

**Zur Rolle der Apoptose in der Induktion
von Immuntoleranz: Beispiel Nickel**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Michael Nowak
aus Solingen

Düsseldorf
2005

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ernst Gleichmann
2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Wunderlich

Tag der mündlichen Prüfung: 29. April 2004

Inhalt

I.	Verzeichnis der Tabellen.....	5
II.	Verzeichnis der Abbildungen.....	5
III.	Häufig verwendete Abkürzungen.....	7
IV.	Terminologie der verwendeten Mäuse.....	8
1.	Einleitung.....	9
1.1.	Überempfindlichkeitsreaktionen.....	9
1.2.	Hapten-ausgelöste DTH-Reaktionen.....	10
1.2.1.	Induktionsphase.....	10
1.2.2.	Effektorphase.....	11
1.2.3.	Nickelkontaktdermatitis.....	11
1.3.	Orale Toleranz.....	12
1.3.1.	Dendritische Zellen.....	12
1.3.2.	NKT-Zellen.....	14
1.3.3.	B-Zellen.....	16
1.3.4.	Apoptose.....	18
1.4.	Oral induzierte Toleranz gegen Nickel.....	20
1.5.	Fragestellung.....	23
2.	Material und Methoden.....	24
2.1.	Material.....	24
2.1.1.	Geräte.....	24
2.1.2.	Software.....	24
2.1.3.	Chemikalien.....	25
2.1.4.	Mäuse.....	30
2.2.	Methoden.....	30
2.2.1.	Zellbiologische Methoden.....	30
2.2.2.	Genexpressionsanalysen.....	36
2.2.3.	Proteinexpressionsanalysen.....	37
2.2.4.	Tierexperimentelle Methoden.....	41
2.2.5.	Statistische Auswertung.....	42
3.	Ergebnisse.....	43
3.1.	Veränderungen der Milz durch Nickel.....	43
3.1.1.	Organgewicht und B-Zellpopulation.....	43
3.1.2.	Phänotypische und genotypische Veränderungen von B-Zellen und dendritischen	
3.2.	Mechanismen der Toleranzinduktion durch B-Zellen.....	47
3.2.1.	Fas- und FasLigand-Abhängigkeit der oralen Toleranzinduktion.....	47
3.2.2.	Tolerogene B-Zellen müssen funktionelles Fas exprimieren.....	48

3.3.	Mechanismen der Fas-vermittelten Tolerogenität von B-Zellen.....	49
3.3.1.	Apoptose tolerogener B-Zellen.....	50
3.3.2.	Phagozytose apoptotischer Ni ^{high} -Zellen durch dendritische Zellen.....	53
3.3.3.	Führt die Phagozytose apoptotischer Zellen zur Bildung tolerogener DZ.....	55
3.3.4.	Nickelkonzentrationen in Blut, Organen und Ausscheidungen.....	57
3.3.5.	Nickelkonzentrationen der B-Zellen oral toleranter Mäuse.....	58
3.3.6.	Die Induktion von Apoptose in Ni ^{low} -B-Zellen führt zu deren Tolerogenität.....	59
3.4.	Beteiligung von iNKT-Zellen an der Toleranzübertragung durch B-Zellen.....	61
3.4.1.	FasLigand ⁺ iNKT-Zellen in der Toleranzinduktion durch B-Zellen.....	61
3.4.2.	Migration FasLigand ⁺ NKT-Zellen nach Sensibilisierung.....	63
3.4.3.	Toleranzinduktion durch apoptotische Ni ^{high} -B-Zellen ohne iNKT-Zellen.....	65
3.5.	Proteomanalyse von Ni ^{high} - und Ni ^{low} -B-Zellen.....	66
4.	Diskussion	71
4.1.	Veränderungen des B-Zellphänotyps- und -genotyps.....	71
4.2.	Durch welche Mechanismen senkt Nickel die Schwelle zur Apoptoseinduktion ?	74
4.2.1.	Genotoxizität und DNA-Reparatur.....	74
4.2.2.	Die Rolle von p53.....	75
4.2.3.	Der Einfluss der Immunisierung.....	76
4.3.	Die Rolle der Apoptose bei der Toleranzinduktion.....	77
4.4.	Voraussetzungen für die Toleranzübertragung durch B-Zellen.....	78
4.5.	Die Rolle dendritischer Zellen.....	80
4.5.1.	Phänotyp dendritischer Zellen.....	80
4.5.2.	Phagozytose.....	81
4.5.3.	Tolerogene dendritische Zellen.....	82
4.6.	Die Rolle von iNKT-Zellen für die Induktion der Toleranz durch B-Zellen.....	83
4.6.1.	Regulatorische, zytotoxische iNKT-Zellen in der Nickeltoleranz.....	83
4.6.2.	Migration von NKT-Zellen und Regulation der FasLigand-Expression	85
4.6.3.	Wechselwirkungen von iNKT-Zellen und B-Zellen.....	86
4.7.	Sind die Mechanismen der Toleranzinduktion für Nickel allgemeingültig ?.....	87
4.8.	Modell einer von B-Zellen ausgehenden Toleranzinduktion gegen Nickel.....	89
5.	Ausblick	91
6.	Zusammenfassung	92
7.	Literaturverzeichnis	93
8.	Anhang	108

I. Verzeichnis der Tabellen

Tab.1	Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotidprimer.....	28
Tab.2	Verwendete monoklonale Antikörper (mAk).....	29
Tab.3	Reverse-Transkriptase Reaktionsansatz.....	36
Tab.4	Real-Time-PCR Reaktionsansatz.....	37
Tab.5	Unterschiedlich exprimierte Proteine.....	70

II. Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.3.4.	Apoptoseinduktion durch FasLigand und andere Stimuli.....	18
Abb. 1.4.	Infektiöse Toleranz.....	21
Abb. 2.2.1.	Experimentelles Schema zur Isolierung dendritischer Zellen der Milz.....	33
Abb. 2.2.3.	Experimentelles Design für die Proteinexpressionsanalysen.....	37
Abb. 2.2.4.	Experimentelle Protokolle von Maus-Ohrschwellungstest und Adoptivtransfer.....	42
Abb. 3.1.1	Reduzierte Milz und Veränderungen der B-Zellfraktion durch Nickel.....	43
Abb. 3.1.2.	Phänotyp und Genotyp von B-Zellen und DZ nach oraler Toleranzinduktion.....	44
Abb. 3.1.3	bcl-2 und bcl _{xl} mRNA-Expression.....	46
Abb. 3.2.1.	Die Induktion der Nickeltoleranz wird durch Fas und FasLigand vermittelt.....	47
Abb. 3.2.2.	Tolerogene B-Zellen müssen funktionelles Fas exprimieren.....	48
Abb. 3.3.1.1.	Apoptose von Ni ^{high} -B-Zellen nach Adoptivtransfer und Immunisierung.....	51
Abb. 3.3.1.2.	Immunisierung mit NiCl ₂ /H ₂ O ₂ reguliert bax in Ni ^{high} -B-Zellen.....	52
Abb. 3.3.1.3.	Regulation der SerpinA3G-Expression durch NiCl ₂ /H ₂ O ₂	53
Abb. 3.3.2.1.	Werden apoptotische Ni ^{high} -Milzzellen durch DZ phagozytiert ?.....	54
Abb. 3.3.2.2.	Nachweis der Aufnahme apoptotischer Ni ^{high} -Zellen durch DZ der Milz.	55
Abb. 3.3.3.	Toleranzinduktion durch dendritische Zellen.....	56
Abb. 3.3.4.	Nickelkonzentrationen in Blut, Organen und Ausscheidungen.....	57
Abb. 3.3.5.	B-Zellen nehmen <i>in vivo</i> Nickel auf.....	58
Abb. 3.3.6.1	Annexin-V Profile von Milzzellen nach γ -Bestrahlung.....	59
Abb. 3.3.6.2.	Toleranzinduktion durch <i>ex vivo</i> bestrahlte Ni ^{low} -B-Zellen.....	60
Abb. 3.4.1.1.	Sind iNKT-Zellen für die B-Zellapoptose verantwortlich ?.....	61

Abb. 3.4.1.2.	Experimentelles Design des Ko-Transferassay.....	62
Abb. 3.4.1.3.	FasLigand ⁺ iNKT-Zellen sind für die Toleranzinduktion nötig.....	62
Abb. 3.4.2.	Migration FasLigand ⁺ NKT-Zellen in Milz und Lymphknoten nach Immunisierung.....	64
Abb. 3.4.3.	Apoptoseinduktion in Ni ^{high} -B-Zellen ersetzt iNKT-Zellen des Empfängers.	65
Abb. 3.5.1.	Proteomanalyse von Ni ^{low} - und Ni ^{high} -B-Zellen (I).....	67
Abb. 3.5.2.	Proteomanalyse von Ni ^{low} - und Ni ^{high} -B-Zellen (II).....	68
Abb. 3.5.3.	Proteinexpression von Ni ^{high} - und Ni ^{low} -B-Zellen nach Immunisierung.....	69
Abb. 4.2.1.	Arbeitshypothese (I): Dysregulation von Apoptosesignalen durch Nickel.....	75
Abb. 4.4.	Arbeitshypothese (II): Senkung der Schwelle zur Apoptoseinduktion.....	80
Abb. 4.6.	Modell der Interaktionen von iNKT-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen für die Induktion der Nickeltoleranz.....	88

III. Häufig verwendete Abkürzungen

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
α -GalCer	alpha-Galactosylceramid
ACT	Ammoniumchlorid-TRIS
APC	Allyophycocyanin
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CFSE	5-(und 6-)-Carboxyfluoresceindiacetate, Succinimidylester
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propansulfonat
DZ	Dendritische Zelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNFB	2,4-Dinitrofluorobenzol
DTH	Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ (delayed-type hypersensitivity reaction)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FACS	Fluoreszenzdurchflusszytometer (fluorescence-activated cell sorter)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	Vorwärtsstreulicht (forward scatter)
FKS	Fötale Kalbserum
i.d.	intradermal
IL	Interleukin
iNKT	invariante natürliche Killer-T-Zelle
i.v.	intravenös
mAk	monoklonaler Antikörper
MFI	Mean fluorescent index
Ni	Nickel
NKT	Natürliche Killer-Zelle
NPG	Newport Green
PAA	Polyacrylamid
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridinin-Chlorophyll-Protein
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PS	Phosphatidylserin
RT	Reverse-Transkriptase
RuBPS	Ruthenium-II-tris(BathoPhenanthroline)-diSulfonat
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SSC	Seitwärtsstreulicht (sideward scatter)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TZR	T-Zell-Rezeptor
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TNP	Trinitrophenol
Treg	Regulatorische T-Zelle
v/v	volume/volume, ml Volumen in 100 ml Gesamtvolumen
w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen

IV. Terminologie der verwendeten Mäuse

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Mäuse eingesetzt, die über das Trinkwasser und ihre Käfige unterschiedlichen Mengen Nickel ausgesetzt waren. Um eine klare Unterscheidung zu ermöglichen, werden folgende Bezeichnungen verwendet:

Ni^{low} Mäuse, die in konventionellen, das heisst mit Gitterdeckeln und Flaschenauslässen aus Nickel-haltigem Edelstahl ausgestatteten, Käfigen aufgezogen wurden.

Ni^{high} In konventionellen Käfigen aufgezogene Mäuse. Diese Tiere erhielten für 4-8 Wochen 10 mM NiCl₂ über das Trinkwasser.

Ni^{very low} Mäuse, welche unter Nickel-armen Bedingungen gezüchtet und gehalten wurden. Diese Tiere wurden in Kunststoffkäfigen gehalten, welche keine Metallkomponenten enthielten.

1. Einleitung

Die Unterscheidung zwischen „Selbst“ und „Fremd“ ist eine grundlegende Eigenschaft des Immunsystems. Immunreaktionen gegen körpereigene Strukturen oder harmlose fremde, das heisst keine Bedrohung darstellende, Substanzen stellen eine potentielle Gefahr für den Körper dar. Autoreaktive Lymphozyten, die körpereigene Strukturen als „fremd“ erkennen, werden durch unterschiedliche Mechanismen eliminiert oder inaktiviert. Werden autoreaktive T-Zellen nicht beseitigt oder inaktiviert, führt dies zu Autoimmunerkrankungen. Werden Immunreaktionen gegen harmlose Antigene aufgebaut, bezeichnet man diese als Überempfindlichkeitsreaktionen oder Allergien.

Neben der zentralen Toleranz, der Beseitigung potentiell autoreaktiver Lymphozyten während ihrer Entwicklung in Thymus und Knochenmark, besteht die Möglichkeit, diese Zellen auch später noch in der Peripherie zu kontrollieren. Dieser Vorgang wird als periphere Toleranz bezeichnet.

Das Verständnis der Immuntoleranz gegen bestimmte Antigene wie Nickel setzt die Kenntnis der Immunreaktion gegen dieses Antigen voraus. Daher werden im folgenden zunächst Überempfindlichkeitsreaktionen und hier insbesondere die Nickelkontaktdermatitis als eine solche Reaktion geschildert. Im weiteren Verlauf werden für die vorliegende Arbeit relevante und an der Toleranzinduktion beteiligte Zelltypen erläutert um schließlich Aspekte der Apoptose als einem vieldiskutierten Mechanismus der Toleranzinduktion zu schildern.

1.1. Überempfindlichkeitsreaktionen

Überempfindlichkeitsreaktionen sind starke Immunantworten gegen harmlose endogene oder exogene Antigene, die in diesem Zusammenhang als Allergene bezeichnet werden. Coombs und Gell charakterisierten vier Formen unterschiedlicher allergischer Reaktionen (Janeway, C. A., Immunobiology 1997):

Typ I- bis Typ III-Reaktionen sind humorale Immunantworten und werden durch Antikörper vermittelt. Die Ausschüttung Allergen-spezifischer Antikörper aktiviert Granulozyten, Makrophagen, NK-Zellen oder Mastzellen, die als Effektorzellen Mediatoren wie Histamin ausschütten. (Janeway, C. A., Immunobiology 1997; Pawankar *et al.* 2003).

Typ IV-Reaktionen oder Überempfindlichkeitsreaktionen vom verzögerten Typ (DTH, engl. *delayed-type hypersensitivity reaction*) werden durch Allergen-spezifische T-Effektorzellen

vermittelt (Janeway, C. A., Immunobiology 1997; Kimber *et al.* 2002). Diese DTH-Reaktionen können sowohl durch Autoantigene sowie Fremdanigene ausgelöst werden. Autoimmuner Diabetes mellitus, Multiple Sklerose oder Kontaktdermatitis sind klassische Beispiele für diese Immunreaktion (Janeway, C. A., Immunobiology 1997).

Da zu Beginn von Typ IV-Reaktionen lokal Zytokine produziert werden, und hierdurch Effektorzellen erst an den Ort der Immunantwort migrieren, zeigen Überempfindlichkeitsreaktionen dieses Typs im Gegensatz zu den Typen I-III eine verzögerte Kinetik.

1.2. Hapten-ausgelöste DTH-Reaktionen

Neben Autoantigenen können auch Fremdanigene DTH-Reaktionen auslösen. Chemisch reaktive Moleküle wie Nickel, welche zu klein sind um vom Immunsystem erkannt und präsentiert zu werden, können an Trägerproteine wie Serumalbumin binden und so eine erkennbare antigene Struktur bilden. Substanzen mit diesen Eigenschaften werden als Haptene bezeichnet. Wie bei allen Immunreaktionen kann bei DTH-Reaktionen zwischen einer Induktion- und einer Effektorphase unterschieden werden. Während der Induktionsphase kommt es zur Präsentation des Antigens durch antigenpräsentierende Zellen an T-Zellen, diese differenzieren daraufhin in T-Effektorzellen. Weitere Kontakte mit demselben Antigen führen in der nun ablaufenden Effektorphase zur raschen Aktivierung und Proliferation bereits gebildeter T-Effektorzellen sowie dem Einstrom in den Entzündungsherd.

1.2.1. Induktionsphase

Die Induktionsphase der DTH-Reaktion beginnt mit der Aufnahme des Haptens, welches auch als Allergen bezeichnet wird. Lipophile Haptene, wie Dinitrofluorbenzol (DNFB) können Haut-residierende antigenpräsentierende Langerhans-Zellen direkt penetrieren. Dort binden sie kovalent an zytoplasmatische Proteine, es werden sog. Neoantigene gebildet. Die Applikation von Haptenen führt zur Migration antigenpräsentierender Zellen (APZ) der Haut, wie dermale dendritische Zellen (DZ) oder Langerhans-Zellen über Lymphbahnen zu den nächstgelegenen Lymphknoten (Hill *et al.* 1990). Dort angekommen werden dann Neoantigene als Peptide auf MHC-I Molekülen präsentiert. Hydrophile Haptene wie Nickel binden präferentiell nicht-kovalent an extrazelluläre Proteine, was zur Präsentation dieser Neoantigene auf MHC-II Molekülen an T-Zellen führt.

Die Aktivierung von T-Zellen und Differenzierung dieser T-Zellen in Effektorzellen setzt dabei zwei von antigenpräsentierenden Zellen gelieferte Signale voraus: Die Erkennung von

MHC-Peptidkomplexen durch den T-Zellrezeptor der T-Zelle liefert das sogenannte Signal 1. Durch weitere Rezeptor-Ligandwechselwirkungen zwischen APZ und T-Zelle, die als Signal 2 bezeichnet werden wie bsp. CD40:CD40Ligand, werden der T-Zelle die für die Aktivierung nötigen kostimulatorischen Signale übermittelt. Diese führen in der Folge zur Aktivierung, Proliferation und Differenzierung der T-Zelle in Effektor-T-Zellen. Die Aktivierung von T-Zellen alleine durch Signal 1 führt dagegen zur Bildung sogenannter aneurer T-Zellen. Diese sind durch weitere Stimulation nicht weiter aktivierbar und führen stattdessen regulatorische Funktionen aus, indem sie Immunantworten supprimieren können (Lombardi *et al.* 1994).

Die Expression kostimulatorischer Moleküle kann durch Adjuvantien, das heißt die Reaktion auf ein Antigen verstärkende Substanzen, wie H₂O₂, bakterieller Zellbestandteile, oder allgemeiner sogenannter „*danger-Signale*“ induziert werden (Matzinger 1994). Im Lymphknoten angelangt, werden in MHC-I Moleküle eingebettete Peptide den CD8⁺ T-Zellen und MHC-II-eingebettete Peptide den CD4⁺ T-Zellen präsentiert.

1.2.2. Effektorphase

Nach erfolgter Sensibilisierung kann sich bei erneutem Kontakt mit demselben Antigen eine DTH-Reaktion entwickeln. Die Effektorphase der DTH-Reaktion ist die eigentliche durch Symptome wie wie Rötung, Juckreiz und Schwellung gekennzeichnete Phase der Überempfindlichkeitsreaktion (Pschyrembel Klinisches Wörterbuch) Antigen-spezifische Effektor-T-Zellen migrieren an den Ort der erneuten Antigenapplikation, meist der Haut, wo sie rasch aktiviert werden. Die Aktivierung von T-Effektorzellen ist mit der Ausschüttung inflammatorischer Zytokine verbunden, was zum unspezifischen Einstrom weiterer Zellen wie Granulozyten, Makrophagen, B-Zellen und T-Zellen an den Entzündungsherd führt. Dieser massive Einstrom führt schließlich zu den genannten Symptomen der DTH-Reaktion.

1.2.3. Nickelkontaktdermatitis

In industrialisierten Ländern ist Nickel mit 6 % der männlichen Bevölkerung und 10-15 % der weiblichen Bevölkerung die häufigste Ursache der allergischen Kontaktdermatitis, einer DTH-Reaktion (Hostynek 2002; Nielsen *et al.* 1993). Nickel kann aus Metallegierungen beispielsweise durch Hautschweiß herausgelöst werden. Demzufolge kommt es speziell an den schweißexponierten Körperstellen zur Ausbildung eines Ekzems.

Frühe Versuche, Tiermodelle der allergischen Kontaktdermatitis gegen Nickel durch Applikation von Nickelsalzen wie NiCl₂ oder NiSO₄ zu entwickeln waren wenig erfolgreich, d.h. es

mussten sehr hohe Konzentrationen eingesetzt werden (Ishii *et al.* 1993). Erst van Hoogstraten *et al.* gelang es Mäuse mit moderaten Nickelkonzentrationen und Freundschem Adjuvanz zu sensibilisieren, indem sie Mäuse zuvor für mehrere Generationen in Nickel-freien Käfigen züchteten (van Hoogstraten *et al.* 1993).

Einen anderen Ansatz verfolgten Artik *et al.*, indem sie Mäuse mit NiCl₂ gemeinsam mit dem Adjuvanz Wasserstoffperoxid (H₂O₂) oder dem Detergenz SDS intradermal injizierten (Artik *et al.* 1999). H₂O₂ ist ein endogener Entzündungsmediator, der auch in gereizter Haut durch Granulozyten ausgeschüttet werden kann. Dies entspricht der klinischen Beobachtung, dass sich die Ni-Allergie vor allem auf irritativer Haut entwickelt. Durch Nickel-Bindung gebildete Neoantigene stellen dabei Signal 1 dar, während H₂O₂ als „*danger-Signal*“ zur Expression kostimulatorischer Moleküle und somit zu Signal 2 führt. Für die Auslösung der Effektorphase, also der allergischen Reaktion, ist die intradermale Injektion von NiCl₂ ohne H₂O₂ ausreichend, da bereits gebildete T-Effektorzellen keine weitere Kostimulation für die Aktivierung benötigen (Artik *et al.* 1999).

1.3. Orale Toleranz

Gegen oral über die Nahrung aufgenommene Antigene besteht normalerweise eine Toleranz, d.h. durch unterschiedliche Mechanismen wird eine ansonsten ablaufende Immunantwort unterdrückt. Die Prozesse der oralen Toleranz sind bislang noch nicht genau verstanden, denn es handelt sich um ein komplexes Netzwerk verschiedener daran beteiligter und im folgenden erläuteter Zelltypen und Mechanismen.

1.3.1. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DZ) wurden erstmals 1868 von Paul Langerhans beschrieben (für eine Übersicht siehe Becker 2003). DZ sind phänotypisch und funktionell eine sehr heterogene Zellpopulation, die in allen lymphatischen Organen, Leber und Herz sowie epithelialen Oberflächen anzutreffen ist (Banchereau *et al.* 2000). Über die Entwicklung einzelner DZ-Populationen herrscht derzeit noch keine Einigkeit. Die komplexe Ontologie dieser Zellen vereinfachend, können dendritische Zellen in solche myeloiden und lymphoiden Ursprungs unterschieden werden. Lymphoide DZ sind durch die Expression eines CD8 α -Homodimers charakterisiert, während myeloide DZ CD8 α ⁻ sind (Banchereau *et al.* 2000).

Unreife DZ besitzen eine ausgeprägte Phagozytoseaktivität und sind gleichzeitig, aufgrund der niedrigen Expression von MHC und kostimulatorischen Molekülen CD80 und CD86 nur

schwache antigenpräsentierende Zellen. Die DZ-Reifung dendritischer Zellen wird durch „*danger-Signale*“ induziert (Matzinger 1994). Solche Signale können inflammatorische Zytokine, die Phagozytose nekrotischer Zellen oder Adjuvantien wie H_2O_2 sein. Reife DZ sind schließlich stark antigenpräsentierende immunstimulierende Zellen die keine Phagozytoseaktivität mehr besitzen.

Wie in Abschnitt 1.2.4. noch in Detail zu erläutern ist, können prinzipiell zwei Formen des Zelltods unterschieden werden. Nekrotische Zellen können durch den Verlust der Membranintegrität charakterisiert werden. Dies führt zur Leckage intrazellulärer Proteine, die immunstimulierend wirken. Im Gegensatz dazu werden Verlauf des apoptotischen Zelltods für die Zelle essentielle Bestandteile wie die Kernmembran und die DNA abgebaut. Im Gegensatz zu nekrotischen sind apoptotische Zellen nicht immunstimulierend, sondern besitzen, wie in Abschnitt 1.3.4. erläutert wird, regulatorische Eigenschaften.

Die Beseitigung apoptotischer Zellen durch Phagozyten ist ein physiologischer Vorgang. Dieser Prozess verläuft über mehrere Stufen, beginnend von der Migration der Phagozyten zu apoptotischen Zellen über die Bindung an diese und schließlich der Aufnahme der apoptotischen Zelle. Diese Schritte werden durch Rezeptor-Ligand-Wechselwirkungen, den sog. „*come-get-me*“ und „*eat-me*“-Signalen, zwischen dendritischen Zellen oder anderen Phagozyten und apoptotischen Zellen reguliert (Lauber *et al.* 2004). Apoptotische Zellen exprimieren früh nach Induktion der Apoptose Phosphatidylserin (PS) auf der Aussenseite der Membran, was apoptotische Zellen als solche kennzeichnet und den PS-Rezeptor CD36 auf dendritischen Zellen ligiert (Fadok *et al.* 1992).

Die Aufnahme apoptotischer Zellen durch DZ führt nicht zu deren Reifung wie es nach Aufnahme nekrotischer Zellen bzw. im Kontext inflammatorischer Zytokine oder Adjuvantien der Fall ist. DZ, welche apoptotische Zellen aufgenommen haben, sezernieren u.a. das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 (Morelli *et al.* 2003). Nekrotische Zellen schütten durch Verlust der Membranintegrität Hitzeschockproteine aus, die einen direkten Einfluss auf die Reifung dendritischer Zellen haben (Basu *et al.* 2000) und deren Aufnahme zur Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-12 führt (Basu *et al.* 2000; Sauter *et al.* 2000b).

Aus dem extrazellulären Raum über Phagozytose aufgenommenes Antigen wird intrazellulär in Vesikeln in Peptide gespalten, ein Vorgang der als "Antigen-Prozessierung" bezeichnet wird. Peptide extrazellulärer Proteine werden normalerweise in MHC-II Moleküle auf der Oberfläche antigenpräsentierender Zellen eingebettet und $CD4^+$ T-Zellen präsentiert. Eine Subpopulation dendritischer Zellen, die $CD8\alpha$ exprimiert, besitzt die Eigenschaft, so aufge-

nommenes Material über MHC-I Moleküle an CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren und CD8⁺ Effektorzellen zu induzieren. Dieses Phänomen erhielt den Begriff *cross-priming* (Albert *et al.* 1998). Die Antigenpräsentation phagozytierten Materials in der Abwesenheit von Kostimulation, wie es nach der Aufnahme apoptotischer Zellen der Fall ist, kann auch die Bildung Toleranz-vermittelnder regulatorischer CD8⁺ T-Zellen einleiten, was als *cross-tolerization* bezeichnet wird (Belz *et al.* 2002; Ferguson *et al.* 2002; Heath *et al.* 2001; Kurts *et al.* 2001; Sauter *et al.* 2000b).

1.3.2. NKT-Zellen

Eine Subpopulation der natürlichen Killer-T Zellen (NKT) ist an der Induktion der immunologischen Toleranz beteiligt und Gegenstand intensiver Forschung.

NKT-Zellen stellen eine T-Zellsubpopulation dar, die Marker natürlicher Killer (NK) Zellen exprimieren und neben der Leber insbesondere in lymphatischen Organen zu finden sind. Die Mehrheit dieser Zellen, sogenannte invariante NKT-Zellen (iNKT-Zellen), exprimiert in der Maus einen aus den Segmenten J α 14 und V α 18 bestehenden invarianten T-Zellrezeptor (TZR). iNKT-Zellen reagieren im Gegensatz zu klassischen MHC-I oder MHC-II restringierten T-Zellen auf CD1-gebundene Glycolipide oder Phospholipide (Gumperz *et al.* 2000). Über die Natur der auf invarianten CD1-Molekülen präsentierten Glycolipide ist, mit Ausnahme des aus dem Tiefseeschwamm *Agelas mauritanus* gewonnenen Glycolipids α -Galactosylceramid (α -GalCer), wenig bekannt (Kobayashi *et al.* 1995; Morita *et al.* 1995). Zhou *et al.* identifizierten kürzlich ein lysosomales Glycosphingolipid, iGb3, als endogenen CD1-Liganden. iGb3 ist das Abbauprodukt des Enzyms β -N-Acetylhexosaminidase, Mäuse mit genetischen Defekten dieses Enzyms besitzen eine stark verminderte Zahl CD1-restringierter NKT-Zellen, was darauf schließen lässt, dass dieses Lipid für die iNKT-Zellentwicklung benötigt wird (Godfrey *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2004). Zuvor bereits konnten Wu *et al.* ein aus Melanomazellen gewonnenes Disialogangliosid als möglichen endogenen CD1-Liganden identifizieren (Wu *et al.* 2003). Die TZR-vermittelte Aktivierung von iNKT-Zellen durch CD1-Antigenpräsentation führt zu rascher und starker Ausschüttung der Zytokine IL-4, IL-10 bzw. IFN- γ (M.Lutz, persönliche Kommunikation). Die Stimulation von iNKT-Zellen durch CD40-exprimierende antigenpräsentierende Zellen führt zur Sekretion von IFN- γ , während die Interaktion zwischen CD1d und dem NKT-TZR ohne CD40 die Ausschüttung der Zytokine IL-4 und IL-10 anregt (Hayakawa *et al.* 2001).

