

AUS DEM
INSTITUT FÜR SYSTEMISCHE ENTZÜNDUNGSFORSCHUNG
DER UNIVERSITÄT ZU LÜBECK

DIREKTOR: PROF. DR. JÖRG KÖHL

**Wirkung von sialylierten IgG Antikörpern
auf Dendritische Zellen und die T-Zell
Differenzierung**

Inauguraldissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von
Johann RAHMÖLLER
aus Bünde

Lübeck 2014

Promotionskommission

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Matthias Klinger

Tag der mündlichen Prüfung: 14.05.2018

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 14.05.2018

- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	viii
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Angeborenes Immunsystem	2
1.1.1.1 Humorale Komponenten	2
1.1.1.2 Zelluläre Bestandteile	3
1.1.2 Adaptives Immunsystem	4
1.1.2.1 T-Zellen	4
1.1.2.2 B-Zellen	6
1.1.2.3 Antikörper	7
1.2 Therapeutische Antikörper und Autoimmunerkrankungen	9
1.2.1 Mögliche Wirkmechanismen von IVIG	10
1.2.2 Mögliche Rezeptoren	11
1.2.3 Vermuteter Wirkmechanismus Antigen-spezifischer, sialylierter Antikörper	12
1.3 Ziel dieser Arbeit	13
2 Material und Methoden	15
2.1 Mäuse	15
2.2 Reagenzien, Material, Geräte	16
2.2.1 Antigen	17
2.2.2 Anti-TNP Antikörper	17
2.2.2.1 Herstellung der Antikörper	17
2.2.2.2 Glykoanalyse per MALDI TOF	18
2.2.3 Immunkomplexe	18
2.2.4 Adjuvans	19
2.3 Adaptiver Transfer und Stimulation	19
2.3.1 Aufreinigung der OVA-spezifischen CD4+ T-Zellen	20
2.3.2 Antigen-Stimulation der Tiere	21
2.4 Durchflusszytometrie	21
2.4.1 Organentnahme am Versuchsende	21
2.4.2 Extra- und intrazelluläre Zellfärbung - Kurzprotokoll	22
2.4.3 Restimulation zum Nachweis intrazellulär exprimierter Zytokine	22

2.5	Auswertung	23
2.5.1	Durchflusszytometrisches Gating	23
2.5.2	Verwendete Software/Statistik	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Experiment 1: Wirkung von IVIG auf die Immunisierung mit OVA in CFA	26
3.2	Experiment 2: Wirkung von <i>in-vitro</i> generierten Immunkomplexen in Fcgr2b ^{-/-} Mäusen	29
3.3	Experiment 3: Wirkung von <i>in-vitro</i> generierten Immunkomplexen in Wildtyp C57BL/6J Mäusen	33
3.4	Experiment 4: Wirkung von verschiedenen glykosylierten IgG1-Antikörpern auf die Immunisierung mit TNP-OVA in eCFA	35
4	Diskussion	38
4.1	Vermutete Wirkungsweise von IVIG bzw. sialylierten Antikörpern	38
4.2	Diskussion der Experimente	39
4.2.1	Experiment 1	39
4.2.2	Experiment 2 und 3	41
4.2.3	Experiment 4	42
4.3	Diskussion des Modells	43
4.3.1	Rezeptor-knockout Mäuse	44
4.3.2	Antigen-spezifische T-Zellen	44
4.4	Klinische Relevanz der Experimente und Ausblick	45
5	Zusammenfassung	46
6	Literaturverzeichnis	48
	Anhang	57
A	Materialien	57
B	Eidesstattliche Erklärung	63
C	Danksagungen	64

Abkürzungsverzeichnis

AF	Alexa Fluor
APC	<i>antigen-presenting cells</i>
ASN	Asparagin
aTNP IgG	anti-2,4,6-Trinitrophenol Immunglobulin G
BCR	B-Zell Rezeptor
BV	<i>Brilliant Violet</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
eCFA	<i>enriched Complete Freund's Adjuvant</i>
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	fluoreszenzbasierte Durchflusszytometrie
Fc	<i>fragment crystallisable</i>
FCS	Fetales Kälberserum
FoxP3	<i>forkhead box P3</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
G0	agalaktosylierte IgG
G1/G2	galaktosylierte IgG
G1S1/G2S1/G2S2	sialylierte IgG
GlcNac	N-Acetylglucosamin
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
ITP	Immunthrombozytopenie
KCl	Kaliumchlorid
KH₂PO₄	Kaliumdihydrogenphosphat
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>

mes. Lymphknoten	mesenteriale Lymphknoten
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
Na₂HPO₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
OVA	Ovalbumin
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PE	Phycoerythrin
PenStrep	Penicillin/Streptomycin
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PRR	<i>pattern-recognition receptor</i>
R	Rezeptor
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>side scatter</i>
T-Reg	Regulatorische T-Zelle
TCR	T-Zell Rezeptor
Th	T-Helferzelle
TNP	2,4,6-Trinitrophenol

Abbildungsverzeichnis

1.1	Priming von naiven CD4 ⁺ T-Zellen	6
1.2	Schematische Darstellung und Nomenklatur der Struktur eines IgG und der wichtigsten Glykosylierungen	8
1.3	Vermuteter Einfluss von Immunkomplexen aus verschiedenen glykosylierten IgG auf die Entwicklung von T-Helferzellen	12
2.1	Glykoanalyse der verwendeten anti-TNP IgG	18
2.2	Exemplarische durchflusszytometrische Gating-Strategie	23
2.3	Formel zur Berechnung des Proliferationsindexes	24
3.1	Experiment 1: Übersicht	26
3.2	Experiment 1: Verringerte Antigen-spezifische CD4 ⁺ T-Zell-Proliferation in IVIG-behandelten Mäusen	27
3.3	Experiment 1: Verringerte Reifung dendritischer Zellen in IVIG behandelten Tieren	28
3.4	Experiment 2: Übersicht	29
3.5	Experiment 2: Relativer Anteil und absolute Zahl OVA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen von allen CD4 ⁺ T-Zellen	30
3.6	Experiment 2: Erhöhter Anteil an OVA-spezifischen FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen in Immunkomplex-behandelten Tieren	31

3.7	Experiment 2: Verringerter Anteil OVA-spezifischer, IFN γ -produzierender CD4 ⁺ T-Zellen in Immunkomplex-behandelten Tieren	32
3.8	Experiment 3: Experiment-Übersicht und Anteil OVA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen an den gesamten CD4 ⁺ T-Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten	33
3.9	Experiment 3: Verringerter Anteil an OVA-spezifischen, IFN γ -produzierenden CD4 ⁺ T-Zellen in Immunkomplex-behandelten Tieren	34
3.10	Experiment 4: Experiment-Übersicht und Anteil OVA-spezifischer CD4 ⁺ T-Zellen an den gesamten CD4 ⁺ T-Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten	35
3.11	Experiment 4: Tendenziell erhöhter Anteil an OVA-spezifischen FoxP3 ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen durch sialylierte Antikörper	36

Tabellenverzeichnis

1.1	Untergruppen der T-Helferzellen	5
2.1	Verwendete Mausstämme	16
2.2	Übersicht der Experimente	21
A.1	Geräte	57
A.2	Verbrauchsmaterialien	58
A.3	Reagenzien	59
A.4	Benutzte <i>Kits</i>	60
A.5	Puffer, Medien und Lösungen	60
A.6	Antikörper	61
A.7	Primer für die PCR der $Fcgr2b^{-/-}$ Mäuse	62

Kapitel 1

Einleitung

Das Immunsystem dient der Abwehr von Pathogenen. So wichtig Entzündung für die Abwehr ist, so wichtig ist auch die Begrenzung dieser Reaktion, um nicht mehr Schaden als Nutzen anzurichten. Die Toleranz gegenüber dem eigenen Körper aber auch gegenüber fremden, nicht-pathogenen Stoffen und Kommensalen ist sehr wichtig; fehlt sie, kann es zu schweren Autoimmunkrankheiten und Allergien kommen. Genau wie Entzündung ist auch Toleranz ein aktiver Prozess und nicht nur die Abwesenheit von Entzündung (47). Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Hypothese, dass auch Antikörper eine „Toleranz“ induzieren können und zwar in Abhängigkeit von bestimmten Zuckerketten an ihren konstanten Domänen. Im Speziellen sollte ein Modell gefunden werden, um den Einfluss verschiedener Glykoformen Antigen-spezifischer Immunglobulin G (IgG) Antikörper, in Form von Immunkomplexen mit dem Antigen, auf die Reifung von dendritischen Zellen und die Entwicklung entsprechender Antigen-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen zu messen.

Im Folgenden soll zunächst auf wichtige Komponenten des Immunsystems eingegangen werden; dann folgt eine kurze Einführung in die vermutete Wirkungsweise von IVIG (gepooltem humanem Serum IgG, das entzündungshemmende Eigenschaften aufweist), im Speziellen der sialylierten IgG-Subfraktion des IVIG, und in die Entstehung und Wirkung verschieden glykosylierter IgG Antikörper.

1.1 Das Immunsystem

Die Komponenten des Immunsystems können funktionell in zwei große Gruppen eingeteilt werden: das sogenannte angeborene und das adaptive Immunsystem. Letztlich weisen beide

jedoch eine Vielzahl von gegenseitigen Verschränkungen und Abhängigkeiten auf.

Das angeborene Immunsystem ist der entwicklungs geschichtlich ältere Teil. Genetisch verankerte Mustererkennungsrezeptoren, auch *pattern recognition receptors* (PRR) genannt, ermöglichen ihren Zellen und Effektormolekülen sehr schnell und spezifisch auf Bedrohungen zu reagieren, indem sie ihre jeweiligen Pathogen-assoziierten, molekularen Muster erkennen. Gleichzeitig ist es im Vergleich zum adaptiven Immunsystem aber auch in seiner Bandbreite begrenzt und rigider in seiner Antwort (22).

Das adaptive Immunsystem wird erst anschließend aktiviert. Durch Rearrangement multipler Rezeptorelemente, sind seine spezifischen Rezeptoren auf den T- und B-Zellen sehr variabel und vielfältig und dadurch in der Lage eine wesentlich größere Bandbreite an möglichen Zielstrukturen zu erkennen. Allerdings hat diese größere Freiheit auch einen Preis: nämlich den einer schwereren Unterscheidung zwischen fremd und selbst (bzw. gefährlich und ungefährlich). Transplantat-Abstoßungen, Autoimmun-Krankheiten aber auch Allergien werden Störungen des adaptiven Immunsystems angelastet (22).

Während das angeborene Immunsystem also bei der Erkennung wiederholter Infekte jedes Mal auf die gleiche Art und Weise reagiert, kann das adaptive Immunsystems dank einer Art immunologischen Gedächtnisses durch überlebende, spezialisierte Zellen, deutlich schneller und gezielter reagieren als noch beim Erstinfekt.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Neben physischen und chemischen Barrieren, wie z.B. der Haut, sind zelluläre und lösliche (humorale) Komponenten wichtige Bestandteile des angeborenen Immunsystems (36).

1.1.1.1 Humorale Komponenten

Wichtig für die Pathogen-Erkennung sind die bereits erwähnten PRR. Lösliche Proteine mit einer solchen Erkennungsfunktion können sekretiert werden und zirkulieren im Blut. Einige können bereits eine unmittelbare, afferente Funktion übernehmen und z.B. Bakterien direkt lysieren; ansonsten wirken sie mittelbar, indem z.B. das Ziel opsoniert wird oder andere lösliche Komponenten wie das Komplement aktiviert werden (33). Komplement dient ebenfalls der Opsonierung, aber auch der direkten Lyse von Zielzellen. Dabei kann es über viele Wege aktiviert werden: neben löslichen PRR des angeborenen Immunsystems auch durch die Antikörper des adaptiven Immunsystems (36).

1.1.1.2 Zelluläre Bestandteile

Die Zellen des angeborenen Immunsystems verfügen über verschiedene membrangebundene oder intrazelluläre PRR. So können sie zusätzlich zu der Erkennung durch lösliche, angeborene PRR oder Antikörper auch direkt Pathogene erkennen (33).

Natürliche-Killerzellen Natürliche-Killerzellen können einen Virusbefall von körpereigenen Zellen erkennen und betroffene Zellen lysieren. Alle kernhaltigen Zellen des Körpers präsentieren Abschnitte der von ihnen hergestellten Proteine auf ihrer Oberfläche durch Haupt-histokompatibilitätskomplex-I (MHC-I) Rezeptoren. Virusbefallene Zellen regulieren diese Rezeptoren häufig herunter, was die Erkennbarkeit durch $CD8^+$ T-Zellen reduziert (*siehe Abschnitt 1.1.2.1*). Bereits eine relative Herabregulation der MHC-I Moleküle kann durch Natürliche-Killerzellen erkannt werden (36).

Sekretorische Zellen Zu ihnen zählen Mastzellen, Basophile Granulozyten und Eosinophile Granulozyten. Bei Aktivierung z.B. durch Antikörper (je nach Zelltyp unterschiedlich) setzen sie aus ihren Vesikeln verschiedene proinflammatorische Mediatoren und Enzyme wie z.B. Interleukine (IL), Eicosanoide, Proteoglykane, Histamin oder Proteasen frei. Zellen aller drei Gruppen exprimieren ähnliche Rezeptoren und Zytokine, unterscheiden sich aber in ihrer Effektorfunktion. Während Mastzellen vornehmlich im Gewebe vertreten sind und eine Rolle bei der Wundheilung aber auch bei der allergischen Sofortreaktion (Typ I) spielen, zirkulieren Basophile Granulozyten intravaskulär und werden mit der Abwehr von Parasiten und auch mit verzögerten allergischen Reaktionen (Typ IV) in Zusammenhang gebracht. Eosinophile finden sich v.A. im Gastrointestinaltrakt. Ein vermehrtes Vorkommen im Blut wird bei Infektionen mit Parasiten wie Helminthen aber auch bei allergischem Asthma beobachtet (58).

Phagozytische (und Antigen-präsentierende) Zellen Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Monozyten sind die primären „Effektorzellen“ des angeborenen Immunsystems (56). Sie erscheinen schnell am Ort des Infektes und phagozytieren opsonierte oder auch direkt erkannte Ziele. Makrophagen und Monozyten kommt außerdem eine Doppelrolle als Antigen-präsentierende Zellen in der Aktivierung des adaptiven Immunsystems zu.

Antigen-präsentierende (und phagozytische) Zellen Antigen-präsentierende Zellen (APC) sind verantwortlich für die Einbindung des adaptiven Immunsystems in die Immunantwort. Gemeinsam ist ihnen eine Vielzahl von (angeborenen) Rezeptoren für bakterielle Komponenten, für lösliche PRR, aber auch Rezeptoren für Immunglobuline als Teile des adaptiven Immunsystems. So erkennen sie Pathogene/Antigene, phagozytieren sie und spalten sie auf. Dann transportieren sie die Information in lymphatische Organe, um sie den $CD4^+$ T-Zellen des adaptiven Immunsystems zu präsentieren (37). Dafür verwenden sie als professionelle Antigen-präsentierende Zellen MHC-II-Moleküle im Gegensatz zu „gewöhnlichen“ Körperzellen, die nur via MHC-I Einblick in die von ihnen hergestellten Proteine geben. Für die Aktivierung der $CD4^+$ T-Zellen bedarf es neben dem MHC-II noch weiterer kostimulatorischer Signale wie CD80 und CD86. Diese dienen gleichzeitig als Reifungsmarker für dendritische Zellen (7). Zu der Gruppe der APC zählen neben den dendritischen Zellen auch Makrophagen und Monozyten. Allerdings wird den dendritischen Zellen die Rolle der wichtigsten Antigen-präsentierenden Zelle zugeschrieben (28). Weitere Antigenpräsentierende Zellen sind die B-Zellen des adaptiven Immunsystems (*siehe Abschnitt 1.1.2.2*).

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Das Prinzip der adaptiven Immunantwort ist es, im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem anpassungsfähige Rezeptoren zu verwenden, die sich durch Rearrangement und Selektion immer besser an das jeweilige Ziel angepasst werden. Mit größerer Freiheit sind aber auch Risiken verbunden; deshalb ist eine enge Regulation der proinflammatorischen, adaptiven Immunantwort auf allen Ebenen wichtig. Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems werden die B- und T-Zellen gezählt. Selbstreaktive T- und B-Zellen werden schon bei Ihrer Entstehung eliminiert und regulatorische T-Zellen sorgen zusätzlich für die Kontrolle unerwünschter Immunreaktionen.

1.1.2.1 T-Zellen

Unreife T-Lymphozyten durchwandern Blut- und Lymphsystem auf der Suche nach dem für sie passenden Epitop. Jede weist bereits jetzt einen individuellen T-Zell-Rezeptor (TCR) auf. T-Zell-Rezeptoren können ihre jeweiligen Epitope (Peptide) im Gegensatz zu B-Zell-Rezeptoren nicht direkt erkennen, sondern nur wenn sie im Rahmen von MHC-Molekülen präsentiert werden. Man unterscheidet die T-Zellen je nachdem welchen MHC-Typ sie erkennen (37).

CD8⁺ T-Zellen CD8⁺ T-Zellen, auch zytotoxische T-Zellen genannt, erkennen ihr jeweiliges Antigen, wenn es von anderen Zellen via MHC-I präsentiert wird. Einmal aktiviert, sind sie in der Lage die präsentierenden Zellen zu lysieren. Auf diese Weise können intrazelluläre Pathogene wie z.B. Viren effektiv bekämpft werden (64).

CD4⁺ T-Zellen CD4⁺ T-Zellen, T-Helferzellen genannt, erkennen ihr Peptid, wenn es via MHC-II von professionellen APC präsentiert wird. Durch diesen ersten spezifischen Kontakt und mit Hilfe ko-stimulatorischer Signale wie CD80 und CD86 werden die CD4⁺ T-Zellen dann aktiviert (10). Unter Einfluss von Zytokinen wie IL12, IL6, IL4 entwickeln sich aus ihnen spezifische T-Helfer Subtypen, die dann wichtige Aufgaben bei der Aktivierung und Regulation von CD8⁺ T-Zellen und B-Zellen wahrnehmen. Je nachdem welche Transkriptionsfaktoren aktiviert sind oder welche Zytokine sie produzieren, lassen sie sich in verschiedene Gruppen einteilen (37):

TABELLE 1.1: Untergruppen der T-Helferzellen

Bezeichnung	Hauptzytokin, Transkriptionsfaktor	Funktion
Th1-Zellen	Interferon γ (IFN γ), T-bet	Hilfe bei zellulärer Immunantwort, aktivieren Makrophagen bei Bekämpfung intrazellulärer Pathogene wie Mykobakterien, fördern die Entstehung von IgG.
Th2-Zellen	IL4, GATA3	Bekämpfung parasitärer Infektionen, leisten Hilfe bei humoraler Immunantwort, fördern die Entstehung von IgG und IgE.
Th17-Zellen	Il17a, ROR γ T	Bekämpfung von extrazellulären Pathogenen, Verstärkung der Neutrophilen-Antwort.
Regulatorische T-Zellen	TGF β , forkhead-box P3 (FoxP3)	Vermitteln Toleranz, unterdrücken T-Zell-Proliferation, verhindern überschießende Immunreaktionen.

Darüber hinaus gibt es noch die sogenannten folliculären T-Helferzellen. Sie sind in den meisten Fällen essentiell für die Ausbildung einer B-Zell Antwort des Immunsystems. Allerdings besteht Uneinigkeit, ob es sich um eine eigenständige Subpopulation handelt oder ob sie aus einer der vorgenannten hervorgehen (14). Bis auf die regulatorischen T-Zellen werden alle der vorgenannten Subpopulationen mit proinflammatorischen Eigenschaften in Verbindung gebracht. Den regulatorischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen wird eine wichtige Rolle bei der Kontrolle dieser T-Zellen zugeschrieben. Zum einen wirken sie direkt über Zytokine wie IL10

oder TGF- β und deren dämpfende Wirkung auf Zellen des adaptiven und des angeborenen Immunsystems, zum anderen auch indirekt, etwa indem die Reifung dendritischer Zellen und damit das T-Zell-Priming verhindert werden (8, 13).

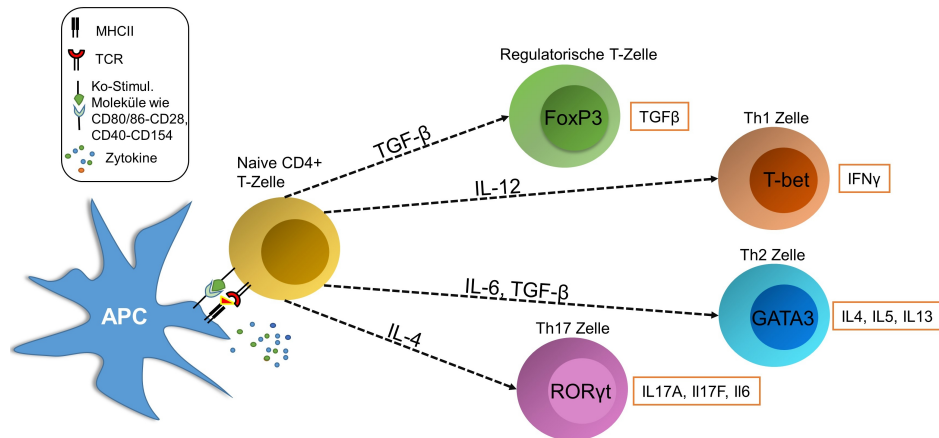


Abbildung 1.1: Priming von naiven CD4⁺ T-Zellen zu aktivierten CD4⁺ T-Zellen (nach 20).

1.1.2.2 B-Zellen

B-Zellen sind in der Lage spezifische Antikörper zu produzieren und tragen ähnlich den T-Zellen einen für sie spezifischen B-Zell Rezeptor (BCR), der letztlich ein membrangebundener Antikörper ist. Im Gegensatz zu T-Zellen können sie ihr Antigen direkt erkennen; sie brauchen also keine Präsentation via MHC. Allerdings ist für die Aktivierung durch die meisten Antigene eine zusätzliche Unterstützung durch CD4⁺ T-Helferzellen notwendig. Dazu präsentiert die B-Zelle das von ihr aufgenommene und prozessierte Antigen via MHC-II an CD4⁺ T-Zellen mit komplementärem T-Zell-Rezeptor und erhält aktivierende Signale (35).

Aktivierte naive B-Lymphozyten machen in Lymphfollikeln der Lymphknoten (Lk) und der Milz einen stark regulierten Reifungsprozess durch, bei dem sie durch Mutation ihrer Ig-Gene und positive Selektion immer affiner für ihr jeweiliges Antigen werden (59). Überlebende Zellen werden am Ende dieses Prozesses dann entweder zu terminal differenzierten, Antikörper-produzierenden Plasmazellen oder zu Gedächtniszellen. Letztere können lange Zeiträume überleben und bei erneutem Antigenkontakt wieder in Teilung übergehen und Antikörper produzieren. Mittlerweile wird auch bestimmten B-Zell Populationen (IL-10 und IL-35 produzierende B-Zellen) eine anti-inflammatorische Wirkung zugeschrieben (53).

