

**Charakterisierung der in vivo Funktion niedrigaffiner
Fc-Rezeptorgene in KO-Mausmodellen**

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

genehmigte Dissertation
von
Dipl. Biol. Carsten Schiller
geboren am 17. Juni 1966
in Hanau am Main

1999

Referent: Prof. Dr. R. E. Schmidt
Abt. Klin. Immunologie
Med. Hochschule Hannover

Koreferent: PD Dr. W. Müller
Abt. Physiol. Chemie
Med. Hochschule Hannover

Tag der Promotion: 22. Juli 1999

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 1995 bis Mai 1999 in der Arbeitsgruppe von Dr. J. E. Gessner, Abteilung Klinische Immunologie der Medizinischen Hochschule Hannover (Leiter: Prof. Dr. R. E. Schmidt) mit Unterstützung der DFG, Projekt Ge 892-2.1/2 durchgeführt.

Zusammenfassung

Die Rezeptoren für den Fc-Teil von IgG werden auf nahezu allen Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und sind an vielen pathologischen Prozessen beteiligt. Die Entwicklung verschiedener Mausstämme mit genetisch erzeugten Fc γ -Rezeptordefekten hat sehr zum Verständnis dieser Rezeptoren beigetragen. So hat sich herausgestellt, daß der hochaffine Fc γ RI und der niedrigaffine Fc γ RIII an aktivatorischen Effektorfunktionen beteiligt sind. Der niedrigaffine Fc γ RII hingegen weist durch eine inhibitorische zytoplasmatische Domäne eher regulatorische Funktionen auf. Bis auf den allgemein eingesetzten Antikörper 2.4G2 wurden bisher keine monoklonalen Antikörper beschrieben, die selektiv an den Fc γ RII oder den Fc γ RIII binden.

In dieser Arbeit wurden Antikörper für das murine Ly-17.1/2 Alloantigensystem als ausschließlich spezifisch für den Fc γ RII charakterisiert. In Durchflußzytometrischen Analysen mit typischen Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zellen wurde gezeigt, daß das Expressionsmuster von Ly-17 dem des Fc γ RII und nicht des Fc γ RIII entspricht. Weiterhin kompetitierten die anti-Ly-17 Antikörper nicht nur mit der Bindungsstelle des 2.4G2, sondern blockierten auch die Ligandenbindung an den Fc γ RII. Durch die in-vitro Blockade des Fc γ RII konnte eine spezifische Bindung IgG1 opsonierter Immunkomplexe an den Rezeptor gezeigt werden. Diese Bindung führte zur Inhibition der Fc γ RIII vermittelten Phagozytose der Komplexe, die nach der Blockade des Fc γ RII stark heraufreguliert wurde. Die in-vivo Blockade des Fc γ RII führte zu einer Verstärkung der passiven kutanen Arthus Reaktion, hatte aber interessanterweise keinen Effekt auf die IgG1 vermittelte autoimmune hämolytische Anämie, die klar auf den Fc γ RIII restringiert ist. Um die Rolle verschiedener Fc γ -Rezeptoren in der IgG2a vermittelten AIHA zu untersuchen, wurde ein Fc γ RI und Fc γ RIII doppelt defizienter Mausstamm erzeugt, indem der NOD Defekt des Fc γ RI in Fc γ RIII defiziente Mäuse eingekreuzt wurde. Ein protektiver Effekt beider einzelner Rezeptordefekte konnte beobachtet werden, mit Vorteilen für den Fc γ RI. Nur der kombinierte Defekt schützte die Tiere komplett, mit einem kleinen verbleibenden Abfall des Hämatokrits, der durch die Depletion des Komplementsystems vollständig inhibiert wird. Somit konnten im Rahmen dieser Arbeit einerseits erstmalig murine Fc γ RII spezifische Antikörper charakterisiert und außerdem die Rolle des immunmodulatorischen Fc γ RII in verschiedenen Krankheitsmodellen untersucht werden.

Summary

Receptors for the Fc part of IgG are widely expressed on cells of the hematopoietic system and are involved in many pathological processes such as inflammatory responses or autoimmune diseases. In the murine system the development of different Fc γ -receptor deficient mouse strains opened the opportunities for intensive investigation of the distinct roles of these receptors. It has become clear that the high affinity Fc γ RI and the low affinity Fc γ RIII both mediate activatory effector functions. On the other hand the low affinity Fc γ RII displays a more regulatory function, bearing a cytoplasmatic inhibitory motif. With the exception of the commonly used Fc γ RII and Fc γ RIII blocking antibody 2.4G2 there are no monoclonal antibodies described to bind either Fc γ RII or Fc γ RIII.

In this study antibodies to the mouse Ly-17.1/2 alloantigen system were characterized to be exclusively specific for Fc γ RII. By flow-cytometric analysis of typical Fc γ -receptor expressing cells it could be shown that the expression pattern of Ly-17 is in accordance with Fc γ RII and not Fc γ RIII. Furthermore the Ly-17 antibodies not only compete with the binding site of 2.4G2 but even block ligand binding of Fc γ RII. By blocking the receptor in-vitro it was shown that there is a specific binding of IgG1 opsonized immunocomplexes to Fc γ RII. This binding leads to an inhibition of Fc γ RIII mediated phagocytosis, which is upregulated after blocking of Fc γ RII. Furthermore the in-vivo blocking of Fc γ RII led to the upregulation of passive cutaneous Arthus reaction, but interestingly had no effect on IgG1 mediated autoimmune hemolytic anemia (AIHA) which is clearly restricted to Fc γ RIII. To study the role of different Fc γ -receptors in IgG2a mediated AIHA a Fc γ RI and Fc γ RIII double defective mouse strain was created by crossing the NOD defect of the Fc γ RI into Fc γ RIII deficient mice. A protective effect of each single receptor defect was observed towards the lethal form of the disease with an advantage for Fc γ RI. Only the combined defect protects the animals completely with a remaining drop in hematocrit which can be completely inhibited by complement depletion. Thus in this study on the one hand specific antibodies for the murine Fc γ RII could be characterized for the first time and furthermore the role of the immune regulatory Fc γ RII could be investigated in different disease models.

Fc γ receptor, erythrophagocytosis, autoimmune hemolytic anemia

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG	1
1.1 Fc Rezeptoren	1
1.2 Fcγ Rezeptoren	3
1.2.1 Der Fc γ -Rezeptor I	4
1.2.2 Der Fc γ -Rezeptor II	7
1.2.3 Der Fc γ -Rezeptor III	12
1.3 Mausmodelle	15
1.3.1 Die FcR γ -Ketten KO Maus	16
1.3.2 Die Fc γ RIII KO Maus	17
1.3.3 Die Fc γ RII KO Maus	18
1.3.4 Die NOD Maus	19
1.4 Murine Autoimmunmodelle	21
1.4.1 Die Autoimmune Hämolytische Anämie (AIHA)	22
1.5 Zielsetzung	23
2 MATERIAL UND METHODEN	24
2.1 Materialien	24
2.1.1 Zelllinien	24
2.1.2 Chemikalien	24
2.1.3 Lösungen und Kulturmedien	26
2.1.4 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.5 Geräte	31
2.1.6 Tiere	32
2.2 Methoden	33
2.2.1 Molekularbiologische Methoden	33
2.2.2 Proteinchemische Methoden	36
2.2.3 Zellbiologische Methoden	38
2.2.4 Tierversuche	41
3 ERGEBNISSE	46
3.1 Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den mFcγRII	46
3.1.1 Kreuzblockade Experimente mit anti-Ly-17 mAk und 2.4G2 auf typischen Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zellen	46
3.1.2 FACS Analyse der Ly-17.2 Expression in der direkten Immunfluoreszenz	48
3.1.3 Untersuchung der Ly-17 Expression auf Fc γ RII defizienten Makrophagen	49
3.2 Funktionelle Untersuchungen mit FcγRII spezifischen anti-Ly-17 Antikörpern	51
3.2.1 Bindung von Immunkomplexen an Makrophagen	51
3.2.2 Rosettierung und Phagozytose IgG1 opsonierter MRBC durch Thioglykollat induzierte Makrophagen	52

3.2.3	Phagozytose von subopsonierten MRBC nach Fc γ RII Blockade durch anti-Ly-17 Antikörper	54
3.2.4	Fc γ RII Blockade durch anti-Ly-17 Antikörper in der reversen passiven cutanen Arthus Reaktion (PCA)	55
3.3	Die Bedeutung verschiedener Fcγ-Rezeptorklassen in der experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA)	56
3.3.1	Hämatokritverlauf in der IgG1 induzierten AIHA nach Fc γ RII Blockade	58
3.3.2	Immunhistologische Untersuchungen der Leber bei der IgG1 induzierten AIHA	59
3.3.3	Rückkreuzung des NOD-Fc γ RI Defektes in die Fc γ RIII knock-out Maus	60
3.3.4	In-vitro Phagozytose IgG2a opsonierter MRBC durch Thioglykollat aktivierte Makrophagen	64
3.3.5	Mortalität in der IgG2a vermittelten AIHA bei verschiedenen Fc γ -Rezeptor defekten Mausstämmen	65
3.3.6	Hämatokritverlauf in der IgG2a vermittelten AIHA bei Fc γ RI und Fc γ RIII defekten Mäusen	66
3.3.7	Bedeutung des Komplementsystems für die IgG2a vermittelte AIHA	67
3.3.8	Bedeutung des Fc γ RII in der IgG2a vermittelten AIHA	69
4	DISKUSSION	72
4.1	Charakterisierung der mFc γ RII spezifischen anti-Ly-17 Antikörper	73
4.2	Funktionelle Effekte der Fc γ RII Blockade in-vitro und in-vivo	76
4.2.1	Bindung und Phagozytose von IgG1 opsonierten Immunkomplexen	76
4.2.2	Blockade des Fc γ RII in der reversen passiven cutanen Arthus Reaktion	78
4.2.3	Blockade des Fc γ RII in der IgG1 vermittelten experimentellen AIHA	79
4.3	Die Bedeutung niedrigaffiner Fc γ -Rezeptoren in der IgG2a vermittelten AIHA	80
4.3.1	Generation eines Mausstammes mit Defekten des Fc γ RI und Fc γ RIII	81
4.3.2	Die Bedeutung von Fc γ RI, Fc γ RIII und des Komplementsystems in der IgG2a induzierten AIHA	82
4.3.3	Der Einfluß des Fc γ RII auf die IgG2a induzierte AIHA	84
4.4	Ausblick	85
5	LITERATURVERZEICHNIS	87
6	ABKÜRZUNGEN	102
7	DANKSAGUNG	104
8	LEBENS LAUF	105

1 Einleitung

1.1 FC Rezeptoren

Die Rezeptoren für den Fc-Teil der Immunglobuline (Fc-Rezeptoren) spielen zusammen mit den Rezeptoren für die Komponenten des Komplementsystems eine zentrale Rolle in der Vermittlung zwischen humoraler und zellulärer Immunantwort. Diese auf allen Zellen des Immunsystems exprimierten Glykoproteine verbinden dabei die hochspezifischen Interaktionen zwischen Antikörpern und ihren löslichen oder partikulären Antigenen mit zellulären Effektormechanismen (Hulett und Hogarth 1994, van de Winkel und Capel 1993). Für alle Klassen von Antikörpern wurden entsprechende Fc-Rezeptoren charakterisiert, deren Einteilung sich aus ihrer Spezifität für den Fc-Teil (*fragment crystallizable*), also den konstanten Teil der schweren Kette der Immunglobuline, ergibt. Am besten untersucht sind die Rezeptoren für IgG (Fc γ -Rezeptoren), IgE (Fc ϵ -Rezeptoren) und auch für IgA (Fc α -Rezeptoren), während für die Rezeptoren für IgD (Fc δ -Rezeptor) und IgM (Fc μ -Rezeptor) noch keine genomischen Sequenzen gefunden wurden (Moretta et al. 1975, Nakamura et al. 1993, Ohno et al. 1990, Pricop et al. 1993).

Die Fc-Rezeptoren gehören zur Familie der Immunglobulin-Superfamilie mit zwei bzw. drei Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Die bisher bekannten Ausnahmen sind der niedrigaffine Fc ϵ RII, der eine Lektin-ähnliche Struktur aufweist (Ikuta et al. 1987) und der neonatale FcRn-Rezeptor, der MHC Klasse I Molekülen ähnelt (Burmeister et al. 1994).

Die Effektorfunktionen der Fc-Rezeptoren sind so vielfältig wie ihre strukturelle Variabilität. Größtenteils liegen sie in der Aktivierung von Effektorzellen, die durch die Liganden-bedingte Kreuzvernetzung der Rezeptoren und die daraus resultierenden Signaltransduktionswege ausgelöst wird. Bei Fc γ -Rezeptoren führt dies unter anderem zur Auslösung der Antikörper-abhängigen zellulären Zytotoxizität (ADCC), sowie zur Aufnahme und somit zur Clearance von Antikörper/Antigen Immunkomplexen, zur Phagozytose von Antikörper opsonierten Partikeln, wie Bakterien, Viren oder

Zelltrümmern, und schließlich zur Freisetzung entzündlicher Mediatoren (Gessner et al. 1998, Hulett und Hogarth 1994, Ravetch und Kinetic 1991, van de Winkel und Anderson 1991a, van de Winkel et al. 1991b).

Rezeptoren für IgE werden hauptsächlich von Mastzellen, Eosinophilen und Basophilen Granulozyten exprimiert (Gounni et al. 1994). Sie bilden multimere Komplexe aus der ligandenbindenden α -Kette, der signaltransduzierenden γ -Kette (Ravetch und Kinetic 1991) und einer Signal-amplifizierenden β -Kette (Lin et al. 1996). Eine Aktivierung des Fc ϵ RI führt zur Freisetzung von Histamin und Serotonin sowie anderer inflammatorischer Faktoren, was den Fc ϵ RI zu einem wichtigen Mediator von allergischen Reaktionen macht (Burd et al. 1989, Parker 1987, Ravetch 1994a).

Wachsende Bedeutung haben in den letzten Jahren die immunmodulatorischen Funktionen der Oberflächenproteine gewonnen, die für die Regulation entzündlicher Prozesse sorgen und somit die Überreaktion aktivierter Zellen vermeiden. Der bislang einzige bekannte regulatorische Rezeptor unter den Fc-Rezeptoren ist der Fc γ RIIB, der durch eine inhibitorisch wirksame Domäne den aktivatorischen Signalen anderer Fc-Rezeptoren, wie dem Fc ϵ RI, Fc γ RI oder Fc γ RIII entgegenwirken kann (Daëron et al. 1995, Hulett und Hogarth 1998).

Aufgrund ihrer großen Verbreitung im Immunsystem sind Fc-Rezeptoren in zahlreiche pathogenetische Vorgänge involviert. Die krankhafte Bildung zytotoxischer Antikörper gegen autologe Antigene kann unter Mitwirkung von Fc-Rezeptoren und Komplementfaktoren durch Autoantikörper gegen Thrombozyten zur Ausbildung der immunologischen thrombozytopenischen Purpura (ITP) (Witte et al. 1993) oder durch anti-Erythrozytäre Autoantikörper zur autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA) führen (Izui 1994). In der ITP führt die Gabe von Immunglobulinen durch die unspezifische Blockade von Fc-Rezeptoren zu Erfolgen bei der Therapie der Erkrankung (Schmidt et al. 1984, Schmidt et al. 1981). Auch die verminderte Clearance zirkulierender Immunkomplexe durch Fc-Rezeptoren kann mit immunologischen Erkrankungen assoziiert sein. So wurden etwa beim systemischen Lupus Erythematodes (SLE) und beim Sjögren's Syndrom Autoantikörper gegen Fc-Rezeptoren gefunden (Boros et al. 1993, Witte et al. 1996). Auch in der

Pathogenese der rheumathoiden Arthritis (Hendrich et al. 1991) oder der Glomerulonephritis (Radeke et al. 1994) wurde die Beteiligung von Fc-Rezeptoren nachgewiesen. Ferner wurden auch in der paroxysmalen nächtlichen Hämoglobinurie (PNH) erhöhte Immunkomplexspiegel gefunden. Bei der PNH ist durch genetische Defekte die Bildung des Glycosylphosphatidylinositols (GPI) gestört, was unter anderem dazu führt, daß der GPI-verankerte und für die Clearance von Immunkomplexen wichtige Fc γ RIIB nicht exprimiert werden kann (Schubert et al. 1990).

Aufgrund des hohen Anteils von ca. 75% der gesamten Immunglobuline hat das Immunglobulin G (IgG) eine zentrale Stellung im spezifischen Immunsystem (Klein 1991). Dies äußert sich auch in der großen Verbreitung und heterogenen Funktionalität der Rezeptoren für IgG.

1.2 Fc γ Rezeptoren

Die humanen (hFc γ R) und die murinen (mFc γ R) Fc γ -Rezeptoren werden in drei Klassen eingeteilt: Fc γ RI, Fc γ RII und Fc γ RIII. In den extrazellulären Bereichen dieser Rezeptoren gibt es, auch zwischen beiden Spezies, starke Homologien, was auf einen gemeinsamen genetischen Ursprung aller Fc γ -Rezeptoren hindeutet. Im Gegensatz zum Fc γ -Rezeptor II (Fc γ RII) und Fc γ -Rezeptor III (Fc γ RIII), den beiden Fc γ -Rezeptorklassen mit niedriger Ligandenaffinität, die über zwei extrazelluläre Immunglobulinähnliche Domänen verfügen, weist der hochaffine Fc γ -Rezeptor I (Fc γ RI) drei dieser Domänen auf. Die größten genetischen Variationen zwischen den Fc γ -Rezeptoren liegen allerdings in den kodierenden Sequenzen für die zytoplasmatischen Bereiche und in den Promoterregionen. Diese Unterschiede führen zu der großen funktionellen Heterogenität der Fc γ -Rezeptoren, sowohl in ihrer gewebespezifischen Expression, als auch in den Signaltransduktionskaskaden, die nach Kreuzvernetzung der Rezeptoren ausgelöst werden (van de Winkel und Capel 1993).

Die Gene für die verschiedenen humanen Fc γ -Rezeptorklassen sind auf dem Chromosom 1 lokalisiert. Es handelt sich um Bereiche mit drei Genen für den Fc γ RI (Fc γ RIA, B und C), drei Genen für den Fc γ RII (Fc γ RIIA, B und C) und

zwei Genen für den Fc γ RIII (Fc γ RIIIA und B) (Ravetch 1994b). Die murinen Fc γ -Rezeptoren werden jeweils durch ein einzelnes Gen codiert. Die Gene für die niedrigaffinen mFc γ RII und mFc γ RIII befinden sich auf Chromosom 1, während das Gen für den mFc γ RI auf Chromosom 3 lokalisiert ist (siehe auch Tabelle 1.1) (Oakey et al. 1992, Qiu et al. 1990).

	mFc γ RI	mFc γ RII	mFc γ RIII
Molekül	70 kDa	40-60 kDa	40-60 kDa
Gene	mFc γ RIA	mFc γ RIIB	mFc γ RIIIA
Allele	–	Ly-17.1, Ly-17.2	–
Isoformen	mFc γ RIa	mFc γ RIIb1, b1', b2, b3	mFc γ RIIIa
Untereinheiten	FcR γ -Kette	–	FcR γ -Kette, FcR β -Kette FcR ζ -Kette
Affinität zu mIgG (K _a)	10 ⁸ M ⁻¹	<10 ⁷ M ⁻¹	<10 ⁷ M ⁻¹
Spezifität für mIgG	2a, 2b>3>>>1	1=2a=2b>>>3	1=2a=2b>>>3

Tabelle 1.1: Eigenschaften muriner Fc γ -Rezeptoren.

Weitere Unterschiede innerhalb der einzelnen Klassen resultieren aus Polymorphismen, die sich teilweise in der Ligandenaffinität auswirken (z.B. Fc γ RIIA^{HR/LR}) und aus alternativen Spleißprodukten, die funktionelle Varianten erzeugen (z.B. Fc γ RIIb1/b2). Die drei Klassen der Fc γ -Rezeptoren werden im folgenden kurz vorgestellt.

1.2.1 Der Fc γ -Rezeptor I

Der hochaffine Fc γ RI ist der einzige Fc γ -Rezeptor, der in der Lage ist, monomeres IgG zu binden, was aus der Insertion einer dritten immunglobulinähnlichen Domäne (EC3) resultiert, die Fc γ RII und Fc γ RIII nicht aufweisen (Allen und Seed 1989). Die beiden Membran-distalen extrazellulären Domänen weisen starke Homologien mit den anderen beiden Fc γ -Rezeptorklassen auf, während die Membran-proximale Domäne wahrscheinlich

die erhöhte Affinität und auch die veränderte Ligandenspezifität verursacht (Hulett und Hogarth 1998, Hulett et al. 1991, Hulett et al. 1994).

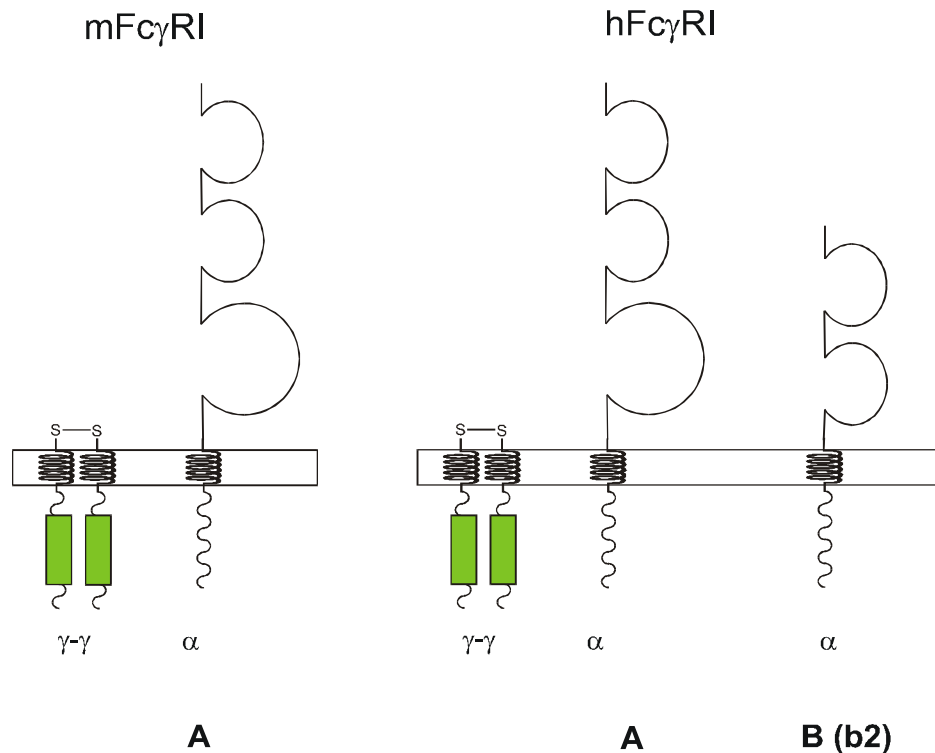


Abb. 1.1: Isoformen muriner und humaner Fc γ RI.

Die ITAM Domänen der assoziierten signaltransduzierenden FcR γ -Ketten sind grün dargestellt.

Der humane Fc γ RI (hFc γ RI, CD64) wird von drei Genen codiert, von denen allerdings nur der hFc γ RIA Locus zur Expression des vollständigen Glykoproteins von 72 kDa führt. Die Loci hFc γ RIB und hFc γ RIC weisen ein Translations Stop-Codon in der dritten extrazellulären Domäne (EC3), vor den transmembranen und cytoplasmatischen Domänen auf (Ernst et al. 1992), so daß sie lediglich für lösliche Proteine codieren könnten, deren Existenz aber noch nicht nachgewiesen werden konnte (Hulett und Hogarth 1994). Eine Spleiß-Variante des hFc γ RIB (hFc γ RIB2), der die mRNA Sequenzen für die EC3 fehlen, führt in-vitro zur Expression einer niedrigaffinen Rezeptorisoform, der allerdings noch keine in-vivo Funktion zugeordnet werden konnte (Ernst et al. 1992). Die murine Form des Fc γ RI wird hingegen nur von einem Gen codiert und bildet ein Glykoprotein von 70kDa (Quilliam et al. 1993).

Der hFc γ RI bindet vor allem humanes IgG3 und IgG1 mit hoher Spezifität ($K_a=10^8-10^9M^{-1}$), während IgG4 und vor allem IgG2 wesentlich schwächer gebunden werden. Eine Besonderheit stellt die Affinität zu murinen IgG Isotypen dar, weil im Gegensatz zu den anderen Fc γ -Rezeptor Klassen das mIgG2b nicht durch den hFc γ RI gebunden wird. Die Ligandenspezifität des mFc γ RI liegt eindeutig auf der Seite des mIgG2a ($K_a = 10^8 M^{-1}$), eine Reaktivität gegen mIgG1 weist der mFc γ RI nicht auf. Die Bindung und Phagozytose von IgG2b ist noch umstritten, und kürzlich wurde der mFc γ RI auch als Rezeptor für mIgG3 beschrieben (Gavin et al. 1998a).

Auf Monozyten und Makrophagen wird der hFc γ RI konstitutiv exprimiert, während er auf Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten, sowie auf den Mesangialzellen der Nierenglomeruli erst durch Interferon- γ (IFN- γ) induziert wird (Sivo et al. 1993, Uciechowski et al. 1998). Auch andere Zytokine sind in der Lage, die Expression des Fc γ RI zu beeinflussen, was wahrscheinlich eine wichtige Bedeutung in der lokalen Regulation von Effektorzellen bei entzündlichen Vorgängen hat. So sind beispielsweise Interleukin 10 und der Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) positiv regulierend für den Fc γ RI (Kerst et al. 1993, te Velde et al. 1992), während Interleukin 4 eine negative Regulation bewirkt (te Velde et al. 1990).

Obwohl die ligandenbindende α -Kette des Fc γ RI allein in der Lage ist zur Antigenpräsentation von Immunkomplexen zu führen (Capel 1999, interne Mitteilung), ist sie funktionell sehr stark mit der signaltransduzierenden FcR γ -Kette assoziiert, mit der sich ein multimerer Rezeptorkomplex bildet ($\alpha\gamma_2$, siehe Abb. 1.1). Die FcR γ -Kette ist ein Homodimer, das zuerst im Zusammenhang mit dem hochaffinen Rezeptor für IgE, dem Fc ϵ RI, beschrieben wurde (Paolini et al. 1991, Paolini und Kinet 1993, Paolini et al. 1995). Sie ist aber auch mit dem Rezeptor für IgA, dem Fc α RI (Morton et al. 1996), sowie mit den Fc γ RI und Fc γ RIII assoziiert (Ernst et al. 1993, Ra et al. 1989). Die FcR γ -Kette enthält ein ITAM Motiv (Immunoreceptor tyrosine based activatory motive), eine konservierte und aktivierende Proteinsequenz, die auch in Seitenketten des BCR (B-Zell Rezeptor) und TCR (T-Zell Rezeptor) enthalten ist (Cambier 1995a, Daëron et al. 1995). Zusammen mit der α -Kette des Fc γ RI führt die FcR

γ -Kette zur Vermittlung von Phagozytose und der Freisetzung entzündlicher Mediatoren, indem sie Tyrosin Kinasen rekrutiert (Pfefferkorn und Swink 1996). Durch die Kreuzvernetzung der ITAM-Motive werden Phosphotyrosinkinase der src-Familie aktiviert (Cambier und Johnson 1995), die ihrerseits zur Freisetzung intrazellulärer Ca^{2+} und zur Aktivierung des Ras-Signalweges führen (Agarwal et al. 1993, Benhamou et al. 1993). Zusätzlich ist die FcR γ -Kette aber scheinbar auch wichtig für die Expressionsdichte und die Affinität des Rezeptors (Miller et al. 1996).

Da gegen den mFc γ RI bislang noch keine monoklonalen Antikörper hergestellt werden konnten, ist er bislang der am wenigsten untersuchte murine Fc γ -Rezeptor. Weitere Erkenntnisse über den mFc γ RI erbrachten jedoch eine genetisch veränderte FcR γ -Ketten knock-out Maus, der die intakten Formen des Fc γ RI, Fc γ RIII als auch des Fc ϵ RI fehlen, sowie der NOD Mausstamm, der multiple Mutationen in der für den Fc γ RI kodierenden Region aufweist (siehe unten).

1.2.2 Der Fc γ -Rezeptor II

Der Fc γ RII stellt in struktureller als auch in funktioneller Hinsicht eine Ausnahme unter den Fc γ -Rezeptoren dar. Er ist ein monomere Rezeptor, der über signaltransduzierende Sequenzen in seiner cytoplasmatischen Domäne verfügt und deshalb nicht auf assoziierte Seitenketten angewiesen ist. Er gehört, zusammen mit dem Fc γ RIII, zu den niedrigaffinen Fc γ -Rezeptoren, die mit ihren zwei Ig-ähnlichen extrazellulären Domänen IgG nur in Form von Immunkomplexen mit einer Affinität (K_a) von unter $10^7 M^{-1}$ binden können. Der Fc γ RII ist der am weitesten verbreitete Fc γ -Rezeptor. Er ist auf Neutrophilen, Basophilen und Eosinophilen Granulozyten, auf Monozyten, Makrophagen, Thrombozyten, Langerhans Zellen, Dendritischen Zellen sowie auf B-Zellen und einigen Subpopulationen von T-Zellen zu finden (Fanger et al. 1996, Hulett und Hogarth 1994, Thomas und Lipsky 1994, Unkeless et al. 1988).

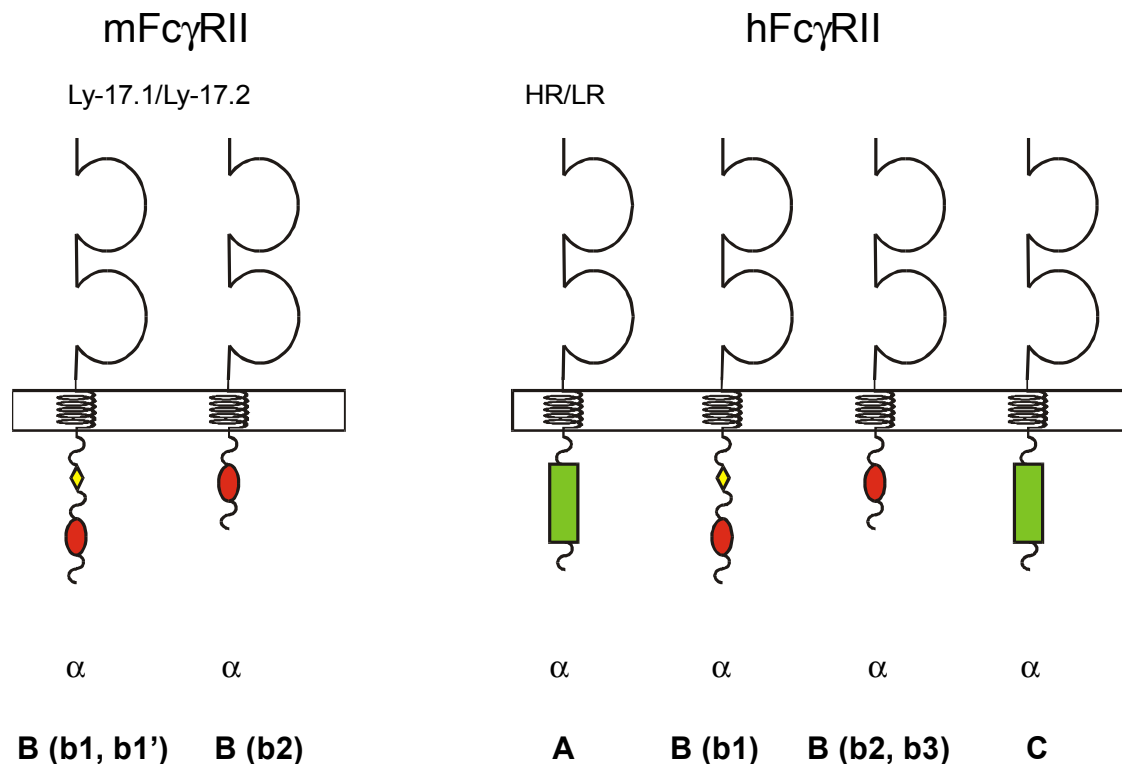


Abb. 1.2: Isoformen muriner und humaner Fc γ RII.

Die intrazellulären ITAM und ITIM Domänen sind grün bzw. rot dargestellt. Die inserierte C1-Domäne des B-Zell spezifischen Fc γ RIIb1 ist gelb dargestellt.

Der humane Fc γ RII, der von drei Genen kodiert wird (Fc γ RIIA, B, C), bildet durch alternatives Spleißen sechs Transkripte (a1, a2, b1-3, c), die zur Expression von Glykoproteinen von ca. 40 kDa führen (Brooks et al. 1989). Für den hFc γ RIIc konnte noch kein translatiertes Protein gezeigt werden (Warmerdam et al. 1993), während der hFc γ RIIa2 als lösliche Isoform sezerniert wird (Rappaport et al. 1993). Die Ligandenspezifität liegt auf der Seite des hIgG1 und hIgG3, während hIgG4 nicht gebunden wird, wohl aber mIgG2a und mIgG2b. Eine Besonderheit stellt ein Polymorphismus des hFc γ RIIa dar, der durch einen Arginin/Histidin Austausch an der Position 131 verursacht wird. Der sogenannte high responder (HR, Arg¹³¹) Allotyp bindet zusätzlich noch hIgG2, während der low responder (LR, His¹³¹) Allotyp mIgG1 binden kann (Clark et al. 1989). Dieser Polymorphismus wird auch mit veränderten Empfindlichkeiten für bakterielle Infektionen und mit bestimmten Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht (Salmon et al. 1996, Sanders et al. 1994). Die für die IgG-Bindung wichtigen Epitope auf dem hFc γ RII wurden sehr genau untersucht. Sie befinden sich auf den Loops zwischen

verschiedenen β -Faltblättern der Membran-proximalen zweiten extrazellulären Domäne (Hulett et al. 1995).