Eine der ersten Erkenntnisse zur Rolle von iNKT-Zellen wurden an sogenannten nonobese diabetes (NOD) Mäusen. Diese Mäuse entwickeln die Autoimmunerkrankung des Insulin-abhängigen Diabetes mellitus. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine durch CD8⁺ T-Zellen vermittelte Autoimmunreaktion gegen die Insulin-produzierenden β -Zellen des Pankreas (Wang *et al.* 1991). Auffälligerweise besitzen NOD-Mäuse eine verringerte Zahl von iNKT-Zellen (Hammond *et al.* 1998). Eine Beteiligung der iNKT-Zellen an der Inhibition des Diabetes konnte durch Injektion dieser Zellen nachgewiesen werden indem NOD-Mäusen durch Injektion von Wildtyp-iNKT-Zellen mit diesen rekonstituiert wurden was die Entwicklung des Diabetes verhinderte. Einen anderen Ansatz in der Untersuchung von iNKT-Zellen in der Toleranz verfolgten Sharif *et al.* Sie aktivierten iNKT-Zellen mit dem exogenen Liganden α -GalCer was die Ausschüttung der Th-2 Zytokine IL-4 und IL-10 zur Folge hatte und die Bildung pathogener, autoreaktiver Th1-T-Effektorzellen verhinderte (Sharif *et al.* 2001). In gleichartiger Weise funktionieren iNKT-Zellen bei der Kontrolle weiterer Autoimmunreaktionen wie EAE (Miyamoto *et al.* 2001). In allen untersuchten Modellen wurde die Funktion der iNKT-Zellen lediglich auf die rasche und sehr starke Ausschüttung von IL-4 und IL-10 zurückgeführt.

Stein-Streilein *et al.* beleuchteten die Rolle von iNKT-Zellen im Tiermodell der okular induzierten Toleranz, dem sog. ACAID-Modell (*anterior chamber of the eye aquired immune deviation*). Die Injektion geringer Mengen eines Proteinantigens wie Ovalbumin führte zur Migration antigenpräsentierender Zellen des Auges in die Milz (Stein-Streilein *et al.* 2000). In der Milz schließlich konnte die Interaktion verschiedener Zelltypen an der Bildung regulatorischer T-Zellen und somit der Toleranz nachgewiesen werden (Sonoda *et al.* 1999). Die Produktion des Chemokins MIP-2 durch B-Zellen der Milz rekrutierte iNKT-Zellen dorthin (Faunce *et al.* 2001; Sonoda *et al.* 2002), welche IL-10 ausschütten. Dieses Zytokin war für die Differenzierung von T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen notwendig (Sonoda *et al.* 2001). Daneben führte die Expression des Chemokins RANTES durch iNKT-Zellen zur Rekrutierung von T-Zellen und weiterer antigenpräsentierender Zellen, was in der Induktion regulatorischer T-Zellen mündete, die als Effektorzellen der Toleranz agieren (Faunce *et al.* 2002).

1.3.3. B-Zellen

B-Zellen sind eine funktionell wie phänotypisch heterogene Zellpopulation. Die klassische und bestuntersuchte Funktion von B-Zellen ist die Sezernierung spezifischer Immunglobuline gegen lösliche Antigene. Obwohl B-Zellen in verschiedenen Modellen mit der Induktion einer Immuntoleranz in Zusammenhang gebracht wurden, ist dieser Bereich bislang nur lückenhaft erforscht (Buhlmann *et al.* 1995; Holländer *et al.* 1996; Croft *et al.* 1997; Faunce *et al.* 2001; Fillatreau *et al.* 2002)

Mit einem Anteil von ca. 50 % repräsentieren B-Zellen z.B. die größte Fraktion der Milz-lymphozyten bei der Maus. Alle B-Zellen besitzen die Fähigkeit, über membranständige Immunglobuline, den B-Zellrezeptor (BZR), spezifische Antigene zu binden (Janeway, C. A., Immunobiology 1997). Die Antigen-BZR-Bindung führt zur Internalisierung und Pro dieses Komplexes. Peptide dieses Komplexes werden auf MHC-II Molekülen der B-Zelle an CD4⁺ T-Zellen präsentiert, wodurch in Folge verschiedener B-Zell/T-Zell-Wechselwirkungen die B-Zelle aktiviert wird und lösliche Antigen-spezifische Immunglobuline sezerniert. Die Aktivierung von B-Zellen wird durch verschiedene Rezeptor-Ligandenpaare kontrolliert. Das Rezeptor-Ligandenpaar CD40 und CD40Ligand sowie die Antigen:BZR-Ligation sind wichtige Faktoren in der Aktivierung von B-Zellen (Lipsky *et al.* 1997).

Die Rolle von B-Zellen in der peripheren Toleranz ist bislang nur lückenhaft untersucht. Bis heute wurden B-Zellen über die nur schwache Kostimulation durch CD40:CD40L (Buhlmann *et al.* 1995; Holländer *et al.* 1996; Croft *et al.* 1997) oder der Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (Fillatreau *et al.* 2002) mit der Induktion peripherer Toleranz in Verbindung gebracht.

Im ACAID-Modell (siehe auch Abschnitt 1.3.2) ist eine kleine Fraktion in der Milz lokalisierter B-Zellen an der Toleranzinduktion beteiligt. Diese B-Zellen stellen ca. 3 % der Milz-lymphozyten dar und sind in der Randzone der Milz, der sogenannten marginal zone, lokalisiert (Martin *et al.* 2002). B-Zellen dieser Zone sind über die Expression von CD1 und die Fähigkeit iNKT-Zellen durch MIP-2 Expression chemotaktisch anzulocken an der Toleranzinduktion gegen das Antigen Ovalbumin beteiligt (Faunce *et al.* 2001; Sonoda *et al.* 2002). CD1d ist ein an der Antigenpräsentation beteiligtes Transmembranmolekül, welches von B-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert wird (Brigl *et al.* 2004). Im Gegensatz zu klassischen hochpolymorphen MHC-Molekülen ist CD1 invariant und präsentiert Glycolipide und Phospholipide (Gumperz *et al.* 2000), (siehe auch Abschnitt 1.3.2). Im Menschen

existieren fünf CD1-Isoformen (CD1a-CD1e) (Han *et al.* 1999), von denen die Maus nur CD1d exprimiert (Porcelli 1995).

B-Zellen sind durch die Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 an der Kontrolle der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE), einem zur humanen multiplen Sklerose ähnlichen Tiermodell, beteiligt (Fillatreau *et al.* 2002). EAE ist eine von Th1-T-Zellen vermittelte Immunreaktion, welche gegen ein im zentralen Nervensystem in Myelinscheiden exprimiertes Protein gerichtet ist (Cuzner *et al.* 1999). Während die Aktivierung von T-Zellen in Gegenwart von Th1-Zytokinen wie IFN- γ die Differenzierung in Th1-T-Zellen führt, bewirken Th2-Zytokine wie IL-10 das Gegenteil. Durch diesen Mechanismus können B-Zellen die Bildung der autoreaktiven, pathogenen T-Effektorzellen verhindern (Fillatreau *et al.* 2002).

Die Interaktion zwischen CD40 und CD40L ist von zentraler Bedeutung für die Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen. Murines CD40 ist ein aus 305 Aminosäuren bestehendes Transmembranprotein, welches zur Tumornekrosefaktorrezeptor- (TNF-R) Familie gehört. Im Gegensatz zu anderen Rezeptoren dieser Familie, wie Fas, besitzt CD40 keine intrazelluläre Todesdomäne, die Apoptose auslösen kann. CD40 wird von B-Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten sowie Endothelzellen exprimiert (van Kooten *et al.* 2000). CD40Ligand (CD40L) gehört zur TNF-Familie und wird früh nach Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen exprimiert (Armitage *et al.* 1993; Ogasawara *et al.* 1999). Die Ligation des T-Zellrezeptors durch MHC-Komplexe führt zur raschen Aufregulation von CD40L (Armitage *et al.* 1993). Die Aktivierung durch CD40L-CD40-Ligation führt in B-Zellen zu Proliferation und Differenzierung der B-Zellen (Lipsky *et al.* 1997).

Daneben spielt dieses Rezeptor-Ligandenpaar eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Toleranz. So zeigten Tang *et al.*, dass die Blockade der CD40-CD40L-Interaktion eine stabile Toleranz gegen das Kontaktallergen Dinitrofluorbenzol (DNFB) induziert. Bereits zuvor zeigten Buhlmann, dass CD40-defiziente B-Zellen nach Transfer eine Toleranz gegen die durch sie übertragenen "fremden" MHC-Moleküle induzieren, welche normalerweise eine Abstoßungsreaktion hervorrufen würden. Mit den aus der Literatur bekannten Daten lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Blockade der kostimulatorischen CD40-CD40Ligand-Wechselwirkung die Induktion einer Toleranz bevorzugt.

1.3.4. Apoptose

Unter dem Begriff Apoptose wird ein Mechanismus des kontrollierten, energieabhängigen Abbaus einer Zelle verstanden. Höhere Organismen nutzen die Apoptose im Rahmen der Embryogenese und Organentwicklung um nicht mehr benötigte Zellen zu beseitigen. Apoptose kann durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli wie Ligation von Oberflächenrezeptoren, DNA-schädigende Agenzien, Cytokine, Hormone oder Exposition mit ionisierender bzw. ultravioletter Strahlung ausgelöst werden.

Die Nekrose, wie sie durch Einwirkung von Entzündungsmediatoren, toxische Agenzien o.ä. entsteht, ist energieunabhängig und nicht kontrolliert. Nekrotische Zellen verlieren ihre Membranintegrität was zum Ausstrom intrazellulärer Bestandteile führt, diese können immunstimulierend wirken.

Wie in Abb. 1.3.4 schematisch dargestellt, ist allen genannten Stimuli der Apoptose gemeinsam, dass sie intrazellulär in einer konservierten Signalkaskade münden. Diese verläuft über eine Reihe Aspartat-spezifischer Proteasen, die ein Cystein in ihrem aktiven Zentrum aufweisen, die sogenannten Caspasen (Alnemri *et al.* 1996).

Diese Caspasesignalkaskade endet mit der spezifischen Aktivierung verschiedener Proteine, welche essentielle Zellbestandteile wie die Kernmembran oder das Zytoskeletts abbauen.

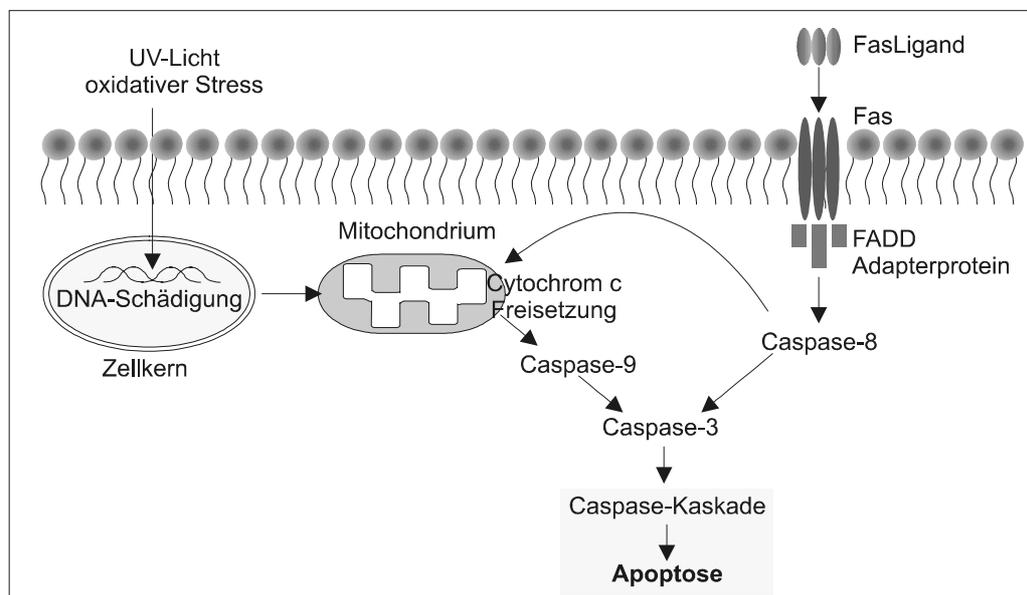


Abb. 1.3.4. Apoptoseinduktion durch FasLigand und andere Stimuli.

Die Caspase-Signalkaskade wird durch weitere Proteine reguliert, als besonders wichtige Regulatoren wären Proteine der bcl-Familie zu nennen (Ju *et al.* 1999; Marsden *et al.* 2003). Diese lassen sich in zwei Subfamilien, die anti- und die pro-apoptotischen bcl-Proteine unterteilen. Bcl-2 und bcl_{xl} werden zu den anti-apoptotischen gezählt, da sie die Caspase-9

aktivierende Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien inhibieren (Nunez *et al.* 1994). Bax hingegen ist ein pro-apoptotisches Protein der bcl-Familie, gemeinsam mit bak formiert es Ionenkanäle in der äusseren Membran der Mitochondrien, was zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials und Ausstrom von Cytochrom c führt (Bates *et al.* 1999). Die Balance zwischen anti- und pro-apoptotischen Apoptose-regulatoren ist für das Schicksal der Zelle von entscheidender Bedeutung.

1.3.4.1. Rezeptor-induzierte Apoptose

Unter den zuvor genannten Induktoren der Apoptose spielen die, welche Rezeptor-vermittelte Apoptose induzieren, eine besondere Rolle. Immunologisch relevante Apoptose-induzierende Rezeptoren gehören zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren (TNF-R). Die Mitglieder dieser Familie sind strukturell unterschiedlich, besitzen jedoch alle Cystein-reiche extrazelluläre Subdomänen, und intrazellulär eine sogenannte Todesdomäne. Diese ermöglicht die Bindung von Adapterproteinen, welche ihrerseits Todesdomänen aufweisen und die somit den intrazellulären Signalweg der Apoptose in Gang setzen.

Unter den TNF-R Proteinen von immunologisch besonderem Interesse sind ist das Rezeptor-Ligandenpaar Fas und FasLigand, da Mäuse mit genetischen Defekten dieser Proteine Symptome der Autoimmunität aufweisen. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der Apoptose für die Induktion bzw. Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz hin.

Fas (CD95, APO-1) ist ein 48 kDa Transmembranprotein der TNF-R Familie. Fas wird in einer Reihe von Organen wie Thymus, Milz, Leber, Herz oder Lunge exprimiert (Nagata *et al.* 1995). FasLigand ist ein in der Maus aus 279 Aminosäuren bestehendes Membranprotein (Swissprot Accession number 41047). Die Expression von FasLigand ist auf NK Zellen, aktivierte T-Zellen, dendritische Zellen (DZ) sowie immunologisch privilegierte Organe wie Auge oder Hoden beschränkt (Lee *et al.* 2003). Von der FasLigand-Expression in immunologisch privilegierten Organen wird angenommen, dass sie der Aufrechterhaltung einer Toleranz gegen Organe und Strukturen mit geringer oder keiner Regenerationsfähigkeit, wie der Cornea des Auges, dient (Nieder Korn 2002).

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten MRL.Tnfsflpr („Fas-lpr“) Mäuse exprimieren einen defekten Fas-Rezeptor auf ihrer Zellmembran. Die Insertion eines Retrotransposons von ca. 800 bp Länge resultiert in der Expression eines infunktionellen Fas-Rezeptors (Lynn *et al.* 1997). Mäuse mit diesem genetischen Defekt akkumulieren aktivierte T-Zellen in ihren lymphatischen Organen, da diese nach Aktivierung nicht über den als „*activation-induced cell death*“ bezeichneten Apoptosemechanismus beseitigt werden kön-

nen. Die Symptome der Lymphoproliferation gaben diesen Mäusen die Bezeichnung *lpr*. Mäuse mit einer Punktmutation im FasLigand-Lokus entwickeln denen in Fas-*lpr* Mäusen sehr ähnliche Symptome der Autoimmunität und Lymphoproliferation (*generalized lymphoproliferative disease, gld*).

Neben den Befunden dass Fas- und FasLigand-defektive Mäuse autoimmun sind, wurde die Rolle der Fas-induzierten Toleranz durch eine Reihe weitergehender Untersuchungen belegt. Durch UVB-Strahlung induzierte Toleranz gegen das Kontaktallergen Dinitrofluorbenzol (DNFB) beispielsweise ist vom Fas-FasLigand-System abhängig (Hill *et al.* 1999; Schwarz *et al.* 1998). Unklar ist in diesem System allerdings, welche Zellen Fas bzw. FasLigand exprimieren müssen. Hill *et al.* zeigten hier, dass T-Zellen FasLigand exprimieren müssen, um eine Toleranz gegen DNFB in unbehandelte Empfänger zu übertragen zu können. Im Gegensatz dazu kommen Schwarz *et al.* zu dem Schluss, nicht nur FasLigand sondern auch Fas muss in Empfängermäusen exprimiert werden, wodurch die UV-induzierte Toleranz in diese Mäuse übertragen werden kann. In einem anderen Modellsystem konnten Ferguson *et al.* die Induktionsphase der Toleranz näher untersuchen. Indem sie *in vitro* mit dem Hapten Trinitrophenol (TNP) beladene Milzzellen i.v. in syngene Empfängermäuse injizierten zeigten, dass die Toleranzinduktion gegen dieses Hapten von der Fas-Expression auf diesen Zellen abhängig (Ferguson *et al.* 2002). Die durch vorherige γ -Bestrahlung induzierte Apoptose führte zur Bildung regulatorischer T-Zellen als Effektorzellen der Toleranz, umgekehrt waren Fas-defiziente Milzzellen hierzu nicht in der Lage. Regulatorische T-Zellen also sind in der Lage, in syngenen Empfängern eine Toleranz zu induzieren.

1.4. Oral induzierte Toleranz gegen Nickel

Obwohl 6-15% der mitteleuropäischen Bevölkerung eine Überempfindlichkeit gegen Nickel aufweisen (Hostynek 2002; Liden *et al.* 2001), ist der überwiegende Teil der Bevölkerung gegen dieses in vielen Gegenständen des täglichen Umgangs vorhandene Metall nicht allergisch. Van Hoogstraten *et al.* zeigten, dass der Erstkontakt mit Nickel durch das Tragen von Ni-haltigen Zahnspangen vor einem „ear-piercing“ mit Ni-haltigem Modeschmuck die Frequenz einer Ni-Allergie reduziert (van Hoogstraten *et al.* 1991). Dieselben Autoren zeigten, dass die orale Gabe von NiSO₄ an Mäuse zur Bildung regulatorischer T-Zellen führte, die eine Toleranz gegen Nickel auf syngene Empfängermäuse übertragen konnten (van Hoogstraten *et al.* 1992). In einer Vergleichsstudie konnte die umweltbedingte Nickerpo-

sition und das Auftreten der Kontaktallergie gegen Nickel invers korreliert werden. Verglichen wurde die, durch die industrielle Nickelgewinnung stark Ni-exponierte russische Stadt Nikkel an der russisch-norwegischen Grenze, mit einer nahe gelegenen norwegischen Stadt, welche keine solche Nickelverarbeitung besitzt. Die Einwohner auf russischer Seite wiesen mit 7.2 % einen geringeren Anteil Nickel-allergischer Probanden auf, als jene auf norwegischer Seite mit einem Anteil von 27.5 % (Smith-Sivertsen *et al.* 2002).

Artik *et al.* untersuchten im o.g. Mausmodell die Mechanismen der Toleranzinduktion (Abschnitt 1.2.3). Die orale Gabe von NiCl_2 über das Trinkwasser induzierte eine langanhaltende Toleranz gegen Nickel. Diese Toleranz war Nickel-spezifisch, das heißt Immunreaktionen gegen Kontaktallergene wie das getestete Dinitrofluorobenzol (DNFB) konnten weiterhin ausgelöst werden (Artik *et al.* 2001). Die Toleranz konnte durch Zellen der Milz auf syngene Empfänger übertragen werden. Sowohl T-Zellen der Milz oral toleranter Spender als auch APZ konnten in geringer Zahl die Toleranz übertragen. Da bereits 10^2 T-Zellen bzw. 10^3 APZ dazu in der Lage waren, wurde davon ausgegangen und dies auch nachgewiesen (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003), dass die geringe Zahl von Spenderzellen im Empfänger eine Toleranz induziert in dem Zellen des Empfängers zur Toleranz instruiert oder mit dieser „infiziert“ werden (Schematische Darstellung, siehe Abb. 1.4). Ein solcher Vorgang wurde von Cobbold und Waldmann als „infektiöse Toleranz“ beschrieben, ohne damit eine klassische mikrobielle Infektion zu meinen (Qin *et al.* 1993). Als APZ wurden T-Zell-depletierte Milzzellsuspensionen bezeichnet, die schließlich mehr als 85 % B-Zellen enthielten. Diese Zahl ergibt sich aus einem T-Zellanteil von etwa 30% und etwa 60 % B-Zellen in einer Milz.

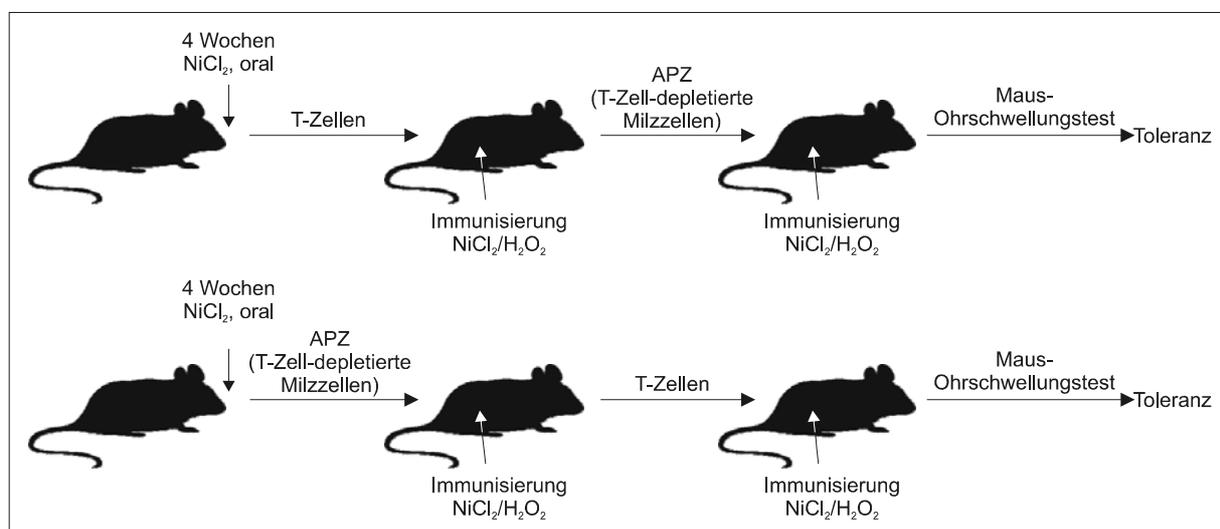


Abb. 1.3. Infektöse Toleranz.

Die Induktion der Toleranz von Zellen des Spenders auf Empfängerzellen war von einer Immunisierung des Empfängers mit NiCl_2 und dem Adjuvanz H_2O_2 abhängig (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003b). Während diese Immunisierung unbehandelte Mäuse gegen Nickel sensibilisierte, führte dieselbe Immunisierung hier zur Induktion einer Toleranz. In der Tat konnten Roelofs-Haarhuis *et al.* nachweisen, dass diese Empfänger-Immunisierung nötig ist, die Toleranz von den übertragenen T-Zellen oder APZ auf Empfängerzellen zu übertragen, die ihrerseits in der Lage waren, die Toleranz in weitere Empfänger zu transferieren (siehe Abb. 1.3). Dabei war mit dem verwendeten experimentellen Protokoll zu beobachten, dass die Übertragung von APZ die Bildung regulatorischer T-Zellen anstieß, während übertragene regulatorische T-Zellen zur Bildung tolerogener APZ führten (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003b). Die Transduktion des tolerogenen Signals über APZ erfolgte durch B-Zellen, die den größten Anteil der als „APZ“ übertragenen Zellen ausmachten. Es wurde allerdings nicht ausgeschlossen und bislang nicht getestet, ob andere Zelltypen, insbesondere dendritische Zellen, auch dazu in der Lage sind (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003b).

Weitere Untersuchungen beteiligter Zelltypen ergaben, dass auch iNKT-Zellen in der oralen Toleranz eine Rolle spielen. iNKT-Zell-defiziente Mäuse, sog. $\text{V}\alpha 14\text{J}\alpha 18^{-/-}$ Mäuse, konnten durch vierwöchige Applikation von NiCl_2 nicht tolerisiert werden. Transferexperimente zeigten, dass diese $\text{CD}4^+$ iNKT-Zellen für die Toleranzübertragung durch T-Zellen oral toleranter Spender unerheblich waren. Andererseits konnten tolerogene APZ, also solche aus oral mit NiCl_2 behandelten Spendern, die Toleranz nur in Empfänger übertragen, die $\text{CD}4^+$ iNKT-Zellen besaßen (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004). Die Toleranzübertragung durch APZ war nur möglich, wenn diese $\text{CD}1d$ exprimierten, woraus auf eine Interaktion zwischen APZ und iNKT-Zellen geschlossen wurde. Die weitere Charakterisierung der iNKT-Zellen zeigte, dass diese in der Lage sein mussten, die Zytokine IL-4 und IL-10 zu produzieren, was den Hinweisen aus der Literatur entsprach (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004).

1.5. Fragestellung

Die Gabe von NiCl_2 im Trinkwasser führt in Mäusen zur Bildung einer gegen Nickel spezifischen immunologischen Toleranz. Diese Toleranz ist durch regulatorische T-Zellen sowie auch B-Zellen übertragbar. Die Übertragung der Toleranz erforderte die Immunisierung der Empfängertiere mit dem Antigen Nickel und dem Adjuvanz H_2O_2 , was zur Bildung tolerogener Zellen der Empfängertiere führt. Die Mechanismen der Toleranzinduktion insbesondere durch B-Zellen sind noch ungeklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der Toleranzübertragung durch B-Zellen zu charakterisieren.

Es wurde zunächst die Frage untersucht, ob die orale Applikation von NiCl_2 im Trinkwasser zu Veränderungen des B-Zellphänotyps führt. Nachdem gezeigt werden konnte, dass B-Zellen oral toleranter Mäuse ein zugunsten der Apoptose verschobenes Gleichgewicht zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen besitzen, wurde die Apoptose als Mechanismus der Toleranzübertragung näher untersucht. Es wurden daher für das Modell der Nickeltoleranz folgende Fragen untersucht:

- Ist die Induktion einer Toleranz gegen Nickel von Fas-FasLigand-vermittelter Apoptose abhängig ?
- Exprimieren tolerogene B-Zellen Fas um die Toleranz zu übertragen ?
- Sind dendritische Zellen in der Lage apoptotische B-Zellen zu phagozytieren, und
- Führt dies zur Bildung tolerogener dendritischer Zellen ?
- Welche Zellen sind für die Induktion der B-Zell-Apoptose verantwortlich, und
- Durch welche Mechanismen steuert die für die Toleranzübertragung nötige Immunisierung die Apoptose ?

Für die Untersuchung dieser Fragen wurden Mäuse eingesetzt, welche genetische Defekte für das Apoptose-induzierende Rezeptor-Ligandenpaar Fas und FasLigand besitzen. Die Untersuchung der benötigten Fas- und FasLigand-Expression auf unterschiedlichen Zelltypen erfolgte anhand von Adoptivtransferexperimenten mit unterschiedlichen genetisch defekten Mausstämmen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ferner damit begonnen, durch orale Nickelgabe induzierten Veränderungen des B-Zellproteoms mittels 2D-Gelelektrophorese zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Soweit nicht anders angegeben, wurden Plastikverbrauchsmaterialien von Greiner, Solingen bezogen.

137Cs Quelle gammacell 2000	Mungsgaard, Kopenhagen, Dänemark
Brutschrank HERAccl	Hereaus, Düsseldorf
Durchflusszytometer FACSCalibur (NeAr-488 nm Laser, 633 nm Diodenlaser, optionale Zellsortiereinheit)	BDBioscience, Heidelberg
FluorImager 595	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Gelelektrophoresekammern	Serva, Heidelberg
Gelelektrophoresekammer Protan 2	Bio Rad Laboratories, München
Gelerfassungssystem Fluor-S-Max	Bio Rad Laboratories, München
Längenmessgerät Oditest	Kröplin, Schlüchtern
Lichtmikroskop Leitz Diaplan	Leitz, Weitzlar
PhosphoImager SI	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Spektralphotometer GeneQuant II	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Sterilfilter Acrodisc 25 µm	Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA
Sterilbank Gelaire BSB	Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim
Zellzähler CASY Model TT	Schärfe System, Reutlingen
Thermocycler LightCycler und Kapillaren	Roche Applied Science, Mannheim
Thermocycler TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Zentrifugen:	
Beckman H2-JS, JA-20 Rotor	Beckman, Fullerton, CA, USA
Hereaus Megafuge	Hereaus, Düsseldorf
Mikrozentrifuge Eppendorf 5415C	Eppendorf, Hamburg

2.1.2. Software

GraphPad Prism 3.0	GraphPad, San Diego, CA, USA
Excel 97	Microsoft, Redmond, WA, USA
Quantity One 4.1.0	Bio Rad Laboratories, München
CellQuest Pro	BDBioscience, Heidelberg
ImageMaster 2D Platinum	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden

2.1.3. Chemikalienverzeichnis

2.1.3.1. Feinchemikalien

Feinchemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von Merck, Hohenbrunn bezogen.

