiven Produktion und Synthese von IL-1 und TNF- α angeregt werden, könnte weitere induktive Effekte auf die Expression der aktivierenden Fc γ R ausüben, während gleichzeitig Fc γ RII nicht mit einer Verstärkung der Expression reagieren würde. Diese Monokine und weitere entzündlich wirksame Produkte dieser Zellen stellen eine permanente Aktivierung der Mesangiumzellen dar, die weiterhin mit der Sekretion autokrin und parakrin wirksamer Mediatoren, sowie verstärkter Produktion extrazellulärer Matrix [FLOEGE et al., 1994b] reagieren können. Dadurch kann es zu einer fortlaufend kaskadenartigen Verstärkung der Reaktionen kommen, die im positiven Fall (nach Entfernung der pathogenen IC) mit einer Ausheilung beendet werden kann und im schlimmsten Fall zu einer Chronifizierung bis hin zu einem Funktionsverlust der renalen Strukturen führt. Unterstützt wird die Interaktion mit Immunzellen durch die erwähnte Expressionsinduktion von Oberflächenmolekülen wie ICAM-1 und MHC Klasse II auf den MMC [UCIECHOWSKI et al., 1998; LEFKOWITH, 1997]. In Tierversuchen mit chimären MHC Klasse II-defizienten Mäusen, die nur in der Niere keine MHC-Klasse II Moleküle exprimierten, wurde kürzlich die Bedeutung dieses Oberflächenmoleküls auf glomerulären Zellen für die Initiation renaler Entzündungen nachgewiesen [LI et al., 1998].

5.2 Funktionelle Aktivierbarkeit von Fc γ -Rezeptoren auf murinen Mesangiumzellen

Um die funktionelle Aktivierbarkeit der beobachteten Expression von Fc γ R-mRNA und Oberflächenmolekülen im Hinblick auf die oben beschriebenen Resultate zu überprüfen, wurden die Wirkungen hitzeaggregierter IgG-IC (HAIGG) auf WT- im Vergleich zu Fc γ RIII-KO-MMC untersucht. Diese Versuche wurden mit wachsenden Zellen durchgeführt, da in proliferierenden MMC größere Mengen Fc γ R-mRNA und Oberflächenproteine als in wachstumsarretierten MMC detektiert wurden.

In mehreren Studien konnte in Mesangiumzellen nach einer Stimulation mit IgG-IC die Expression des CC-Chemokins MCP-1 gezeigt werden [HORA et al., 1992; SATRIANO et al., 1993; UCIECHOWSKI et al., 1998]. CC-Chemokine, zu denen neben MCP-1 u.a. auch RANTES, MIP-1 α und MIP-1 β gehören, übernehmen in vielen GN-Formen durch die chemotaktische Rekrutierung von Monozyten / Makrophagen und Lymphozyten in das Glomerulum essentielle Rollen bei der Entwicklung und Fortschreitung von entzündlichen Glomerulonephritiden [BANAS et al., 1996].

Vor allem MCP-1, das von lokalen gewebeständigen und auch bereits infiltrierte Zellen exprimiert werden kann, spielt in diesem Zusammenhang eine relevante Rolle. So konnten im Vergleich zu gesunden Individuen in an Glomerulopathien laborierenden Patienten deutlich erhöhte MCP-1-Konzentration in der Niere und im Urin nachgewiesen werden [ROVIN et al., 1996; NORIS et al., 1995; PRODJOSUDJADI et al., 1996]. Weiterhin konnte in murinen Modellen zur IC-vermittelten GN durch den Einsatz von neutralisierenden Antikörpern gegen MCP-1 ein Rückgang von sklerotisierenden Vorgängen im Glomerulum erreicht werden, die mit einer reduzierten Infiltration von Makrophagen und Leukozyten einher ging [WADA et al., 1996; LLOYD et al., 1997]. Eine Stimulation der WT- und Fc γ RIII-KO-MMC mit hitzeaggregierten murinen Antikörpern der Subklassen IgG1 und IgG2b, für die in der Literatur eine präferentielle Bindungsspezifität für die beiden niedrigaffinen Fc γ R angegeben wird [RAVETCH & KINET, 1991; HAZENBOS et al., 1998], führte unter proliferierenden Bedingungen bei WT-MMC zu einer stärkeren Induktion der MCP-1-mRNA-Expression als bei den Fc γ RIII-KO-MMC (**Abb. 4.19**). Diese Unterschiede in der Expressionshöhe lassen sich durch das Fehlen des Fc γ RIII auf der Zelloberfläche der Fc γ RIII-KO-MMC erklären. Für die Transkriptionsverstärkung der MCP-1-mRNA auf den Fc γ RIII-KO-MMC durch die HAIGG scheint die Kreuzvernetzung des hochaffinen Fc γ RI verantwortlich zu sein, denn auf proliferierenden Fc γ RIII-KO-MMC wurde schon basal eine starke Expression der Fc γ RI α - und der assoziierenden γ -Ketten-mRNA detektiert. Fc γ RI auf MMC sind also in der Lage, IC aus IgG1 und IgG2b zu binden und darüber hinaus aktiviert zu werden. Durch das Fehlen der Fc γ RIII α -Kette in den Fc γ RIII-KO-MMC könnten weiterhin die „überschüssigen“ γ -Ketten, die sonst an die Fc γ RIII α -Kette gebunden

hätten, vermehrt an die Fc γ R1 α -Kette zur Bildung des Fc γ RI-Rezeptorkomplexes assoziieren und so für eine erhöhte Oberflächenexpression des Fc γ RI verantwortlich sein. Ein ähnliches Ergebnis wurde durch das Fehlen der Fc ϵ R1 α -Kette in der Fc ϵ R1 α -*chain*-defizienten Maus beobachtet, wodurch eine verstärkte Assoziation der Fc γ RIII α -Kette mit den β - und γ -Ketten eine erhöhte Expression von Fc γ RIII auf Mastzellen gefunden wurde, die mit einer verstärkten Mastzelldegranulation und IgG-vermittelten Anaphylaxie einher ging [DOMBROVICZ et al., 1997].

Zwar gibt es in humanen mononukleären Zellen Hinweise dafür, daß MCP-1 nur durch die direkte Kreuzvernetzung von Fc γ RIII, nicht aber durch die Kreuzvernetzung von Fc γ RI und Fc γ RII exprimiert wird [MARSH et al., 1997]. Daten in humanen Mesangiumzellen dagegen zeigten nach gezielter Fc γ RI-Kreuzvernetzung eine eindeutige Expressionsinduktion von MCP-1 [UCIECHOWSKI et al., 1998]. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß Fc γ RI-vermittelte Effekte wie die induzierte Transkription von Chemokingenen Zelltyp-spezifisch reguliert werden, was durch Unterschiede der involvierten spezifischen Substrate, die bei der ITAM-vermittelten Signaltransduktion aktiviert werden, begründet werden könnte. Wiesen die WT-MMC mit den HAlgG1/2b schon deutliche Induktionen der MCP-1-mRNA auf, so wurde durch den Einsatz von präformierten Antigen-Antikörper-IC, die aus kreuzvernetztem FITC-markiertem Ovalbumin (OVA-XL-FITC) und den entsprechenden Anti-FITC-IgG1/2b zusammengesetzt waren, noch deutlichere Stimulationen beobachtet, die das dreifache des Mediumwertes betrug. Da *in vivo* eher Antigen-Antikörper-Komplexe die stimulierenden Makromoleküle darstellen [ABRASS, 1997] als Antigen-freie IgG-IC, stellt diese Stimulation einen interessanten Befund dar.