Der nur von einem Gen kodierte mFc γ RII wird in Form von vier alternativen Transkripten exprimiert (b1, b1', b2, b3) und bildet ein 40 bis 60 kDa großes Glykoprotein. Strukturell ist er dem hFc γ RIIb am ähnlichsten, während es für den hFc γ RIIa keine murinen Homologe gibt (siehe Abb 1.2). Dem mFc γ RIIb3 fehlen die transmembrane und die erste zytoplasmatische Domäne (C1), wodurch diese Isoform als lösliches Protein von Makrophagen sezerniert wird (Tartour et al. 1993). Die mFc γ RIIb1 Isoform, die vorwiegend von B-Zellen, aber auch von Mastzellen und Makrophagen exprimiert wird, enthält die Insertion eines 47 Aminosäuren langen Abschnittes aus dem C1 Exon, die zur Unterbrechung eines Internalisationssignals in der zytoplasmatischen Domäne führt. Eine weitere Isoform wurde als murines Homolog zum humanen Fc γ RIIb1 beschrieben, bei der diese Insertion auf 19 Aminosäuren verkürzt ist, was die gleichen funktionellen Konsequenzen hat und die in Anlehnung an den mFc γ RIIb1 mFc γ RIIb1' benannt wurde (Latour et al. 1996). Diese Rezeptorisoformen werden nicht internalisiert und bilden stattdessen sogenannte capping Strukturen auf der Membran, wenn sie durch Immunkomplexe kreuzvernetzt werden, wodurch sie mit anderen Membranproteinen wie dem BCR kolokalisiert bleiben (Amigorena et al. 1992, Miettinen et al. 1989). Der murinen Fc γ RIIb2 Isoform, wie auch dem humanen Fc γ RIIb2, fehlen diese C1 Sequenzen. Sie werden vorwiegend von myeloiden Zellen exprimiert und sind in der Lage, Immunkomplexe zu endozytieren. Darin enthaltene Antigene können in MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche präsentiert werden (Amigorena et al. 1998).

Bis auf den humanen Fc γ RIIa1, der ein ITAM (Immunoreceptor tyrosine based activatory motif) in seiner zytoplasmatischen Domäne aufweist, haben die Fc γ -Rezeptoren vom Typ II regulative Aufgaben. Der hFc γ RIIa1, der auf Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert wird, kann diese Zellen aktivieren und ADCC sowie Phagozytose auslösen (Indik et al. 1995). Das aktivierende ITAM ist ein konserviertes Motiv, das unter anderem auch in der FcR γ -Kette und den B-Zell sowie T-Zell Rezeptor Komplexen vorkommt. Es handelt sich um eine Anordnung von zwei YXXL-Motiven (im ein-

Buchstaben Code für Aminosäuren steht Y für Tyrosin, L für Leucin und X für eine beliebige Aminosäure), die durch sieben bis zwölf Aminosäuren voneinander getrennt sind (Cambier 1995b).

Das inhibitorische Signal der Rezeptoren der Fc γ RIIb Isoform wird maßgeblich durch ein ITIM (Immunoreceptor tyrosine based inhibitory motif) in der zytoplasmatischen Domäne verursacht. Es handelt sich um eine konservierte Aminosäuresequenz (I(Isoleucin)/LXYXXL), die auch in anderen inhibitorischen Rezeptoren, wie verschiedenen KIRs (killer cell inhibitory receptor) oder CD22 eine immunmodulierende Rolle spielt (Burshtyn et al. 1996, O'Keefe et al. 1996). Die Tyrosinreste im ITIM des Fc γ RIIb werden nach der Kreuzvernetzung mit aktivatorischen Rezeptoren (wie dem hFc γ RIIa, dem Fc ϵ RI, dem Fc γ RIII oder dem BCR) durch die Phosphotyrosinkinase aktiviert, die auch deren ITAM-Tyrosinreste phosphorylieren und somit aktivieren (Binstadt et al. 1996, Muta et al. 1994). Seine inhibitorische Wirkung erlangt es durch die nachfolgende Rekrutierung von SH2-Domänen enthaltenden Phosphatasen. Das ITIM des Fc γ RIIb kann zwar in-vitro auch mit den Tyrosin Phosphatasen SHP-1 und SHP-2 assoziieren (D'Ambrosio et al. 1995), scheint aber in B-Zellen und Mastzellen hauptsächlich mit SHIP (SH2-containing inositol phosphatase) zu interagieren (Chacko et al. 1996, Ono et al. 1996). Die Aktivierung von SHIP führt dann unter anderem zur Hemmung der Phosphoinositolkinase, die die Freisetzung von Phosphoinositol-3-Phosphat (PIP₃) an der inneren Zellmembran katalysiert, und durch den ITAM Signaltransduktionsweg stimuliert wird. Durch die Inhibition der Bildung von PIP₃ wird die Rekrutierung der Brutons Tyrosin Kinase (Btk) an die Zellmembran blockiert, die den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ durch spezialisierte Ca²⁺-Kanäle aktiviert (Bolland et al. 1998, Kawakami et al. 1999). Somit inhibiert SHIP den Einstrom von extrazellulärem Ca²⁺ in die Zelle, was in Mastzellen beispielsweise zur Regulation der Serotoninfreisetzung führt (Daëron et al. 1995). Weiterhin soll auch ein proapoptotischer Faktor durch die SHIP/Fc γ RIIb Interaktion reguliert werden, was eine wichtige Rolle in der Generierung von Memory B-Zellen spielen könnte (Ono et al. 1997).

Auch der murine Fc γ RII weist Polymorphismen in seiner zweiten extrazellulären Domäne (EC2) auf. Basierend auf der alten Nomenklatur für

murine Antigene (entsprechend des humanen CD (cluster of differentiation) Systems wird der Locus für niedrig affine Fc γ -Rezeptoren, Ly-17, deshalb in Ly-17.1 und Ly-17.2 unterteilt. In den vorhandenen Inzuchtmausstämmen werden die beiden Allele homozygot exprimiert. Man kann Mausstämme also in Ly-17.1⁺ (z.B. CBA, C3H, NZB, oder 129) oder Ly-17.2⁺ (z.B. AKR, Balb/c oder C57Bl/6) unterteilen (Davidson et al. 1983). Die Allele des Fc γ RII können auf Proteinebene durch spezifische monoklonale Antikörper (mAk) unterschieden werden (Hämmerling interne Mitteilung, Kimura et al. 1981, Shen und Boyse 1980), zum Zeitpunkt der Erstbeschreibung des Polymorphismus war allerdings noch nicht bekannt, daß sich die niedrig affinen Fc γ -Rezeptoren in zwei Klassen (Fc γ RII und Fc γ RIII) unterteilen.

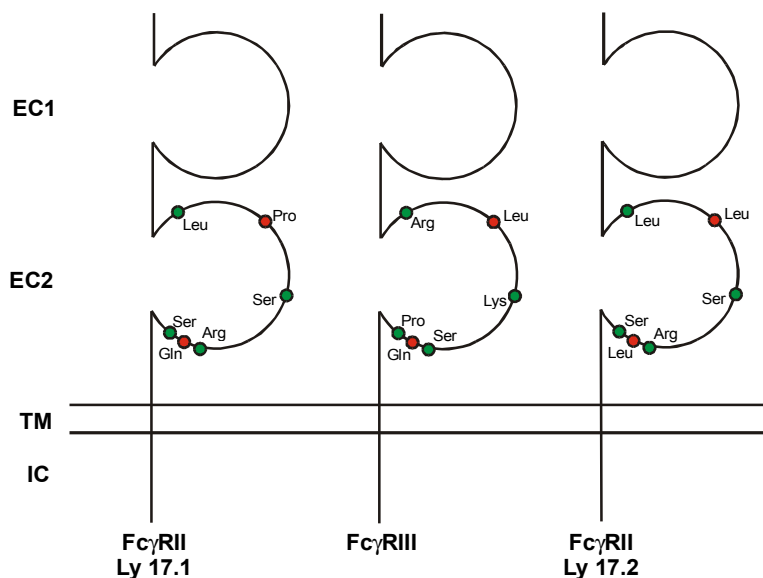


Abb. 1.3: Polymorphismen muriner niedrig affiner Fc γ -Rezeptoren.

Dargestellt sind die unterschiedlichen Aminosäuren der polymorphen Formen des Fc γ RII (rot) und des Fc γ RIII (grün) in der zweiten extrazellulären Domäne.

Die molekulare Grundlage für die abweichenden Allele basiert auf zwei unterschiedlichen Aminosäuren in der zweiten extrazellulären Domäne (Abb. 1.3). Während der Fc γ RII/Ly-17.1 an den Aminosäurepositionen 116 ein Prolin und an Position 161 ein Glutamin aufweist, finden sich hier im Ly-17.2 Allotyp ein Leu¹¹⁶ und Leu¹⁶¹ (Hibbs et al. 1985, Hogarth et al. 1987, Lah et al. 1990). Die EC2 des Fc γ RIII, für den keine murinen Polymorphismen bekannt sind, nimmt an diesen Positionen mit Leu¹¹⁶/Glu¹⁶¹ eine Zwischenstellung ein. Auf

der Innenseite der Darstellung in Abb. 1.3 sind die vier nicht polymorphen Aminosäuren dargestellt, in denen sich die EC2 des Fc γ RII von der EC2 des Fc γ RIII unterscheidet.

Da der Ly-17 Polymorphismus sich in der EC2 befindet, sind die Bindungsstellen der allelspezifischen Antikörper in der Nähe der ligandenbindenden Region des Fc γ RII lokalisiert. Blockadestudien haben ergeben, daß die Bindung von dimerisiertem IgG an B-Zellen durch eine Vorinkubation mit anti-Ly-17 Antikörpern inhibiert werden kann. Außerdem findet eine Konkurrenz mit dem monoklonalen Antikörper 2.4G2 statt (Holmes et al. 1985). Der mAk 2.4G2 ist bislang der einzige allgemein benutzte Antikörper gegen murine niedrig affine Fc γ -Rezeptoren. Er blockiert ebenfalls die Ligandenbindungsstelle, allerdings bindet er gleichermaßen an Fc γ RII und Fc γ RIII (Unkeless 1979).

1.2.3 Der Fc γ -Rezeptor III

Der Fc γ RIII ist ein stark glykosyliertes Protein mit einem Gewicht von 50 bis 80 kDa (murin 40 bis 60 kDa). Er ist wie der Fc γ RII ein niedrig affiner Rezeptor für komplexiertes IgG und ist, wie der Fc γ RI, funktionell von signaltransduzierenden Seitenketten abhängig. Der hFc γ RIII hat eine hohe Spezifität für hIgG1 und hIgG3 (Simmons und Seed 1988) und die Bindungsstellen für den Liganden wurden sehr genau untersucht. Sie befinden sich wie beim Fc γ RII in der Membran-proximalen EC2 auf zwei Loops und dem F β -Faltblatt, wo sie eine diskontinuierliche Bindungsstelle bilden (Tamm et al. 1996, Tamm und Schmidt 1997).

Der hFc γ RIII wird von zwei Genen kodiert (Fc γ RIIIA und B), die hohe Homologien aufweisen. Einzelne Nukleotidunterschiede in den kodierenden Sequenzen führen allerdings zu großen phänotypischen Konsequenzen. Einerseits weichen die Gene in ihrem Glykosylierungsmuster voneinander ab (Ravetch und Perussia 1989), andererseits entsteht durch den Austausch von Phenylalanin an der Position 185 im Fc γ RIIIA durch Serin im Fc γ RIIIB ein Signal für die posttranskriptionelle Verknüpfung mit einem GPI(Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol)-Anker (Kurosaki und Ravetch 1989). Für die Signaltransduktionswege

dieses Rezeptors, der über keine intrazellulären Domänen verfügt, wird eine extrazelluläre Interaktion mit dem Komplementrezeptor 3 oder dem FcγRIIa vermutet (Boros et al. 1991, Stöckl et al. 1995). Der FcγRIIIa bildet, wie der FcγRI, einen multimeren Rezeptorkomplex aus, der aus der ligandenbindenden α-Kette besteht, die zur Expression auf der Zellmembran und zur Signaltransduktion mit einer dimeren Seitenkette assoziieren muß. Hierzu kann wiederum die FcR γ-Kette dienen, aber auch Homodimere der ζ-Kette aus dem TCR/CD3 Komplex oder Heterodimere aus γζ-Ketten können mit dem FcγRIII interagieren (siehe Abb 1.4) (Lanier et al. 1999, Ra et al. 1989).

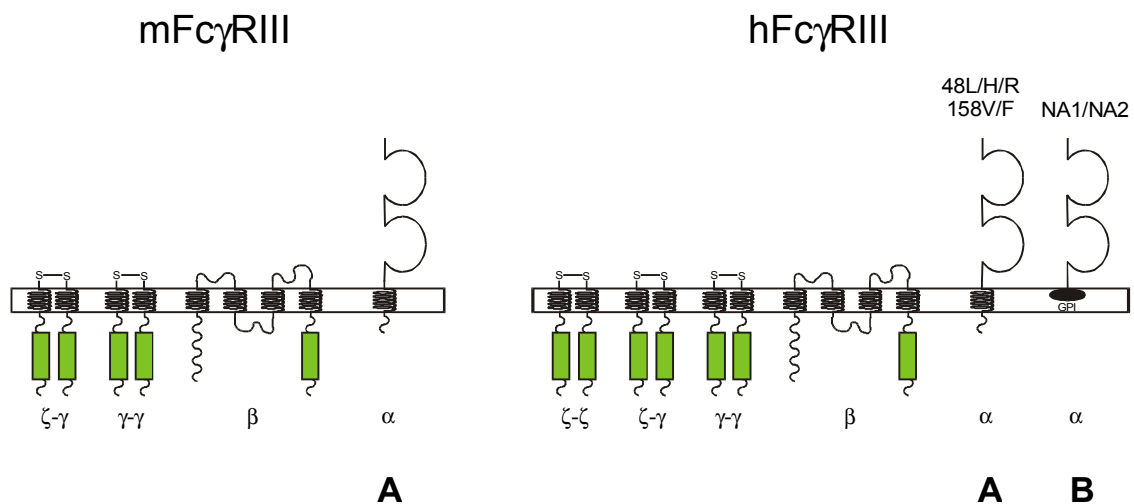


Abb. 1.4: Isoformen muriner und humaner FcγRIII.

Die ITAM Domänen der signaltransduzierenden Untereinheiten sind grün dargestellt.

Die Expression beider Rezeptorvarianten steht unter strikter genetischer Kontrolle. Während der hFcγRIIIa auf Makrophagen, NK-Zellen und γδ T-Zellen konstitutiv exprimiert wird und auf den Mesangialzellen der Niere durch Interferon-γ (IFN-γ) induziert werden kann, wird der hFcγRIIIb auf Neutrophilen und nach IFN-γ Induktion auch auf Eosinophilen Granulozyten exprimiert (Braakman et al. 1992, Hartnell et al. 1992, Radeke et al. 1994, Uciechowski et al. 1992). Die Bereiche in der 5'-Region der kodierenden Sequenzen wurden intensiv untersucht (Gessner et al. 1996, Li et al. 1996) und verschiedene Promotoren, Enhancer und Suppressorstrukturen wurden als verantwortlich für die Kontrolle der Zelltypspezifität in diesem Bereich identifiziert (Gessner et al. 1995).

Der hFcγRIII weist einige allele Varianten auf, wie den NA1/NA2 Polymorphismus des FcγRIIIb auf Neutrophilen Granulozyten. Durch Unterschiede in vier Aminosäuren der Membran-distalen EC1 kommt es zu einem veränderten Glykosylierungsmuster und damit assoziiert zur Verminderung der Phagozytoseleistung durch den NA2 Allotyp (Salmon et al. 1990). Im FcγRIIIa auf NK-Zellen und Monozyten wurden zwei Polymorphismen beschrieben. An der Aminosäureposition 48 gibt es drei Allele, die durch Leucin (L), Arginin (R) oder Histidin (H) besetzt sind, während an der Position 158 für Phenylalanin (F) oder Valin (V) kodiert wird. Der homozygote 158VV Genotyp ist mit einer erhöhten Bindung von IgG1 und IgG3 assoziiert (de Haas et al. 1996, Koene et al. 1997) und wurde bei zwei Kindern, die an einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen leiden, gefunden (48HH-158VV) (de Vries et al. 1996). Der niedrig affine 158FF Genotyp wurde mit erhöhter Frequenz bei Patienten mit einem SLE (systemischer Lupus Erythematodes) gefunden und scheint dort auch mit der Entwicklung der Lupusnephritis assoziiert zu sein (Wu et al. 1997).

Wenn der FcγRIII durch Immunkomplexe kreuzvernetzt wird, löst er zahlreiche Effektormechanismen aus. Auf NK-Zellen, auf denen er den einzigen Fcγ-Rezeptor repräsentiert, führt seine Aktivierung beispielsweise zur ADCC (Antikörperabhängige zelluläre Zytotoxizität) (Werfel et al. 1989). Neutrophile Granulozyten werden durch die Kreuzvernetzung des FcγRIIIb aktiviert (Hundt und Schmidt 1992) und durch die folgende Calciummobilisierung wird unter anderem der sogenannte respiratory burst ausgelöst, also die Freisetzung von Sauerstoff-Radikalen (Zhou et al. 1995). Eine Regulation dieser Reaktionen erfolgt durch die Tyrosin-Phosphatase CD45 (Hoffmeyer et al. 1995). Ein weiterer Regulationsmechanismus könnte die Freisetzung des membranständigen FcγRIII durch das sogenannte shedding sein, das an Entzündungsorten vermehrt stattfindet (Fleit et al. 1992).

Im murinen System wird der FcγRIII wiederum nur durch ein singuläres Gen kodiert, ein Analog zum GPI-verankerten hFcγRIIIb gibt es hier nicht. Der mFcγRIII bindet Immunkomplexe mit mIgG1, mIgG2a und mIgG2b mit niedriger Affinität ($K_a < 10^7 \text{ M}^{-1}$). Er wird assoziiert mit der FcR γ -Kette auf NK-Zellen, Mastzellen, Makrophagen, Neutrophilen Granulozyten und Mesangialzellen

exprimiert. Auf NK-Zellen kann er aber auch mit der ζ -Kette aus dem TCR/CD3 Komplex und auf Mastzellen mit der β -Kette des Fc ϵ RI assoziieren (Kurosaki et al. 1992). Die Assoziation mit der β -Kette auf Mastzellen, auf denen der Fc γ RIII mit dem Fc ϵ RI koexprimiert wird, führt zur Nutzung identischer Signaltransduktionswege durch beide Rezeptoren, wobei die β -Kette die Signale des ITAMs der FcR γ -Kette amplifiziert (Lin et al. 1996). Die gemeinsame Nutzung der FcR γ -Kette durch die α -Ketten des Fc γ RIII und Fc ϵ RI führt zu einer Kompensationsreaktion, wenn der Fc ϵ RI deletiert wird. In Fc ϵ RI knock-out Tieren wird der Fc γ RIII höher exprimiert und führt zu erhöhten Mastzell-Reaktionen nach IgG-Komplex Stimulation (Dombrowicz et al. 1997).

Auf Makrophagen wird der Fc γ RIII mit den beiden anderen Fc γ -Rezeptorklassen koexprimiert und hat hier wichtige Funktionen in der Endo- und Phagozytose sowie in der Antigenpräsentation. Auch diese Funktionen werden durch das ITAM der FcR γ -Kette vermittelt (Bonnerot et al. 1992). Die Bedeutung der Expression von Fc γ RII und Fc γ RIII auf fetalen Thymozyten ist noch nicht geklärt, könnte aber eine Rolle in der Entwicklung von Vorläuferzellen der NK- und T-Zellen spielen (Rodewald et al. 1992). Im murinen System gibt es lediglich einen monoklonalen Antikörper gegen den Fc γ RIII, der in gleicher Weise den Fc γ RII bindet, den mAk 2.4G2 (Unkeless 1979).

1.3 Mausmodelle

Beginnend mit der knock-out Maus für die FcR γ -Kette wurden bisher verschiedene Fc γ -Rezeptoren gentechnisch deletiert, um die in-vivo Funktionen dieser Proteine differenzierter betrachten zu können. Neben Mausstämmen, die definierte Defizienzen für die α -Ketten des Fc γ RII und des Fc γ RIII aufweisen ist jedoch bis heute noch kein selektiver Fc γ RI knock-out publiziert. Deshalb wird hier auch der NOD Mausstamm kurz vorgestellt, der einen natürlichen Defekt des Fc γ RI aufweist.

1.3.1 Die FcR γ -Ketten KO Maus

Da die FcR γ -Kette mit mehreren Rezeptoren funktionell eng assoziiert ist kommt es durch die Deletion dieses Proteins zu vielfältigen Effekten. Beeinflußt werden maßgeblich die Fc γ RIII vermittelten Reaktionen von NK-Zellen, die Effektorfunktionen der Makrophagen, welche durch Fc γ RI und Fc γ RIII vermittelt werden sowie von Mastzellen, auf denen Fc γ RIII und Fc ϵ RI in ihrer Funktion beeinträchtigt sind. Auf aktivierten Makrophagen hat sich gezeigt, daß IgG opsonierte Erythrozyten nicht mehr phagozytiert werden, trotz einer noch vorhandenen Bindungskapazität für IgG1 und IgG2b. Dieser Befund reflektiert die regulatorische Funktion des Fc γ RII, der auf diesen Zellen noch aktiv ist und seine Liganden binden kann, diese jedoch nicht phagozytiert (Takai et al. 1994). Weiterhin stellte sich heraus, daß Fc γ -Rezeptoren offenbar eine sehr wichtige Rolle in der Tumor-Abwehr spielen, was klar für die Abstoßung von Melanomen gezeigt werden konnte (Clynes et al. 1998b). Diese Beobachtung wurde in klinischen Untersuchungen umgesetzt, indem man bispezifische Antikörper gegen Tumorantigene, sowie gegen Fc γ RI oder Fc γ RIII entwickelte (Hartmann et al. 1997, Weiner et al. 1995).

Interessante Erkenntnisse brachte der FcR γ -Ketten knock-out auch bezüglich IgE und IgG vermittelter Hypersensibilitätsreaktionen, bei denen die beiden γ -Ketten assoziierten Fc γ RIII und Fc ϵ RI auf Mastzellen eine wichtige Rolle spielen. Die Arbeiten zeigten, daß eine IgE abhängige, passive Anaphylaxie zwar durch den Fc ϵ RI initiiert wird, daß aber, anders als bisher angenommen, in der aktiven systemischen Anaphylaxie neben IgE auch IgG1 Antikörper produziert werden. Diese, größtenteils Fc γ RIII vermittelte Reaktion, trägt maßgeblich zur Mortalität in der aktiven Anaphylaxie bei (Miyajima et al. 1997).

In einem weiteren Modellversuch für Hypersensibilitätsreaktionen, der reversen kutanen Arthus-Reaktion, kommt es zur Bildung von subkutanen Immunkomplexen nach der Injektion von Antigen in zuvor mit entsprechenden Antikörpern behandelten Tieren. Die typischen Reaktionen, wie die Bildung von Hämorrhagien und der Einstrom von Neutrophilen Granulozyten, sind in FcR γ -Ketten knock-out Mäusen deutlich reduziert, so daß auch hier eine Beteiligung

von Fc γ -Rezeptoren, eher als die Aktivierung des Komplementsystems, zur Ausbildung der Arthus-Reaktion führt (Sylvestre und Ravetch 1994). Später wurde gezeigt, daß vor allem die Fc γ RIII exprimierenden Mastzellen die Symptome dieser inflammatorischen Reaktion verursachen (Sylvestre und Ravetch 1996).

1.3.2 Die Fc γ RIII KO Maus

In der Fc γ RIII KO Maus wurde die ligandenbindende α -Kette genetisch deletiert, ohne andere Komponenten, wie γ - oder β -Ketten zu beeinflussen. Diese Mäuse weisen einen isolierten Defekt in der Expression des Fc γ RIII auf und zeigen unter anderem bei NK-Zellen den Verlust der ADCC (Hazenbos et al. 1996). Bei der Induktion einer experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA) zeigte sich überraschenderweise nach der Applikation autoreaktiver mAbs gegen murine rote Blutzellen (MRBC) eine nahezu komplette Protektion der knock-out Tiere gegen die mit IgG1 ausgelöste AIHA. Nach der Injektion von IgG2a mAb waren die Tiere nur leicht geschützt (Meyer et al. 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, daß eine Vielzahl von IgG1 vermittelten Immunreaktionen streng restringiert auf den Fc γ RIII und unabhängig vom Fc γ RI sind, während es für IgG2a und IgG2b Kompensationsmechanismen zwischen den beiden Rezeptoren gibt (Hazenbos et al. 1998).

Weiterhin stellte sich heraus, daß neben dem Fc ϵ RI der Fc γ RIII die dominierende Struktur in der IgG-abhängigen Mastzell Aktivierung darstellt. Fc γ RIII defiziente Mastzellen sind im Gegensatz zu Wildtypzellen weder nach Kreuzvernetzung mit 2.4G2 (anti Fc γ RII und Fc γ RIII) noch mit IgG opsonierten Erythrozyten in der Lage zu degranulieren. In-vivo zeigte sich eine starke Beeinträchtigung der passiven cutanen Anaphylaxie (PCA), was Untersuchungen bestätigt, in denen nach Ovalbumin Sensibilisierung auch in IgE defizienten Mäusen eine anaphylaktische Reaktion ausgelöst wurde (Oettgen et al. 1994).

In der reversen passiven Arthus Reaktion zeigte sich, daß zwischen verschiedenen Fc γ RIII defizienten Tieren starke Varianzen auftraten. Nur nach

der Depletion des Komplementsystems durch CVF (Cobra Venom Faktor) war die kutane Extravasation an der Injektionsstelle des Antikörpers bei allen knock-out Tieren inhibiert (Hazenbos et al. 1996). Dieser Einfluß des Komplementsystems auf die Arthus Reaktion wurde bei den FcR γ -Ketten defizienten Tieren nicht beobachtet (Takai et al. 1994) und könnte einen Unterschied im genetischen Hintergrund beider Mausmodelle reflektieren. Weiterhin unklar bleibt die Rolle des Komplements jedoch nach jüngeren Untersuchungen, in denen Rezeptor defiziente Tiere für die Komplementkomponente C5a einen Einfluß des Komplementsystems auf Hautreaktionen und besonders auf IgG Hypersensitivitäten in der Lunge zeigen (Höpken et al. 1997), während bei einem Vergleich verschiedener Fc γ -Rezeptor knock-out Tiere kein Einfluß von Komplement in diesen Modellsystemen festgestellt wurde (Clynes et al. 1999).

1.3.3 Die Fc γ RII KO Maus

Die Rolle des regulativen Fc γ RIIb wurde in diesem bislang jüngsten Fc γ -Rezeptor knock-out untersucht. Da kein murines Analog zum humanen Fc γ RIIa mit einem ITAM besteht, wurde in diesem Modell nur die ITIM tragende Variante deletiert. In B-Zellen, die durch den Fc γ RIIb1 reguliert werden, zeigte sich durch die Deletion dieses Rezeptors eine erhöhte Produktion von Antikörpern gegen Thymus-abhängige und unabhängige Antigene. Diese Erhöhung war spätestens 14 Tage nach der Immunisierung der Tiere mit verschiedenen Antigenen und auch nach der Induktion einer Sekundärantwort durch eine weitere Injektion für die Isotypen IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 und IgA signifikant (Takai et al. 1996). Die Deletion des Fc γ RIIb auf B-Zellen führt allerdings nicht zu einer unkontrollierten Antikörperproduktion, die man ohne weitere Kontrollelemente auf diesen Zellen erwartet hätte. Ein mögliches Membranprotein, das für eine solche kompensierende Funktion in Frage käme ist das Lektin-ähnliche Molekül CD22 (Doody et al. 1995). Wie der Fc γ RIIb verfügt CD22 über ein intrazelluläres ITIM und ist so in der Lage ITAM vermittelte Signale zu inhibieren. In verschiedenen CD22 defizienten

Mausmodellen wurden überreaktive B-Zell Antworten festgestellt (Nitschke et al. 1997, O'Keefe et al. 1996).

Auf Mastzellen vermittelt der Fc γ RIIb ein klares inhibitorisches Signal gegen die vom ITAM der FcR γ -Kette erzeugte Aktivierung durch den Fc γ RIII und Fc ϵ RI (Ono et al. 1996, Takai et al. 1996). Bei der Fc γ RII defizienten Maus wurde gezeigt, daß bereits mit 5-10 fach geringeren Antikörperkonzentrationen eine IgG induzierte passive cutane Anaphylaxie ausgelöst werden kann. Der analoge Versuch, eine PCA durch IgE Antikörper auszulösen, wurde bei diesen Tieren bislang nicht durchgeführt.

Die Funktion des Fc γ RIIb2 auf Makrophagen ist noch nicht vollständig geklärt. Während es Evidenzen für eine phagozytierende Funktion gibt, die durch bispezifische Antikörper gegen Fc γ RII und Antigenkomplexe ausgelöst wird (Hazenbos et al. 1996) wurde gezeigt, daß in FcR γ -Ketten knock-out Tieren, in denen der Fc γ RIIb2 den einzig intakten Fc γ -Rezeptor auf Makrophagen repräsentiert, trotz der Bindung von IgG opsonierten Erythrozyten, keine Phagozytose nachweisbar ist (Takai et al. 1994). Kürzlich wurde aber an Fc γ RII defizienten Mäusen gezeigt, daß der Fc γ RIIb2 sowohl in der Lage ist die Immunkomplex vermittelte Freisetzung von Interleukin-2 durch Makrophagen zu inhibieren (Yuasa et al. 1999), als auch die Phagozytose-Effizienz IgG opsonierter Erythrozyten durch Makrophagen zu regulieren (Clynes et al. 1999).

1.3.4 Die NOD Maus

NOD (non-obese diabetic) Mäuse zeichnen sich durch einen autoimmunen Phänotyp aus, der von multiplen Allelen hervorgerufen wird und zu der spontanen Entwicklung einer dem humanen Diabetes Mellitus Typ I sehr ähnlichen Erkrankung führt. Bisher wurden 18 genomische Idd (insulin-dependent diabetes) Loci gefunden, die mit der Ausprägung der Krankheit assoziiert sind. Die stärkste Beziehung zur Pathogenese hat der Idd 1, der einen Genomabschnitt beschreibt, auf dem sich die Gene für den MHC Klasse II der Maus befinden (Wicker et al. 1995).

Auch in den Promotersequenzen und kodierenden Bereichen für Fc γ -Rezeptoren wurden bei NOD Mäusen genetische Defekte gefunden. Ein NOD-spezifischer Defekt im Promoterbereich des Fc γ RIIB Genes führt wahrscheinlich zu einer Defizienz der Tiere für die auf Makrophagen exprimierte Spleißvariante Fc γ RIIb2 und der ebenfalls von Makrophagen sezernierten löslichen Variante Fc γ RIIb3 (Luan et al. 1996). Die auf B-Zellen exprimierte Isoform Fc γ RIIb1 ist interessanterweise nur wenig reduziert (20 - 30%), während die Fc γ RIII Expression nicht verändert ist. Der Defekt des Fc γ RIIb2 korreliert bei den NOD Tieren mit einem Anstieg des Serumgehaltes an IgG1 und IgG2b, was an einer erniedrigten Clearance dieser Isotypen über den Fc γ RIIb2 auf Makrophagen liegen könnte.

Im Fc γ RI des NOD Stammes wurden zahlreiche Mutationen gefunden. Im extrazellulären Bereich gibt es Änderungen in der genomischen Sequenz, die zu Verschiebungen der Exon/Intron Grenzen führen. Durch neue Spleißsignale entstehen drastische Veränderungen in den Verbindungen zwischen den immunglobulinähnlichen Domänen, was zu einem erweiterten Ligandenspektrum des NOD-Fc γ RI führt. Neben IgG2a wird auch monomeres IgG3 und IgG2b mit hoher Affinität gebunden und zudem ist die Dissoziationszeit von gebundenem IgG2a verlängert (Gavin et al. 1996, Gavin et al. 1998b). Auch im zytoplasmatischen Teil des Rezeptors gibt es Mutationen. Die größten Konsequenzen hat die Deletion von vier Basenpaaren. Sie führt zur Entstehung eines neuen Stopkodons und damit zum Verlust von ca. 75% der intrazellulären Domäne, was zu einer Inhibition der Internalisation von gebundenem IgG2a führt (Prins et al. 1993). Diese Mutation wurde anfangs mit der Pathogenese des Diabetes in Zusammenhang gebracht, da sich der Fc γ RI im Idd10 Locus befindet. Spätere, genauere Untersuchungen ergaben allerdings, daß sich der Idd10 Locus in den Idd10 und Idd17 Locus unterteilt, die distal und proximal vom Fc γ RI liegen, der somit als Diabetes-Faktor bei NOD Mäusen ausscheidet (Podolin et al. 1997).