7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	Invitrogen, Karlsruhe
Aprotinin	Sigma, Deisenhofen
Collagenase D	Roche Applied Science, Mannheim
Ficoll Paque	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Leupeptin	Sigma, Deisenhofen
L-[³⁵ S]-Methionin	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Newport Green DCF	Invitrogen, Karlsruhe
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma, Deisenhofen
Ruthenium(tris(bathophenanthrolin- disulfonat), tetra-Natriumsalz	Biotrend Chemikalien, Köln
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin (HPLC-grade)	Promega, Madison, WI, USA
Vybrant CFDA SE Cell Tracer Kit	Molecular Probes, Eugene, WA, USA

Chemikalien für molekularbiologische Arbeiten:

Agarose	Sigma, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Promega, Madison, WI, USA
DTT	Promega, Madison, WI, USA
EDTA	Promega, Madison, WI, USA
MgCl ₂	Promega, Madison, WI, USA
MMLV Reverse Transkriptase	Promega, Madison, WI, USA
oligo dT ₁₆₋₁₈ Oligonukleotidprimer	Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden
Quiagen SYBR Green Kit	Qiagen, Hilden
RNasin	Promega, Madison, WI, USA

2.1.3.2. Lösungen und Medien

ACT-Lysepuffer, pH 7.2	17 mM Trizma Base (Sigma, Deisenhofen) 160 mM NH ₄ Cl
Annexin V Binding Buffer	10 mM HEPES/NaOH, pH 7,4 140 mM NaCl 2.5 mM CaCl ₂
CASYTON	134 mM NaCl 1 mM EDTA 4 mM KCl 1.6 mM NaH ₂ PO ₄ 12 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 7 mM NaF
DEPC-H ₂ O	0.1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat wurden in entionisiertem Wasser gelöst, mit einem Magnetrührer über Nacht unter dem Abzug gerührt und anschließend autoklaviert
DNFB	0.2 % (w/v) bzw. 0.3 % (w/v) 2,4-Dinitrofluorbenzol in Aceton/Olivenöl (4:1, alles Sigma, Deisenhofen)
Equilibrierungspuffer	6 M Harnstoff 3.75 mM TRIS-HCl 2 % (v/v) SDS 20 % (w/v) Glyzerin
Elektrodenpuffer	2.48 mM Trizma Base 19.2 mM Glyzin 0.01 % (v/v) SDS
FACS-Puffer	140 mM NaCl 4 mM KCl 2 mM KH ₂ PO ₄ 20 mM Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O 0.7 mM EDTA für die Messung der PS-Exposition mit Annexin-V wurde FACS-Puffer ohne EDTA verwendet.
Fixierungspuffer	PBS, 2 % (w/v) Paraformaldehyd Paraformaldehyd wurde durch Erhitzen auf 60°C für 2 Std. gelöst, die Lösung wurde anschließend durch einen 0.4 µM Filter sterilfiltriert.
Gel-Fixierlösung	50 % (v/v) Methanol 10 % (v/v) Essigsäure

Gel-Entfärbelösung	15 % (v/v) Methanol 7 % (v/v) Essigsäure
Gel Loading Buffer	0.25 % (w/v) Xylencyanol 0.25 % (w/v) Bromphenolblau 30 % (v/v) Glyzerin ad DEPC-H ₂ O
Gel-Waschlösung	50 % (v/v) Methanol 40 % H ₂ O 10 % (v/v) Essigsäure
Hypotoner Aufschlusspuffer	10 mM HEPES / NaOH pH 7.4 10 mM NaCl 0.5 mM MgCl ₂ 1 mM EGTA
Isotonisierungslösung	0.25 M Sucrose 3 mM MgCl ₂ 0.5 % (v/v) Triton X-100
Overlay-Solution	0.5 % low-melting Agarose (Sigma, Deisenhofen) 0.05 % Bromphenolblau 0.1 % (v/v) SDS gelöst in Elektrodenpuffer
Ni(II)Cl ₂	10 mM NiCl ₂ ·6 H ₂ O (Sigma, Deisenhofen) in pyrogenfreiem, sterilen 0.9 % NaCl
NiCl ₂ / H ₂ O ₂	10 mM NiCl ₂ ·6 H ₂ O (Sigma, Deisenhofen) in pyrogenfreiem, sterilen 0.9 % NaCl + 1 % (v/v) H ₂ O ₂ (30 %)
PBS, pH 7,4	140 mM NaCl 2 mM KCl 6 mM Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O 1.5 mM KH ₂ PO ₄
PBS / NaN ₃	PBS, 0.02 % (w/v) NaN ₃
Permeabilisierungspuffer	PBS, 1 % (w/v) BSA 0.5 % (w/v) Saponin
Peptidextraktionslösung	66 % (v/v) Acetonitril 2 % (v/v) Ameisensäure
RuBPS-Färbepuffer	20 % (v/v) Methanol 40 nM Ruthenium-II-tris (BathoPhenanthroline diSulfonat)

Running Buffer	PBS, 10 % (w/v) FKS (Sigma, Deisenhofen), durch 0.4 µm Filter sterilfiltriert
Sample Buffer	6.5 M Harnstoff 1.5 M Thio-Harnstoff 4 % (w/v) CHAPS 0.05 % (w/v) SDS 100 mM DTT
TAE-Laufpuffer	1,142 g/l Eisessig (Sigma, Deisenhofen) 4.84 g/l Trizma Base 0,744 g/l EDTA
TRIS-HCl, pH 6.8	0.5 M Tris-HCl 0.4 % (w/v) SDS
TRIS-HCl, pH 8.0	1.5 M Tris-HCl 0.4 % (w/v) SDS
Zellkulturmedium	Dulbeccos Modified Eagles Medium (DMEM,high glucose) oder Methionin-freies DMEM, jeweils supplementiert mit je 50 U/ml Penicillin/Streptomycin, 50 µM β-Mercapto- ethanol (beides Invitrogen, Karlsruhe).

2.1.3.3. Oligonukleotide

Für PCR-Analysen wurden salzfreie Oligonukleotidprimer (Operon, Köln) verwendet.

Tab. 1. Sequenzen der eingesetzten Oligonukleotidprimer

Gen	5'-3' forward primer	5'-3' reverse primer	Annealing- Temperatur
Bax	ACAGATCATGAAGACAGGGG	CAAAGTAGAAGAGGGCAACC	52°C
Bcl-2	CAGTCAGCTGCACCTGA	CCCAGCCTCCGTTATCC	55°C
Bcl _{xl}	CATCAATGGCAACCCATCCTG	TGTTCCCGTAGAGATCCACAAAAG	55°C
Fas	CGAAAGTACCGGAAAAGAAA	TTGCCCTCCTTGATGTTATT	55°C
rPS6	ATTCCTGGACTGACAGACAC	GTTCTTCCTAGTGCGTTGCT	55°C
Spi1.2	CAG TCA TGA TGG GAC TGT GC	CCTGCCCTTTCAATT TGTGT	57°C

2.1.3.4. Monoklonale Antikörper und Fluorochromkonjugate

Tab. 2. Verwendete monoklonale Antikörper (mAk)

Spezifität	bezogen von
α -Maus CD1d biotin	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD3 APC	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD11b biotin	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD11c APC	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD16/32, purified	BD Biosciences, Heidelberg
α -MausCD19 APC	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD38 biotin	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD40 FITC	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD45R (B220) APC	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus CD90.1 (Thy1.2) PE	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus $\alpha\beta$ TCR FITC	BD Biosciences, Heidelberg
Annexin-V Biotin	BD Biosciences, Heidelberg
α -Maus DEC-205 FITC	DPC Biermann, Bad Nauheim
α -Maus NKRP1 (NK1.1) PE	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin-APC	BD Biosciences, Heidelberg
Streptavidin-PerCP	BD Biosciences, Heidelberg

mAk wurden in einer, zuvor durch Titration bestimmten, Konzentration eingesetzt.

2.1.3.5. Materialien für die magnetische Zellseparation

Magnetische Sortierungen wurden mit einem autoMACS (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) durchgeführt.

Folgende microBeads wurden von Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach bezogen:

anti-CD11c microBeads
 anti-CD19 microBeads
 anti-CD90.1 microBeads
 anti-B220 microBeads
 anti-biotin microBeads

2.1.4. Mäuse

In allen Experimenten wurden spezifisch-pathogenfreie, weibliche Mäuse im Alter von 5-10 Wochen der folgenden Stämme verwendet:

C57BL/6	Janvier, Le Genest St. Isle, Frankreich
C57BL/6J	The Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA, USA
B6Smn.C3- <i>Tnfsf6</i> ^{gld} ("Fas-gld")	The Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA, USA
B6.MRL-TNF-Rsf6 ^{lpr} /J ("Fas-lpr")	The Jackson Laboratories, Bar Harbor, MA, USA

$J\alpha 18V\alpha 281^{-/-}$ Mäuse (durch Dr. Balk (Beth Israel Deacones Medical Center, Harvard University, Boston USA) auf genetischen C57BL/6 Hintergrund gekreuzt) wurden in der Tierhaltung des Instituts gezüchtet.

2.2. Methoden

2.2.1. Zellbiologische Methoden

2.2.1.1. Präparation von Einzelzellsuspensionen der Milz und Lymphknoten

Mäuse wurden durch Erstickung in einer gesättigten CO₂-Atmosphäre getötet. Anschließend wurden unter aseptischen Bedingungen die Milz bzw. Lymphknoten entfernt und in Gewebekulturplatten mit eiskaltem PBS gelagert. Milzen wurden in einer Petrischale vorsichtig mit der Rückseite eines Spritzenstempels homogenisiert. Lymphknoten wurden mit einer breiten Pinzette in 1 ml PBS zerdrückt, verbleibende grobe Gewebereste wurden anschließend durch Filtration über Nylonfilter (BD Biosciences, Heidelberg) mit einer Maschenweite von 100 µm entfernt. Die Zellsuspension wurde bei 300 x g, 4 °C, 8 min. pelletiert. Um Erythrozyten der Milzzellsuspension zu lysieren, wurde das Zellpellet in 5 ml hypotoner ACT-Lösung aufgenommen und für 5 min. bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das zehnfache Volumen an kaltem PBS hinzugefügt, die Zellen durch Zentrifugation pelletiert und abschließend in PBS bzw. Zellkulturmedium resuspendiert.

2.2.1.2. Zellzählung

Der Anteil vitaler Zellen wurde mikroskopisch durch Trypanblau-Ausschluss bestimmt. Ein Aliquot der Zellsuspension wurde im Verhältnis 1:10 mit Trypanblau in der Neubauer-Zählkammer gezählt. Tote Zellen sind dabei als Trypanblau⁺ erkennbar.

Für die in 3.3.1 und 3.3.2 geschilderten Experimente wurden die Zellzahlen in einem CASY® Model TT gezählt. Das Messprinzip basiert auf der Messung des elektrischen Widerstands in Abhängigkeit von der Größe einer Zelle, d.h. tote Zellen und Erythrozyten können aufgrund ihrer, im Vergleich zu vitalen Lymphozyten, geringeren Größe erkannt und ausgeschlossen werden. Für die Messung wurden Aliquots der Zellsuspensionen im Verhältnis 1:501 mit isotoner Casyton-Lösung verdünnt und dreimal im CASY gemessen.

2.2.1.3. Durchflusszytometrie

2.2.1.3.1. Extrazelluläre Färbung

Zellsuspensionen wurden in einer Zelldichte $< 5 \cdot 10^6$ Zellen/ ml in PBS/ NaN_3 aufgenommen. Unspezifische Bindungen über Fc-Rezeptoren wurde durch Absättigung mit monoklonalen Antikörpern gegen Fc-Rezeptoren (CD16, CD32) über einen Zeitraum von 15 min bei 4°C geblockt. Nach Zentrifugation und Waschen der Zellen erfolgte die Färbung durch Inkubation mit zuvor austitrierten Konzentrationen Fluorochrom- bzw. Biotin-konjugierter Antikörper für 15 min. bei 4°C. Bei Verwendung Biotin-konjugierter Antikörper erfolgte die Bindung der Streptavidin-Konjugate (mit den Fluorochromen PerCP oder APC) nach Zentrifugation und Waschen durch weitere Inkubation über 15 min. bei 4°C.

Die abschließend in PBS resuspendierten Zellen wurden im FACSCalibur mit dem Programme CellQuest analysiert.

2.2.1.3.2. Intrazelluläre Färbung

Intrazelluläre Färbungen erfolgten nach Fixierung mit Paraformaldehyd und Permeabilisierung mit Saponin. Hierzu wurden Lymphozyten in 2 % (w/v) Paraformaldehyd für 10 min. bei 37°C inkubiert und anschließend in Running Buffer gewaschen. Für die Permeabilisierung der Zellmembran wurden die Zellen in Permeabilisierungspuffer gewaschen. Für die intrazelluläre Färbung wurden die verwendeten Antikörpern in Permeabilisierungspuffer an Stelle von PBS verdünnt. Die Färbung wurde für 15 min. bei 37°C durchgeführt. Die gefärbten Zellen wurden in Permeabilisierungspuffer und anschließend in Running Buffer gewaschen und für die FACS-Analyse in Running Buffer suspendiert.

2.2.1.4. Zelltrennungen

2.2.1.4.1. Isolation von B-Zellen

B-Zellen der Milz wurden durch magnetische Zellseparation aufgereinigt. Hierzu wurden wie unter 2.2.1.1 beschrieben Einzelzellsuspensionen der Milz präpariert, welche mit koloidalen super-paramagnetischen ‚microBeads‘, konjugiert mit den angegebenen monoklonalen Antikörpern inkubiert wurden.

B-Zellen wurden durch "magnetische" Markierung und Depletion von T-Zellen und dendritischen Zellen aufgereinigt. Hierzu wurden $1 \cdot 10^7$ Zellen/ 100 μ l Running Buffer mit jeweils 10 μ l CD90-, und CD11c-spezifischen microBeads für 15 min. bei 4°C inkubiert. Ungebundene microBeads wurden durch Waschen im 5-10 fachen Volumen Running Buffer entfernt. Das Zellpellet wurde in 500 μ l Running Buffer resuspendiert und im autoMACS mit der Option "depletes" aufgereinigt. B-Zellen der negativen Durchflussfraktion wurden erneut gewaschen. Zur Überprüfung der Reinheit wurden ca. $2 \cdot 10^4$ Zellen der Negativfraktion mit α -B220 APC mAk oder α -CD19 APC mAk gefärbt (siehe Abschnitt 2.2.7) und im FACS aufgenommen. Bei Verunreinigung der Zellpopulation wurde die Zellseparation wiederholt. In einigen Experimenten war es durch starke Kontamination mit Granulozyten, welche im FACS anhand der höheren Granularität und Zellgröße erkennbar sind nötig, diese zu depletieren. Die Depletion von Granulozyten erfolgte durch Färbung mit 0.5 μ g α -CD11b biotin mAk in 100 μ l Running Buffer für 15 min. Nach Waschen der Zellen wurden diese in 60 μ l Running Buffer/ 10^7 Zellen resuspendiert und mit 40 μ l/ 10^7 Zellen α -Biotin microBeads für 10 min. bei 4°C inkubiert. Nach Waschen wurde die in 500 μ l resuspendierte Zellsuspension erneut auf eine autoMACS-Säule geladen. Die nach der Aufreinigung resultierende Negativfraktion wurde bis zu einer Reinheit von CD19⁺ bzw. B220⁺ Zellen >90% bzw. >95% wiederholt separiert.

2.2.1.4.2. Isolierung dendritischer Zellen

Dendritische Zellen (DZ) der Milz wurden in Anlehnung an ein Protokoll von Steinman *et al.* (Steinman *et al.* 1979) isoliert.

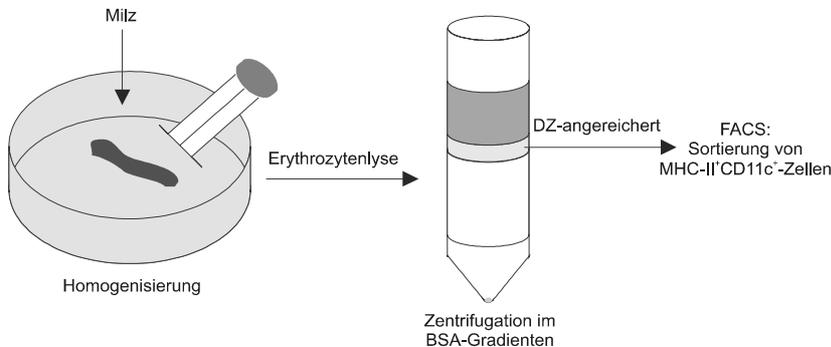


Abb. 2.2.1. Experimentelles Schema zur Isolierung dendritischer Zellen der Milz.

Vorbereitend wurde eine dichte BSA-Lösung wie folgt angesetzt und über Nacht bei 4°C gelöst:

BSA, Fraktion 5 (Serva, Heidelberg)	106 g
PBS	186 ml
1 M NaOH	29 ml
H ₂ O bidest	65 ml

Milzen wurden nach Entnahme in Petrischalen mit Zellkulturmedium nach Zusatz von 2 µg/ml Collagenase D und 1 µg/ml DNase I mit der Rückseite eines sterilen Spritzenstempels homogenisiert. Das Homogenat wurde für eine Stunde bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Zellsuspension gefiltert und in dem fünffachen Volumen Zellkulturmedium pelletiert. Das Zellpellet wurde in 5.5 ml eiskaltem, dichtem BSA resuspendiert und in Zentrifugenröhrchen überführt. Nach vorsichtigem Überschichten mit 1.5 ml kaltem Zellkulturmedium wurde der Ansatz bei 9500 x g für 15 min./ 4 °C zentrifugiert. Dendritische Zellen finden sich nach Zentrifugation in der Interphase zwischen BSA und Medium. Diese Interphase sowie der Überstand wurden in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und zweimal mit kaltem PBS gewaschen.

Um die Reinheit der dendritischen Zellen weiter zu erhöhen, wurden die Zellen im Durchflusszytometer sortiert. Zur Absättigung von Fc-Rezeptoren wurden die Zellen in 100 µl PBS mit 0.5 µg α-CD16/32 mAk für 15 min./ 4°C inkubiert, gewaschen und anschließend

mit je 0.5 μg $\alpha\text{-CD11c}$ APC mAk und $\alpha\text{-I-Ab}$ FITC mAk/ 100 μl PBS gefärbt. Die Zellen wurden nach Waschen in PBS auf eine Zelldichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ ml eingestellt. Die Sortierung erfolgte in 50 ml Zentrifugenröhrchen, gefüllt mit 5 ml PBS/ 10 % FKS (v/v). Um unspezifische Adhäsion der Zellen an die Plastikoberfläche zu unterbinden, wurden die Röhrchen für mindestens 24 Stunden mit 50 ml PBS/ 10 % FKS (v/v) bei 4°C gelagert, dieses anschließend bis auf verbleibende 5 ml abgegossen.

Dendritische Zellen wurden im Durchflusszytometer als FCS^{int} , SSC^{low} , $\text{CD11c}^{\text{high}}$ und MHC-II^+ charakterisiert und mit der Einstellung "Single Cell" der Steuerungssoftware sortiert. Die sortierten Zellsuspensionen wurden anschließend zweimal in PBS gewaschen. Um die Reinheit zu kontrollieren, wurde ein Aliquot der Zellen erneut im FACS aufgenommen. Die Reinheit der $\text{CD11c}^+\text{MHC}^+$ Zellen war $>97\%$.

2.2.1.5. CFSE-Fluoreszenzfärbung

Für die Färbung mit dem zellpermeablen Fluorochrom CFSE wurde das Vybrant® CFDA SE Cell Tracer Kit verwendet. In Anlehnung an Lyons *et al.* wurden Lymphozyten in einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ ml PBS mit $0.5 \mu\text{M}$ CFSE, gelöst in DMSO für 10 min./ 37°C im Wasserbad inkubiert (Lyons 2000). Ungebundenes CFSE wurde anschließend durch wiederholtes Waschen in eiskaltem PBS/ 10% FKS (v/v) entfernt.

2.2.1.6. Ficoll-Gradientenzentrifugation

Jeweils 5 ml Ficoll wurden mit bis zu $1 \cdot 10^8$ Zellen, suspendiert in 5 ml Zellkulturmedium überschichtet und bei $800 \times g$ / 20 min. / 20°C zentrifugiert. Die Interphase zwischen Medium und Ficoll wurde anschließend mit dem zehnfachen Volumen Zellkulturmedium gewaschen.

2.2.1.7 Apoptoseinduktion

Apoptose wurde durch Bestrahlung von Zellsuspensionen mit unterschiedlichen Energiedosen von 3-12 Gy, einer Bestrahlungszeit von 30 sec. -2 min. entsprechend, in einer gammacell - ^{137}Cs -Quelle induziert.

2.2.1.8. Apoptoseassays

Frühe Apoptosestadien sind durch die Exposition von Phosphatidylserin (PS) auf der Aussenseite der Zellmembran charakterisiert. Annexin-V bindet spezifisch und Ca^{2+} -abhängig an PS und kann so zur Bestimmung früher apoptotischer Zellen verwendet werden. Spät-apoptotische und nekrotische Zellen können durch zusätzliche Färbung mit DNA-interkalierenden Farbstoffen wie 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) diskriminiert werden. Annexin-

V⁺/7-AAD⁻ Zellen wurden als apoptotisch gewertet (Schutte *et al.* 1998). Zur Bestimmung apoptotischer Zellen wurden diese in Annexin Binding-Buffer gewaschen und für 15 min./ 4°C mit 1 µg Annexin-V biotin und 0.5 µg 7-Aminoactinomycin D (7-AAD) gefärbt. Nach einem erneuten Waschschrift in Annexin-V Binding-Buffer wurden die Zellen mit 0.5 µg Streptavidin-PerCP bzw. Streptavidin-APC für 15 min./ 4°C inkubiert und nach einem abschließenden Waschschrift im FACS untersucht.

2.2.1.9. Ni-Konzentrationsbestimmungen, Atomabsorptionsspektroskopie

2.2.1.9.1. Probenvorbereitung für die Atomabsorptionsspektroskopie

Die Messung des Nickelgehaltes in Blut, Organen und Ausscheidungen mittels Atomabsorptionsspektroskopie (Zeeman AAS 4100, Perkin-Elmer) erfolgte durch Dr. Jermann, IUF. Um Nickelverunreinigungen zu komplexieren wurden für die Probenaufbewahrung vorgesehene Mikroschraubgefäße mehrmals mit HNO₃ (10%) und anschließend mit Millipore-Wasser gespült. Die Gefäße wurden anschließend im Wärmeschrank bei ca. 40 °C getrocknet. Organe wurden mit Teflon-beschichteten Pinzetten und Scheren entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch Herzpunktion mit ebenfalls gereinigten Eppendorfpipetten, Urin wurde direkt in Mikroschraubgefäßen gesammelt. Die Proben wurden in flüssigem N₂ schockgefroren und bis zur Präparation bei -80°C gelagert.

2.2.1.9.2. Newport Green

Zur Untersuchung des Ni-Gehaltes isolierter B-Zellen wurde das für zweiwertige Kationen spezifische Fluorochrom Newport Green (NPG) verwendet. NPG besitzt eine Spezifität für Zn²⁺ sowie Ni²⁺, aber keine Spezifität für Ca²⁺ und Mg²⁺ (Accapezzato *et al.* 2003; Adler *et al.* 1998; Kurts *et al.* 1998) und besitzt nach Schwermetallbindung ein Absorptionsmaximum bei 490 nm sowie ein Emissionsmaximum bei 535 nm. Die Färbungen und Messungen mit NPG wurden in Anlehnung an Thierse durchgeführt (Thierse *et al.* 2004). Newport Green wurde von Dr. Thierse, Freiburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zellen wurden zweimal in NaCl (0.9%) gewaschen und in 100 µl NaCl mit 1 µM NPG für 30 min./ 4°C inkubiert. Nach Abschluss der Färbung und erneutem Waschen in NaCl wurde die grüne Fluoreszenzemission im FACS gemessen.

2.2.2. Genexpressionsanalysen

2.2.2.1. RNA-Isolation

RNA wurde durch Phenol:Chloroform-Extraktion mit TRIzol Reagent durchgeführt. Zellsuspensionen wurden pelletiert und in 1 ml TRIzol/ 10^7 Zellen resuspendiert. Nach fünfminütiger Inkubation auf Eis wurden zur DNA/ RNA-Extraktion 250 μ l Chloroform/ 10^7 Zellen zugefügt und der Ansatz auf dem Vortexer für 30 sec. gemischt. Der Ansatz wurde für 15 min bei 14000 x g zentrifugiert und anschließend die RNA-enhaltende wässrige, obere Phase in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Nukleinsäurefällung erfolgte durch Zugabe von 500 μ l 2-Propanol/ 10^7 Zellen, gefolgt von einer Zentrifugation bei 14000 x g für 10 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml Ethanol, 70% gewaschen und die RNA nach lufttrocknen in DEPC-H₂O durch Vortexen gelöst.

2.2.2.2. Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Vor der reversen Transkription von RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde kontaminierende DNA durch Inkubation mit DNase I entfernt. Hierzu wurden 1 μ g RNA in für 15 min. bei Raumtemperatur in 1x DNase-Puffer mit 1 U DNase I inkubiert und die Reaktion anschließend durch Zugabe von 1 μ l EDTA (25 mM) Reaktion gestoppt. Die DNase wurde durch Erhitzen auf 60°C für 10 min. inaktiviert. Für die Hybridisierung wurden 2 μ l eines oligo dT₁₆₋₁₈ Oligonukleotidprimers (1 μ g/ μ l) zugegeben, die Hybridisierung erfolgte bei 65°C für 5 Minuten, anschließend wurde. 27 μ l des vorbereiteten Reverse Transkriptase-Reaktionsansatzes (Tab.3) zu einem Gesamtvolumen von 40 μ l zugefügt. Die Reaktion wurde im Thermoblock bei 37°C für 60 min. durchgeführt, die Reverse Transkriptase anschließend für 10 min bei 70°C inaktiviert.

Tab. 3. Reverse-Transkriptase Reaktionsansatz

5x RT-Puffer	8 μ l
DEPC-H ₂ O	7 μ l
DTT (100 mM)	4 μ l
dNTP (ATP,CTP,GTP,TTP), je 10 mM	4 μ l
RNasin (40 U/ μ l)	2 μ l
MMLV-Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	2 μ l

Für die anschließenden Real-Time-PCR Analysen wurde 1/20 der RT-Reaktion mit dem SYBR Green Kit (Quiagen, Hilden) in einem LightCycler entsprechend der in 2.1.3.3. angegebenen Annelingtemperatur und Zyklenzahl amplifiziert.

Tab. 6. Real-Time-PCR Reaktionsansatz

SYBR Green Mastermix	10 μ l
forward primer (10 μ M)	2 μ l
reverse primer (10 μ M)	2 μ l
H ₂ O bidest	4 μ l
cDNA	2 μ l

2.2.3 Proteinexpressionsanalysen

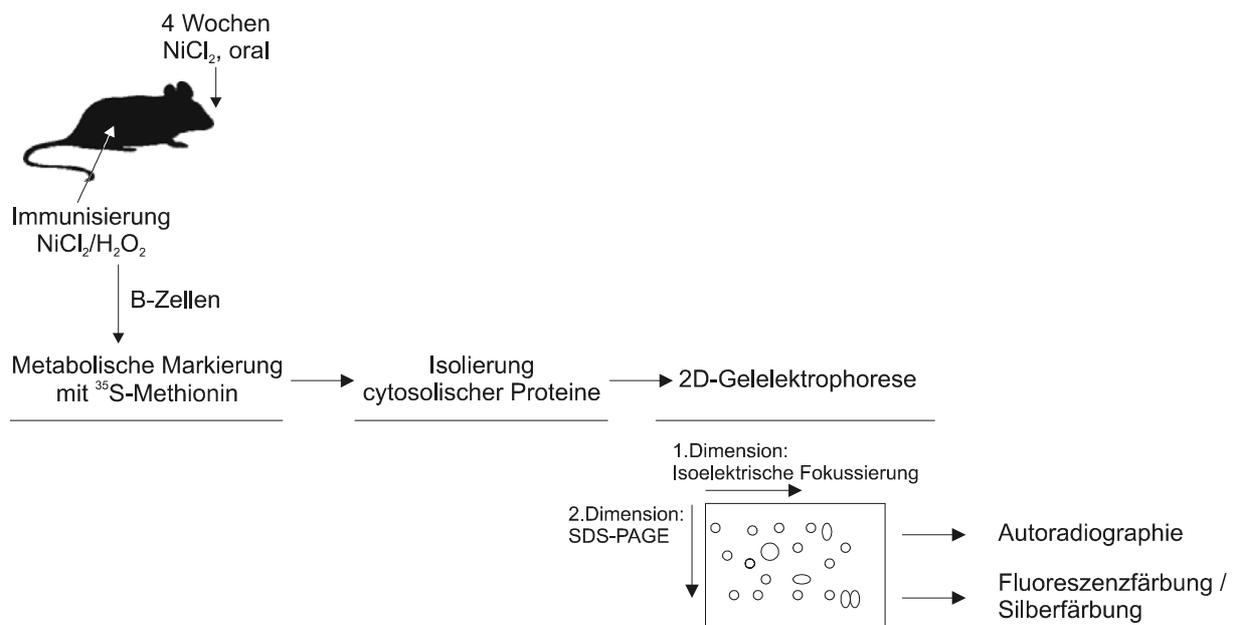


Abb.. 2.2.3. Experimentelles Design für die Proteinexpressionsanalysen.