Durch eine Vorstimulation der MMC mit IFN- γ und TNF- α sollte in anschließenden Experimenten die funktionelle Aktivierbarkeit der Fc γ R mit HAlgG nach regulatorischer Induktion der einzelnen Fc γ R-Klassen mit Hinblick auf die Expression verschiedener Chemokine untersucht werden. Für die Versuche standen MMC aus WT-, Fc γ RIII-/(KO)- und γ -*chain*-/(KO)-Mäusen mit unterschiedlichen Fc γ R-Oberflächenexpressionen zur Verfügung. Die Durchführung eines *RNase Protection Assay* mit einer Sonde zur Detektion neun verschiedener Maus C-, CC- und CXC-Chemokin-mRNA-Spezies (Lymphotactin, RANTES, Eotaxin, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, IP-10, MCP-1 und TCA-3) zeigte, daß MMC unter den gewählten Versuchsbedingungen RANTES-, IP-10- und MCP-1-mRNA exprimierten (**Abb. 4.21** und **Diagr. 4.15 - 4.17**). Ein Vergleich der mRNA-Induktionen der Chemokine in den untersuchten MMC hat gezeigt, daß WT-MMC schon basal und noch stärker nach Stimulation mit den Zytokinen IFN- γ und TNF- α größere Mengen Chemokin-mRNA exprimierten als die beiden KO-MMC. Unter Mediumbedingungen war bei den WT-MMC nach HAlgG-Stimulation sowohl für MCP-1-mRNA und -Protein (**Diagr. 4.18**) als auch für RANTES- und IP-10-mRNA eine Erhöhung der zu erkennen, ein Effekt,

der bei Fc γ RIII-KO- und γ -chain-KO-MMC nur bei der MCP-1-mRNA-Transkription und Proteinsekretion auftrat.

Eine Vorstimulation mit IFN- γ führte bei allen MMC zu einer besonders starken Induktion der mRNA des *Interferon-inducible protein-10* (IP-10), aber auch von MCP-1 und RANTES. Die anschließende Stimulation mit den HAlgG zeigte in WT-MMC deutliche Induktionseffekte der mRNA-Menge von MCP-1, IP-10 und RANTES sowie bei der Sekretion von MCP-1-Protein. Bei den Fc γ RIII-KO- und bei den γ -chain-KO-MMC hatte die Inkubation von HAlgG auf die IFN- γ vorstimulierten Zellen ebenso induktive Wirkungen auf die mRNA-Synthese der Chemokine.

TNF- α führte gleichfalls zu einer Transkriptionsverstärkung der Chemokin-mRNA. Die MCP-1-mRNA-Expression und auch die Sekretion von MCP-1 Protein wurde dabei bei allen MMC am deutlichsten stimuliert, während die Induktionen der IP-10- und RANTES-mRNA schwächer ausfielen. Ein Vergleich der mRNA-Induktionen von MCP-1, IP-10 und RANTES durch HAlgG zeigte bei WT- und γ -chain-KO-MMC für alle Chemokine eine Stimulation der mRNA-Synthese, während bei Fc γ RIII-KO-MMC, wie erwartet, keine Wirkungen auftraten. Die bei den WT-MMC aufgetretenen deutlichen Erhöhungen der mRNA-Mengen nach Stimulation mit den HAlgG gehen mit der postulierten und gezeigten Oberflächenexpression von Fc γ RI und Fc γ RIII einher. Auch die Effekte auf den Fc γ RIII-KO-MMC lassen sich erklären. Da für den Nachweis des murinen Fc γ RI kein spezifischer Antikörper vorhanden ist, müssen über die hypothetische Oberflächenexpression Vermutungen anhand der mRNA-Expression des Fc γ RI α und der assoziierten γ -Kette auf den Fc γ RIII-KO-MMC ausgesprochen werden. Die Oberflächenexpression des Fc γ RI auf Fc γ RIII-KO-MMC könnte mit IFN- γ verstärkt und mit TNF- α eher abgeschwächt werden, während Fc γ RIIb2 gleichzeitig gegenläufig reguliert wird. Eine Stimulation mit HAlgG zeigte daher, konform mit den hypothetischen Fc γ RI- und gezeigten Fc γ RII-Expressionen, nur unter Mediumbedingungen und nach IFN- γ Stimulation, nicht aber nach TNF- α Vorstimulation eine Erhöhung der Chemokin-mRNA. Die Induktionsanstiege der Chemokin-mRNA bei den γ -chain-KO-MMC nach Stimulation mit HAlgG lassen sich nicht über Fc γ R-Kreuzvernetzung erklären, da die Mäuse, aus denen die Zellen präpariert wurden, keine Oberflächenexpression der aktivatorischen Fc γ RI und Fc γ RIII, sondern nur des inhibitorischen Fc γ RIIb aufweisen sollten. Dieser induzierende Effekt aggregierter IgG auf die Chemokinsynthese in mesangialen Primärkulturen aus γ -chain-KO-MMC wurde auch schon von Suzuki et al. [SUZUKI et al., 1998] gezeigt. Diese Gruppe macht FcR-unabhängige Mechanismen wie das Renin-Angiotensin System (RAS) für diese Observationen verantwortlich, das *in vivo* renale Schädigungen durch Anti-GBM-Antikörper in γ -chain-KO-Mäusen induzierte. Ob Angiotensin II in der Zellkultur ebenfalls für die Induktion der Chemokine durch IgG-Behandlung verantwortlich gemacht werden kann, ist fraglich, da bisher keine Synthese von Angiotensin II in Mesangiumzellen nachgewiesen wurde.

Neben den Induktionen der Chemokin-mRNA-Synthese durch Fc γ R-Kreuzvernetzung mit HA1gG hatten auch die zur Fc γ R-Induktion eingesetzten Stimuli unterschiedliche Wirkungen auf die Transkription von MCP-1, RANTES und IP-10. Die starke Responsivität des IP-10-Gens durch Stimulation mit IFN- γ und schwächer durch TNF- α , wird durch die gleichzeitige Anwesenheit von Interferon-stimulierten responsiven Elementen (ISRE) und NF κ B-Bindungsstellen in der 5'-flankierenden Region hervorgerufen [OHMORI & HAMILTON, 1993a]. Dieses CXC-Chemokin, das chemotaktisch auf T- und NK- Zellen, aber nicht aktivierend auf Neutrophile wirkt [DEWALD et al., 1992], wird *in vivo* hauptsächlich in der Leber und der Niere synthetisiert und könnte daher eine wichtige Funktion bei der Reaktion auf systemische Inflammationen übernehmen [NARUMI et al., 1992; OHMORI et al., 1993b]. So wurden in Anti-GBM-GN neben einer erhöhten MCP-1- auch verstärkte IP-10-mRNA-Expressionen gefunden [TANG et al., 1995]. Die Induktionen von MCP-1 und RANTES durch TNF- α lassen sich durch die Aktivierung genregulatorischer Elemente wie der Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF κ B und ihre Lokation an Bindungsstellen in den Promotoren der Chemokin-Gene erklären [ROEBUCK et al., 1999]. Besonders der Transkriptionsfaktor NF- κ B spielt bei der Kontrolle der Genexpression von Chemokinen signifikante Rollen, so wurde bewiesen, daß auch die von IC durch Fc-Rezeptor-Kreuzvernetzung vermittelten Effekte auf IP-10, MCP-1 und RANTES durch eine Erhöhung und Aktivierung von NF- κ B hervorgerufen werden [SATRIANO & SCHLÖNDORFF, 1994; DUQUE et al., 1997; SATRIANO et al., 1997]

Die durch IFN- γ Stimulation beobachteten Effekte könnten durch die Anwesenheit von IFN- γ *activation sites* (GAS) begründet werden, die z.B. im MCP-1 Promoter identifiziert wurden, an den IFN-spezifische Transkriptionsfaktoren binden und so die Transkription induzieren [VALENTE et al., 1998]. Da für die Induktion von RANTES mit IFN- γ und TNF- α synergistische Eigenschaften beschrieben wurden [MARFAING-KOKA et al., 1995]., könnten die besonders deutlichen stimulatorischen Wirkungen auf die RANTES Transkription nach IFN- γ Vorstimulation und anschließender Inkubation mit HA1gG, die ja genauso wie TNF- α -Effekte über NF- κ B vermittelt werden, auf eine solche kooperative Wechselwirkung schließen. Neben den chemotaktischen Eigenschaften, die RANTES vorwiegend auf T-Gedächtniszellen, Eosinophilen und Basophilen induziert, besitzt dieses Chemokin auch kostimulierende Fähigkeiten bei der T-Zell-Proliferation [BACON et al., 1995].