1.1.2.3 Antikörper

Antikörper sind eine Art lösliche Epitoperkennungs-Rezeptoren. Durch kontinuierliche Selektion und Anpassung der B-Zellen kann der variable Teil der Antikörper sein jeweiliges Epitop hochaffin binden. So können Pathogene unmittelbar „neutralisiert“ werden, indem biologische Funktionen wie z.B. die Fusionierung von Viren mit Zellen gestört werden, aber auch mittelbar, indem zelluläre und nichtzelluläre Komponenten des Immunsystems die gebundenen Antikörper an ihrem „konstanten“ Fc-Teil erkennen und aktiviert werden (37, *Abbildung 1.2*). Neben dieser Effektorrolle in der Eliminierung fremder Antigene haben sie auch eine wichtige Funktion im afferenten Schenkel des Immunsystems, also in der Regulation der folgenden Immunantworten. Durch Interaktion mit aktivierenden aber auch inaktivierenden Rezeptoren auf Immunzellen haben sie auch Einfluss darauf, wie Antigene dem Immunsystem präsentiert werden. So spielen sie, neben den Zellen, ebenfalls eine Rolle bei der Regulation der Immunantwort (39).

Von den fünf Antikörperklassen (IgA, IgD, IgE, IgG und IgM) ist IgG die im Serum anteilmäßig am häufigsten vertretene Klasse. Sie setzt sich in der Maus ähnlich wie im Menschen aus vier verschiedenen IgG Subklassen (IgG1, IgG2a/IgG2c, IgG2b, IgG3) mit leicht veränderten Strukturen zusammen (34). Der Anteil der jeweiligen Subklassen hat Einfluss auf die Immunantwort, da sie sich durch einen unterschiedlichen Grad an Komplementaktivierung, Antikörper-abhängiger zellvermittelter Zytotoxizität und in ihrer Affinität zu ihren verschiedenen Rezeptoren unterscheiden (38, 61).

Fc γ -Rezeptoren, als typisches Bindeglied zwischen IgG und dem übrigen Immunsystem, finden sich in unterschiedlicher Ausprägung auf fast allen Zellen des Immunsystems inklusive Endothel- und Mesangialzellen. Lediglich auf T-Zellen konnten sie bisher nicht nachgewiesen werden (41). Sie können in aktivierende und inhibitorische Rezeptoren eingeteilt werden und deren jeweiliger Anteil an der Erkennung eines Liganden beeinflusst, ob es zu einer Aktivierung einer Zelle kommt oder nicht (39).

Aufgrund einer niedrigen Affinität zwischen IgG und Fc γ -Rezeptoren können die meisten Fc γ -Rezeptoren allerdings nur durch Immunkomplexe (durch Antikörper komplexiertes Antigen) aktiviert werden. Erst dadurch werden Quervernetzungen und die gleichzeitige Aktivierung mehrerer Rezeptoren möglich. Dieser geringen Affinität kommt in der Verhinderung unspezifischer Aktivierungen durch ubiquitär vorhandene IgG eine wichtige Funktion zu (41). Durch Immunkomplexe aktivierte DC sind zudem im Vergleich mit lediglich durch Antigen aktivierte DC in der Lage, eine vielfach stärkere Immunantwort auszulösen (49).

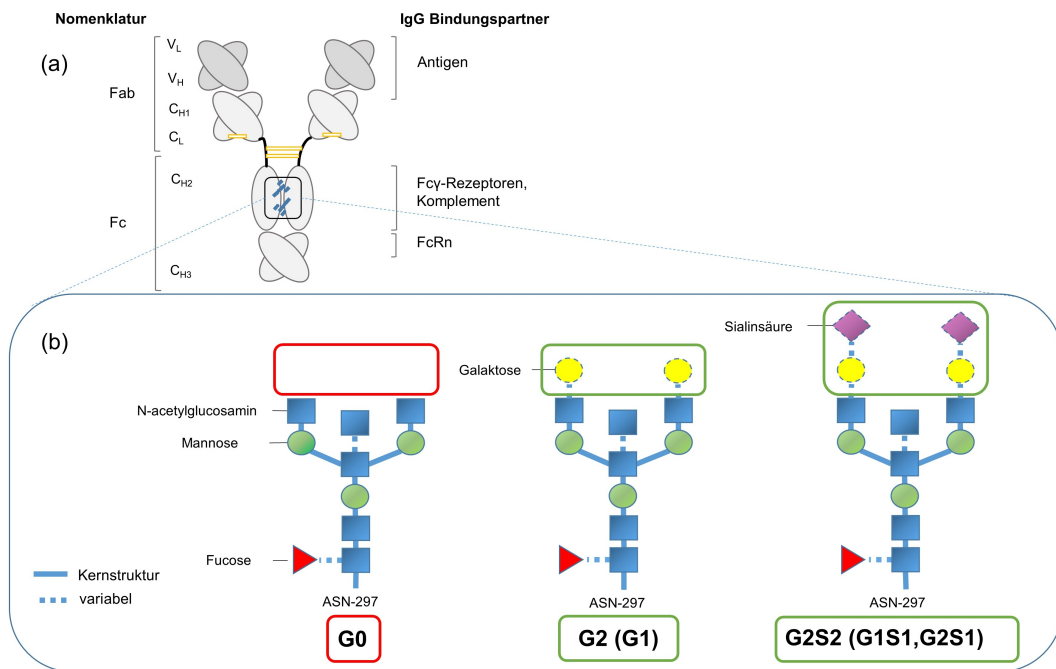


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Struktur eines IgG und der wichtigsten Glykosilierungen am ASN-297 der CH2 Domänen. (a) Funktionell eingeteilt wird IgG in 2 gleiche für die Antigenbindung verantwortliche Arme (fragment antigen binding, Fab) und einen für die Vermittlung zu Komponenten des Immunsystems zuständigen Effektoranteil (fragment crystallizable, Fc). Strukturell setzt sich das Molekül aus zwei leichten Ketten (light, L) und zwei schweren Ketten (heavy, H) zusammen. Die leichten Ketten bestehen aus einer variablen (V_L , dunkelgrau) und einer konstanten (C_L , hellgrau) Domäne, die schweren Ketten neben der variablen (V_H , dunkelgrau) aus drei weiteren konstanten Domänen (C_{H1-3} , hellgrau). Die Ketten sind untereinander über Disulfidbrücken (gelb) verknüpft. Effektorfunktionen benötigen die am ASN-297 N-glykosidisch gebundene Glykankette (dunkelblau). (b) Die Kernstruktur dieser Kette ist essentiell für die Effektorfunktion und Struktur des IgG. Die endständigen variablen Glieder können die Struktur ebenfalls beeinflussen und die Bindung zusätzlicher Rezeptoren ermöglichen (43). Als **G0** werden Antikörper bezeichnet, die an keinem der endständigen N-Acetylglucosamine (GlcNac) eine Galaktose tragen, Immunkomplexen mit ihnen werden pro-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (11). **G1/G2** bezeichnet Antikörper die eine oder zwei Galaktosen tragen. **G1S1/G2S1/G2S2** bezeichnet die Glykoformen, die zusätzlich zur Galaktose noch eine oder zwei Sialinsäuren tragen. Sowohl Immunkomplexe mit galaktosylierten als auch sialylierten Glykoformen werden mit einer anti-inflammatorischen Wirkung in Verbindung gebracht (25, 42). Abbildung modifiziert nach (9).

Glykoformen und deren Vorkommen Neben der Verteilung der Subklassen konnte noch eine andere Antikörpereigenschaft mit einer Regulation der Immunantwort assoziiert werden: die Glykosylierung der Antikörper (*siehe Abbildung 1.2*). Jede Antikörperklasse zeichnet sich durch eine begrenzte Anzahl an möglichen Glykosylierungen aus, die in Art und Lokalisation im Fc-Teil stark variieren können. IgG tragen lediglich eine einzige N-Glykosylierung im Fc-Teil und zwar am Asparagin-297 (ASN-297) der CH2-Domäne. Diese Glykosylierung ist, abgesehen von den endständigen Gliedern, hoch konserviert und essentiell für die Effektorfunktion des Antikörpers (9). Die endständigen Zuckerbausteine hingegen sind sehr variabel: Es existieren 32 verschiedene Glykoformen (5), die vermutlich Einfluss auf die Konformation

des Antikörpers und Rezeptoraffinitäten haben (43).

Bereits in den 1980er Jahren konnte eine floride Rheumatoide Arthritis mit Veränderungen in den vorherrschenden Glykoformen von IgG assoziiert werden. Es ließ sich eine größere Prävalenz von agalaktosylierten Glykoformen (G0) nachweisen. Ein erhöhter Anteil an G0 IgG konnte zudem mit einer verstärkten Komplementaktivierung in Zusammenhang gebracht werden (30). Später wurde gezeigt, dass ein erhöhter Anteil an spezifischen G0 anti-citrullinierte Peptide IgG mit schwereren Krankheitsverläufen assoziiert ist. Diese Veränderungen ließen sich bereits einige Monate vor dem Nachweis der Arthritis feststellen (46). Auch bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa gibt es Hinweise auf ähnliche Muster in den Glykoformen der IgG Antikörper (55).

Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass ein Protein-Antigen zusammen mit einem starken pro-inflammatorischen Reiz einen deutlich größeren Anteil proteinspezifischer, asialylierter und agalactosylierter IgG-Antikörper hervorrufen kann als das Protein-Antigen allein (42). Auf der anderen Seite gibt es Hinweise, dass die bei Allergiepateinten durch orale Hyposensibilisierung induzierten IgG zu einem erhöhten Anteil Sialinsäuren tragen (42).

Die Glykosylierung der IgG scheint also in einem gewissen Maß die Reaktion des Immunsystems auf einen Reiz widerzuspiegeln.

1.2 Therapeutische Antikörper und Autoimmunerkrankungen

Antikörper spielen eine wesentliche Rolle bei der Immunantwort. Ein angeborener oder erworbener Mangel an Antikörpern kann die Fähigkeit des Immunsystems auf Pathogene zu reagieren stark einschränken. Allerdings können solche Mangelzustände gut durch Substitution mit gepoolten, menschlichen Immunglobulinen (IVIG) behandelt werden.

IVIG besteht aus aufgereinigten, polyvalenten, humanen Antikörpern von mehreren tausend Spendern. Je nach Charge beträgt der Anteil an IgG zumeist mehr als 90% (44). In den 1980er Jahren wurde entdeckt, dass IVIG in hoher Dosierung (1-2g/kg KG) auch Patienten mit Immunthrombozytopenie (ITP) hilft (21), einer Autoimmunerkrankheit, bei der das Immunsystem Autoantikörper gegen Blutplättchen bildet und so deren Lebensdauer verkürzt. Folge ist in vielen Fällen eine verstärkte Blutungsneigung, die im Falle von gastrointestinalen oder intrakraniellen Blutungen auch lebensbedrohlich werden können.

Diese Behandlung erschien zunächst paradox, schließlich halfen Antikörper gegen eine durch (Auto-)Antikörper ausgelöste Krankheit. Jedoch kamen mit dieser Entdeckung mehr und

mehr die immunregulatorischen Eigenschaften von Antikörpern in den Fokus der Forschung. Heute wird eine Vielzahl von Autoimmunkrankheiten mit IVIG behandelt:

Die bereits erwähnte Immunthrombozytopenie, das Kawasaki-Syndrom oder das Guillain-Barré-Syndrom sind in der Behandlung zugelassen (17, 40). Viele Krankheiten wie z.B. die Myasthenia gravis oder die Dermatomyositis werden zudem im sog. Off-Label-Use behandelt, also außerhalb der von den nationalen und europäischen Zulassungsbehörden genehmigten Anwendungsgebiete (26). Auch die Transplantationsmedizin zählt dazu: MHC-inkompatible und sensitivierte Nierentransplantations-Patienten können von IVIG-Behandlung profitieren (23).

1.2.1 Mögliche Wirkmechanismen von IVIG

Wie diese immunregulatorische Wirkung entsteht, ist jedoch nicht abschließend geklärt (51). Antikörper lassen sich in zwei funktionale Einheiten teilen, das für die Antigenerkennung verantwortliche hochvariable Fab-Fragment und das für die Verbindung zu den verschiedenen zellulären und löslichen Komponenten des Immunsystems zuständige Fc-Fragment (*siehe Abbildung 1.2*). Beiden wurden Effekte bei der Wirkung von IVIG zugeschrieben.

Zunächst das Fab-Fragment: In IVIG-Präparationen wurden Autoantikörper gefunden, die beispielsweise Immunzellen depletieren, pro-inflammatorische Rezeptoren blockieren und Zytokine oder andere autoaggressive Antikörper neutralisieren könnten. Ein weiterer möglicher Effekt ist die Bindung und Inaktivierung der pro-inflammatorischen Komplementfaktoren C3a und C5a durch Fab-Fragmente (40).

Es gibt jedoch auch überzeugende Hinweise für eine Beteiligung der Fc-Fragmente: Dies wurde zuerst durch erfolgreiche Behandlung der bereits erwähnten Immunthrombozytopenie mit reinen Fc-Fragmenten gezeigt (15). Bei diesem Effekt scheint auch die Antikörperglykosylierung eine wichtige Rolle zu spielen (*siehe Abbildung 1.2*). 2006 konnte in einem Arthritis Maus-Modell gezeigt werden, dass die Entfernung der gesamten Zuckerkette am Fc-Fragment die protektive Wirkung des IVIG zunichte macht. Überraschenderweise führte auch bereits die Entfernung der terminalen Sialinsäuren, die nur an ca. 15% der Zuckerketten vorkommen, zu einem der Entfernung der Gesamtkette vergleichbaren Wirkungsverlust; eine angereicherte Präparation der sialylierten Glykoformen hingegen, konnte in 10fach geringerer Dosis als IVIG, einen vergleichbaren protektiven Effekt erzielen. Diese Ergebnisse ließen sich zudem mit reinen Fc-Fragmenten replizieren (24) und wurden in einer neueren Studie auch in einem

ITP-Modell bestätigt (50). Interessanterweise gibt es Hinweise, dass auch die IgG, die erfolgreich zur Rhesusprophylaxe bei schwangeren Frauen eingesetzt werden, einen erhöhten Anteil an sialylierten Glykoformen aufweisen (62). Es gibt also starke experimentelle Hinweise, dass die ASN-297-Glykosylierung der Fc-Domäne eine wichtige Rolle bei der regulatorischen Funktion IVIGs hat.

1.2.2 Mögliche Rezeptoren

Weiter stellt sich die Frage, welche Rezeptoren auf zellulärer Ebene unmittelbar beteiligt sein können. Unter der Maßgabe, dass IVIG Zellen des Immunsystems zumindest mittelbar dämpft, wäre eine Aktivierung inhibierender oder eine Inhibierung aktivierender Rezeptoren denkbar. Als mögliche Rezeptoren für IgG kommen dabei zunächst die Fc γ -Rezeptoren in Betracht. Ein Mechanismus könnte dabei die *Blockade aktivierender Fc γ -Rezeptoren* auf Immunzellen sein. Die Affinität von monomeren IgG zu den meisten Fc γ -Rezeptoren ist allerdings gering, und eine dauerhafte Bindung von Monomeren unwahrscheinlich. Die einzige Ausnahme ist der Fc γ -RI, der monomere IgG der Subklasse 1 binden kann (41). Es wird deshalb vermutet, dass eine Interaktion zwischen IgG und deren Rezeptoren hauptsächlich in Form von Immunkomplexen stattfindet (4); eine Verdrängung von Immunkomplexen durch monomere Antikörper aus IVIG ist weniger wahrscheinlich, zumal eine Sialylierung die Affinität zusätzlich herabsetzt (43).

Ein weiterer Mechanismus könnte die Beteiligung des einzigen bekannten *inhibitorischen Fc γ -Rezeptors IIB* sein. Eine zumindest sekundäre Beteiligung bei der Verhinderung einer passiven ITP konnte bereits 2001 gezeigt werden (48). Allerdings lässt sich dieser Effekt nicht an allen Modellen beobachten (51). Zudem gibt es viele Hinweise, dass auch Fc γ RIIB unabhängige Mechanismen existieren (27). Diese Ergebnisse sprechen eher für eine möglicherweise modellabhängige und mittelbare Beteiligung am IVIG Effekt, beispielsweise durch vermehrte Expression dieses Rezeptors.

Einiges spricht deshalb für die Beteiligung weiterer Rezeptoren bei der direkten Erkennung der Glykosylierung. In einer aktuellen Übersichtsarbeit werden sie als „Typ-II“ Fc γ Rezeptoren bezeichnet in Abgrenzung zu den klassischen „Typ I“ Rezeptoren (43). Dazu zählt u.a. der C-Typ Lektin-Rezeptor CD209 (DC-SIGN)/SIGNR1, der auf Marginal-Zonen Makrophagen eine inhibitorische Wirkung vermittelt (3).

1.2.3 Vermuteter Wirkmechanismus Antigen-spezifischer, sialylierter Antikörper

IVIg besteht wie erwähnt aus konzentriertem Plasma Immunglobulin G tausender verschiedener Spender. Seine anti-inflammatorische Wirkung kann also nur unspezifisch und nicht gegen ein bestimmtes Epitop gerichtet sein. Da Immunkomplexe aufgrund der höheren Affinität eine sehr wichtige Wirkungsform von Antikörpern für die Interaktion mit $Fc\gamma$ -Rezeptoren darstellen, ist es denkbar, dass die Wirkung von IVIg auch über Einbeziehung in solche Komplexe entsteht. Aus diesem Gedanken heraus wurden Antigen-spezifische sialylierte Antikörper eingesetzt, um so möglicherweise eine effektivere Wirkung zu erzielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Sialylierung *Antigen-spezifischer* monoklonaler Antikörper in 100-fach geringerer Dosis als IVIg (10mg/kg KG) die Immunantwort gegenüber einem Antigen reduziert. Durch Behandlung mit diesen sialylierten Antikörpern konnte so in einem Asthma-Modell, eine geringere Infiltration mit Eosinophilen, weniger Th2-Zellen, weniger Antigen-spezifische Plasmazellen und eine verringerte Antigen-spezifische Antikörperproduktion nachgewiesen werden. Dieser Effekt war sowohl vom Sialylierungsgrad als auch von der Spezifität der Antikörper abhängig, nicht jedoch vom inhibitorischen $Fc\gamma$ RIIB (42). Dies spricht wiederum für die Beteiligung weiterer Rezeptoren für sialylierte Antikörper.

Für die Einleitung der adaptiven Immunantwort spielt die Präsentation der Antigene durch

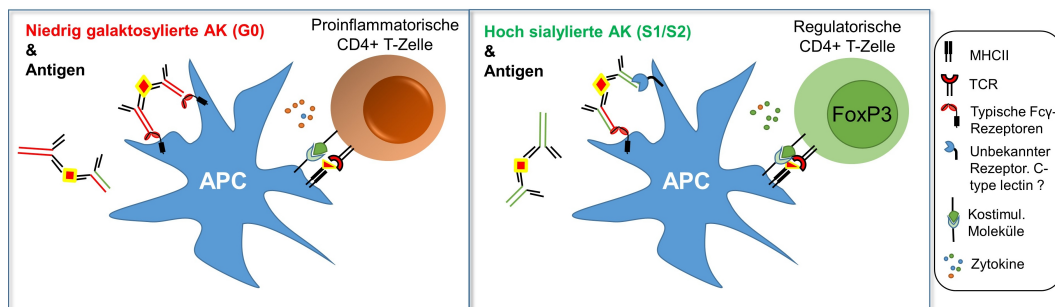


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des vermuteten Einflusses von Immunkomplexen aus verschieden glykosylierten IgG auf die Entwicklung von T-Helferzellen. Immunkomplexe werden von APC mit Hilfe typischer und neuer, noch zu definierender $Fc\gamma$ -Rezeptoren erkannt, das Priming der T-Zellen erfolgt dann in Abhängigkeit von den durch Sialylierung beeinflussten Rezeptoren.

APC an $CD4^+$ T-Zellen, insbesondere durch dendritische Zellen, eine große Rolle (*siehe Abschnitt 1.1.1.2*). In einem in-vitro Modell konnte mit IVIg die Reifung dendritischer Zellen vermindert werden. Durch in-vitro hergestellte Immunkomplexe mit sialylierten IgG1 konnte gegenüber dem gleichen geringer sialylierten Antikörper ebenfalls eine verminderte Reifung erzielt werden (42).

Sollte dieser Effekt auch in-vivo auftreten, wäre im nächsten Schritt eine Beeinflussung der

Reifung naiver $CD4^+$ T-Zellen denkbar; für IVIG wurde bereits eine Induktion regulatorische FoxP3⁺T-Zellen als ein möglicher Effekt beschrieben (31).

Zusammengefasst lautet die Hypothese dieser Arbeit wie folgt: Antigen und spezifische Antikörper bilden Immunkomplexe, die von APC mit Hilfe typischer $Fc\gamma$ -Rezeptoren und neuer, noch zu definierender Rezeptoren erkannt, aufgenommen, prozessiert und dann via MHC-II an $CD4^+$ T-Zellen präsentiert werden. Die Glykosylierung soll so, über die APC, Einfluss auf die Antigen-spezifische Aktivierung und das anschließende Priming der T-Helferzellen nehmen; insbesondere die vermehrte Bildung von Antigen-spezifischen FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen könnte ein möglicher immunsuppressiver Mechanismus sein. Diese beeinflussen im nächsten Schritt die weitere Immunantwort gegenüber dem Antigen, z.B. das Priming anderer $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen (*siehe Abschnitt 1.1.2.1*) oder die Bildung T-Zell abhängiger Antikörper (*siehe Abschnitt 1.1.2.2*).

1.3 Ziel dieser Arbeit

Toleranz und Regulation sind ebenso wichtige Funktionen des Immunsystems wie die Abwehr von Pathogenen. Gerade das adaptive Immunsystem, mit seiner Fähigkeit durch vielfältige Rezeptoren Antigene zu erkennen, stellt auch eine Gefahr für den eigenen Körper dar. Einer fehlgerichteten Abwehr können z.B. Allergien und Autoimmunkrankheiten folgen. Um dies zu verhindern, findet die Regulation des Immunsystems auf vielen Ebenen parallel statt. Neben regulatorischen T-Zellen (13) und immun-inhibitorischen B-Zellen (53) werden mittlerweile auch Antikörpern anti-inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben (52). Mit IVIG, als prominentem Beispiel, ist es möglich, einige Autoimmunkrankheiten im Menschen erfolgreich mit Antikörpern zu behandeln; eine wichtige Rolle scheint dabei der Glykosylierung der Antikörper zuzukommen: im Mausmodell konnte eine Sialylierungsabhängigkeit des anti-inflammatorischen Effektes gezeigt werden (24). Analog dazu ließen sich immunsuppressive Effekte, in wesentlich geringeren Dosierungen, auch mit sialylierten, Antigen-spezifischen Antikörpern in Form von Immunkomplexen erzielen. Ein möglicher Wirkmechanismus ist dabei die Induktion regulatorischer T-Helferzellen über dendritische Zellen (42). Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, an dem die Wirkung verschieden glykosylierter Antikörper auf die Antigen-spezifische T-Zell-Entwicklung, insbesondere die der regulatorischen FoxP3⁺ T-Helferzellen, belegt werden kann.