2.2.3.1. Metabolische Markierung mit ^{35}S -Methionin

Die vorliegende Proteinexpression, angegeben als die zu gegebenem Zeitpunkt in der Zelle vorhandene Menge eines Proteins, ist ein wichtiger Parameter für die Beurteilung von Veränderungen der Proteinausstattung. Bei Proteinen mit niedrigem Umsatz ist die Information über die Translationsrate und den Abbau eines Proteins aussagekräftiger als die Menge vorliegenden Proteins. Dies wird durch metabolische Markierung von Zellen mit einer

radioaktiv markierten, essentiellen Aminosäure erreicht, die in neu translatierte Proteine eingebaut wird und durch Verfahren wie der Autoradiographie identifiziert werden kann. Meist wird zu diesem Zweck ^{35}S -markiertes Methionin verwendet. Die Qualität der metabolischen Markierung hängt entscheidend von der Depletion des zellulären Methioninpools ab. Zu diesem Zweck wurden die zu markierenden, isolierten B-Zellen in Met-freiem Medium (Invitrogen, Karlsruhe) gewaschen und anschließend bei einer Zelldichte von $5 \cdot 10^6$ Zellen/ml in Met-freiem Medium resuspendiert und für 15 Min. bei 37°C inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen pelletiert und in einer Dichte von $1 \cdot 10^7$ Zellen/ml in frisch angesetztem Met-freiem Medium mit $0.1 \text{ mCi/ml } ^{35}\text{S}$ -Methionin resuspendiert. Der Einbau des radioaktiven Methionins erfolgte über 2 Stunden bei 37°C im Brutschrank. Die Zellen wurden nach Ablauf der Zeit pelletiert, wiederholt in eiskaltem PBS gewaschen, und der Überstand abgesaugt. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.3.2. Isolierung cytoplasmatischer Proteine

Jeweils kurz vor der Präparation wurde der Aufschlusspuffer mit den Proteaseinhibitoren Pepstatin A ($1 \mu\text{g/ml}$), Leupeptin ($1 \mu\text{g/ml}$) sowie PMSF (1 mM) versetzt.

Um Zellen aufzuschließen wurden tiefgefrorene Zellpellets in hypotonem Aufschlusspuffer aufgenommen und mehrmals durch eine Pipettenspitze homogenisiert. Kerne und Cytoplasma wurden durch Zentrifugation bei $2000 \times g$ bei 4°C für 5 Min. getrennt. Das im Überstand befindliche Cytoplasma in frische Röhrchen überführt und mit dem vierfachen Volumen an -20°C kaltem absoluten Ethanol versetzt. Die Fällung der Proteine erfolgte über Nacht bei -20°C , anschließend wurden die cytosolischen Proteine durch Zentrifugation bei $4000 \times g$ bei 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Um verbleibende Restflüssigkeit zu entfernen, wurden die Pellets im Exsikkator getrocknet. Abschließend wurden die Pellets in ca. $50 \mu\text{l}$ Sample-Buffer gelöst.

2.2.3.3. Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung erfolgte nach einer von Bradford (Bradford 1976) beschriebenen Methode. Der Proteinansatz wurde im Verhältnis 1:200 mit bereits 1:5 vorverdünntem Bradford-Reagenz verdünnt und für 5-20 Min. ein Raumtemperatur inkubiert. Als Proteinstandard wurde eine Verdünnungsreihe mit Rinderserumalbumin (BSA) bekannter Konzentrationen angesetzt. Die Absorption der Proben wurde anschließend photometrisch bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen wurden anhand der erstellten BSA-Standardkurve errechnet.

2.2.3.4. Zweidimensionale Gelelektrophorese

2.2.3.4.1. Erste Dimension: Isolelektrische Fokussierung (IEF)

Die Auflösung der Proteine anhand ihres pI-Wertes erfolgte elektrophoretische Auftrennung in einer Matrix mit bereits eingebetteten Ampholyten (IPG-Strips, Bio-Rad). 300 µg Protein wurden in Sample Buffer auf ein Gesamtvolumen von 280 µl verdünnt, 1.5 µl Ampholyte, pH 3.5-10 sowie 0.5 µl 1% Bromphenolblau hinzugefügt. Die IPG-Streifen wurden vorsichtig mit dem Proteinansatz benetzt, um Austrocknen zu verhindern, nach ca. 15 min. mit Mineralöl (Dry Strips Cover Oil, Bio-Rad) überschichtet und über Nacht bei Raumtemperatur stehengelassen. Die Elektrophorese wurde in fertigen Geltroggrinnen (Bio-Rad) mit einer konstanten Temperatur von 25 °C nach folgendem Programm durchgeführt:

1h:	0V - 500V linearer Gradient	30mA 20W
5h:	500V konstant	40mA 40W
5h:	500V - 3500V linearer Gradient	40mA 30W
12h:	3500V konstant	30mA 30W

2.2.3.4.2. Zweite Dimension: SDS-PAGE

In der SDS-PAGE werden Proteine im elektrischen Feld anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Das amphiphile Detergenz SDS lagert sich stöchiometrisch an Proteine, denaturiert die Proteine und hebt den Einfluss der Ladung des Proteins auf die Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld auf (Wilson, K., in Methoden der Biochemie 2004(2004)). Die aufgetrennten Proteine können anschließend angefärbt oder isoliert werden. Im Fall radioaktiver Proben können diese durch Autoradiographie nachgewiesen und quantifiziert werden.

Die Proteinseparation nach Molekulargewicht erfolgte durch Auftrennung in einem 12 % Polyacrylamidgel mit folgender Zusammensetzung:

23 ml 30 % (w/v)	Acrylamid/ 0.8 % (w/v) Piperazindiacrylamid
11.5 ml	2 M TRIS-HCl, pH 8.8
23 ml	H ₂ O
0.02 ml	Ammoniumperoxodisulfat, 10 % (w/v)
0.004 ml	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Die aus der isoelektrischen Fokussierung gewonnenen IPG-Streifen wurden zuvor wie folgt behandelt: Um Sulfhydryl-Gruppen zu irreversibel zu reduzieren wurden die Streifen nach Abstreifen des Öls mit je 2 ml Equilibrierungslösung/ 100 mM DTT für 10 min. geschüttelt. Die irreversible Alkylierung der reduzierten SH-Gruppen erfolgte für 10 min. in je 2 ml Equilibrierungslösung mit 2.5 % Iodacetamid, ebenfalls unter Schütteln. Die fertigen IPG-Streifen wurden auf den SDS-Gelen platziert und in heisse Cover Solution eingebettet. Die Elektrophorese der Proteine erfolgte für ca. 5 Stunden bei einem Strom von 150 mA/ 4 Gelen, einer Kühlung auf 15-20°C in Elektrodenpuffer.

2.2.3.4.3. Fluoreszenzfärbung

Die Gele wurden zunächst über Nacht fixiert und anschließend zweimal mit 20 % (v/v) Methanol gewaschen und jeweils für 5 min. inkubiert. Die Färbung mit RuBPS erfolgte für 6 Stunden. Ungebundenes RuBPS wurde durch Inkubation in Entfärbelösung über Nacht entfernt. Alle Inkubationsschritte wurden bei Raumtemperatur auf einem Schüttler ausgeführt.

2.2.3.4.4. Fluorographie und Autoradiographie

Nach erfolgter RuBPS-Färbung (siehe 2.2.3.6.2.) wurden die SDS-Gele in einem Fluoreszenzdetektor (FluorImager 595, Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) ausgelesen. SDS-Gele, welche radioaktiv markierte Proteine enthielten, wurden nach Auslesen der Fluoreszenz unter Vakuum bei 40°C für drei Stunden getrocknet. PhosphoImager-Verstärkerfilme (low energy screen, Amersham Pharmacia) wurden mit den getrockneten Gelen die für jeweils angegebenen Zeiträume exponiert und anschließend in einem PhosphoImager (Amersham Pharmacia) ausgelesen.

Die Auswertung der Fluoreszenzbilder und Autoradiogramme erfolgte mit den Programmen ImageQuant und ImageMaster Platinum.

2.2.4. Tierexperimentelle Methoden

2.2.4.1. Haltung der Versuchstiere

Im folgenden als Ni^{low} bzw. Ni^{high} bezeichnete C57BL/6 Mäuse wurden in Kunststoffkäfigen (Makrolon, Ebeco, Castrop-Rauxel) mit Abdeckungen aus Edelstahl (Werkstoff 1.4301, Ebeco, Castrop-Rauxel) gehalten. Trinkwasser wurde in Kunststoffflaschen mit Metallauslässen angeboten. Alle Tiere erhielten konventionelles Haltungsfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest).

C57BL/6 Mäuse, welche im Folgenden als Ni^{very low}-Mäuse bezeichnet werden, wurde unter Bedingungen minimierter Nickelexposition gezüchtet und aufgezogen. Die Käfige dieser Tiere waren mit Kunststoffdeckeln ausgestattet, normales Trinkwasser wurde in Kunststoffflaschen mit Glasauslässen angeboten.

Für Experimente wurden 5-8 Wochen alte Tiere verwendet, welche unter diesen Bedingungen für zwei Generationen gezüchtet und gehalten wurden. Die Tiere erhielten konventionelles Haltungsfutter, Zuchttiere erhielten spezielles proteinangereichertes Zuchtfutter (beides Ssniff Spezialdiäten, Soest).

Alle durchgeführten Tierversuche waren beim Regierungspräsidium Düsseldorf angemeldet und genehmigt.

2.2.4.2. Toleranzinduktion

5-6 Wochen alte weibliche Mäuse der angegebenen Stämme erhielten für einen Zeitraum von 4-8 Wochen als Trinkwasser 10 mM NiCl₂·6 H₂O. Dieses wurde in 50% H₂O ad libitum, 50 % aqua bidest. gelöst, welches durch 0.2 µm Filter sterilfiltriert wurde. Zur klaren Unterscheidung werden diese Tiere im Folgenden als Ni^{high}-Mäuse bezeichnet.

Gleichaltrige Kontrollmäuse, im Folgenden als Ni^{low} bezeichnet, erhielten normales Trinkwasser.

2.2.4.3. Adoptivtransfers

Zu transferierende Zellsuspensionen wurden wiederholt in pyrogenfreiem PBS gewaschen. 5-8 Wochen alte Mäuse, welche für ca. 15 min., um die Schwanzvene zu dilatieren, unter einer Rotlichtlampe saßen, erhielten i.v. Injektionen der angegebenen Zellzahlen in je 150 µl PBS in die Schwanzvene. 24 Stunden nach dem Adoptivtransfer wurden die Empfängermäuse wie unter „Immunisierung“ angegeben immunisiert.

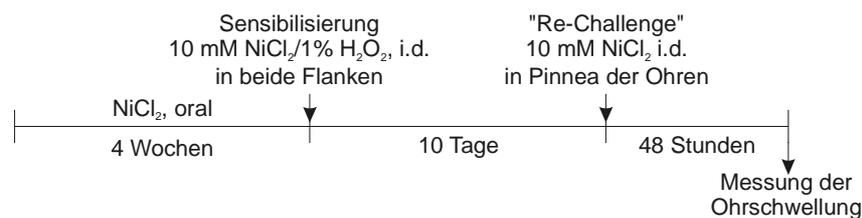
2.2.4.4. Immunisierung

Immunisierungen erfolgten durch intradermale Injektionen von je 50 μ l 0.9% NaCl, 10 mM NiCl₂ oder 10 mM NiCl₂/ 1 % H₂O₂ in beide Flanken.

2.2.4.5. "Re-Challenge", Maus-Ohrschwellungstest

Zehn Tage nach der Immunisierung erfolgte die Auslösung der Zweitantwort („Re-Challenge“) durch intradermale Injektion von jeweils 50 μ l 10 mM NiCl₂ in die Pinnae beider Ohren. Zwei Tage nach der Auslösung der allergischen Zweitantwort ("Re-Challenge") wurde die Ohrdicke mit einem Längenmessgerät Oditest von zwei Experimentatoren doppelt-blind, d.h. ohne Kenntnis der zuvor codierten Versuchsgruppe, bestimmt. Die Ohrschwellung wurde als Inkrement der Ohrdicke vor dem Re-Challenge bestimmt. Als Konstante der basalen Ohrdicke dienten über einen Zeitraum > 2 Jahren wiederholt an altersgleichen Mäusen erhobene Messungen mit einem Mittelwert von $27 \cdot 10^{-2}$ mm.

Maus-Ohrschwellungstest



Adoptivtransfer

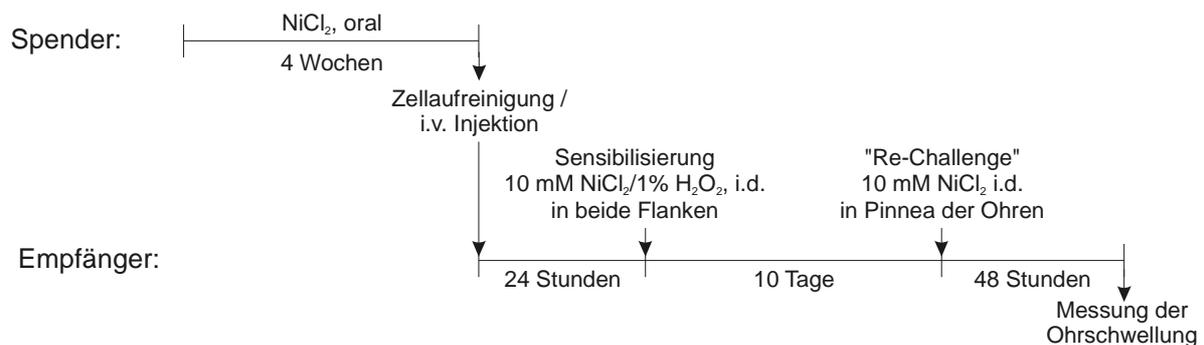


Abb. 2.2.4. Experimentelle Protokolle von Maus-Ohrschwellungstest und Adoptivtransfer.

2.2.5. Statistische Auswertung

Die Auswertung der Ohrschwellungsdaten erfolgte mit Graphpad Prism 3.0. Zur statistischen Auswertung der Signifikanz wurde der One-way ANOVA-Test mit anschließendem Newman-Keuls-Post-Test verwendet. Die statistische Auswertung der FACS-Daten erfolgte in Microsoft Excel mittels Student t-Test.

3. Ergebnisse

Vorarbeiten von Artik *et al.* und Roelofs-Haarhuis *et al.* zeigten, dass eine vierwöchige orale Gabe von NiCl_2 zur Ausbildung einer stabilen, dauerhaften und gegen Nickel spezifischen Toleranz führt. Diese Toleranz ist durch T-Zellen der Milz sowie B-Zellen auf syngene Empfänger übertragbar (Artik *et al.* 2000; Artik *et al.* 2001; Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003b).

In den im folgenden Abschnitt geschilderten Experimenten wurde die Frage untersucht, ob die orale Ni-Applikation zu Veränderungen des Phänotyps von B-Zellen und dendritischen Zellen führt.

3.1. Veränderungen der Milz durch Nickel

3.1.1. Organgewicht und B-Zellpopulation

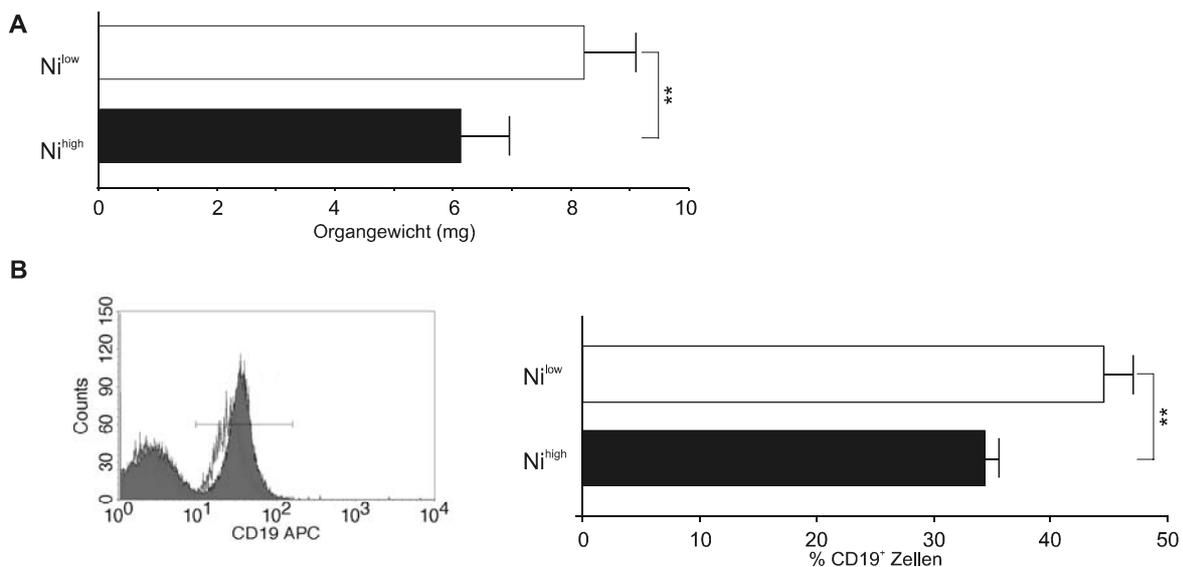


Abb. 3.1.1. Reduzierte Milz und Veränderungen der B-Zellfraktion durch Nickel.

A. Gewicht der Milzen aus Ni^{low} - und Ni^{high} -Mäusen ($n=7$). **B.** Prozentualer Anteil von B-Zellen der Milz. Einzelzellsuspensionen wurden mit einem α -CD19 mAk gefärbt. Links: Repräsentative Darstellung der CD19-Färbung der untersuchten Milzen (Ni^{low} , grau hinterlegt; Ni^{high} , grün). Rechts: Graphische Darstellung des Anteils CD19⁺ Zellen + Standardabweichung. Die Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Milzen oral mit Nickel behandelte Mäuse wurden nach abgeschlossener Toleranzinduktion auf ihr Gewicht, also indirekt die Zellulärität, getestet. Wie aus Abb. 3.1.1.A ersichtlich ist, weisen die Milzen oral toleranter Mäuse im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ein um ca. 20 % verringertes Gewicht auf. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde anhand einer CD19-Färbung der Anteil von B-Zellen untersucht, diese sind mit ca. 50% die grösste Milzzellpopulation (Coligan, J. E., In Vitro Assays for Mouse Lymphocyte Function, in

Current Protocols in Immunology 2004). Wie in Abb. 3.1.2.B. dargestellt ist, besitzen Ni^{high} -Mäuse einen mittleren Anteil von 35 % B-Zellen in der Milz. Dies entspricht einer im Vergleich zu unbehandelten (Ni^{low} -) Mäusen Reduktion um 24 %.

3.1.2. Phänotypische und genotypische Veränderungen von B-Zellen und dendritischen Zellen durch Nickel

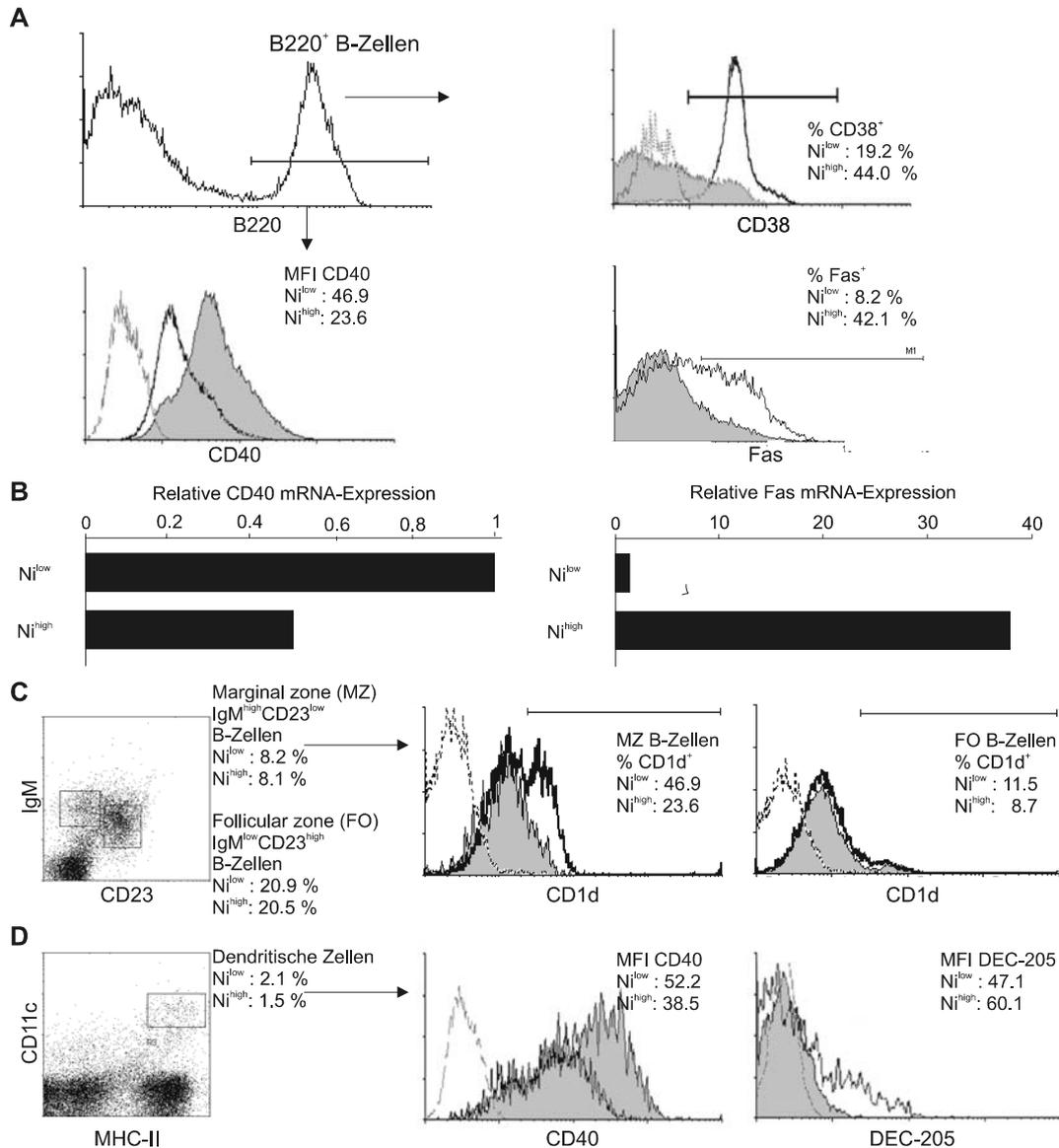


Abb. 3.1.2. Phänotyp und Genotyp von B-Zellen und DZ nach oraler Toleranzinduktion.

A. CD38, CD40 sowie Fas-Proteinexpression auf B220⁺ B-Zellen aus Ni^{high} - (fette Linie) und Ni^{low} -Mäusen (grau gefüllt). Unterbrochene Linie: Färbung mit entsprechenden Isotyp-identischen mAk.

B. CD40 und Fas mRNA-Expression isolierter B220⁺ Milzzellen aus Ni^{high} -B-Zellen im Vergleich zu Ni^{low} -B-Zellen, durch Real-Time-PCR untersucht.

C. CD1d-Expression auf $IgM^{low}CD23^{high}$ („Follicular zone“) und $IgM^{high}CD23^{low}$ („marginal zone“) B-Zellen der Milz aus Ni^{high} - (fette Linie) und Ni^{low} -Mäusen (grau hinterlegt).

D. CD40-Expression und intrazelluläre DEC-205 von MHC-II⁺CD11c⁺ (DZ) Milzzellen aus Ni^{high} - (fett) und Ni^{low} -Mäusen (grau hinterlegt). Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für mindestens drei Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Wie in Punkt 2.2.4.2 beschrieben, wurde C57BL/6 Mäusen 10 mM NiCl₂ für 4 Wochen im Trinkwasser verabreicht (Ni^{high}), Kontrolltiere (Ni^{low}) erhielten unsupplementiertes Trinkwasser. Einzelzellsuspensionen der Milz dieser Mäuse werden mit monoklonalen Antikörpern gegen CD38, CD40 oder DEC-205 gefärbt. B-Zellen wurden durch Anfärbung mit einem B220-spezifischen Antikörper differenziert, die Charakterisierung dendritischer Zellen erfolgte nach Gegenfärbung mit anti-CD11c sowie anti-MHC-II Antikörpern, dendritische Zellen wurden als MHC-II⁺CD11c⁺ charakterisiert.

Die orale Gabe von NiCl₂ im Trinkwasser führte zu einer um ca. 50 % verminderten CD40-Expression auf Ni^{high}-B-Zellen (MFI 23.6) verglichen mit B-Zellen altersgleicher Kontrollmäuse (Ni^{low}, MFI 46.9). Die Reduktion der CD40-Expression auf B-Zellen war mit einer Reduktion der CD40 mRNA-Expression verbunden (Abb. 3.1.2,B). Diese Veränderungen der CD40-Expression waren nicht auf B-Zellen beschränkt, da auch CD11c⁺ dendritischen Zellen eine Reduktion der CD40 Expression aufwies (Abb. 3.1.2, D). Wie in Abb. 3.1.2.A weiterhin dargestellt ist, besaßen Ni^{high}- verglichen mit Ni^{low}-B-Zellen eine erhöhte Fas-Expression. Diese erhöhte Fas-Proteinexpression konnte durch Real-Time-PCR als Erhöhung der Fas mRNA-Expression bestätigt werden (Abb. 3.1.2, B). Oral mit NiCl₂ behandelte Mäuse zeigen eine stark erhöhte Zahl CD38-exprimierender B-Zellen der Milz (Abb. 3.1.2, A).

DEC-205 gehört zur Familie der Multilektinrezeptoren und vermittelt neben anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie die Rezeptor-vermittelte Endozytose. In der Milz wird DEC-205 von dendritischen Zellen exprimiert. In der Literatur wird DEC-205 mit der tolerogenen Funktion dendritischer Zellen in Verbindung gebracht. So präsentieren dendritische Zellen über DEC-205 phagozytiertes Antigen an T-Zellen und führen schließlich zur Induktion regulatorischer T-Zellen (Bonifaz *et al.* 2002; Hawiger *et al.* 2001; Mahnke *et al.* 2003). Die experimentelle Bindung eines Ovalbumin-konjugierten DEC-205-Antikörpers an DEC-205⁺ DZ führt zur Aufnahme dieses Komplexes in lysosomale Kompartimente der Zelle von wo der leere Rezeptor schließlich zurück zur Zellmembran zurückgeführt wurde (Mahnke *et al.* 2000). Die DEC-205-Expression wurde daraufhin durch Anfärbung fixierter und permeabilisierter Zellen getestet. Milz-DZ Ni-behandelter Mäuse wiesen im Vergleich zu solchen unbehandelter Mäuse eine erhöhte intrazelluläre DEC-205 Expression auf (Abb. 3.1.2, C).

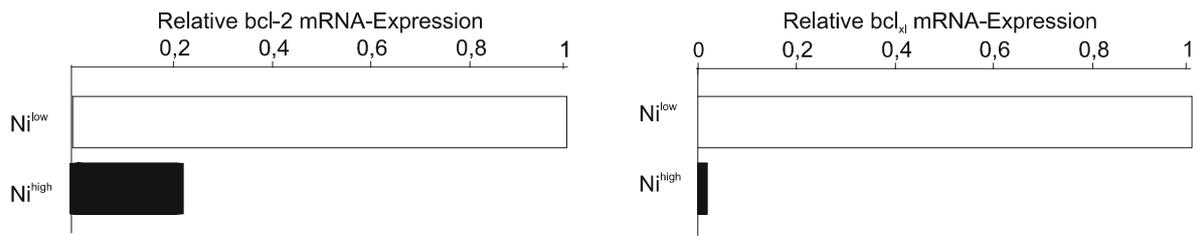


Abb. 3.1.3. bcl-2 und bcl_{xl} mRNA-Expression.

Relative bcl-2 und bcl_{xl} mRNA-Expression in Ni^{high}-B-Zellen im Vergleich zu Ni^{low}-B-Zellen, mittels Real-Time-PCR untersucht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 2 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

Ni^{high} B-Zellen sind durch eine einerseits stark verminderte Kostimulation (CD40) und andererseits erhöhten Expression des Fas-Rezeptors gekennzeichnet (Abb. 3.1.2). CD40 ist neben seiner kostimulatorischen Funktion als „Überlebensfaktor“ für B-Zellen bekannt. Umstritten ist, ob die Ligation von CD40 zur Induktion oder Reduktion der Expression anti-apoptotischer Proteine wie bcl-2 und bcl_{xl} führt (Bjorck *et al.* 1997; Fang *et al.* 1997; Reid *et al.* 1997). Aufgrund dieser B-Zellcharakteristika wurde untersucht, ob die vierwöchige Behandlung mit NiCl₂ im Trinkwasser in B-Zellen die Expression der anti-apoptotischen bcl-Proteine bcl-2 und bcl_{xl} moduliert. Durch Real-Time-PCR wurde die mRNA-Expression dieser Proteine in Ni^{high}- und Ni^{low}-Mäusen untersucht. Wie in Abb. 3.1.3 dargestellt ist, zeigte sich in Ni^{high} B-Zellen eine stark herabgesetzte Expression von bcl-2 und bcl_{xl} um mindestens das fünffache.

3.2. Mechanismen der Toleranzinduktion durch B-Zellen

Oral mit NiCl₂ behandelte Mäuse besitzen sowohl regulatorische T-Zellen (Artik *et al.* 2001) wie auch B-Zellen, die in der Lage sind, eine gegen Nickel spezifische Toleranz auf syngene Empfänger zu übertragen (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003b). Nach der Untersuchung phänotypischer Veränderungen von B-Zellen und dendritischen Zellen durch die orale Gabe von NiCl₂, sollten die Mechanismen der Toleranzinduktion durch B-Zellen untersucht werden. Wie in Abschnitt 1.2.3.4. bereits geschildert, ist bislang nur wenig über die Rolle von B-Zellen an der immunologischen Toleranz bekannt. Wie die Abb. 3.1.2. und 3.1.3 darstellen, besitzen B-Zellen oral Ni-toleranter (Ni^{high}) Mäuse einen veränderten Phänotyp (CD40^{niedrig}, Fas^{hoch}, bcl-2^{niedrig}, bcl_{xl}^{niedrig}), der apoptotische Mechanismen in der Induktion der Ni-Toleranz suggeriert.