Neben der Induktion von Chemokinen führt die Stimulation von Mesangiumzellen mit Zytokinen und IC auch zu einer Produktion von Prostaglandinen, wie z.B. Prostaglandin E₂ (PGE₂) und Thromboxan B₂ [NEUWIRTH et al., 1988; KNAUS et al., 1989]. PGE₂ vermittelt neben der Hemmung der T-Lymphozyten-Aktivierung [GOODWIN & CEUPPENS, 1983] eine Reihe von lokalen antiinflammatorischen Effekten in der Niere. So inhibiert es die Zellrekrutierung, die Proliferation von

Mesangiumzellen und reduziert die Formation extrazellulärer Matrix [ZAHNER et al., 1994; STAHL, 1997]. Die Bedeutung eines intakten PG-Systems wird besonders unter pathophysiologischen Bedingungen deutlich. PGE₂ wird meist erst nach der initialen Gewebsverletzung im Glomerulum detektiert, könnte so als gegenregulatorisches Signal den proinflammatorischen Reaktionen entgegenwirken und zu einer Ausheilung des Gewebes führen. So zeigte sich im Tiermodell zur IC-assoziierten GN, daß eine Behandlung mit PGE₂ einen signifikanten Rückgang von glomerulären Schädigungen bewirkte [McLEISH et al., 1983]. Der durchgeführte PGE₂-ELISA wies besonders bei WT-MMC, aber auch bei den FcγRIII-KO- und γ-chain-KO-MMC einen Sekretionsanstieg dieses Cyclooxygenase-Produkts nach Inkubation mit HAIG auf (**Diagr. 4.19**). Interessanterweise war die basale PGE₂-Sekretion unter unstimulierten Mediumbedingungen und auch nach Vorstimulation mit IFN-γ bei den FcγRIII- und γ-chain-KO-MMC deutlich höher als bei den WT-MMC. Vielleicht war es diese höhere basale Produktion des Prostaglandins, die zu der Verringerung der Chemokin-Expressionen bei den KO-MMC im Vergleich zu den WT-MMC führte. So konnte gezeigt werden, daß die durch cAMP vermittelten suppressiven Wirkungen von PGE₂ zu einer Verminderung der mRNA-Expression von MCP-1, CSF-1, RANTES und Monokinen führten, die auf transkriptioneller Ebene reguliert wurden [SATRIANO et al., 1993, 1997; KUNKEL et al., 1988]. Doch auch zusätzlich zur Genexpressionskontrolle könnten Änderungen auf posttranskriptioneller Ebene durch Modifikationen der mRNA-Stabilität nicht ausgeschlossen werden, da die mRNA von MCP-1 AUUUA-reiche Sequenzen in ihrer 3'-untranslatierten Region besitzt, die für die Stabilitätskontrolle der mRNA verantwortlich ist [SHAW et al., 1986; SATRIANO et al., 1993].

5.3 Untersuchungen in der dendritischen Zelllinie XS52

Neben den Mesangiumzellen, die als lokale Gewebezellen eine zentrale Rolle im Verlauf entzündlicher Immunreaktionen einnehmen können, sollten in dieser Arbeit die Effekte von IgG-IC auf professionelle antigenpräsentierende dendritische Zellen (DC) und ansatzweise ihre Wechselwirkungen mit MMC untersucht werden. Da die Etablierung von DC-Kulturen äußerst diffizil und aufwendig ist, wurde für die geplanten Untersuchungen eine nicht-lymphoide „Langzeit“-DC-Zelllinie, XS52, eingesetzt, die aus der Epidermis pränataler BALB/c-Mäuse etabliert wurde und noch Eigenschaften residenter epidermaler DC (Langerhans Zellen) besitzt [XU et al., 1995].

DCs, die überall im Körper gefunden werden, werden durch ihre typische Zellmorphologie und ihre konstitutive Expression von MHC Klasse I- und II-Molekülen charakterisiert. Eine besondere Fähigkeit dieser Zellen ist die sogenannte „Ausreifung“ durch spezielle Faktoren, die durch die Interaktion mit Pathogenen und T-Zellen induziert wird [BANCHEREAU & STEINMAN, 1998]. Damit verbunden sind

Änderungen im Expressionsmuster bestimmter Oberflächenmoleküle und ihre Fähigkeit, mit syngenen T-Zellen zur Antigenpräsentation zu reagieren [ROMANI & SCHULER, 1992]. In Untersuchungen der XS52-DCs konnte ebenfalls eine konstitutive Oberflächenexpression des MHC II-Moleküls detektiert werden, die durch Inkubation mit IFN- γ noch anstieg (**Abb. 4.25 - 4.26**). Auch der Nachweis einer hohen konstitutiven Fc γ RII- und Fc γ RIII-Oberflächenexpression auf den XS52 (**Abb. 4.23**) zeigte, daß diese Zelllinie die Fähigkeiten zur Aufnahme von Antigen-Antikörper-Komplexen und zur Präsentation der prozessierten Antigene besitzt, die durch IFN- γ -Inkubation noch verstärkt wurden.

In einer Immunpräzipitation mit dem Anti-Fc γ RII/III-Antikörper 2.4G2 und nachfolgendem Western-Blot mit dem Fc γ RII-spezifischen Antikörper Ly-17.2 konnte gezeigt werden, daß IFN- γ außerdem zu einer Herunterregulation der Fc γ RII-Proteine führt (**Abb. 4.24**). Diese Ergebnisse weisen auf die Einleitung eines Ausreifungsprozesses der XS52 durch IFN- γ hin, bei dem die Fähigkeiten zur Antigen-Aufnahme abnehmen, während gleichzeitig die Expression der MHC Klasse II-Moleküle und damit die Befähigungen zur Antigenpräsentation zunehmen [BANCHEREAU & STEINMAN, 1998].

Neuere Untersuchungen beschreiben, daß zwei DC-Formen existieren: eine den myeloiden Zellen ähnliche DC1, die durch die Produktion großer IL-12-Mengen T_H1-Antworten induzieren und eine lymphoid-ähnliche DC2-Zellform, die wenig IL-12 produzierend, T_H2-Antworten hervorrufen kann [RISSOAN et al., 1999].

Auch im Kontext inflammatorischer Reaktionen in der Niere könnten DCs primär durch die Interaktion mit T-Helfer-Zellen relevante Funktionen erfüllen. Untersuchungen von Radeke (unveröffentlichte Ergebnisse) weisen nämlich darauf hin, daß es sich bei den im murinen mesangialen Gewebe detektierten MHC Klasse II positiven Zellen nicht nur um infiltrierte oder residente Makrophagen handelt, sondern auch andere professionelle antigenpräsentierende Zellen (APC) wie DC involviert sein könnten. Diese könnten zirkulierende sensitivierte T-Gedächtniszellen u.a. durch die Präsentation lokal deponierter Antigene über ihre MHC Klasse II Moleküle zu einer Sekretion von IFN- γ aktivieren.

In einem *in vivo* Modell wurde demonstriert, daß intrinsische renale Zellen zu einer effektiven Antigen-Präsentation befähigt waren, die zu einer Zell-assoziierten Gewebsschädigung führen konnte [RENNKE et al., 1994]. Auch eine *in vitro* Studie mit Zellpräparationen residenter Mesangiumzellen und syngenen Lymphknoten-Lymphozyten konnte die Fähigkeit der lokalen Zellen zur Aktivierung der autoreaktiven T-Lymphozyten zeigen [RADEKE et al., 1994b].

Diese Untersuchungen wurden aber mit gemischten Lymphknotenpopulationen durchgeführt, in denen auch DC und andere APC zu finden sind. Erst die Generierung eines I-A^d-restringierten OVA-spezifischen T_H1-Zell-Klons, IF12, (durch H.H. Radeke) machte „reine“ Kokulturen mit syngenen Primärkulturen aus Mesangiumzellen möglich. Befunde von Kokultur-Experimenten in IFN- γ -ELISPOT-

Assays (Radeke, unveröffentlichte Ergebnisse) mit MMC und IF12-T-Zellen, APC und IF12-T-Zellen, sowie MMC, APC und IF12-Zellen aus einem syngenen Maussystem zeigten, daß mit IFN- γ und TNF- α vorstimulierte MMC alleine nicht in der Lage waren, die T-Zellen durch Präsentation des prozessierten OVA-Peptids zur Sekretion von IFN- γ zu aktivieren. Die Kokultur von MC, APC und T-Zellen dagegen wies deutlich verstärkte Aktivierungen der T_H1-Zellen im Vergleich zu den reinen APC-T-Zell-Kokulturen auf. Es gibt also Hinweise dafür, daß, obwohl Mesangiumzellen nicht in der Lage sind, T-Zellen direkt zu aktivieren, ihre Interaktionen mit APC wichtige Funktionen im inflammatorischen Geschehen in der Niere übernehmen könnten.