Durch Transfer TCR-transgener $CD4^+$ T-Zellen besteht die Möglichkeit ihre Entwicklung in ausreichend großer Zahl nachzuvollziehen. TNP-gekoppeltes Ovalbumin (TNP-OVA) ermöglicht zum einen die Bildung von Immunkomplexen mit gegen TNP gerichteten Antikörpern und zum anderen die Aktivierung der OVA³²³⁻³³⁹-spezifischen OTII T-Zellen durch APC. Die Verwendung von $Fcgr2b^{-/-}$ Mäusen als Wirtstier soll zudem Rückschlüsse auf die beteiligten Rezeptoren zulassen.

Mit Hilfe dieses noch unzureichend erforschten Effektes, könnte es möglich sein, die Immunantwort gegenüber einem bestimmten Antigen gezielt und auch prophylaktisch zu beeinflussen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Mäuse

Für die Versuche wurden Mäuse der in Tabelle 2.1 genannten Stämme verwendet. Die Tiere waren 6-12 Wochen alt. In Experiment 1 wurden Männchen und Weibchen, in Experiment 2 und 4 Weibchen und in Experiment 3 Männchen benutzt. Die Tiere wurden vor Experimentbeginn randomisiert ihren Gruppen zugeteilt. Um bei den Mausversuchen eine ausreichende Anzahl an Antigen-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen per fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie (FACS) identifizieren zu können, wurden $CD4^+$ T-Zellen mit transgenem T-Zell-Rezeptor adaptiv in die Wirtstiere transferiert. Die dabei verwendeten OTII^{+/+} Mäuse tragen ein T-Zell-Rezeptor Transgen ($V\alpha 2/V\beta 5$) spezifisch für das Hühner Ovalbuminpeptid 323-339, das über MHC-II (H2-Ab1) präsentiert wird. Um die transferierten $CD4^+$ T-Zellen besser von denen der Wirtsmäus unterscheiden zu können, wurden die OTII^{+/+} Mäuse zusätzlich mit Thy1.1^{+/+} Mäusen verpaart. Thy1.1^{+/+} Mäuse exprimieren auf ihren Lymphozyten CD90.1 (Thy1.1) anstatt CD90.2 (Thy1.2) wie normale C57BL/6J Mäuse und sind dadurch durchflusszytometrisch leicht zu erkennen. Die resultierenden Mäuse werden im Folgenden als OTIIxThy1.1 bezeichnet, ihre $CD4^+$ T-Zellen, die in die Wirtsmäuse transferiert wurden, werden als (OVA-)spezifische $CD4^+$ T-Zellen bezeichnet in Abgrenzung zu denen der Wirtsmäuse, die als endogene $CD4^+$ T-Zellen benannt werden.

Die Expression des spezifischen T-Zell Rezeptors der OTII^{+/+} Mäuse ($V\beta 5$) und der Oberflächenmarker der Thy1.1^{+/+} Mäuse (CD90.1) wurden per FACS mit den in Tabelle A.6 aufgeführten Antikörpern kontrolliert. Der Genotyp der als Wirtstier verwendeten $Fc\gamma r2b^{-/-}$ Tiere wurde per PCR von DNA aus Schwanzspitzen kontrolliert, die verwendeten Primer

finden sich im Anhang in Tabelle A.7.

Alle Mäuse wurden in der Gemeinsamen Tierhaltung der Universität Lübeck gehalten; dort besteht freier Futter- und Flüssigkeitszugang sowie ein 12-Stunden Hell/Dunkel Rhythmus. Alle Tierversuche, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden, wurden vom Ministerium für Landwirtschaft, Umwelt und Ländliche Räume des Landes Schleswig-Holstein am 14.08.2013 unter der Versuchsnummer V241-72241.122-39 (103-7/13) genehmigt.

TABELLE 2.1: Verwendete Mausstämme

Abkürzungen; genaue Bezeichnung	Hersteller	Besonderheit
C57Bl/6; C57Bl/6J	Jackson (Bar Harbor, Maine, USA)	Wildtyp
Fcgr2b ^{-/-*} ; B6;129S-Fcgr2btm1Ttk/J	Taconic (Köln)	Knockout Maus ohne inhibitorischen Fc γ -Rezeptor IIB
OTII ^{+/*} ; B6.Cg-Tg(TcraTcrb)425Cbn/J	Jackson (Bar Harbor, Maine, USA)	CD4 ⁺ T-Zellen mit Hühner Ovalbumin ^{323–339} spezifischem (α/β) TCR
Thy1.1 ^{+/*} ; B6.PL-Thy1a/CyJ	Jackson (Bar Harbor, Maine, USA)	lymphozytenspezifisches Thy1.1 Allel
OTIIxThy1.1	Labor M. Ehlers (Lübeck)	Paarung aus Thy1.1 ^{+/*} und OTII ^{+/*}

*diese Mausstämme wurden in der Vergangenheit mindestens 8 x auf den C57BL/6J Hintergrund zurückgekreuzt

2.2 Reagenzien, Material, Geräte

Im Anhang finden sich alle in dieser Arbeit verwendeten Geräte (Tabelle A.1), Verbrauchsmaterialien (Tabelle A.2), Reagenzien (Tabelle A.3), Kits (Tabelle A.4) und Puffer (Tabelle A.5) inklusive Herstellerangaben. Auf einige Reagenzien wird im folgenden gesondert eingegangen.

2.2.1 Antigen

Für die effiziente Komplexierung des OVA durch Antikörper wurde ein mit mehreren 2,4,6-Trinitrophenol (TNP) gekoppeltes OVA und monoklonale anti-TNP IgG1-Antikörper (aTNP IgG1-Antikörper) verwendet. Auf diese Weise erkennen die Antikörper und die (OVA-) spezifischen CD4⁺ T-Zellen zwar unterschiedliche Epitope, jedoch dasselbe Molekül. Um mögliche Interferenzen durch das TNP bei der Präsentation der OVA-Peptide durch APC zu minimieren, wurde für die Experimente ein OVA mit der geringen durchschnittlichen Kopplungsrate von 5 TNP-Molekülen pro OVA gewählt. Vorexperimente hatten ergeben, dass es im Tierversuch bei einer höheren TNP-Kopplungsrate zu einer verringerten OVA-spezifischen Antikörperproduktion kommt; möglicherweise weil die OVA-Peptide nicht mehr im gleichen Ausmaß auf den MHC-Molekülen präsentiert werden können.

2.2.2 Anti-TNP Antikörper

In allen Experimenten, in denen monoklonale Antikörper verwendet wurden, kamen verschiedenen glykosylierte, murine anti-TNP IgG1-Antikörper zur Anwendung.

2.2.2.1 Herstellung der Antikörper

Monoklonale, murine aTNP IgG1-Antikörper wurden durch Transfektion von Schwere- und Leichte-Ketten Expressionsplasmiden in HEK293T Zellen produziert (*wie hier beschrieben*: 18). Diese Antikörper sind unbehandelt niedrig galaktosyliert und fast nicht sialyliert. Um zusätzlich zu diesen nativen IgG1-Antikörpern noch galaktosylierte und sialylierte IgG1-Antikörper zu produzieren, wurde in einem entsprechenden Transfektionsansatz zusätzlich zu den Schwere- und Leichte-Ketten Expressionsplasmiden ein Expressionsplasmid mit den Genen für die humane β -1,4-Galaktosyltransferase und die humane α -2,6-Sialyltransferase verwendet.

Die Herstellung, Aufreinigung und Überprüfung aller in dieser Arbeit verwendeten Antikörper wurde im Labor von der Technischen Assistentin Josephine Bitterling oder der wissenschaftlichen Doktorandin Alexandra Epp durchgeführt.

2.2.2.2 Glykoanalyse per MALDI TOF

Die IgG1-Antikörper wurden mit rekombinant hergestellter Endoglycosidase S von Streptokokkus pyogenes verdaut und die Glykane vom Protein getrennt. Die resultierenden Glykane wurden angereichert, permethyliert und mittels matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) analysiert (18, 42). Alle Glykoanalysen in dieser Arbeit wurden von der wissenschaftlichen Doktorandin des Labors, Dominique Petzold, am Institut für Laboratoriumsmedizin, Klinische Chemie und Pathobiochemie an der Charité in Berlin im Kooperationslabor von Dr. Véronique Blanchard durchgeführt.

Als sialylierter anti-TNP IgG1 wurde in Experiment 2-4 der Antikörper 12145-107 verwendet. Als nativer anti-TNP-IgG1 kam in Experiment 2 und 3 12145-098 zum Einsatz; in Experiment 4 wurde er zu gleichen Mengenanteilen mit 12145-130 gemischt.

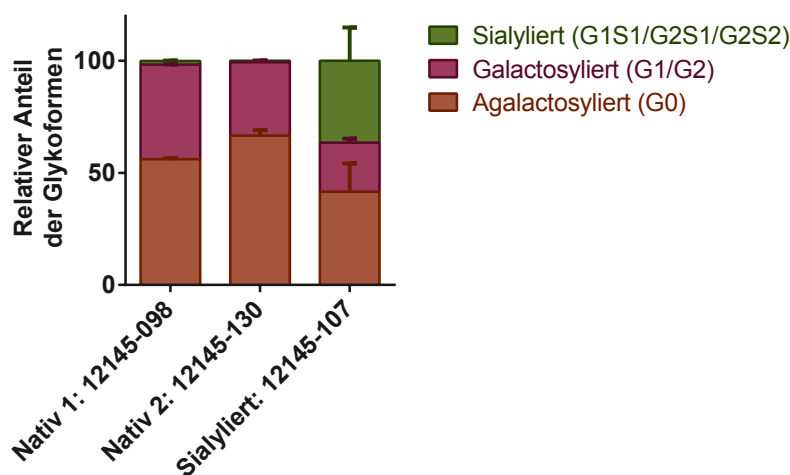


Abbildung 2.1: Dargestellt wird der relative Anteil der verschiedenen Glykoformen, der in den Maus-Experimenten verwendeten anti-TNP IgG1-Antikörper. (Siehe Abbildung 1.2 für die Nomenklatur.) Die Analyse erfolgte per MALDI-TOF. Die Balken zeigen das arithmetische Mittel plus Standardabweichung. Für jeden Wert wurden 2 Proben analysiert.

2.2.3 Immunkomplexe

Um Immunkomplexe herzustellen, wurden die verschiedenen glykosylierten, murinen anti-TNP IgG1-Antikörper für 5 Minuten bei 20 000 g zentrifugiert, um mögliche Aggregate zu entfernen. Danach wurde die Antikörperkonzentration bestimmt und die erforderliche Menge mit PBS und TNP-OVA gemischt. In Experiment 2 wurden pro Versuchstier 43,5 μg und in Experiment 3 210 μg Antikörper mit 30 μg Antigen in 150 μl PBS gemischt und für eine Stunde bei 37°C leicht schüttelnd inkubiert. Das PBS und das Antigen für die Versuchsgruppen,

die keine Immunkomplexe erhielten, wurde analog behandelt. Die mit den niedrig sialylierten IgG1 hergestellten Immunkomplexe werden im folgenden als native anti-TNP IK, die mit den höher sialylierten hergestellten als (höher) sialylierte anti-TNP Immunkomplexe bezeichnet.

2.2.4 Adjuvans

Um eine pro-inflammatorische Immunantwort gegen OVA auszulösen, wurden in Experiment 1 und 4 komplettes Freund-Adjuvans (CFA, 1mg *M.tuberculosis*/ml) bzw. angereichertes Freund-Adjuvans (eCFA, 5mg *M.tuberculosis*/ml) verwendet und mit dem Antigen emulgiert. Zur Herstellung der CFA-Emulsionen wurden je 500 μ l CFA oder eCFA und 500 μ l TNP-OVA (*Konzentration siehe Abschnitt 2.3.2*) in PBS jeweils luftfrei in 1ml Spritzen aufgezogen, eine der Spritzen mit einer 23G Kanüle und die andere mit einer 19G Kanüle versehen und die beiden Kanülen ineinandergesteckt. Dann wurde zunächst die wässrige Phase (Antigen in PBS) in die ölige gespritzt und die Mischung zwischen den Spritzen solange hin- und herbewegt bis eine feste Suspension entstand. Als Test der Festigkeit diente, ob ein Tropfen der Suspension auf einer Wasserfläche auseinandergezogen wird oder kompakt zusammenbleibt. Um das in Experiment 4 statt CFA verwendete eCFA herzustellen, wurde inkomplettem CFA 5mg Hitze-inaktiviertes *Mycobacterium tuberculosis* pro ml hinzugefügt.

2.3 Adaptiver Transfer und Stimulation

Um bei den Mausversuchen OVA-spezifische CD4⁺ T-Zellen in ausreichender Zahl nachweisen zu können, mussten zunächst native OVA-spezifische CD4⁺ T-Zellen in die Wirtsmäuse transferiert werden. Dazu wurden in Experiment 1 aufgereinigte CD4⁺ T-Zellen aus der Milz und in den Experimenten 2-4 die gesamten Milzzellen aus OTIIxThy1.1 Mäusen mit einem Proliferationsmarker gefärbt und in *Fcgr2b*^{-/-} oder Wildtyp C57BL/6J Mäuse transferiert. Die genauen Zeitpunkte der Injektionen von Zellen, IVIG, Immunkomplexen, Antikörpern und TNP-OVA/CFA für die jeweiligen Experimente sind in Tabelle 2.2 und in den jeweiligen Übersichten der Experimente dargestellt.

2.3.1 Aufreinigung der OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen

Zur Gewinnung der Milzzellen wurden die Tiere mit CO₂ betäubt und anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Organe und Zellsuspensionen wurden, wenn nicht anders erwähnt, während der gesamten Zeit auf 4°C gehalten. Die Milz wurde zwischen den rauen Matträndern zweier Mikroskop-Objektträger über einer Petrischale unter Zugabe von ca. 30 ml PBS zerrieben. Danach wurde die Zellsuspension durch ein 70- μ m Zellsieb in ein 50ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen (300g, 10 Minuten, 4°C) und nach jedem Waschschrift durch ein 70- μ m Zellsieb gegeben. In Experiment 1 wurden zusätzlich die CD4⁺ T-Zellen per *magnetic-activated cell sorting* (MACS) angereichert (*siehe Abschnitt 2.3.1: Aufreinigung von CD4⁺ T-Zellen*). Die CD4⁺ T-Zellen (Experiment 1) oder die gesamten Milzzellen (Experiment 2-4) wurden anschließend mit dem CellTrace Violet (CTV) Proliferationsmarker gefärbt. Dazu wurden die aufgereinigten CD4⁺ T-Zellen von bis zu 6 Mäusen oder die gesamten Zellen aus bis zu 3 Milzen in 5 ml 10 μ M CTV in PBS bei 37°C für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurde die Färbereaktion mit 40 ml Medium gestoppt, und die Zellen erneut zweimal mit PBS gewaschen, bevor sie in einer Neubauer Kammer quantifiziert und auf die entsprechende Konzentration pro 100 μ l eingestellt wurden (*siehe Tabelle 2.2*).

Anreicherung von CD4⁺ T-Zellen In Experiment 1 (*siehe Abschnitt 3.1*) wurden die Milzzellen zusätzlich vor der Färbung mit CTV mit dem CD4⁺ T-Cell Isolation Kit II von Miltenyi per negativer Selektion aufgereinigt. Dies erfolgte mit leichten Modifikationen gemäß Hersteller-Protokoll: 2,5*10⁷ Zellen werden im folgenden Abschnitt als eine Einheit (E) bezeichnet. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen in 40 μ l MACS Puffer pro E resuspendiert, danach folgten 10 μ l Antikörper Mix pro E. Es erfolgte eine 15 minütige Inkubation auf dem Schüttler. Danach wurden weitere 30 μ l MACS Puffer und 20 μ l Antibiotin-Beads pro E hinzugegeben und erneut 20 Minuten auf dem Schüttler inkubiert. Pro 4 E wurden dann 500 μ l MACS Puffer hinzugefügt und die Zell-Suspension pro 4 E auf jeweils eine mit 3x2 ml MACS-Puffer vorgewässerte MACS-LS Säule gegeben. Der gesamte Durchlauf einschließlich der 3 folgenden Spülungen mit jeweils 2ml MACS-Puffer wurde aufgefangen. Die resultierende Zellsuspension wurde erneut gewaschen und anschließend wurden die Zellen mit dem Proliferationsmarker gefärbt (*siehe Abschnitt 2.3.1*).

2.3.2 Antigen-Stimulation der Tiere

Zur intravenösen Injektion wurden die Wirtsmäuse (Wildtyp C57Bl/6J und $Fc\gamma r2b^{-/-}$) im Mausrestrainer fixiert und ihnen anschließend mit einer 30 Gauge Kanüle $100\mu\text{l}$ der zuvor beschriebenen Zellsuspension mit definierter Zellzahl in eine der beiden Schwanzvenen injiziert. Die intraperitoneale Injektion der Immunkomplexe, der Antigen-CFA Emulsion und der Antikörper erfolgte in $200\mu\text{l}$ pro Tier mittels einer 26 Gauge Nadel. Die Injektionen wurden zu den in Tabelle 2.2 angegebenen Zeitpunkten durchgeführt.

TABELLE 2.2: Übersicht der Experimente

Experiment	Transferierte Zellen/ Tier (Tag -1)	Stimuli und Zeitpunkt (Antigenkontakt immer an Tag 0)	Experimentdauer nach Antigenkontakt
1	$2 \cdot 10^5$ CD4 ⁺ T-Zellen	IVIG 2mg/g KG i.p. Tag -2 100 μg OVA in CFA i.p.	5 Tage
2	$3 \cdot 10^7$ Milzzellen	43,5 μg aTNP IgG1 + 30 μg TNP(5)-OVA als Immunkomplexe i.p.	3 Tage
3	$3 \cdot 10^7$ Milzzellen	210 μg aTNP IgG1 + 30 μg TNP(5)-OVA als Immunkomplexe i.p.	4 Tage
4	$3 \cdot 10^7$ Milzzellen	90 μg antiTNP-IgG1 i.p. Tag -1 30 μg TNP-OVA in eCFA) i.p.	4 Tage

2.4 Durchflusszytometrie

2.4.1 Organentnahme am Versuchsende

Für die Analyse der CD4⁺ T-Zellen wurden die Tiere wie oben geschrieben getötet und die Organe entnommen (*siehe Abschnitt 2.3.1*); zusätzlich zur Milz wurden in Experiment 2-4 noch die mesenterialen Lymphknoten (mes. Lymphknoten) präpariert. Aus den entnommenen Organen wurde wie bereits oben beschrieben eine Zellsuspension hergestellt und nach dem ersten Waschschrift zur (Zytokin-)Restimulation (*siehe Abschnitt 2.4.3*) oder sofortigen Färbung aufgeteilt.

2.4.2 Extra- und intrazelluläre Zellfärbung - Kurzprotokoll

Extra- und intrazelluläre Färbung erfolgte in einem Schritt, da alle hier verwendeten Färbekörper gegen Oberflächenmarker diese auch in fixiertem Zustand noch vergleichbar gut erkannten. Auf eine Lyse der Erythrozyten wurde verzichtet. Zunächst wurden ca. je $2 \cdot 10^7$ Zellen in $200 \mu\text{l}$ in ein Well einer 96-Well V-Boden Mikrotiterplatte pipettiert. Nach Zentrifugation bei $250g$ für 5 Minuten wurde der Überstand verworfen und die Platte auf ausgelegtem saugfähigem Papier trocken geklopft. Die Zellen wurden in $50 \mu\text{l}$ Fixierungs/Permeabilisierung Lösung (Transcription Factor Staining Buffer Set) mit Hilfe einer Multikanalpipette resuspendiert; eventuell verbliebene, nicht resuspendierbare Aggregate wurden in diesem Schritt ebenfalls entfernt. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten auf dem Schüttler bei Raumtemperatur (RT) wurden pro Well $125 \mu\text{l}$ 1x Permeabilisationspuffer (Transcription Factor Staining Buffer Set) zugegeben und erneut zentrifugiert (s.o.). Die Pellets wurden in je $25 \mu\text{l}$ Färbelösung (1x Permeabilisationspuffer plus der entsprechenden Konzentration an extra- und intrazellulären Antikörpern (*siehe Tabelle A.6*)) resuspendiert und für 25 Minuten bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS wurden die Zellen am Durchflusszytometer analysiert.

2.4.3 Restimulation zum Nachweis intrazellulär exprimierter Zytokine

Parallel zur Organentnahme wurde das 1,1x Restimulations-Medium vorbereitet: Pro Well einer 24 Well-Platte wurden $900 \mu\text{l}$ T-Zell-Medium (*siehe Tabelle A.5*) mit den jeweiligen Reagenzien vorgelegt: PMA; $6,6 \text{ ng}/900 \mu\text{l}$, Ionomycin; $1 \mu\text{g}/900 \mu\text{l}$, OVA-Peptid; $5 \mu\text{g}/900 \mu\text{l}$ und Monensin $1,38 \mu\text{g}/900 \mu\text{l}$. Auf diese Weise wurde nach Zugabe von $100 \mu\text{l}$ Zellsuspension pro Well die entsprechenden Endkonzentrationen erreicht: PMA 10 nM ($6,6 \text{ ng}/\text{ml}$), Ionomycin $1,5 \mu\text{M}$ ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$), OVA-Peptid $2,8 \text{ nM}$ ($5 \mu\text{g}/\text{ml}$), Monensin $2 \mu\text{M}$ ($1,38 \mu\text{g}/\text{ml}$). PMA/Ionomycin wurden für die polyklonale Stimulation und das OVA-Peptid für eine Antigen-spezifische Stimulation verwendet. Monensin diente als Sekretionsblocker. In Experiment 2 und 4 wurden die CD4^+ T-Zellen Antigen-spezifisch mit OVA-Peptid restimuliert, in Experiment 3 polyklonal mit PMA/Ionomycin. Die Zellen wurden gezählt, gewaschen, resuspendiert und mit entsprechendem Volumen an T-Zell-Medium auf $1 \cdot 10^8$ Zellen/ml eingestellt. Dann wurden je $100 \mu\text{l}$ in die vorbereiteten Wells gegeben und die Platten 5 Stunden im Brutschrank bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$ inkubiert. Anschließend wurde der Überstand (ca $800 \mu\text{l}$) vorsichtig mit einer $1000 \mu\text{l}$ Pipette abgenommen, die Zellen resuspendiert, in eine 96-Well Platte überführt

und wie oben beschrieben gefärbt.