Neben dem Befund, dass Fas- und FasLigand-defekte Mäuse Symptome der Autoimmunität zeigen (Watanabe-Fukunaga *et al.* 1992), deuten weitere Arbeiten auf eine Funktion von Fas und FasLigand für die Toleranzinduktion hin (Gao *et al.* 1998; Griffith *et al.* 1996; Schwarz *et al.* 1998).

3.2.1. Fas- und FasLigand-Abhängigkeit der oralen Toleranzinduktion

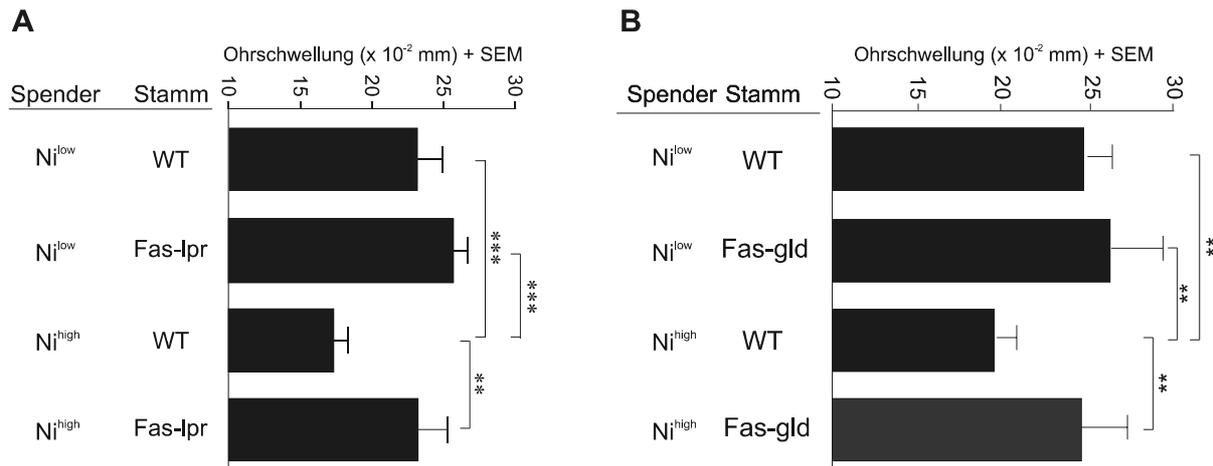


Abb. 3.2.1. Die Induktion der Nickeltoleranz wird durch Fas und FasLigand vermittelt.

Fas-lpr (A), Fas-gld (B) oder C57BL/6 Mäuse („WT“) erhielten für 4 Wochen 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser oder unsupplementiertes Trinkwasser. Danach erhielten die Mäuse Injektionen von 10 mM NiCl₂ + 1% H₂O₂ („NiCl₂/H₂O₂“) intradermal in beide Flanken, nach weiteren 10 Tagen wurde die Zweitantwort durch intradermale Injektion von 10 mM NiCl₂ in die Pinnea beider Ohren ausgelöst, die Ohrschwellung wurde nach weiteren 48 Stunden gemessen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*, p≤0.05, **, p≤0.01, ***, p≤0.001).

Um eine funktionelle Relevanz von Fas und FasLigand im Modell der oral induzierten Toleranz gegen Nickel zu testen, wurden Fas- und FasLigand-defiziente Mausstämmen nach oraler Ni-Applikation im Maus-Ohrschwellungstest (MEST) auf eine Toleranz untersucht.

Wie bereits aus Vorarbeiten (Artik *et al.* 1999; Artik *et al.* 2001) bekannt, führten intradermale Injektionen von NiCl₂/H₂O₂ und anschließende Injektionen von NiCl₂ zur Auslösung einer Zweitantwort, die an der signifikant erhöhten Ohrschwellung (Abb. 3.2.1, Gruppe 1 verglichen mit Gruppe 3) erkennbar war. Wurden C57BL/6 Mäuse nach oraler Ni-Applikation durch NiCl₂/H₂O₂ immunisiert, so zeigte sich eine gegenüber diesen Mäusen signifikant verringerte Ohrschwellung im MEST. Dies wurde als Toleranz gewertet. Vergleichbare Reaktionen zeigten sich in Fas-defizienten Fas-lpr (Abb. 3.2.1, A) und FasLigand-defizienten Fas-gld (Abb. 3.2.1, B) Mäusen ohne orale Nickelgabe nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂. Dabei war zu erkennen, dass Fas-gld eine gegen C57BL/6-WT Mäusen leicht erhöhte Ohrschwellung aufwies.

Nach oraler Verabreichung von NiCl₂, anschließender Sensibilisierung mit NiCl₂/H₂O₂ und Re-Challenge zeigte sich bei diesen Tieren allerdings keine Reduktion der Ohrschwellung. Weder in Fas- noch FasLigand-defizienten Mäusen konnte die orale Applikation von NiCl₂ im Trinkwasser eine Toleranz induzieren.

3.2.2. Tolerogene B-Zellen müssen funktionelles Fas exprimieren

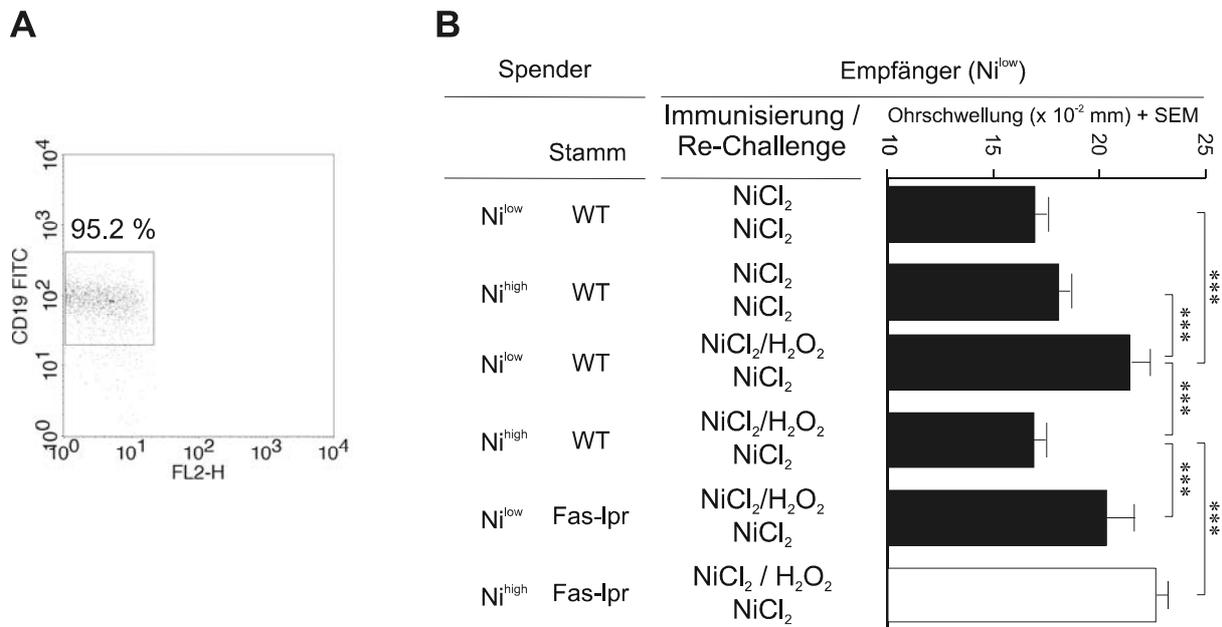


Abb. 3.2.2. Tolerogene B-Zellen müssen funktionelles Fas exprimieren.

Fas-lpr oder WT-Mäuse erhielten 10 mM NiCl₂ im Trinkwasser wie unter Material und Methoden beschrieben. **A.** CD19⁺ B-Zellen wurden durch magnetische Depletion von CD11b⁺, CD11c⁺, Thy1.2⁺ Zellen zu einer Reinheit >95 % sortiert. 10³ B-Zellen wurden adoptiv in syngene C57BL/6 Mäuse übertragen. **B.** Die Empfängerermäuse wurden anschließend im Maus-Ohrschwellungstest auf eine Toleranz gegen Nickel getestet. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*, p < 0.05, **, p < 0.01, ***, p < 0.001).

Fas und FasLigand sind für die Induktion der Nickeltoleranz nötig (Abb. 3.2.1). Es sollte daher untersucht werden, auf welchen Zellen Fas exprimiert werden muss, um eine Toleranz zu induzieren. Aufgrund der Vorbefunde des veränderten Phänotyps von B-Zellen, d.h. der verringerten Expression der anti-apoptotischen Proteine bcl-2 und bcl_{xl} sowie der erhöhten Fas-Expression, erschienen Ni^{high}-B-Zellen als relativ leicht Apoptose-induzierbar. Obwohl die Arbeiten von Roelofs-Haarhuis *et al.* zeigten, dass Ni^{high}-B-Zellen eine gegen Nickel spezifische Toleranz übertragen, blieben die Mechanismen ungeklärt.

In Zusammenarbeit mit Frank Kopp, Institut für umweltmedizinische Forschung, wurde daher im folgenden Experiment untersucht, ob Ni^{high}-B-Zellen Fas exprimieren müssen um die Ni-Toleranz übertragen zu können.

C57BL/6 Wildtyp oder Fas-lpr Mäuse wurden, wie in 2.2.4.2 beschrieben, für 4 Wochen mit NiCl₂ im Trinkwasser versorgt oder erhielten normales Trinkwasser. Nach Beendigung der Ni-Applikation wurden diese Spendertiere getötet und CD19⁺ B-Zellen der Milz aufgereinigt. Wiederholte Depletion von Thy1.2⁺, CD11b⁺ und CD11c⁺ Zellen resultierte in einer Reinheit > 95 % CD19⁺ Zellen. Abb. 3.2.2,A stellt exemplarisch die durchflusszytometrische Analyse der Reinheit der transferierten B-Zellen nach Anfärbung mit einem CD19-spezifischen Antikörper dar. 10³ B-Zellen wurden in Ni^{low}-Empfänger übertragen und diese nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ im Maus-Ohrschwellungstest auf eine Toleranzübertragung durch B-Zellen getestet.

Im Gegensatz zu B-Zellen oral mit Nickel behandelter WT-Mäuse waren Fas-defiziente B-Zellen (Fas-lpr) nicht in der Lage, in Wildtypempfängern eine Toleranz gegen Nickel zu induzieren. Daraus wurde geschlossen, dass der Apoptose-induzierende Rezeptor Fas eine Funktion in der Fähigkeit von B-Zellen besitzt, die Ni-Toleranz übertragen zu können.

3.3. Mechanismen der Fas-vermittelten Tolerogenität von B-Zellen

Es konnte nachgewiesen werden, dass die Übertragung der Toleranz durch tolerogene B-Zellen von funktioneller Fas-Expression auf diesen Zellen abhängig ist. Es sollte daher im folgenden Komplex untersucht werden, über welche Schritte tolerogene, Ni^{high}-B-Zellen in Wildtypempfängern eine Toleranz gegen Nickel induzieren.

Im weiteren lag der Fokus auf folgenden Fragen:

3.3.1. Wird in Ni^{high}-B-Zellen Fas-vermittelte Apoptose induziert ?

In welchen lymphatischen Organen findet diese statt ?

Wird die Apoptose durch die Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ gesteuert ?

3.3.2. Werden apoptotische B-Zellen durch dendritische Zellen phagozytiert ?

3.3.3. Führt die Phagozytose apoptotischer B-Zellen zur Bildung tolerogener DZ ?

3.3.1. Apoptose tolerogener B-Zellen

3.3.1.1. Lokalisierung und Steuerung der Apoptose

Nachdem gezeigt wurde konnte, dass tolerogene B-Zellen Fas exprimieren müssen, ergaben sich zwei weitere Fragen. Zum einen sollte geklärt werden, ob in tolerogenen B-Zellen *in vivo* Apoptose induziert wird um zum zweiten, in welchen Organen dies geschieht.

Zur Klärung dieser Fragen wurden Milzzellen von Ni^{high}- oder Ni^{low}-Mäusen *in vitro* mit dem Fluoreszenzmarker CFSE inkubiert, um sie nach Adoptivtransfer in Wildtypmäuse von Zellen des Empfängers unterscheiden zu können. Die Empfängermäuse wurden 24 Stunden nach dem Transfer mit 10 mM NiCl₂ oder 10 mM NiCl₂/1 % H₂O₂ immunisiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die axillären und inguinalen Lymphknoten und Milzen entnommen. Apoptotische Zellen der untersuchten Organe wurden anhand der typischen Exposition von Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran identifiziert und quantifiziert. PS wird bei vitalen Zellen lediglich auf der Innenseite der Lipiddoppelschicht exprimiert und ist bereits früh nach Induktion der Apoptose auch auf der Außenseite zu detektieren. Annexin-V bindet spezifisch und Ca²⁺-abhängig an Phosphatidylserin (PS) (Vermes *et al.* 1995). B-Zellen wurden durch Färbung mit einem α -CD19 mAk identifiziert.

Wie in Abb. 3.3.1.1 dargestellt ist, konnten nach Adoptivtransfer von Ni^{low}-B-Zellen und Immunisierung mit NiCl₂ oder NiCl₂/H₂O₂ in der Milz vergleichbare Fraktionen apoptotischer Spender-B-Zellen festgestellt werden (39.8% zu 41.3 %). Diese Werte waren vergleichbar mit dem als Kontrolle erhobenen Anteil CD19⁻ Empfängerzellen nach Immunisierung mit NiCl₂ (Abb. 3.3.1.1,B). Im Vergleich dazu war ein größerer Anteil der Ni^{high}-B-Zellen nach diesen Immunisierungen apoptotisch, wobei festzustellen ist, dass Immunisierungen mit NiCl₂/H₂O₂ (60.2%, Abb. 3.3.1.1,F) in der Stimulation der Ni^{high}-B-Zellapoptose effektiver waren als NiCl₂ ohne H₂O₂ (51.3%, Abb. 3.3.1.1, E). In Abb. 3.3.1.1,G und H sind diese für die Milz erhobenen Werte den der drainierenden Lymphknoten (FACS-Plots nicht dargestellt) gegenübergestellt. In den drainierenden axillären und inguinalen Lymphknoten war im Vergleich zur Milz ein wesentlich geringerer Anteil der Spender-B-Zellen 24 Stunden nach Immunisierung apoptotisch.

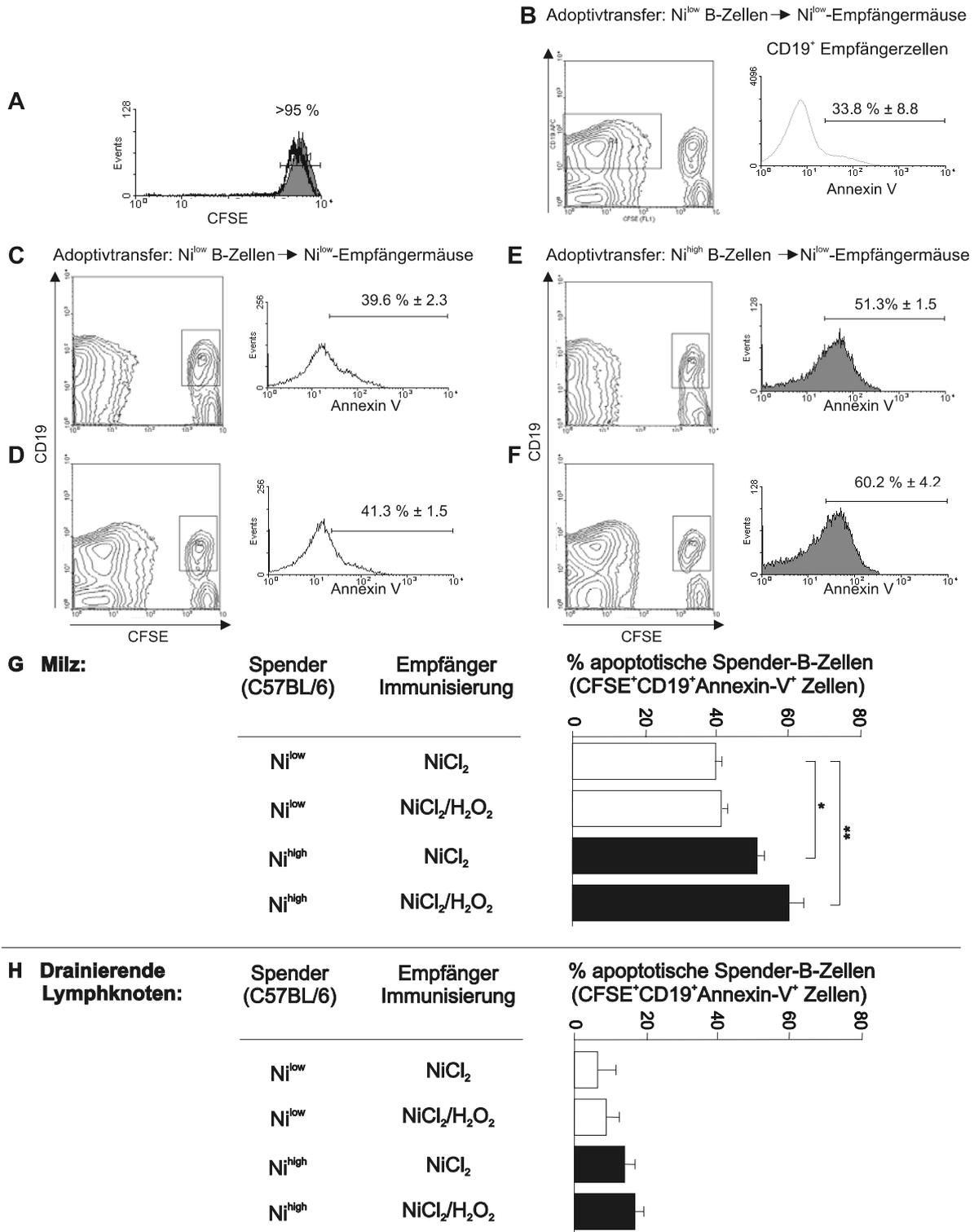


Abb. 3.3.1.1. Apoptose von Ni^{high}-B-Zellen nach Adoptivtransfer und Immunisierung.

A. Ni^{high}- oder Ni^{low}-B-Zellen wurden mit 0.5 µM CFSE gefärbt. 10⁷ Milzzellen von Ni^{low}- (C,D) oder Ni^{high}-Mäusen (E,F) wurden adoptiv in unbehandelte Empfänger übertragen, diese 24 Stunden später mit 10 mM NiCl₂ (C,E) oder 10 mM NiCl₂/1%H₂O₂ (D,F) intradermal in beide Flanken immunisiert. Drainierende axilläre und inguinale Lymphknoten sowie die Milzen der Empfängermäuse wurden nach weiteren 24 Stunden entnommen und mit einem α-CD19 mAk sowie Annexin-V gefärbt. **B.** Apoptotische CD19⁺Empfängerzellen 24 nach Immunisierung mit NiCl₂.

C-F. Exemplarische Darstellung der FACS-Analyse der Empfängermilzen.

G, H. Graphische Darstellung der aus der FACS-Analyse gewonnenen Anteile apoptotischer Spender-B-Zellen in Milz und drainierenden Lymphknoten.

3.3.1.2 Regulation der bax-Expression durch Immunisierung mit NiCl₂ und H₂O₂

Es konnte bislang nachgewiesen werden, dass Ni^{high}-B-Zellen nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ Fas-vermittelte Apoptose unterlaufen. Es stellte sich daher die Frage, ob das zentrale pro-apoptotische Protein bax durch die Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ in seiner mRNA-Expression moduliert wird.

Wie in Abb. 3.3.1.2 dargestellt ist, wiesen Ni^{high}-B-Zellen ohne Immunisierung eine mit Ni^{low}-B-Zellen vergleichbare bax mRNA-Expression auf. Die Injektion von NiCl₂ führte zu keiner Veränderung der bax-Expression. Intradermale Injektionen von NiCl₂/H₂O₂ führten verglichen mit der nicht-immunisierten Kontrolle in Ni^{high}-, nicht aber Ni^{low} B-Zellen zu einer Aufregulation der bax mRNA-Expression um den Faktor 20.

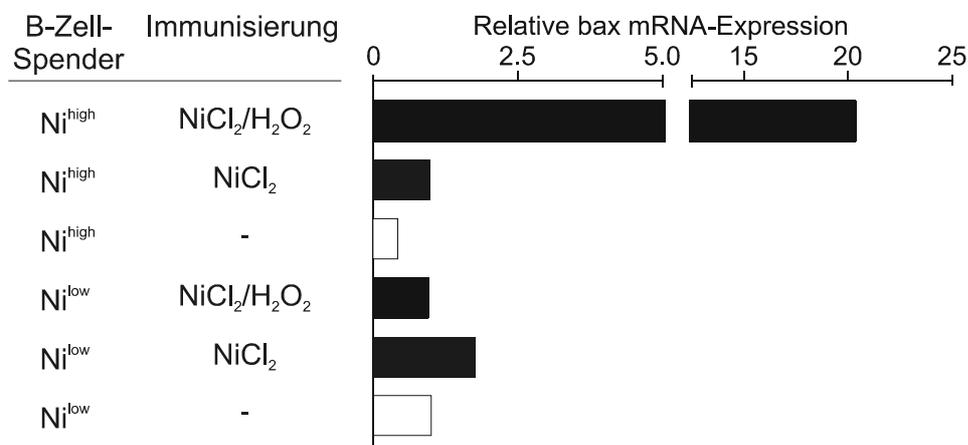


Abb. 3.3.1.2. Immunisierung mit NiCl₂ / H₂O₂ reguliert bax.

Relative bax-mRNA Expression in Ni^{low}- und Ni^{high}-B-Zellen 24 Stunden nach Immunisierung mit 10 mM NiCl₂, 10 mM NiCl₂ / 1 % H₂O₂ oder ohne Immunisierung, mittels Real-Time-PCR untersucht. Die bax- Expression der B-Zellen nicht-immunisierter Ni^{low}-Mäuse diente als Referenz (weisser Balken). Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

3.3.1.3. Regulation des Serinproteaseinhibitors A3G nach Immunisierung

Im Rahmen der Frage, welche Apoptose-regulierenden Gene oder Proteine in Ni^{high}-B-Zellen verändert exprimiert werden oder durch die Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ reguliert werden, fiel eine Arbeit von Zhao *et al.* auf (Zhao *et al.* 2004b). Diese untersuchten mithilfe von DNA-Mikroarrays Maus-Fibroblasten nach akuter *in vitro* Exposition mit NiCl₂ und wiesen eine Reihe von regulierten Genen nach. Eines der am stärksten regulierten Gene war der nach NiCl₂-Inkubation herunterregulierte Serin-/Cysteinproteaseinhibitor A3G (Accession Nr. MGI:105046).

Es sollte getestet werden, ob Ni^{high} -B-Zellen eine erniedrigte SerpinA3G-Expression aufweisen, und ob die Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ diese negativ reguliert.

Wie in Abb. 3.3.1.3 dargestellt ist, besitzen Ni^{high} -B-Zellen nicht-immunisierter Mäuse verglichen zu Ni^{low} -B-Zellen eine um den Faktor 2.5 erhöhte SerpinA3G Expression. Diese wurde durch Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ um den Faktor 15 herabgesetzt, was ca. 20 % der Basalexpression in Ni^{low} -B-Zellen entsprach. Interessanterweise führte dieselbe Injektion in Ni^{low} -B-Zellen zu einer Aufregulation der SerpinA3G-Expression.

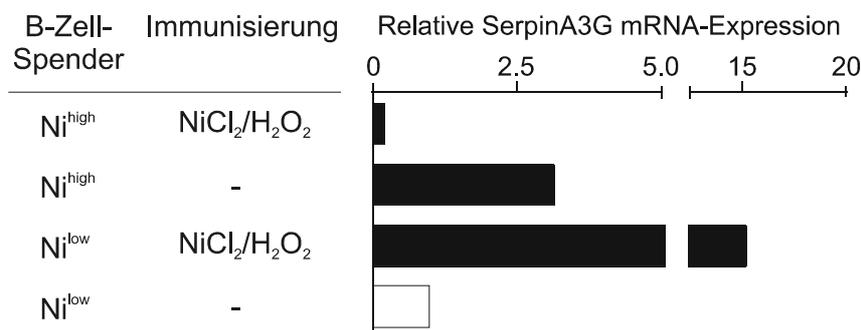


Abb. 3.3.1.3. Regulation der SerpinA3G-Expression.

Relative SerpinA3G-mRNA Expression von Ni^{high} - im Vergleich zu Ni^{low} -B-Zellen 24 Stunden nach Immunisierung mit 10 mM $\text{NiCl}_2/1\% \text{H}_2\text{O}_2$ oder ohne Immunisierung, mittels Real-Time-PCR untersucht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

3.3.2. Phagozytose apoptotischer Ni^{high} -Zellen durch dendritische Zellen

Da Ni^{high} -B-Zellen nach Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ in Apoptose gehen, stellte sich die Frage nach den weiteren Schritten der Toleranzübertragung von diesen, nun apoptotischen, B-Zellen auf Zellen des Empfängers. Dendritische Zellen nehmen Antigen über Mechanismen der Endozytose und Phagozytose auf. Abhängig von der Stimulation der DZ sind diese in der Lage, durch Präsentation der phagozytierten Antigene regulatorische T-Zellen zu induzieren. (Sauter *et al.* 2000a).

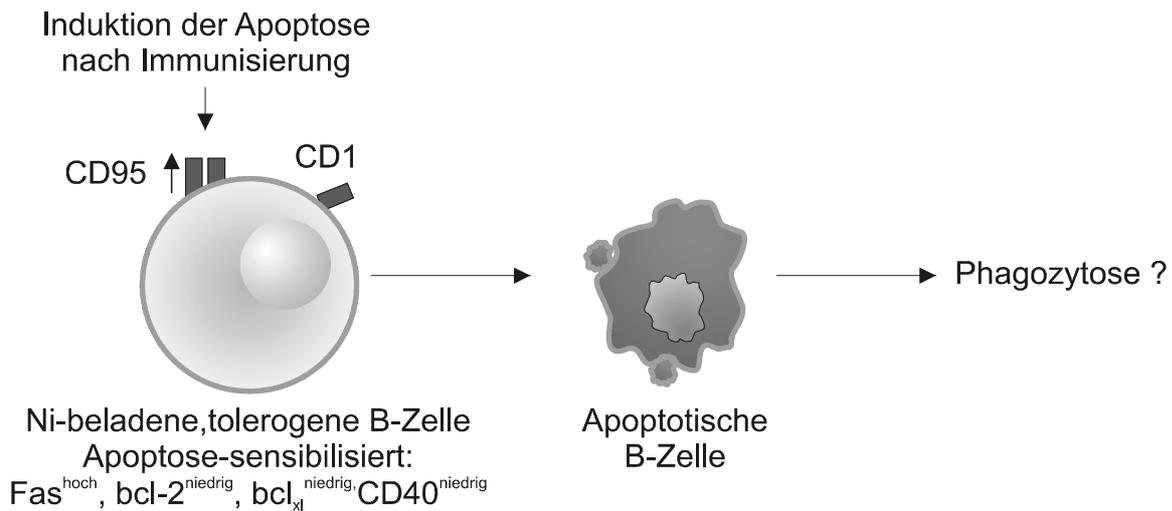


Abb. 3.3.2.1: Werden apoptotische Ni^{high}-Milzzellen durch DZ phagozytiert ?

Um diese Frage zu beantworten, wurden Milzzellen aus Ni^{high}-Spendermäusen entnommen. Die erhaltenen Zellen wurden *ex vivo* mit dem Fluoreszenzfarbstoff CFSE inkubiert und die dendritischen Zellen depletiert. Die Depletion der DZ war notwendig, da sonst keine Unterscheidung zwischen CFSE-positiven Spender-DZ und Empfänger-DZ nach Aufnahme der CFSE⁺ Spenderzellen mehr möglich gewesen wäre. Einen Tag nach i.v. Injektion dieser Zellen wurden die Empfänger mit NiCl₂ oder NiCl₂/H₂O₂ immunisiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden schließlich dendritische Zellen der Milz auf ihre CFSE-Fluoreszenz untersucht.

Wie in Abb. 3.3.2.2 dargestellt ist, lag der Anteil CFSE-positiver dendritischer Zellen in allen getesteten Proben bei mindestens 31 %. Diese DZ konnten als Zellen der Empfängermäuse identifiziert werden, da keine CD11c⁺ Zellen übertragen wurden. Während der Transfer von Ni^{low}-Zellen mit folgender NiCl₂-Immunisierung zu einem Anteil von 31.4% CFSE⁺ DZ führte, lag dieser Anteil nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ bei 43.3 %. Nach Transfer von DZ-depletierten Milzzellen aus Ni^{high}-Mäusen (C,D) konnten keine Effekte der unterschiedlichen Immunisierungen festgestellt werden. Insgesamt betrachtet waren lediglich klare Unterschiede zwischen der mit NiCl₂ immunisierten Kontrollgruppe (A) und allen anderen Gruppen festzustellen.