1.4 Murine Autoimmunmodelle

Um ein besseres Verständnis für die molekularen Grundlagen humaner Erkrankungen des Immunsystems zu erlangen, wurden verschiedene Tiermodelle entwickelt, die in ihren pathogenetischen Abläufen menschlichen Autoimmundefekten stark ähneln. Eine große Rolle spielen dabei Tiere, die mittels genetischer Manipulationen definierte Defekte einzelner Immunkomponenten enthalten. Die hier vorgestellten knock-out Mausstämme für Fc γ -Rezeptoren erlauben eine eingehende Unterscheidung der Bedeutung einzelner Rezeptorklassen in Überempfindlichkeitsreaktionen von Typ I, II oder III in-vitro und in-vivo. Es hat sich herausgestellt, daß die Interaktion von Antigen-Antikörper Komplexen mit Fc-Rezeptoren ausreicht, um anaphylaktische Reaktionen auszulösen (Dombrowicz et al. 1993, Hazenbos et al. 1996, Miyajima et al. 1997) und eine große Rolle in der Arthus Reaktion zu spielen (Sylvestre und Ravetch 1994). Andererseits hat sich gezeigt, daß der Fc γ RIIB eine wichtige Rolle in der Regulation dieser Prozesse spielt. So kommt es nach seiner Deletion etwa zu Überreaktionen in der passiven kutanen Anaphylaxie (Takai et al. 1996) oder zur Entwicklung einer Kollagen-induzierten Arthritis. Der genetische Hintergrund der Fc γ RII defizienten Mäuse ist normalerweise gegen die Entwicklung dieser Modellerkrankung für die humane rheumatoide Arthritis geschützt. Durch das Fehlen des inhibitorischen Fc γ RIIB werden die Schwellenwerte zur Produktion von Autoantikörpern und zur Auslösung von Effektorzellfunktionen aber so weit erniedrigt, daß die Krankheit sich manifestieren kann (Yuasa et al. 1999).

Die Glomerulonephritis (GN) ist eine Erkrankung, bei der es zur übermäßigen Deposition von Immunkomplexen in der Niere kommt. Besonders beim SLE (systemischer Lupus Erythematoses) spielt die GN eine Rolle, da sie hier eine der Haupttodesursachen darstellt. Die Immunkomplexe entstehen in der Zirkulation und werden von den glomerulären Strukturen der Nieren abgefangen (Radeke und Resch 1992). Im murinen Modell für diese Erkrankung, die die F1 Nachkommen der Kreuzung aus NZB und NZW Mäusen spontan entwickeln, läßt sich durch das Einkreuzen der FcR γ -Ketten Deletion eine komplette Protektion erzielen. Es werden zwar Immunkomplexe in der Niere deponiert, die das Komplementsystem aktivieren, aber durch das

Fehlen von Fc γ RI und Fc γ RIII bleibt eine entzündliche Überreaktion aus (Clynes et al. 1998a).

Auch für Hypersensitivitätsreaktionen vom Typ II gibt es Modellsysteme, wie die idiopathische thrombozytopenische Purpura (ITP), die durch die Deletion von Fc γ -Rezeptoren beeinflusst werden (Clynes und Ravetch 1995). Eine der ältesten bekannten Autoimmunerkrankungen dieser Art, die AIHA, soll abschließend noch etwas näher beschrieben werden.

1.4.1 Die Autoimmune Hämolytische Anämie (AIHA)

Die AIHA ist durch die spontane Entwicklung autoreaktiver Antikörper gegen autologe Erythrozyten (RBC) charakterisiert, die zu einer Lyse dieser Zellen und zum Abfall des Hämatokrits führen. Der NZB (New Zealand Black) Mausstamm entwickelt, ähnlich wie im humanen System, ebenfalls spontan Autoantikörper gegen seine murinen roten Blutzellen (MRBC). Durch die Myelomfusion mit B-Zellen aus erkrankten NZB Mäusen konnten acht Hybridome generiert werden, die monoklonale Antikörper (mAk) gegen MRBC bilden, welche durch Injektion in andere Mausstämmen zu einem Hämatokritabfall führen (Shibata et al. 1990). Das Komplementsystem spielt in der AIHA scheinbar nur eine sehr untergeordnete Rolle, denn auch in Abwesenheit von Komplement lässt sich die Krankheit induzieren (Sylvestre et al. 1996). Ein Grund dafür könnten die Oberflächenproteine sein, welche die kernlosen Erythrozyten vor dem Angriff des autologen Komplementsystems schützen sollen, wie der decay accelerating factor (DAF).

Es wurden zwei pathogene Mechanismen der anti-MRBC Antikörper festgestellt. Zum einen wurde ein IgG1 Antikörper beschrieben (mAk 31-9D), der zu einer Agglutination der Erythrozyten, also zu einer Fc γ -Rezeptor unabhängigen AIHA führt. Andererseits wurden aber auch zwei Antikörper mit der gleichen Bindungsstelle gefunden, die vom Epitop des 31-9D abweicht. Sie verursachen eine AIHA aufgrund einer Fc γ -Rezeptor vermittelten Phagozytose. Die vom Antikörper 105-2H vom IgG1 Isotyp induzierte AIHA wird durch den Fc γ RIII vermittelt. Sie lässt sich durch Vorbehandlung der Mäuse mit dem Fc γ RII und Fc γ RIII blockierenden Antikörper 2.4G2 hemmen, während die

durch den Antikörper 34-3C (IgG2a) verursachte AIHA wahrscheinlich durch den Fc γ RI und den Fc γ RIII vermittelt wird (Izui et al. 1994). Weitere Hinweise auf die Bedeutung der Fc γ -Rezeptoren in der AIHA entstehen aus einem Modell in dem Mäuse mit einem polyklonalen Kaninchenserum gegen murine Erythrozyten behandelt wurden. Im Gegensatz zu wildtyp Tieren entwickeln FcR γ -Ketten defiziente Mäuse danach keine AIHA (Clynes und Ravetch 1995).

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des modulatorisch wirksamen Fc γ RII in Immunreaktionen näher untersucht werden. Bislang existiert nur ein monoklonaler Antikörper, der Fc γ RII und Fc γ RIII gleichermaßen erkennt, und deshalb sollten Antikörper charakterisiert werden, die eine Spezifität für den Fc γ RII, aber nicht für Fc γ RIII aufweisen. Für den Nachweis der gewebe- sowie aktivierungsabhängigen Expressionsdichte des Fc γ RII sind solche Antikörper sehr wichtig. Weiterhin bieten sie die Gelegenheit, in verschiedenen Maussystemen durch eine spezifische Ligandenblockade des Fc γ RII die funktionelle Bedeutung dieses Rezeptors zu untersuchen.

In Vorarbeiten wurde gezeigt, daß die Antikörpersubtypenspezifität der verschiedenen Fc γ -Rezeptorklassen eine maßgebliche Rolle in den Effektorfunktionen von Immunzellen spielt. Die hohe Restriktion von IgG1 an den Fc γ RIII konnte dabei nachgewiesen werden (Hazenbos et al. 1998, Meyer et al. 1998). In verschiedenen Mausmodellen sollte die Bedeutung der drei Fc γ -Rezeptor Klassen nun für IgG2a vermittelte Immunreaktionen am Beispiel der experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie untersucht werden. Da es bisher noch keine Rezeptor knock-out Maus für die α -Kette des Fc γ RI gibt, sollte anhand der NOD Maus, die große zytoplasmatische Deletionen dieses Rezeptors aufweist, ein Modell für einen Fc γ RI Defekt und durch Rückkreuzung für einen Fc γ RI/Fc γ RIII kombinierten Defekt erstellt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

Die anti Ly-17 Hybridome K75.325 (anti-Ly-17.1) und K9.361 (anti-Ly-17.2) stammten von Dr. U. Hämmerling, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, USA.

Die anti MRBC Hybridome 105-2H und 34-3C wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Shozo Izui, CMU, Genf, Schweiz, zur Verfügung gestellt.

Alle Hybridome wurden in Kulturmedium in Greiner, bzw. Nunc Zellkulturflaschen gehalten.

2.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Feinchemikalien hatten im Allgemeinen Analysegrad und wurden von den Firmen Applichem, Merck, Riedel-de Haen, Sigma oder J.T. Baker bezogen. Destilliertes und deionisiertes Wasser wurde in der MHH hergestellt. Soweit die Herkunft der Chemikalien für die durchgeführten Methoden eine Rolle spielte wurde dies an entsprechender Stelle erwähnt.

2.1.2.1 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Biometra synthetisiert und in gelöster Form in einer Konzentration von 100 µg/ml geliefert. Sie wurden aliquotiert und bis zum Gebrauch bei -20° C gelagert.

Name	Sequenz (5' nach 3')
------	----------------------

common antisense	GCC ATG GTG GAT GGT GGA GGT C
WT	TCC ATC TCT CTA GTC TGG TAC C
KO	ACT TGT GTA GCG CCA AGT GCC A

2.1.2.2 Antikörper

anti-CD11b/Mac-1 α chain (M1/70)

anti-CD16/32 / Fc γ RII/III (2.4G2)

anti-CD45R/B220 (RA3-6B2)

anti-Ly-6C/Gr-1 (RB6-8C5)

anti-NK1.1/NKR-P1C (PK136)

Pharmingen, San Diego, USA

anti IgG (Peroxidase gekoppelt)

anti IgG1 (DAKO capture AK für ELISA)

anti IgG2a (DAKO capture AK für ELISA)

anti IgG2b (DAKO capture AK für ELISA)

anti IgG3 (DAKO capture AK für ELISA)

anti IgM (DAKO capture AK für ELISA)

Dako, Hamburg

Goat-anti-mouse IgG Fitc-konjugiert

Dianova, Hamburg

anti Ly-17.1, anti-Ly-17.2 Fitc konjugiert Medac, Hamburg

2.1.2.3 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von den Firmen Boehringer Mannheim, Gibco BRL, MBI Fermentas, New England Biolabs, Pharmacia, Promega, Sigma, Serva oder Stratagene bezogen. Soweit die Herkunft der Chemikalien für die durchgeführten Methoden eine Rolle spielte wurde dies an entsprechender Stelle erwähnt.

2.1.2.4 Größenstandards

1 kb-Leiter (100 µg/ml in loading buffer) von Gibco BRL mit den Größen 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636, 1018, 517/506, 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134 und 75 Basenpaaren

100 bp-Leiter (100 µg/ml in loading buffer) von Gibco BRL mit den Größen 2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 Basenpaaren

2.1.3 Lösungen und Kulturmedien

2.1.3.1 Standardpuffer

ACK-Puffer zur Erythrozytenlyse

8,29 g NH₄Cl

1 g KHCO₃

37,2 mg Na₂-EDTA

ad 1 l mit Aqua dest., bei einem pH von 7,3, sterilfiltrieren

Carbonat-Puffer zur FITC Markierung

1,6 g Na₂CO₃

2,9 g NaHCO₃

ad 500 ml mit Aqua dest., bei einem pH von 9,5

Gesättigte Ammoniumsulfat-Lösung

760 g Ammoniumsulfat wurden unter Rühren in einem Liter Aqua dest., bis kurz unter dem Siedepunkt erhitzt. Vor Benutzung wurde die Lösung über nacht bei Raumtemperatur abgekühlt.

TAE Puffer (50 x)

242 g TRIS Base

57,1 ml Eisessig

100 ml 0,5 M EDTA (pH8.0)
ad 1 l mit Aqua dest. bei einem pH von 7,2

TBE Puffer (10 x)

107,8 g TRIS Base
55 g Borsäure
10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
ad 1 l mit Aqua dest.

TE Puffer

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA, pH8

loading buffer (6 x)

6 ml 50 x TAE Puffer
44 ml Glycerin
mit einer Spatelspitze Bromphenolblau über Nacht mischen

Ethidiumbromid

10 mg/ml in H₂O

ELISA Blockade-Puffer

PBS mit
0.05% Tween 20
1 mM EDTA
0,25% BSA
0,05% Natriumacid

PCR-Puffer

45 µl 1 M Tris, pH 8,3
11 µl 1 M NH₄SO₄
0,5 µl 14 M β-Mercapto-Ethanol

4 x 5 µl 100 mM dNTP

1,1 µl 10% BSA

1 µl 5 mM EDTA

2 µl 1M MgCl₂

19,3 µl Aqua dest.

Proteinase K Puffer

50 mM Tris

12,5 mM EDTA

0,5% SDS

einstellen auf pH 8, frisch 0,5 mg/ml Proteinase K zugeben

Sörensen Puffer für die Formalin Fixierung

Stammlösungen:

1.3609 g KH₂PO₄ in 100 ml H₂O = Lsg.A

1.78 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O in 100 ml H₂O = Lsg. B

Gebrauchslösung:

pH 7.4 = 16 ml Lsg. A + 84 ml Lsg. B

Thioglykollat Medium (3%)

30 g Thioglykollat mit 1000 ml Aqua dest. aufkochen lassen und autoklavieren

Zitronensäurephosphatpuffer für Giemsa-Färbelösung

172 ml 0,1 M Zitronensäure

230 ml 0,2 M Na₂HPO₄ · 2 H₂O

auf 2000 ml mit dest. H₂O auffüllen, pH 5,75 einstellen

2.1.3.2 Puffer für CH50 Komplementtest

Alseverlösung

20,5g Dextrose (D-(+)-Glukose)-Monohydrat

8,9 g Tri-Na-Zitrat x 2H₂O

4,2 g NaCl

ad 1 Liter Aqua dest.

auf pH 6,1 einstellen mit 10% Zitronensäure

VBS Stammlösung

220,70 g NaCl

25,48 g Na-5,5-diäthylbarbitat

86 ml 1 N

ad 5 Liter mit Aqua dest. (pH 7,6)

EDTA Stammlösung 0,5 M (für VBS-EDTA)

93,06 g EDTA (Merck) in 150 ml 1 N NaOH aufnehmen und bei 70°C im Wasserbad erwärmen

einstellen des pH Wertes auf 7,3-7,5 mit 2 N NaOH

ad 500 ml mit Aqua dest.

VBS-EDTA Gebrauchslösung

360 ml VBS Stammlösung

40 ml EDTA Stammlösung

6 ml 10% ige Gelantine

ad 2 Liter Aqua dest. bei pH 7,3

MP-Stammlösung

1000 ml VBS Stammlösung

0,5 ml 0,3 M CaCl₂

0,5 ml 2,0 M MgCl₂

MP-Gebrauchspuffer

200ml MP-Stammlösung

3 ml 10% Gelantine (weiß, extrafein (Merck))

einstellen auf pH 7,3

2.1.3.3 Lösungen und Medien für die Zellkultur

FCS-haltiges Kulturmedium

10% FCS (PAA, Standard Fetales Kälberserum)

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

1% L-Glutamin (Biochrom, 200 mM)

1% Natriumpyruvat (Gibco, p.A.)

in RPMI 1640 (Biochrom)

pH 7,4

bei Kulturmedium für murine Zellen erfolgt zusätzlich die Zugabe von 3,5 µl β-Mercaptoethanol auf 500 ml

PBS-Puffer

130 mM NaCl

7,8 mM Na₂HPO₄

in H₂O, pH 7,4

PBS mit Ca/Mg (Gibco)

PBS mit je 100 mg/l CaCl und MgCl

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Cobra venom Factor

Calbiochem

Dialyseschläuche

Roth

Einfriergefäße

Nunc

ELISA-Platten (Nunc Immunoplate Maxisorb)	Nunc
Ficoll	Biochrom
Gelfiltrationssäule	Pharmacia
Kanülen	B. Braun
Multiwell-Platten	Greiner, Nunc
Pipetten	Greiner
Pipettenspitzen	Sarstedt
ProteinA Gel	Pharmacia
Reaktionsgefäße (50 ml, 15 ml)	Greiner
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml)	Sarstedt, Eppendorf
Spritzen	B. Braun
Thioglykollat	Sigma
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 75 cm ²)	Greiner
Zellkulturflaschen (175 cm ²)	Nunc
Zellkulturpetrischalen	Falcon
Zentrifugenröhrchen	Falcon

2.1.5 Geräte

Bioimager	Fujifilm, BAS 1500
Brutschränke	Heraeus Sepatech
ELISA Reader	Labsystems, Multiscan plus
Durchflußzytometer	Becton Dickinson, FACScan und FACSCalibur
Fraktionssammler	Pharmacia, Frac 300
Gelelektrophoresekammer	Hoffa, Mighty Small II (SE 250)
Heizblock	Eppendorf, Thermomixer 5436
Mikrowelle	Philips
Photometer	Shimadzu, UV-Meter 1202
pH-Meter (Digital pH Meter)	Knick
Spannungsgeräte	Pharmacia
Thermocycler	Landgraf, Varius V
Tischzentrifuge 5415	Eppendorf

Zentrifugen

Heraeus, Megafuge 2R, Biofuge
Beckmann, J2-21, J6-B

2.1.6 Tiere

Die Mausstämme C57BL/6 und Balb/c wurden von Charles River/Deutschland erworben. Die Mausstämme 129 und NOD/Ltj stammen von Jackson Laboratories/USA. Fc γ RIII knock-out Mäuse sowie deren Kontrollen wurden im Zentralen Tierlabor der Medizinischen Hochschule Hannover gezüchtet. Fc γ RII knock-out Mäuse wurden von Toshiyuki Takai, Tohoku Universität, Japan, zur Verfügung gestellt. FcR γ -Ketten und Fc γ RII/FcR γ -Ketten doppel knock-out Mäuse wurden von Taconics, Dänemark erhalten.

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

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

Die durchgeführten molekularbiologischen Methoden wurden, wenn nicht anders erwähnt, entsprechend gängigen Protokollen aus Molecular Cloning, Sambrook et al. 1989, Cold Spring Harbour Press oder den Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel et al. 1995, John Wiley & Sons, Inc. durchgeführt.

2.2.1.1 Präparation genomischer DNA

Nach der Äthernarkose wurde mit einem über einem Brenner ausgeglühten Skalpell etwa ein cm der Mäuseschwanzspitze abgeschnitten. Das Schwanzstück wurde kleingeschnitten in 500 µl Proteinase K Puffer bei 56°C über Nacht im Thermoblock (Thermomixer 5436; Eppendorf) inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl Phenol wurde die Mischung fünf Minuten bei 14000 Upm. abzentrifugiert. Aus 100 µl der wässrigen Phase wurde mittels Zugabe von 1/10 Volumen 4 M NaCl und 2,5fachem Volumen 100% Ethanol p.a. die genomische DNA präzipitiert. Nach Abzentrifugation bei 2500 Upm über 15 Min. wurde die DNA in 70% Ethanol gewaschen und nach Absaugen des Überstandes für 5 min. luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 300 µl TE Puffer für 48 Stunden gelöst.

2.2.1.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Ein µl der gelösten genomischen DNA pro Ansatz wurde mit dem sense Primer WT (WT-FcγRIII, etwa 10 pmol/Ansatz) bzw. dem sense Primer KO (KO-Neomycinkassette, etwa 10 pmol/Ansatz) und zusätzlich mit dem antisense Primer (erkennt sowohl KO und

WT DNA, 10 pmol/Ansatz) inkubiert (für die pos. Kontrolle wurden sense und antisense Primer gegen die EC2 von Fc γ RII/III benutzt).

Das amplifizierte PCR Produkt aus der Wildtyp DNA hat eine Länge von 505 Basenpaaren (Bp), während das PCR Produkt aus der genomischen DNA der knockout Mäuse eine Länge von 572 Bp besitzt.

Das Ansetzen der PCR Reaktion erfolgte mit 1 μ l 10x PCR-Puffer und wurde mit Aqua dest. auf 10 μ l aufgefüllt. Als letztes erfolgte die Zugabe von 1 U Taq Polymerase (Promega/USA).

Die PCR wurde im Thermocycler (Thermocycler Varius V, Landgraf, Langenhagen, Deutschland) gefahren, wobei die erste Denaturierung über 300 Sek. bei 95°C und das anschließende Annealing bei 62°C über 60 Sek. erfolgte. Der erste Polymerisationsschritt (Elongationsschritt) erfolgte bei 72°C über 45 Sek.. Im zweiten Schritt, welcher zweimal wiederholt wurde, wurde nur noch eine Denaturierung von 45 Sek. bei 95°C und ein Annealing 61°C durchgeführt (das Annealing wurde bei jedem Schritt um 1°C reduziert bis zum Optimum 57°C), der Polymerisationsschritt fand wie oben statt. Ab Schritt 5 wurde die Hauptamplifikation, welche 30 mal wiederholt wurde, mit einem Annealingoptimum bei 57°C durchgeführt. Im letzten Schritt wurde der Denaturierungsschritt über 60 Sek. und der Polymerisationsschritt über 300 Sek. durchgeführt, um verbleibende Einzelstränge komplett aufzufüllen. Der PCR Reaktionsansatz wurde bei 4°C gelagert.

2.2.1.3 Gelelektrophorese

2.2.1.3.1 Agarosegel Elektrophorese

Zum Gießen eines 1%igen Agarose Gels wurden 0,5 g Agarose in 50 ml TAE Puffer in einem 250 ml Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach Zugabe von 2 bis 5 μ l Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurde das Gel in die Gelkammer mit 15 zahnigen Kämmen (bio-rad Mini Sub cell GT) gegossen und

bei 4°C eine halbe Stunde durchgehärtet. Nach Einlegen in die Gelkammer wurde diese mit TAE Puffer gefüllt. Als Größenstandard wurde eine 1 Kb-Leiter (Gibco) benutzt. 10 µl des PCR Reaktionsansatzes wurden mit 2 µl 6fach konzentrierten Loading Puffer vermischt und in die Geltaschen gegeben und bei 120 V ein halbe Stunde laufen gelassen. Die anschließende Detektion der Banden erfolgte unter dem UV-Meter bei 260 nm.

2.2.1.3.2 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden

Die radioaktiv markierten Oligonukleotide wurden zur Untersuchung der PCR Produkte zur Unterscheidung zwischen NOD und wildtyp FcγRI benutzt, da es sich hierbei um sehr kleine Unterschiede zwischen 180 und 184 bp handelte. Jeweils 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotide wurden in PNK-Puffer (50 mM Tris/HCl pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM Spermidin, 0,1 mM EDTA) mit 10 pmol [³²P]ATP (3000 Ci/mmol) und 5 U T4-Polynukleotidkinase für 45 min bei 37° C am 5'-Ende markiert. 1 µl des Ansatzes wurde zur Kontrolle in 100 µl STE aufgenommen, auf eine Sephadex G50-Säule gegeben und 5 min bei 1700 rpm zentrifugiert. Die nicht eingebaute Radioaktivität wird auf der Säule immobilisiert, während die Oligonukleotide im Eluat bleiben. Durch eine vergleichende Messung der Säule und des Eluates mit dem Geigerzähler kann die Einbaurrate ermittelt werden.

2.2.1.3.3 Polyacrylamidgel Elektrophorese

Ein 8%iges Gel wurde aus 31 g Harnstoff, der in 31 ml dd H₂O und 7,5 ml 10× TBE gelöst, und mit 11 ml 38% Acrylamid/2% Bisacrylamid, sowie 450 ml 10% Amoniumpersulfat versetzt wurde hergestellt. Die Lösung wurde unter Vakuum entgast, durch die Zugabe von 75 µl TEMED wurde die Polymerisation eingeleitet und das Gel wurde zwischen zwei Sequenzier-Glasplatten gegossen. Die Platten wurden zunächst gründlich mit Ethanol gereinigt, woraufhin die größere Platte mit 300 ml γ-Methacryloxy-propyltrimethoxysilan und die kleinere mit 300 µl Sigmacote behandelt wurden, um nach der späteren Trennung das Gel auf der größeren Platte zu fixieren. Nach dem erneuten

Waschen der Platten wurden diese mit inserierten "Spacern" aufeinandergelegt und mit Klammern fixiert. Das Gel wurde langsam zwischen die Platten gegossen und die Probenkämme wurden mit der stumpfen Seite ca 5 mm tief zwischen die Platten geschoben, so daß eine Tasche entstand. Das Gel wurde 60 min auspolymerisiert und in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und der Oberpuffer (1× TBE), sowie der Unterpuffer (0,5× TBE) zugegeben. Die Kämme wurden mit der spitzen Seite zwischen die Platten ca. 2 mm tief ins Gel gesteckt und die Taschen wurden mit einer Spritze gereinigt. In einem Vorlauf wurde das Gel 1 h bei 1,8 kV und 80 Watt erhitzt.

Der markierte PCR-Reaktionsansatz wurde 5 min bei 95° C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Vor dem Auftragen von je 3 µl der denaturierten Proben wurden die Taschen mit einer Spritze gespült um den Harnstoff zu entfernen. Nach der Elektrophorese wurden die Platten getrennt und das auf der großen Platte haftende Gel für 20 min fixiert, wobei in der Fixierungslösung (5% Methanol, 5% Essigsäure) der Harnstoff ausgewaschen wurde. Das Gel wurde jetzt 20 min in H₂O gewaschen, im Trockenschrank bei 80° C getrocknet, auf einer Imaging Platte exponiert und mit einem Bioimager ausgewertet.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 SAS Fällung muriner Hybridomüberstände

Hybridomüberstände der K9.361 und K75.325 Linien wurden durch eine halbstündige Zentrifugation bei 20000 x g im Rotor JA-14 von Zellen und Zelltrümmern gereinigt. Unter Rühren wurde 45% (v/v) gesättigte Ammoniumsulfatlösung zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Das präzipitierte Immunglobulin wurde durch einstündige Zentrifugation bei 20000 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde in einem Zwanzigstel des Ausgangsvolumens PBS aufgenommen und bei dreimaligem Pufferwechsel gegen PBS dialysiert.

2.2.2.2 Aufreinigung muriner Antikörper über Protein A

Für die ProteinA Aufreinigung wurde eine komplett Säule (high flow; Pharmacia Länge 18 cm $\varnothing = 1,5$ cm), welche mit 5 ml ProteinA Sepharose CL-4B gefüllt war, verwandt. Waschen, Beladen, Elution und Fraktionierung erfolgten mittels des Fraktionssammlers (Frac 300, Pharmacia) nach den Angaben des Herstellers.

In PBS gelöste Antikörperlösung (K9.361 Hybridomüberstände, IgG2b) wurde mit 1/10 Volumen 1M TRIS (pH 8,9) versetzt und mit einer Flußrate von 0,5 ml/Min über die Säule laufen gelassen. Nach Waschen mit dem 20fachen Säulenvolumen 100 mM Tris (pH8,9) wurde die Elution mit 100 mM Glycinpuffer (pH3) bei einer Flußgeschwindigkeit von etwa 1,5 ml/ Min. durchgeführt. Es wurden 20 Fraktionen von etwa 1,5 ml (+ 100 μ l 1M Tris-Puffer zur schnellen Neutralisation) gesammelt und photometrisch auf ihren Proteingehalt bei 280 nm analysiert. Die Fraktionen mit einem Proteingehalt > 1 mg/ml wurden vereinigt und in der Immunfluoreszenz, im ELISA und der SDS Gelelektrophorese untersucht.

2.2.2.3 Isotypenbestimmung und Konzentrationsbestimmung muriner Hybridomüberstände durch ELISA

Die Bestimmung der Immunglobulinisotypen erfolgte durch die ELISA Sandwich Technik. In einem ersten Schritt wurde eine 96-well-Nunc-maxisorp Platte mit 50 μ l/Well von einem 1 : 1000 in PBS verdünnten 'capture-antibody' (Dako) der eine Spezifität für das zu detektierende Immunglobulin besitzt über Nacht bei RT beschichtet. Unspezifische Bindungen wurden anschließend mit 400 μ l/Well Blockade Puffer für zwei Stunden bei RT abgesättigt und mit Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurde der zu detektierende Antikörper in einem Volumen von 50 μ l zugegeben. Es folgte die zweistündige Inkubation des Peroxidase gekoppelten Sekundärantikörpers gegen murines oder Rattenimmunglobulin (Dako). Nach Waschen mit Aqua dest. wurde 100 μ l/Well

vom (nach Angaben des Herstellers (Dako)) zubereiteten Substrat zugegeben und unter Lichtschutz für eine Stunde inkubiert. Der Farbumschlag wurde durch Zugabe von 100 µl 1 M H₂SO₄/well gestoppt und die Extinktion im ELISA-Reader ausgewertet. Die Konzentration der untersuchten Proben wurde durch die Interpolation mit mitgetesteten Kontrollantikörpern bestimmt.

2.2.2.4 FITC Markierung muriner Antikörper

Zur Konjugation monoklonaler Antikörper mit dem Fluoreszenzfarbstoff wurde zunächst 50 mg FITC (Sigma F7250) in 5 ml DMSO aufgenommen. Für 1 mg des zu markierenden Antikörpers wurden 5 µl (50 µg) dieser Lösung eingesetzt. Hierzu wurde die gegen PBS dialysierte Antikörperlösung mit dem gleichen Volumen eines doppelt konzentrierten Carbonat Puffers und der entsprechenden Menge der FITC-DMSO Lösung versetzt und eine Stunde in einem end-over-end Mixer bei Raumtemperatur unter Lichtausschluß inkubiert. Danach wurde die Lösung zweimal bei 4° C und 14000 Upm. abzentrifugiert und schließlich wurde der Überstand gegen PBS dialysiert, um überschüssiges FITC zu entfernen. Das Antikörper-FITC Konjugat wurde dann aliquotiert und bei -80° C eingefroren.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Allgemeine Zellkultur

Die Zellen wurden bei 37° C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampfatosphäre kultiviert. Zur Erhaltung einer Hybridomkultur wurde eine Passagierung auf das vier bis fünffache Volumen durchgeführt, wenn die Kultur eine Dichte von maximal 10⁶ Zellen/ml erreicht hatte. Zur Produktion von Hybridomüberständen wurde die Kultur auf das gewünschte Volumen expandiert und dann für zehn Tage bis zum Absterben der Zellen weiter kultiviert.

2.2.3.1.1 Bestimmung der Lebendzellzahl

Die semiadhärenten Hybridomzellen wurden durch starkes Auf- und Abpipettieren in Suspension gebracht. Für die Zählung wurden sie mit dem gleichen Volumen einer 1:10 verdünnten Trypanblau Lösung versetzt und in einer Neubauer-Zählkammer wurde die Lebendzellzahl von mindestens 100 Zellen ausgezählt.

2.2.3.1.2 Einfrieren

Jeweils 5 x 10⁶ Zellen wurden fünf Minuten bei 1000 Upm. zentrifugiert, woraufhin das Pellet in 0,5 ml kaltem FCS resuspendiert wurde. Die Aliquots wurden in Einfrierröhrchen überführt, in denen jeweils 0,5 ml FCS mit 20% DMSO vorgelegt war und in einer Styroporbox auf -80° C abgekühlt. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen in flüssigen Stickstoff überführt.

2.2.3.1.3 Auftauen

Die Zellen aus dem flüssigen Stickstoff wurden zügig aufgetaut und in 10 ml Kulturmedium überführt. Nach dem fünfminütigen Abzentrifugieren bei 1000 Upm. wurden die Zellen noch einmal in 14 ml Kulturmedium gewaschen, um das toxische DMSO zu entfernen und in einer Dichte von 5 x 10⁵ Zellen/ml kultiviert.

2.2.3.2 Reklonierung von Hybridomen

In Kulturmedium resuspendierte Hybridomzellen wurden zu 0,3 Zellen pro Well in eine 96 Well Flachbodenplatte mit 1×10^6 bestrahlten murinen Milzzellen als Feederzellen ausgesät. Angewachsene Zellen wurden als monoklonal betrachtet und mittels ELISA und Immunfluoreszenz auf ihre Antikörperproduktion untersucht und weiterkultiviert.

2.2.3.3 Isolierung muriner Zellen

Zur Isolierung der Splenozyten wurde die Milz unter aseptischen Bedingungen entfernt. Die Zellen wurden durch ein feinmaschiges Stahlsieb von der Organkapsel und größeren Gewebepartikeln getrennt. Die mononukleären Zellen wurden über einen Ficoll-Dichtegradienten angereichert, indem die Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Ficoll (Dichte 1,077 g/ml, Biochrom) vorsichtig unterschichtet wurde. Dann wurde ein Zentrifugationsschritt bei 2000 Upm. für 20 min und ohne Bremse durchgeführt. Die mononukleären Zellen aus der Interphase wurden abgenommen und noch zweimal in Kulturmedium gewaschen.

Zur Isolierung der peripheren Blutzellen wurden die Mäuse mit Äther narkotisiert und mit einer feinen Kanüle wurde aus dem Retroorbitalplexus Blut entnommen. Zur Eliminierung der Erythrozyten wurden ca. 200 μ l Vollblut für zehn Minuten in 6 ml ACK-Lösung einer hypotonen Lyse unterzogen, dann mit 6 ml PBS versetzt und 5 Minuten bei 2000 Upm. abzentrifugiert. Die Zellen wurden noch zweimal in PBS gewaschen und in einer Dichte von 10^6 Zellen pro ml in dem entsprechenden Medium aufgenommen.

C57Bl/6, NOD, Fc γ RIII WT und KO Mäuse unterschiedlichen Geschlechts wurden vier Tage vor Versuchsbeginn mit 0,5 ml Thioglykollatmedium 3% i.p. vorstimuliert. Bei Versuchsbeginn wurden die Peritonealzellen nach Töten der Mäuse durch Spülen des Peritoneums mit 20 ml PBS isoliert und nach dreimaligen Waschen im jeweiligen Versuchsmedium weiterverwendet.