2.5 Auswertung

2.5.1 Durchflusszytometrisches Gating

Wie bereits beschrieben (*siehe Abschnitt 2.1*), exprimieren die transferierten OTIIxThy1.1 CD4⁺ T-Zellen und deren Nachkommen im Gegensatz zu den CD4⁺ T-Zellen der Wirtsmäuse CD-90.1 (Thy1.1) und können so identifiziert werden. Sie wurden während der Experimente als (OVA-)spezifische CD4⁺ T-Zellen bezeichnet. Allerdings exprimieren nicht alle OTIIxThy1.1 CD4⁺ T-Zellen ursprünglich V β 5 (eigene Beobachtung), eine der beiden TCR-Untereinheiten, die bei diesen Mäusen die OVA-Spezifität ausmachen. Zwar steigt der Anteil der V β 5⁺ Zellen nach OVA-Kontakt und Proliferation auf > 95%, trotzdem wurde diese Untereinheit in Experiment 2 und 4 zusätzlich angefärbt und nur die positiven Zellen wurden analysiert (*siehe Abbildung 2.2 E*). Zudem wurden bei der Zytokin- und FoxP3-Analyse in allen Experimenten nur diejenigen Zellen betrachtet, die auf den Antigenreiz hin proliferierten und die Konzentration des Proliferationsmarkers verringerten. Dies geschah, um anerge Zellen und solche die möglicherweise trotz Thy1.1 (und V β 5) Positivität nicht OVA-spezifisch sind, nicht mit in die Analyse einzubeziehen. Die proliferierten Zellen wurden hier als Generation 1+ bezeichnet (*siehe Abbildung 2.2 F*).

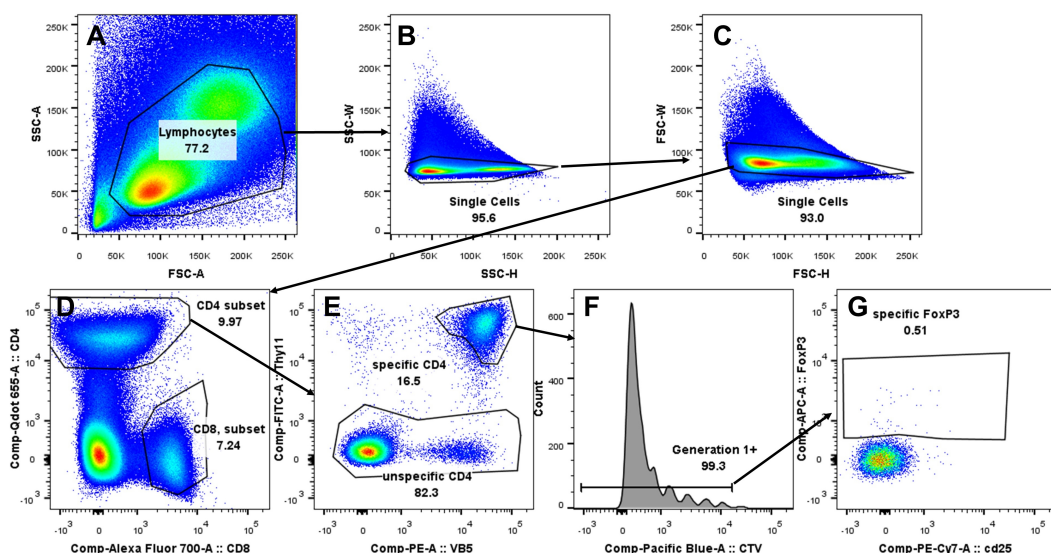


Abbildung 2.2: Darstellung einer exemplarischen Gatingstrategie: **A** Lymphozyten, **B,C** singuläre Zellen, **D** CD4⁺ T-Zellen, **E** Thy1.1⁺ und V β 5⁺ Zellen, **F** proliferierte spezifische Zellen, **G** FoxP3⁺ Zellen.

Wenn in einem Experiment, bei einer Analyse einzelner Tiere keine Proliferation der CD4⁺/Thy1.1⁺(/Vβ5⁺) CD4⁺ T-Zellen zu erkennen war und der Anteil der OVA-spezifischen T-Zellen dem der Tiere der PBS-Kontrollgruppe (ohne Antigenkontakt) glich, wurden diese Tiere von einer weiteren Analyse ausgeschlossen. Dies geschah in der Annahme eines Fehlers bei der intraperitonealen Applikation des Antigens beispielsweise durch Injektion ins Caecum. Weiterhin wurden Proben, bei denen z.B. aufgrund von Fehlern bei der Verarbeitung weniger als 1*10⁵ CD4⁺ T-Zellen aufgenommen werden konnten, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen. Dies trat insbesondere bei den mesenterischen Lymphknoten auf.

2.5.2 Verwendete Software/Statistik

Die FACS Daten wurden an einem LSRII mit Hilfe des Programms FACS DIVA Version 6.0 von BD (Heidelberg) erhoben und mit Flowjo v10.0.7 von Treestar (Ashland, OR, USA) ausgewertet. Eine Zusammenführung der Daten eines Experiments und die weiterführende statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms Prism 6.0 von GraphPad (La Jolla, CA, USA). Die Signifikanz zwischen den Versuchsgruppen wurden mit Hilfe der einfaktoriellen Varianzanalyse und des Tukey-Tests für multiples Testen bestimmt. Das jeweilige Signifikanzniveau wurden wie folgt mit * gekennzeichnet: * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001, **** p<0.0001; in Einzelfällen, in denen eine Tendenz deutlich gemacht werden sollte, wurde der P-Wert direkt angegeben. Jeder Punkt einer Grafik entspricht einer Maus im Experiment. Sind mehrere Werte in Gruppen zusammengefasst, wurde zusätzlich das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung dargestellt.

$$ProliferationsIndex = \frac{\sum_1^i i \times \frac{N_i}{2^i}}{\sum_1^i \frac{N_i}{2^i}}$$

Abbildung 2.3: i ist die jeweilige Generationszahl und N_i ist die Anzahl an Zellen in der jeweiligen Generation i . Es wird also für diejenigen Zellen die sich geteilt haben, die mittlere Zahl der Teilungen berechnet (45). Eine möglicherweise teilweise anerge „Generation 0“ findet dabei keine Berücksichtigung und kann das Ergebnis nicht verfälschen.

Für die Auswertung des Proliferationsindexes im ersten Experiment wurde das *proliferation tool* der Software Flowjo 7.6.4 von Treestar (Ashland, OR, USA) verwendet; die Berechnung des Proliferationsindexes erfolgte nach der in Abbildung 2.3 dargestellten Formel.

Kapitel 3

Ergebnisse

B- und T-Zellen lassen sich als hochspezialisierte Zellen des adaptiven Immunsystems dank ihres Rezeptors einem spezifischen Epitop eines Antigens zuordnen und eignen sich deshalb, eine Antigen-spezifische Immunantwort zu verfolgen. Nach Antigenstimulation entwickeln sich spezifische T-Helferzell-Subpopulationen, die wichtige regulatorische Aufgaben wahrnehmen und grob in proinflammatorische (wie Th1 oder Th17) und immunsuppressive (z.B. FoxP3⁺) CD4⁺ T-Zellen eingeteilt werden können. Es konnte gezeigt werden, dass IVIG wahrscheinlich mittels APC wie dendritischen Zellen die Bildung von regulatorischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen positiv beeinflussen kann und mithin ein möglicher Zusammenhang zwischen den immunmodulatorischen Eigenschaften von IVIG und diesen Zellen besteht. Analog dazu ließen sich immunsuppressive Effekte mit sialylierten, Antigen-spezifischen Antikörpern in Form von Immunkomplexen mit ihrem Antigen erzielen. Ziel dieser Arbeit war es, Methoden und Modelle zu entwickeln, um die Einflüsse von IVIG und unterschiedlich glykosylierten, Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern auf die Antigen-spezifische T-Helferzell-Entwicklung, insbesondere auf die Induktion FoxP3⁺ regulatorischer T-Zellen, zu untersuchen. Später könnten mit geeigneten Modellen dann auch die daran beteiligten Rezeptoren auf den APC charakterisiert werden. Wenn es möglich wäre mit Hilfe von Antigen-spezifischen Antikörpern Einfluss auf die Entwicklung von Antigen-spezifischen, regulatorischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen zu nehmen, könnte das ein vielversprechendes Werkzeug z.B. bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten und Allergien sein.

3.1 Experiment 1: Wirkung von IVIG auf die Immunisierung mit OVA in CFA in $Fc\gamma r2b^{-/-}$ Mäusen

Es konnte gezeigt werden, dass die Reifung dendritischer Zellen unter dem Einfluss von IVIG gehemmt wird (siehe Abschnitt 1.2.3). Zudem gibt es Hinweise, dass IVIG die Bildung von $FoxP3^+ CD4^+$ T-Zellen positiv beeinflusst (31).

Anknüpfend an diese Ergebnisse wurde im ersten Experiment die anti-inflammatorische Wirkung von IVIG untersucht. Es sollte dessen Einfluss auf dendritischen Zellen, die endogenen, OVA-unspezifischen und die transferierten, OVA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen nach Aktivierung mit dem pro-inflammatorischen Stimulus OVA in CFA beurteilt werden. Da eine

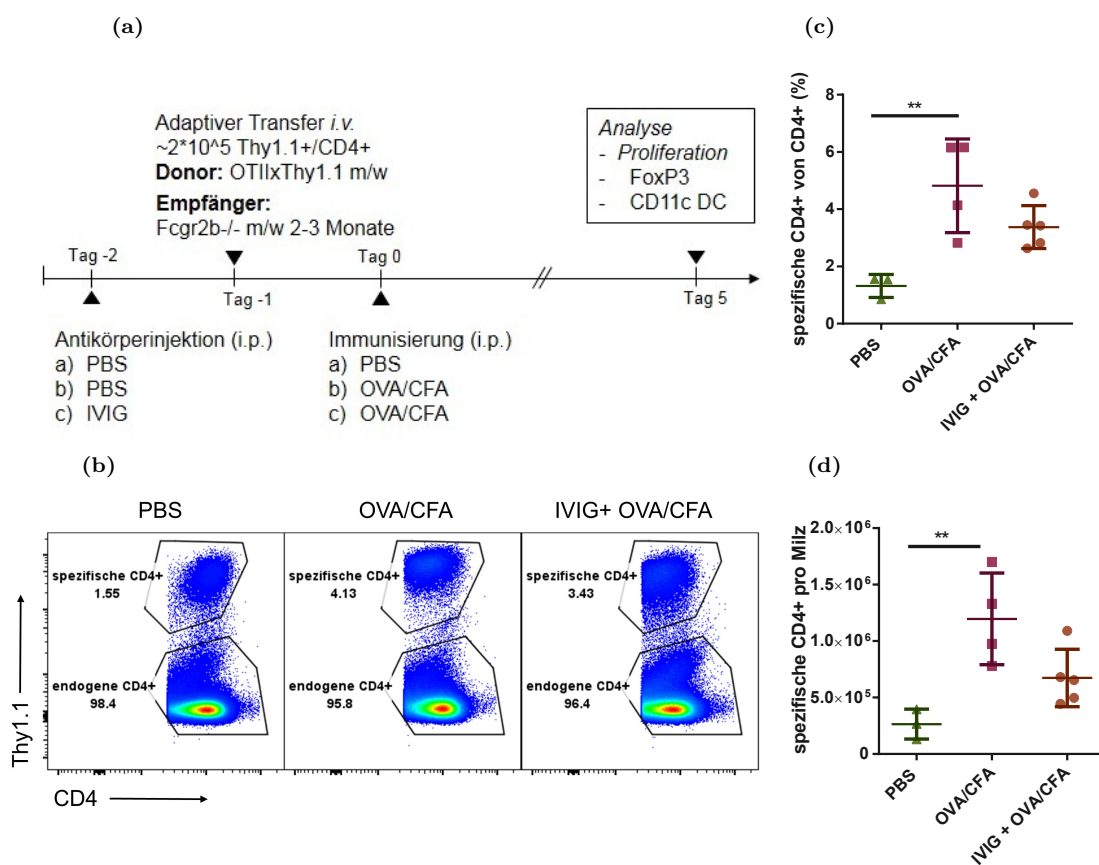


Abbildung 3.1: (a) Übersicht über Experiment 1 (weitere Details in Tabelle 2.2 und im Text). (b) Exemplarische durchflusszytometrische Darstellung der Frequenzen von $Thy1.1^+ CD4^+$ T-Zellen an allen $CD4^+$ T-Zellen der Milzen. $Thy1.1$ dient als Marker für transferierte Zellen. (c) Relative Anteile und (d) absolute Zahlen (berechnet) der in (b) gezeigten Zellen. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

$Fc\gamma RII B$ unabhängige Wirkung sowohl von IVIG als auch von sialylierten, monoklonalen

IgG1-Antikörpern auf dendritische Zellen nachgewiesen werden konnte (42), wurden in diesem Experiment $Fc\gamma r2b^{-/-}$ Mäuse als Wirtstiere verwendet.

Dazu wurden die Versuchstiere in drei Gruppen mit je 3 (Gruppe a) oder je 5 Tieren (Gruppe b und c) aufgeteilt (*vergleiche Abbildung 3.1a*). Allen Tieren der drei Gruppen wurden an Tag -1 2×10^5 aufgereinigte $Thy1.1^+ CD4^+$ T-Zellen von OTIIxTh1.1 Mäusen i.v. gespritzt. Gruppe a (PBS) diente als Negativkontrolle und wurde weder mit IVIG an Tag -2 noch mit OVA in CFA an Tag 0 behandelt. Gruppe b (OVA/CFA) war die Positivkontrolle und wurde an Tag 0 mit $100 \mu g$ OVA in CFA i.p. immunisiert. Gruppe c (IVIG + OVA/CFA) bekam im Vergleich zu Gruppe b zusätzlich an Tag -2 IVIG ($2 mg/g$ Körpergewicht) i.p. appliziert. Das Experiment wurde an Tag 5 nach Antigengabe beendet und die Milzzellen analysiert.

Sowohl beim relativen Anteil als auch an der absoluten Zahl OVA-spezifischer $CD4^+$ T-

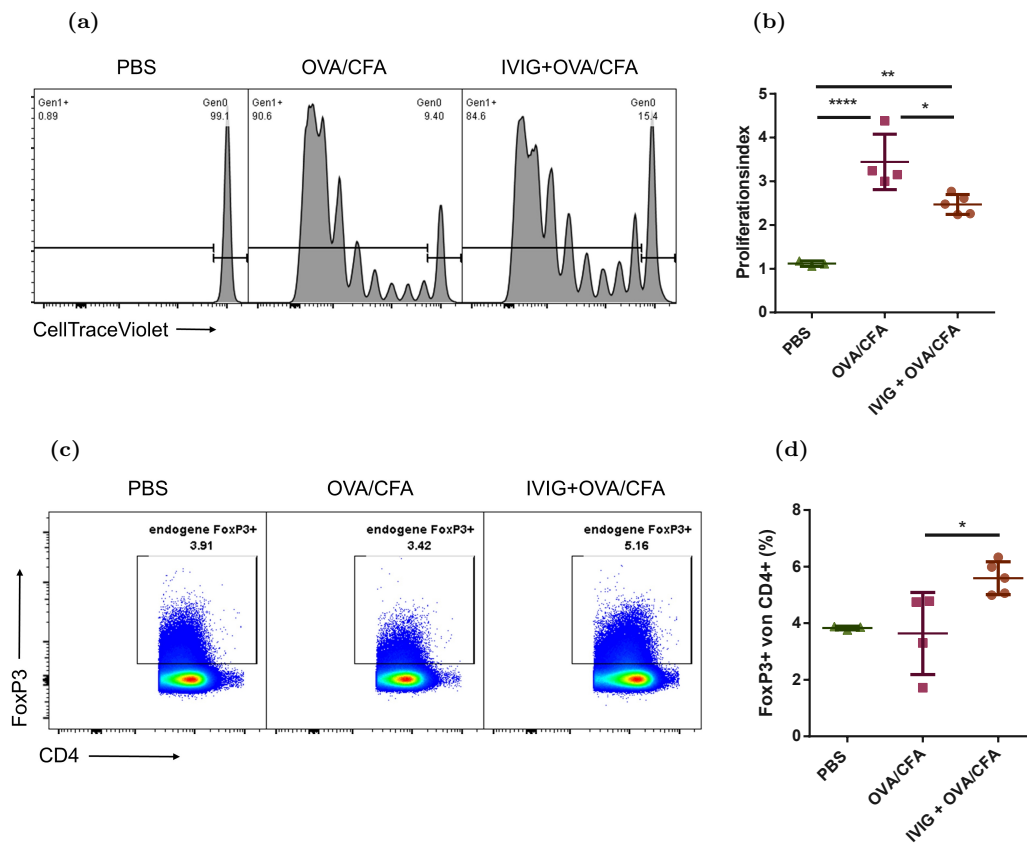


Abbildung 3.2: Verringerte Antigen-spezifische $CD4^+$ T-Zell-Proliferation und vermehrt regulatorische $FoxP3^+ CD4^+$ T-Zellen in IVIG-behandelten Mäusen: (a) Exemplarische Darstellung der Proliferation der transferten $Thy1.1^+ CD4^+$ T-Zellen je Gruppe. (b) Durchschnittliche Zellteilungen der $Thy1.1^+ CD4^+$ T-Zellen. Der Proliferationsindex ist die Anzahl von Zellteilungen, geteilt durch die Anzahl der Zellen, die (berechnet) ursprünglich in Teilung gingen (*siehe Abbildung 2.3*). (c) Exemplarische Darstellung endogener $FoxP3^+ CD4^+$ T-Zellen der Milz. (d) Prozentualer Anteil endogener $FoxP3^+ CD4^+$ T-Zellen an allen endogenen $CD4^+$ T-Zellen der Milz. Die Menge an $Thy1.1^+ FoxP3^+ CD4^+$ T-Zellen war in diesem Experiment so gering, dass sie nicht ausgewertet werden konnten. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Zellen deutete sich eine geringere Proliferation bei den mit IVIG behandelten Mäusen an (siehe Abbildung 3.1c und 3.1d). Signifikant wurde dieser Trend bei Betrachtung des Proliferationsmarkers CTV: Die mittlere Zahl der Zellteilungen (Proliferationsindex) ist in der IVIG-behandelten Gruppe geringer (siehe Abbildung 3.2b). Betrachtet man bei den OVA-unspezifischen, endogenen $CD4^+$ T-Zellen den Anteil an $FoxP3^+$ T-Zellen, so ergibt sich in der IVIG-behandelten Gruppe c ein größerer Anteil an $FoxP3^+$ T-Zellen im Vergleich zur nicht behandelten Gruppe b. Die OVA-spezifischen $FoxP3^+$ $CD4^+$ T-Zellen konnten aufgrund ihrer geringen Frequenz nicht ausgewertet werden.

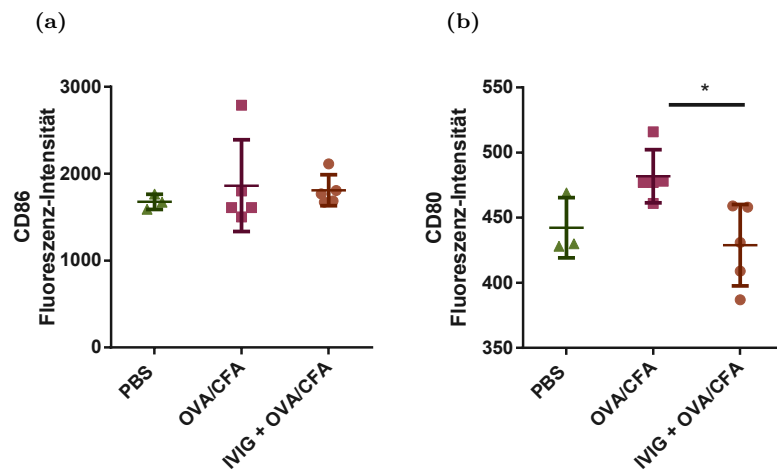


Abbildung 3.3: Verringerte Reifung dendritischer Zellen in IVIG behandelten Tieren: CD80 und CD86 als wichtige Aktivierungsmarker muriner, $CD11c^+$, dendritischer Zellen. (a) CD86 Oberflächenexpression. (b) CD80 Oberflächenexpression. Ausgewertet wurden $CD11c^+$ Milzzellen. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel der Fluoreszenzintensität mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Da dendritische Zellen einen maßgeblichen Einfluss auf die T-Zell-Entwicklung haben, wurden in diesem Experiment die Aktivierungsmarker CD80 und CD86 auf $CD11c^+$ dendritischen Zellen betrachtet. Während bei CD86 kein Unterschied zwischen den Gruppen nachweisbar war, zeigte sich für CD80 eine geringere Oberflächenexpression auf $CD11c^+$ Milzzellen in der mit IVIG behandelten Gruppe c (siehe Abbildung 3.3).

Dieses Experiment fand in $Fcgr2b^{-/-}$ Mäusen statt, daher scheinen die beobachteten Effekte, wie erwartet nicht vom inhibitorischen $Fc\gamma RIIB$ abhängig zu sein.

Zusammengefasst konnte in diesem Versuch gezeigt werden, dass IVIG die Expression des Aktivierungsmarkers CD80 auf $CD11c^+$ dendritischen Zellen vermindert, den Anteil an unspezifischen regulatorischen T-Helferzellen erhöht und die Proliferation OVA-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen verringert.

3.2 Experiment 2: Wirkung von *in-vitro* generierten Immunkomplexen in $Fcgr2b^{-/-}$ Mäusen

Beginnend mit Experiment 2 wurden anstatt des poly-spezifischen IVIG, TNP-spezifische IgG1 in Form von Immunkomplexen mit TNP-OVA eingesetzt, um so die Immunantwort gezielter in Bezug auf die OVA-spezifischen T-Zellen beeinflussen zu können. Dabei kamen 2 Gruppen von monoklonalen anti-TNP IgG1 zum Einsatz, die sich in der Glykosylierung ihrer Fc-Region unterschieden (*siehe Abschnitt 2.2.3*). Außerdem wurde auf ein proinflammatorisches Adjuvans verzichtet um herauszufinden, ob Immunkomplexe bereits unter diesen Bedingungen in der Lage sind Antigen-spezifische, regulatorische $CD4^+$ T-Zellen zu induzieren.