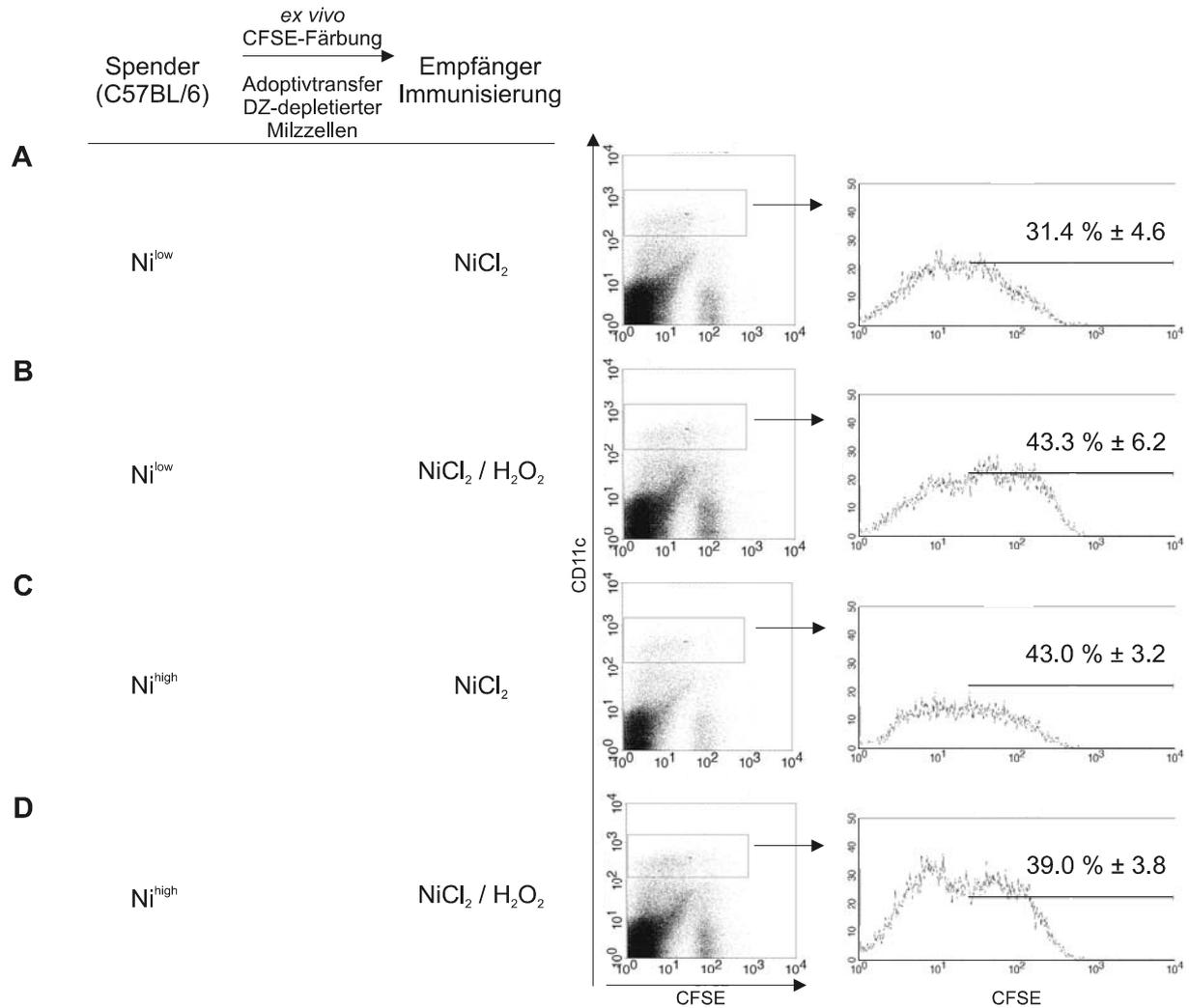


Abb. 3.3.2.2. Nachweis der Aufnahme apoptotischer Ni^{high}-Zellen durch DZ der Milz.

Milzzellen aus Ni^{low}- (A,B) oder Ni^{high}- (C,D) Spendermäusen wurden *ex vivo* durch magnetische Depletion CD11c⁺ Zellen von dendritischen Zellen befreit und anschließend mit 0.5 μ M CFSE gefärbt. Jeweils 10⁷ dieser Zellen wurden adoptiv in unbehandelte Empfänger übertragen, diese wurden 24 Stunden später mit 10 mM NiCl₂ (A,C) oder 10 mM NiCl₂/ 1% H₂O₂ (B,D) intradermal in beide Flanken immunisiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Milz der Empfängermäuse entnommen und mit einem α -CD11c mAk gefärbt.

3.3.3. Führt die Phagozytose apoptotischer Zellen zur Bildung tolerogener DZ ?

Die bisher geschilderten Befunde zeigen, dass Apoptose für die Toleranzinduktion durch Ni^{high}-B-Zellen nötig ist. Aufgrund der Hinweise, dass Ni^{high}-B-Zellen nach Adoptivtransfer von Empfänger-DZ phagozytiert werden, wurde die Frage untersucht, ob die Aufnahme apoptotischer Ni^{high}-B-Zellen dendritische Zellen befähigt, eine Toleranz gegen Nickel zu induzieren. Hierzu wurden aufgereinigte Ni^{high}- oder Ni^{low}-B-Zellen adoptiv in Ni^{low}-Empfänger übertragen und diese am nächsten Tag mit NiCl₂/H₂O₂ immunisiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Empfänger getötet und dendritische Zellen (CD11c⁺MHC⁺) der Milz isoliert. 10⁴ dendritische Zellen wurden anschließend erneut adoptiv in eine weitere

Gruppe Ni^{low} -Empfänger übertragen. Diese wurden im Maus-Ohrschwellungstest auf die Induktion einer Toleranz durch dendritische Zellen untersucht. Als Negativkontrolle der Ohrschwellung wurde eine Versuchgruppe der getesteten Mäuse, ohne zuvor Zellen erhalten zu haben, anstelle von $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ mit NiCl_2 immunisiert (in Abb. 3.3.3 als „kein Transfer“ gekennzeichnet).

Dendritische Zellen aus Mäusen, welche Ni^{high} -B-Zellen erhalten haben, waren in der Lage, in Ni^{low} -Empfänger eine Toleranz gegen Nickel zu übertragen (Abb. 3.3.3). Im Gegensatz dazu waren dendritische Zellen der Kontrollgruppe, welche zuvor Ni^{low} -B-Zellen erhielten, nicht tolerogen.

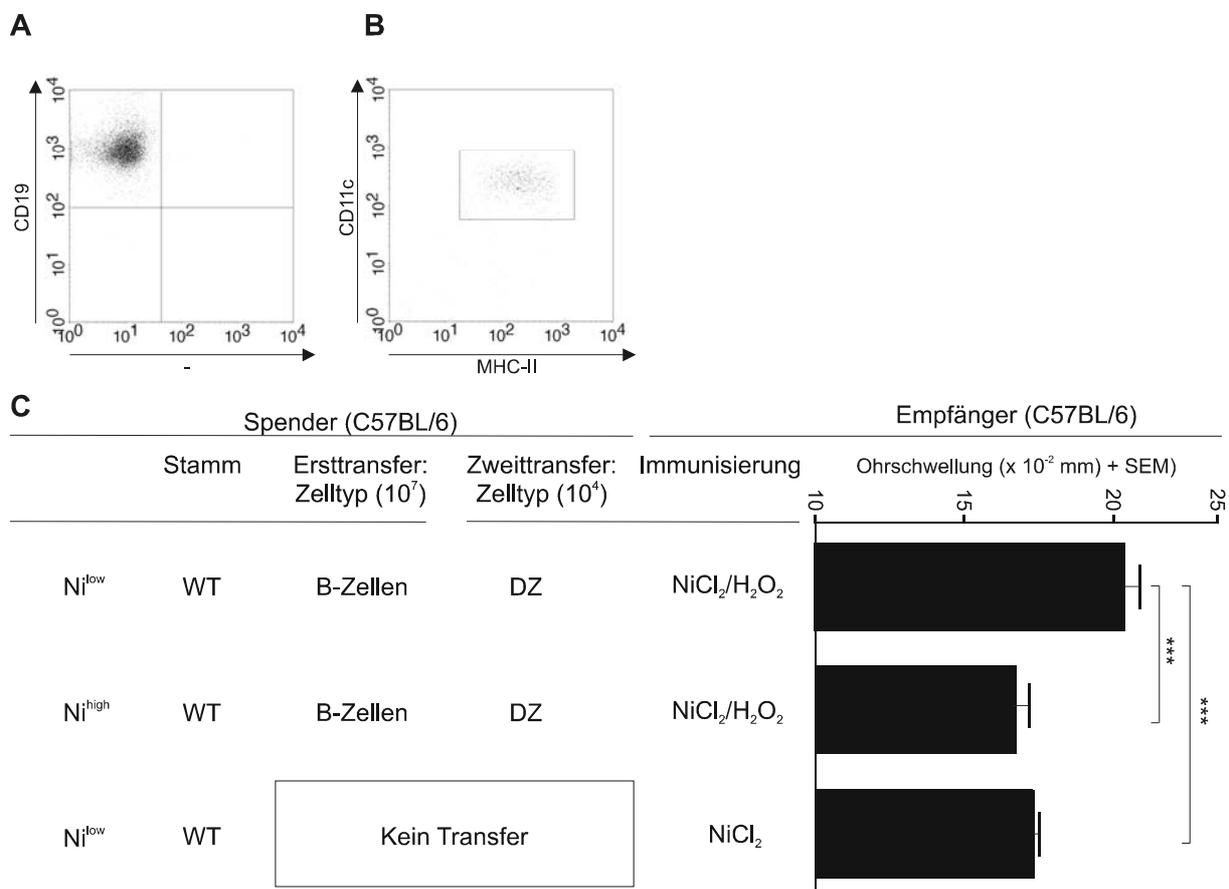


Abb. 3.3.3. Toleranzinduktion durch dendritische Zellen.

A. CD19^+ B-Zellen aus Ni^{high} - bzw. Ni^{low} - Mäusen wurden durch wiederholte magnetische Depletion von CD11b^+ , CD11c^+ und Thy.1.2^+ Zellen zu einer Reinheit >95 % aufgereinigt. 10^7 aufgereinigte B-Zellen wurden adoptiv in C57BL/6 Empfänger übertragen, diese wurden 24 Stunden nach dem Adoptivtransfer mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ immunisiert. **B.** Nach weiteren 24 Stunden wurden die Empfänger getötet und dendritische Zellen ($\text{MHC}^+\text{CD11c}^+$) isoliert.

C. 10^4 DZ der Erstempfänger wurden in weitere C57BL/6 Mäuse übertragen, welche nach Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ im Maus-Ohrschwellungstest auf die Induktion der Toleranz getestet wurden. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für zwei Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.01$, ***, $p \leq 0.001$).

3.3.4. Nickelkonzentrationen in Blut, Organen und Ausscheidungen

C57BL/6 Mäuse der drei Haltungsformen, von denen Ni^{low} - und Ni^{high} - Mäuse zuvor bereits verwendet wurden, waren experimentell unterschiedlichen Mengen Nickel ausgesetzt. Diese Tiere wurden in konventionellen Käfigen gehalten, d.h. die Käfige waren mit Edelstahlgittern sowie Wasserflaschen mit Edelstahlauslässen versehen, die einen Ni-Anteil von 9.8 % (Qualitätszeugnis Werkstoff 1.4301, Fa. Ebeco, Castrop-Rauxel) aufweisen. Zusätzlich wurden in Kunststoffkäfigen ohne Edelstahlkomponenten gezüchtete und aufgezogene Mäuse untersucht, welche im Folgenden als " $\text{Ni}^{\text{very low}}$ "-Mäuse bezeichnet werden. Altersgleiche Tiere dieser Haltungsformen wurden mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) auf die Nickelkonzentrationen in verschiedenen Organen, Blut und Ausscheidungen untersucht. Die Durchführung der Spektroskopie wurde freundlicherweise von Dr. Jermann, Institut für umweltmedizinische Forschung, durchgeführt.

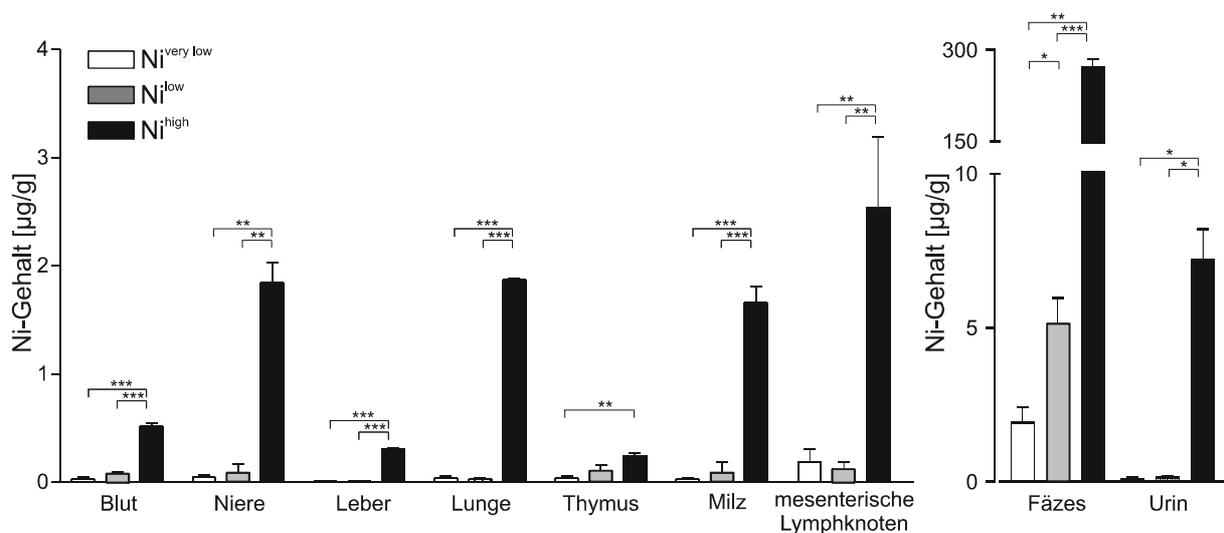


Abb. 3.3.4. Nickelkonzentrationen in Blut, Organen und Ausscheidungen.

A. Nickelkonzentrationen im Blut sowie verschiedene Organen altersgleicher $\text{Ni}^{\text{very low}}$ -, Ni^{low} - und Ni^{high} -Mäuse. **B.** Nickelkonzentrationen in Fäzes und Urin.

Die Nickelkonzentrationen wurden durch Atomabsorptionsspektroskopie bestimmt und freundlicherweise von Dr. Jermann, IUF, zur Verfügung gestellt.

Ni^{high} -Mäuse wiesen in allen untersuchten Proben gegenüber Ni^{low} - und $\text{Ni}^{\text{very low}}$ - Mäusen erhöhte Nickelkonzentrationen auf (Abb. 3.3.4). Die Milzen der untersuchten Ni^{low} - Mäuse wiesen gegenüber den Milzen aus $\text{Ni}^{\text{very low}}$ - Mäusen signifikant ($p < 0.05$) höhere Nickelkonzentrationen auf. In den übrigen untersuchten Organen sowie Blut und Urin dieser Tiere waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

3.3.5. Nickelkonzentrationen der B-Zellen oral toleranter Mäuse

Um den Nickelgehalt in isolierten B-Zellen zu untersuchen, konnte die Methode der Atomabsorptionsspektroskopie nicht angewendet werden: Die Isolation der B-Zellen war mit einer Reihe von Waschschritten und dem Kontakt zwischen Zellen und der Metallmatrix der MACS-Sortiersäulen verbunden, was den Signalhintergrund in der AAS zwangsläufig stark erhöht hätte. Aus diesem Grund wurde der Nickelgehalt von B-Zellen durchflusszytometrisch mit dem zellpermeablen Acetomethylester-Derivat Newport Green DCF (NPG DCF) gemessen. Durch Gegenfärbung mit einem B-Zell-spezifischen anti-B220 Antikörper war es möglich, die Ni^{2+} -Bindung in Einzelzellsuspensionen zu untersuchen.

B-Zellen oral mit NiCl_2 behandelter Ni^{high} -Mäuse wiesen eine signifikant erhöhte Newport Green-Fluoreszenz auf, was mit den in Abb. 3.3.5 dargestellten erhöhten Nickelorgankonzentrationen vergleichbar ist. Im Gegensatz zu den signifikant herabgesetzten Milz-Nickelkonzentrationen der $\text{Ni}^{\text{very low}}$ -Mäuse (Abb. 3.3.5) konnten in isolierten B-Zellen keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, was an der, verglichen zur Atomabsorptionsspektroskopie geringen Empfindlichkeit der Messmethode liegt.

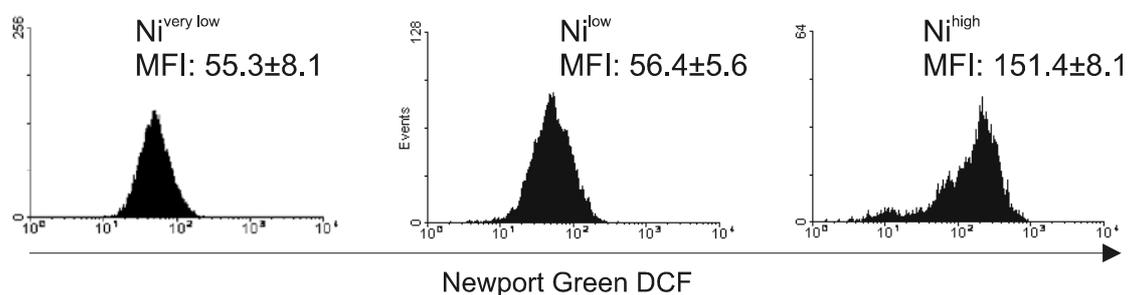


Abb. 3.3.5. B-Zellen nehmen *in vivo* Nickel auf.

Angereicherte Milz-B-Zellen aus Spendern (3 Spender/ Gruppe) der unterschiedlichen Haltungformen ($\text{Ni}^{\text{very low}}$, Ni^{low} bzw. Ni^{high}) B-Zellen wurden mit Newport Green DCF gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die mittlere Newport Green DCF Fluoreszenz \pm Standardabweichung. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

3.3.6. Die Induktion von Apoptose in Ni^{low} - B-Zellen führt zu deren Tolerogenität

Da B-Zellen oral toleranter Mäuse, welche u.a. durch erhöhte Nickelkonzentrationen gekennzeichnet sind (Abb. 3.3.5), die Toleranz übertragen können, stellte sich die Frage, ob *ex vivo* mit Nickel beladene B-Zellen nach Induktion von Apoptose ebenfalls in der Lage sind, in Empfängermäusen eine Toleranz zu induzieren.

Hierzu galt es herauszufinden, welche Dosis ionisierender γ -Strahlung ausreicht in B-Zellen Apoptose zu induzieren. B-Zellen unbehandelter Wildtypmäuse wurden magnetisch sortiert. Tote Zellen wurden durch Ficollgradientenzentrifugation entfernt, die verbleibenden vitalen Zellen wurden in einer ^{137}Cs -Quelle Energiedosen von 3, 6 oder 12 Gy ausgesetzt oder blieben unbestrahlt. Nach anschließender dreistündiger Kultur in Zellkulturmedium wurden die Zellen durch Färbung im Annexin-V Assay im FACS auf die Exposition von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche getestet, dargestellt in Abb. 3.3.6.1. 2 % der unbestrahlten B-Zellen waren nach dreistündiger Kultur Annexin-V⁺, eine Bestrahlung mit 3 Gy induzierte unter den B-Zellen durchschnittlich 12.7 % Annexin-V⁺ Zellen. Energiedosen von 6 Gy und 12 Gy induzierten 58 bzw. 60.9 % Annexin-V⁺ Zellen. Nach weiterer dreistündiger Inkubation waren nach allen Bestrahlungen >80 % der Zellen apoptotisch (Daten nicht dargestellt), wobei der Anteil apoptotischer Zellen in der unbestrahlten Kontrollgruppe auf etwa 30 % anstieg. Daraufhin wurde, in Übereinstimmung mit Literaturangaben (Coligan, J. E., In Vitro Assays for Mouse Lymphocyte Function, in Current Protocols in Immunology 2004), eine Dosis von 6 Gy als Bestrahlungsprotokoll zur Apoptoseinduktion vorgesehen. In den weiteren Experimenten wurden nach *ex vivo*-Kultur von B-Zellen tote Zellen durch Ficollgradientenzentrifugation entfernt.

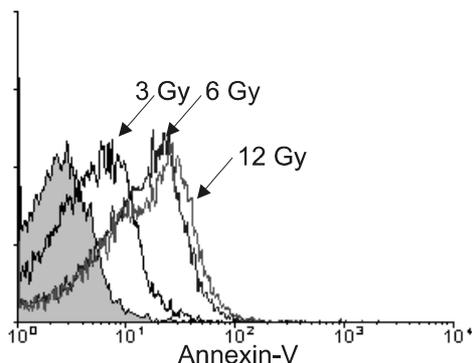


Abb. 3.3.6.1. Annexin-V Profile von Milzzellen nach γ -Bestrahlung.

Milzzellen unbehandelter C57BL/6 Mäuse wurden mit Energiedosen von 3, 6 oder 12 Gray bestrahlt, Kontrollzellen blieben unbestrahlt, und anschließend in Medium für 3 Std. bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abschließend mit Annexin-V und Streptavidin-APC gefärbt und im FACS untersucht.

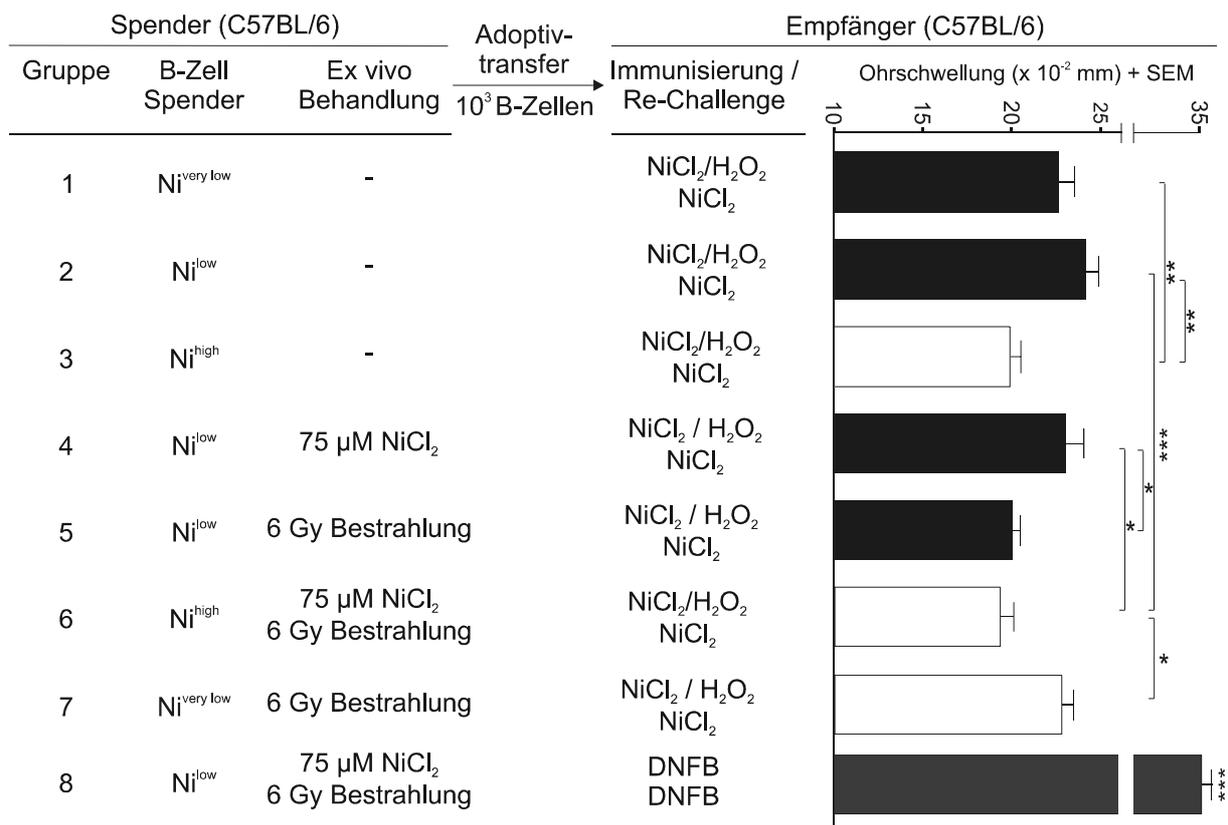


Abb. 3.3.6.2. Toleranzinduktion durch bestrahlte Ni^{low}-B-Zellen.

Milzzellen aus Ni^{high}-, Ni^{low}- sowie Ni^{very low}- Mäuse wurden für 16 h in Zellkulturmedium mit oder ohne 75 µM NiCl₂ inkubiert, anschließend wurden CD19⁺ B-Zellen isoliert. B-Zellen wurden anschließend mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt oder blieben unbestrahlt. 10³ dieser B-Zellen wurden in Ni^{low}-Empfänger übertragen und diese 24 h später mit NiCl₂/H₂O₂ oder DNFB immunisiert. Nach zehn Tagen wurde die Zweitantwort durch NiCl₂ oder DNFB ausgelöst. Die Ohrdicke wurde nach weiteren 48 h gemessen. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 Experimente, die Gruppen 8 und 9 repräsentativ für 2 Experimente, jeweils mit vergleichbaren Ergebnissen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001).

Milzzellen von Ni^{very low}-, Ni^{low}- sowie Ni^{high}-Mäusen wurden *ex vivo* über Nacht in komplettem Medium mit oder ohne Zusatz einer nicht-toxischen Konzentration (X.Wu, persönliche Kommunikation) von 75 µM NiCl₂ kultiviert, nach 16 Stunden wurden B-Zellen dieser Proben aufgereinigt. Ein Teil dieser Zellen wurde mit der getesteten Dosis von 6 Gy bestrahlt, die übrigen Zellen blieben unbestrahlt. 10³ behandelte B-Zellen wurden adoptiv in Ni^{low}-Empfänger übertragen und diese im Maus-Ohrschwellungstest auf eine Toleranzinduktion gegen Nickel getestet.

Wie Abb. 3.3.6.2 darstellt, konnte durch die Übertragung von Ni^{high}-B-Zellen ohne *ex vivo*-Behandlung in Wildtypempfängern eine Toleranz gegen Nickel induziert werden (Gruppe 3). Im Vergleich dazu waren weder Ni^{low} noch Ni^{very low}-B-Zellen dazu fähig (Gruppen 1 und 2). Ni^{low}-B-Zellen waren auch nach Kultur in Gegenwart von NiCl₂ nicht in der Lage in Empfängermausen eine Toleranz gegen Nickel zu induzieren (Gruppe 4), allerdings waren nach Ende der *ex vivo*- Kultur bestrahlte B-Zellen dazu in der Lage (Gruppe 5). Die Injektion

so behandelte B-Zellen induzierte keine generelle Immunsuppression, da die Empfängertiere nach Immunisierung und Re-Challenge gegen das Kontrollantigen DNFB eine starke Ohrschwellung ausbildeten (Abb. 3.3.6.2, Gruppe 8). Der Transfer von bestrahlten B-Zellen, welche nicht mit Nickel beladen wurden, führte in 3 von 4 durchgeführten Experimenten zu einer Toleranzinduktion, dies ist in Gruppe 5 dargestellt. Um die Möglichkeit zu testen, dass in Ni^{low} -B-Zellen enthaltenes Nickel für die Induktion dieser partiellen Toleranz verantwortlich ist, wurden bestrahlte B-Zellen aus $\text{Ni}^{\text{very low}}$ -Mäusen adoptiv in Wildtypempfänger übertragen. Diese waren allerdings nicht in der Lage eine Toleranz zu übertragen (Gruppe 7).

3.4. Beteiligung von iNKT-Zellen an der Toleranzübertragung durch B-Zellen

3.4.1. FasLigand⁺iNKT-Zellen in der Toleranzinduktion durch B-Zellen

Nach den bislang beschriebenen Befunden blieb es ungeklärt, welche Zellen des Empfängers FasLigand exprimieren müssen, um in Ni^{high} -B-Zellen Apoptose zu induzieren. Im Modell der oral induzierten Toleranz gegen Nickel wurden eine Beteiligung von iNKT-Zellen (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003a; Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004) beschrieben. Es wurde daher die Frage untersucht, ob die für die Toleranzinduktion benötigten iNKT-Zellen des Empfängers diese Funktion wahrnehmen, d.h. FasLigand zur Expression bringen müssen.

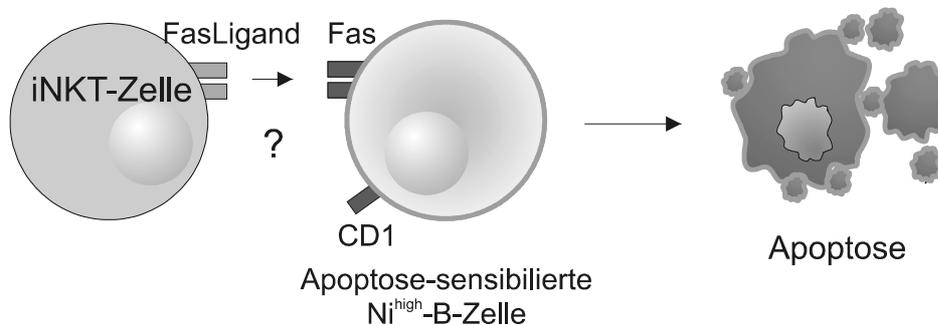


Abb. 3.4.1.1. Sind iNKT-Zellen für die B-Zellapoptose verantwortlich ?