2.2.3.4 FACS Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen

5×10^5 Zellen wurden in 1% BSA / PBS gewaschen und mit 20 μ l der jeweiligen (1: 40 verdünnten) Antikörpersuspension für eine halbe Stunde bei 4°C inkubiert. Zur Blockade wurden Zellen mit 100 μ l der SAS gefällten unmarkierten Antikörpern in sättigenden Konzentration für eine Stunde vorinkubiert. Bei der indirekten Immunfluoreszenz erfolgte zusätzlich die Färbung mit 10 μ g des jeweiligen Sekundärantikörpers (Goat-anti-mouse IgG Fitc-konjugiert (Dianova))/Well nach dreimaligen Waschen in 1% BSA/PBS für eine weitere halbe Stunde bei 4°C. Zuletzt wurden die Zellen dreimal in 1% BSA/PBS gewaschen und in 100 μ l 1% BSA/PBS im FACScan (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) analysiert.

Die Analyse der Zellen erfolgte nach der Zellgröße (Forwardscatter/FSC), der Granularität (Side-Scatter/SSC), bzw. nach der Fluoreszenz (FITC/FL1 (grün) und PE/FL2 (rot)). Bei den meisten Versuchen erfolgte vor der Auswertung der Fluoreszenz ein Gating nach Zellgröße und Granularität, so daß im FSC und SSC definierte Zellpopulationen (wie etwa Monozyten und Lymphozyten) isoliert hinsichtlich ihrer Fluoreszenz ausgewertet wurden. Die Auswertung der Fluoreszenz erfolgte im dot plot, wobei jeder Punkt eine Zelle repräsentiert, die anhand des Ausmaßes ihrer grünen Fluoreszenz und des Ausmaßes ihrer roten Fluoreszenz in einem Diagramm logarithmisch aufgetragen oder in einem eindimensionalen Histogramm dargestellt werden. Bei überlappenden Emissionsspektren in der Zwei-Farben-Immunfluoreszenz wurde elektronisch nach den Angaben des Herstellers kompensiert. Als Bezugswerte dienten Einfachfärbungen. Die mathematische Auswertung erfolgte im WinMDI Programm.

2.2.4 Tierversuche

2.2.4.1 Bestimmung der Rosetting und Phagozytose Kapazität von Peritoneal Makrophagen

Die Peritonealmakrophagen wurden nach der Lavage auf eine Konzentration von 10^6 Zellen/ml Kulturmedium (RPMI/10% FCS) eingestellt. Die Zellen wurden dann zu jeweils 300 μ l/well auf Nunc chamber-slides ausplattiert und für vier Stunden oder über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nicht adhärenente Zellen wurden dann mit warmem PBS mit Calcium und Magnesium gewaschen, woraufhin die Makrophagen mit sättigenden Konzentrationen blockierender Antikörper (100 μ l SAS gefällter anti-Ly-17.1/2 oder 2.4G2) für eine Stunde im Brutschrank inkubiert wurden. In der Zwischenzeit wurden durch Retroorbitalpunktion gewonnene murine Erythrozyten dreimal mit PBS gewaschen und das gleiche Volumen gepackter (pelletierter) Erythrozyten mit SAS gereinigten anti MRBC Antikörper für eine Stunde bei 4° C opsoniert. Für die Opsonierung mit subsättigenden Konzentrationen wurden die Antikörper in 1:10 Schritten mit PBS heruntertitriert, bis die Phagozytosekapazität bei ca. 50% lag. Nach dreimaligem Waschen der Makrophagen und Erythrozyten wurden 5 μ l gepackte MRBC in 200 μ l PBS/Ca/Mg pro well auf die Zellen gegeben. Für den Phagozytose Assay wurde eine Stunde im Brutschrank inkubiert, während für den Rosettierungs Assay die gleiche Zeit bei 4° C inkubiert wurde um die Phagozytose zu inhibieren. Die nicht phagozytierten Zellen im Phagozytose Assay wurden dann durch eine zehninütige ACK Behandlung lysiert, während die nicht rosettierten MRBC im Rosettierungs Assay durch vorsichtiges Spülen mit PBS/Ca/Mg entfernt wurden. Die chamber-slides wurden dann gewaschen und mit 100% Methanol fixiert.

Die Färbung der chamber-slides erfolgte nach Pappenheim mit Giemsa und Eosin Färbelösung. Die luftgetrockneten Ausstriche wurden für 3 bis 5 Minuten in May-Grünwald-Lösung (Riedel de Haen) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit dest. H₂O abgespült. Die Färbung mit Giemsa-Gebrauchslösung (80 ml Zitronensäurephosphatpuffer für Giemsa wurde mit 5 ml Giemsa Lösung (Riegel de Haen) vermischt) erfolgte über 20 Min. bei Raumtemperatur.

2.2.4.2 Induktion einer experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie

Zur Anämieinduktion wurden aufgereinigte Antikörper in einem Volumen von 500 µl pro Maus intraperitoneal injiziert. Zur Bestimmung der Dosis wurden die Mäuse zunächst gewogen und dann mit der entsprechenden Menge der Antikörper bezogen auf das Körpergewicht (zur Induktion einer letalen oder transienten AIHA) behandelt. Bei der zeitlichen Verlaufsbeobachtung des Hämatokrits wurden vor Injektion und für 10 Tage alle 24 Std. den Mäusen etwa 50 bis 75 µl Blut aus dem Retroorbitalplexus entnommen und der Hämatokrit in Standardhämatokritröhrchen (Brand) nach Zentrifugation (Haereaus Biofuge 2) entsprechend den Angaben des Herstellers gemessen. Für einige Versuche wurde lediglich am Tag 4. Blut zur Hämatokritbestimmung entnommen.

Zur Ly-17 Blockade (anti-FcγRII) wurde den Mäusen 250 µg anti-Ly-17.2 Antikörper 24 Stunden vor Induktion der Anämie, sowie am Tag 2 appliziert. Zur Komplementdepletion wurde den Mäusen 10 µg Cobra venom Faktor (CVF) 24 Stunden vor und 48 Stunden nach Antikörperapplikation intraperitoneal appliziert. Zur Überprüfung der Effizienz der Komplementdepletion wurde die Komplementaktivität im Serum nach CVF bzw. PBS Applikation gemessen.

2.2.4.3 Histologie und Immunhistologie von murinen Organen

Zur Erstellung der Histologie und Immunhistologie wurden die Tiere am Tag 2. bzw. am Tag 4. getötet und Leber und Milz entnommen. Zur Anfertigung von Parafinschnitten für die HE-Färbung wurden die Organe in 4% Formalin haltigem Sörensen Puffer gelagert und 24 Stunden vor der Parafineinbettung in 70% Alkohol überführt. Vor der Parafineinbettung erfolgte die Entwässerung über eine aufsteigende Ethanolreihe im Einbettungsautomaten (Citadel 1000 Shannon) über 24 h. Die entwässerten Gewebe wurden in Paraffin eingebettet

und mit einem Mikrotom in etwa 5 µm dicke Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger aufgebracht. Anschließend erfolgte die Färbung der Paraffinschnitte in Hämatoxin und Eosin.

Für die Immunhistologie wurden die Organe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Kryostatschneider auf die Objektträger gebracht. Vor der Färbung wurden die Objektträger 10 Min. bei -20°C in Methanol-Aceton (1/1) fixiert und anschließend mit TBS gespült. Der primäre Antikörper (Mac-1, 1:250 in PBS verdünnt) wurde aufgetragen und in feuchter Kammer für 30 min. inkubiert. Nach dem Abspülen des Primärantikörpers mit TBS wurde der Sekundärantikörper (Dako, Z494, 1:100 verdünnt in PBS) aufgetragen und 30 Min. inkubiert und anschließend mit TBS gespült. Danach wurde der tertiäre Antikörper (Dako, D488, APAAP, 1:100 verdünnt in PBS) aufgetragen und ebenfalls für 30 Min. inkubiert und mit TBS abgespült. Die letzten beiden Schritte wurden noch einmal mit einer Inkubationszeit von 15 Min. wiederholt. Für die Benzidinfärbung wurden 80 µl 3% H₂O₂ mit 4 ml TBS und 160 µl Benzidin (Sigma, D-5637) vermischt und für 10 Min. auf die Präparate aufgetragen. Nach Spülung mit TBS wurde das Substrat aufgetragen (Dako, Fast Red) und 15 bis 30 Minuten auf den Präparaten inkubiert. Nach dem Abspülen wurde für 30 bis 60 Sek. mit Hämatoxin (1:2 in PBS verdünnt) gegengefärbt und durch zehnmaliges tauchen in 0,2% Ammoniakwasser die für den blauen Farbstoff notwendige pH-Änderung durchgeführt. Nach der abschließenden Spülung in Leitungswasser wurden die Präparate mit Glycergel (Dako) eingedeckt.

Die Auswertung der Immunhistologien erfolgte durch Auszählen der Anzahl der Benzidin und Peroxidase positiven Zellen pro mm² des histologischen Präparats.

2.2.4.4 Bestimmung der Komplementaktivität von Mausserum

Die Bestimmung der Komplementaktivität aus murinem Serum erfolgte nach einem modifiziertem Protokoll von Van Dijk et. al. (1980).

Kaninchenerythrozyten (RaRBC) wurden 1:2 in Alsever Lösung aufgenommen und in VSB-EDTA Lösung dreimal gewaschen. 3×10^8 RaRBC wurden für dreißig Minuten mit hitzeinaktivierten (30 Min. bei 56°C) Goat-anti-RaRBC Antiserum (Cappel, 1:10 verdünnt) im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen in VSB²⁺ Puffer wurden 15×10^6 RaRBC in 100 µl/Well auf eine 96-well-Flachbodenplatte zusammen mit 200 µl Mausserum in verschiedenen Konzentrationen, bzw. 200 µl Aqua dest und 200 µl VSB²⁺ Puffer für 90 Min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Abzentrifugieren wurden 200 µl des Überstandes abgenommen und auf einer 96-well-NUNC-Maxisorb-Flachbodenplatte im ELISA-Reader bei 405 nm gemessen. Die relative Hämoglobinfreisetzung wurde aus der Extinktion der Freisetzung bei Serumzugabe abzüglich der Freisetzung in VSB²⁺ Puffer ermittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen den mFc γ RII

Anfang der 80er Jahre konnte gezeigt werden, daß der mFc γ RII in zwei Allelen exprimiert wird, die sich in zwei Aminosäuren der zweiten extrazellulären Domäne unterscheiden (Abb 1.3). Dies wurde zum einen durch molekularbiologische Untersuchungen der genomischen Sequenzen dieses Bereiches durchgeführt. Zum anderen wurden monoklonale Antikörper entwickelt, mit denen der Ly-17 Polymorphismus auf Proteinebene unterschieden werden kann. In den folgenden Untersuchungen sollte gezeigt werden, daß diese Antikörper nicht nur spezifisch für den Fc γ RII Polymorphismus sind, sondern auch selektiv an den Fc γ RII und nicht an den Fc γ RIII binden. Die monoklonalen Antikörper anti-Ly-17.1 (Klon K75.325) und anti-Ly-17.2 (K9.361) wurden aus Hybridomüberständen mit gesättigtem Ammoniumsulfat (SAS) gefällt und für einige Anwendungen über Protein A Säulen weiter aufgereinigt.

3.1.1 Kreuzblockade Experimente mit anti-Ly-17 mAk und 2.4G2 auf typischen Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zellen

Da anti-Ly-17 mAk mit der Bindungsstelle des mAk 2.4G2 kompetitieren, kann durch die Vorinkubation mit unmarkierten anti-Ly-17 Antikörpern die Fluoreszenz durch FITC markierte 2.4G2 Färbung inhibiert werden. Der aus der Ratte stammende 2.4G2 färbt in gleichem Maße Fc γ RII und Fc γ RIII. In Abbildung 3.1 wurden primäre Zellen aus Ly-17.1 (129, Abb. 3.1 B und D) und Ly-17.2 (C57Bl/6, Abb. 3.1 A, C, E und F) positiven Tieren verwendet. Die Zellen wurden zunächst in einer Doppelfluoreszenz mit zelltypspezifischen Markern angefärbt und auf die positive Population gated, die in einem Histogramm für FITC Intensität dargestellt ist. Verglichen wird hier jeweils die Vorinkubation mit unmarkierten anti-Ly-17.1/2 (durchgezogene Linie) und

2.4G2 mAk (gepunktete Linie) mit der unblockierten 2.4G2 Färbung (gestrichelte Linie).

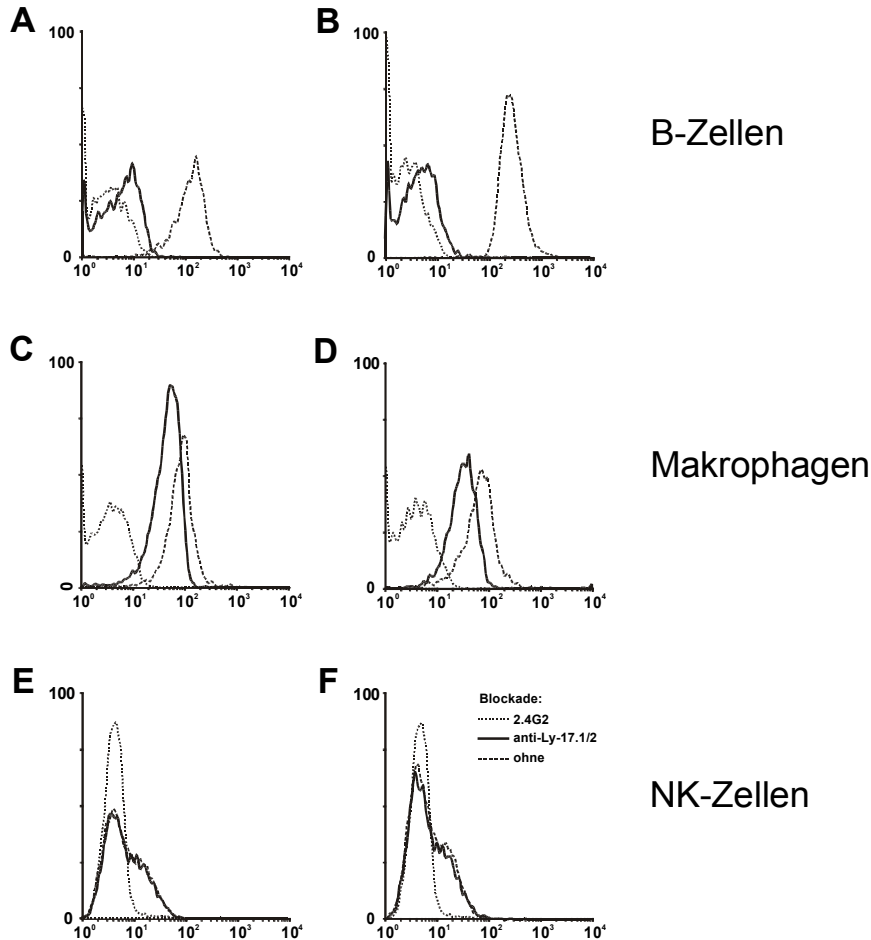


Abb 3.1: Kreuzblockade der 2.4G2-FITC Färbung typischer Fc γ -Rezeptor exprimierender Zellen durch anti-Ly-17 mAk.

Primäre Zellen aus Ly-17.1 (B und D) und Ly-17.2 (A, C, E und F) positiven Tieren wurden mit den zelltypspezifischen Markern B220 für periphere B-Zellen (A und B), Mac-1 für Thioglycollat induzierte Peritoneal-Makrophagen (C und D) und NK1.1 für IL-2 aktivierte NK-Zellen (E und F) gated. Dargestellt ist ein Histogramm der FITC Intensität der 2.4G2-FITC gefärbten positiven Populationen.

Die B220 positiven peripheren B-Zellen (Abb. 3.1 A und B) exprimieren als einzigen Fc γ -Rezeptor den Fc γ RII. In Abbildung 3.1 A und B zeigt sich, daß sowohl durch anti-Ly-17.1, als auch durch anti-Ly-17.2 Blockade die 2.4G2-FITC Färbung fast komplett inhibiert werden kann.

Auf den Mac-1 positiven Thioglykollat induzierten Peritoneal-Makrophagen werden alle drei Fc γ -Rezeptorklassen exprimiert. Eine Vorinkubation mit anti-

Ly-17 Antikörpern ergibt hier lediglich eine Reduktion der Fc γ RII und Fc γ RIII spezifischen 2.4G2 Färbung (Abb 3.1 B und C).

Der einzige Fc γ -Rezeptor auf den NK1.1 positiven IL-2 aktivierten NK-Zellen ist der Fc γ RIII, der nicht dem Ly-17 Polymorphismus folgt, weshalb hier für die anti-Ly-17.1 und anti-Ly-17.2 Blockade Zellen aus C57Bl/6 Mäusen benutzt wurden (Abb. 3.1 E und F). Weder durch die Vorinkubation mit anti-Ly-17.1 noch mit anti-Ly-17.2 mAk kann auf diesen Zellen die Bindung des 2.4G2 an den Fc γ RIII inhibiert werden.

3.1.2 FACS Analyse der Ly-17.2 Expression in der direkten Immunfluoreszenz

Um die Expression des von anti-Ly-17 Antikörpern erkannten Epitopes zu untersuchen, wurde der anti-Ly-17.2 mAk durch Affinitätschromatographie an einer Protein A Säule aufgereinigt und mit FITC konjugiert. In einer Doppelfluoreszenz wurde dann die Expression von Ly-17.2 und 2.4G2 verglichen (Abb 3.2).

Bei der Doppelfluoreszenz zeigte sich, daß die Ly-17.2 Färbung von B220 positiven peripheren B-Zellen völlig der 2.4G2 Färbung entsprach. Der Fc γ RII, der den einzigen Fc γ -Rezeptor auf B-Zellen repräsentiert, wurde also in gleichem Maße von anti-Ly-17.2 und 2.4G2 mAk gefärbt (Abb. 3.2 A und B).

Auf Thioglykollat induzierten Peritoneal-Makrophagen zeigte sich wiederum ein abweichendes Muster. Auf diesen Fc γ RII und Fc γ RIII koexprimierenden Zellen war die anti-Ly-17.2 Färbung im Gegensatz zur 2.4G2 Färbung auf etwa 20% reduziert (Abb. 3.2 C und D).

Der Fc γ RIII, der den einzigen Fc γ -Rezeptor auf den NK1.1 positiven IL-2 aktivierten NK-Zellen darstellt wurde hingegen nicht durch anti-Ly-17.2 Antikörper erkannt, wohl aber durch 2.4G2.

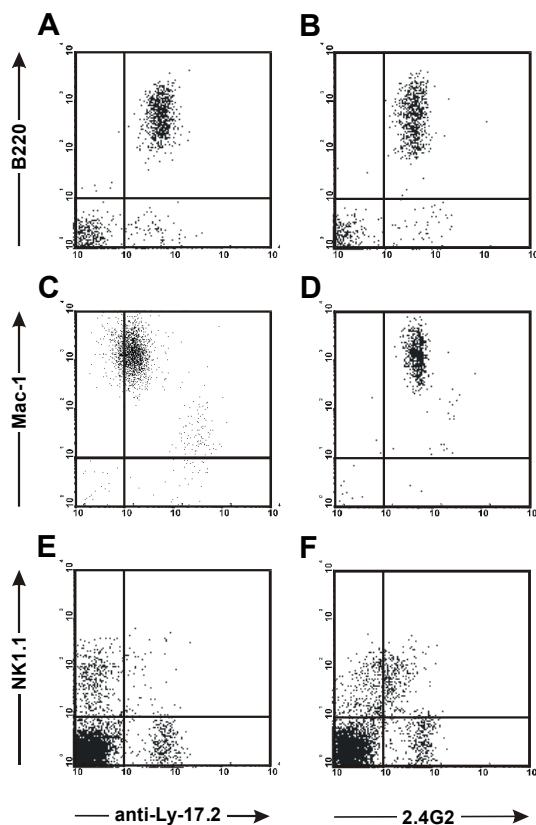


Abb 3.2: Direkte Immunfluoreszenz PE markierter zelltypspezifischer Marker gegen FITC markierte 2.4G2 und anti-Ly-17.2 mAb.

Primäre Zellen aus C57Bl/6 Mäusen (Ly-17.2^+) wurden mit den zelltypspezifischen Markern B220 für periphere B-Zellen (A und B), Mac-1 für Thioglycollat induzierte Peritoneal-Makrophagen (C und D) und NK1.1 für IL-2 aktivierte NK-Zellen (E und F) PE gefärbt. Die FITC Gegenfärbung wurde mit anti-Ly-17.2 (A, C und E) und 2.4G2 (B, D und F) durchgeführt.

3.1.3 Untersuchung der Ly-17 Expression auf $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ defizienten Makrophagen

Um die naheliegende $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ Spezifität der anti-Ly-17 Antikörper weiter zu verifizieren, wurden Thioglykollat aktivierte Makrophagen aus $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ defizienten Mäusen isoliert und in der Doppelfluoreszenz mit Makrophagen aus $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ knock-out (Ly-17.1^+) und C57Bl/6 (Ly-17.2^+) Mäusen verglichen (Abb 3.3).

Im Vergleich mit der 2.4G2-FITC Färbung (Abb 3.3 A, D und G) zeigte sich bei anti-Ly-17.1-FITC und anti-Ly-17.2-FITC ein abweichendes Muster. Während die anti-Ly-17.2 Färbung auf den $\text{Fc}\gamma\text{RII}$ und $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ koexprimierenden C57Bl/6 Makrophagen reduziert war, (siehe Abb 3.2 C) wurden die Ly-17.1^+ $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ knock-out Zellen nicht gefärbt. Die anti-Ly-17.1 Antikörper erzielten auf $\text{Fc}\gamma\text{RIII}$ knock-out Makrophagen annähernd die gleiche

Färbung wie 2.4G2, da der einzig verbliebene niedrig affine Fc γ -Rezeptor auf diesen Zellen der Fc γ RII ist. Auf den Ly-17.2⁺ C57Bl/6 Makrophagen ließ sich keine anti-Ly-17.1 Färbung nachweisen.

Obwohl sich mit 2.4G2 eine sehr ausgeprägte Färbung der Fc γ RII defizienten Makrophagen erzielen ließ, die die Expression von Fc γ RIII auf diesen Zellen reflektiert, konnte weder mit anti-Ly-17.1, noch mit anti-Ly-17.2 eine FITC Färbung erzielt werden. Die Expression von Ly-17 folgt also dem Muster des Fc γ RIII und nicht des Fc γ RII.

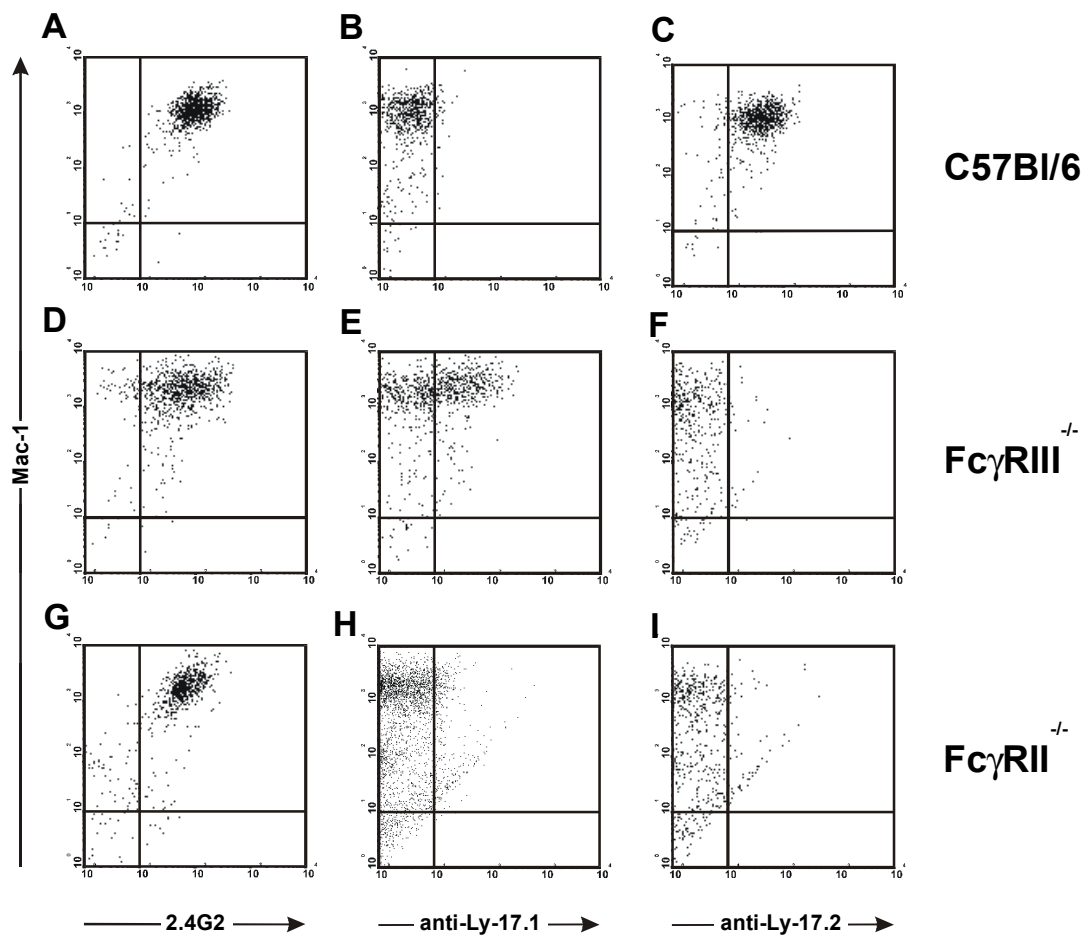


Abb. 3.3: Doppelfluoreszenz mit Thioglykollat aktivierten Peritoneal-Makrophagen aus Fc γ RII knock-out Mäusen im Vergleich mit Fc γ RIII defizienten und C57Bl/6 Tieren.

Thioglykollat aktivierte Peritoneal-Makrophagen aus C57Bl/6 (A-C), Fc γ RIII^{-/-} (D-F) und Fc γ RII^{-/-} Mäusen wurden mit Mac-1-PE gefärbt und mit 2.4G2-FITC (A, D und G), anti-Ly-17.1-FITC (B, E und H) und anti-Ly-17.2-FITC (C, F und I) gegengefärbt.

3.2 Funktionelle Untersuchungen mit Fc γ RII spezifischen anti-Ly-17 Antikörpern

Da die anti-Ly-17 Antikörper neben ihrer Kompetition mit der Bindungsstelle für 2.4G2 wie dieser auch in der Lage sind die Ligandenbindung des Fc γ RII zu inhibieren, konnten durch Rezeptorblockade weitere Untersuchungen bezüglich der Funktion des Fc γ RII in-vivo und in-vitro durchgeführt werden.

3.2.1 Bindung von Immunkomplexen an Makrophagen

Um die Bindung definierter Immunkomplexe an verschiedene Klassen von Fc γ -Rezeptoren zu untersuchen, wurden murine Erythrozyten (MRBC) mit murinen anti-MRBC monoklonalen Antikörpern opsoniert. Die pelletierte Erythrozytensuspension wurde zu gleichen Teilen mit SAS gereinigter Antikörper Lösung inkubiert um eine maximale Absättigung aller Epitope auf den MRBC zu erreichen. Als Fc γ -Rezeptor exprimierende Effektorzelle wurden Peritonealmakrophagen gewählt, die vier Tage zuvor durch eine intra-peritoneale (i.p.) Injektion mit 3% Thioglykollat aktiviert wurden. Die Makrophagen adhärten über Nacht an Nunc Chamber-slides und wurden dann mit IgG1 (105-2H) opsonierten MRBC bei 4° C inkubiert, um eine Bindung der komplexierten IgG1 Antikörper an die Fc γ -Rezeptoren zu ermöglichen und die Phagozytose der MRBC auszuschließen.

In Abb 3.4 ist die Rosettierung IgG1 opsonierter MRBC an Makrophagen dargestellt, die mit anti-Ly-17 Antikörpern blockiert (Abb 3.4 B und D) oder nicht vorinkubiert (Abb 3.4 A, C und E) wurden. Bei C57Bl/6 Zellen hat die Fc γ RII Blockade durch anti-Ly-17.2 keinen Einfluß auf die Rosettierungskapazität (Abb 3.4 A und B), ähnlich wie bei Fc γ RII defizienten Makrophagen, die eine normale Rosettierung aufweisen (Abb. 3.4 E). Auch nicht vorbehandelte Fc γ RIII defiziente Makrophagen binden IgG1 opsonierte MRBC unverändert (Abb 3.4 C), zeigen aber einen starken Abfall der Bindung, wenn zusätzlich der Fc γ RII durch anti-Ly-17.1 Antikörper blockiert wird (Abb 3.4 D). Die Bindung IgG1

opsonierter MRBC erfolgt also über den Fc γ RII sowie den Fc γ RIII, nicht jedoch über den Fc γ RI.

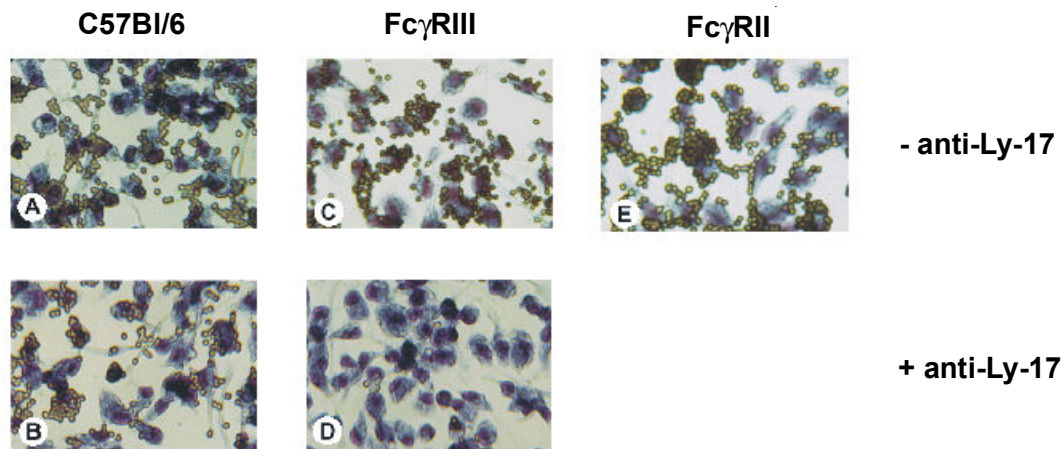


Abb 3.4: Rosettierung von IgG1 opsonierten MRBC an Thioglykollat induzierte Peritoneal-Makrophagen.

Makrophagen aus C57Bl/6 (A und B), Fc γ RIII^{-/-} (C und D) und Fc γ RII^{-/-} (E) Mäusen wurden mit anti-Ly-17 Antikörpern vorinkubiert (B und D) oder nicht blockiert (A, C und E) und mit vollständig mit IgG1 opsonierten MRBC inkubiert.

3.2.2 Rosettierung und Phagozytose IgG1 opsonierter MRBC durch Thioglykollat induzierte Makrophagen

Neben der passiven Bindung der IgG1 opsonierten MRBC wurde auch das Phagozytoseverhalten der Makrophagen ermittelt. Die Zellen wurden hierzu bei 37° C für eine Stunde mit den Erythrozyten inkubiert, woraufhin eine hypotone Lyse der nicht phagozytierten MRBC durchgeführt wurde.

In Abbildung 3.5 ist die quantitative Auswertung der Rosettierung und Phagozytose von vollständig mit IgG1 opsonierten MRBC dargestellt. Abbildung 3.5 A verdeutlicht die qualitative Aussage aus Abbildung 3.4. Bei unblockierten Makrophagen aus wildtyp und Fc γ RIII defizienten Tieren kam es zu einer nahezu vollständigen Ausschöpfung der Rosettierungskapazität (positiv waren Zellen mit ≥ 3 rosettierten Erythrozyten). Die Blockade des Fc γ RII durch anti-Ly-17 Antikörper veränderte das Bindungsverhalten von IgG1 an wildtyp Zellen nicht signifikant, während auf Fc γ RIII defizienten Makrophagen die Rosettierung nahezu komplett inhibiert wurde. Zusätzlich wurde gezeigt, daß die Blockade von Fc γ RII und Fc γ RIII durch den mAk 2.4G2 auch auf wildtyp

Makrophagen die Bindung von IgG1 opsonierten MRBC komplett inhibieren kann.

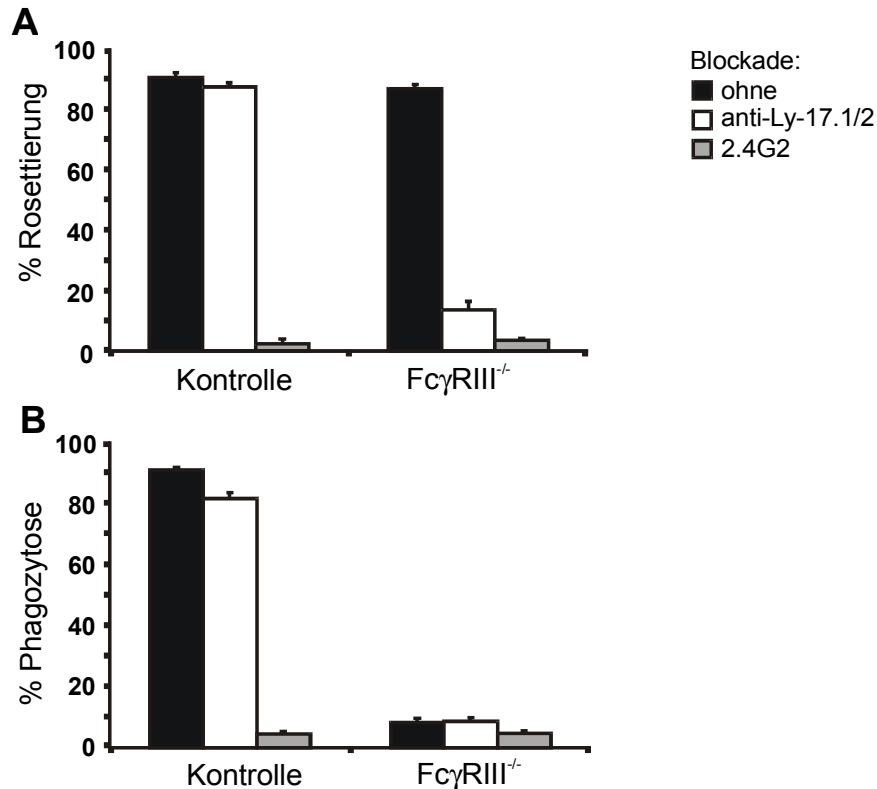


Abb 3.5: Quantifizierung der Rosettierung und Phagozytose von IgG1 opsonierten MRBC durch Thioglykollat induzierte Makrophagen.