Aus diesem Grund wurden IL-12-ELISPOT-Experimente mit den IL-12 produzierenden XS52-DC und MMC oder nur mit MMC-Kultivierungsüberständen durchgeführt. Die Überstände mit IFN- γ , IFN- γ /TNF- α oder am deutlichsten mit LPS vorstimulierten MMC aktivieren dabei XS52 am stärksten zur IL-12-Sekretion (**Diagr. 4.20**). Stimulierte MMC können also mit der Sekretion bislang noch unbekannter Faktoren DCs so beeinflussen, daß durch verstärkte IL-12-Produktion eine effizientere T_H1-Zell-Antwort möglich sein könnte. Ein mögliches MMC Produkt, für das bereits eine Stimulation der IL-12-Sekretion bei DCs beschrieben wurde, stellt PGE₂ dar [RIESER et al., 1997]. PGE₂ besitzt also neben den oben beschriebenen anti-inflammatorischen Wirkungen auch pro-inflammatorisches Potential. Dieser Mechanismus der Antigen-unabhängigen Aktivierung der DCs könnte im Kontext von Autoimmunerkrankungen wichtig sein, wie in (MRL/lpr) Lupus nephritis-Mäusen gezeigt werden konnte, in deren Seren signifikant höhere IL-12-Konzentrationen gefunden wurden als in den entsprechenden Kontrollmäusen [HUANG et al., 1996].

IL-12, das primär von den sogenannten DC1-Zellen produziert wird, unterstützt die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Lymphozyten in T_H1-Zellen und verstärkt die Produktion von T_H1-Zytokinen wie IFN- γ und IL-2. Weiterhin fungiert dieses proinflammatorische Zytokin als Wachstumsfaktor aktivierter natürlicher Killerzellen (NK-Zellen) und T-Zellen, erhöht die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen und ist daher relevant für die Kontrolle der Zell-vermittelten Immunität [TRINCHIERI, 1995].

In Tiermodellen von IC-assoziierten GN wurde die wichtige Funktion dieses proinflammatorischen Zytokins durch die Aktivierung von T-Zellen erkannt. So führte die Neutralisation von IL-12 mit Antikörpern zu abgeschwächten Reaktionen, die Gabe von rekombinanten IL-12 induzierte dagegen Kollagenablagerungen und Matrixbildungen im Glomerulum, die mit erhöhter Reaktivität von T_H1-Zellen verbunden waren [NAKAJAMA et al., 1997; KITCHING et al., 1999b].

Auch die Inkubation mit HAIGG führte bei XS52-DC durch Fc γ R-Kreuzvernetzung zu einer verstärkten IL-12-Sekretion (**Diagr. 4.21**). Dabei übte die Vorinkubation mit IFN- γ induktive, die Vorstimulation mit TNF- α hemmende Wirkungen auf die IL-12-Produktion aus. Bezogen auf die *in vivo*-Situation verdeutlichen diese Resultate, daß im Glomerulum befindliche DC durch Interaktionen mit IgG zu einer verstärkten T_H1-

Zell-Aktivierungen durch IL-12 fähig sind, die den Beginn der inflammatorischen Kaskade intensivieren kann.

Dabei könnten auch weitere, von den DC nach IC-vermittelten Reaktionen exprimierte Mediatoren wie Chemokine, den inflammatorischen Prozeß vorantreiben. Die Inkubation der dendritischen Zelllinie XS52 mit verschiedenen Faktoren wie IFN- γ und TNF- α und die nachfolgende Stimulation mit HAlGg führte bei diesen APC zu einem anderen Chemokin-Expressionsmuster als bei den MMC. XS52 exprimierten unter den gewählten Versuchsbedingungen die mRNA der CC-Chemokine MIP-1 α , MIP-1 β und MCP-1 sowie des CXC-Chemokins MIP-2, das homolog zum humanen GRO- β ist (**Abb. 4.27** und **Diagr. 4.22 - 4.25**). Die beiden CC-Chemokine MIP-1 α , das vorwiegend CD8+-T- und B-Zellen, sowie Baso- und Eosinophile chemotaktisch anlockt und MIP-1 β , das präferentiell Chemotaxis bei CD4+-T-, B-, und NK-Zellen induziert, besitzen noch weitere Funktionen bei der Regulation der T-Zelladhäsion an Endothelzellen [TAUB et al., 1993]. Während die MCP-1-mRNA- und auch die MCP-1-Protein-Expression (**Diagr. 4.26**) unter allen Vorstimulationsbedingungen und nochmals nach Inkubation mit HAlGg als Fc γ R-vermittelter Effekt deutlich induziert wurde, zeigten sich bei den anderen Chemokinen andere Regulationsmuster. So bewirkte die Vorstimulation mit IFN- γ eine Hemmung der mRNA-Transkription von MIP-1 β und MIP-2, bzw. hatte keinen Effekt auf die Expression von MIP-1 α . Die nachfolgende Inkubation mit HAlGg zeigte abermals inhibierende Wirkungen auf die mRNA-Expression von MIP-1 β , sowie nur geringe Einflüsse auf die Induktion der MIP-1 α - und MIP-2-mRNA-Mengen. Die Anwesenheit des Lymphokins IFN- γ und damit auch der Präsenz von T_H1-Zellen sowie von IgG-IC würde also die Fähigkeit der DC über Chemokinese noch weitere T-Zellen, im Fall von MIP-2, auch Neutrophile, anzulocken verringern, während die Rekrutierung von Monozyten durch MCP-1 weiter verstärkt werden würde. Die Vorstimulation mit TNF- α dagegen regulierte die Chemokinexpression kaum. Eine nachfolgende Inkubation mit aggregierten IgG führte hingegen stimulatorische Wirkungen auf die Transkription der Chemokin-Gene aus. Bei Anwesenheit von Monozyten/Makrophagen, die als potentielle TNF- α -Produzenten in der *in vivo* Situation in Frage kommen, besteht also weiterhin die Möglichkeit zur chemotaktischen Rekrutierung weiterer Lymphozyten an den Entzündungsort. Diese könnten dann mit der Produktion von IFN- γ die Chemokinese von T-Zellen verringern und gleichzeitig die IL-12-Sekretion im Zusammenhang mit IC und Fc γ R-Stimulierung zur besseren Aktivierung der T-Lymphozyten stimulieren.

Die Inkubation mit IFN- γ scheint die XS52-DCs, die noch Eigenschaften muriner Langerhans Zellen aufweisen, zu einer Zellausreifung zu beeinflussen. So wurde auch in zu DCs „ausreifenden“ Langerhans Zellen eine Herunterregulation der MIPs gefunden [HEUFLER et al., 1992]. Weitere Hinweise auf „Maturationsvorgänge“, die durch IFN- γ eingeleitet und oben schon beschrieben wurden, sind die verstärkte MHC Klasse II Expression, die Herunterregulierung des Fc γ RII-Proteins, sowie die

Erhöhung der IL-12 Produktion [BANCHEREAU & STEINMAN, 1998]. Die in die Vorgänge der Antigenpräsentation involvierten Reaktionen sind also bidirektionale Prozesse, bei der nicht nur DCs die T-Zell-Aktivierung induzieren, sondern auch aktivierende Signale von den korrespondierenden T-Lymphozyten zurück erhalten.