Um die Frequenz OVA-spezifischer $CD4^+$ T-Zellen im Vergleich zu Experiment 1 weiter zu

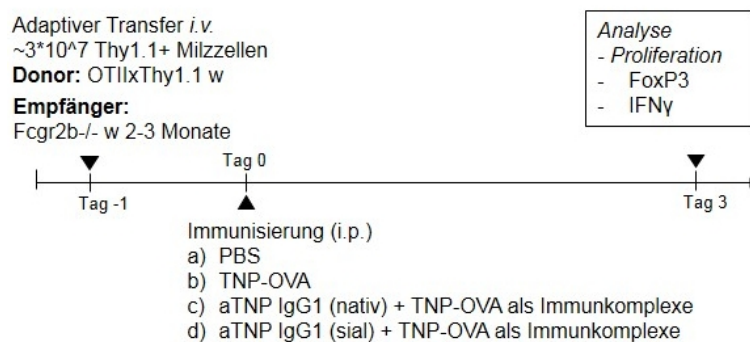


Abbildung 3.4: Übersicht über Experiment 2 (*weitere Details in Tabelle 2.2 und im Text*).

erhöhen, wurde auf die Aufreinigung der $CD4^+$ T-Zellen verzichtet und am Tag -1 ca. $3 \cdot 10^7$ OTII-Thy1.1 Milzzellen in je eine $Fcgr2b^{-/-}$ Maus transferiert. Die Versuchstiere wurden in zwei Gruppen zu je 6 Tieren (c/d, nativ/sial. anti-TNP IK), eine mit 5 Tieren (b, TNP-OVA) und eine Kontrollgruppe mit 2 Tieren (a, PBS) aufgeteilt. An Tag 0 wurden die Tiere stimuliert: Gruppe a wurde als negative Kontrollgruppe für die Proliferation der OVA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen nur mit PBS behandelt, den Tieren der Gruppe b wurde als Positivkontrolle für die T-Zell-Proliferation lediglich $30 \mu\text{g}$ TNP-OVA injiziert, die der Gruppe c dienten als Negativkontrolle für die Sialylierung und erhielten $30 \mu\text{g}$ TNP-OVA komplexiert mit $43,5 \mu\text{g}$ nativen anti-OVA IgG1. Gruppe d erhielt ebenfalls $30 \mu\text{g}$ TNP-OVA, jedoch komplexiert mit sialylierten anti-TNP IgG1. (*Vergleiche Abbildung 3.4 und Tabelle 2.2.*)

Experimente zu oral und intravenös induzierter Toleranz haben ergeben, dass die dabei entstehenden $FoxP3^+$ $CD4^+$ Zellen zuerst in den mesenterialen, den Dünndarm drainierenden Lymphknoten detektiert werden können (12). Weil die Experimente hier, mit 3 bis 4 Tagen sehr kurz sind und die Frequenz an spezifischen $FoxP3^+$ $CD4^+$ T-Zellen gering ist, wurden

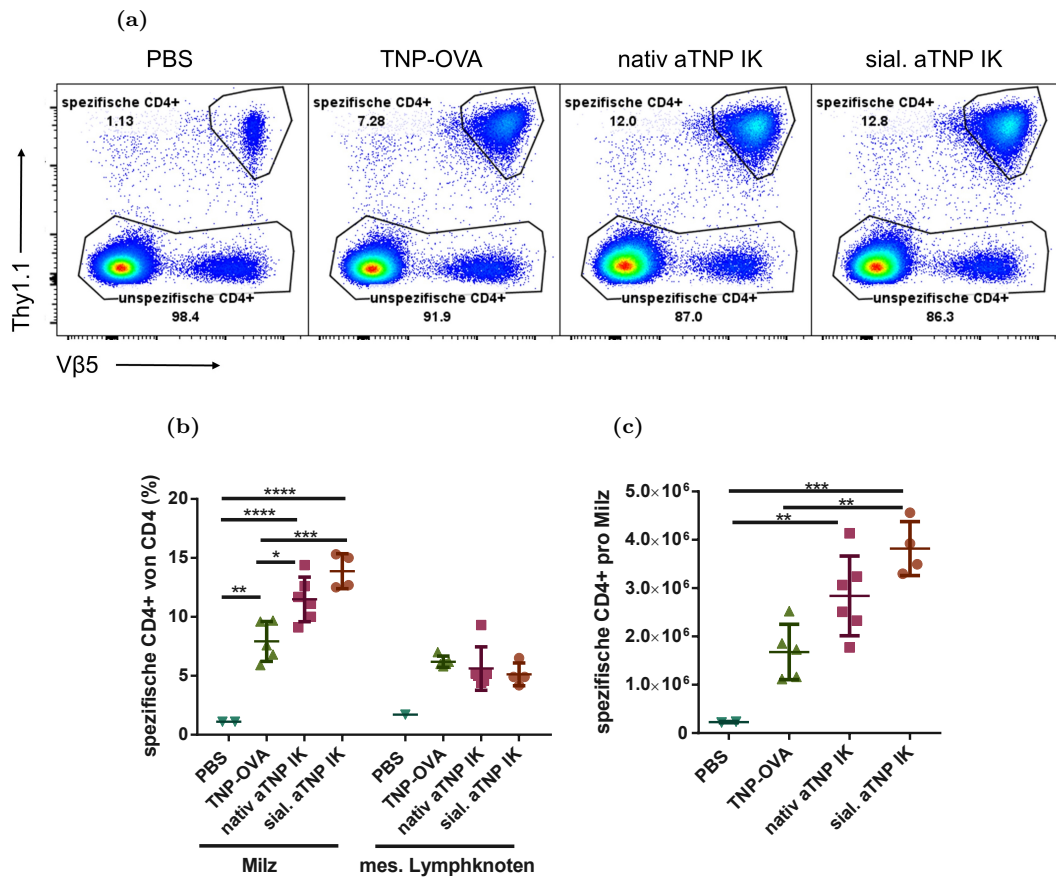


Abbildung 3.5: Relativer Anteil und absolute Zahl OVA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen von allen CD4⁺ T-Zellen. **(a)** Exemplarische durchflusszytometrische Darstellung der Frequenzen von Thy1.1⁺/Vβ5⁺ CD4⁺ T-Zellen in den Milzen. Thy1.1 dient als Marker für transferierte Zellen und Vβ5 als Marker für den transgenen Ovalbuminpeptid-Rezeptor. **(b)** Relativer Anteil und **(c)** absolute Zahlen der in (a) gezeigten Zellen. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

den Tieren neben den Milzen auch die mesenterischen Lymphknoten (mes. Lymphknoten) entnommen und untersucht.

In den Milzen der mit Immunkomplexen behandelten Tiere (Gruppe c und d) konnte im Vergleich zu den nur mit TNP-OVA behandelten Tieren (Gruppe b) ein deutlich höherer Anteil spezifischer CD4⁺ T-Zellen detektiert werden; allerdings tendenziell am meisten in Gruppe d, deren Antikörper einen hohen Grad an Sialylierung aufwiesen. Interessanterweise ließ sich in den mesenterischen Lymphknoten keine solche Tendenz feststellen (*siehe Abbildung 3.5*). Im Gegensatz zum Vorexperiment ließen sich bei den unspezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen feststellen. Bei den OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen waren bei den Immunkomplex-behandelten Tieren signifikant mehr FoxP3⁺ Zellen vorhanden, jedoch ohne signifikanten Unterschied zwischen den verschiedenen glykosylierten Immunkomplexen (*siehe Abbildung 3.6*).

Um die IFNγ-Zytokinexpression als Marker für Th1 CD4⁺ T-Zellen zu bestimmen, wur-

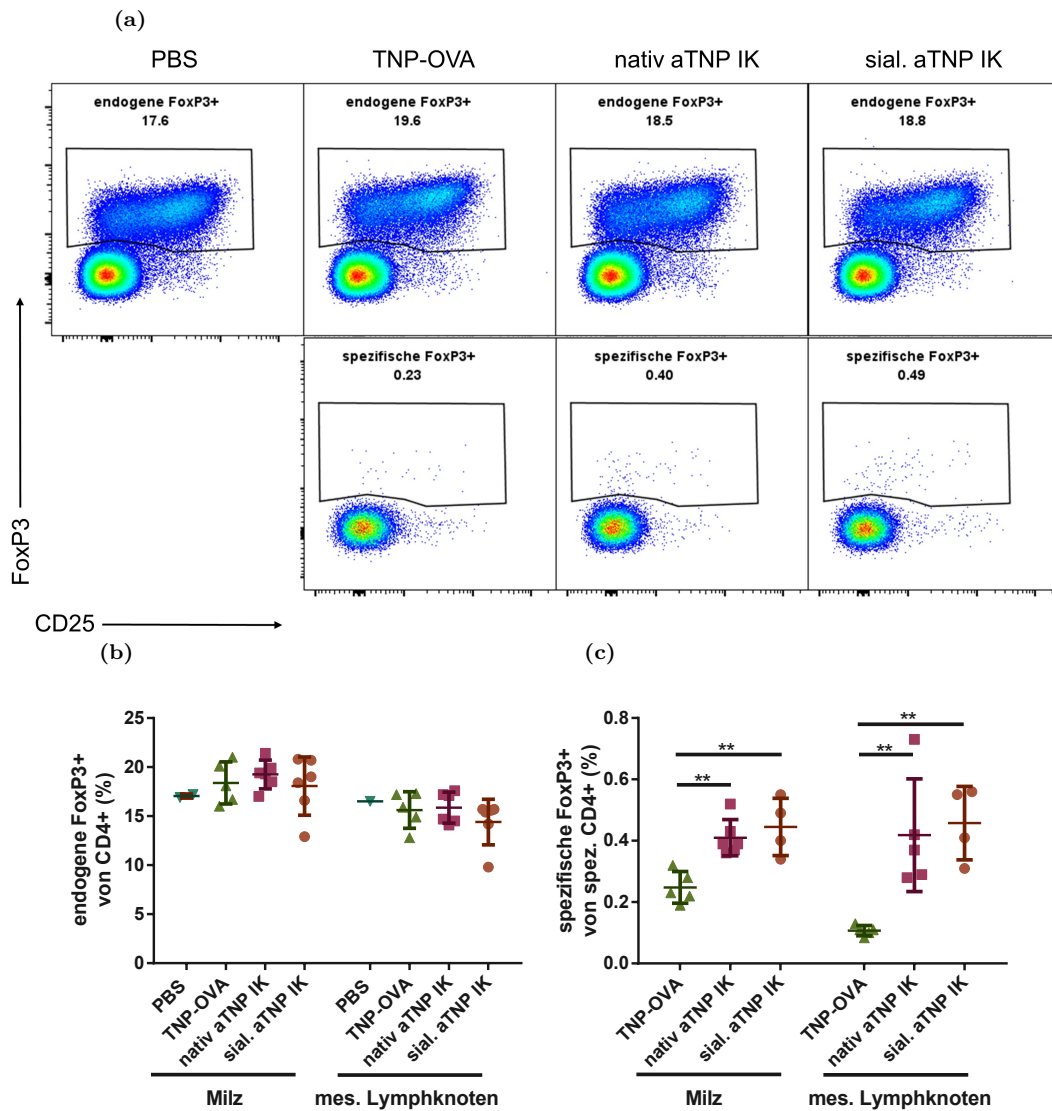


Abbildung 3.6: Erhöhter Anteil an OVA-spezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen in Immunkomplex-behandelten Tieren (a) Endogene und Thy1.1⁺/Vβ5⁺ (OVA-spezifische) FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen. (b) Frequenzen von endogenen, FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen der Versuchsgruppen in Milz und mes. Lymphknoten. (c) Anteil von Thy1.1⁺/Vβ5⁺ FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen an den gesamten Thy1.1⁺/Vβ5⁺ CD4⁺ T-Zellen in Milz und mes. Lymphknoten. Das Gating der Thy1.1⁺/Vβ5⁺ CD4⁺ T-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, ausgewertet wurden die Zellen, die sich zumindest einmal geteilt haben. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

den die Milzzellen in-vitro mit dem für den OTII-TCR passenden OVA-Peptid stimuliert. Die transferierten, OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zeigten im Gegensatz zu den endogenen CD4⁺ T-Zellen, eine deutliche Aktivierbarkeit anhand des Markers CD154. Durch vierstündige Stimulation ließen sich ca. 10-20% der Thy1.1⁺ CD4⁺ T-Zellen Antigen-spezifisch aktivieren. Die Kontrollgruppe zeigte, dass diese Aktivierung nicht durch das Monensin oder die Zellkultur ausgelöst wurde. Die CD4⁺ T-Zellen der Immunkomplex-behandelten Mäuse zeigten eine tendenziell geringere Aktivierbarkeit als die nur mit TNP-OVA behandelten;

zudem war ein signifikant geringerer Anteil $\text{IFN}\gamma$ -positiv. Allerdings konnten erneut keine signifikanten Unterschiede zwischen den nativen und höher sialylierten IgG1 festgestellt werden (siehe Abbildung 3.7).

Insgesamt zeigte sich in diesem Experiment ein zweideutiges Bild: Die mit Immunkomplexen

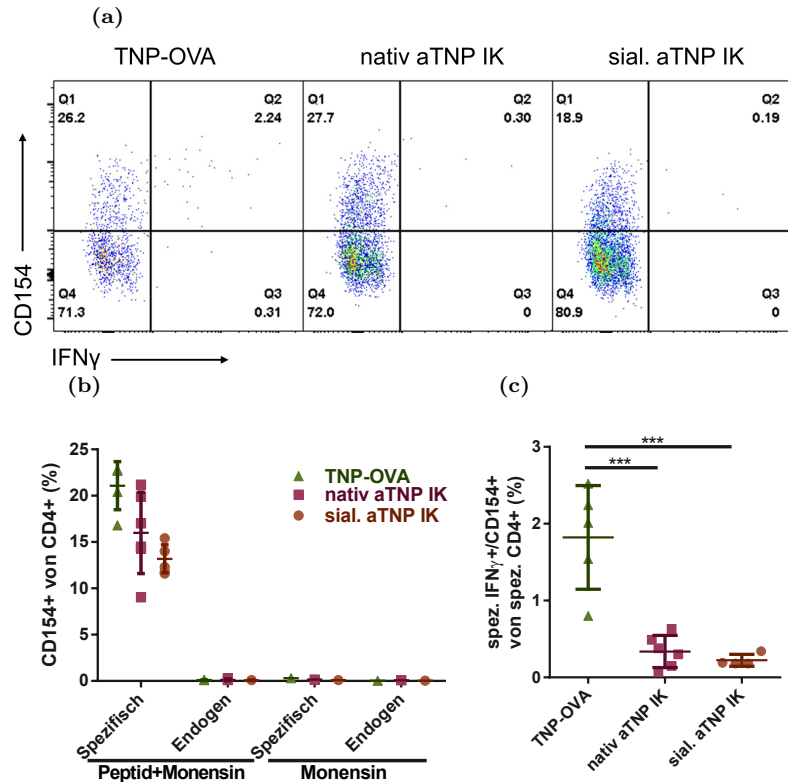


Abbildung 3.7: Verringerter Anteil OVA-spezifischer, $\text{IFN}\gamma$ -produzierender CD4^+ T-Zellen in Immunkomplex-behandelten Tieren. **(a)** Durchflusszytometrische Darstellung aktivierter (CD154^+), $\text{Thy1.1}^+/\text{V}\beta 5^+$ CD4^+ T-Zellen und deren $\text{IFN}\gamma$ Expression nach 4 stündiger in-vitro Stimulation mit OVA-Peptid. **(b)** Anteil aktivierter (CD154^+) CD4^+ T-Zellen bei spezifischen ($\text{Thy1.1}^+/\text{V}\beta 5^+$) und endogenen, CD4^+ T-Zellen nach Stimulation mit OVA-Peptid plus Monensin oder Monensin allein. **(c)** Anteil $\text{IFN}\gamma^+/\text{CD154}^+$ an $\text{Thy1.1}^+/\text{V}\beta 5^+$ CD4^+ T-Zellen. Das Gating der OVA-spezifischen CD4^+ T-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben. Ausgewertet wurden die Zellen, die sich zumindest einmal geteilt haben. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

behandelten Tiere wiesen einen höheren Anteil spezifischer regulatorischer CD4^+ T-Zellen auf und der Anteil an Th1-Zellen war vermindert. Allerdings war der Anteil an OVA-spezifischen CD4^+ T-Zellen an den gesamten CD4^+ T-Zellen in den Immunkomplex-behandelten Tieren größer, was für eine stärkere Proliferation spricht. Die Unterschiede zwischen den mit verschiedenen Glykoformen behandelten Tieren waren nur gering ausgeprägt.

3.3 Experiment 3: Wirkung von *in-vitro* generierten Immunkomplexen in Wildtyp C57BL/6J Mäusen

Die Ergebnisse des letzten Experimentes zeigten bei den mit Immunkomplexen behandelten Tieren zwar einen höheren Anteil an FoxP3⁺ Zellen und einen verringerten Anteil IFN γ ⁺ Zellen an den OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen, allerdings ließen sich keine deutlichen Unterschiede zwischen den mit sialylierten und den mit nativen Antikörpern hergestellten Immunkomplexen feststellen. Im folgenden Experiment wurden deshalb die Immunkomplexe

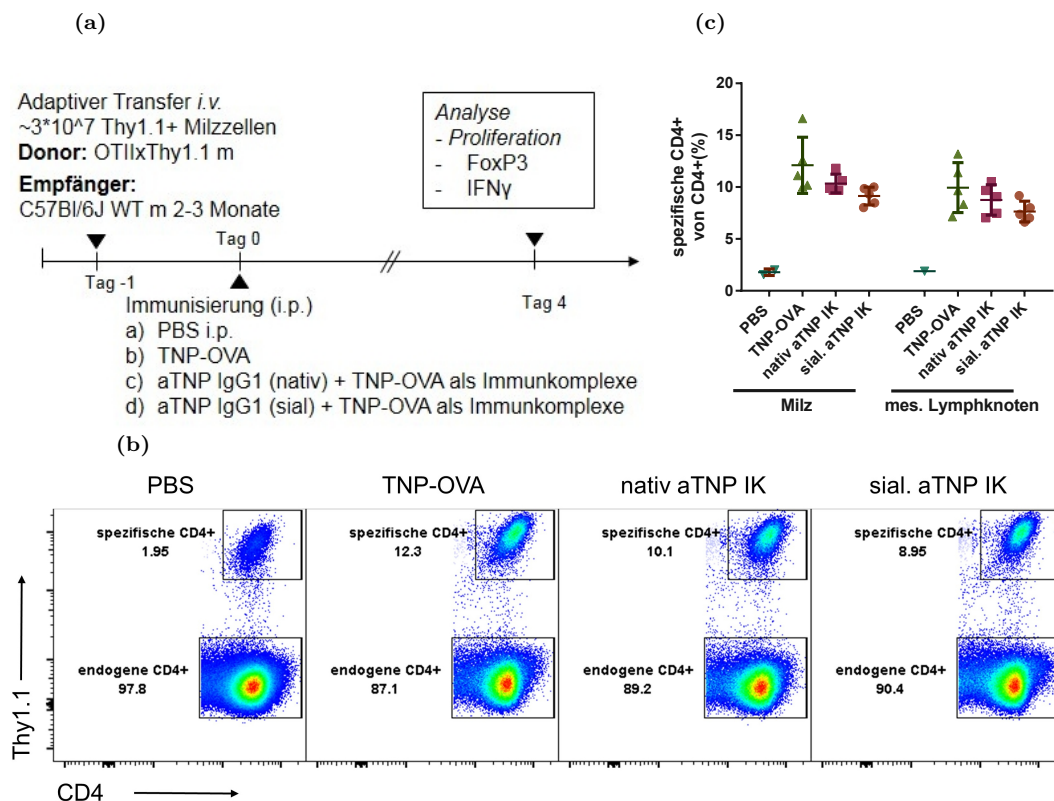


Abbildung 3.8: Anteil OVA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen an den gesamten CD4⁺ T-Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten. **(a)** Übersicht über Experiment 3 (*weitere Details in Tabelle 2.2 und im Text*). **(b)** Exemplarische durchflusszytometrische Darstellung der Frequenzen an endogenen und Thy1.1⁺ CD4⁺ T-Zellen in den Milzen. Thy1.1 dient als Marker für transferierte Lymphozyten und deren Nachkommen. **(c)** Anteil Thy1.1⁺ CD4⁺ T-Zellen an den gesamten CD4⁺ T-Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten. In der Gruppenanalyse entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

mit einem höheren Antikörperanteil hergestellt. Außerdem wurden statt Fc γ 2b^{-/-} Mäusen normale C57BL/6J Wildtyp Mäuse verwendet, um eine mögliche Beteiligung des inhibitorischen Fc γ -Rezeptors unter diesen Bedingungen nicht auszuschließen. Die Tiere wurden in drei Gruppen zu 5 Tieren und eine Kontrollgruppe mit 2 Tieren aufgeteilt. Wie in Experiment 2 wurden am Tag -1 ca. 3×10^7 OTII-Thy1.1 Milzzellen in jedes Versuchstier injiziert. Am Tag

0 erhielten die Tiere der Kontrollgruppe (a, PBS) PBS, während, den Versuchstieren der drei übrigen Gruppen 30 μ g TNP-OVA injiziert wurde; bei Gruppe c (nativ aTNP IK) und d (sial. aTNP IK) zusätzlich komplexiert mit 210 μ g nativen bzw. sialylierten IgG1. Nach 4 Tagen wurde das Experiment beendet (siehe Abbildung 3.8 und Tabelle 2.2).