Makrophagen aus Kontroll-Tieren und FcγRIII defizienten Mäusen wurden mit anti-Ly-17 Antikörpern, bzw. 2.4G2 vorinkubiert oder nicht blockiert. Die Zellen wurden mit vollständig mit IgG1 opsonierten MRBC bei 4° C zur Ermittlung des Rosettierungsgrades (A) oder bei 37° C zur Quantifizierung der Phagozytose (B) inkubiert.

In der Phagozytose stellte sich in Bestätigung früherer Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe heraus, daß FcγRIII defiziente Makrophagen im Vergleich mit dem Wildtyp nicht in der Lage sind, IgG1 opsonierte MRBC zu phagozytieren (positiv bewertet wurden Zellen mit ≥ 1 phagozytierten Erythrozyten). Weiterhin wurde kein Effekt der FcγRII Blockade auf wildtyp und FcγRIII defizienten Zellen gefunden, während die Blockade von FcγRII und FcγRIII auf wildtyp Makrophagen durch 2.4G2 zu einem Verlust der Phagozytose IgG1 opsonierter MRBC führte.

3.2.3 Phagozytose von subopsonierten MRBC nach Fc γ RII Blockade durch anti-Ly-17 Antikörper

Da bei vollständig opsonierten MRBC keine Unterschiede zwischen wildtyp, anti-Ly-17 blockierten sowie Fc γ RII defizienten Makrophagen festzustellen waren, weil sich die Zellen bereits an der oberen Grenze ihrer Phagozytosekapazität befanden, wurde die Opsonierung der MRBC soweit reduziert, daß nur noch ca. 50% der C57Bl/6 Zellen mindestens einen Erythrozyten phagozytierten.

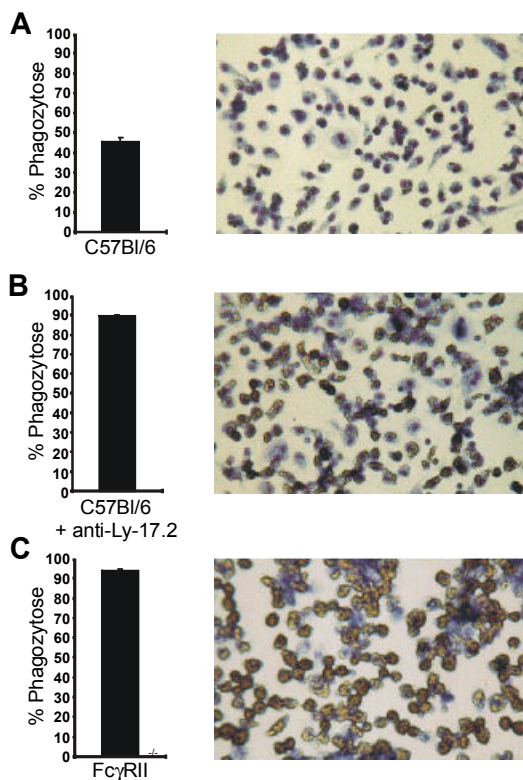


Abb 3.6: Phagozytose von IgG1 subopsonierten MRBC durch Thioglykollat induzierte Makrophagen.

Makrophagen aus C57Bl/6 Mäusen (A) wurden mit anti-Ly-17.2 Antikörpern blockiert (B) und mit Fc γ RII defizienten Zellen verglichen (C). Die Makrophagen wurden mit MRBC inkubiert, die nicht vollständig mit IgG1 opsoniert waren.

In Abbildung 3.6 A ist die Phagozytose von Erythrozyten durch C57Bl/6 Makrophagen dargestellt, die nicht vollständig mit IgG1 opsoniert sind. Man erkennt hier eine deutliche Reduktion der Phagozytose von über 80% (siehe Abb. 3.5) auf unter 50%. Vergleicht man die anti-Ly-17.2 blockierten und Fc γ RII defizienten Zellen, so wird eine Steigerung der Phagozytose auf über 80%

deutlich. Auch zwischen den Fc γ RII blockierten und defizienten Zellen gibt es einen qualitativen Unterschied, da die Makrophagen aus den Fc γ RII knock-out Tieren deutlich mehr Erythrozyten pro Zelle phagozytieren. Diese Differenz läßt sich allerdings unter den gewählten Versuchsbedingungen nicht quantitativ erfassen. Unter diesen Bedingungen wird also ein klarer Einfluß des Fc γ RII auf die IgG1 vermittelte Phagozytose durch Peritonealmakrophagen deutlich, denn sowohl durch die Blockade des Rezeptors, als auch durch die genetische Deletion wird sie stark heraufreguliert.

3.2.4 Fc γ RII Blockade durch anti-Ly-17 Antikörper in der reversen passiven cutanen Arthus Reaktion (PCA)

In der PCA wurden intradermale Injektionen eines Kaninchen anti Ovalbumin Serums in verschiedenen Konzentrationen, direkt gefolgt von einer intravenösen Injektion von Ovalbumin, dem der blaue Farbstoff Evans-blue beigefügt wurde, durchgeführt. Zusätzlich wurden bei einigen Mäusen intradermal anti-Ly-17.2 Antikörper appliziert. Die Tiere wurden dann nach vier Stunden getötet um den Austritt des Farbstoffes an der intradermalen Injektionsstelle in Form des Durchmessers der dermalen Hautfärbung als Maß für die Stärke der Arthus Reaktion zu quantifizieren.

Im Vergleich der Intensitäten der Arthus Reaktion stellte sich heraus, daß sowohl die anti-Ly-17.2 behandelten als auch die Fc γ RII defizienten Tiere deutlich verstärkt auf die induzierte PCA reagieren. Bereits bei einer Antiserum Applikation von 3 μ g, bei der in wildtyp und Fc γ RIII defizienten Tieren noch keine signifikante Evans-blue Färbung zu beobachten war zeigt sich bei den Fc γ RII blockierten und defizienten Mäusen bereits eine Exsudation von über 6 mm, was von wildtyp Tieren erst bei der dreifachen Konzentration erreicht wird. Bei der Gabe von 10 μ g Antiserum zeigt sich dann weiterhin eine Verstärkung der Arthus Reaktion bei anti-Ly-17.2 behandelten (10,75 mm) und Fc γ RII defizienten Tieren (11 mm) im Vergleich mit den C57Bl/6 Mäusen (7,1 mm), während sich bei den Fc γ RIII knock-out Mäusen ein protektiver Effekt einstellt (4,2 mm).

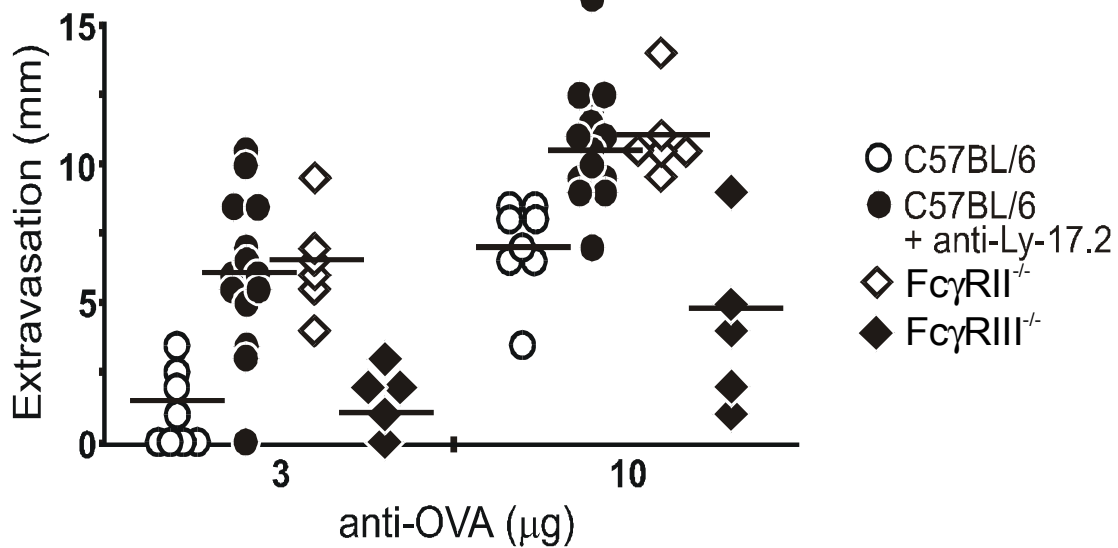


Abb. 3.7: Reverse passive kutane Arthus Reaktion bei verschiedenen Mausstämmen.

C57Bl/6 Mäuse wurden zusammen mit Fc γ RII und Fc γ RIII defizienten Tieren mit drei und zehn μ g anti-Ovalbumin Antiserum behandelt. Bei einigen C57Bl/6 Tieren wurde gleichzeitig der Fc γ RII durch anti-Ly-17.2 Antikörper blockiert. Als Maß für die Intensität der Arthus Reaktion diente der Durchmesser der entsprechenden Evans-blue gefärbten Hautpartie (Die Werte wurden freundlicherweise von Dr. U. Baumann zur Verfügung gestellt).

3.3 Die Bedeutung verschiedener Fc γ -Rezeptorklassen in der experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA)

Frühere Untersuchungen mit anti MRBC Autoantikörpern verschiedener Isotypen haben gezeigt, daß die IgG1 vermittelte AIHA durch den Fc γ RIII auf Kupferzellen der Leber ausgelöst wird. Da IgG1 opsonierte Erythrozyten zwar an den Fc γ RII von Peritoneal-Makrophagen binden, über diesen jedoch nicht phagozytiert werden, sollte untersucht werden welche Rolle der Fc γ RII in der AIHA spielt. Der negative Effekt, den der Fc γ RII auf die Phagozytose durch Peritonealmakrophagen ausübte, hätte auf eine erhöhte Empfindlichkeit von Fc γ RII blockierten Tieren in der AIHA schließen lassen. Im Gegensatz zu IgG1 konnte der Verlauf der durch IgG2a induzierten AIHA durch die Deletion des Fc γ RIII nur teilweise abgeschwächt werden. In weiteren Untersuchungen sollte auch die Rolle anderer Fc γ -Rezeptorklassen in der IgG2a vermittelten AIHA analysiert werden.

Die experimentelle autoimmune hämolytische Anämie wurde durch anti erythrozytäre monoklonale Autoantikörper vom IgG1 und IgG2a Isotyp aus NZB Mäusen ausgelöst. Die mAk 105-2H (IgG1) und 34-3C (IgG2a) wurden aufgereinigt und verschiedenen Fc γ -Rezeptor defizienten und Kontroll Mäusen durch eine einmalige intraperitoneale Injektion appliziert. In einigen Versuchen wurde der Fc γ RII durch die mehrfache intraperitoneale Injektion von anti-Ly-17 Antikörpern in-vivo blockiert. Die pathologischen Manifestationen der AIHA wurden dann durch tägliche Bestimmung des Hämatokrits und durch histologische Untersuchungen der Leber und der Milz zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmt.

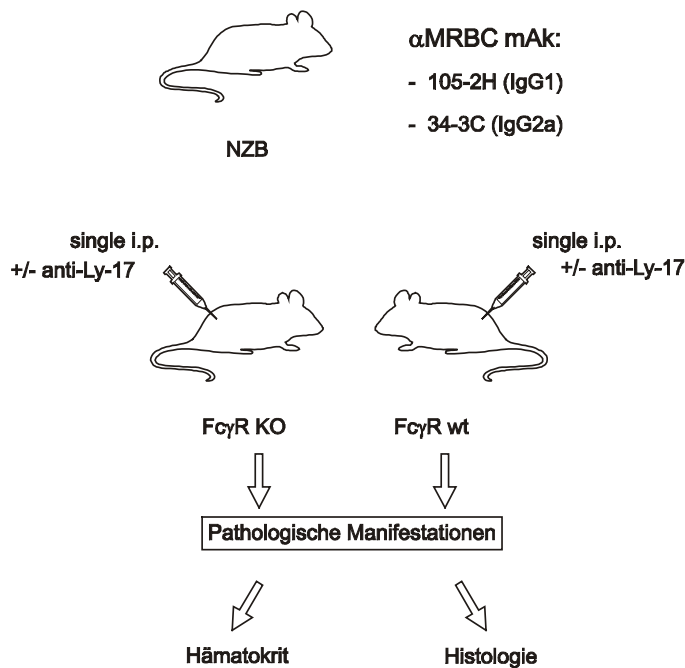


Abb. 3.8: Schematische Darstellung der Induktion einer experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie.

Die aus NZB Mäusen gewonnenen anti MRBC Autoantikörper vom IgG1 und IgG2a Isotyp wurden aufgereinigt und in einer einmaligen intraperitonealen Injektion verschiedenen Fc γ -Rezeptor defizienten und Kontroll Tieren verabreicht. Bei einigen Tieren wurden gleichzeitig anti-Ly-17 Antikörper appliziert. Die Manifestation der AIHA wurde durch den abnehmenden Hämatokrit und die Histologie der Leber und Milz ermittelt.

3.3.1 Hämatokritverlauf in der IgG1 induzierten AIHA nach Fc γ RII Blockade

Um die Rolle des Fc γ RII in der IgG1-Fc γ RIII vermittelten AIHA zu untersuchen wurden C57Bl/6 Mäusen mit anti-Ly-17.2 Antikörpern behandelt und mit Fc γ RII defizienten Mäusen verglichen. Den Tieren wurde eine subletale Dosis des IgG1 anti MRBC Antikörpers 105-2H injiziert und der Hämatokritverlauf wurde durch die tägliche Entnahme von 50 μ l peripherem Blut in Hämatokritröhrchen gemessen. Die Blockade des Fc γ RII in C57Bl/6 Mäusen wurde durch die Injektion von 250 μ g anti-Ly-17.2 Antikörper einen Tag vor und zwei Tage nach der Gabe von 105-2H erzielt.

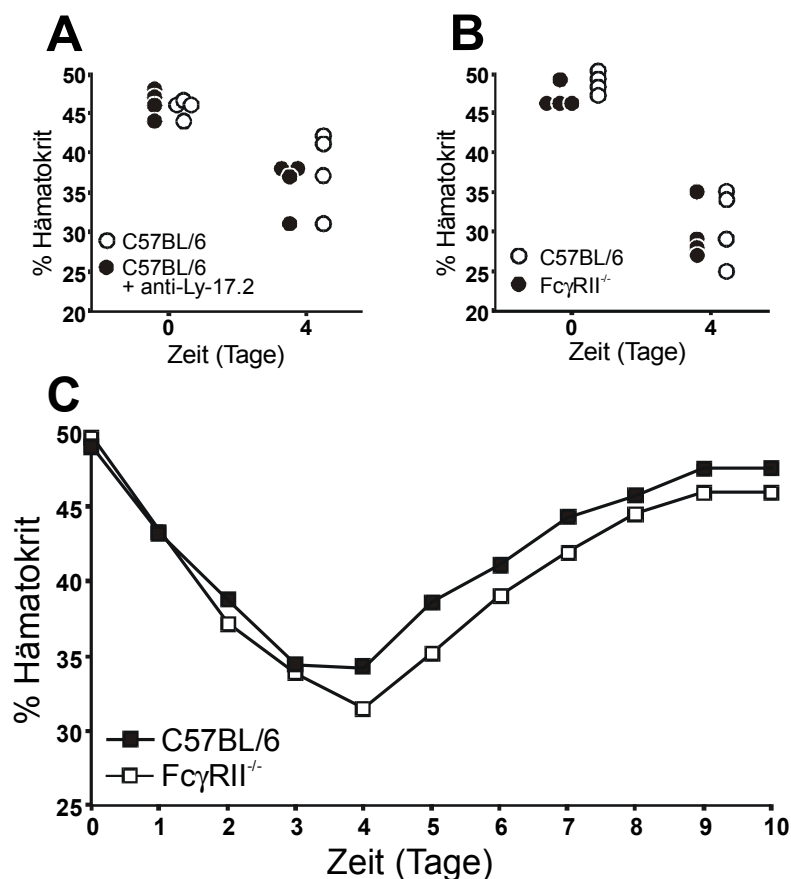


Abb 3.9: Hämatokritverlauf nach der Induktion einer AIHA durch den IgG1 anti MRBC Antikörper 105-2H.

C57Bl/6 und Fc γ RII defiziente Mäuse erhielten eine Dosis von 12 (A), bzw. 15 μ g/gKG 105-2H zur Induktion einer transienten AIHA. Zusätzlich wurde bei vier C57Bl/6 Tieren eine Blockade des Fc γ RII durch anti-Ly-17.2 Antikörper durchgeführt (A). Dargestellt ist der Hämatokrit der Einzeltiere am Tag 0 und der maximale Hämatokritabfall am Tag 4 (A und B), sowie der mittlere zeitliche Verlauf der Hämatokritentwicklung (C).

In Abb. 3.9 A ist der Hämatokrit von acht C57Bl/6 Mäusen am Tag der 105-2H Injektion (Tag 0) und vier Tage danach dargestellt. Die Tiere erhielten eine Dosis von 12 µg/gKG 105-2H, was zu einer transienten AIHA mit einem maximalen Abfall im Hämatokritverlauf am Tag vier führte. Vier der Tiere wurden mit anti-Ly-17.2 Antikörpern behandelt um den FcγRII in-vivo zu blockieren. Die AIHA der unbehandelten Mäuse war am Tag vier mit einem Abfall des Hämatokrits auf 34% nicht von der Ausprägung der Krankheit bei den FcγRII blockierten Mäusen zu unterscheiden, die am Tag vier noch einen Hämatokrit von 37% aufwiesen. Dieser Befund wurde durch die Untersuchungen an FcγRII defizienten Tieren bestätigt (Abb 3.9 B). Da die beiden Gruppen der C57Bl/6 Kontrollen und FcγRII knock-out Tiere mit einer höheren Dosis des 105-2H behandelt wurden (15 µg/gKG), sank der Hämatokrit am Tag vier etwas stärker ab, aber zwischen den vier C57Bl/6 Tieren mit einem mittleren Hämatokrit von 29,7% und den FcγRII^{-/-} Mäusen mit 31,4% wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt. Um auszuschließen, daß der FcγRII einen Einfluß auf die Kinetik der Krankheit hat, wurde bei zwei Gruppen von je neun C57Bl/6 und FcγRII knock-out Mäusen in einem Zeitraum von zehn Tagen täglich der Hämatokrit bestimmt (Abb. 3.9 C). Es stellte sich heraus, daß beide Gruppen mit einem Abfall des Hämatokrits bis zum Tag vier auf die Injektion von 105-2H reagierten wonach sich in nahezu identischer Zeitkinetik die Werte ab Tag sieben wieder normalisierten.

3.3.2 Immunhistologische Untersuchungen der Leber bei der IgG1 induzierten AIHA

Für eine weitere Quantifizierung des Ausmaßes der AIHA wurden Immunhistologien der Leber angefertigt. Jeweils fünf C57Bl/6 und FcγRII knock-out Tiere wurden mit einer Dosis von 15 µg/gKG 105-2H behandelt, woraufhin am Tag zwei die Leber entnommen und kryokonserviert wurde. Die daraus angefertigten Kryostatschnitte wurden mit dem Makrophagen typischen Antikörper Mac-1 gefärbt, während sich die Erythrozyten durch ihre intrinsische Peroxidaseaktivität in der Benzidinfärbung gold-gelb darstellten.

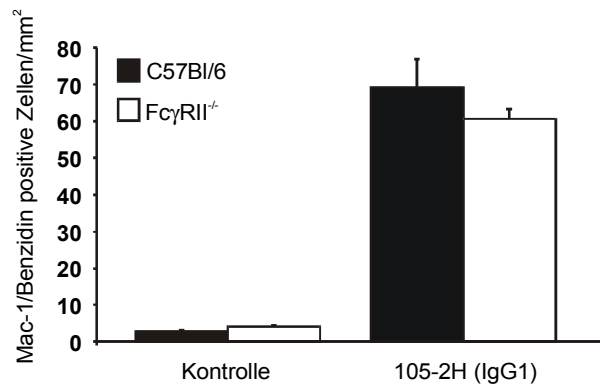


Abb. 3.10: Quantifizierung der Phagozytoseaktivität der Leber am Tag 2 nach der Induktion einer IgG1 vermittelten AIHA.

C57Bl/6 und FcγRII knock-out Mäuse wurden mit einer Dosis von 15 µg/gKG 105-2H IgG1 anti MRBC Antikörper behandelt oder nicht gespritzt (Kontrollen). Zwei Tage nach der Injektion wurden Kryostatschnitte der Leber angefertigt. Nach der Färbung der Schnitte mit Mac-1 und Benzidin wurden die doppelt positiven Leberzellen pro mm² Gewebe ausgezählt. Die Werte wurden freundlicherweise von Iska Janssen-Graalfs zur Verfügung gestellt.

Durch die Auszählung der Leber Makrophagen wurde der Hämatokritverlauf der C57Bl/6 und FcγRII knock-out Tiere bestätigt. Während sich bei unbehandelten Tieren (Kontrolle) kaum phagozytierte Erythrozyten in der Leber fanden, wiesen die anämischen Mäuse über 60 MRBC beladene Makrophagen pro mm² der Leberschnitte auf. Zwischen den C57Bl/6 und den FcγRII knock-out Tieren kam es jedoch auch in der Leber zu keinen signifikanten Unterschieden.

3.3.3 Rückkreuzung des NOD-FcγRI Defektes in die FcγRIII knock-out Maus

Während vorhergehende Studien gezeigt haben, daß die IgG1 vermittelte AIHA ausschließlich vom FcγRIII beeinflusst wird, zeigte sich für IgG2a ein anderer Verlauf. Sowohl in der in-vitro Phagozytose als auch im in-vivo AIHA Modell wurde durch die Deletion des FcγRIII hier nur ein sehr partieller Protektionseffekt erreicht. Um genauer zu überprüfen, welche anderen Rezeptoren in IgG2a vermittelte Effektorprozesse involviert sind, wurde die NOD Maus in unsere Untersuchungen einbezogen. NOD Mäuse haben, neben anderen Mutationen, eine Deletion von vier Basenpaaren in der kodierenden Region für die zytoplasmatische Domäne des FcγRI. Diese Mutation führt durch

die Verschiebung des Leserasters zur Entstehung eines neuen Stopkodons und somit zum Verlust von über 75% der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors. Diese Trunkation ist assoziiert mit der Inhibition der Internalisierung von extrazellulär gebundenem IgG2a und erzeugt somit einen funktionellen Defekt des Fc γ RI. Um einen definierten Defekt der α -Ketten von Fc γ RI und Fc γ RIII zu erzeugen wurde die mutante Form des NOD-Fc γ RI in die Fc γ RIII knock-out Maus eingekreuzt.

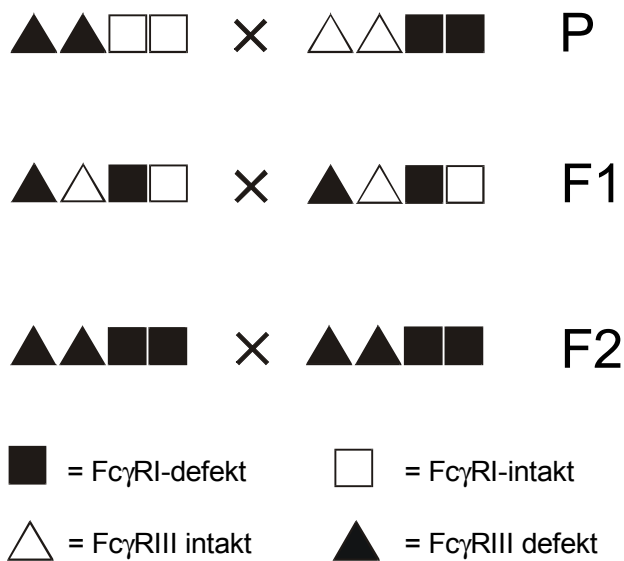


Abb. 3.11: Rückkreuzung Fc γ RIII defizienter Tiere mit NOD Mäusen zur Erstellung eines Fc γ RI und Fc γ RIII doppelt defekten Mausstammes.

NOD und Fc γ RIII knock-out Mäuse wurden zunächst gekreuzt, um eine doppelt heterozygote F1-Generation zu erhalten. Bei der Rückkreuzung der F1-Generation entstehen in einer Frequenz von 1:16 doppelt homozygote Tiere, so daß sich statistisch unter mindestens 32 Tieren ein homozygoten Pärchen in der F2-Generation befindet. Diese Tiere wurden eingesetzt um einen doppelt homozygoten Mausstamm für Fc γ RI und Fc γ RIII aufzubauen.

Die Strategie zur Erstellung eines doppelt defizienten Mausstammes für Fc γ RI und Fc γ RIII ist in Abbildung 3.11 schematisch dargestellt zunächst wurde eine Kreuzung von NOD und Fc γ RIII knock-out Mäusen durchgeführt, um eine F1-Generation zu erhalten, die heterozygot für beide Merkmale ist. Aus der Rückkreuzung dieser F1-Generation entstehen theoretisch doppelt homozygote Tiere mit einer Frequenz von 1:16, so daß unter mindestens 32 F2-Tieren ein doppelt homozygoten Pärchen sein sollte. Aus diesen Tieren der resultierenden F2-Generation wurde dann ein Pärchen für den Aufbau eines Fc γ RI und Fc γ RIII defekten Mausstammes benutzt.

Die Analysen zur Detektion der Rezeptordefekte wurden an genomischer DNA durchgeführt, die aus den Schwanzspitzen der entsprechenden Tiere gewonnen wurde. Für die Fc γ RIII Deletion wurde eine PCR Diagnostik entworfen, die auf der Strategie in der Herstellung des knock-outs basiert. Durch das Konstrukt für die homologe Rekombination der Fc γ RIII spezifischen Sequenzen wurden die zweite extrazelluläre und Teile der transmembranen Domäne durch ein Resistenzgen gegen Hygromycin ausgetauscht. Für eine spezifische PCR gegen beide Varianten des Fc γ RIII wurden Primer konstruiert, die spezifisch für Sequenzen des Hygromycin Resistenzgens sind (KO), also nur an die genomische DNA der knock-out Variante binden, sowie Primer mit einer Spezifität gegen die Sequenzen der transmembranen Domäne (WT), die in den knock-out Tieren ersetzt wurden, die also nur an der DNA der wildtyp Variante binden können. Beide sense Primer wurden mit einem gemeinsamen antisense Primer eingesetzt, der 3' gelegene Sequenzen erkennt, die in beiden Varianten vorhanden sind.

In Abbildung 3.12 sind die Agarosegel elektrophoretischen Untersuchungen von drei exemplarisch untersuchten Tieren der F2-Generation dargestellt, die sich als homozygot für die Fc γ RIII Deletion erwiesen. Insgesamt wurde 62 Tiere untersucht, von denen sich 15 als homozygote Träger des Fc γ RIII Defektes erwiesen. In den Kontrollen in den rechten sechs Spuren wird deutlich, daß in Tieren, die ausschließlich die nicht mutierte Variante enthielten (+/+) kein Fragment mit dem KO sense Primer amplifiziert werden konnte, während in den homozygoten Trägern des Fc γ RIII knock-out Genes (-/-) die entsprechenden WT sense Primer nicht binden konnten. Nur in Mäusen die heterozygot jeweils ein wildtyp und ein knock-out Allel trugen (+/-) wurden beide Fragmente, das 505 Basenpaare lange wildtyp und das 572 Basenpaare lange knock-out Fragment amplifiziert.

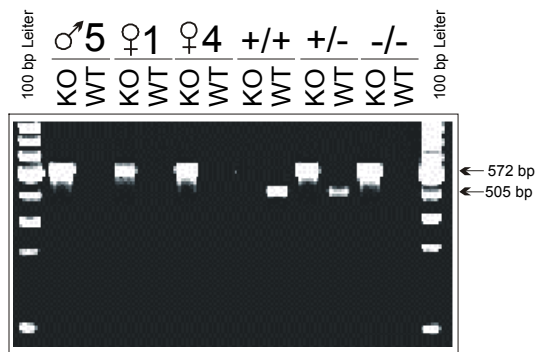


Abb. 3.12: PCR Analyse der Fc γ RIII Deletion in Tieren der F2-Generation der Rückkreuzung von NOD und Fc γ RIII knock-out Mäusen.

Durch den Einsatz spezifischer sense Primer gegen das bei knock-out Tieren inserierte Hygromycin Resistenzgen (KO), bzw. die entsprechenden wildtyp Sequenzen der transmembranen Domäne (WT) mit einem gemeinsamen antisense Primer wurden Fragmente amplifiziert die eine Länge von 505 und 572 Basenpaaren für das knock-out, respektive das wildtyp Allel aufwiesen. Die genomische Existenz des Alleles mit der Fc γ RIII Deletion oder der nicht mutierten Variante, bzw. in heterozygoten Tieren beider Allele wurde durch die Auftrennung auf einem Agarosegel nachwiesen.

Für die Mutation des NOD-Fc γ RI mußte die genomische Deletion von vier Basenpaaren nachgewiesen werden. Die bei der Untersuchung der 62 F2-Tiere gefundenen homozygoten Fc γ RIII defizienten Tiere wurden hierzu in einer weiteren PCR analysiert. Es wurde ein Fragment aus der kodierenden Region für die zytoplasmatische Domäne des Fc γ RI amplifiziert, das bei der wildtyp 184 und bei der NOD Variante 180 Basenpaare lang ist. Wegen des geringen Größenunterschiedes beider Allele durch die nachzuweisende Mutation wurden die Fragmente auf einem Polyacrylamid Gel aufgetrennt und für die Detektion radioaktiv markiert.

In Abbildung 3.13 ist das Autoradiogramm von fünf Männchen und vier Weibchen aus der Gruppe der 15 homozygoten Fc γ RIII defizienten F2-Tiere dargestellt. In den rechten drei Spuren befinden sich Kontrollen, in denen die PCR Fragmente aus der DNA einer NOD Maus (-/-), einer Fc γ RIII knock-out Maus (+/+) und einer Mischung beider DNA Proben (+/-) aufgetragen wurden. Banden unterhalb der 180 Basenpaar Markierung sind wahrscheinlich Degradationsprodukte. Man erkennt, daß drei Tiere homozygot für die vier Basenpaar Deletion des NOD Genotyps des Fc γ RI sind (Männchen 5, Weibchen 1 und 4), während Männchen 3 homozygot das wildtyp Allel trägt und die anderen Tiere heterozygot für das Fc γ RI Allel sind. Aus den drei

homozygoten Tieren wurden dann die Zuchtpaare für einen kombinierten Fc γ RI und Fc γ RIII defekten Mausstamm aufgebaut.



Abb. 3.13: Autoradiogramm der PCR Analyse des NOD-Fc γ RI Defektes in Tieren der F2-Generation der Rückkreuzung von NOD und Fc γ RIII knock-out Mäusen.

Aus genomischer DNA der untersuchten Tiere wurden PCR Fragmente amplifiziert, die die vier Basenpaar Deletion des NOD-Fc γ RI Genotyps beinhalten. Die Fragmente wurden zur Detektion radioaktiv markiert und auf einem Polyacrylamid Gel aufgetrennt. Dargestellt ist das Autoradiogramm von neun untersuchten Tieren und der Kontroll Fragmente.

3.3.4 In-vitro Phagozytose IgG2a opsonierter MRBC durch Thioglykollat aktivierte Makrophagen

Zur Untersuchung der Phagozytosekapazitäten der verschiedenen Fc γ -Rezeptor defekten Makrophagen wurden zunächst in-vitro Phagozytose Assays mit Thioglykollat aktivierten Peritonealmakrophagen durchgeführt. Hierzu wurden MRBC in sättigenden Konzentrationen mit dem anti MRBC IgG2a Antikörper 34-3C opsoniert und dann für eine Stunde bei 37° C mit den Makrophagen inkubiert. Nach der hypotonen Lyse nicht phagozytierter MRBC wurden wieder Makrophagen mit mehr als einem phagozytierten Erythrozyten als positiv bewertet.

In Abbildung 3.14 ist die Phagozytose verschiedener Fc γ -Rezeptor defekter Zellen mit und ohne Blockade von Fc γ RII und Fc γ RIII durch Vorinkubation mit 2.4G2 dargestellt. Im Vergleich mit C57Bl/6 Zellen zeigt sich bei den Fc γ RIII defizienten Makrophagen kein signifikanter Unterschied in der Phagozytoseaktivität und auch die Blockade von Fc γ RII und Fc γ RIII durch 2.4G2 verändert nicht die Phagozytose.