Zusammenfassend haben die Ergebnisse dieser Arbeit gezeigt, daß die Expression der verschiedenen Fc γ R auf glomerulären Mesangiumzellen muriner Nieren ein deutlich regulierter Prozeß ist, der durch unterschiedliche Zytokine beeinflusst und gesteuert werden kann. So wurde unter nicht-proliferierenden Zellkulturbedingungen nur der als inhibitorischer Fc-Rezeptor beschriebene Fc γ RIIb2 von den MMC transkribiert, während wachsende MMC alle drei Fc γ R-Klassen konstitutiv exprimierten. Für die Regulation der Fc γ R-Expression wurde die Relevanz des T_H1-Zell-Lymphokins IFN- γ deutlich, das die Stimulation inflammatorisch wirksamer Moleküle wie der aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII, sowie des Oberflächenmoleküls MHC Klasse II bewirkte, während es gleichzeitig auf die Regulation des inhibitorischen Fc γ RIIb eine hemmende Wirkung ausübte. Für Fc γ RII und Fc γ RIII konnten diese gegenläufigen Regulationen auch bei der Oberflächenexpression gezeigt werden. Die Fc γ R-Ligation kann inflammatorische Vorgänge initiieren, die durch Zytokine und aktivierte Komplementfaktoren amplifiziert werden können. Auch für die Induktion und Regulation der Chemokinexpression wurde die besondere Bedeutung des Lymphokins IFN- γ deutlich, das mit aggregierten IgG auf verschiedenen Zelltypen wie MMC und DC differentiell und deutlich unterschiedlich interagiert. Die Vorbehandlung der MMC mit IFN- γ verstärkte die Expression von MCP-1-, RANTES- und IP-10-mRNA. Eine Stimulation mit IC erhöhte durch die Induktion der aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren Fc γ RI und Fc γ RIII die Transkription und Translation der Chemokin-Gene noch weiter, was durch den Vergleich von WT- und Fc γ RIII-KO-MMC gezeigt werden konnte. Dagegen bewirkte das T_H1-Lymphokin bei den DC Hemmungen der Genexpression von MIP-2, MIP-1 α und MIP-1 β , nicht aber von MCP-1. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Produkte von stimulierten Mesangiumzellen und auch IgG-IC professionell antigenpräsentierende DC zur vermehrten Sekretion von IL-12 stimulieren können, wodurch eine effektivere Aktivierung von T-Zellen möglich werden könnte. MMC können also durch die Kreuzvernetzung ihrer ITAM-Fc γ -Rezeptoren chemotaktische Wirkungen auf Leukozyten ausüben und auch durch die Aktivierung von DC im lokalen Entzündungsgeschehen bedeutende Rollen übernehmen, die das Potential für eine Ausheilung oder Chronifizierung der inflammatorischen Prozesse besitzen.

6 Literaturverzeichnis

Abrass, C.K. (1997): Mechanisms of immune complex formation and deposition in renal structures. In: Neilson, E.G. & Couser, W.G. *Immunologic Renal Diseases*. Philadelphia: Lippincott-Raven: 291-307

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

Bacon, K.B., Premarck, B.A., Gerdner, P., Schall, T.J. (1995): Activation of dual T cell signaling pathways by the chemokine RANTES. *Science*, **269**: 1727-1730

Banas, B., Wenzel, U., Stahl, R.A.K., & Schlöndorff, D. (1996): Role of Chemokines in Glomerular disease. *Kidney Blood Press. Res.* **19**: 270-280

Banchereau, J., & Steinman, R.M. (1998): Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, **392**: 245-252

Burmeister, W.P., Huber, A.H., & Bjorkman, P.J. (1994): Crystal structure of the complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. *Nature* **372** (6504): 379-383

Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987): Single step method of RNA isolation by acidguanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.*, **162**: 156-159

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

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

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

Cochrane, C.G., Muller-Eberhard, H.J., & Aikin, B.S. (1970): Depletion of plasma complement in vivo by a protein of cobra venom: its effect on various immunologic reactions. *J. Immunol.* **105**: 55-69

Conrad, D.H. (1990): Fc ϵ RII/CD23: the low affinity receptor for IgE. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 623-645

Daëron, M., Latour, S., Malbec, O., Espinosa, E., Pina, P., Pasmans, S., & Fridman, W.H. (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

Dewald, B., Moser, B., Barella, L., Schumacher, C., Baggiolini, M., & Clark-Lewis, I. (1992): IP-10, a gamma-interferon-inducible protein related to interleukin-8, lacks neutrophil activating properties. *Immunol. Lett.* **32**: 81-84

Dombrowicz, D., Flamand, V., Brigman, K.K., Koller, B.H., & Kinet, J.P. (1993): Abolition of anaphylaxis by gene targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor α chain gene. *Cell*, **75**: 969-976

Dombrowicz, D., Flamand, V., Miyajima, I., Ravetch, J.V., Galli, S.J., & Kinet, J.P. (1997): Absence of Fc ϵ R1 α chain results in upregulation of Fc γ RIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. *J. Clin. Invest.* **99**: 915-925

Duque, N., Gómez-Guerrero, C., & Egido, J. (1997): Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J. Immunol.* **159**: 3474-3482

Ernst, L.K., Duchemin, A.M., & Anderson, C.L. (1993): Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI) with the gamma subunit of the IgE receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **90** (13): 6023-6027

Finbloom, D.S., & Winnestock, K.D. (1995): IL-10 induces the tyrosine phosphorylation of tyk2 and Jak1 and the differential assembly of STAT1 alpha and STAT3 complexes in human T cells and monocytes. *J. Immunol.*, **155** (3): 1079-1090

Floege, J., & Rees, A.J. (1997): Growth factors and cytokines. In: Neilson, E.G. & Couser, W.G. *Immunologic Renal Diseases*. Philadelphia: Lippincott-Raven: 417-454

Floege, J., Radeke, H.H., & Johnson, R. (1994a): Glomerular cells *in vitro* versus the glomerulum *in vivo*. *Kidney Int.* **45**: 360-368

Floege, J., Johnson, R., & Alpers, C.E. (1994b): Visceral glomerular epithelial cells can proliferate *in vivo* and synthesize platelet-derived growth factor B-chain. *Am J. Pathol.* **142**: 637-650

Francki, A., Uciechowski, P., Floege, J., von der Ohe, J., Resch, K., & Radeke, H.H. (1995): Autocrine growth regulation of human glomerular mesangial cells is primarily mediated by basic fibroblast growth factor. *Am J. Pathol.* **147**: 1372-1382

Frank, J., Engler-Blum, G., Rodemann, H.P., & Müller, G.A. (1993): Human renal tubular cells as a cytokine source: PDGF-B, GM-CSF, and IL-6 mRNA expression *in vitro*. *Exp. Nephrol.* **1**: 26-35

- Gessner, J.E., Heiken, H., Tamm, A., & Schmidt, R.E. (1996):** The IgG Fc receptor family. *Ann. Haematol.*, **76**: 231-248
- Gómez-Guerrero, C., López-Armada, M.J., González, E., & Egido, J. (1994):** Soluble IgA and IgG aggregates are catabolized by cultured rat mesangial cells and induce production of TNF- α and IL-6, and proliferation. *J. Immunol.* **153**: 5247-5255
- Goodwin, J.S., & Ceuppens, J. (1983):** Regulation of the immune response by prostaglandins. *J. Clin. Immunol.* **3**: 295-315
- Hazenbos, W.L.W., Heijnen, I.A.F.M., Meyer, D., Hofhuis, F.M.A., de Lavalette, C.R., Schmidt, R.E., Capel, P.J.A., van de Winkel, J.G.J., Gessner, J.E., van den Berg, T.K., & Verbeek, J.S., (1998):** Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc γ RIII (CD16)., *J. Immunol.*, **161**:3026-3032
- Hazenbos, W.L.W., Gessner, J.E., Hofhuis, F.M.A., Kuipers, H., Meyer, D., Heijnen, I.A.F.M., Schmidt, R.E., Sandor, M., Capel, P.J.A., Daeron, M., van de Winkel, J.G.J., Verbeek, J.S. (1996):** Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc γ RIII (CD16) deficient mice. *Immunity* **5**: 181-188
- Hebert, L.A., Cosio, F.G., & Birmingham, D.J. (1997):** Complement and Complement regulatory proteins in renal disease. In: Neilson, E.G. & Couser, W.G. In: *Immunologic Renal Diseases*. Philadelphia: Lippincott-Raven: 377-395
- Heufler, C., Topar, G., Koch, F., Trockenbach, B., Kämpgen, E., Romani, N. & Schuler, G. (1992):** Cytokine gene expression in murine epidermal cell suspensions: Interleukin 1 β and Macrophage Inflammatory Protein 1 α are selectively expressed in Langerhans cells but are differentially regulated in culture. *J. Exp. Med.*, **176**: 1221-1226
- Hirose, W., Lahat, N., Platzer, M., Schmitt, S., & Davies, T.F. (1988):** Activation of MHC-restricted rat T-cells by cloned syngeneic thymocytes. *J. Immunol.* **144**: 75-83
- Holmes, K.L., Palfree, R.G.E., Hammerling, U., & Morse III, H.C. (1985):** Alleles of the Ly-17 alloantigen define polymorphism of the murine IgG Fc receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**: 7706-7710
- Hora, K., Satriano, J.A., Santiago, A., Mori, T., Stanley, E.R., Shan, Z. & Schlondorff, D. (1992):** Receptors for IgG complexes activate synthesis of monocyte chemoattractant peptide 1 and colony stimulating factor 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 1745-1749
- Huang, F.P., Feng, G.J., Lindop, G., Stott, D.I., & Liew, F. Y. (1996):** The role of interleukin 12 and nitric oxide in the development of spontaneous autoimmune disease in MRLMP-*lpr/lpr* mice. *J. Exp. Med.* **183**: 1447-1459