In den Immunkomplex-behandelten Mäusen gab es in Milz und Lymphknoten tendenziell we-

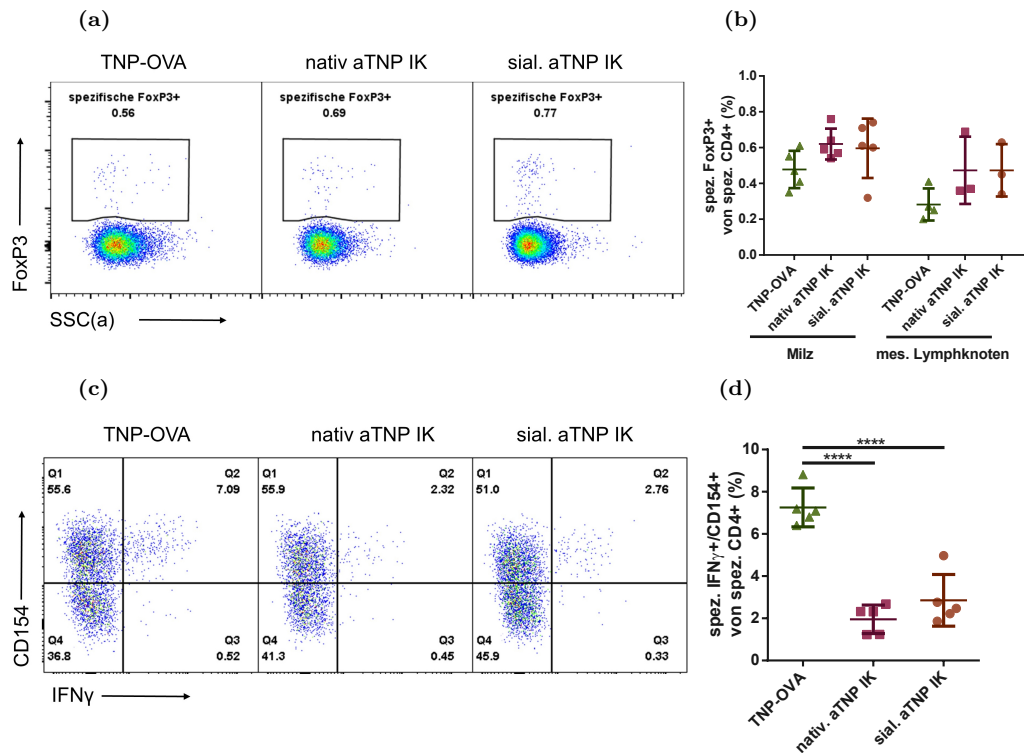


Abbildung 3.9: Tendenzuell höherer Anteil an OVA-spezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen und geringerer Anteil an OVA-spezifischen, IFN γ -produzierenden, aktivierten CD4⁺ T-Zellen in den Immunkomplex-behandelten Tieren. (a,b) Anteil FoxP3⁺ an Thy1.1⁺ CD4⁺ T-Zellen. (c,d) IFN γ und CD154 Expression in den Thy1.1 CD4⁺ T-Zellen der Milz. Das Gating der Thy1.1⁺ CD4⁺ T-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, jedoch ohne V β 5-Färbung. Ausgewertet wurden die Zellen, die sich zumindest einmal geteilt haben. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

niger OVA-spezifische CD4⁺ T-Zellen als in den mit Antigen allein behandelten. Zudem wiesen diese Tiere einen tendenziell höheren Anteil von FoxP3⁺ Zellen an den OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen auf und auch der Anteil an IFN γ -produzierenden, aktivierten (CD154⁺) CD4⁺ T-Zellen war deutlich verringert. Allerdings bestand wiederum kein klarer Unterschied zwischen den mit nativen und den mit sialylierten IgG1-Immunkomplexen behandelten Tieren. Erneut zeigte sich also ein leicht erhöhter Anteil an OVA-spezifischen regulatorischen CD4⁺ T-Zellen und ein verringerter Anteil an Th1-Zellen in den Immunkomplex-behandelten Tieren. Auch in diesem Experiment waren die Unterschiede zwischen den Glykoformen gering ausgeprägt.

3.4 Experiment 4: Wirkung von verschiedenen glykosylierten IgG1-Antikörpern auf die Immunisierung mit TNP-OVA in eCFA in $Fcgr2b^{-/-}$ Mäusen

Die in-vitro präformierten Immunkomplexe der letzten beiden Experimente mit TNP-OVA und den verschiedenen glykosylierten anti-TNP IgG1-Antikörpern brachten keine klaren Unterschiede zwischen den verschiedenen Glykoformen zutage. Allerdings existierte auch kein starker pro-inflammatorischer Reiz, vor dessen Hintergrund sich eine potentielle inhibitorische Wirkung der sialylierten IgG1-Antikörper deutlich hätte abheben können. Aus diesem Grund wurde in diesem Experiment, ähnlich dem ersten Experiment, Freund-Adjuvans verwendet. Um diesen pro-inflammatorischen Ko-Stimulus weiter zu verstärken, wurde das Adjuvans im Vergleich zum CFA mit einer erhöhten Dosis an Hitze-inaktivierten Mykobakterien versehen.

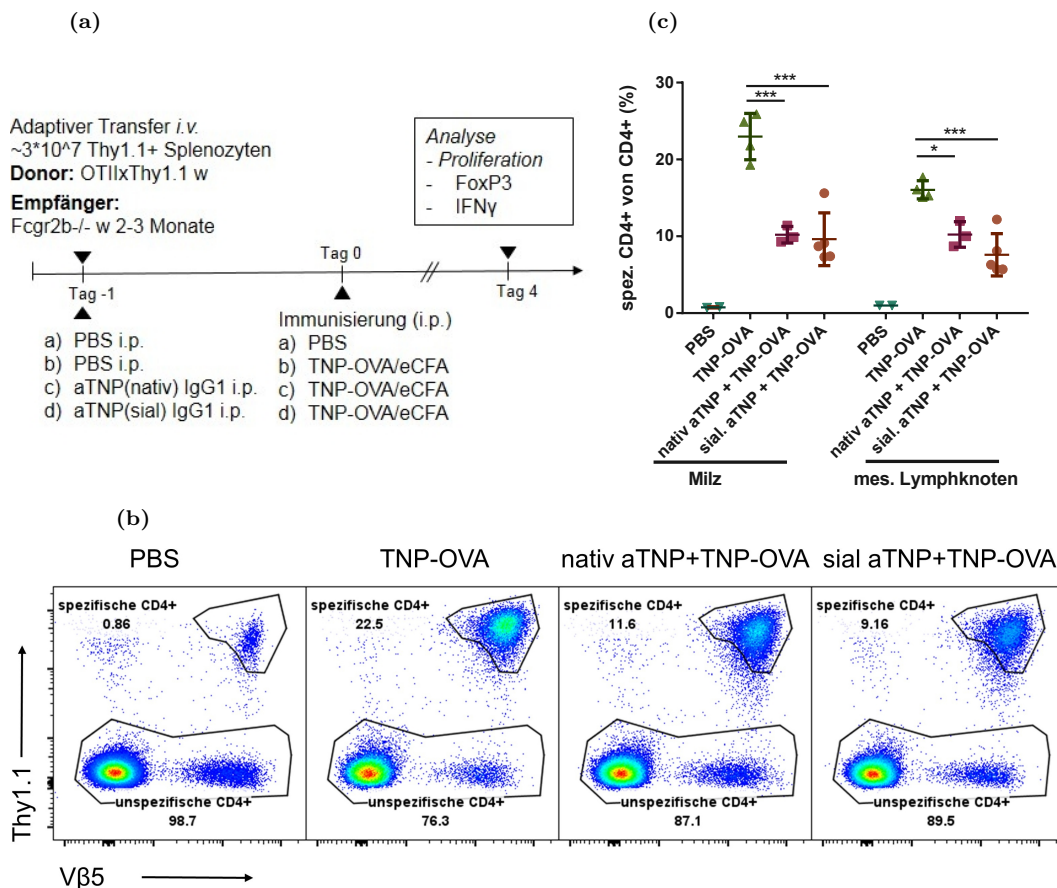


Abbildung 3.10: (a) Übersicht über Experiment 4 (*weitere Details in Tabelle 2.2 und im Text*). (b) Exemplarische durchflusszytometrische Darstellung der Frequenzen an OVA-spezifischen (Thy1.1 $^{+}$ /V β 5 $^{+}$) CD4 $^{+}$ T-Zellen von den gesamten CD4 $^{+}$ T-Zellen in der Milz. (c) Anteil Thy1.1 $^{+}$ /V β 5 $^{+}$ CD4 $^{+}$ T-Zellen an den gesamten CD4 $^{+}$ T-Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten. In der Gruppenanalyse entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

Die in-vitro Generierung von Immunkomplexen in Experiment 2 und 3 stellt eine weitere Variable und damit eine zusätzliche mögliche Fehlerquelle dar. Daher wurde das Experiment 4 so verändert, dass spezifische Antikörper und Antigen getrennt voneinander gespritzt wurden, um die Immunkomplexformierung unter möglichst physiologischen Bedingungen in den Mäusen selbst ablaufen zu lassen.

Die $Fc\gamma R2b^{-/-}$ Mäuse wurden in vier Gruppen eingeteilt: Eine Negativkontrollgruppe mit 2 Mäusen (Gruppe a, PBS) und drei Gruppen mit je 5 Mäusen. Jeder Maus wurden an Tag -1 3×10^7 Milzzellen aus OTIIxThy1.1 Mäusen injiziert. Eine halbe Stunde später erhielten Gruppe a und die Positivkontrollgruppe b PBS; Gruppe c erhielt $90 \mu\text{g}$ native und Gruppe d $90 \mu\text{g}$ sialylierte anti-TNP IgG1-Antikörper. An Tag 0 wurde allen Tieren, außer denen der Negativkontrollgruppe a, $30 \mu\text{g}$ TNP-OVA in eCFA injiziert. An Tag 4 wurden die Zellen der Milz und der mesenterialen Lymphknoten per FACS analysiert (siehe Abbildung 3.10).

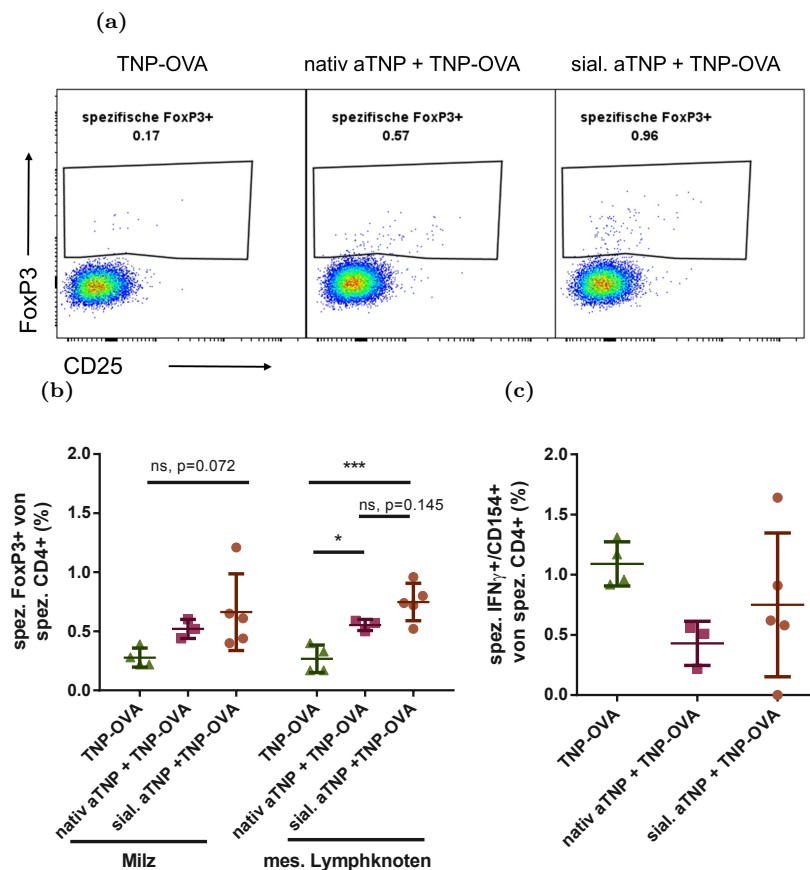


Abbildung 3.11: Tendenziell erhöhter Anteil an OVA-spezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen durch sialylierte Antikörper. **(a)** Exemplarische durchflusszytometrische Darstellung Thy1.1⁺/V β 5⁺ CD4⁺ T-Zellen und der Anteil an FoxP3⁺ Zellen. **(b)** Anteil Thy1.1⁺/V β 5⁺ FoxP3⁺ an CD4⁺ T-Zellen aus Milz und den mesenterialen Lymphknoten **(c)** Anteil IFN γ -produzierender CD154⁺ Zellen an den Thy1.1⁺/V β 5⁺ CD4⁺ T-Zellen. Das Gating der OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen erfolgte wie in Abschnitt 2.5.1 beschrieben, ausgewertet wurden die Zellen, die sich zumindest einmal geteilt haben. In den Gruppenanalysen entspricht jeder Punkt einer Maus im Experiment. Dargestellt wurde das arithmetische Mittel mit der Standardabweichung. Das Experiment wurde einmal durchgeführt.

In den Antikörper-behandelten Tieren (Gruppe c und d) fanden sich sowohl relativ als auch absolut (nicht gezeigt) weniger OVA-spezifische CD4⁺ T-Zellen in Milz und mesenterialen Lymphknoten als in der Antigen-behandelten Gruppe b. In den mit höher sialylierten IgG1 behandelten Tieren zeichnete sich im Vergleich zu den mit nativen IgG1 behandelten, eine Tendenz zu weniger OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten ab. Ein entgegengesetztes Bild zeigte sich bei den OVA-spezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen. Tiere der beiden Antikörper-behandelten Gruppen wiesen einen höheren Anteil an OVA-spezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen auf, als die nur mit Antigen und Adjuvans behandelten Tiere. Zwischen den Gruppen, die die verschiedenen Antikörper-Glykoformen bekommen hatten, zeichnete sich ebenfalls in den mesenterialen Lymphknoten eine Tendenz ab: Mäuse, die mit höher sialylierten Antikörpern behandelt wurden, wiesen einen tendenziell höheren prozentualen Anteil an OVA-spezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen auf.

Mäuse, die mit Antikörpern behandelt wurden, zeigten außerdem einen tendenziell geringeren Anteil an IFN γ ⁺ OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen in der Milz. Es fand sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den mit höher sialylierten und den mit nativen Antikörpern behandelten Tieren.

Zusammenfassend gab es in Experiment 4 Unterschiede zwischen Antikörper-behandelten und nicht behandelten Fcgr2b^{-/-} Mäusen. Tendenzuell hatten die mit sialylierten IgG1-Antikörpern behandelten Mäuse einen höheren Anteil an OVA-spezifischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten als die mit nativen, niedriger galaktosylierten und niedriger sialylierten Antikörpern behandelten Tiere. Diese Tendenz muss in Zukunft durch Wiederholungs-Experimente mit größeren Gruppen weiter untersucht werden.

Kapitel 4

Diskussion

Mit Hilfe von IVIG werden heute eine Vielzahl von Autoimmunkrankheiten behandelt. Seit dieser zunächst überraschende Effekt entdeckt wurde, hat die medizinische Forschung versucht, ihn zu entschlüsseln, auch um ihn in Zukunft besser nutzbar zu machen.

4.1 Vermutete Wirkungsweise von IVIG bzw. sialylierten Antikörpern

Es wurden einige Theorien zur Wirkungsweise von IVIG aufgestellt (*siehe Abschnitt 1.2*). Eine wichtige Rolle bei der anti-inflammatorischen Wirkung scheint der Glykosylierung von IgG zuzukommen, insbesondere der sialylierten (und galaktosylierten) Subfraktion. In mehreren Mausexperimenten konnte ein Verlust der anti-inflammatorischen Wirkung des IVIGs durch das Entfernen der terminalen Sialinsäuren erzielt werden. Durch Anreicherung der sialylierten Subfraktion konnten bei diesen Experimenten eine mit IVIG vergleichbare immunsuppressive Wirkung bei bis zu 10-fach geringerem Antikörperbedarf erzielt werden (24, 32).

Analog dazu konnte für Immunkomplexe mit Antigen-spezifischen, hoch-sialylierten Antikörpern gezeigt werden, dass sie Entzündung und Antikörperproduktion in einer durch Antigen induzierten Atemwegsentzündung deutlich reduzieren konnten (42).

Dendritische Zellen scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Vermittlung des regulatorischen IVIG Effektes zu spielen. In einem passiven Modell zur ITP ließ sich der inhibitorische IVIG Effekt auch durch Transfer von mit IVIG vorbehandelten CD11c⁺ dendritischen Zellen erzielen (57). In einem in-vitro Modell konnte die Reifung dendritischer Zellen durch IVIG vermindert werden. Immunkomplexe mit sialylierten IgG1-Antikörpern reduzierten die

Reifung ebenfalls deutlich im Vergleich zu Immunkomplexen mit geringer sialylierten IgG1-Antikörpern (42).

Dendritische Zellen sind sehr wichtig für die Einbeziehung des adaptiven Immunsystems in die Immunantwort. Sowohl die Induktion von regulatorischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Helferzellen als auch die Reduktion von pro-inflammatorischen CD4⁺ T-Helferzellen über Vermittlung durch dendritische Zellen wird als ein möglicher Effektormechanismus von IVIG betrachtet (31). In einem Tiermodell zur experimentellen Autoimmunenzephalitis war die IVIG Behandlung mit einem Schutz vor der Krankheit und einem erhöhten Anteil regulatorischer CD4⁺ T-Zellen assoziiert (16). Beim Kawasaki-Syndrom konnte der Erfolg einer Behandlung mit IVIG ebenfalls mit einem erhöhten Anteil an FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen assoziiert werden (19).

Weitere Experimente müssen zeigen, ob die sialylierte IgG-Subfraktion des IVIG und Immunkomplexe mit sialylierten Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern die Entwicklung von FoxP3⁺ regulatorischen T-Zellen begünstigen. Der Einsatz von sialylierten Antigen-spezifischen IgG-Antikörpern könnte in Zukunft ein interessantes Werkzeug zur Antigen-spezifischen Behandlung von z.B. Autoimmunerkrankungen und Allergien sein.

4.2 Diskussion der Experimente

In dieser Arbeit sollte der Einfluss sialylierter IgG1-Antikörper auf die Entwicklung (transferierter) OVA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen nach Stimulation mit (TNP-)OVA untersucht werden: zunächst durch den Einfluss von IVIG auf die OVA-Immunisierung und dann durch Immunkomplexe aus TNP-OVA und verschiedenen Glykoformen eines monoklonalen murinen anti-TNP IgG1-Antikörpers.

Die Hypothese lautete, dass OVA bzw. TNP-OVA unter dem Einfluss von IVIG (Experiment 1) oder Immunkomplexen (Experiment 2-4) in der Maus von dendritischen Zellen aufgenommen wird, um dann OVA-Peptide über MHC-II den zuvor transferierten OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu präsentieren. Abhängig von der Sialylierung sollten die Antikörper dabei die Aktivierung der APC beeinflussen, um so Aktivierung, Proliferation und Ausdifferenzierung der transferierten OVA-spezifischen CD4⁺ T-Helferzellen zu prägen.

4.2.1 Experiment 1

Nach wie vor ist weitgehend unklar, welche Rezeptoren auf den verschiedenen Immunzellen bei der unmittelbaren Erkennung der Glykosylierung von spezifischen IgG-Antikörpern in

Immunkomplexen und welche anschließend bei der Weitervermittlung der Immunmodulation über sekundär beteiligte Immunzellen eine Rolle spielen.

Bei den klassischen Fc γ -Rezeptoren existiert nur ein inhibitorischer Rezeptor: Fc γ RIIB. Seine Rolle bei der Wirkung sialylierter IgG-Antikörper ist umstritten (2, 42). Während einige Modelle eine Fc γ RIIB-Abhängigkeit eines immunsuppressiven Effektes aufweisen, besteht diese in anderen nicht (27, 51). Es deutet viel darauf hin, dass Fc γ RIIB nicht direkt an der Erkennung der sialylierten Antikörper beteiligt ist, sondern dass seine Rolle bei der anti-inflammatorischen Wirkung des IVIG eher nachgeschaltet ist, z.B. durch eine durch IVIG induzierte Hochregulation von Fc γ RIIB auf Effektormakrophagen (1, 43). Eine Involvierung des Fc γ RIIB wäre dann stark vom Modell abhängig. In den Vorexperimenten war die inhibierende Wirkung des IVIG bei der mit LPS-induzierten Aktivierung von dendritischen Zellen Fc γ RIIB unabhängig (42). Basierend auf diesen Vorversuchen mit dendritischen Zellen wurden in dieser Arbeit in drei von vier Experimenten Fcgr2b^{-/-} Mäuse verwendet. Im ersten Experiment (*siehe Abschnitt 3.1*) sollte der anti-inflammatorische Einfluss des IVIGs auf die Aktivierung und Differenzierung von endogenen, OVA-unspezifischen und transferierten OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen untersucht werden. Im Experiment wurden die Mäuse dazu mit OVA in CFA stimuliert. CFA wurde in seiner Funktion als typischer Induktor einer Th1-Antwort als Adjuvans eingesetzt (54). Die Ergebnisse zeigen, dass die Vorbehandlung mit IVIG zu einer verringerten Aktivierung dendritischer Zellen (gemessen an der CD80 Expression auf CD11c⁺ Milzzellen) führte. Dies steht in Einklang mit vorherigen in-vitro Ergebnissen zur Aktivierung dendritischer Zellen unter IVIG Einfluss (42). Gleichzeitig ging damit eine verringerte Proliferation OVA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen einher. Aussagen zu den OVA-spezifischen, regulatorischen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen waren aufgrund der geringen Frequenz in diesem Experiment nicht möglich. Allerdings wurde in der mit IVIG behandelten Gruppe ein höherer Anteil an endogenen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen nachgewiesen, was eine anti-inflammatorische Wirkung des IVIG auf die Differenzierung aller CD4⁺ T-Zellen zeigte. Dieses Experiment soll in Zukunft wiederholt werden, um auch den Einfluss auf die Differenzierung von OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen zu untersuchen. Der Einfluss auf die FoxP3 Expression der OVA-unspezifischen CD4⁺ T-Zellen ließ sich in den Experimenten 2-4, in denen TNP-spezifische IgG1-Antikörper anstatt IVIG verwendet wurden, nicht mehr nachweisen und könnte ein Hinweis auf die gezieltere Wirkung (TNP-)spezifischer Antikörper im Gegensatz zum polyvalenten IVIG sein.

4.2.2 Experiment 2 und 3

Im Gegensatz zum polyvalenten IVIG (2g/kg Körpergewicht) konnten sialylierte, Antigen-spezifische IgG1-Antikörper eine anti-inflammatorische Wirkung gegenüber einem bestimmten Antigen mit Ko-Stimulus wesentlich gezielter und in deutlich reduzierter Dosis erreichen. In einem Mausmodell zur Luftwegsentzündung konnte gezeigt werden, dass 4 mg/kg Körpergewicht eines sialylierten Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpers die Luftwegsentzündung reduzierte; die anti-inflammatorische Wirkung war dabei Antigen-spezifisch und abhängig von der Sialylierung. Ebenso konnte die in-vitro Reifung dendritischer Zellen durch Immunkomplexe mit Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern sialylierungsabhängig verringert werden (42).

In einer experimentell induzierten Nephritis konnte zudem im Vergleich von spezifischen, sialylierten mit desialylierten Antikörpern ein deutlich besseres Überleben für die mit sialylierten IgG behandelten Tiere erzielt werden (Mertes et al, Manuskript in Revision). Die Ergebnisse zeigen, dass eine pro-inflammatorische Immunantwort mit sialylierten Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern Antigen-spezifisch verhindert werden kann.

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurde in den folgenden drei Experimenten (2-4) versucht, möglichst trennscharfe experimentelle Bedingungen zu finden, um unter dem Einfluss von Antigen-spezifischen sialylierten IgG1-Antikörpern Antigen-spezifische FoxP3⁺ regulatorische CD4⁺ T-Zellen zu induzieren.