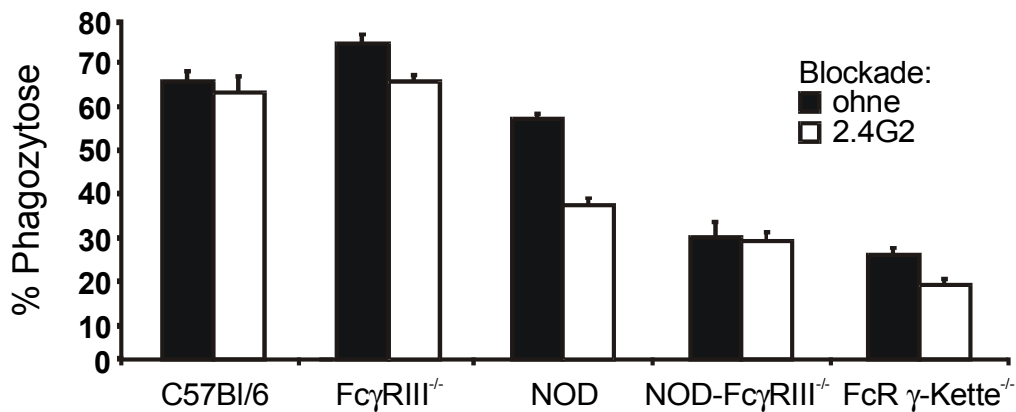


Abb. 3.14: Phagozytose IgG2a opsonierter MRBC durch Thioglykollat aktivierte Peritonealmakrophagen verschiedener Mausstämme.

Makrophagen aus C57Bl/6, FcγRIII defizienten, NOD, NOD-FcγRIII^{-/-} und FcR γ-Ketten defizienten Mäusen wurden nicht vorbehandelt oder durch 2.4G2 blockiert und mit IgG2a opsonierten MRBC inkubiert. Phagozytose positive Zellen wurden lichtmikroskopisch quantifiziert.

Bei NOD Makrophagen, die den FcγRI Defekt dieses Stammes tragen, fällt auf, daß die Phagozytose IgG2a opsonierter MRBC durch unbehandelte Zellen im Vergleich mit C57Bl/6 und FcγRIII defizienten Makrophagen nur unwesentlich verändert ist. Erst durch die Blockade von FcγRII und FcγRIII durch 2.4G2 wird die Phagozytose deutlich inhibiert ($p < 0,004$) und weicht nicht mehr signifikant von den Werten der Zellen aus der NOD-FcγRIII^{-/-} Rückkreuzung und aus FcR γ-Ketten knock-out Mäusen ab ($p > 0,1$). Die Makrophagen der NOD-FcγRIII^{-/-} Rückkreuzung weisen noch eine basale Phagozytose von 29,1 % auf, die sich durch die Blockade mit 2.4G2 nicht mehr verändert. Diese Phagozytoseaktivität unterscheidet sich allerdings nicht mehr von den Zellen aus FcR γ-Ketten defizienten Mäusen (24,7 %), denen die funktionell intakten FcγRI und FcγRIII durch die Deletion dieser für beide Rezeptoren essentiellen signaltransduzierenden Untereinheit fehlen.

3.3.5 Mortalität in der IgG2a vermittelten AIHA bei verschiedenen Fcγ-Rezeptor defekten Mausstämmen

Um die Bedeutung des FcγRI und des FcγRIII in der IgG2a vermittelten AIHA zu untersuchen, wurde den Fcγ-Rezeptor defekten Tieren eine letale Dosis des IgG2a anti MRBC Antikörpers 34-3C verabreicht (10 µg/gKG), die

zum Versterben aller C57Bl/6 Mäuse (n = 10 Tiere) bis zum Tag 5 nach der Injektion führte (Abb. 3.15 A). NOD Tiere hingegen überlebten die gleiche Behandlung mit einer Rate von 87,5 % (n = 8 Tiere).

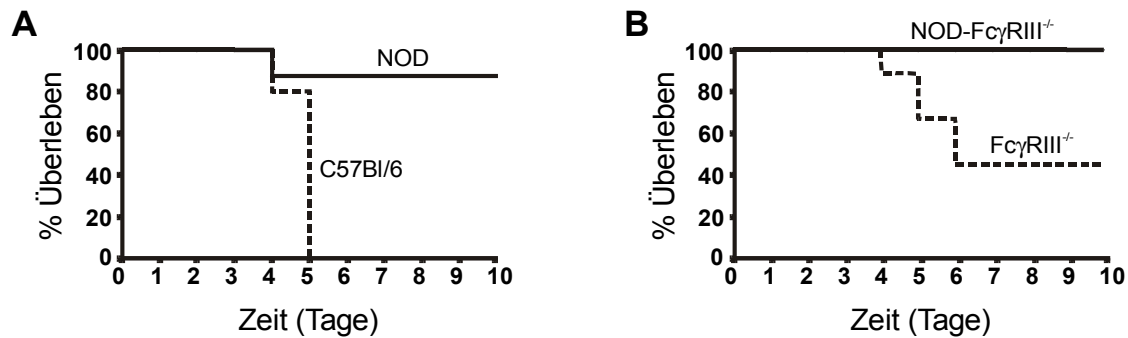


Abb. 3.15: Induktion einer letalen AIHA durch den IgG2a anti MRBC Antikörper 34-3C in verschiedenen Fcγ-Rezeptor defekten Mausstämmen.

In C57Bl/6 und NOD Mäusen (A) sowie der NOD-FcγRIII^{-/-} Rückkreuzung und FcγRIII defizienten Tieren (B) wurde durch die einmalige intraperitoneale Injektion einer letalen Dosis des IgG2a anti MRBC Antikörpers 34-3C (10 µg/gKG) eine AIHA ausgelöst.

Im Vergleich der NOD-FcγRIII^{-/-} Rückkreuzung mit den FcγRIII defizienten Tieren (Abb 3.15 B) stellte sich heraus, daß alle Mäuse mit dem doppelten FcγRI und FcγRIII Defekt die Behandlung mit der letalen 34-3C Dosis überlebten (n = 10 Tiere). Die singuläre FcγRIII Defizienz schützte die Tiere nur zu ca. 50 %, lediglich vier der neun untersuchten Tiere überlebten die AIHA.

3.3.6 Hämatokritverlauf in der IgG2a vermittelten AIHA bei FcγRI und FcγRIII defekten Mäusen

Der Verlauf der IgG2a vermittelten AIHA nach der letalen 34-3C Dosis wurde durch die Beobachtung des Hämatokrits eingehender betrachtet. Nach der Applikation von 10 µg/gKG 34-3C wurde bei NOD Mäusen und den NOD-FcγRIII^{-/-} Rückkreuzungen sowie bei FcR γ-Ketten knock-out Tieren täglich der Hämatokrit bestimmt (Abb. 3.16).

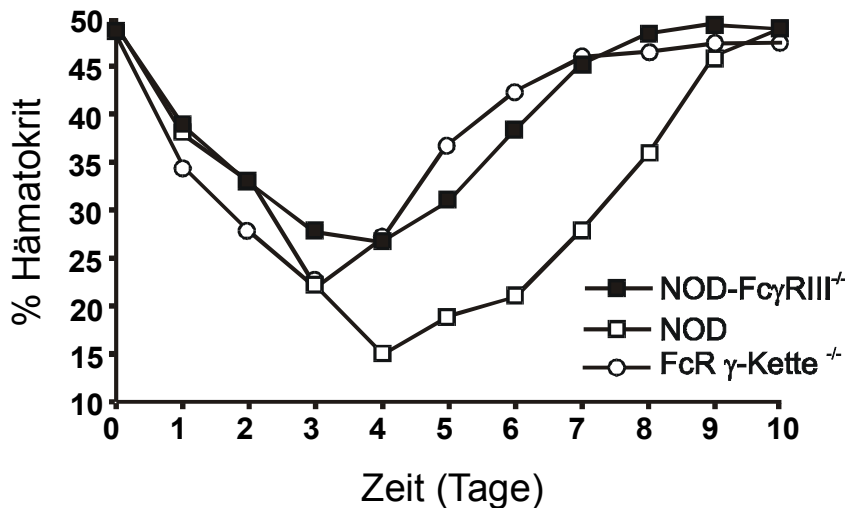


Abb. 3.16: Hämatokritverlauf nach der Injektion einer letalen Dosis des IgG2a anti MRBC Antikörpers 34-3C.

Durch die Injektion von je 10 μ g/gKG in NOD-Fc γ RIII Rückkreuzungen, NOD Mäuse und FcR γ -Ketten defiziente Tiere wurde eine schwere, für wildtyp Tiere letale Form der AIHA induziert. Nach der Injektion wurde täglich der Hämatokrit ermittelt.

Obwohl fast alle NOD Mäuse die Injektion der Antikörper überlebten, zeigten sie eine massive Absenkung des Hämatokrits auf mittlere 15 % am Tag vier und somit eine sehr schwere Form der AIHA. Die NOD-Fc γ RIII^{-/-} Tiere hingegen entwickelten eine milde Form der AIHA mit einem mittleren Hämatokrit von 28 % am Tag 4. Dieser Krankheitsverlauf war vergleichbar mit den FcR γ -Ketten knock-out Mäusen, die die größte Absenkung des Hämatokrits bereits am Tag drei mit 22 % erreichten, am Tag vier aber bereits wieder einen Hämatokrit von 27,1 % aufwiesen.

3.3.7 Bedeutung des Komplementsystems für die IgG2a vermittelte AIHA

Neben der opsonierenden Wirkung der anti MRBC Antikörper, die zu einer Fc γ -Rezeptor vermittelten Phagozytose der Erythrozyten führt, besteht die Möglichkeit, daß durch die Fc-Teile der Antikörper Komplementfaktoren aktiviert werden. Dies könnte zu einer Fc γ -Rezeptor unabhängigen Erniedrigung des Hämatokrits durch die Auslösung der lytischen Komplementkaskade führen, oder durch die zusätzliche Opsonierung der Erythrozyten mit Komplementfaktoren zur Phagozytose durch die Bindung an Komplementrezeptoren. Um den Einfluß des Komplementsystems auf die AIHA

zu untersuchen, wurden die FcR γ -Ketten knock-out Mäuse 24 Stunden vor und 48 Stunden nach der Applikation des 34-3C Antikörpers mit einer Dosis von 20 μg Cobra Venom Faktor (CVF) pro Tier behandelt, um die Komplementkomponenten zu depletieren. Bei zwei Kontrolltieren, denen keine anti MRBC Antikörper injiziert wurden, wurde täglich die Aktivität des Komplementsystems gemessen. In Abbildung 3.17 sind die Extinktionswerte des CH50 Tests exemplarisch für eine Kontrollmaus dargestellt. Man erkennt, daß es im Verlauf von acht Tagen zu einem vollkommenen Verlust der Komplementaktivität bei CVF behandelten Tieren kommt.

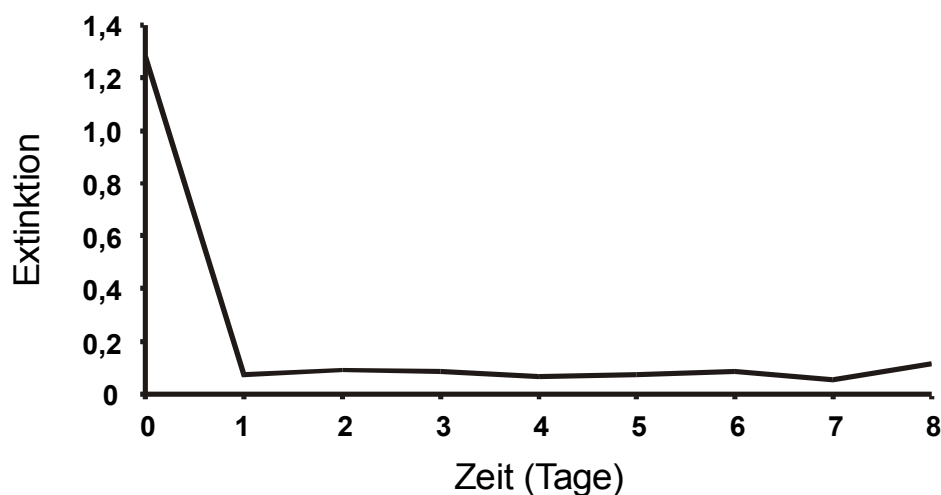


Abb. 3.17: CH50 Messung zur Komplementaktivität nach Cobra Venom Faktor Behandlung.

Kontrollmäuse wurden 24 Stunden vor und 48 Stunden nach der Applikation des IgG2a anti MRBC Antikörpers 34-3C mit 20 μg CVF pro Tier behandelt. Dargestellt ist die Extinktion der CH50 Messung einer 1:20 Serumverdünnung als Maß für die Komplementaktivität.

Nach der Depletion des Komplementsystems wurde bei FcR γ -Ketten knock-out Mäusen durch die Injektion von 10 $\mu\text{g/gKG}$ 34-3C eine AIHA ausgelöst, deren Verlauf durch die tägliche Messung des Hämatokrits verfolgt wurde. In Abbildung 3.18 wird deutlich, daß im Vergleich mit den nicht CVF behandelten Tieren eine Depletion des Komplementsystems zu einer weiteren Protektion vor der Erniedrigung des Hämatokrits führt. Während die unbehandelten Tiere an den kritischen Tagen drei und vier mit einem Abfall des Hämatokrits auf 22 %, bzw. 27,1 % reagierten, blieben die Komplement

depletierten Mäuse bei Werten nur knapp unter der 40 % Grenze (39,8 %, bzw. 39 %), die als pathologisch eingestuft wird.

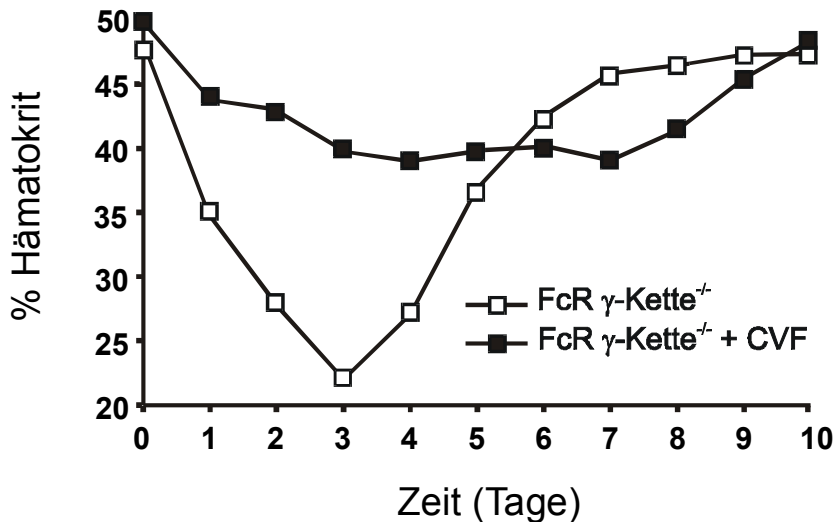


Abb. 3.18: Hämatokritverlauf nach der Induktion einer IgG2a vermittelten AIHA in Komplement depletierten FcR γ -Ketten defizienten Tieren.

FcR γ -Ketten knock-out Mäuse wurden 24 Stunden vor und 48 Stunden nach der Gabe von 10 $\mu\text{g/gKG}$ 34-3C mit 20 μg CVF pro Tier behandelt oder nicht Komplement depletiert. Dargestellt ist der Verlauf des Hämatokrits durch tägliche Messungen.

3.3.8 Bedeutung des Fc γ RII in der IgG2a vermittelten AIHA

Um eine eventuelle aktive Beteiligung des Fc γ RII an Phagozytose Prozessen der AIHA zu überprüfen, wurden doppelt defiziente Mäuse für die FcR γ -Kette und den Fc γ RII in die Untersuchungen mit einbezogen. Den Tieren wurde eine Dosis von 10 $\mu\text{g/gKG}$ 34-3C injiziert, um den resultierenden Hämatokritverlauf mit den Ergebnissen aus Abb. 3.18 zu vergleichen, wo eine Protektion gegen die Erniedrigung des Hämatokrits lediglich durch die fehlenden intakten Fc γ RI und Fc γ RIII beobachtet wurde. Zusätzlich wurden auch doppelt defiziente Tiere mit 20 μg CVF pro Maus Komplement depletiert, um weitere Effekte in Abwesenheit sämtlicher Fc γ -Rezeptoren sowie des Komplementsystems zu untersuchen. In Abbildung 3.19 wird deutlich, daß sich der Verlauf der AIHA in FcR γ -Ketten/Fc γ RII doppelt defizienten Tieren nicht von Tieren unterscheidet, die lediglich defizient für Fc γ RI und Fc γ RIII sind. An den Tagen drei und vier weist der doppel knock-out erniedrigte Hämatokritwerte von 21,2 %, bzw. 23,4 % (n = 5 Tiere). Verglichen mit den FcR γ -Ketten knock-

out Tieren (22 %, bzw. 27,1 %) stellt dies keine signifikante Abweichung dar. Auch nach der Depletion des Komplementsystems unterscheidet sich der Hämatokritverlauf der doppelt defizienten nicht von dem der einfach defizienten Mäuse. Es wird jeweils eine weitere Protektion auf Werte um 40 % erreicht.

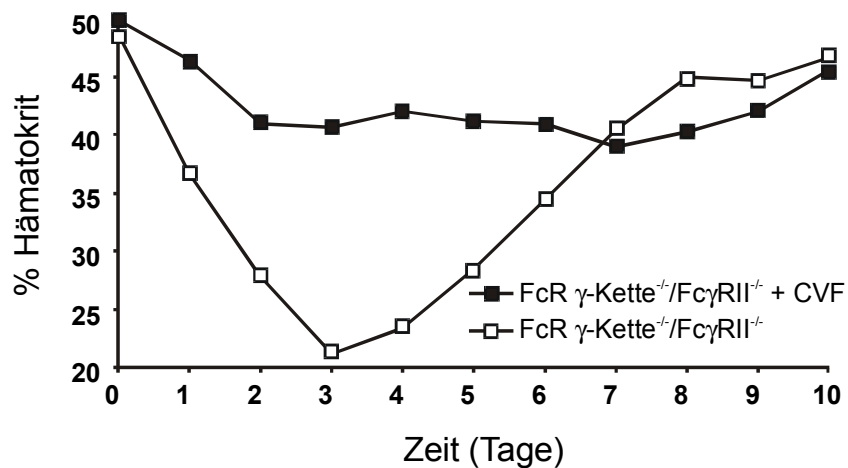


Abb. 3.19: Hämatokritverlauf nach der Induktion einer IgG2a vermittelten AIHA bei FcR γ -Ketten und Fc γ RII doppelt defizienten Mäusen.

Doppelt defizienten Mäusen für die FcR γ -Kette und den Fc γ RII wurden 10 μ g/gKG 34-3C Antikörper injiziert, um eine AIHA zu induzieren. Zusätzlich wurde ein Teil der Tiere mit 20 μ g CVF pro Maus zur Komplementdepletion behandelt.

Um einen regulativen Effekt des Fc γ RII auf die AIHA zu untersuchen, der sich bei den FcR γ -Ketten knock-out Tieren wegen der fehlenden aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren nicht ausgewirkt hätte, wurden Fc γ RII knock-out Tiere mit einer subletalen Dosis des 34-3C Antikörpers behandelt. Die Tiere erhielten eine Dosis von 2 μ g/gKG, um einen milden Verlauf der AIHA zu induzieren. In Abbildung 3.20 wird der Hämatokritverlauf von Fc γ RII defizienten mit C57Bl/6 Mäusen verglichen und es wird deutlich, daß es weder an den Tagen drei (21,8 % bei C57Bl/6 und 22,8 % bei Fc γ RII⁻) und vier (24 % bei C57Bl/6 und 24,6 % bei Fc γ RII⁻) noch im gesamten Verlauf der Erkrankung zu Unterschieden zwischen den beiden Mausstämmen kommt.

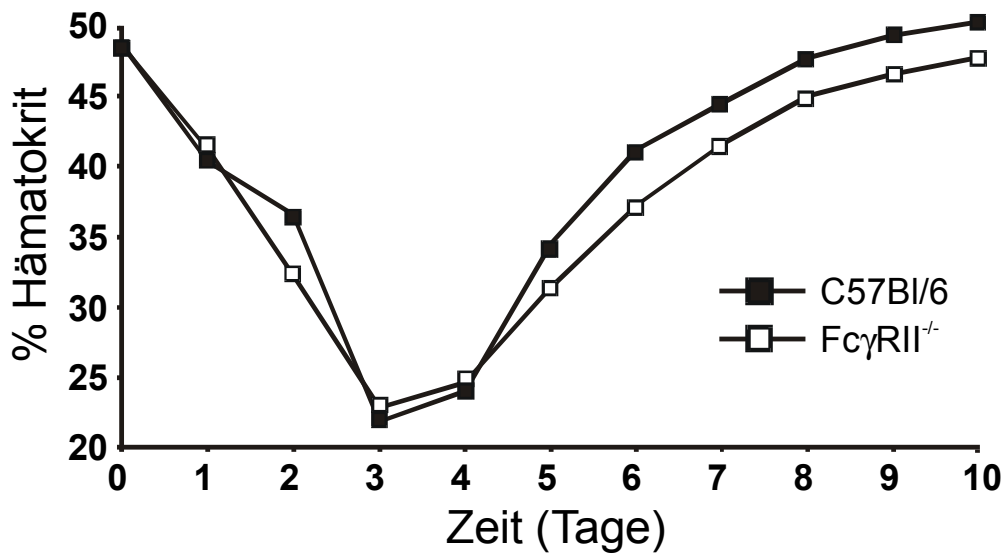


Abb. 3.20: Hämatokritverlauf nach der Induktion einer subletalen AIHA durch IgG2a bei FcγRII defizienten Tieren.

Durch die Applikation von 2 µg/gKG 34-3C wurde bei FcγRII knock-out Mäusen und C57Bl/6 Kontroll Tieren eine subletale AIHA induziert. Der Verlauf der Erkrankung wurde durch die tägliche Ermittlung des Hämatokrits bestimmt.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung der niedrigaffinen Fc γ -Rezeptoren in entzündlichen Prozessen untersucht. Ein Schwerpunkt wurde dabei auf den Fc γ RII gelegt, dessen inhibitorische Funktionen in vielen Punkten noch ungeklärt sind. Zu diesem Zweck wurden zunächst Antikörper charakterisiert, die spezifisch für den murinen Fc γ RII und nicht für den mFc γ RIII sind, da es bisher nur einen Fc γ RII und Fc γ RIII spezifischen Antikörper gab. Diese allelspezifischen monoklonalen Antikörper gegen den murinen Ly-17 Polymorphismus wurden in Kreuzblockade-Untersuchungen sowie in der zweifarbigen direkten Immunfluoreszenz auf typischen Fc γ -Rezeptor exprimierenden Zellen und Fc γ RII defizienten Makrophagen als Fc γ RII spezifisch charakterisiert. In Liganden-Blockade Experimenten mit anti-Ly-17 Antikörpern zeigte sich, daß sowohl in-vitro als auch in-vivo eine Blockade des Fc γ RII erreicht wird. Sowohl in der Phagozytosekapazität von ex-vivo kultivierten Peritoneal-Makrophagen als auch in der reversen passiven Arthus Reaktion zeigte sich ein deutlicher regulativer Effekt des Fc γ RII. Im Unterschied hierzu wurde der Verlauf einer experimentellen AIHA nicht durch die Fc γ RII Blockade beeinflusst. Um die Rolle verschiedener Fc γ -Rezeptoren in der AIHA genauer zu untersuchen, wurde ein Mausstamm mit einem doppelten Defekt des Fc γ RI und des Fc γ RIII hergestellt, indem der defekte Fc γ RI aus NOD Mäusen in Fc γ RIII defiziente Mäuse eingekreuzt wurde. In diesen Tieren zeigte sich die Redundanz der IgG2a vermittelten AIHA. Im Gegensatz zu IgG1 konnte diese nur durch den doppelten Defekt beider aktivatorischer Fc γ -Rezeptoren inhibiert werden. Auch auf den zeitlichen Verlauf der IgG2a vermittelten AIHA wurde kein Einfluß des inhibitorischen Fc γ RII festgestellt. Die Fc γ RI und Fc γ RIII defekten Tiere konnten hingegen durch die Depletion des Komplementsystems fast komplett gegen die geringe verbleibende Anämie geschützt werden.

4.1 Charakterisierung der mFcγRII spezifischen anti-Ly-17 Antikörper

Ein Ziel dieser Arbeit war es, die allelspezifischen Antikörper gegen den murinen Ly-17 Polymorphismus bezüglich ihrer Spezifität zu charakterisieren. Die Antikörper unterteilen die bekannten Inzucht Mausstämme auf Proteinebene in Ly-17.1 und Ly-17.2 positive Tiere, ein heterozygoter Stamm, der monoallelisch beide Merkmale tragen würde ist nicht bekannt. In einer Studie von Holmes aus dem Jahr 1985 wurde berichtet, daß die anti-Ly-17 Antikörper mit dem bislang fast ausschließlich benutzten mAk 2.4G2 kompetitieren. Der mAk 2.4G2 bindet beide niedrig affinen Fcγ-Rezeptoren, den FcγRII und den FcγRIII. Ferner wird auch die Ligandenbindung an B-Zellen durch die Vorinkubation mit anti-Ly-17 Antikörpern sowie mit 2.4G2 inhibiert. Die Aminosäure-Polymorphismen zwischen den beiden Ly-17 Allelen befinden sich in der zweiten extrazellulären Domäne des FcγRII. Es handelt sich um zwei Unterschiede in der Sequenz, von denen sich der Austausch von Prolin (Ly-17.1) gegen Leucin (Ly-17.2) an der Position 116 in einem eher Membran-distal gelegenen Bereich der EC2 befindet. Hier besteht eine große Homologie mit der EC2 des FcγRIII, die an dieser Position ebenfalls ein Leucin trägt. Der zweite Sequenzunterschied befindet sich in einem Membran-proximalen Teil der EC2, in dem auch eine wichtige Ligandenbindungsstelle des humanen FcγRII und des hFcγRIII angesiedelt wird (Hulett et al. 1994, Tamm et al. 1996). Dieser Polymorphismus an der Position 161 ergibt sich aus der Expression von Glutamin durch das Ly-17.1 Allel (wie auch im FcγRIII) und Leucin durch Ly-17.2. Er befindet sich in einem Abschnitt von fünf Aminosäuren, in dem die beiden flankierenden Positionen die EC2 des FcγRII allelunabhängig von der des FcγRIII unterscheiden (siehe Abb. 1.3). Diese Position ist also die einzige, die alle drei Rezeptorformen, die beiden Allele des FcγRII und den FcγRIII in einem linearen Epitop voneinander unterscheidet.

Die Tatsache, daß beide monoklonalen anti-Ly-17 Antikörper spezifisch für ihren jeweiligen Allotyp des FcγRII sind schloss allerdings nicht die Möglichkeit aus, daß sie in ähnlicher Weise wie der mAk 2.4G2 auch an den FcγRIII binden würden. Durch eine FACS Analyse von typischen Fcγ-Rezeptor

exprimierenden primären Zellen sollte die Spezifität der anti-Ly-17 Antikörper überprüft werden.

Zunächst wurden Kreuzblockade-Experimente mit B-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen durchgeführt (Abb. 3.1). Die Zellen wurden dazu mit unmarkierten anti-Ly-17 und 2.4G2 Antikörpern vorinkubiert, um die verbliebenen Bindungsstellen mit FITC-konjugiertem 2.4G2 zu färben. Durch eine zweite Färbung mit PE-konjugierten Zelltyp-spezifischen Antikörpern wurden die entsprechenden Populationen gegatet, um die 2.4G2 Intensität in einem Histogramm darzustellen.

Auf den peripheren B-Zellen zeigte sich, daß durch die Vorinkubation mit anti-Ly-17.1 auf 129 und anti-Ly-17.2 auf C57Bl/6 Zellen eine annähernd komplette Blockade, wie nach der Vorinkubation mit 2.4G2, erzielt werden konnte. Auf diesen Zellen, die als einzigen Fc γ -Rezeptor den Fc γ RII exprimieren, wurden also alle Bindungsstellen für 2.4G2 blockiert. Auf Thioglykollat-aktivierten Makrophagen, die alle drei Fc γ -Rezeptorklassen exprimieren, konnte durch die Vorinkubation mit anti-Ly-17 Antikörpern nur eine partielle Inhibition der 2.4G2 Färbung erzielt werden. In einem weiteren Versuch, in dem IL-2 aktivierte NK-Zellen verwendet wurden, die als einzigen Fc γ -Rezeptor den Fc γ RIII tragen, stellte sich heraus, daß eine Blockade dieser Zellen mit anti-Ly-17 Antikörpern nicht möglich ist. Es wurden hier für die anti-Ly-17.1 und anti-Ly-17.2 Blockade NK-Zellen aus C57Bl/6 Mäusen benutzt, da der Fc γ RIII keinen Polymorphismen in seiner EC2 unterliegt. Dieses Expressionsmuster der 2.4G2 Epitope nach der Blockade durch anti-Ly-17 Antikörpern entspricht dem Profil des Fc γ RII und nicht des Fc γ RIII. Auf B-Zellen konnten sämtliche Fc γ RII blockiert werden, während der Fc γ RIII auf NK-Zellen nach der Vorinkubation mit anti-Ly-17 Antikörpern vollständig durch 2.4G2 gefärbt wird. Bei den Makrophagen stellt dem zufolge der 2.4G2 positive Anteil nach der anti-Ly-17 Blockade den Fc γ RIII dar, der nicht von anti-Ly-17 Antikörpern erkannt wird. Dies wurde weiterhin verdeutlicht, da auf Fc γ RIII defizienten Makrophagen, die als einzigen niedrig affinen Fc γ -Rezeptor den Fc γ RII tragen ebenfalls eine komplette Inhibition der 2.4G2 Färbung erzielt wurde (Daten nicht abgebildet).

Um diese Ergebnisse zu überprüfen, wurde der anti-Ly-17.2 Antikörper FITC konjugiert und in einer zweifarbigen direkten Immunfluoreszenz mit den oben angeführten Zellen aus Ly-17.2 positiven C57Bl/6 Mäusen inkubiert (Abb. 3.2). In diesem Ansatz wurden die B220 positiven B-Zellen in gleichem Maße durch anti-Ly-17.2 wie durch 2.4G2 Antikörper angefärbt. Dies spiegelt die komplette Färbung des Fc γ RII auf diesen Zellen durch anti-Ly-17.2 Antikörper wider. Auf den Mac-1 positiven Makrophagen wird nur ein Anteil von ca. 20% durch anti-Ly-17.2 gefärbt, verglichen mit der Fc γ RII und Fc γ RIII Färbung durch 2.4G2. Dieser Anteil entspricht der Expressionsdichte von 2.4G2 auf Makrophagen der Fc-Rezeptor γ -Ketten knock-out Mäuse im Vergleich mit Kontroll-Tieren. Er spiegelt somit die Expression des Fc γ RII auf diesen Zellen wieder (Takai et al. 1994). Auf NK1.1 positiven NK-Zellen konnte schließlich gezeigt werden, daß im Gegensatz zur 2.4G2 Färbung keine Kreuzreaktion der anti-Ly-17.2 Antikörper gegen den Fc γ RIII auf diesen Zellen stattfindet. Die Expression des Ly-17.2 Epitops entspricht also wiederum der Fc γ RII Expression, da zwar alle Fc γ -Rezeptoren auf B-Zellen, jedoch nicht der Fc γ RIII auf NK-Zellen angefärbt werden. Auf Makrophagen wird nur der dem Fc γ RII entsprechende Anteil durch anti-Ly-17.2 Antikörper erkannt.

Schließlich wurden auch Makrophagen aus Fc γ RIII und Fc γ RII knock-out Mäusen für die zweifarbige FACS Analyse eingesetzt (Abb. 3.3). Bei den Zellen aus C57Bl/6 Mäusen zeigt sich wieder eine reduzierte Bindung von anti-Ly-17.2 Antikörpern im Vergleich mit 2.4G2 (siehe Abb. 3.2), während anti-Ly-17.1 Antikörper nicht an den Ly-17.2 positiven Zellen binden. Die Ly-17.1 positiven Makrophagen aus Fc γ RIII defizienten Mäusen sind negativ für die anti-Ly-17.2 Färbung. Sie zeigen aber nahezu gleiche Expressionsdichten von anti-Ly-17.1 und 2.4G2, da diese Zellen nur noch den Fc γ RII und nicht den Fc γ RIII exprimieren. Auf den Fc γ RII defizienten Makrophagen zeigt sich, daß keine Kreuzreaktionen der anti-Ly-17 Antikörper gegen den Fc γ RIII bestehen. Trotz der deutlichen 2.4G2 Färbung dieses Rezeptors läßt sich keine Färbung mit anti-Ly-17.1 und anti-Ly-17.2 Antikörpern erzielen.

4.2 Funktionelle Effekte der Fc γ RII Blockade in-vitro und in-vivo

Da sich neben der Kompetition mit 2.4G2 auch die Bindung von Immunglobulinen an den Fc γ RII inhibieren läßt, wurden auch funktionelle Untersuchungen der Auswirkung einer Blockade des Fc γ RII durchgeführt.

4.2.1 Bindung und Phagozytose von IgG1 opsonierten Immunkomplexen

Als in-vitro Modell für die IgG vermittelte Bindung und Phagozytose von Immunkomplexen wurden IgG1 opsonierte Erythrozyten mit Thioglykollat-aktivierten Peritoneal-Makrophagen inkubiert. Da aus früheren Studien in unserem Labor bekannt war, daß die von IgG1 ausgelösten Effektorfunktionen ausschließlich auf den Fc γ RIII restringiert sind, konnte so der Einfluß des Fc γ RII auf diese Fc γ RIII vermittelten Vorgänge untersucht werden (Meyer et al. 1998).