Huang, X.R., Tipping, P.G., Apostolopoulos, J., Oettinger, C., D'Souza, M., Milton, G., & Holdsworth, S.R. (1997): Mechanisms of T-cell-induced glomerular injury in anti-glomerular basement membrane (GBM) glomerulonephritis in rats. *Clin. Exp. Immunol.* **109**: 134-142

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

Israel, E.J. Taylor, S., Wu, Z., Mizoguchi, E., Blumberg, R.S., Bhan, A., & Simister, N.E. (1997): Expression of the neonatal Fc receptor, FcRn, on human intestinal epithelial cells. *Immunology* **92** (1): 69-74

Kashgarian, M., & Sterzel, R.B. (1992): The pathobiology of the mesangium. *Kidney Int.* **41**: 524-529

Kitching, A.R., Holdsworth, S.R., & Tipping, P.G. (1999a): IFN-gamma mediates crescent formation and cell-mediated immune injury in murine glomerulonephritis. *J. Am. Soc. Nephrol.* **10**: 752-759

Kitching, A.R., Tipping, P.G. & Holdsworth, S.R (1999b): IL-12 directs severe renal injury, crescent formation and Th1 responses in murine glomerulonephritis. *Eur. J. Immunol.* **29**: 1-10

Knaus, T.C., Meine, P., Ricanati, S.A., Kester, M., Dubyak, G.R., Emancipator, S.N., & Sedor, J.R. (1989): Immune complex activation of rat glomerular mesangial cells: dependence on the Fc region of antibody. *Am. J. Physiol.* **257**: F478-485

Kunkel, S.L., Spengler, M., May, M.A., Spengler, R., Larrick, J., & Remick, D. (1988): Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J. Biol. Chem.* **263**: 5380-5384

Kurosaki, T. & Ravetch, J.V. (1989): A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachmant domain determines the membrane topology of Fc gamma RIII. *Nature*, **342** (6251): 805-807

Kurosaki, T. Gander, I., & Ravetch, J.V. (1991): A subunit to an IgG Fc receptor and the T-cell receptor mediates assembly through different interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88** (9): 3837-3841

Kurosaki, T. Gander, I., Wirthmueller, U., & Ravetch, J.V. (1992): The β subunit of Fc ϵ RI is associated with the Fc γ RIII on mast cells. *J. Exp. Med.*, **175** (2): 447-451

Latour, S., Fridman, W.H., & Daëron, M. (1996): Identification, molecular cloning, biologic properties, and tissue distribution of a novel isoform of murine low-affinity IgG receptor homologous to human Fc γ RIIb1., *J. Immunol.*, **157**: 189-197

- Lefkowitz, J.B. (1997):** Leukocyte migration in immune complex glomerulonephritis: role of adhesion receptors. *Kidney Int.* **51**: 1469-1475
- Li, S., Kurts, C., Kontgen, F., Holdsworth, S.R., & Tipping, P.G. (1998):** Major histokompatibility complex class II expression by intrinsic renal cells is required for crescentic glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* **188**: 597-602
- Lloyd, C.M., Minto, A.W., Dorf, M.E., Proudfoot, A., Wells, T.N., Salant, D.J., & Gutierrez-Ramos, J.C. (1997):** RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescentic formation and interstitial fibrosis. *J. Exp. Med.* **185**: 1371-1380
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., & Sambrook, J. (1989):** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory. Cold Spring Harbour, NY, USA
- Marfaing-Koka, A., Devergne, O., Gorgone, G., Portier, A., Schall, T.J., Galanaud, P., & Emilie, D. (1995):** Regulation of the production of the RANTES chemokine by endothelial cells. Synergistic induction by IFN-gamma plus TNF-alpha and inhibition by IL-4 and IL-13. *J. Immunol.* **154**: 1870-1878
- Marsh, C.B., Wewers, M.D., Tan, L.C., & Rovin, B.H. (1997):** Fc(gamma) receptor cross-linking induces peripheral blood mononuclear cell monocyte chemoattractant protein-1 expression: role of lymphocyte Fc(gamma)RIII. *J. Immunol.* **158**: 1078-1084
- Martin, M., Schwinzer, H., Schellekens, H., & Resch, K. (1987):** Glomerular mesangial cells in local inflammation. Induction of the expression of MHC class II antigens by IFN-gamma. *J. Immunol.* **142**: 1887-18894
- Matyszak, M.K., Denis-Donini, S., Citterio, S., Longhi, R., Granucci, F., & Ricciardi-Castagnoli, P. (1999):** Microglia induce myelin basic protein-specific T cell anergy or T cell activation, according to their state of activation. *Eur. J. Immunol.* **29**: 3063-3076
- McLeish, K.R., Gohara, A.F., Stelzer, G.T., & Wallace, J.H. (1983):** Treatment of murine immune-complex glomerulonephritis with prostaglandin E2: dose-response of immune complex deposition, antibody synthesis, and glomerular damage. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **26**: 18-23
- Merkel, F., Marx, M, Netzer, K.-O., & Weber, M. (1996):** T cell involvement in glomerular injury. *Kidney Blood Press. Res.* **19**: 298-304
- Miller, K.L., Duchemin, A.M., & Anderson, C.L. (1996):** A novel role for the Fc receptor gamma subunit: enhancement of Fc gamma R ligand affinity. *J. Exp. Med.* **183** (5): 2227-2233
- Muta, T., Kurosaki, T., Misulovin, Z., Sanchez, M., Nussenzweig, M.C., & Ravetch, J.V. (1994):** A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIb modulates B-cell receptor signalling. *Nature*, **239** (6478): 340

- Nakajima, A., Hirose, S., Yagita, H., & Okumura, K. (1997):** Roles of IL-4 and IL-12 in the development of lupus in NZB/W F1 mice. *J. Immunol.* **158**: 1466-1472
- Narumi, S., Wyner, L.M., Stoler, M.H., Tannenbaum, C.S., & Hamilton, T.A. (1992):** Tissue-specific expression of murine IP-10 mRNA following systemic treatment with interferon gamma. *J. Leukoc. Biol.* **52**: 27-33
- Neuwirth, R., Singhal, P., Diamond, B., Hays, R.M., Lobmeyer, L., Clay, K., & Schlöndorff, D. (1988):** Evidence for immunoglobulin Fc receptor-mediated prostaglandin₂ and platelet-activating factor formation by cultured rat mesangial cells. *J. Clin. Invest.* **82**: 936-944
- Nickoloff, B.J., & Turka, L.A. (1994):** Immunological functions of non-professional antigen-presenting cells: new insights from studies of T-cell interactions with keratinocytes. *Immunol. Today*, **15** (10): 464-469
- Noris, M., Bernasconi, S., Casiraghi, F., Sozzani, S., Gotti, E., Remuzzi, G., & Mantovani, A. (1995):** Monocyte chemoattractant protein-1 is excreted in excessive amounts in the urine of patients with lupus nephritis. *Lab. Invest.* **73**: 804-809
- Oettgen, H.C., Martin, T.R., Wynshaw-Boris, A., Deng, C., Drazen, J.M., & Leder, P. (1994):** Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature*, **370**: 367-370
- Ohmori, Y., & Hamilton, T.A. (1993):** Cooperative interaction between interferon (IFN) stimulus response element and kappa B sequence motifs controls IFN gamma- and lipopolysaccharide-stimulated transcription from the murine IP-10 promoter. *J. Biol. Chem.* **268**: 6677-6688
- Ohmori, Y., Wyner, L., Narumi, S., Armstrong, D., Stoler, M & Hamilton, T.A. (1993):** Tumor necrosis factor-alpha induces cell type and tissue-specific expression of chemoattractant cytokines in vivo. *Am J. Pathol.* **142**: 861-870
- Osman, N., Kozak, C.A., McKenzie, I.F.C., & Hogarth, P.M. (1992):** Structure and mapping of the gene encoding the high affinity Fc γ RI and chromosomal location of the human Fc γ RI gene. *J. Immunol.* **148**: 1570-1575
- Park, S.Y., Ueda, S., Ohno, H., Hamano, Y., Tanaka, M., Shiratori, T., Yamazaki, T., Arase, H., Karasawa, A., Sato, S., Ledermann, B., Kondo, Y., Okumura, K., Ra, C., Saito, T. (1998):** Resistance of Fc Receptor-deficient Mice to Fatal Glomerulonephritis. *J. Clin. Invest.* **102** (6): 1229-1238
- Pearse, R.N., Feinmann, R., & Ravetch, J.V. (1991):** Characterization of the promoter of the human gene encoding the high affinity IgG receptor: transcriptional induction by γ interferon is mediated through common DNA response elements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 11305-11309