Zur Untersuchung dieser Frage wurden Adoptivtransfers in iNKT-defiziente des Stammes $\text{V}\alpha 14\text{J}\alpha 18^-$ Mäuse (als $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ bezeichnet) durchgeführt. Diese Mäuse besitzen eine Deletion der T-Zellrezeptorsegmente $\text{V}\alpha 14$ und $\text{J}\alpha 18$ und somit eine drastisch herabgesetzte Zahl CD1d-restringierter NKT-Zellen. 10^4 B-Zellen aus Ni^{high} - bzw. Ni^{low} - Mäusen wurden i.v. in $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ Mäuse injiziert. Um die iNKT-defizienten Empfänger mit unterschiedlichen iNKT-Zellen zu rekonstituieren, wurden zur gleichen Zeit 10^7 Milzzellen unbehandelter Spendermäuse kotransferiert. Als Milzzell- und damit iNKT-Spender wurden C57BL/6 oder FasLigand-defektive Fas-gld Mäuse verwendet (Schematische Darstellung, s. Abb. 3.4.1.2)

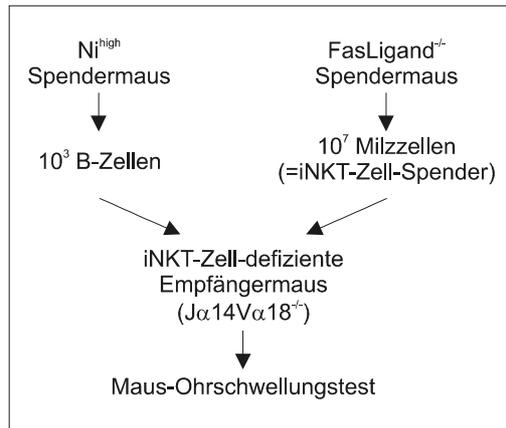


Abb. 3.4.1.2. Experimentelles Design des Ko-Transferassay.

Durch Ko-Transfer von Ni^{high} -B-Zellen gemeinsam mit $\text{FasLigand}^{-/-}$ Milzzellen in $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ -Mäuse konnte in diesen Empfängermäusen keine Toleranz induziert werden (Abb. 3.4.1.3, Gruppe 4). Wurden als iNKT-Zellspender Milzzellen aus Wildtypmäusen mitübertragen konnten Ni^{high} B-Zellen eine Toleranz induzieren, dies bestätigt Befunde anderer (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003a). Entsprechend war der Transfer von Ni^{low} -B-Zellen nicht in der Lage eine Toleranz zu bewirken (Gruppe 1).

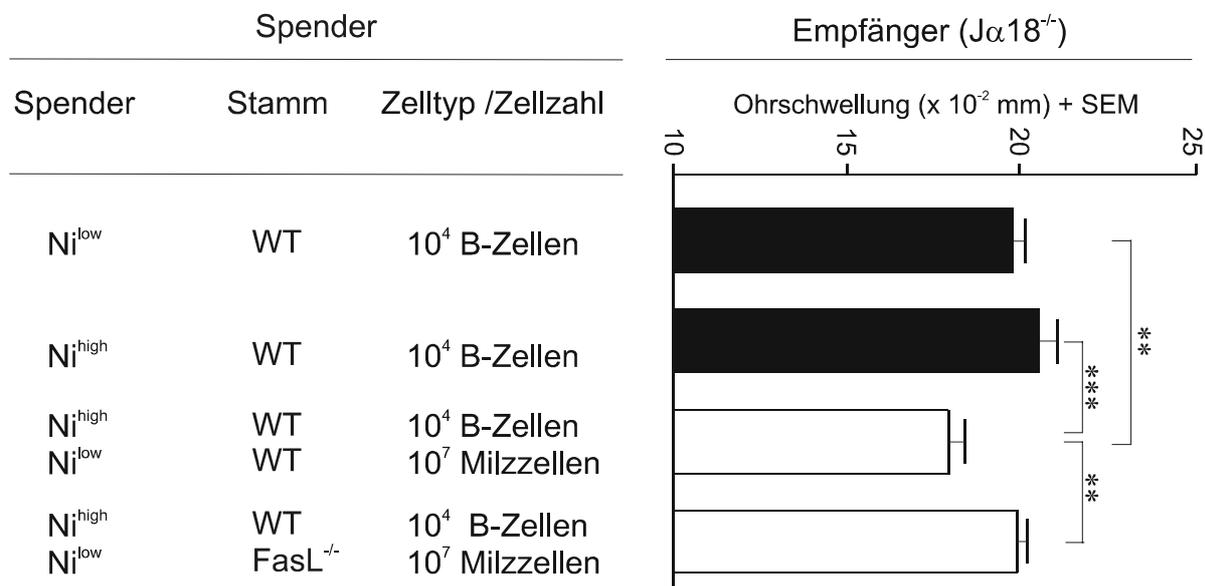


Abb. 3.4.1.3. FasLigand^+ iNKT-Zellen sind für die Toleranzinduktion durch Ni^{high} -B-Zellen nötig.

10^3 CD19^+ B-Zellen aus Ni^{low} - oder Ni^{high} -Mäusen wurden adoptiv in $\text{J}\alpha 18^{-/-}$ Mäuse übertragen. Zur gleichen Zeit wurden 10^7 Milzzellen unbehandelter C57BL/6 oder Fas-gld Mäuse ko-transferiert. 24 Stunden nach dem Transfer wurden die Empfängermäuse durch $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ immunisiert und im Maus-Ohrschwellungstest auf eine Nickeltoleranz getestet. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.01$, ***, $p \leq 0.001$).

3.4.2. Migration FasLigand⁺ NKT Zellen nach Sensibilisierung

Es wurde die Frage gestellt, ob eine Immunisierung mit NiCl₂ und H₂O₂ die Expression von FasLigand auf NKT-Zellen reguliert und neben dem veränderten B-Zellphänotyp an der beobachteten B-Zellapoptose nach Ni/ H₂O₂-Immunisierung beteiligt ist. Unbehandelte C57BL/6 Mäuse erhielten intradermal Injektionen von 10 mM NiCl₂ / 1% H₂O₂, NiCl₂ oder das Lösungsmittel NaCl intradermal in beide Flanken. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Injektion wurden Milz und die Injektionsstelle drainierende axilläre Lymphknoten entnommen. Anschließend wurde die Zahl der FasLigand-exprimierenden NKT-Zellen ($\alpha\beta$ TZR⁺ NK1.1⁺) bestimmt.

Alle getesteten Injektionen führten in Lymphknoten und Milz zu einem zwei-dreifachen, signifikanten ($p < 0.01$) Anstieg der Zahl von NKT-Zellen 24 Stunden nach Injektion (Abb. 3.4.2, B). Diese Zahl sank 48 Stunden nach Immunisierung auf den Ausgangswert zurück. In den axillären Lymphknoten sank die Zahl der NKT-Zellen 72 Stunden nach Injektion unter den Ausgangswert (Abb. 3.4.2.C).

Die Zahl der FasLigand⁺ NKT-Zellen in Milz und drainierenden Lymphknoten zeigte einen dem der Gesamtzahl der NKT-Zellen sehr ähnlichen Verlauf. Die Zahl der FasL⁺ NKT-Zellen stieg in beiden untersuchten Organen 24 Stunden nach Injektion aller getesteten Substanzen auf ein zwei- bis dreifaches des Ausgangswertes, sank 48 Stunden nach Immunisierung auf die niedrigsten gemessenen Werte um nach weiteren 24 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurückzukehren. Zwischen den getesteten Substanzen konnten in Bezug auf diese Zahlen keine Unterschiede festgestellt werden, das heißt, auch intradermale Injektionen von NaCl führten bereits zu diesen Effekten.

Die Zahl der FasL-exprimierenden NKT-Zellen (Abb. 3.4.2, D und E) praktisch deckungsgleich mit der Gesamtzahl der NKT-Zellen (Abb. 3.4.2, B und C). Daraus kann geschlossen werden, dass FasLigand⁺ NKT-Zellen nach intradermaler Injektionen in die Lymphknoten und Milz einwandern. Es kann daher ausgeschlossen werden, dass bereits in diesen Organen residente NKT-Zellen FasLigand aufregulieren.

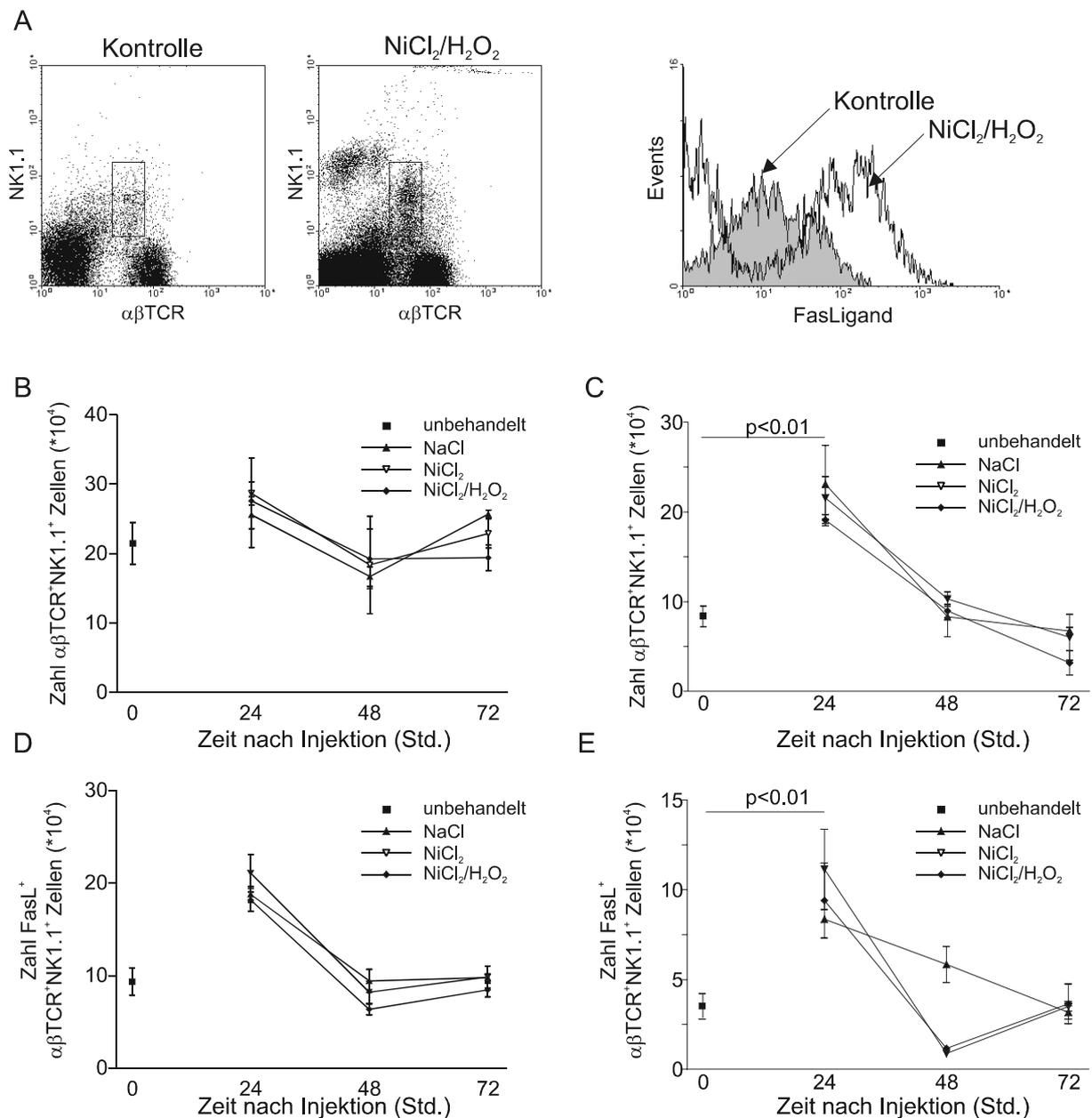


Abb. 3.4.2. Migration FasL^+ NKT-Zellen in Milz und Lymphknoten nach Immunisierung.

Unbehandelte C57BL/6 Ni^{low} -Mäuse erhielten intradermale Injektionen von NaCl, 10 mM NiCl_2 oder 10 mM NiCl_2 / 1% H_2O_2 , oder blieben unbehandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach Injektion wurden die Tiere getötet und die drainierenden axillären Lymphknoten sowie die Milzen entnommen. Zellsuspensionen dieser Organe wurden mit $\alpha\beta\text{TCR}$ mAk, NK1.1 mAk sowie FasLigand mAk gefärbt.

A. Exemplarische DotPlots der Milz einer unbehandelten Maus sowie einer $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ -injizierten Maus 24 Stunden nach Injektion. Die FasLigand-Expression der durch Rahmen eingegrenzten NKT-Zellen sind in A rechts überlagert dargestellt.

B,C. Absolute Zahl $\alpha\beta\text{TCR}^+\text{NK1.1}^+$ Zellen der Milz (B) und drainierenden axillären Lymphknoten (C). Als Vergleich wurden zu allen Zeitpunkten unbehandelte Mäuse untersucht und diese Werte als Zeitpunkt „0h“ zusammengefasst.

D,E. Absolute Zahl $\text{FasL}^+\alpha\beta\text{TCR}^+\text{NK1.1}^+$ Zellen der Milz (D) und drainierenden axillären Lymphknoten (E). Als Vergleich wurden zu allen Zeitpunkten unbehandelte Mäuse untersucht und diese Werte als Zeitpunkt „0h“ zusammengefasst.

Die dargestellten Daten sind repräsentativ für drei Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen.

3.4.3. Toleranzinduktion durch apoptotische Ni^{high} -B-Zellen ohne iNKT-Zellen

Wie in Abb. 3.1.2 gezeigt werden konnte, führt die orale Applikation von 10 mM $NiCl_2$ zu Veränderungen des B-Zellphänotyps. Die Toleranzübertragung durch tolerogene B-Zellen erfordert die Expression von FasLigand auf iNKT-Zellen der Empfänger (Abb. 3.4.1). Apoptotische B-Zellen aus Ni^{low} -Mäusen waren bereits ausreichend um in Wildtypempfängern eine partielle Toleranz zu induzieren. Es wurde daher die folgende Frage untersucht:

Sind tolerogene B-Zellen aus Ni^{high} -Mäusen oder ex vivo mit Nickel beladene B-Zellen in der Lage, nach Bestrahlung in iNKT-defizienten Mäusen eine Toleranz zu induzieren ?

Sollten Nickel-beladene B-Zellen nach der *ex vivo*-Apoptoseinduktion in der Lage sein, in $J\alpha 18^{-/-}$ -Mäusen Toleranz gegen Nickel zu übertragen, wäre die Funktion der iNKT-Zellen für diesen Mechanismus der Toleranzinduktion auf die Induktion der B-Zellapoptose reduziert.

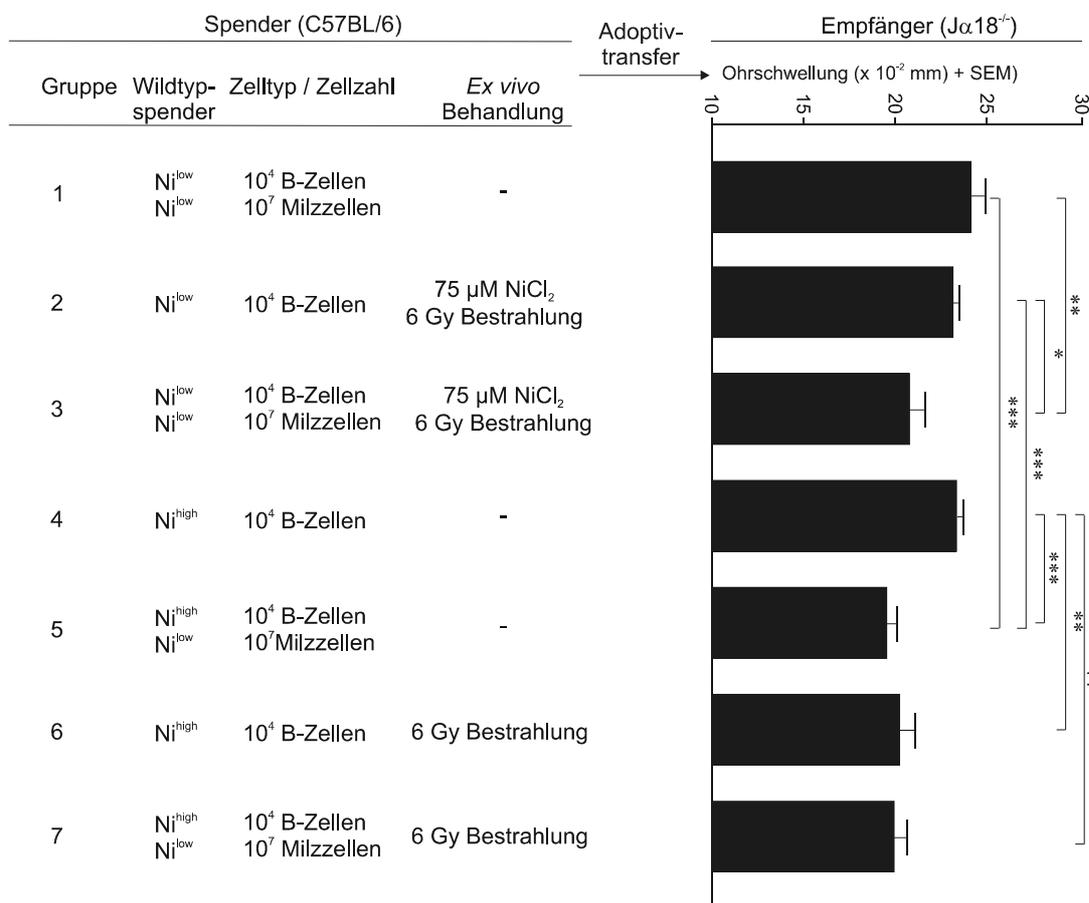


Abb. 3.4.3. Apoptoseinduktion in Ni^{high} -B-Zellen ersetzt iNKT-Zellen des Empfängers.

Ni^{high} -, Ni^{low} - sowie $Ni^{very low}$ -Milzzellen wurden für 16 h *ex vivo* mit oder ohne 10 mM $NiCl_2$ inkubiert, anschließend $CD19^+$ B-Zellen isoliert. 10^3 $CD19^+$ B-Zellen wurden anschließend mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt oder blieben unbestrahlt und in $J\alpha 18^{-/-}$ Empfänger übertragen. Zur gleichen Zeit wurden 10^7 Milzzellen unbehandelter C57BL/6 oder Fas-gld Mäuse ko-transferiert. Empfänger wurden durch $NiCl_2/H_2O_2$ immunisiert und mittels Maus-Ohrschwellungstest auf eine Nickeltoleranz untersucht. Die dargestellten Daten sind repräsentativ für 3 Experimente mit vergleichbaren Ergebnissen. Signifikante Unterschiede sind durch Sterne gekennzeichnet (*, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.01$, ***, $p \leq 0.001$).

Milzzellen aus Ni^{low}- oder Ni^{high}- Mäusen wurden *ex vivo* für 16 Stunden mit Nickel beladen und anschließend mit einer Dosis von 6 Gy bestrahlt. Die Kontrollansätze wurden in Medium ohne Nickelzusatz kultiviert bzw. blieben unbestrahlt. 10⁴ CD19⁺ B-Zellen dieser Ansätze wurden mit 10⁷ Milzzellen unbehandelter Mäuse, welche als iNKT-Zellspender dienten, in J α 18^{-/-} Empfänger übertragen und diese nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ auf eine Toleranzinduktion getestet.

Während Ni^{high}-B-Zellen nur in der Anwesenheit von iNKT-Zellen in der Lage waren in J α 18^{-/-}-Mäuse eine Toleranz gegen Nickel zu übertragen (Abb. 3.4.3, Gruppen 4 und 5). Eine Apoptoseinduktion in Ni^{high}-B-Zellen durch γ -Bestrahlung war für die Toleranzinduktion ohne iNKT-Zellen ausreichend (Gruppe 6). Entsprechend waren diese Zellen auch nach Kotransfer von iNKT-Zellen dazu noch der Lage (Gruppe 7). *Ex vivo* mit Nickel beladene und anschließend bestrahlte B-Zellen aus Ni^{low}-Spendern waren allerdings nicht in der Lage ohne Kotransfer von iNKT-Zellen in J α 18^{-/-}-Mäuse eine Toleranz zu transferieren (Gruppe 2). Der Ko-Transfer von Milzzellen, welche die im Empfänger fehlenden iNKT-Zellen enthielten, führte zur Tolerogenität dieser B-Zellen (Gruppe 3).

3.5. Proteomanalyse von Ni^{high}- und Ni^{low}- B-Zellen

Die bislang hier geschilderten Experimente zeigen, dass die Nickelexposition über die orale Route zu deutlichen Veränderungen des B-Zellphänotyps führt. Zum anderen ist die Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ ein wichtiger Faktor welcher die Induktion der Toleranz beeinflusst. Es entstand die Idee, zu untersuchen, welche Veränderungen der Proteinausstattung durch diese zwei Faktoren ausgelöst werden. Die Proteomanalyse bietet die Möglichkeit, komplexe Veränderungen der Proteinausstattung zu untersuchen.

Es wurden B-Zellen aus Ni^{low}- und Ni^{high}-Spendern bereits 3 Stunden nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂, NiCl₂ oder NaCl isoliert, um sie anschließend *ex vivo* für weitere 2 Stunden mit ³⁵S-markiertem Methionin metabolisch zu markieren. Diese kurze Zeitspanne nach Immunisierung sollte sicherstellen, möglichst spezifische Veränderungen zu erfassen. Da Ni^{high}-B-Zellen bereits 24 Stunden nach Immunisierung apoptotisch waren, wären zu diesem Zeitpunkt Veränderungen der Proteinexpression durch Apoptose und sekundär durch NiCl₂/H₂O₂ zu erwarten gewesen.

Tiefgefrorene Pellets der markierten Zellen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Gerner, Institut für Krebsforschung, Universität Wien, untersucht. Dabei wurden zytosolische Proteine in der 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend mit dem Fluores-

zenzfarbstoff RuBPS (Ruthenium-II-tris(BathoPhenanthrolin)-diSulfonat) visualisiert. Ferner wurden radioaktiv markierte Proteine, d.h. solche die innerhalb der zweistündigen Markierungsperiode *de novo* translatiert wurden, in der Autoradiographie visualisiert.

In der 2D-Gelelektrophorese sind Proteine durch ihre absolute Position im Gel sowie relative Position zu anderen Spots, also Proteinen, gekennzeichnet. In den dargestellten Abbildungen eingetragene Bezeichnungen einzelner Spots basieren auf bereits in der dortigen Arbeitsgruppe durchgeführten Analysen des B-Zellproteoms, wobei einzelne Spots massenspektrometrisch identifiziert wurden (C.Gerner, persönliche Kommunikation).

Wie in Abb. 3.5.1 zu erkennen ist, führte die vierwöchige orale Gabe von NiCl_2 zu einer Veränderung des B-Zellproteoms. In der RuBPS-Fluoreszenz der Ni^{high} -B-Zellen waren 9 Spots sichtbar, welche von Ni^{low} -B-Zellen nicht exprimiert wurden. Umgekehrt konnten anhand der Fluoreszenz in Ni^{low} -B-Zellen 4 Spots entdeckt werden, welche nur in Ni^{low} -B-Zellen nicht aber Ni^{high} -B-Zellen exprimiert wurden.

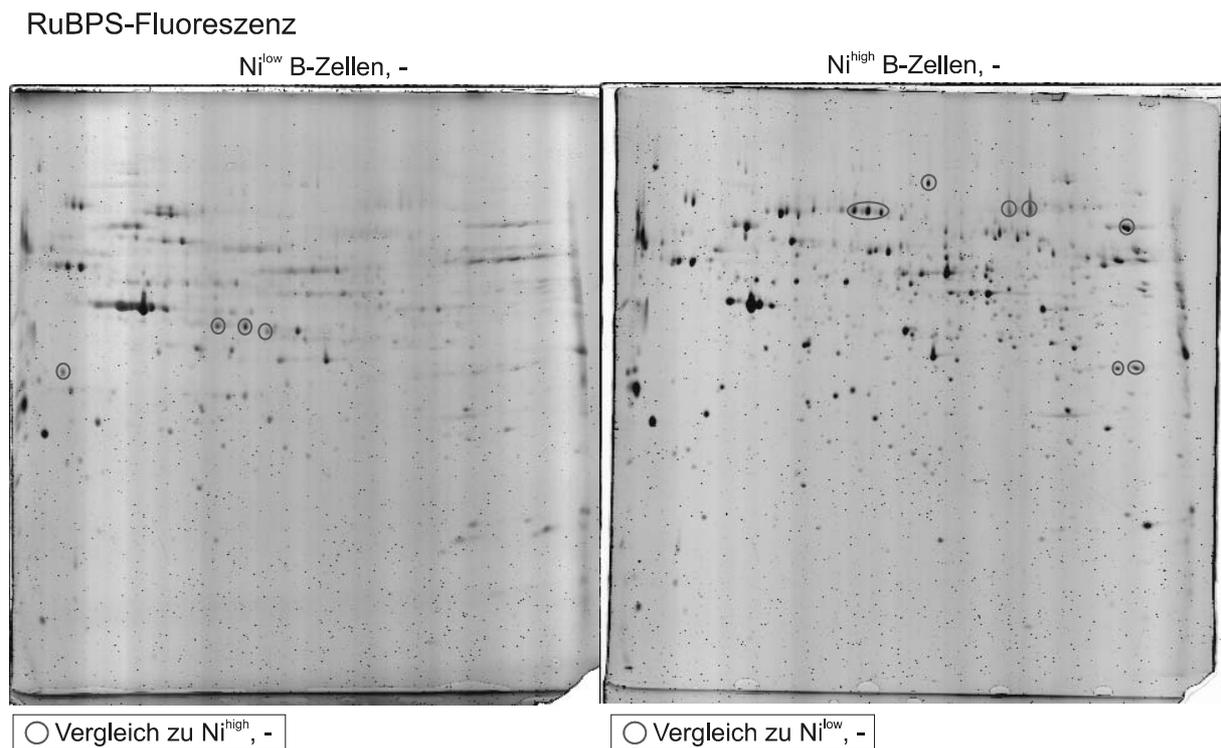


Abb. 3.5.1. Proteomanalyse von Ni^{low} - und Ni^{high} -B-Zellen im Ruhezustand (I).

Isolierte B220⁺ Milz-B-Zellen aus Ni^{low} - und Ni^{high} -Mäusen für 3 Std. *in vitro* mit ³⁵S-markiertem Methionin markiert. Die zytosolische Proteinfaktion anschließend lysierter Zellen wurde daraufhin durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Proteine wurden im SDS-Gel mit dem Fluoreszenzfarbstoff RuBPS angefärbt., anschließend im Fluorlmager ausgelesen. Markiert sind Spots, welche im gegenüberliegenden Gel nicht oder wesentlich schwächer ausgeprägt sind. Proteine wurden im SDS-Gel mit RuBPS angefärbt. Dargestellt ist die RuBPS-Fluoreszenz der erhaltenen Gele mit differentiell regulierten Proteinen. Sofern Spots anhand ihrer Position aus bereits durchgeführten Experimenten bekannt waren, sind ihre Bezeichnungen in der Abbildung angegeben (C.Gerner, persönliche Kommunikation).

Autoradiographie

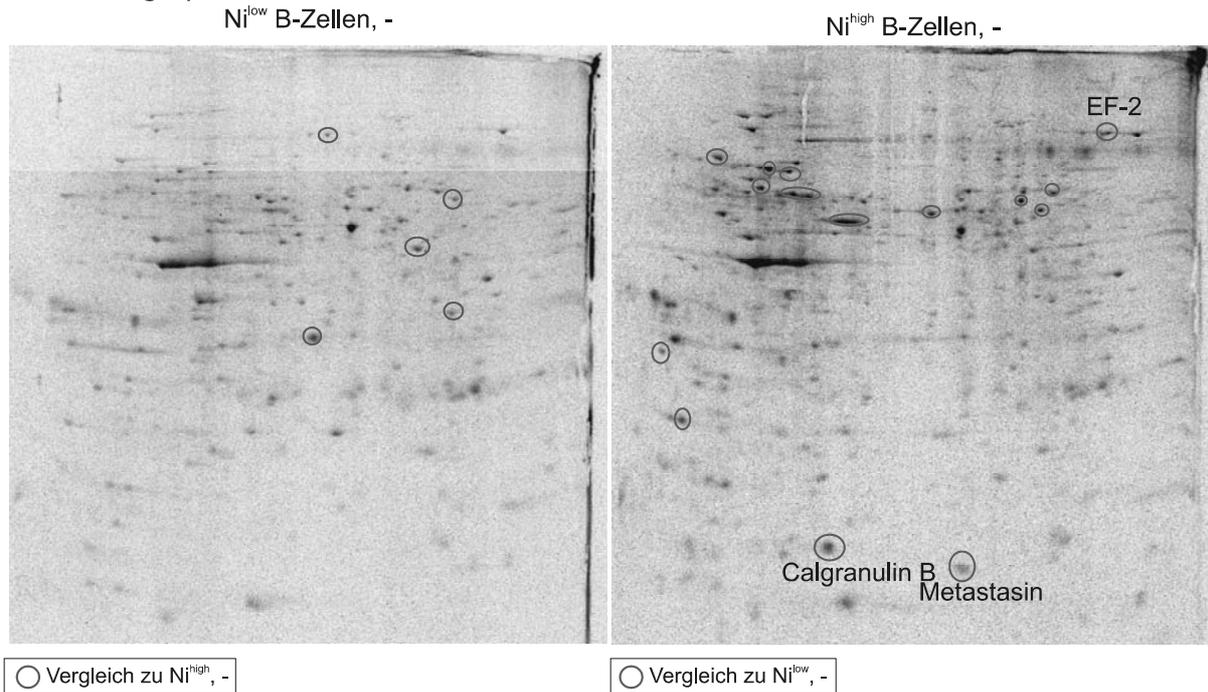


Abb. 3.5.2. Proteomanalyse von Ni^{low} - und Ni^{high} -B-Zellen im Ruhezustand (II).