Zunächst wurden mit sättigenden murinen IgG1 Konzentrationen opsonierte murine Erythrozyten (MRBC) bei 4° C mit Makrophagen verschiedener Mausstämmen inkubiert. Danach wurde die Phagozytose der MRBC und ihre Bindung an die Makrophagen durch die entstehenden Rosetten untersucht (Abb. 3.4). Für die Bindung von IgG1 opsonierten Immunkomplexen wird, im Gegensatz zur Bindung von monomerem IgG2a, den niedrig affinen Fc γ -Rezeptoren eine dominante Rolle zugeschrieben (Weinshank et al. 1988). Wir konnten beobachten, daß sich im Vergleich mit den C57Bl/6 Kontroll-Makrophagen die Deletion eines einzelnen niedrig affinen Fc γ -Rezeptors nicht negativ auf die Rosettierungskapazität auswirkte. Weder bei Fc γ RII und Fc γ RIII knock-out Mäusen noch durch die Blockade des Fc γ RII durch anti-Ly-17.2 Antikörper wurde die Bindung IgG1 opsonierter MRBC inhibiert. Einzig bei den Fc γ RIII defizienten Zellen, bei denen zusätzlich der Fc γ RII durch anti-Ly-17.2 Antikörper blockiert wurde, zeigte sich qualitativ ein fast vollständiger Verlust der Rosettenbildung. Durch die Quantifizierung dieser Versuche (Abb. 3.5 A) bestätigte sich, daß für die Bindung von IgG1 opsonierten Immunkomplexen die Funktionalität eines der niedrig affinen Fc γ -Rezeptoren ausreichend ist. Während bei Kontrollmakrophagen die Rosettierung durch die Blockade des

Fc γ RII keinen Effekt hat, führt die Blockade von Fc γ RII und Fc γ RIII zum Verlust der IgG1 Bindung. Dies kann auch durch den Fc γ RI auf diesen Zellen nicht kompensiert werden. Bei Fc γ RIII defizienten Makrophagen, die unblockiert kaum in ihrem Bindungsverhalten beeinträchtigt sind, wirkt sich bereits die Vorinkubation mit anti-Ly-17 Antikörpern ähnlich stark inhibierend auf das Bindungsverhalten aus, wie die 2.4G2 Blockade.

Um die funktionellen Konsequenzen dieses Bindungsverhaltens auf die Effektorfunktionen der Makrophagen zu untersuchen, wurde die Phagozytose der opsonierten MRBC quantifiziert (Abb. 3.5 B). Bei Kontrolltieren ließ sich durch die Blockade des Fc γ RII keine signifikante Veränderung der Phagozytoseaktivität erzielen. Erst die Blockade von Fc γ RII und Fc γ RIII führte fast zum kompletten Verlust der Fähigkeit zur Aufnahme der IgG1 opsonierten MRBC. Interessanterweise stellte sich heraus, daß die Fc γ RIII defizienten Makrophagen, die zwar in nahezu unveränderter Kapazität IgG1 opsonierte MRBC binden, nicht in der Lage sind, diese zu phagozytieren. Dies steht im Widerspruch zu vereinzelt publizierten Publikationen, die Phagozytoseaktivitäten des mFc γ RIIb2, der von Makrophagen exprimiert wird, beschreiben (Amigorena et al. 1998, Hazenbos et al. 1996).

Kürzlich wurde ein regulativer Effekt des Fc γ RII auch auf die in-vitro Phagozytose Immunglobulin opsonierter Erythrozyten beschrieben (Clynes et al. 1999, Yuasa et al. 1999). In den oben beschriebenen Phagozytose-Versuchen konnten wir keinen regulativen Effekt des Fc γ RII zwischen Wildtyp, Fc γ RII defizienten und Fc γ RII blockierten Makrophagen feststellen. Da unter diesen Bedingungen bereits bei den Wildtyp Zellen mit ca. 90% die Phagozytosekapazität ausgeschöpft war, konnte eine weitere Steigerung durch den funktionellen Verlust des Fc γ RII nicht erfasst werden. Die Opsonierung der MRBC wurde deshalb soweit verringert, bis die Phagozytose durch Wildtyp-Makrophagen auf ca 50% vermindert war (Abb. 3.6). Unter diesen Bedingungen zeigte sich, daß der von Makrophagen exprimierte Fc γ RII einen regulativen Einfluß auf die Phagozytoseaktivität der Zellen hat. Sowohl durch die Blockade des Fc γ RII durch Vorinkubation mit anti-Ly-17 Antikörpern als auch bei Fc γ RII defizienten Makrophagen wird die Phagozytose wieder auf Werte über 80% gesteigert. Auch zwischen den Fc γ RII defizienten Zellen und

den mit anti-Ly-17 Antikörpern vorinkubierten Makrophagen gab es qualitative Differenzen. Die Zellen aus Fc γ RII knock-out Tieren nahmen deutlich mehr Erythrozyten pro Zelle auf. Da unsere Färbetechnik und lichtmikroskopische Auswertung keine Quantifizierung der Erythrozytenzahl in einem einzelnen Makrophagen zulassen, konnten diese Unterschiede jedoch nicht weiter quantifiziert werden.

4.2.2 Blockade des Fc γ RII in der reversen passiven cutanen Arthus Reaktion

Für entzündliche Prozesse, in denen Mastzellen eine große Rolle spielen, wurde bereits gezeigt, daß dem Fc γ RII eine wichtige Rolle in der Regulation zukommt. Ein Modellsystem für diese Typ III Überreaktion ist die passive kutane Arthus Reaktion, die in Fc γ RII knock-out Tieren gesteigert ist (Takai et al. 1996). Zur Induktion der Arthus Reaktion wurden intradermal verschiedene Konzentrationen eines Kaninchen anti-Ovalbumin Serums injiziert. Der Fc γ RII wurde durch gleichzeitige Injektion von anti-Ly-17.2 Antikörpern blockiert. Direkt nach der Injektion der Antikörper wurde Ovalbumin und Evans-blue intravenös injiziert, um die Extravasation des Serums in die entsprechenden Hautpartien zu visualisieren. Wir stellten fest, daß die Blockade des Fc γ RII eine vergleichbare Steigerung der Arthus Reaktion wie bei den Fc γ RII knock-out Mäusen hervorrief. Bereits bei Konzentrationen des anti-Ovalbuminserums, die bei Wildtyp und Fc γ RIII defizienten Tieren zu keinen wesentlichen Evans-blue Färbungen führten, bildeten sich bei Fc γ RII blockierten und Fc γ RII defizienten Mäusen deutliche PCA Reaktionen mit dermalen Extravasationen von über 6 mm Durchmesser. Diese Werte wurden von unbehandelten C57Bl/6 Mäusen mit mittleren 7,1 mm erst bei der dreifachen Konzentration des anti Ovalbumin Serums erreicht. Hier wiesen Fc γ RII blockierte Mäuse mit 10,75 mm und Fc γ RII defiziente Tiere mit 11 mm eine weitere Verstärkung der Arthus Reaktion auf. Bei den Fc γ RIII defizienten Tieren manifestierte sich bei dieser Konzentration ein protektiver Effekt, mit einer Extravasation von 4,2 mm. Dieser Versuch unterstreicht weiterhin, im Gegensatz zum Fc γ RIII, die regulative Funktion des

Fc γ RII in entzündlichen Prozessen. Er zeigt außerdem, daß auch in-vivo eine Blockade des Fc γ RII durch anti-Ly-17 Antikörper gewährleistet ist.

4.2.3 Blockade des Fc γ RII in der IgG1 vermittelten experimentellen AIHA

Aufgrund unserer Beobachtungen der regulativen Rolle des Fc γ RII in der in-vitro Phagozytose von IgG opsonierten Erythrozyten sollte der Einfluß dieses Rezeptors auf die Entwicklung einer experimentellen autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA) untersucht werden. Die von uns induzierte AIHA ist ein Modell für eine Autoimmunerkrankung, bei der durch Fc γ -Rezeptor vermittelte Phagozytose, u. a. durch die Kupffer Zellen der Leber, Erythrozyten aus dem Blutkreislauf entfernt werden. Dies macht sich unmittelbar in einer Absenkung des Hämatokritwertes, das heißt des Anteils fester Bestandteile des Blutes bemerkbar. Zur Induktion der AIHA benutzten wir zwei murine Autoantikörper gegen murine Erythrozyten, die im Labor von Dr. S. Izui aus NZB Mäusen generiert wurden, den mAk 105-2H vom IgG1 Isotyp und den IgG2a mAk 34-3C (Shibata et al. 1990). Die Antikörper wurden von Dr. D. Meyer über Protein-A Säulen aufgereinigt und waren frei von Kontaminationen. Sie wurden in einer einmaligen intraperitonealen Injektion verabreicht, woraufhin die pathologischen Manifestationen in Form des Hämatokritabfalls und der Leberhistologie untersucht wurden (siehe Abb. 3.8).

In der IgG1 vermittelten AIHA, die durch die alleinige Deletion des Fc γ RIII aufgehoben wird (Meyer et al. 1998) wurde der Einfluß des Fc γ RII durch die systemische Blockade mit anti-Ly-17.2 Antikörpern und in Fc γ RII knock-out Tieren untersucht (Abb. 3.9). Zum Zeitpunkt des maximalen Hämatokritabfalles am Tag vier nach der Injektion von 12 μ g/gKG 105-2H kam es interessanterweise nicht zu Unterschieden zwischen den unbehandelten und den Ly-17 blockierten Tieren. Diese Ergebnisse bestätigten sich durch die Untersuchungen an Fc γ RII defizienten Mäusen, die eine höhere Dosis des Antikörpers erhielten (15 μ g/gKG). Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrolltieren am Tag vier. Auch im Verlauf der AIHA über zehn Tage kam es zu einer simultanen Kinetik beider Gruppen, die ab Tag

sieben wieder normale Werte von über 40% erreichte. Um ähnliche Sättigungseffekte wie bei den in-vitro Phagozytose-Assays durch Peritoneal-Makrophagen auszuschließen wurden auch niedrige Dosen von 2 und 4 µg/gKG eingesetzt. Auch hier kommt es nur zu marginalen Unterschieden zwischen FcγRII knock-out und C57Bl/6 Tieren (Daten nicht gezeigt).

Um einen weiteren Parameter zur Untersuchung dieses Phänomens zu erhalten, wurden am Tag zwei nach der Induktion der IgG1 vermittelten AIHA Kryostatschnitte der Leber angefertigt, um die Phagozytose der Erythrozyten durch organständige Makrophagen zu quantifizieren. Obwohl die Zahl der Mac-1 positiven Zellen in FcγRII knock-out Tieren erhöht war (Daten nicht gezeigt), was auf eine erhöhte Aktivität der Leber Makrophagen hindeutet, wirkt sich dies nicht auf das Ausmaß der Phagozytose aus. C57Bl/6 und FcγRII defiziente Mäuse weisen mit über 60 phagozytierenden Makrophagen pro mm² des Leberschnittes stark erhöhte Werte auf, die sich allerdings nicht signifikant voneinander unterscheiden. Eine Ursache für diesen Widerspruch könnte in einer abweichenden Ausstattung der Lebermakrophagen mit signaltransduzierenden Molekülen in Gegensatz zu Peritonealmakrophagen liegen, oder in Unterschieden in der Expressionsdichte des FcγRII, was in der Immunhistologie allerdings problematisch zu quantifizieren ist (interne Beobachtung).

4.3 Die Bedeutung niedrigaffiner Fcγ-Rezeptoren in der IgG2a vermittelten AIHA

4.3.1 Generation eines Mausstammes mit Defekten des Fc γ RI und Fc γ RIII

Im Gegensatz zur IgG1 induzierten AIHA, die ausschließlich durch den Fc γ RIII vermittelt und auch nicht durch den Fc γ RII reguliert wird, wird die IgG2a induzierte AIHA durch eine Deletion des Fc γ RIII lediglich abgeschwächt. Die Rolle der anderen Fc γ -Rezeptoren sollte für diese Form der AIHA näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein Mausstamm mit einem doppelten Defekt des Fc γ RI und Fc γ RIII hergestellt. Für NOD-Mäuse wurde ein funktioneller Defekt des Fc γ RI beschrieben, der durch eine Mutation in der kodierenden DNA Sequenz für die zytoplasmatische Domäne des Rezeptors verursacht wird. Durch den Verlust von vier Basenpaaren kommt es zu einer Leserasterverschiebung, die dazu führt, daß ein Stopkodon entsteht und somit ca. 75% der kodierenden Sequenz der zytoplasmatische Domäne nicht mehr translatiert werden. Diese Trunkation des Rezeptors führt dazu, daß der NOD-Fc γ RI gebundenes IgG2a nicht mehr internalisiert (Prins et al. 1993). Um diesen Defekt mit der Fc γ RIII Deletion der knock-out Tiere zu kombinieren wurden die beiden Stämme gekreuzt. Durch die Rückkreuzung der entstehenden biallelisch heterozygoten F1-Generation wurde ein Zuchtpaar generiert das beide Fc γ -Rezeptor Defekte homozygot aufweist (siehe Abb. 3.11). Der Nachweis der Fc γ RIII knock-out DNA erfolgte durch eine genomische PCR. Es wurden Primer verwendet, die spezifisch für die nur in den genmanipulierten Tieren vorhandenen Sequenzen der Hygromycin Resistenz Kasette, bzw. für die entsprechenden, nur in Wildtyp-Tieren vorhandenen Sequenzen sind. Unter den 62 Tieren, die wir aus der F2-Generation analysierten, fanden wir 15 Tiere, die das Merkmal des homozygoten Fc γ RIII knock-outs aufwiesen. Dies entsprach der theoretisch zu erwartenden Frequenz von 25%. Um diese Tiere auf den NOD Defekt des Fc γ RI zu untersuchen, wurde aus der genomischen DNA ein PCR Fragment amplifiziert das die Deletion von vier Basenpaaren des Rezeptors beinhaltet. Nach der Auftrennung der radioaktiv markierten Fragmente auf einem Sequenz-Polyacrylamidgel konnte der Größenunterschied auf einem Autoradiogramm unterschieden werden. Es wurden drei Tiere gefunden, die

beide Fc γ -Rezeptor Defekte homozygot aufwiesen. Diese wurden für den Aufbau neuer Zuchtpaare verwendet (Abb. 3.12 und 3.13).

4.3.2 Die Bedeutung von Fc γ RI, Fc γ RIII und des Komplementsystems in der IgG2a induzierten AIHA

Um den Einfluß der beiden Fc γ -Rezeptor Defekte auf die Phagozytose IgG2a opsonierter Erythrozyten zu untersuchen, wurden zunächst in-vitro Phagozytose-Assays durchgeführt. Thioglykollat aktivierte Peritoneal-Makrophagen aus den verschiedenen Mausstämmen wurden mit 34-3C opsonierten MRBC inkubiert, um ihre Phagozytosekapazität zu quantifizieren (Abb. 3.14). Es zeigte sich, daß im Vergleich mit C57Bl/6 Kontrollen weder die Fc γ RIII Defizienz noch der Fc γ RI Defekt die Phagozytose negativ beeinflussen. Dies bedeutet, daß jeder der beiden Rezeptoren kompensatorisch für den Verlust des anderen wirken kann. Erst durch die Blockade des Fc γ RII und Fc γ RIII durch die Vorinkubation mit 2.4G2 wird die Phagozytose der NOD Makrophagen mit dem Fc γ RI Defekt signifikant erniedrigt. Sie sinkt auf eine basale Restaktivität, die ebenfalls in den Zellen der NOD-Fc γ RIII^{-/-} Rückkreuzungen noch zu verzeichnen ist, und die auch durch die 2.4G2 Behandlung nicht mehr verringert wird. Als weitere Kontrolle wurden Makrophagen aus FcR γ -Ketten knock-out Tieren eingesetzt. Sie weisen eine funktionelle Defizienz des Fc γ RI und des Fc γ RIII auf, da die für beide Rezeptoren zur Signaltransduktion essentielle Untereinheit deletiert ist. Auch diese Zellen zeigen noch eine Restphagozytose von 24,7%, die sich nicht signifikant von den NOD-Fc γ RIII^{-/-} Rückkreuzungen unterscheidet. Über die Ursachen dieser Restaktivität läßt sich nur spekulieren, da dieses in-vitro System naturgemäß von einigen unphysiologischen Faktoren beeinflusst wird, wie etwa der sehr hohen Dichte der Opsonierung der MRBC.

Um die Auswirkungen der verschiedenen Rezeptordefekte in-vivo zu untersuchen, wurde den Tieren eine letale Dosis des 34-3C IgG2a anti MRBC Antikörpers von 15 μ g/gKG verabreicht. Alle C57Bl/6 Kontrolltiere verstarben daran in den ersten fünf Tagen (Abb. 3.15). Wie in früheren Beobachtungen bereits festgestellt wurde, ist eine geringere Dosis des 34-3C Antikörpers in der

Lage, eine der durch IgG1 anti MRBC (105-2H) entsprechende AIHA zu induzieren (interne Mitteilung, Dr. D. Meyer). Interessanterweise wiesen die NOD-Mäuse eine Protektion gegen die bei C57Bl/6 letale Dosis des 34-3C auf, denn 87,5% der untersuchten Tiere überlebten diese Behandlung. Auch die Deletion des Fc γ RIII schützte etwa die Hälfte der Tiere gegen die letale Form der AIHA. Die NOD-Fc γ RIII^{-/-} Rückkreuzungen waren allerdings die einzige Gruppe, die diese Behandlung komplett überlebte. Diese Ergebnisse bestätigen teilweise die in-vitro Versuche der Phagozytoseassays mit Peritoneal-makrophagen. Sowohl der Fc γ RI als auch der Fc γ RIII Defekt sind in der Lage eine gewisse Protektion gegen eine letale IgG2a induzierte AIHA zu vermitteln, während nur der doppelte Defekt beider Rezeptoren die Tiere komplett gegen den tödlichen Verlauf der Erkrankung schützt. Das Ausmaß der Protektion läßt auf eine größere Rolle des Fc γ RI in dieser Form der AIHA schließen. Von den acht Tieren der NOD Gruppe ist lediglich eine Maus verstorben, während vier der neun untersuchten Fc γ RIII knock-out Tiere die Behandlung nicht überlebten. Ein Faktor, der eventuell zur Verfälschung dieser Ergebnisse führen könnte ist allerdings der unterschiedliche genetische Hintergrund zwischen NOD und Fc γ RIII defizienten Tieren.

Zur genaueren Differenzierung wurde der Verlauf des Hämatokrits während der AIHA bestimmt (Abb. 3.16). Hier wird deutlich, daß die NOD Tiere zwar größtenteils gegen den letalen Verlauf der AIHA geschützt sind, jedoch eine sehr schwere Form der Erkrankung mit einem mittleren Hämatokrit von 15% am Tag vier entwickeln. Die NOD-Fc γ RIII Tiere zeigen hingegen einen milden Verlauf der AIHA, mit einem leichten Abfall des Hämatokrits auf 28% am Tag vier. Dies entspricht etwa dem Verlauf bei FcR γ -Ketten defizienten Mäusen, die zwar bereits am Tag drei auf 22% absinken, aber am Tag vier wieder einen Wert von 27,1% erreichen.

Die Ursache für den verbliebenen Abfall des Hämatokrits wurde näher untersucht, indem bei FcR γ -Ketten knock-out Mäusen durch eine Behandlung mit Cobra Venom Faktor (CVF) das Komplementsystem depletiert wurde. An Kontrolltieren durchgeführte Messungen der Komplementaktivität zeigten, daß im Verlauf der AIHA das Komplementsystem der Tiere durch die CVF Behandlung inaktiviert werden konnte (Abb. 3.17). Der Hämatokritverlauf wird

durch die Inaktivierung des Komplementsystems fast komplett gegen den verbliebenen Abfall geschützt. CVF behandelte Tiere zeigen im Vergleich mit den unbehandelten FcR γ -Ketten defizienten Mäusen nur noch einen sehr leichten Abfall des Hämatokrits auf mittlere 39%. Diese Beobachtungen widersprechen nur scheinbar Versuchen, in denen keine Unterschiede in der Phagozytose zwischen Komplement defizienten und Kontroll-Tieren beobachtet wurden (Sylvestre et al. 1996). Da in dem Modell der FcR γ -Ketten knock-out Maus keine aktivatorischen Fc γ -Rezeptoren vorhanden sind, kann das Komplementsystem hier eine gewisse kompensatorische Funktion entfalten. In einer Wildtyp-Maus wird dieser Effekt durch die wesentlich effizientere Fc γ -Rezeptor vermittelte Phagozytose überdeckt.

4.3.3 Der Einfluß des Fc γ RII auf die IgG2a induzierte AIHA

Auch für die IgG2a vermittelte Phagozytose sollte der Einfluß des Fc γ RII untersucht werden. Zunächst wurde ein aktiver Anteil an der Phagozytose der IgG2a opsonierten MRBC zu beurteilt, der prinzipiell durch den Makrophagen typischen Fc γ RIIb2 möglich wäre und auch schon in Transfektionsstudien gezeigt wurde (Amigorena et al. 1998). Hierzu induzierten wir eine AIHA in Mäusen mit einer kombinierten Defizienz für den Fc γ RII und die FcR γ -Kette (Abb. 3.19). Zusätzlich wurde auch eine CVF Behandlung vorgenommen, um Einflüsse des Komplementsystems auszuschließen. Verglichen mit den Werten aus der FcR γ -Ketten knock-out Maus läßt sich in diesem doppel knock-out Modell jedoch keine weitere Steigerung der Protektion gegen die IgG2a vermittelte AIHA beobachten. Weder ohne Komplementdepletion noch nach der CVF Behandlung weichen die Kinetiken der beiden Mausstämme voneinander ab (siehe Abb. 3.18). Dies läßt eine aktive Beteiligung des Fc γ RII an Phago-zytoseprozessen in der AIHA als unwahrscheinlich erscheinen.

Die regulative Funktion des Fc γ RII wurde wiederum im Modell der Fc γ RII knock-out Maus untersucht (Abb. 3.20). Auch hier ergaben sich keine Unterschiede zwischen den C57Bl/6 Kontrollen und den knock-out Tieren. Somit ist auch für die IgG2a induzierte AIHA eine Beteiligung des Fc γ RII weder

durch die direkte Teilnahme an phagozytotischen Prozessen noch durch regulative Mechanismen gegeben.

4.4 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß niedrig affiner Fc γ -Rezeptoren auf verschiedene entzündliche Prozesse des Immunsystems untersucht. In diesem Zusammenhang konnten die ersten monoklonalen Antikörper charakterisiert werden, die eine Spezifität für den murinen Fc γ RII und nicht für den Fc γ RIII aufweisen. Neben dieser Spezifität der anti-Ly-17 Antikörper liegt auch eine Konkurrenz mit der Bindungsstelle des mAk 2.4G2 vor, der den Fc γ RII und den Fc γ RIII gleichermaßen erkennt. Außerdem blockieren anti-Ly-17 Antikörper die Ligandenbindungsstelle des Fc γ RII in-vitro und in-vivo. Dies ermöglicht eine Vielzahl neuer Möglichkeiten der Untersuchung der Gewebeverteilung der niedrig affinen Fc γ -Rezeptoren in verschiedenen Aktivierungszuständen sowie funktionelle Untersuchungen des im allgemeinen regulatorisch wirksamen Fc γ RII. Durch anti-Ly-17 Antikörper kann der Fc γ RII in verschiedenen knock-out Modellen blockiert werden, ohne aufwendige Rückkreuzungen durchzuführen. So konnten in dieser Arbeit die Effekte der Fc γ RII Blockade auf die Phagozytose von Immunkomplexen durch Peritonealmakrophagen, die passive cutane Arthus Reaktion und die experimentelle AIHA gezeigt werden.

Außerdem wurde die Isotypenspezifität der verschiedenen Fc γ -Rezeptoren näher untersucht. In unserem Labor konnte bereits eine starke Restriktion IgG1 vermittelter Prozesse auf den Fc γ RIII gezeigt werden, während IgG2a eine gewisse Redundanz aufweist. Durch die Erstellung eines Fc γ RI und Fc γ RIII doppelt defekten Mausstammes konnte gezeigt werden, daß durch den Defekt der einzelnen Rezeptoren eine gewisse Protektion gegen eine letale Form der AIHA erzeugt wird, besonders durch den NOD Defekt des Fc γ RI. Einen kompletten Schutz gegen diese Erkrankung bot nur der kombinierte Defekt beider Rezeptoren, des Fc γ RI und des Fc γ RIII. In diesem Modell konnte auch ein gewisser Einfluß des Komplementsystems nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise hatte die Deletion oder die Blockade des Fc γ RII keinen

Einfluß auf den Verlauf der AIHA. Trotz seiner regulativen Funktion, die der Rezeptor auf die Phagozytose durch Peritoneal-Makrophagen aufweist, scheint sich dies nicht auf Makrophagen der Leber und der Milz auszuwirken, die für die Entwicklung der AIHA verantwortlich sind. Die Untersuchung dieses Phänomens bleibt weiteren Studien vorbehalten.

5 Literaturverzeichnis

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

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

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

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

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

Binstadt, B. A., K. M. Brumbaugh, C. J. Dick, A. M. Scharenberg, B. L. Williams, M. Colonna, L. L. Lanier, J. P. Kinet, R. T. Abraham, and P. J. Leibson. 1996. Sequential involvement of Lck and SHP-1 with MHC-recognizing receptors on NK cells inhibits FcR-initiated tyrosine kinase activation. *Immunity* 5: 629-638

Bolland, S., R. N. Pearce, T. Kurosaki, and J. V. Ravetch. 1998. SHIP modulates immune receptor responses by regulating membrane association of Btk. *Immunity* 8: 509-516

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

-
- Boros, P., T. Muryoi, H. Spiera, C. Bona, and J. C. Unkeless. 1993. Autoantibodies directed against different classes of Fc gamma R are found in sera of autoimmune patients. *J Immunol* 150: 2018-2024
- Boros, P., J. A. Odin, T. Muryoi, S. K. Masur, C. Bona, and J. C. Unkeless. 1991. IgM anti-Fc gamma R autoantibodies trigger neutrophil degranulation. *J Exp Med* 173: 1473-1482
- Braakman, E., J. G. van de Winkel, B. A. van Krimpen, M. Jansze, and R. L. Bolhuis. 1992. CD16 on human gamma delta T lymphocytes: expression, function, and specificity for mouse IgG isotypes. *Cell Immunol* 143: 97-107
- Brooks, D. G., W. Q. Qiu, A. D. Luster, and J. V. Ravetch. 1989. Structure and expression of human IgG FcRII(CD32). Functional heterogeneity is encoded by the alternatively spliced products of multiple genes. *J Exp Med* 170: 1369-1385
- Burd, P. R., H. W. Rogers, J. R. Gordon, C. A. Martin, S. Jayaraman, S. D. Wilson, A. M. Dvorak, S. J. Galli, and M. E. Dorf. 1989. Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med* 170: 245-257
- Burmeister, W. P., L. N. Gastinel, N. E. Simister, M. L. Blum, and P. J. Bjorkman. 1994. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor [see comments]. *Nature* 372: 336-343
- Burshtyn, D. N., A. M. Scharenberg, N. Wagtmann, S. Rajagopalan, K. Berrada, T. Yi, J. P. Kinet, and E. O. Long. 1996. Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor. *Immunity* 4: 77-85
- Cambier, J. C. 1995a. Antigen and Fc receptor signaling. The awesome power of the immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM). *J Immunol* 155: 3281-3285
- Cambier, J. C. 1995b. New nomenclature for the Reth motif (or ARH1/TAM/ARAM/YXXL) [letter]. *Immunol Today* 16: 110
- Cambier, J. C., and S. A. Johnson. 1995. Differential binding activity of ARH1/TAM motifs. *Immunol Lett* 44: 77-80
- Chacko, G. W., S. Tridandapani, J. E. Damen, L. Liu, G. Krystal, and K. M. Coggeshall. 1996. Negative signaling in B lymphocytes induces tyrosine

phosphorylation of the 145-kDa inositol polyphosphate 5-phosphatase, SHIP. *J Immunol* 157: 2234-2238

Clark, M. R., S. B. Clarkson, P. A. Ory, N. Stollman, and I. M. Goldstein. 1989. Molecular basis for a polymorphism involving Fc receptor II on human monocytes. *J Immunol* 143: 1731-1734

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

Clynes, R., J. S. Maizes, R. Guinamard, M. Ono, T. Takai, and J. V. Ravetch. 1999. Modulation of Immune Complex-induced Inflammation In Vivo by the Coordinate Expression of Activation and Inhibitory Fc Receptors. *J Exp Med* 189: 179-185

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

Clynes, R., Y. Takechi, Y. Moroi, A. Houghton, and J. V. Ravetch. 1998b. Fc receptors are required in passive and active immunity to melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 652-656

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

D'Ambrosio, D., K. L. Hippen, S. A. Minskoff, I. Mellman, G. Pani, K. A. Siminovitch, and J. C. Cambier. 1995. Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc gamma RIIB1 [see comments]. *Science* 268: 293-297

Davidson, W. F., d. Morse HC, B. J. Mathieson, C. A. Kozak, and F. W. Shen. 1983. The B cell alloantigen Ly-17.1 is controlled by a gene closely linked to Ly-20 and Ly-9 on chromosome 1. *Immunogenetics* 17: 325-329

de Haas, M., H. R. Koene, M. Kleijer, E. de Vries, S. Simsek, M. J. van Tol, D. Roos, and A. E. von dem Borne. 1996. A triallelic Fc gamma receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc gamma RIIIa. *J Immunol* 156: 3948-3955

-
- de Vries, E., H. R. Koene, J. M. Vossen, J. W. Gratama, A. E. von dem Borne, J. L. Waaijer, A. Haraldsson, M. de Haas, and M. J. van Tol. 1996. Identification of an unusual Fc gamma receptor IIIa (CD16) on natural killer cells in a patient with recurrent infections. *Blood* 88: 3022-3027
- Dombrowicz, D., V. Flamand, K. K. Brigman, B. H. Koller, and J. P. Kinet. 1993. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. *Cell* 75: 969-976
- Dombrowicz, D., V. Flamand, I. Miyajima, J. V. Ravetch, S. J. Galli, and J. P. Kinet. 1997. Absence of Fc epsilonRI alpha chain results in upregulation of Fc gammaRIII-dependent mast cell degranulation and anaphylaxis. Evidence of competition between Fc epsilonRI and Fc gammaRIII for limiting amounts of FcR beta and gamma chains. *J Clin Invest* 99: 915-925
- Doody, G. M., L. B. Justement, C. C. Delibrias, R. J. Matthews, J. Lin, M. L. Thomas, and D. T. Fearon. 1995. A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP. *Science* 269: 242-244
- Ernst, L. K., A. M. Duchemin, and C. L. Anderson. 1993. Association of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI) with the gamma subunit of the IgE receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 6023-6027
- Ernst, L. K., J. G. van de Winkel, I. M. Chiu, and C. L. Anderson. 1992. Three genes for the human high affinity Fc receptor for IgG (Fc gamma RI) encode four distinct transcription products. *J Biol Chem* 267: 15692-15700
- Fanger, N. A., K. Wardwell, L. Shen, T. F. Tedder, and P. M. Guyre. 1996. Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells. *J Immunol* 157: 541-548
- Fleit, H. B., C. D. Kobasiuk, C. Daly, R. Furie, P. C. Levy, and R. O. Webster. 1992. A soluble form of Fc gamma RIII is present in human serum and other body fluids and is elevated at sites of inflammation. *Blood* 79: 2721-2728
- Gavin, A. L., N. Barnes, H. M. Dijkstra, and P. M. Hogarth. 1998a. Identification of the mouse IgG3 receptor: implications for antibody effector function at the interface between innate and adaptive immunity. *J Immunol* 160: 20-23

Gavin, A. L., J. A. Hamilton, and P. M. Hogarth. 1996. Extracellular mutations of non-obese diabetic mouse FcγRI modify surface expression and ligand binding. *J Biol Chem* 271: 17091-17099

Gavin, A. L., P. S. Tan, and P. M. Hogarth. 1998b. Gain-of-function mutations in FcγRI of NOD mice: implications for the evolution of the Ig superfamily. *EMBO J* 17: 3850-3857

Gessner, J. E., T. Grussenmeyer, M. Dumbsky, and R. E. Schmidt. 1996. Separate promoters from proximal and medial control regions contribute to the natural killer cell-specific transcription of the human FcγRIII-A (CD16-A) receptor gene. *J Biol Chem* 271: 30755-30764

Gessner, J. E., T. Grussenmeyer, and R. E. Schmidt. 1995. Differentially regulated expression of human IgG Fc receptor class III genes. *Immunobiology* 193: 341-355

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

Gounni, A. S., B. Lamkhioued, K. Ochiai, Y. Tanaka, E. Delaporte, A. Capron, J. P. Kinet, and M. Capron. 1994. High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites. *Nature* 367: 183-186

Hämmerling, U., interne Mitteilung, Sloan-Kettering Institute, New York

Hartmann, F., C. Renner, W. Jung, C. Deisting, M. Juwana, B. Eichentopf, M. Kloft, and M. Pfreundschuh. 1997. Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30 bispecific antibody [published erratum appears in *Blood* 1998 Mar 1;91(5):1832]. *Blood* 89: 2042-2047

Hartnell, A., A. B. Kay, and A. J. Wardlaw. 1992. IFN-γ induces expression of FcγRIII (CD16) on human eosinophils. *J Immunol* 148: 1471-1478