- Porges, A.J., Radecha, P.B., Doebele, R., Pan, L.C., Salmon, J.E., & Kimberly, R.P. (1992):** Novel Fc γ receptor I family gene products in human mononuclear cells. *J. Clin. Invest.* **90**: 2102-2109
- Prodjosudjadi, W., Gerritsma, J.S., van Es, L.A., Daha, M.R., & Bruijn, J.A. (1995):** Monocyte chemoattractant protein-1 in normal and diseased human kidneys: an immunohistochemical analysis. *Clin. Nephrol.* **44**: 148-155
- Radeke, H.H., & Resch, K. (1992):** The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *Clin. Invest.* **70**: 825-42
- Radeke, H.H., Gessner, J.E., Uciechowski P., Mägert, H.J., Schmidt, R.E., & Resch, K. (1994a):** Intrinsic human glomerular mesangial cells can express receptors for IgG complexes (hFc γ RIII-A) and the associated Fc epsilon RI gamma-chain. *J. Immunol.* **153**: 1281-1292
- Radeke, H.H., Emmendorfer, A., Uciechowski, P., von der Ohe, J., Schwinzer, B., & Resch, K. (1994b):** Activation of autoreactive T-lymphocytes by cultured glomerular mesangial cells. *Kidney Int.* **45**: 763-774
- Ravetch, J.V. (1994):** Fc receptors: rubor redux. *Cell* **78**: 553-560
- Ravetch, J.V., Luster, A.D., Weinshak, R., Kochan, J., Pavlovec, A., Portnoy, D.A., Hulmes, J., Pan, Y.-C.E., & Unkeless, J.C. (1986):** Structural heterogeneity and functional domains of murine immunoglobulin G Fc receptors. *Science*, **234**: 718-725
- Ravetch, J.V., & Kinet J.-P. (1991):** Fc receptors. *Annu. Rev. Immunol.* **9**: 457-492
- Renneke, H.G., Klein, P.S., Sandstrom, D.J., & Mendrick, D.L. (1994):** Cell-mediated immune injury in the kidney: acute nephritis induced in the rat by azobenzeneearsonate. *Kidney Int.* **45**: 1044-1056
- Rieser, C., Böck, G., Klocker, H., Bartsch, G., & Thurnher, M. (1997):** Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor α cooperate to activate human dendritic cells: synergistic activation of Interleukin 12 production. *J. Exp. Med.* **186**: 1603-1608
- Rissoan, M-C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal Malefyt, R., & Liu, Y.-J. (1999):** Reciprocal control of t helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**: 1183-1186
- Roebuck, K. A., Carpenter, L.R., Lakshminarayanan, V., Page, S.M., Moy, J.N., & Thomas, L.L. (1999):** Stimulus-specific regulation of chemokine expression involves differential activation of the redox-responsive transcription factors AP-1 and NF- κ B. *J. Leukoc. Biol.* **65**: 291-298
- Romani, N., & Schuler, G. (1992):** The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as a part of the dendritic cell system. *Springer. Semin. Immunopathol.* **13**: 265-279

- Rovin, B.H., Doe, N., & Tan, L.C. (1996):** Monocyte chemoattractant protein-1 levels in patients with glomerular disease. *Am J. Kidney Dis.* 27: 640-646
- Santiago, A., Mori, T., Satriano, J., & Schlöndorff, D. (1991a):** Regulation of Fc receptors for IgG on cultured rat mesangial cells. *Kidney Int.* 39: 87-94
- Santiago, A., Satriano, J., DeCandido, S., Holthofer, H., Schreiber, R., Unkeless, J. & Schlöndorff, D. (1991b):** A specific Fc γ Receptor on cultured rat mesangial cells. *J. Immunol.* 143: 2575-2582
- Santiago, E., Mendoza, J.F., Corona, T.M., Lopez, R., Sanchez, L., Mora, L.M., Flores, F., Valencia, E., & Weiss-Steider, B. (1993):** Induction of Fc receptors on murine macrophages and leukemic cells by interleukin-1 beta. *Eur. Cytokine Netw.* 4: 223-228
- Satriano, J.A., Hora, K., Shan, Z., Stanley E.R., Mori, T., & Schlöndorff, D. (1993):** Regulation of Monocyte Chemoattractant Protein-1 and Macrophage Colony-Stimulating Factor-1 by IFN- γ , Tumor Necrosis Factor- α , IgG aggregates, and cAMP in mouse mesangial cells., *J. Immunol.*, 150: 1971-1978
- Satriano, J.A., & Schlöndorff, D. (1994):** Activation and attenuation of transcription factor NF- κ B in mouse glomerular mesangial cells in response to tumor necrosis factor-alpha, immunoglobulin G, and adenosine 3':5'-cyclic monophosphate: Evidence for involvement of reactive oxygen species. *J. Clin. Invest.* 94: 1629-1636
- Satriano, J.A., Banas, B., Luckow, B., Nelson, P., & Schlöndorff, D.O. (1997):** Regulation of RANTES and ICAM-1 expression in murine mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* 8: 596-603
- Schiller, C., Schmidt, R.E., Gessner, J.E (1998):** Antibodies specific for the murine Ly-17 alloantigen distinguish class II from class III Fc γ receptors. *Immunobiology*, 199, 3-5: 664
- Schwarz, M., Radeke, H.H., Resch, K., & Uciechowski, P. (1997):** Lymphocyte-derived cytokines induce sequential expression of monocyte- and t cell-specific chemokines in human mesangial cells. *Kidney Int.* 52: 1521-1531
- Shaw, G., & Kamen, R. (1986):** A conserved AU sequence from the untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* 46: 659-667
- Simister, N.E., & Story, C.M. (1997):** Human placental Fc receptors and the transmission of antibodies from mother to fetus. *J. Reprod. Immunol.* 37 (1): 1-23
- Sivo, J., Politis, A.D., & Vogel, S.N. (1993):** Differential effects of interferon-gamma and glucocorticoids on Fc gamma R gene expression in murine macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 54: 451-457