In Experiment 2 und 3 wurde zunächst auf einen pro-inflammatorischen Reiz verzichtet und nur die Wirkung von Immunkomplexen mit verschiedenen glykosylierten anti-TNP IgG1-Antikörpern und TNP-OVA auf die T-Zell-Differenzierung untersucht. Die Hypothese dabei war, dass Immunkomplexe ohne pro-inflammatorischen Ko-Stimulus Toleranz und damit OVA-spezifische FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen induzieren sollten. Zwar wurden in Experiment 3 statt Fcgr2b^{-/-} Mäusen C57BL/6J Mäuse verwendet und die Immunkomplexe wurden mit einer höheren Antikörperkonzentration als in Experiment 2 hergestellt; dennoch waren die Ergebnisse in beiden Experimenten vergleichbar.

In beiden Experimenten zeigten die Immunkomplex-behandelten Tiere, unabhängig von der Antikörper-Glykoform einen tendenziell höheren Anteil an FoxP3⁺ und einen verringerten Anteil an IFN γ ⁺ CD4⁺ OVA-spezifischen T-Zellen im Vergleich zu den nur mit Antigen behandelten Tieren. Überraschenderweise war der Anteil OVA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in Experiment 2 in den Immunkomplex-behandelten Gruppen erhöht - und in Experiment 3 verringert, im Vergleich zu den nur mit TNP-OVA behandelten Kontrollgruppen. Denkbar

ist zum Einen, dass dieser Unterschied durch die Verwendung von $Fc\gamma R2b^{-/-}$ Tieren im Vergleich zu C57BL/6J Mäusen entstand. Ein Fehlen des einzigen inhibitorischen $Fc\gamma$ -Rezeptors beispielsweise auf T-Zell-aktivierenden dendritischen Zellen wäre eine mögliche Erklärung für die stärkere Proliferation. Alternativ können die Unterschiede aber auch durch die Verwendung von unterschiedlichen Immunkomplexen hervorgerufen worden sein. Zwar wurden dieselben Reagenzien und Methoden verwendet, jedoch ein anderes Verhältnis von Antigen zu Antikörper (*siehe Tabelle 2.2*). Dies könnte bereits Einfluss auf beispielsweise die Entwicklung dendritischer Zellen haben (63). Auch die Größe von Immunkomplexen hat in-vitro wichtigen Einfluss auf die Interaktion mit den Typ I $Fc\gamma$ -Rezeptoren (29). Welcher dieser Faktoren bei den unterschiedlichen Proliferationsraten eine entscheidende Rolle gespielt hat, ist ohne weitere Experimente nicht zu sagen.

Unter den experimentellen Bedingungen dieser beiden Experimente ohne pro-inflammatorischen Ko-Stimulus ließen sich keine deutlichen immunsuppressiven Effekte durch hoch sialylierte IgG1 im Vergleich zu den nativen IgG1 feststellen.

4.2.3 Experiment 4

In Experiment 4 wurde deshalb, um einen stärkeren Kontrast zwischen den experimentellen Gruppen herzustellen, das Antigen ähnlich wie in Experiment 1 mit dem Adjuvans CFA emulgiert. Um diesen pro-inflammatorischen Ko-Stimulus noch weiter zu verstärken, wurde ein mit der fünffachen Menge an Mykobakterien angereichertes CFA (eCFA) verwendet. Außerdem wurde im vierten Experiment auf die in-vitro Generierung von Immunkomplexen verzichtet, um eine weitere Variable auszuschließen und die Immunkomplexbildung in-vivo unter physiologischeren Bedingungen ablaufen zu lassen. Die Antikörper wurden daher einen Tag vor TNP-OVA in eCFA injiziert. Experiment 4 wurde genau wie Experiment 1 in $Fc\gamma R2b^{-/-}$ Mäusen durchgeführt.

In diesem Experiment ließ sich bei den Antikörper-behandelten Tieren, unabhängig von der Glykoform, eine geringere Expansion der spezifischen $CD4^+$ T-Zellen, ein größerer Anteil spezifischer $FoxP3^+$ $CD4^+$ T-Zellen und eine verringerte Frequenz an spezifischen $IFN\gamma$ -produzierenden T-Helferzellen messen. Zwischen den verschiedenen Glykoformen gab es in der Gruppe der sialylierten IgG1 eine Tendenz zu einem geringeren Anteil an OVA-spezifischen $CD4^+$ T-Zellen und einer höheren Frequenz an OVA-spezifischen regulatorischen $FoxP3^+$ $CD4^+$ T-Zellen in den mesenterialen Lymphknoten. Diese Tendenz muss in zukünftigen Experimenten mit größeren Gruppen analysiert werden. Sollte sie sich dann durch Signifikanz

bestätigen, wären die Versuchsbedingungen wie in Experiment 1 und 4 beschrieben geeignet, um unterschiedliche Wirkungsweisen der verschieden glykosylierten IgG1-Antikörper wie auch deren Rezeptoren auf den DC und die dadurch induzierte Wirkung auf die T-Zell-Differenzierung zu untersuchen.

4.3 Diskussion des Modells

Da es das Ziel dieser Arbeit war, optimale Versuchsbedingungen zu etablieren, wurde das Versuchsprotokoll mit jedem neuen Experiment verändert. Dadurch, dass die Experimente jeweils nur einmal durchgeführt wurden, ist eine starke Einschränkung der Aussagen gegeben. Nachdem in Experiment 4 vielversprechende Bedingungen gefunden wurden, soll in Zukunft dieses Versuchsprotokoll mit größeren Versuchsgruppen wiederholt werden, um die Ergebnisse zu validieren. Zudem soll in Zukunft zusätzlich ein vergleichbar glykosylierter, Antigen-unspezifischer IgG1-Antikörper eingesetzt werden, um so die Antigen-spezifische Wirkung belegen zu können.

Ein Grund für die geringen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Glykoformen könnte sein, dass auch die Unterschiede in der Glykosylierung der Antikörper nicht so groß sind, wie sie sein könnten. Die verwendeten nativen aTNP IgG1 enthalten immer noch einen geringen Anteil an sialylierten und einen gewissen Anteil an galaktosylierten Glykoformen (*siehe Abbildung 2.1*). Kürzlich konnte zudem gezeigt werden, dass galaktosylierte/nicht-sialylierte IgG Antikörper die Aktivierung von neutrophilen Granulozyten inhibieren können (25), eine inhibitorische Wirkung über die terminale Galaktose der verwendeten Antikörper ist also nicht auszuschließen. Im nächsten Schritt könnten durch in-vitro Behandlung zu einem höheren Grad desialylierte und degalaktosylierte bzw. hoch galaktosylierte und sialylierte Antikörper hergestellt werden, um so möglicherweise trennschärfere Ergebnisse zu erzielen.

Eine sinnvolle Erweiterung der Experimente könnte zudem die Verwendung von fluoreszenzmarkiertem TNP-OVA darstellen. Mit dessen Hilfe wäre es möglich, diejenigen dendritischen Zellen zu identifizieren, die aktiv an der Aktivierung der Antigen-spezifischen T-Zellen beteiligt sind, um so noch einen Schritt früher in der angenommenen Effektor-Kette sialylierter Antikörper zu analysieren. Die Analyse der Subpopulation Antigen-spezifisch-aktivierter DC könnte so evtl. deutlichere Unterschiede in der DC Reifung aufdecken.

4.3.1 Rezeptor-knockout Mäuse

Experimente 1 und 4 lieferten Hinweise dafür, dass die anti-inflammatorische Wirkung von IVIG und sialylierten IgG1-Antikörpern unabhängig vom inhibitorischen $\text{Fc}\gamma\text{RIIB}$ auf APC abläuft. Allerdings ist die Aufreinigung der CD4^+ T-Zellen nicht vollständig und ein zusätzlicher Transfer von Donor APC (ohne Knockout) ist wahrscheinlich; dies gilt umso mehr in Experiment 4, in dem statt aufgereinigten CD4^+ T-Zellen Gesamt-Milzzellen transferiert wurden. Daher müssen die Wirtstiere als Chimäre betrachtet werden. Eine sichere Aussage bezüglich einer möglichen Rezeptorbeteiligung wäre nur im direkten Vergleich mit Wirtstieren ohne Knockout möglich. Dies gilt auch für zukünftige Experimente mit anderen Knockouts, z.B. für bestimmte C-Typ Lektin-Rezeptoren.

4.3.2 Antigen-spezifische T-Zellen

Die große Anzahl an (transferierten) Antigen-spezifischen T-Zellen früh nach Antigenkontakt entspricht nicht den physiologischen Abläufen bei der Abwehr. Außerdem gibt es Hinweise, dass die Entwicklung naiver T-Zellen in ihre Subklassen auch von der Affinität des jeweiligen TCR zu seinem Epitop abhängig ist (60). Der TCR OVA-spezifischer OTII CD4^+ T-Zellen ist monoklonal, was daher durchaus Einfluss auf die weitere Differenzierung haben kann. Ein grundsätzliches Problem dieses Modells war, dass in allen Experimenten nur maximal 1-2% OVA-spezifische FoxP3^+ CD4^+ T-Zellen induziert werden konnten. Interessanterweise konnte eine deutlich höhere Frequenz OVA-spezifischer regulatorischer CD4^+ T-Zellen gemessen werden, als analoge Experimente zwischenzeitlich auf dem BalbC-Hintergrund mit einem anderen OVA-spezifischen TCR (DO11.10) getestet wurden. Dies stellt möglicherweise eine Besonderheit in der Differenzierung der TCR-transgenen CD4^+ T-Zellen aus OTII Mäusen dar.

Als Alternative zum adaptiven Transfer monoklonaler CD4^+ T-Zellen käme die Detektion endogener, spezifischer CD4^+ T-Zellen in Betracht: Mit Hilfe der bereits in einigen Experimenten durchgeführten in-vitro Restimulation mit OVA-Peptid (*siehe Abbildung 3.7*), bzw. dem gesamten OVA-Protein, können OVA-spezifische CD4^+ T-Zellen gezielt aktiviert und anhand des Aktivierungsmarkers CD154 identifiziert werden. Allerdings lassen sich FoxP3^+ T-Helferzellen nicht mit CD154 identifizieren. Dort ist es notwendig, alternative Marker zu finden (6). Eine weitere Alternative könnte die Färbung mit Epitop-spezifischen MHC-II Tetrameren sein, allerdings ist es unwahrscheinlich, dass alle Antigen-spezifischen T-Zellen

gegen dasselbe Epitop des Proteins gerichtet sind. Außerdem ist wenig bekannt über die Affinität des T-Zell-Rezeptors regulatorischer T-Zellen, die durchaus unter der Detektionsschwelle von MHC-II Tetrameren liegen könnte (6). Das größte Problem neben der Identifizierung der Antigen-spezifischen T-Zellen ist die äußerst geringe Anzahl an diesen Zellen. Die Tiere müssten unter Umständen mehrmals mit dem Antigen stimuliert werden und gegebenenfalls müsste eine Anreicherung vor der eigentlichen Messung per FACS erfolgen. Daher wäre es vermutlich schwierig, so früh wie in den hier gezeigten Experimenten (3-4 Tage nach Antigengabe) in der CD4⁺ T-Zell-Differenzierung nach Unterschieden zu suchen. Eine längere Wartezeit würde sich vermutlich auch in einer größeren Variabilität der T-Zell-Antwort äußern.

Ein auf endogenen T-Zellen basiertes Modell würde den tatsächlichen Abläufen wegen der oben genannten Einflüsse jedoch zweifelsohne näher kommen. Zukünftig soll deshalb versucht werden, parallel ein solches Modell zu etablieren.

Um die eigentliche biologische Relevanz der Messwerte beurteilen zu können, müsste das Modell zusätzlich mit einer Pathologie, wie z.B. einer Typ IV Überempfindlichkeitsreaktionen, einer Luftwegsentzündung oder einer Nephritis verknüpft werden, um so die durchflusszytometrischen Messwerte mit Symptomen korrelieren zu können.

4.4 **Klinische Relevanz der Experimente und Ausblick**

Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu entwickeln, an dem die Wirkung monoklonaler Antigen-spezifischer verschieden glykosylierter Antikörper auf die Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zell-Entwicklung, insbesondere die der FoxP3⁺ regulatorischen CD4⁺ T-Zellen, nachgezeichnet werden kann. Die Ergebnisse des 4. Experimentes zur Antigen-spezifischen FoxP3 T-Helferzell-Induktion sind vielversprechend und eine gute Basis für weitere Experimente.

Die Möglichkeit eine T-Zell Immunantwort gegenüber einem Antigen durch Behandlung mit Antigen-spezifischen, sialylierten Antikörpern gezielt zu beeinflussen, würde viele Therapiemöglichkeiten eröffnen. Es wäre z.B. eine Art Impfung für Transplantatempfänger denkbar, die den ersten Antigenkontakt unter Toleranz-induzierenden Bedingungen ablaufen lassen würde; aber auch für Autoimmunkrankheiten, die heute mit IVIG behandelt werden, könnten sich so neue und gezieltere Therapieoptionen eröffnen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Gepooltes, humanes Serum-IgG von gesunden Spendern (IVIg; intravenöses Immunglobulin) wird hochdosiert (2mg/kg Körpergewicht) in der Medizin erfolgreich eingesetzt, um Autoimmunkrankheiten systemisch zu behandeln. Als eine mögliche Erklärung dieses anti-inflammatorischen Effektes wird die Art der Antikörper-Glykosylierung, insbesondere die Sialylierung, betrachtet. In Tierversuchen konnte die anti-inflammatorische Wirkung IVIGs durch enzymatisches Abtrennen der endständigen Sialinsäuren aufgehoben werden (*siehe Abschnitt 1.2*). Außerdem konnte inzwischen in Mausexperimenten gezeigt werden, dass eine pro-inflammatorische Immunreaktion prophylaktisch mit monoklonalen, Antigen-spezifischen IgG1-Antikörpern (4 mg/kg KG) in Abhängigkeit von ihrer Sialylierung Antigen-spezifisch inhibiert werden kann (*siehe Abschnitt 1.1.2.3*). Die zugrundeliegende Hypothese dieser Arbeit war, dass Immunkomplexe je nach Art der Glykosylierung der Antikörper, eine adaptive Immunreaktion verstärken oder inhibieren können. Die Aufnahme von Immunkomplexen z.B. durch dendritische Zellen könnte je nach Art der IgG-Glykosylierung deren Aktivierung und damit die Differenzierung von naiven zu pro-inflammatorischen oder FoxP3⁺ regulatorischen CD4⁺ T-Zellen beeinflussen. Neue Publikationen zu diesem Thema legen nahe, dass verschiedenen glykosylierte IgG-Antikörper ihre unterschiedliche Wirkung nicht nur über die klassischen Fc γ -Rezeptoren, sondern je nach IgG-Glykosylierung auch über spezifische zuckerbindende C-Typ Lektin-Rezeptoren vermitteln (43).

In dieser Arbeit sollte ein Mausmodell entwickelt werden, um den Einfluss von IVIG und Antigen-spezifischen, sialylierten IgG1-Antikörpern auf eine Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zell-Antwort nach Stimulation mit dem Antigen zu messen. Dabei sollten die Proliferation der Antigen-spezifischen CD4⁺ T-Zellen und der Anteil der entstehenden FoxP3⁺ T-Zellen wichtige Messparameter sein. Zu diesem Zweck wurden T-Zellen aus transgenen Mäusen

mit einem Ovalbumin^{323–339}-spezifischen T-Zell-Rezeptor in Wirtstiere transferiert, die dann mit (TNP-)Ovalbumin stimuliert wurden. Die Antikörper (IVIG oder TNP-spezifische, monoklonale IgG1 unterschiedlicher Glykosylierung) wurden entweder gesondert vor Antigen und pro-inflammatorischen Ko-Stimulus oder zusammen mit dem Antigen, in Form von Immunkomplexen injiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass IVIG in der Lage war, die Proliferation OVA-spezifischer CD4⁺ T-Zellen zu verlangsamen. Gleichzeitig ließ sich eine verringerte Aktivierung dendritischer Zellen und ein erhöhter Anteil an endogenen FoxP3⁺ CD4⁺ T-Zellen feststellen.

Die Verwendung von TNP-spezifischen IgG1-Antikörper zeigte in Abhängigkeit von der Sialylierung eine Tendenz zu einer verringerten Proliferation und einem erhöhten Anteil an regulatorischen FoxP3⁺ Zellen bei den transferierten OVA-spezifischen CD4⁺ T-Zellen. Zur Überprüfung der Signifikanz sollen die Ergebnisse in Zukunft mit einer größeren Anzahl an Tieren pro Versuchsgruppe wiederholt werden. Wenn sich diese Ergebnisse bestätigen, könnten sie ein Hinweis auf eine neue hochspezifische Immunmodulation durch sialylierte IgG-Antikörper sein. Durch Verwendung entsprechender spezifischer Knockout-Tiere ließen sich dann im nächsten Schritt, die an der Vermittlung dieses Effektes beteiligten Rezeptoren, beispielsweise auf dendritischen Zellen, charakterisieren. In Zukunft könnte die Induktion regulatorischer, Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen durch sialylierte Antigen-spezifische IgG-Antikörper eine vielversprechende Behandlungsmethode sein, um Autoimmunerkrankungen und Allergien Antigen-spezifisch zu behandeln.

Kapitel 6

Literaturverzeichnis

- [1] ANTHONY, R. M.; KOBAYASHI, T.; WERMELING, F. und RAVETCH, J. V.: Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T(H)2 pathway. In: *Nature* 475 (2011), 110–3. <http://dx.doi.org/10.1038/nature10134>
- [2] ANTHONY, R. M. und RAVETCH, J. V.: A novel role for the IgG Fc glycan: the anti-inflammatory activity of sialylated IgG Fcs. In: *J. Clin. Immunol.* 30 Suppl 1 (2010), 9–14. <http://dx.doi.org/10.1007/s10875-010-9405-6>
- [3] ANTHONY, R. M.; WERMELING, F.; KARLSSON, M. C. I. und RAVETCH, J. V.: Identification of a receptor required for the anti-inflammatory activity of IVIG. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008), 19571–8. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0810163105>
- [4] ANTHONY, R. M.; WERMELING, F. und RAVETCH, J. V.: Novel roles for the IgG Fc glycan. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1253 (2012), 170–80. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06305.x>
- [5] ARNOLD, J. N.; WORMALD, M. R.; SIM, R. B.; RUDD, P. M. und DWEK, R. a.: The impact of glycosylation on the biological function and structure of human immunoglobulins. In: *Annu. Rev. Immunol.* 25 (2007), 21–50. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.25.022106.141702>
- [6] BACHER, P. und SCHEFFOLD, A.: Flow-cytometric analysis of rare antigen-specific T cells. In: *Cytometry. A* 83 (2013), 692–701. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.22317>

- [7] BANCHEREAU, J. und STEINMAN, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (1998), 245–52. <http://dx.doi.org/10.1038/32588>
- [8] CAMPBELL, D. J. und KOCH, M. a.: Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. In: *Nat. Rev. Immunol.* 11 (2011), 119–30. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2916>
- [9] CARTER, P. J.: Potent antibody therapeutics by design. In: *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006), 343–57. <http://dx.doi.org/10.1038/nri1837>
- [10] CHEN, L. und FLIES, D. B.: Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. In: *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013), 227–42. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3405>
- [11] COLLIN, M. und EHLERS, M.: The carbohydrate switch between pathogenic and immunosuppressive antigen-specific antibodies. In: *Exp. Dermatol.* 22 (2013), 511–4. <http://dx.doi.org/10.1111/exd.12171>
- [12] CORDING, S.; WAHL, B.; KULKARNI, D.; CHOPRA, H.; PEZOLDT, J.; BUETTNER, M.; DUMMER, A.; HADIS, U.; HEIMESAAT, M.; BERESWILL, S.; FALK, C.; BODE, U.; HAMMANN, A.; FLEISSNER, D.; HUEHN, J. und PABST, O.: The intestinal micro-environment imprints stromal cells to promote efficient Treg induction in gut-draining lymph nodes. In: *Mucosal Immunol.* 7 (2014), 359–68. <http://dx.doi.org/10.1038/mi.2013.54>
- [13] CORTHAY, A.: How do regulatory T cells work? In: *Scand. J. Immunol.* 70 (2009), 326–36. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3083.2009.02308.x>
- [14] CROTTY, S.: Follicular helper CD4 T cells (TFH). In: *Annu. Rev. Immunol.* 29 (2011), 621–63. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-immunol-031210-101400>
- [15] DEBRÉ, M.; GRISCELLI, C.; BONNET, M.-C.; CAROSELLA, E.; PHILIPPE, N.; REINERT, P.; VILMER, E.; KAPLAN, C.; FRIDMAN, W. und TEILLAUD, J.-L.: Infusion of Fc γ fragments for treatment of children with acute immune thrombocytopenic purpura. In: *Lancet* 342 (1993), 945–949. [http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92000-J](http://dx.doi.org/10.1016/0140-6736(93)92000-J)
- [16] EPHREM, A.; CHAMAT, S.; MIQUEL, C.; FISSON, S.; MOUTHON, L.; CALIGIURI, G.; DELIGNAT, S.; ELLURU, S.; BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; COHEN, J. L.; SALOMON, B. L.; KAZATCHKINE, M. D.; KAVERI, S. V. und MISRA, N.: Expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells by intravenous immunoglobulin: a critical factor in

- controlling experimental autoimmune encephalomyelitis. In: *Blood* 111 (2008), 715–22. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2007-03-079947>
- [17] GELFAND, E. W.: Intravenous immune globulin in autoimmune and inflammatory diseases. In: *N. Engl. J. Med.* 367 (2012), 2015–25. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMra1009433>
- [18] HESS, C.; WINKLER, A.; LORENZ, A. K.; HOLECSKA, V.; BLANCHARD, V.; EIGLMEIER, S.; SCHOEN, A.-L.; BITTERLING, J.; STOEHR, A. D.; PETZOLD, D.; SCHOMMARTZ, T.; MERTES, M. M. M.; SCHOEN, C. T.; TIBURZY, B.; HERRMANN, A.; KÖHL, J.; MANZ, R. A.; MADAIO, M. P.; BERGER, M.; WARDEMANN, H. und EHLERS, M.: T cell-independent B cell activation induces immunosuppressive sialylated IgG antibodies. In: *J. Clin. Invest.* 123 (2013), 3788–96. <http://dx.doi.org/10.1172/JCI65938>
- [19] HIRABAYASHI, Y.; TAKAHASHI, Y.; XU, Y.; AKANE, K.; VILLALOBOS, I. B.; OKUNO, Y.; HASEGAWA, S.; MURAMATSU, H.; HAMA, A.; KATO, T. und KOJIMA, S.: Lack of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells is associated with resistance to intravenous immunoglobulin therapy in patients with Kawasaki disease. In: *Eur. J. Pediatr.* 172 (2013), 833–7. <http://dx.doi.org/10.1007/s00431-013-1937-3>
- [20] HOOPER, L. V. und MACPHERSON, A. J.: Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. In: *Nat. Rev. Immunol.* 10 (2010), 159–69. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2710>
- [21] IMBACH, P.; BARANDUN, S.; D'APUZZO, V.; BAUMGARTNER, C.; HIRT, A.; MORELL, A.; ROSSI, E.; SCHÖNI, M.; VEST, M. und WAGNER, H. P.: High-dose intravenous gammaglobulin for idiopathic thrombocytopenic purpura in childhood. In: *Lancet* 1 (1981), 1228–31. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6112565>
- [22] JANEWAY, C. a. und MEDZHITOV, R.: Innate immune recognition. In: *Annu. Rev. Immunol.* 20 (2002), 197–216. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- [23] JORDAN, S. C.; VO, a. a.; PENG, A.; TOYODA, M. und TYAN, D.: Intravenous gamma-globulin (IVIG): a novel approach to improve transplant rates and outcomes in highly HLA-sensitized patients. In: *Am. J. Transplant* 6 (2006), 459–66. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-6143.2005.01214.x>