Hazenbos, W. L., J. E. Gessner, F. M. Hofhuis, H. Kuipers, D. Meyer, I. A. Heijnen, R. E. Schmidt, M. Sandor, P. J. Capel, M. Daëron, J. G. van de Winkel, and J. S. Verbeek. 1996. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in FcγRIII (CD16) deficient mice. *Immunity* 5: 181-188

Hazenbos, W. L., I. A. Heijnen, D. Meyer, F. M. Hofhuis, C. R. Renardel de Lavalette, R. E. Schmidt, P. J. Capel, J. G. van de Winkel, J. E. Gessner, T. K.

van den Berg, and J. S. Verbeek. 1998. Murine IgG1 complexes trigger immune effector functions predominantly via Fc gamma RIII (CD16). *J Immunol* 161: 3026-3032

Hendrich, C., J. G. Kuipers, W. Kolanus, M. Hammer, and R. E. Schmidt. 1991. Activation of CD16+ effector cells by rheumatoid factor complex. Role of natural killer cells in rheumatoid arthritis [see comments]. *Arthritis Rheum* 34: 423-431

Hibbs, M. L., P. M. Hogarth, and I. F. McKenzie. 1985. The mouse Ly-17 locus identifies a polymorphism of the Fc receptor. *Immunogenetics* 22: 335-348

Hoffmeyer, F., K. Witte, U. Gebhardt, and R. E. Schmidt. 1995. The low affinity Fc gamma RIIa and Fc gamma RIIIb on polymorphonuclear neutrophils are differentially regulated by CD45 phosphatase. *J Immunol* 155: 4016-4023

Hogarth, P. M., M. L. Hibbs, L. Bonadonna, B. M. Scott, E. Witort, G. A. Pietersz, and I. F. McKenzie. 1987. The mouse Fc receptor for IgG (Ly-17): molecular cloning and specificity. *Immunogenetics* 26: 161-168

Holmes, K. L., R. G. Palfree, U. Hammerling, and d. Morse HC. 1985. Alleles of the Ly-17 alloantigen define polymorphisms of the murine IgG Fc receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7706-7710

Höpken, U. E., B. Lu, N. P. Gerard, and C. Gerard. 1997. Impaired inflammatory responses in the reverse arthus reaction through genetic deletion of the C5a receptor. *J Exp Med* 186: 749-756

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

Hulett, M. D., and P. M. Hogarth. 1998. The second and third extracellular domains of Fc gamma RI (CD64) confer the unique high affinity binding of IgG2a. *Mol Immunol* 35: 989-996

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

Hulett, M. D., E. Witort, R. I. Brinkworth, I. F. McKenzie, and P. M. Hogarth. 1994. Identification of the IgG binding site of the human low affinity receptor for IgG Fc gamma RII. Enhancement and ablation of binding by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 269: 15287-15293

- Hulett, M. D., E. Witort, R. I. Brinkworth, I. F. McKenzie, and P. M. Hogarth. 1995. Multiple regions of human Fc gamma RII (CD32) contribute to the binding of IgG. *J Biol Chem* 270: 21188-21194
- Hundt, M., and R. E. Schmidt. 1992. The glycosylphosphatidylinositol-linked Fc gamma receptor III represents the dominant receptor structure for immune complex activation of neutrophils. *Eur J Immunol* 22: 811-816
- Ikuta, K., M. Takami, C. W. Kim, T. Honjo, T. Miyoshi, Y. Tagaya, T. Kawabe, and J. Yodoi. 1987. Human lymphocyte Fc receptor for IgE: sequence homology of its cloned cDNA with animal lectins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 819-823
- Indik, Z. K., J. G. Park, S. Hunter, and A. D. Schreiber. 1995. The molecular dissection of Fc gamma receptor mediated phagocytosis. *Blood* 86: 4389-4399
- Izui, S. 1994. Autoimmune hemolytic anemia. *Curr Opin Immunol* 6: 926-930
- Izui, S., L. Reininger, T. Shibata, and T. Berney. 1994. Pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia in New Zealand black mice. *Crit Rev Oncol Hematol* 17: 53-70
- Kawakami, Y., J. Kitaura, D. Hata, L. Yao, and T. Kawakami. 1999. Functions of Bruton's tyrosine kinase in mast and B cells. *J Leukoc Biol* 65: 286-290
- Kerst, J. M., J. G. van de Winkel, A. H. Evans, M. de Haas, I. C. Slaper-Cortenbach, T. P. de Wit, A. E. von dem Borne, C. E. van der Schoot, and R. H. van Oers. 1993. Granulocyte colony-stimulating factor induces hFc gamma RI (CD64 antigen)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood* 81: 1457-1464
- Kimura, S., N. Tada, E. Nakayama, Y. Liu, and U. Hämmerling. 1981. A new mouse cell-surface antigen (Ly-m20) controlled by a gene linked to Mls locus and defined by monoclonal antibodies. *Immunogenetics* 14: 3-14
- Klein, J. (1991) *Immunologie*, Trans. R. E. Schmidt, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, New York, Basel, Cambridge
- Koene, H. R., M. Kleijer, J. Algra, D. Roos, A. E. von dem Borne, and M. de Haas. 1997. Fc gammaRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc gammaRIIIa, independently of the Fc gammaRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood* 90: 1109-1114

Kurosaki, T., I. Gander, U. Wirthmueller, and J. V. Ravetch. 1992. The beta subunit of the Fc epsilon RI is associated with the Fc gamma RIII on mast cells. *J Exp Med* 175: 447-451

Kurosaki, T., and J. V. Ravetch. 1989. A single amino acid in the glycosyl phosphatidylinositol attachment domain determines the membrane topology of Fc gamma RIII [published erratum appears in *Nature* 1990 Jan 25;343(6256):390]. *Nature* 342: 805-807

Lah, M., K. Quelch, N. J. Deacon, I. F. McKenzie, and P. M. Hogarth. 1990. Identification of the mouse beta Fc gamma RII polymorphism by direct sequencing of amplified genomic DNA. *Immunogenetics* 31: 202-206

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

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

Li, M., U. Wirthmueller, and J. V. Ravetch. 1996. Reconstitution of human Fc gamma RIII cell type specificity in transgenic mice. *J Exp Med* 183: 1259-1263

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

Luan, J. J., R. C. Monteiro, C. Sautès, G. Fluteau, L. Eloy, W. H. Fridman, J. F. Bach, and H. J. Garchon. 1996. Defective Fc gamma RII gene expression in macrophages of NOD mice: genetic linkage with up-regulation of IgG1 and IgG2b in serum. *J Immunol* 157: 4707-4716

Meyer, D., C. Schiller, J. Westermann, S. Izui, W. L. W. Hazenbos, J. S. Verbeek, R. E. Schmidt, and J. E. Gessner. 1998. Fc gamma RIII (CD16)-Deficient mice show IgG Isotype-Dependent Protection to Experimental Autoimmune Hemolytic Anemia. *Blood* 92: 3997-4002

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

-
- Miller, K. L., A. M. Duchemin, and C. L. Anderson. 1996. A novel role for the Fc receptor gamma subunit: enhancement of Fc gamma R ligand affinity. *J Exp Med* 183: 2227-2233
- Miyajima, I., D. Dombrowicz, T. R. Martin, J. V. Ravetch, J. P. Kinet, and S. J. Galli. 1997. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. *J Clin Invest* 99: 901-914
- Moretta, L., M. Ferrarini, M. L. Durante, and M. C. Mingari. 1975. Expression of a receptor for IgM by human T cells in vitro. *Eur J Immunol* 5: 565-569
- Morton, H. C., M. van Egmond, and J. G. van de Winkel. 1996. Structure and function of human IgA Fc receptors (Fc alpha R). *Crit Rev Immunol* 16: 423-440
- Muta, T., T. Kurosaki, Z. Misulovin, M. Sanchez, M. C. Nussenzweig, and J. V. Ravetch. 1994. A 13-amino-acid motif in the cytoplasmic domain of Fc gamma RIIB modulates B-cell receptor signalling. *Nature* 369: 340
- Nakamura, T., H. Kubagawa, T. Ohno, and M. D. Cooper. 1993. Characterization of an IgM Fc-binding receptor on human T cells. *J Immunol* 151: 6933-6941
- Nitschke, L., R. Carsetti, B. Ocker, G. Kohler, and M. C. Lamers. 1997. CD22 is a negative reulator of B-cell receptor signaling. *Curr Biol* 7: 133-143
- Oakey, R. J., T. A. Howard, P. M. Hogarth, K. Tani, and M. F. Seldin. 1992. Chromosomal mapping of the high affinity Fc gamma receptor gene. *Immunogenetics* 35: 279-282
- Oettgen, H. C., T. R. Martin, A. Wynshaw-Boris, C. Deng, J. M. Drazen, and P. Leder. 1994. Active anaphylaxis in IgE-deficient mice. *Nature* 370: 367-370
- Ohno, T., H. Kubagawa, S. K. Sanders, and M. D. Cooper. 1990. Biochemical nature of an Fc mu receptor on human B-lineage cells. *J Exp Med* 172: 1165-1175
- O'Keefe, T. L., G. T. Williams, S. L. Davies, and M. S. Neuberger. 1996. Hyperresponsive B cells in CD22-deficient mice. *Science* 274: 798-801

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

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

Paolini, R., M. H. Jouvin, and J. P. Kinet. 1991. Phosphorylation and dephosphorylation of the high-affinity receptor for immunoglobulin E immediately after receptor engagement and disengagement. *Nature* 353: 855-858

Paolini, R., and J. P. Kinet. 1993. Cell surface control of the multiubiquitination and deubiquitination of high-affinity immunoglobulin E receptors. *EMBO J* 12: 779-786

Paolini, R., V. Renard, E. Vivier, K. Ochiai, M. H. Jouvin, B. Malissen, and J. P. Kinet. 1995. Different roles for the Fc epsilon RI gamma chain as a function of the receptor context. *J Exp Med* 181: 247-255

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

Pfefferkorn, L. C., and S. L. Swink. 1996. Intracluster restriction of Fc receptor gamma-chain tyrosine phosphorylation subverted by a protein-tyrosine phosphatase inhibitor. *J Biol Chem* 271: 11099-11105

Podolin, P. L., P. Denny, C. J. Lord, N. J. Hill, J. A. Todd, L. B. Peterson, L. S. Wicker, and P. A. Lyons. 1997. Congenic mapping of the insulin-dependent diabetes (Idd) gene, Idd10, localizes two genes mediating the Idd10 effect and eliminates the candidate Fcgr1. *J Immunol* 159: 1835-1843

Pricop, L., H. Rabinowich, P. A. Morel, A. Sulica, T. L. Whiteside, and R. B. Herberman. 1993. Characterization of the Fc mu receptor on human natural killer cells. Interaction with its physiologic ligand, human normal IgM, specificity of binding, and functional effects. *J Immunol* 151: 3018-3029

Prins, J. B., J. A. Todd, N. R. Rodrigues, S. Ghosh, P. M. Hogarth, L. S. Wicker, E. Gaffney, P. L. Podolin, P. A. Fischer, A. Sirotna, and a. et. 1993. Linkage on chromosome 3 of autoimmune diabetes and defective Fc receptor for IgG in NOD mice. *Science* 260: 695-698

-
- Qiu, W. Q., D. de Bruin, B. H. Brownstein, R. Pearce, and J. V. Ravetch. 1990. Organization of the human and mouse low-affinity Fc gamma R genes: duplication and recombination. *Science* 248: 732-735
- Quilliam, A. L., N. Osman, I. F. McKenzie, and P. M. Hogarth. 1993. Biochemical characterization of murine Fc gamma RI. *Immunology* 78: 358-363
- Ra, C., M. H. Jouvin, U. Blank, and J. P. Kinet. 1989. A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit. *Nature* 341: 752-754
- Radeke, H. H., J. E. Gessner, P. Uciechowski, H. J. Mägert, R. E. Schmidt, and K. Resch. 1994. Intrinsic human glomerular mesangial cells can express receptors for IgG complexes (hFc gamma RIII-A) and the associated Fc epsilon RI gamma-chain. *J Immunol* 153: 1281-1292
- Radeke, H. H., and K. Resch. 1992. The inflammatory function of renal glomerular mesangial cells and their interaction with the cellular immune system. *Clin Investig* 70: 825-842
- Rappaport, E. F., D. L. Cassel, D. O. Walterhouse, S. E. McKenzie, S. Surrey, M. A. Keller, A. D. Schreiber, and E. Schwartz. 1993. A soluble form of the human Fc receptor Fc gamma RIIA: cloning, transcript analysis and detection. *Exp Hematol* 21: 689-696
- Ravetch, J. V. 1994a. Atopy and Fc receptors: mutation is the message? [news]. *Nat Genet* 7: 117-118
- Ravetch, J. V. 1994b. Fc receptors: rubor redux. *Cell* 78: 553-560
- Ravetch, J. V., and J. P. Kinet. 1991. Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 9: 457-492
- Ravetch, J. V., and B. Perussia. 1989. Alternative membrane forms of Fc gamma RIII(CD16) on human natural killer cells and neutrophils. Cell type-specific expression of two genes that differ in single nucleotide substitutions. *J Exp Med* 170: 481-497
- Rodewald, H. R., P. Moingeon, J. L. Lucich, C. Dosiou, P. Lopez, and E. L. Reinherz. 1992. A population of early fetal thymocytes expressing Fc gamma RII/III contains precursors of T lymphocytes and natural killer cells. *Cell* 69: 139-150

-
- Salmon, J. E., J. C. Edberg, and R. P. Kimberly. 1990. Fc gamma receptor III on human neutrophils. Allelic variants have functionally distinct capacities. *J Clin Invest* 85: 1287-1295
- Salmon, J. E., S. Millard, L. A. Schachter, F. C. Arnett, E. M. Ginzler, M. F. Gourley, R. Ramsey-Goldman, M. G. Peterson, and R. P. Kimberly. 1996. Fc gamma RIIA alleles are heritable risk factors for lupus nephritis in African Americans. *J Clin Invest* 97: 1348-1354
- Sanders, L. A., J. G. van de Winkel, G. T. Rijkers, M. M. Voorhorst-Ogink, M. de Haas, P. J. Capel, and B. J. Zegers. 1994. Fc gamma receptor IIa (CD32) heterogeneity in patients with recurrent bacterial respiratory tract infections. *J Infect Dis* 170: 854-861
- Schmidt, R. E., U. Budde, C. Bröschen-Zywietz, G. Schäfer, and C. Mueller-Eckhardt. 1984. High dose gammaglobulin therapy in adults with idiopathic thrombocytopenic purpura (ITP). Clinical effects. *Blut* 48: 19-25
- Schmidt, R. E., U. Budde, G. Schäfer, and I. Stroehmann. 1981. High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura [letter]. *Lancet* 2: 475-476
- Schubert, J., P. Uciechowski, P. Delany, H. J. Tischler, W. Kolanus, and R. E. Schmidt. 1990. The PIG-anchoring defect in NK lymphocytes of PNH patients. *Blood* 76: 1181-1187
- Shen, F. W., and E. A. Boyse. 1980. An alloantigen selective for B cells: Ly-17.1. *Immunogenetics* 11: 315-317
- Shibata, T., T. Berney, L. Reininger, Y. Chicheportiche, S. Ozaki, T. Shirai, and S. Izui. 1990. Monoclonal anti-erythrocyte autoantibodies derived from NZB mice cause autoimmune hemolytic anemia by two distinct pathogenic mechanisms. *Int Immunol* 2: 1133-1141
- Simmons, D., and B. Seed. 1988. The Fc gamma receptor of natural killer cells is a phospholipid-linked membrane protein [published erratum appears in Nature 1989 Aug 24;340(6235):662]. *Nature* 333: 568-570
- Sivo, J., A. D. Politis, and S. N. Vogel. 1993. Differential effects of interferon-gamma and glucocorticoids on Fc gamma R gene expression in murine macrophages. *J Leukoc Biol* 54: 451-457

- Stöckl, J., O. Majdic, W. F. Pickl, A. Rosenkranz, E. Prager, E. Gschwantler, and W. Knapp. 1995. Granulocyte activation via a binding site near the C-terminal region of complement receptor type 3 alpha-chain (CD11b) potentially involved in intramembrane complex formation with glycosylphosphatidylinositol-anchored Fc gamma RIIIB (CD16) molecules. *J Immunol* 154: 5452-5463
- Sylvestre, D., R. Clynes, M. Ma, H. Warren, M. C. Carroll, and J. V. Ravetch. 1996. Immunoglobulin G-mediated inflammatory responses develop normally in complement-deficient mice. *J Exp Med* 184: 2385-2392
- Sylvestre, D. L., and J. V. Ravetch. 1994. Fc receptors initiate the Arthus reaction: redefining the inflammatory cascade. *Science* 265: 1095-1098
- Sylvestre, D. L., and J. V. Ravetch. 1996. A dominant role for mast cell Fc receptors in the Arthus reaction. *Immunity* 5: 387-390
- Takai, T., M. Li, D. Sylvestre, R. Clynes, and J. V. Ravetch. 1994. FcR gamma chain deletion results in pleiotropic effector cell defects. *Cell* 76: 519-529
- Takai, T., M. Ono, M. Hikida, H. Ohmori, and J. V. Ravetch. 1996. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RII-deficient mice. *Nature* 379: 346-349
- Tamm, A., A. Kister, K. U. Nolte, J. E. Gessner, and R. E. Schmidt. 1996. The IgG binding site of human Fc gamma RIIIB receptor involves CC' and FG loops of the membrane-proximal domain. *J Biol Chem* 271: 3659-3666
- Tamm, A., and R. E. Schmidt. 1997. IgG binding sites on human Fc gamma receptors. *Int Rev Immunol* 16: 57-85
- Tartour, E., H. de la Salle, C. de la Salle, C. Teillaud, L. Camoin, A. Galinha, S. Latour, D. Hanau, W. H. Fridman, and C. Sautès. 1993. Identification, in mouse macrophages and in serum, of a soluble receptor for the Fc portion of IgG (Fc gamma R) encoded by an alternatively spliced transcript of the Fc gamma RII gene. *Int Immunol* 5: 859-868
- te Velde, A. A., R. de Waal Malefijt, R. J. Huijbens, J. E. de Vries, and C. G. Figdor. 1992. IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10. *J Immunol* 149: 4048-4052

-
- te Velde, A. A., R. J. Huijbens, J. E. de Vries, and C. G. Figdor. 1990. IL-4 decreases Fc gamma R membrane expression and Fc gamma R-mediated cytotoxic activity of human monocytes. *J Immunol* 144: 3046-3051
- Thomas, R., and P. E. Lipsky. 1994. Human peripheral blood dendritic cell subsets. Isolation and characterization of precursor and mature antigen-presenting cells. *J Immunol* 153: 4016-4028
- Uciechowski, P., J. E. Gessner, R. Schindler, and R. E. Schmidt. 1992. Fc gamma RIII activation is different in CD16+ cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Eur J Immunol* 22: 1635-1638
- Uciechowski, P., M. Schwarz, J. E. Gessner, R. E. Schmidt, K. Resch, and H. H. Radeke. 1998. IFN-gamma induces the high-affinity Fc receptor I for IgG (CD64) on human glomerular mesangial cells. *Eur J Immunol* 28: 2928-2935
- Unkeless, J. C. 1979. Characterization of a monoclonal antibody directed against mouse macrophage and lymphocyte Fc receptors. *J Exp Med* 150: 580-596
- Unkeless, J. C., E. Scigliano, and V. H. Freedman. 1988. Structure and function of human and murine receptors for IgG. *Annu Rev Immunol* 6: 251-281
- van de Winkel, J. G., and C. L. Anderson. 1991a. Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol* 49: 511-524
- van de Winkel, J. G., and P. J. Capel. 1993. Human IgG Fc receptor heterogeneity: molecular aspects and clinical implications. *Immunol Today* 14: 215-221
- van de Winkel, J. G., L. K. Ernst, C. L. Anderson, and I. M. Chiu. 1991b. Gene organization of the human high affinity receptor for IgG, Fc gamma RI (CD64). Characterization and evidence for a second gene. *J Biol Chem* 266: 13449-13455
- Warmerdam, P. A., N. M. Nabben, S. A. van de Graaf, J. G. van de Winkel, and P. J. Capel. 1993. The human low affinity immunoglobulin G Fc receptor IIC gene is a result of an unequal crossover event. *J Biol Chem* 268: 7346-7349
- Weiner, L. M., J. I. Clark, D. B. Ring, and R. K. Alpaugh. 1995. Clinical development of 2B1, a bispecific murine monoclonal antibody targeting c-erbB-2 and Fc gamma RIII. *J Hematother* 4: 453-456

- Weinshank, R. L., A. D. Luster, and J. V. Ravetch. 1988. Function and regulation of a murine macrophage-specific IgG Fc receptor, Fc gamma R-alpha. *J Exp Med* 167: 1909-1925
- Werfel, T., P. Uciechowski, P. A. Tetteroo, R. Kurrle, H. Deicher, and R. E. Schmidt. 1989. Activation of cloned human natural killer cells via Fc gamma RIII. *J Immunol* 142: 1102-1106
- Wicker, L. S., J. A. Todd, and L. B. Peterson. 1995. Genetic control of autoimmune diabetes in the NOD mouse. *Annu Rev Immunol* 13: 179-200
- Witte, T., F. M. Bode, M. Hammer, H. Deicher, and R. E. Schmidt. 1996. Autoantibody against a 58 kD molecule in a patient with neutropenia and NK cell deficiency. *Br J Haematol* 92: 565-570
- Witte, T., D. Schaumann, R. Hein, U. Helmchen, K. H. Neumann, K. M. Koch, H. Deicher, and R. E. Schmidt. 1993. [Cyclophosphamide bolus therapy in lupus nephritis]. *Dtsch Med Wochenschr* 118: 1005-1010
- Wu, J., J. C. Edberg, P. B. Redecha, V. Bansal, P. M. Guyre, K. Coleman, J. E. Salmon, and R. P. Kimberly. 1997. A novel polymorphism of Fc gamma RIIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest* 100: 1059-1070
- Yuasa, T., S. Kubo, T. Yoshino, A. Ujike, K. Matsumura, M. Ono, J. V. Ravetch, and T. Takai. 1999. Deletion of Fc gamma Receptor IIB Renders H-2b Mice Susceptible to Collagen-induced Arthritis. *J Exp Med* 189: 187-194
- Zhou, M. J., D. M. Lublin, D. C. Link, and E. J. Brown. 1995. Distinct tyrosine kinase activation and Triton X-100 insolubility upon Fc gamma RII or Fc gamma RIIB ligation in human polymorphonuclear leukocytes. Implications for immune complex activation of the respiratory burst. *J Biol Chem* 270: 13553-13560

6 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADCC	Antibody dependent cellular cytotoxicity
AIHA	Autoimmune hämolytische Anämie
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BCR	B-Zellrezeptor
bidest.	Zweifach destilliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin (Rinderserumalbumin)
CD	Cluster of differentiation
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidyltriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme linked immuno sorbend assay
Fab	Fragment antigen binding, monovalent
F(ab) ₂	Fragment antigen binding, bivalent
FACS	Fluorescence activating cell sorting
Fc	Fragment crystallizable eines Antikörpers
FCS	Fetales Kälberserum
Fc _γ R	Fc-Rezeptor für IgG (Fc-Teil)
Fitc	Fluorescein Isothiozyanat
GAM	Goat-anti-mouse
gKG	Gramm Körpergewicht
gp	Glykoprotein
IFN	Interferon

Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
ITAM	Immuno receptor tyrosine activating motif
kD	Kilodalton
ITIM	Immuno receptor tyrosine inhibitory motif
μ	Mikro
M	molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MRBC	Murine red blood cells
n	Nano
NK Zelle	Natürliche Killer Zelle
NOD	Non obese diabetic
MHC	Major-histocompatibility-complex
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PE	Phycoerythrin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAS	Saturated-ammonium-sulfate solution
TCR	T-Zellrezeptor
TEMED	Tetramethylehtylendiamin
TNF α	Tumor-Nekrosefaktor-alpha
TNP	Trinitrophenol
Tris	Tris (Hydroxy-Methyl)-Methylamin
Upm.	Umdrehungen pro Minute

7 Danksagung

Prof. Dr. Reinhold E. Schmidt danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Abteilung durchführen zu können und für seine Unterstützung in meiner gesamten Zeit an der MHH.

Dr. J. E. Gessner danke ich für die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit und zahlreiche oft konträre, aber immer fruchtbare Diskussionen, die die Arbeit in dieser Form ermöglicht haben, besonders aber für das Beharren auf funktionellen Defekten in NOD Mäusen.

Prof. Dr. W. Müller danke ich für die kurzfristige Übernahme des Koreferendariats und seine beruhigende Art.

Mein ganz besonderer Dank gilt natürlich meinen Kollegen in unserem Exil im Kanzlergebäude. Frank Heusohn für die oft überraschende Sichtweise eines Vaters von drei Kindern und Gundula Wirries, die das Ende dieser Arbeit leider knapp verpasst hat. Fabian Loescher danke ich für ein Kopf-an-Kopf Rennen das er (glücklicherweise) gewonnen hat und Iska Janssen-Graalfs für ihre fachliche und menschliche Intelligenz sowie Uli, Kirsten, Simone und Esther für die nette Zusammenarbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen jetzigen und früheren Mitarbeitern aus dem Bettenhaus, Andreas Tiede für einen interessanten Abend in Würzburg, Ingo Bastisch für die Positiv-Kontrolle (Dr. Arbeit machen geht), Roland Jacobs für viele Computer- und sonstige Tips sowie Almut, Anja, noch mal Anu (Danke!), Bettina, Clodel, Frank, Georg, Gyn, Jörg, Kathrin, Margot, Martina, Matthias, Regine, Sabine, Tammo, Thorsten und Uli. Last but not least danke ich Dirk Meyer, der mir so oft im Tierstall Gesellschaft geleistet hat und von dem ich einiges gelernt habe.

Christopher möchte ich für seine Freundschaft danken, die mir in den vergangenen Jahren sehr geholfen hat und Christoph für die Möglichkeit unsere fast identischen Lebenswege zu diskutieren. Christian danke ich dafür, daß er immer noch da ist, wenn man ihn braucht (wenn auch in Rosenthal) und Hartmut, Guenther und Andreas für alles mögliche, was man hier nicht aufschreiben kann.

Meinen Lieblingseltern, Peter und Bernhild Schiller danke ich dafür, daß sie genau so sind wie sie sind und mich immer in allem unterstützt haben, als wäre das selbstverständlich. Ich weiß, daß ich mit Euch viel Glück hatte, Danke!

Ute möchte ich dafür danken, daß es sie gibt und daß sie immer zu mir gehalten hat. Das ist bestimmt nicht immer einfach...

8 Lebenslauf

Name: Carsten Schiller
Adresse: Mathildenstr. 13, 30451 Hannover
geboren: 17. Juni 1966 in Hanau am Main
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Eltern: Peter Schiller und Bernhild Schiller, geb. Carstensen

01.08.1972 - 30.06.1976 Grundschule Hanau a. M.
01.07.1976 - 19.07.1978 Förderstufe Hanau a. M.
01.08.1978 - 09.07.1980 Gymnasium Hanau a. M.
01.08.1980 - 19.06.1985 Gymnasium Isernhagen
Juni 1985 Abitur
12.08.1985 - 28.02.1987 Zivildienst bei der Johanniter-Unfallhilfe Wunstorf
im Behindertenfahrdienst.
01.10.1987 - 30.06.1994 Studium der Biologie an der Universität Hannover
Juni 1994 Diplomprüfung in den Fächern Mikrobiologie,
Biochemie, Zoologie, und Immunologie
Juli 1994 Diplomarbeit an der Medizinischen Hochschule
Hannover, Abt. Klin. Immunologie über Mutationen
des Komplementrezeptors 3
September 1995 Studienabschluß als Diplom-Biologe
seit 01.10.1995 Doktorarbeit an der Medizinischen Hochschule
Hannover, Abt. Klin. Immunologie über die
Charakterisierung niedrig affiner Fc γ -Rezeptoren an
knock-out Maus Modellen

Originalpublikationen:

Dirk Meyer, Carsten Schiller, Jürgen Westermann, Shozo Izui, Wouter L. W. Hazenbos, J. Sjef Verbeek, Reinhold E. Schmidt, and J. Engelbert Gessner (1998). Fc γ RIII (CD16) deficient mice demonstrate IgG subtype-dependent protection in experimental autoimmune hemolytic anemia (AIHA). *Blood* **92(11)**: 3997-4002

Carsten Schiller, Ulrich Baumann, Kirsten Schwerter-Strumpf, Shozo Izui, Toshiyuki Takai, J. Sjef Verbeek, Reinhold E. Schmidt, and J. Engelbert Gessner (1998). Antibodies specific for the murine Ly-17.1/2 alloantigen system allow for the functional dissection of the counteractive Fc γ RII and Fc γ RIII receptors. (eingereicht).

Vorträge, Poster und Abstracts:

C. Schiller, A. Tamm, J.E. Gessner, T. Witte, F.L. Dumoulin, and R.E. Schmidt (1996). Molecular characterization of a defect in the complement-receptor 3 associated with systemic lupus erythematosus (SLE). Vortrag auf dem Spring Meeting of the Deutsche Gesellschaft für Immunologie 29.2.-2.3. 1996 in Jena

C. Schiller, A. Tamm, J.E. Gessner, T. Witte, F.L. Dumoulin, and R.E. Schmidt (1996). Molekularbiologische Untersuchung eines Komplementrezeptor 3-Defektes im Zusammenhang mit einem systemischen Lupus Erythematoses (SLE). Vortrag auf der Tagung der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie, 18.9.-21.9. 1996 in Bamberg

C. Schiller, A. Tamm, J.E. Gessner, T. Witte, F.L. Dumoulin, and R.E. Schmidt (1996). Molecular characterization of a defect in the complement-receptor 3 correlated to a systemic lupus erythematosus (SLE). Beitrag für Abstracts of the XVI. International complement workshop. *Molecular Immunology*, 33 (1): 3, 1996

Schiller C, Meyer D, Schmidt RE, Gessner JE (1997). Murine low affinity Fc γ receptors can be distinguished by anti-Ly-17 antibodies. Poster auf dem 13. European Immunology Meeting vom 22.-25.06. 1997 in Amsterdam. Immunol. Letters **56** (1-3): 401

Meyer D, Schiller C, Westermann J, Izui S, Verbeek JS, Schmidt RE, Gessner JE (1997). Dissecting the role of Fc γ R in the pathogenesis of autoimmune hemolytic anemia. Vortrag auf dem 13. European Immunology Meeting vom 22.-25.06. 1997 in Amsterdam. Immunol. Letters **56** (1-3): 206

Schiller C, Meyer D, Schmidt RE Gessner JE (1997). Anti-Ly-17 antibodies can be used for functional Fc γ RII blocking in mice. Vortrag auf der 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie vom 24.-27.09.1997 in Würzburg. Immunobiol. **197**: 294.

Meyer D, Schiller C, Westermann J, Izui S, Verbeek JS, Schmidt RE Gessner JE (1997). Role of Fc γ RIII in experimental autoimmune hemolytic anemia. Poster auf der 28. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie vom 24.-27.09.1997 in Würzburg. Immunobiol. **197**: 245.

Meyer D, Schiller C, Westermann J, Izui S, Verbeek JS, Gessner JE, Schmidt RE (1997). Fc γ -Rezeptor vermittelte Mechanismen der autoimmunen hämolytischen Anämie (AIHA) am Beispiel der Fc γ RIII KO Maus. Vortrag auf der XXV. Tagung des Arbeitskreises Klinische Immunologie am 31.10 und 01.11.1997 in Frankfurt/Höchst.

Carsten Schiller, Ulrich Baumann, Kirsten Schwerter-Strumpf, Shozo Izui, Toshiyuki Takai, J. Sjeff Verbeek, Reinhold E. Schmidt, and J. Engelbert Gessner (1998). Antibodies specific for the murine Ly-17.1/2 alloantigen system allow for the functional dissection of the counteractive Fc γ RII and Fc γ RIII receptors. Poster auf dem 10th Symposium on Signals and Signal

Processing in the Immune System vom 13. Bis 17. September 1998 in Balatonöszöd, Ungarn.

Carsten Schiller, Ulrich Baumann, Kirsten Schwerter-Strumpf, Shozo Izui, Toshiyuki Takai, J. Sjef Verbeek, Reinhold E. Schmidt, and J. Engelbert Gessner (1998). Antibodies specific for the murine Ly-17 alloantigen distinguish class II from class III Fc γ receptors. Poster auf der XXIX. Tagung der Gesellschaft für Immunologie vom 23. Bis 26. September 1998 in Freiburg. Immunobiology, 199 (3-5): 664.

Carsten Schiller, D. Meyer, Shozo Izui, J. Sjef Verbeek, Reinhold E. Schmidt, and J. Engelbert Gessner (1998). Fc γ RI and Fc γ RIII, but not Fc γ RII contribute to the development of experimental autoimmune hemolytic anemia: Effects of the IgG isotype. Poster und Vortrag auf der XXIX. Tagung der Gesellschaft für Immunologie vom 23. Bis 26. September 1998 in Freiburg. Immunobiology, 199 (3-5): 665.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung der in vivo Funktion niedrigaffiner Fc-Rezeptorgene in KO-Mausmodellen“ selbständig verfaßt sowie alle benutzten Hilfsmittel und Institutionen vollständig angegeben habe.

Ferner versichere ich, daß die vorliegende Dissertation nicht schon als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit verwendet worden ist.

Hannover, Mai 1999