- Stahl, R.A.K. (1997):** Prostaglandins and Leukotrienes. In: Neilson, E.G. & Couser, W.G. *Immunologic Renal Diseases*. Philadelphia: Lippincott-Raven: 469-487
- Sterzel, R.B., & Rupperecht, H.D. (1997):** Glomerular mesangial cells In: Neilson, E.G. & Couser, W.G. *Immunologic Renal Diseases*. Philadelphia: Lippincott-Raven: 595-626
- Sterzel, R.B., Perfetto, M., Biemesderfer, D., & Kashgarian, M. (1983):** Disposal of ferritin in the glomerular mesangium of rats. *Kidney Int.* **23**: 480-488
- Sterzel, R.B., Schulze-Lohoff, E., & Marx, M. (1993):** Cytokines and mesangial cells., *Kidney Int. Suppl.*, **39**: 26-31
- Suzuki, Y., Shirato, I., Okumura, K., Ravetch, J.K., Takai, T., Tomino, Y., Ra, C. (1998):** Distinct contribution of Fc receptors and angiotensin II-dependent pathways in anti-GBM glomerulonephritis. *Kidney Int.* **54**: 1166-1174
- Sylvestre, D.L., Clynes, R., Ma, M., Warren, H., Carroll, M.C., & Ravetch, J.V. (1996):** Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. *J. Exp. Med.*, **184**: 2385-2392
- Sylvestre, D.L., Ravetch, J.V. (1994):** Fc receptors initiate the Arthus reaction: Redefining the inflammatory cascade. *Science* **265**: 1094-1098
- Takai, T., Li, M., Sylvestre, D., Clynes, R., & Ravetch, J.V. (1994):** Fc γ chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell*, **76**: 519-529
- Takai, T., Ono, M., Hikida, M., Ohmori, H., Ravetch, J.V. (1996):** Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc γ RII-deficient mice. *Nature* **379**: 346-349
- Tang, W.W., Yin, S., Wittwer, A.W., & Qi, M. (1995):** Chemokine gene expression in anti-glomerular basement membrane antibody glomerulonephritis. *Am. J. Physiol.* **269**: F323-330
- Taub, D.D., Conlon, K., Lloyd, A.R., Oppenheim, J.J., & Kelvin, D.J. (1993):** Preferential migration of activated CD4+ and CD8+ T cells in response to MIP-1 alpha and MIP-1 beta. *Science*, **260**: 355-358
- Tracy, K.J., & Cerami, A. (1994):** Tumour necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annu. Rev. Med.* **45**: 491-501
- Trinchieri, G. (1995):** Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptive immunity. *Annu. Rev. Immunol.* **13**: 251-276
- Uciechowski, P., Schwarz, M., Gessner, J.E., Schmidt, R.E., Resch, K. & Radeke, H.H. (1998):** IFN γ induces the high-affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur. J. Immunol.* **28**: 2928-2935

- Valente, A.J., Xie, J.F., Abramova, M.A., Wenzel, U.O., Abboud, H.E., & Graves, D.T. (1998):** A complex element regulates IFN-gamma-stimulated monocyte chemoattractant protein-1 gene transcription. *J. Immunol.* **161**: 3719-3728
- van de Winkel, J.G.J., & Capel, P.J.A. (1993):** Human IgG Fc receptors heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol. Today.* **14**: 215-221
- van Vugt, M.J., Heijnen, A.F., Capel, P.J., Park, S.Y., Ra, C., Saito, T., Verbeek, J.S. & van de Winkel, J.G. (1996):** FcR gamma-chain is essential for both surface expression and function of human Fc gamma RI (CD 64) *in vivo*. *Blood*, **87**: 3593-3599
- van Vugt, M.J., Reefman, E., Zeelenberg, I., Boonen, G., Leusen, J.H., & van de Winkel, J.G. (1999):** The alternatively spliced CD64 transcript FcgammaRIb2 does not specify a surface-expressed isoform. *Eur. J. Immunol.*, **29** (1): 143-149
- Veggeberg, S. (1998):** Lupus: Complement cascade, Fc receptors...or both? *Mol. Med. Today; News.* **4**; **5**: 184
- Wada, T., Yokoyama, H., Furuichi, K., Kobayashi, K.I., Harada, K., Naruto, M., Su, S.B., Akiyama, M., Mukaida, N., & Matsushima, K. (1996):** Intervention of crescentic glomerulonephritis by antibodies to monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1). *FASEB J.* **10**: 1418-1425
- Wang, P., Wu, P., Siegel, M.I., Egan, R.W., & Billah, M.M. (1995):** Interleukin (IL)-10 inhibits nuclear factor κ B (NF κ B) activation in human monocytes. IL-10 and IL-4 suppress cytokine synthesis by different mechanisms. *J. Biol. Chem.* **270**: 9558-9563
- Weinshank, R.L., Luster, A.D., & Ravetch, J.V. (1988):** Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc γ R α . *J. Exp. Med.*, **167**:1909-1925
- Wirthmueller, U., Kurosaki, T., Murakami, M.S., & Ravetch, J.V. (1992):** Signal transduction by Fc gamma RIII (CD16) is mediated through the gamma chain. *J. Exp. Med.*, **175** (5): 1381-1390
- Xu, S., Ariizumi, K., Caceres-Dittmar, G., Edelbaum, D., Hashimoto, K., Bergstresser, P.R., & Takashima, A. (1995):** Successive generation of antigen-presenting, dendritic cell lines from murine epidermis. *J. Immunol.* **154**: 2697-2705
- Zahner, G., Disser, M., Thaiss, F., Wolf, G., Schoeppe, W. & Stahl, R.A. (1994):** The effect of prostaglandin E2 on mRNA expression and secretion of collagens I, II, and IV and fibronectin in cultured rat mesangial cells. *J. Am. Soc. Nephrol.* **4**: 1778-1785

Hiermit bestätige ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität als Dissertation eingereicht.
Ferner erkläre ich, daß diese Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet wurde.

Eveline Sowa

Danksagung

Mein herzlicher und freundschaftlicher Dank gilt...

...zuerst Herrn Professor Dr. Klaus Resch für die Möglichkeit, die Arbeit in seiner Abteilung anfertigen zu können, sowie für die Übernahme des Koreferats.

...vor allem Herrn Prof. Dr. Heinfried H. Radeke für seine intensive Betreuung, die ständige Diskussionsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung.

...ganz besonders Herrn Prof. Dr. Walter H. Müller für seine Diskussionsbereitschaft und die freundliche Übernahme des Referats.

...allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Radeke, ganz besonders Juliane von der Ohe, sowie Petra Marchand, Dorothea Bouillon-Ludwig, Claudia Höltje, Michael Wahl, Mario Schwarz und Anas Pischitzis für das nette Laborklima und die freundschaftliche Atmosphäre.

...allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Pharmakologie für die gute Zusammenarbeit.

...meinem Freund Torsten und allen, die mich während der letzten Jahre unterstützt und freundschaftlich begleitet haben.

...schließlich und vor allem auch meinen Eltern, die mich während meiner ganzen Ausbildung immer nach allen Kräften unterstützt haben

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Eveline Sowa
Geburtsdatum: 16.12.1969
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Eltern: Karl-Heinz Sowa, geb. am 06.10.1942
Edeltraud Sowa, geborene Schimeczek, geb. am 28.1.1944

Schulische und universitäre Ausbildung

1976-1989 Schulbesuch in Garbsen, Berenbostel
Abschluß: Abitur

10/1989-10/1990 Studium Lehramt an Realschulen an der Universität
Hannover, Fächerkombination Biologie, Deutsch, Chemie

10/1990-05/1996 Biologiestudium an der Universität Hannover;
Abschluß: Diplom

Seit 08/1997 Promotionsstudium an der Medizinischen Hochschule
Hannover, am Inst. f. Pharmakologie;
mit Unterstützung der Graduiertenförderung der
Medizinischen Hochschule Hannover

Wissenschaftliche Laufbahn

09/1995-05/1996 Diplomandin an der Medizinischen Hochschule Hannover;
am Inst. für Biochemie; Thema der Diplomarbeit: „Induktion
der 5'-Nukleotidase durch Retinsäure bei Säugetierzellen in
Kultur.“

02/1996-03/1996 Wissenschaftliche Hilfskraft im Institut für Biochemie der
Medizinischen Hochschule Hannover

Seit 08/1997 Promotionsstudium an der Medizinischen Hochschule
Hannover, am Inst. f. Pharmakologie; Thema der
Dissertation: „Untersuchung der Expression verschiedener
Fc γ -Rezeptoren in glomerulären Mesangiumzellen der Maus,
sowie deren Funktion *in vitro* mit Hilfe von Fc γ RIII-
Defektmutanten.“

Publikationsliste

Sowa, E., Gessner, J.E., Schwarz, M., Wahl, M., Janssen-Graalfs, I., Verbeek, J.S., Schmidt, R.E., Resch, K., & 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., Sowa, E., Verbeek, J.S., Radeke, H.H., Schmidt, R.E., & 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., Verbeek, J.S., Schmidt, R.E., Resch, K., & 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-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 358 (Suppl.):120

Janssen-Graalfs, I., Sowa, E., Radeke, H.H., & 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