- [24] KANEKO, Y.; NIMMERJAHN, F. und RAVETCH, J. V.: Anti-inflammatory activity of immunoglobulin G resulting from Fc sialylation. In: *Science* 313 (2006), 670–3. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1129594>
- [25] KARSTEN, C. M.; PANDEY, M. K.; FIGGE, J.; KILCHENSTEIN, R.; TAYLOR, P. R.; ROSAS, M.; McDONALD, J. U.; ORR, S. J.; BERGER, M.; PETZOLD, D.; BLANCHARD, V.; WINKLER, A.; HESS, C.; REID, D. M.; MAJOU, I. V.; STRAIT, R. T.; HARRIS, N. L.; KÖHL, G.; WEX, E.; LUDWIG, R.; ZILLIKENS, D.; NIMMERJAHN, F.; FINKELMAN, F. D.; BROWN, G. D.; EHLERS, M. und KÖHL, J.: Anti-inflammatory activity of IgG1 mediated by Fc galactosylation and association of Fc γ RIIB and dectin-1. In: *Nat. Med.* 18 (2012), 1401–6. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2862>
- [26] LEONG, H.; STACHNIK, J.; BONK, M. E. und MATUSZEWSKI, K. A.: Unlabeled uses of intravenous immune globulin. In: *Am. J. Health. Syst. Pharm.* 65 (2008), 1815–24. <http://dx.doi.org/10.2146/ajhp070582>
- [27] LEONTYEV, D.; KATSMAN, Y. und BRANCH, D. R.: Mouse background and IVIG dosage are critical in establishing the role of inhibitory Fc γ receptor for the amelioration of experimental ITP. In: *Blood* 119 (2012), 5261–4. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2012-03-415695>
- [28] LIU, K. und NUSSENZWEIG, M. C.: Origin and development of dendritic cells. In: *Immunol. Rev.* 234 (2010), 45–54. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0105-2896.2009.00879.x>
- [29] LUX, A.; YU, X.; SCANLAN, C. N. und NIMMERJAHN, F.: Impact of immune complex size and glycosylation on IgG binding to human Fc γ Rs. In: *J. Immunol.* 190 (2013), 4315–23. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1200501>
- [30] MALHOTRA, R.; WORMALD, M. und RUDD, P.: Glycosylation changes of IgG associated with rheumatoid arthritis can activate complement via the mannose-binding protein. In: *Nat. Med.* 1 (1995), 237–243. <http://dx.doi.org/10.1038/nm0395-237>
- [31] MASSOUD, A. H.; GUAY, J.; SHALABY, K. H.; BJUR, E.; ABLONA, A.; CHAN, D.; NOUHI, Y.; MCCUSKER, C. T.; MOURAD, M. W.; PICCIRILLO, C. A. und MAZER, B. D.: Intravenous immunoglobulin attenuates airway inflammation through induction of forkhead box protein 3-positive regulatory T cells. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012), 1656–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.050>

- [32] MASSOUD, A. H.; YONA, M.; XUE, D.; CHOUIALI, F.; ALTURAIHI, H.; ABLONA, A.; MOURAD, W.; PICCIRILLO, C. A. und MAZER, B. D.: Dendritic cell immunoreceptor: a novel receptor for intravenous immunoglobulin mediates induction of regulatory T cells. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 133 (2014), 853–63. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.09.029>
- [33] MEDZHITOV, R.: Toll-like receptors and innate immunity. In: *Nat. Rev. Immunol.* 1 (2001), 135–45. <http://dx.doi.org/10.1038/35100529>
- [34] MESTAS, J. und HUGHES, C. C. W.: Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology. In: *J. Immunol.* 172 (2004), 2731–2738. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.172.5.2731>
- [35] MILLS, D. M. und CAMBIER, J. C.: B lymphocyte activation during cognate interactions with CD4+ T lymphocytes: molecular dynamics and immunologic consequences. In: *Semin. Immunol.* 15 (2003), 325–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2003.09.004>
- [36] MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. und JANEWAY, C.; SCHANCK, D. (Hrsg.) und SCOBIE, J. (Hrsg.): *Immunobiology*. 37–126. 8. Auflage. New York : Garland Science, 2012
- [37] MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. und JANEWAY, C.; SCHANCK, D. (Hrsg.) und SCOBIE, J. (Hrsg.): *Immunobiology*. 335–507. 8. Auflage. New York : Garland Science, 2012
- [38] NIMMERJAHN, F. und RAVETCH, J. V.: Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. In: *Science* 310 (2005), 1510–2. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1118948>
- [39] NIMMERJAHN, F. und RAVETCH, J. V.: Fcγ receptors: old friends and new family members. In: *Immunity* 24 (2006), 19–28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2005.11.010>
- [40] NIMMERJAHN, F. und RAVETCH, J. V.: Anti-inflammatory actions of intravenous immunoglobulin. In: *Annu. Rev. Immunol.* 26 (2008), 513–33. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090232>

- [41] NIMMERJAHN, F. und RAVETCH, J. V.: Fcγ receptors as regulators of immune responses. In: *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008), 34–47. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2206>
- [42] OEFNER, C. M.; WINKLER, A.; HESS, C.; LORENZ, A. K.; HOLECSKA, V.; HUXDORF, M.; SCHOMMARTZ, T.; PETZOLD, D.; BITTERLING, J.; SCHOEN, A.-L.; STOEHR, A. D.; VU VAN, D.; DARCAN-NIKOLAISEN, Y.; BLANCHARD, V.; SCHMUDDE, I.; LAUMONNIER, Y.; STRÖVER, H. a.; HEGAZY, A. N.; EIGLMEIER, S.; SCHOEN, C. T.; MERTES, M. M. M.; LODDENKEMPER, C.; LÖHNING, M.; KÖNIG, P.; PETERSEN, A.; LUGER, E. O.; COLLIN, M.; KÖHL, J.; HUTLOFF, A.; HAMELMANN, E.; BERGER, M.; WARDEMANN, H. und EHLERS, M.: Tolerance induction with T cell-dependent protein antigens induces regulatory sialylated IgGs. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 129 (2012), 1647–55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2012.02.037>
- [43] PINCETIC, A.; BOURNAZOS, S.; DI LILLO, D. J.; MAAMARY, J.; WANG, T. T.; DAHAN, R.; FIEBIGER, B.-M. und RAVETCH, J. V.: Type I and type II Fc receptors regulate innate and adaptive immunity. In: *Nat. Immunol.* 15 (2014), 707–716. <http://dx.doi.org/10.1038/ni.2939>
- [44] PRINS, C.; GELFAND, E. W. und FRENCH, L. E.: Intravenous immunoglobulin: properties, mode of action and practical use in dermatology. In: *Acta Derm. Venereol.* 87 (2007), 206–18. <http://dx.doi.org/10.2340/00015555-0249>
- [45] ROEDERER, M.: Interpretation of cellular proliferation data: avoid the panglossian. In: *Cytometry. A* 79 (2011), 95–101. <http://dx.doi.org/10.1002/cyto.a.21010>
- [46] ROMBOUTS, Y.; EWING, E.; STADT, L. a. d.; SELMAN, M. H. J.; TROUW, L. a.; DE-ELDER, A. M.; HUIZINGA, T. W. J.; WUHRER, M.; SCHAARDENBURG, D. van; TOES, R. E. M. und SCHERER, H. U.: Anti-citrullinated protein antibodies acquire a pro-inflammatory Fc glycosylation phenotype prior to the onset of rheumatoid arthritis. In: *Ann. Rheum. Dis.* (2013), Online Vorausveröffentlichung. <http://dx.doi.org/10.1136/annrheumdis-2013-203565>
- [47] SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T. und ONO, M.: Regulatory T cells and immune tolerance. In: *Cell* 133 (2008), 775–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2008.05.009>

- [48] SAMUELSSON, A.; TOWERS, T. L. und RAVETCH, J. V.: Anti-inflammatory activity of IVIG mediated through the inhibitory Fc receptor. In: *Science* 291 (2001), 484–6. <http://dx.doi.org/10.1126/science.291.5503.484>
- [49] SCHUURHUIS, D. H.; MONTFOORT, N. van; IOAN-FACSINAY, a.; JIAWAN, R.; CAMPS, M.; NOUTA, J.; MELIEF, C. J. M.; VERBEEK, J. S. und OSSENDORP, F.: Immune Complex-Loaded Dendritic Cells Are Superior to Soluble Immune Complexes as Antitumor Vaccine. In: *J. Immunol.* 176 (2006), 4573–4580. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.176.8.4573>
- [50] SCHWAB, I.; BIBURGER, M.; KRÖNKE, G.; SCHEFF, G. und NIMMERJAHN, F.: IVIg-mediated amelioration of ITP in mice is dependent on sialic acid and SIGNR1. In: *Eur. J. Immunol.* 42 (2012), 826–30. <http://dx.doi.org/10.1002/eji.201142260>
- [51] SCHWAB, I. und NIMMERJAHN, F.: Intravenous immunoglobulin therapy: how does IgG modulate the immune system? In: *Nat. Rev. Immunol.* 13 (2013), 176–89. <http://dx.doi.org/10.1038/nri3401>
- [52] SHADE, K.-T. und ANTHONY, R.: Antibody Glycosylation and Inflammation. In: *Antibodies* 2 (2013), 392–414. <http://dx.doi.org/10.3390/antib2030392>
- [53] SHEN, P.; ROCH, T.; LAMPROPOULOU, V.; O’CONNOR, R. a.; STERVBO, U.; HILGENBERG, E.; RIES, S.; DANG, V. D.; JAIMES, Y.; DARIDON, C.; LI, R.; JOUNEAU, L.; BOUDINOT, P.; WILANTRI, S.; SAKWA, I.; MIYAZAKI, Y.; LEECH, M. D.; MCPHERSON, R. C.; WIRTZ, S.; NEURATH, M.; HOEHLIG, K.; MEINL, E.; GRÜTZKAU, A.; GRÜN, J. R.; HORN, K.; KÜHL, A. a.; DÖRNER, T.; BAR-OR, A.; KAUFMANN, S. H. E.; ANDERTON, S. M. und FILLATREAU, S.: IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. In: *Nature* 507 (2014), 366–70. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12979>
- [54] SHIBAKI, A. und KATZ, S. I.: Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund’s adjuvant. In: *Exp. Dermatol.* 11 (2002), 126–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11994139>
- [55] SHINZAKI, S.; IJIMA, H.; NAKAGAWA, T.; EGAWA, S.; NAKAJIMA, S.; ISHII, S.; IRIE, T.; KAKIUCHI, Y.; NISHIDA, T.; YASUMARU, M.; KANTO, T.; TSUJII, M.; TSUJI, S.; MIZUSHIMA, T.; YOSHIHARA, H.; KONDO, A.; MIYOSHI, E. und HAYASHI, N.: IgG oligosaccharide alterations are a novel diagnostic marker for disease activity and the

- clinical course of inflammatory bowel disease. In: *Am. J. Gastroenterol.* 103 (2008), 1173–81. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01699.x>
- [56] SILVA, M. T.: When two is better than one: macrophages and neutrophils work in concert in innate immunity as complementary and cooperative partners of a myeloid phagocyte system. In: *J. Leukoc. Biol.* 87 (2009), 93–106. <http://dx.doi.org/10.1189/jlbb.0809549>
- [57] SIRAGAM, V.; CROW, A. R.; BRINC, D.; SONG, S.; FREEDMAN, J. und LAZARUS, A. H.: Intravenous immunoglobulin ameliorates ITP via activating Fc gamma receptors on dendritic cells. In: *Nat. Med.* 12 (2006), 688–92. <http://dx.doi.org/10.1038/nm1416>
- [58] STONE, K. D.; PRUSSIN, C. und METCALFE, D. D.: IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. In: *J. Allergy Clin. Immunol.* 125 (2010), 73–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.11.017>
- [59] TENG, G. und PAPAVALIOU, F. N.: Immunoglobulin somatic hypermutation. In: *Annu. Rev. Genet.* 41 (2007), 107–20. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130340>
- [60] TUBO, N. J.; PAGÁN, A. J.; TAYLOR, J. J.; NELSON, R. W.; LINEHAN, J. L.; ERTELT, J. M.; HUSEBY, E. S.; WAY, S. S. und JENKINS, M. K.: Single naive CD4+ T cells from a diverse repertoire produce different effector cell types during infection. In: *Cell* 153 (2013), 785–96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.04.007>
- [61] VIDARSSON, G.; DEKKERS, G. und RISPENS, T.: IgG Subclasses and Allotypes: From Structure to Effector Functions. In: *Front. Immunol.* 5 (2014), 1–17. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2014.00520>
- [62] WINKLER, A.; BERGER, M. und EHLERS, M.: Anti-rhesus D prophylaxis in pregnant women is based on sialylated IgG antibodies. In: *F1000Research* 2 (2013), 169. <http://dx.doi.org/10.12688/f1000research.2-169.v1>
- [63] YADA, A.; EBIHARA, S.; MATSUMURA, K.; ENDO, S.; MAEDA, T.; NAKAMURA, A.; AKIYAMA, K.; AIBA, S. und TAKAI, T.: Accelerated antigen presentation and elicitation of humoral response in vivo by Fc γ RIIB- and Fc γ RI/III-mediated immune complex uptake. In: *Cell. Immunol.* 225 (2003), 21–32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2003.09.008>

-
- [64] ZHANG, S.; ZHANG, H. und ZHAO, J.: The role of CD4 T cell help for CD8 CTL activation. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 384 (2009), 405–8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.04.134>

Anhang A

Materialien

TABELLE A.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Analysenwaage	Sartorius (Göttingen)
CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
CO ₂ Inkubator	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Durchflusszytometer BD LSR II	Becton Dickinson (Heidelberg)
Einkanal Pipetten	Eppendorf (Hamburg)
Fluss-Sortierer BD FACSAria III	Becton Dickinson (Heidelberg)
Inverses Mikroskop	Wilovert Standard Helmut Hund (Wetzlar)
Mehrkanal Pipetten	VWR (Radnor, PA, USA)
Mikrozentrifuge 5424R	Eppendorf (Hamburg)
Multikanal Pipetten	VWR International (Darmstadt)
Neubauer Zählkammer	Brand (Wertheim)
Pipettierhilfe Pipetboy	INTEGRA Biosciences (Fernwald)
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Plattformschüttler Titramax 100	Heidolph (Schwabach)
Reagenzglasschüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries (Bohemia, NY, USA)
Reinstwassersystem Barnstead NanoPure	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)

Schüttelinkubator Ecotron	Infors HT (Bottmingen, Schweiz)
Spektrophotometer NanoDrop-1000	Peqlab (Erlangen)
Sterile Werkbank	NuAire (Plymouth, MN, USA)
Thermomixer Compact	Eppendorf (Hamburg)
Tischzentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf (Hamburg)
UV-Dokumentationstisch ImageQuant 350	GE Healthcare (Chalfont St. Giles, UK)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge Avanti J26XP	Beckman Coulter (Brea, CA, USA)

TABELLE A.2: Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
24 Well Suspensions Zellkulturplatten	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
96 Well Microplate Non binding v-shaped	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Durchflusszytometer Röhren (5 ml)	Sarstedt (Sarstedt)
Mikroskop Objektträger Superfrost	Menzel Gläser (Braunschweig)
Petrischalen	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Pipettenspitzen mit oder ohne Filter (10 μ l, 100 μ l, 200 μ l, 1000 μ l)	Sarstedt (Sarstedt)
Polypropylen Röhrchen (15ml, 50 ml)	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Reagiergefäße (1,5 ml)	Sarstedt (Sarstedt)
Stabpipetten (5ml, 10ml, 25ml)	Sarstedt (Sarstedt)
Whatman Filter 0.45 μ m	GE Healthcare (Chalfort St Giles, Großbritannien)
Zellkulturflaschen (25 cm ² , 50 cm ² , 175 cm ²)	Greiner Bio-one (Kremsmünster, Österreich)
Zellsiebe Falcon Cell Strainer 70 μ m	Becton Dickinson (Heidelberg)

TABELLE A.3: Reagenzien

Reagenz	Hersteller
2-Mercaptoethanol (2-ME)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dinatriumhydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Ethanol	Th. Geyer (Renningen)
Fetales Kälberserum (FCS)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Freund adjuvant, complete (CFA; 1 mg mycobacterium/ml)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Freund adjuvant, incomplete	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Hitze-inaktiviertes Mycobacterium tuberculosis H37RA	DIFCO Laboratories (Detroit, MI, USA)
HEPES-Puffer	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Intratect 50 g/l-Infusionslösung (IVIG)	Biotest AG (Dreieich)
Ionomycin from Streptomyces conglobatus	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Kaliumchlorid (KCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Calbiochem (Darmstadt)
Monensin (1000X)	eBioscience (Frankfurt am Main)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe)
Ovalbimun Grade V (OVA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Penicillin Streptomycin 10,000 U/ml (Pen-Strep)	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
RPMI 1640	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
TNP(5)-OVA (2,4,6-Trinitrophenol-Ovalbumin)	Biosearch Technologies (Petaluma, CA, USA)

TABELLE A.4: Benutzte *Kits*

Methode	Kit	Hersteller
Proliferations-verfolgung	CellTrace Violet Cell Proliferation Kit, for flow cytometry	Thermo Fisher Scientific (Schwerte)
Intrazelluläre Färbung	Foxp3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience (Frankfurt am Main)
Aufreinigung CD4 ⁺ T-Zellen	CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach)

TABELLE A.5: Puffer, Medien und Lösungen

Name	Zusammensetzung
10x PBS (phosphatgepufferte Salzlösung), pH 7,4	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ ad 900 ml mit Reinstwasser auffüllen pH 7,4 einstellen ad 1000 ml mit Reinstwasser auffüllen
T-Zell-Medium	RPMI 1640 10 %-vol FCS 100 U/ml PenStrep 10mM HEPES 55uM 2-Mercaptoethanol 2mM Glutamin

TABELLE A.6: Antikörper

Antikörper	Fluoreszenz- konjugate	Konzentration FACS	Klon	Hersteller
anti-rat/mouse CD90.1	AF488	0,83 μ g/ml	OX-7	Biolegend(Fell)
anti-rat/mouse Foxp3	APC	1 μ g/ml	FJK-16s	eBioscience (Frankfurt am Main)
anti-mouse CD154	APC	1 μ g/ml	MR1	Biolegend(Fell)
anti mouse IL-17A	BV605	1 μ g/ml	TC11- 18H10	Becton Dickinson (Hei- delberg)
anti-mouse CD4	BV711	0,8 μ g/ml	RM4-5	Biolegend(Fell)
anti-mouse TCR V β 5.1, 5.2	PE	1 μ g/ml	MR9-4	Biolegend(Fell)
anti-mouse CD154	PE	1 μ g/ml	MR1	Biolegend(Fell)
anti-mouse ROR γ t	PE-CF594	0,6 μ g/ml	Q31-378	Becton Dickinson (Hei- delberg)
anti-mouse IFN-g	PE-CF594	0,6 μ g/ml	XMG1.2	Becton Dickinson (Hei- delberg)
anti-mouse CD137	PE-Vio770	1 μ g/ml	17B5- 1H1	Miltenyi Biotec (Ber- gisch Gladbach)
anti-TNP IgG1 nativ1: 12145-098	-		H5	Labor M. Ehlers (Lü- beck)
anti-TNP IgG1 nativ2: 12145-130	-		H5	Labor M. Ehlers (Lü- beck)
anti-TNP IgG1 sialy- liert: 12145-107	-		H5	Labor M. Ehlers (Lü- beck)

BV= Brilliant Violet, AF= Alexa Fluor, PE =Phycoerythrin, APC = Allophycocyanin

TABELLE A.7: Primer für die PCR der $Fcgr2b^{-/-}$ Mäuse

Ziel	Primer
Fcgr2b wt forward	5' atcttccaaaggctgtggc
Fcgr2b ko forward	5' ctctgctttacggtatgcc
Fcgr2b wt & ko reverse	5' ttgactgtggccttaaactgtag

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Johann RAHMÖLLER, erkläre an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel 'Wirkung von sialylierten IgG Antikörpern auf Dendritische Zellen und die T-Zell Differenzierung' selbst verfasst habe und die präsentierte Arbeit von mir selbst durchgeführt wurde. Ich versichere weiter, dass:

- die Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde,
- keine anderen als die in der Arbeit genannten personellen, technischen und sachlichen Hilfen oder Hilfsmittel benutzt wurden,
- ich die Dissertation in der gegenwärtigen oder einer anderen Fassung an keiner anderen Fakultät eingereicht und mich noch keinem anderen Promotionsverfahren unterzogen habe
- und dass alle Stellen, die ich wörtlich oder dem Sinne nach aus anderen Veröffentlichungen entnommen habe, kenntlich gemacht worden sind.

Lübeck, den 14. Mai 2018

(Johann RAHMÖLLER)

Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich allen herzlich danken, die mich bei der Fertigstellung der Dissertation auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank dem ISEF und seinem Direktor Herrn Prof. Dr. med. Köhl dafür, dass es mir möglich war, dort meine Dissertation anzufertigen. Ganz besonders danken möchte ich auch meinem Betreuer und Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Marc Ehlers, der mich, immer ansprechbar, während der gesamten Zeit begleitet hat. Auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rudolf Manz danke ich, dass er ein stets verlässlicher Ansprechpartner war. Weiter möchte ich der gesamten AG Ehlers für ihre Unterstützung danken: Yannick Bartsch, Josephine Bitterling, Alexandra Epp, Simon Eschweiler, Juliane Hobusch und Gina-Marie Lilienthal. Danke auch den beiden anderen Arbeitsgruppen des ISEF, ganz besonders Kathleen Kurwahn, und Tillman Vollbrandt für die hilfreichen Tipps, und die sonstige Unterstützung.

Klaus und Margitta Rahmöller, die mir das Studium ermöglichten, Steffen und Henrik und Lisa, die mir stets mit Zuspruch und Unterstützung zur Seite standen, und Kristin, die da war, möchte ich von Herzen danken.

Und schlussendlich ein Dank noch an alle, die mir durch Kritik oder Aufmunterung und nicht zuletzt fleißiges Korrekturlesen geholfen haben.