Isolierte B220⁺ Milz-B-Zellen aus Ni^{low} - und Ni^{high} -Mäusen für 3 Std. *in vitro* mit ³⁵S-markiertem Methionin markiert. Die zytosolische Proteinfaktion anschließend lysierter Zellen wurde daraufhin durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. Dargestellt sind die Autoradiogramme der getrockneten Gele aus Abb. 3.5.1. Verstärkerfolien wurden für 87 Std. mit den Gelen exponiert, anschließend im Phosphorimager ausgelesen. Markiert sind Spots, welche im gegenüberliegenden Gel nicht oder wesentlich schwächer ausgeprägt sind. Proteine wurden im SDS-Gel mit RuBPS angefärbt. Dargestellt ist die RuBPS-Fluoreszenz der erhaltenen Gele mit differentiell regulierten Proteinen. Sofern Spots anhand ihrer Position aus bereits durchgeführten Experimenten bekannt waren, sind ihre Bezeichnungen in der Abbildung angegeben (C.Gerner, persönliche Kommunikation)

Die in Abb. 3.5.2 abgebildeten Autoradiogramme zeigen, dass in Ni^{low} - 5 und Ni^{high} -B-Zellen 16 Proteine differentiell *de novo* translatiert werden. Bislang konnten drei der regulierten Spots identifiziert werden. Dies sind die Proteine Elongation-factor-1, Metastasin und Calgranulin B.

In Abbildung 3.5.3. sind Fluoreszenzfärbungen (A) und Autoradiogramme (B) von Ni^{low} - und Ni^{high} -B-Zellen 3 Stunden nach intradermaler Injektion von NaCl (links) und $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ vergleichend dargestellt. Die einzelnen Autoradiogramme wurden mit zwei weiteren Gruppen verglichen, Unterschiede sind durch rote oder grüne Kreise markiert.

Wie aus Abb. 3.5.3 B ersichtlich ist, führt die Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ in Ni^{low} -B-Zellen zur *de novo* Translation von insgesamt 11 Proteinen (grün umrandet), welche durch die Injektion des Lösungsmittels NaCl (Abb. 3.5.2,A) nicht induziert werden. Es konnten zwischen der Kontrollgruppe (Ni^{low} -B-Zellen nach NaCl-Injektion, Abb. 3.5.3,A) und anderen Gruppen keine Unterschiede zweifelsfrei ausgemacht werden.

Autoradiographie

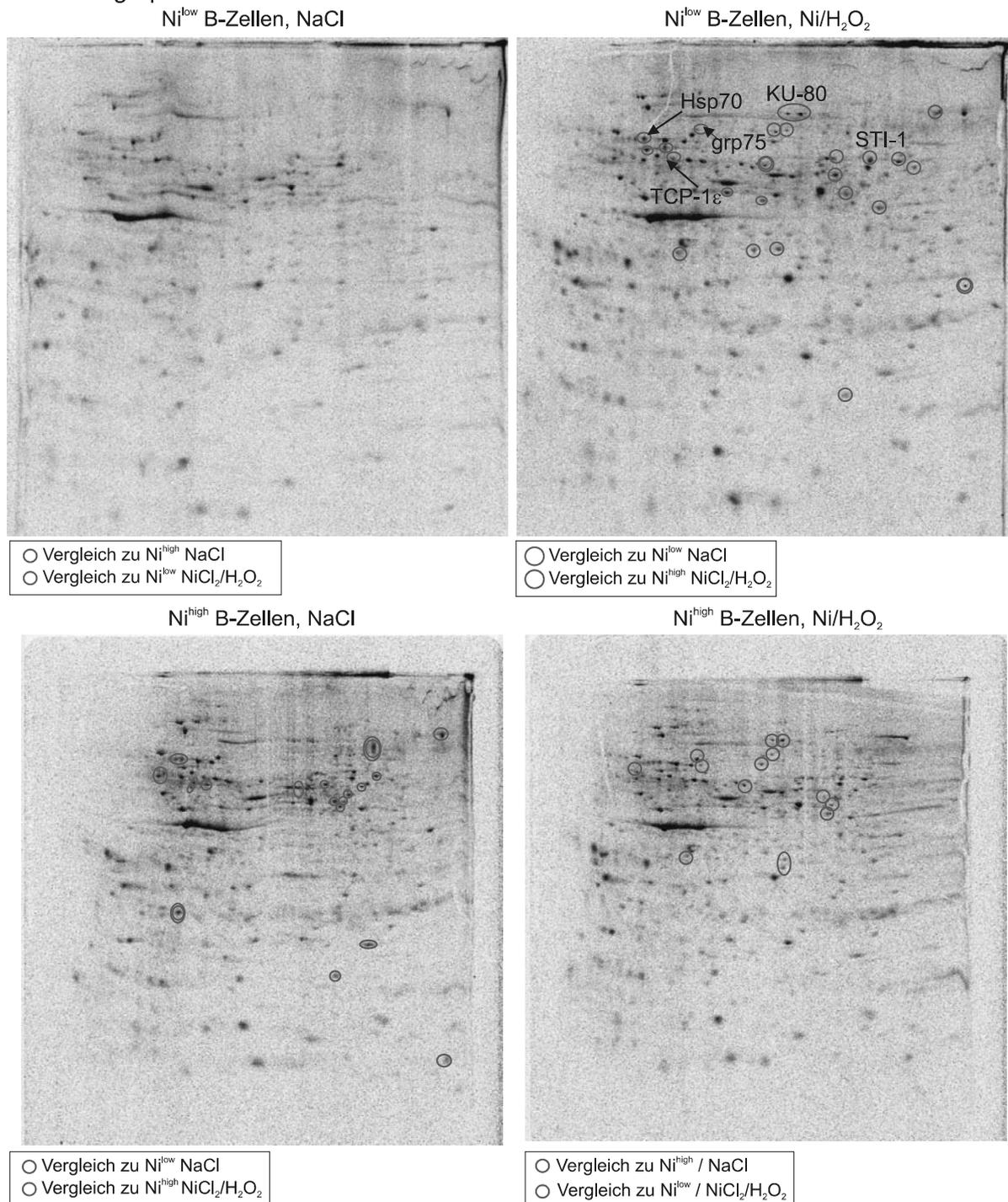


Abb. 3.5.3. Proteinexpression von Ni^{high} - und Ni^{low} -B-Zellen nach Immunisierung.

Ni^{low} - und Ni^{high} - Mäuse erhielten intradermale Injektionen von 10 mM NiCl₂ / 1% H₂O₂ oder NaCl, oder blieben unbehandelt. Drei Stunden nach Immunisierung wurden B220⁺ B-Zellen der Milz isoliert und für 3 Std. *in vitro* mit ³⁵S-markiertem Methionin markiert. Die zytosolische Proteinfraktion anschließend lysierter Zellen wurde daraufhin durch 2D-Gelelektrophorese aufgetrennt. **A.** Proteine wurden im SDS-Gel mit dem Fluoreszenzfarbstoff RuBPS angefärbt., anschließend im Fluorimager ausgelesen. **B.** Autoradiogramme getrockneter Gele aus A. Verstärkerfolien wurden für 87 Std. mit den Gelen exponiert, anschließend im Phosphorimager ausgelesen. Markiert sind Spots, welche im gegenüberliegenden Gel nicht oder wesentlich schwächer ausgeprägt sind. Dargestellt ist die RuBPS-Fluoreszenz der erhaltenen Gele mit differentiell regulierten Proteinen. Sofern Spots anhand ihrer Position aus bereits durchgeführten Experimenten bekannt waren, sind ihre Bezeichnungen in der Abbildung angegeben (C.Gerner, persönliche Kommunikation).

Die Injektion von $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ induzierte in Ni^{high} -B-Zellen die Expression von 18 Proteinen, die im Autoradiogramm der Kontrollgruppe (Abb. 3.5.3., „ Ni^{high} B-Zellen, NaCl“) nicht sichtbar waren. Umgekehrt wurden durch diese Injektion 8 Proteine in der Translation eingestellt, dies ergab sich aus dem Vergleich zur Kontrollgruppe (Ni^{high} B-Zellen, NaCl, Spots dort grün markiert).

Es wurden auch die durch $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ auf Ni^{low} - und Ni^{high} -B-Zellen regulierten Proteine untersucht. Es konnten ausschließlich in Ni^{low} -B-Zellen nicht aber Ni^{high} -B-Zellen nach Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ aufregulierte Proteine entdeckt werden, dies waren insgesamt 13 Spots. Sechs der in Abb. 3.5.3. markierten Spots konnten als TCP-1 ϵ , Ku-80, hsp70, STI-1 sowie grp75 identifiziert werden. Diese waren bereits anhand ihrer charakteristischen Position im Gel aus Experimenten mit murinen Zellen der Arbeitsgruppe von Prof. C.Gerner bekannt. Eine Übersicht über die unterschiedlich exprimierten und identifizierten Proteine ist in Tab. 5 aufgeführt.

Tab. 5. Unterschiedlich exprimierte Proteine.

Protein (Synonyme)	Accession number
Calgranulin B, S100 calcium binding protein A9	Swissprot P31725
EF-1, elongation factor-1	Swissprot P10126
grp75, Stress-70 protein, mitochondrial precursor, Mot-1	Swissprot P38647
Hsp70, heat shock 70 kD protein	Genbank AF109906
Ku-80, ATP-dependent DNA helicase II, XRCC5	Swissprot P27641
Metastasin, S100 calcium-binding protein A4	Swissprot P07091
PCNA, proliferating cell nuclear antigen	Swissprot P17918
STI1, stress-inducible phosphoprotein-1, Hsp70/Hsp90-organizing protein	Swissprot Q60864
TCP-1 ϵ , T-complex protein 1, epsilon subunit	Swissprot P80316

4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Mechanismen der Toleranzübertragung durch B-Zellen zu charakterisieren. Die Apoptose ist ein Mechanismus, beschädigte, autoreaktive oder nicht länger benötigte Zellen zu eliminieren. Dabei wird dieser Prozess eingesetzt, die Toleranz gegen Selbstantigene zu induzieren bzw. aufrecht zu erhalten.

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung der Apoptose als Mechanismus der Toleranzinduktion gegen Nickel. Dabei wurden zunächst die phänotypische und genotypischen Veränderungen der Nickelbehandlung auf B-Zellen untersucht. Auf die funktionelle Prüfung der Fas- und FasLigand-Abhängigkeit der Toleranz, insbesondere für die Toleranzübertragung durch B-Zellen, folgte die Untersuchung anderer an der Toleranzinduktion beteiligter Zelltypen, wie iNKT-Zellen und dendritischen Zellen. Im weiteren wurde die Frage untersucht, welche funktionellen Voraussetzungen in B-Zellen erfüllt werden müssen, um eine Toleranz induzieren zu können.

4.1. Veränderungen des B-Zellphänotyps und -genotyps

Die orale Verabreichung von NiCl_2 führte zu starken Veränderungen des B-Zellphänotyps. B-Zellen der Milz dieser Tiere zeigten eine um durchschnittlich 50 % verringerte Expression von CD40 auf ihrer Zellmembran (Abb. 3.1.2). Auffällig war, dass diese Verringerung der Expression nicht auf einzelne B-Zellpopulationen wie die eingangs beschriebenen „*Marginal zone*“ B-Zellen beschränkt war, sondern vielmehr alle durch den B-Zellmarker CD19 charakterisierten Zellen betroffen waren. Veränderungen einzelner B-Zellsubpopulationen wären in der durchgeführten Durchflusszytometrie erkennbar, da in einem solchen Fall in den Histogrammdarstellungen der CD40-Fluoreszenz mindestens zwei Peaks sichtbar wären, dies war nicht der Fall (Abb. 3.1.2,A). Aus der Literatur sind keine Daten einer vergleichbar starken Regulation von CD40 bekannt. Anerkannt ist, dass Wechselwirkungen zwischen CD40 und seinem Liganden CD40L herausragende Rolle für die Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen einnimmt (Übersichten in Grewal *et al.* 1996; van Kooten *et al.* 2000). In mehreren tierexperimentellen Modellen konnte durch Blockade der Interaktionen zwischen CD40 und CD40L mit antagonistischen Antikörpern oder durch genetische Manipulation dieser Moleküle eine Aktivierung der Immunabwehr verhindert werden. Durch diese Eingriffe konnten Autoimmunreaktionen und Überempfindlichkeitsreaktionen verhindert werden (Buhlmann *et al.* 1995; Li *et al.* 1999b; Tang *et al.* 1997).

Erstaunlicherweise sind Ni^{high}-Mäuse mit dieser herabgesetzten CD40-Expression, soweit dies getestet wurde, nicht immunsupprimiert (Artik *et al.* 1999; Artik *et al.* 2000; Artik *et al.* 2001). Obwohl die Expression von CD40 auf allen antigenpräsentierenden Zellen der Milz stark vermindert war, konnten weiterhin starke Erst- und Zweitantworten gegen das Standardkontaktallergen Dinitrofluorobenzol (DNFB) ausgelöst werden (Artik *et al.* 1999; Artik *et al.* 2000; Artik *et al.* 2001). Da die CD40-Expression auf Ni^{high}-B-Zellen herabreguliert aber nicht vollständig abgeschaltet wird, reichte die diese niedrige CD40-Basalexpression offenbar aus, T-Effektorzellen gegen DNFB zu bilden.

Die Mechanismen die zu dieser starken CD40-Reduktion führen, konnten im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr geklärt werden. Möglich wäre, dass regulatorische und gegen Nickel spezifische T-Zellen, die in Ni^{high}-Mäusen vorhanden sind (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003), die CD40-Expression inhibieren. Ein ähnlicher Mechanismus wurde von Li *et al.* sowie Liu *et al.* berichtet. Diese zeigten, dass Treg-Zellen die Expression von CD40 auf antigenpräsentierenden Zellen inhibieren (Li *et al.* 1999a; Liu *et al.* 1999). Sollte diese Annahme zutreffen, so dürfte in T-Zell-defizienten Mäusen, wie Rag-1^{-/-} Mäusen, nach vierwöchiger Nickelverabreichung keine CD40-Reduktion zu beobachten sein.

Ist CD40 ein Überlebensfaktor für B-Zellen ?

In der vorliegenden Arbeit wurde eingangs gezeigt, dass Ni^{high}-Mäuse im Vergleich zu Kontrollmäusen signifikant kleinere Milzen besitzen (Abb. 3.1.1). Dieser Gewichtsunterschied konnte auf eine Verkleinerung der B-Zellpopulation zurückgeführt werden (s. Abschnitt 3.1.1.). Eine wahrscheinliche und durch die Arbeiten anderer gestützte Hypothese führt die beobachtete, niedrige CD40-Expression der Ni^{high}-B-Zellen auf eine verkürzte Lebensspanne dieser Zellen zurück. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese wiesen Oka *et al.* eine Rolle von CD40 für die Lebensspanne von B-Zellen nach. Mäuse mit genetischen Defekten im CD40-Lokus besaßen in der Milz einen um ca. 30 % verringerten B-Zellpool, gleichzeitig war in diesen Mäusen die Lebensspanne der B-Zellen gegenüber Wildtypmäusen verringert (Oka *et al.* 1996). Eine weitere Arbeit zeigte, dass *in vitro* über CD40-aktivierte B-Zellen Telomerase re-exprimieren, was zu einer verlängerten Lebensspanne dieser Zellen führt (Igarashi *et al.* 1997).

Die Rolle von CD40 als die Apoptose-regulierender Faktor wird kontrovers diskutiert. Aus *in vitro*-Arbeiten von Fang *et al.* sowie Reid *et al.* ist bekannt, dass B-Zellen oder B-Lymphomzellen nach Stimulation mit agonistischen CD40-Antikörpern und anti-IgM-Antikörpern, die gemeinsam eine Antigenerkennung simulieren, das anti-apoptotische Protein

bcl_{xl} aufregulieren (Fang *et al.* 1997; Reid *et al.* 1997). Hess *et al.* wiederum beschrieben, dass obwohl CD40 ein TNF-Rezeptor ohne intrazelluläre Todesdomäne ist, die Aktivierung von CD40 zur Induktion des Apoptose führt (Hess *et al.* 1996). Die aufgestellte Hypothese, dass die orale Toleranzinduktion gegen Nickel die Lebensspanne, der B-Zellen verkürzt, könnte durch die Untersuchung mittels Einbau des Thymidinanalogs BrdU und der Durchflusszytometrie überprüft werden.

Eine Funktion von CD40 als Apoptose-regulierenden Überlebensfaktor wird durch weitere Befunde der hier vorliegenden Arbeit untermauert. So weisen Mäuse, welchen für vier Wochen $NiCl_2$ im Trinkwasser verabreicht wurden (Ni^{high} -Mäuse), eine stark verringerte mRNA-Expression der anti-apoptotischen Proteine $bcl-2$ und bcl_{xl} auf (Abb. 3.1.3). Diese Proteine sind von zentraler Bedeutung für die Regulation der Apoptose-Signalkaskade. $Bcl-2$ und bcl_{xl} funktionieren, indem sie die durch bax/bak induzierte Porenbildung in den Mitochondrien und damit die Auslösung der Apoptose-Signalkaskade inhibieren (Strasser *et al.* 2000).

Die Expression von CD38 war in Ni^{high} -B-Zellen stark erhöht (Abb. 3.1.2). CD38 wird in der Milz von B-Zellen sowie auch T-Zellen und dendritischen Zellen exprimiert (Donis-Hernandez *et al.* 2001; Read *et al.* 1998; Zubiaur *et al.* 1999). Durch Experimente mit agonistischen anti-CD38 Antikörpern ist bekannt, dass CD38 die Aktivierung und Apoptose von B-Zellen der Keimzentren reguliert (Funaro *et al.* 1997; Lund *et al.* 1995; Zupo *et al.* 1994). Möglich ist daher, dass die auf Ni^{high} -B-Zellen erhöhte CD38-Expression einen weiteren Beitrag zur Senkung der Apoptoseschwelle leistet.

Eine weitere Veränderung der Ni^{high} -B-Zellen betraf die Fas-Expression. Unter physiologischen Bedingungen exprimieren B-Zellen nur geringe Mengen Fas auf der Zellmembran, wie es auch anhand der Ni^{low} -B-Zellen bestätigt werden konnte. Dagegen wiesen Ni^{high} -B-Zellen sowohl auf mRNA- wie auch Ebene der Proteinexpression eine gegenüber Ni^{low} -B-Zellen erhöhte Expression dieses Apoptose-induzierenden Rezeptors auf (Abb. 3.1.2). Aus diesen phänotypischen und genotypischen Veränderungen lässt sich schlussfolgern, dass die orale Toleranzinduktion gegen Nickel zu einer erniedrigten Schwelle der Apoptose in Ni^{high} -B-Zellen führt.

Im folgenden sollen die Mechanismen erläutert werden, die zu den beobachteten Veränderungen des B-Zellphänotyps führen.

4.2. Durch welche Mechanismen senkt Nickel die Schwelle zur Apoptoseinduktion ?

4.2.1 Genotoxizität und DNA-Reparatur

Eines der Ergebnisse der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proteomanalyse ist eine bereits drei Stunden nach intradermaler Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ in Ni^{low} -, nicht aber Ni^{high} -B-Zellen der Milz beobachtete *de novo*-Translation von Ku-80 (Abb. 3.5.3). Ku-80, die DNA-Helicase II, ist an der Reparatur von Doppelstrangbrüchen beteiligt (Peterson *et al.* 1995). Dies wird durch Befunde aus der Literatur unterstützt, nach denen Nickel die DNA-Reparatur inhibiert.

Nickel besitzt die Eigenschaft DNA-Reparaturmechanismen zu inhibieren (Cavallo *et al.* 2003; Danadevi *et al.* 2004; Hu *et al.* 2004; Lynn *et al.* 1997; Wozniak *et al.* 2004). Zu den aus der Literatur bekannten *in vitro*-Studien ist anzumerken, dass dort die auf untersuchten Zelllinien eingesetzten Nickelkonzentrationen teilweise um Potenzen die für primäre Lymphozyten subtoxischen Konzentrationen überschreiten. Lynn *et al.* zeigten, dass Nickel synergistisch mit H_2O_2 durch Bildung reaktive Sauerstoffradikale die DNA-Polymerisation und DNA-Ligation inhibiert (Lynn *et al.* 1997). Im Gegensatz zur schwächeren Wirkung der Einzelsubstanzen Nickel oder H_2O_2 waren diese Effekte nicht durch Radikalfänger wie Glutathion inhibierbar.

Neben der Eigenschaft, die DNA-Reparatur zu inhibieren, ist bekannt, dass Nickel genotoxisch ist (Barceloux 1999; Danadevi *et al.* 2004). Wie Danadevi *et al.* berichteten, führte die akute orale Gabe von NiCl_2 in Mäusen bereits nach vier Stunden in Blutleukozyten zu nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüchen (Danadevi *et al.* 2004). Die niedrigste dort getestete NiCl_2 -Konzentration (3.4 mg/kg Körpergewicht) erzielte bereits signifikante Effekte. Bemerkenswerterweise ist diese Konzentration circa dreizigfach niedriger als die errechnete, tägliche Aufnahme der in der vorliegenden Arbeit verwendeten 10 mM NiCl_2 -Lösung von 117 mg/kg Körpergewicht und auch niedriger als die von Barceloux *et al.* eingesetzte Konzentration. Wie Danadevi *et al.* weiter darstellten, konnten nach weiteren 24 Stunden weniger Strangbrüche beobachtet werden, was die Autoren auf eine in Gang gesetzte DNA-Reparatur zurückführten. Dies steht scheinbar im Widerspruch zur Arbeit von Barceloux *et al.* und der hier vorliegenden Arbeit. Aus dem Vergleich der in den einzelnen Modellen verwendeten Konzentrationen kann man allerdings schlussfolgern, dass die Genotoxizität von Nickel und Inhibition der DNA-Reparatur von der Ni-Konzentration abhängig sind.

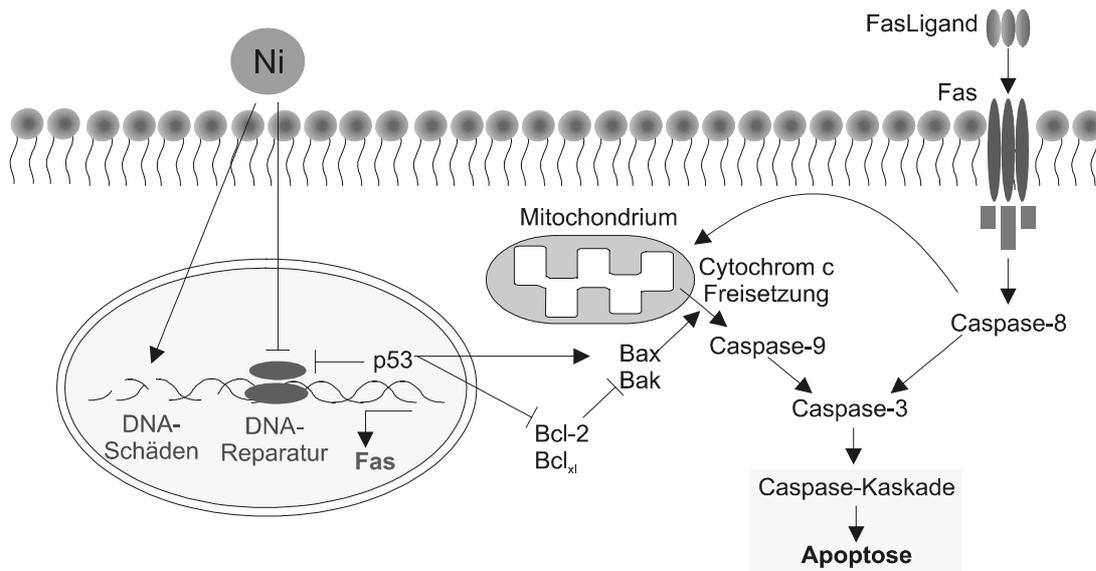


Abb. 4.2.1. Arbeitshypothese (I): Dysregulation von Apoptosesignalen durch Nickel.

Die orale Gabe von NiCl_2 führt zu DNA-Doppelstrangbrüchen und der Inhibition der DNA-Reparatur (links). Die DNA-Schädigung aktiviert den Transkriptionsfaktor p53. Dieser initiiert die Fas-Transkription (links), aktiviert die pro-apoptotischen Moleküle bax/bak sowie inhibiert die anti-apoptotischen Moleküle bcl-2 und bcl_{xl} (Mitte). Durch Fas-Ligation und der Inhibition von bcl-2/bcl_{xl} kommt es zur Auslösung der Caspase-Signalkaskade und der Apoptose.

Wie im Folgenden erläutert wird, sind diese Befunde als mögliche Mechanismen der erhöhten Apoptosesensibilität von B-Zellen von Bedeutung (schematisch dargestellt in Abb. 4.2.1):

4.2.2. Die Rolle von p53

Der Transkriptionsfaktor p53 kann als ein Sensor für DNA-Schäden betrachtet werden (Bates *et al.* 1999). Zellen mit DNA-Schädigung sind, da sie die latente Gefahr der unkontrollierten Zellteilung in sich bergen, eine Gefahr für mehrzellige Organismen. Einem gängigen Konzept zufolge entsprechend werden Zellen mit reparablen DNA-Schäden im Zellzyklus gestoppt, um die Reparatur zu ermöglichen. Auf der anderen Seite müssen Zellen mit irreparablen oder ausgedehnten DNA-Schäden durch Apoptose eliminiert werden (Bates *et al.* 1999). Diese Schritte werden zentral durch p53 gesteuert. Durch welche Mechanismen p53 über G1-Zellzyklus-Arretierung oder Apoptose entscheidet, ist noch unklar.

Die Aktivierung des Transkriptionsfaktors p53 führt einerseits zur Expression bestimmter, andererseits zur Inhibierung die Apoptose regulierender Gene. Zielgene sind u.a. Fas und das pro-apoptotische Protein bax, deren Transkription initiiert wird. Umgekehrt wird die Transkription des bax-Antagonisten bcl-2 durch p53 inhibiert (Tokino *et al.* 2000). Die Veränderung exakt dieser p53-Zielgene konnte in der vorliegenden Arbeit auf Ebene der mRNA- bzw. Proteinexpression nachgewiesen werden (Abb. 3.1.2 und 3.1.3). Wie Salnikow *et al.* zeigten, führte die Inkubation von Maus-Fibroblasten *in vitro* zur Aktivierung von p53

(Salnikow *et al.* 2003). Ob die orale Ni-Gabe tatsächlich p53 *in vivo* aktiviert, konnte nicht mehr geklärt werden. Aufgrund der in Abschnitt 3.1.3. geschilderten Befunde der verringerten bcl-2 und erhöhten Fas-Expression sowie einer Vielzahl von Literaturhinweisen ist p53 ein vielversprechender Ansatzpunkt, die Mechanismen der in Ni^{high}-B-Zellen beobachteten bcl-2 und bcl_{xl}-Inhibition zu erklären. Diese Hypothese wird durch den Befund unterstützt, das Ni^{low}-B-Zellen, nicht aber Ni^{high}-B-Zellen nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ das Protein grp75 (Calprotectin) *de novo* translatieren (Abb. 3.5.3). Von grp75 ist bekannt, dass es durch Bindung an p53 diesen inhibiert (Kaul *et al.* 2000), was in Ni^{high}-B-Zellen offenbar nicht möglich ist.

4.2.3. Der Einfluss der Immunisierung

In Abschnitt 3.3.1.2. wurde dargestellt, dass Ni^{high}-B-Zellen als Antwort auf Immunisierungen mit NiCl₂/H₂O₂ die Expression des Serin-/Cysteinproteaseinhibitors SerpinA3G herabregulieren, während Ni^{low}-B-Zellen umgekehrt eine 15-fache Aufregulation zeigen. SerpinA3G gehört zur Klasse der Serin- und Cysteinproteaseinhibitoren und ist in der Literatur unter verschiedenen Synonymen bekannt (u.a. 2A2, alpha-1 antiproteinase, Spi2A). Wie Zhao *et al.* beschrieben, wurde SerpinA3G in murinen Fibroblasten nach Inkubation mit NiCl₂ herabreguliert (Zhao *et al.* 2004c). Dieser Effekt wurde durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 α vermittelt. HIF-1 α , Hypoxia-inducible factor-1 α , wird durch Hypoxie aber auch unter dem Einfluss von reaktiven Sauerstoffspezies aktiviert (Lee *et al.* 2004), wie sie durch die Reaktion von NiCl₂ und H₂O₂ entstehen können (Shi *et al.* 1992; Stohs *et al.* 1995). Von SerpinA3G ist bekannt, dass es als Inhibitor der durch reaktive Sauerstoffspezies ausgelösten Apoptose wirken kann (Liu *et al.* 2004). Die Aktivierung von HIF-1 α führte in diesem *in vitro*-System zur Expressionserhöhung weiterer pro-apoptotischer Faktoren wie NIP2 oder Cap43 (Zhao *et al.* 2004a). Diese wurden bislang in Ni^{high}-B-Zellen nicht untersucht, würden allerdings zu einem besseren Verständnis der Apoptose-Dysregulation in Ni^{high}-B-Zellen beitragen. Insgesamt betrachtet scheint die orale Verabreichung von NiCl₂ die Transkription einer Reihe von Apoptose-regulierenden Proteinen zu regulieren, welche die Apoptosesensibilität der B-Zellen anhebt.

Im Rahmen der Proteomanalyse konnten bislang zwei Spots identifiziert werden, die von den getesteten Gruppen lediglich von unimmunisierten Ni^{low}-B-Zellen nicht exprimiert werden, dies waren die Proteine Calgranulin B und Metastasin (Abb. 3.5.2). Calgranulin B ist ein Calcium-bindendes Protein und wird von Neutrophilen und Monozyten exprimiert, in diesen Zellen reguliert es die Migration (Ryckman *et al.* 2003). Eine Expression in B-Zellen ist nicht

bekannt. Calgranulin B besitzt *in vitro* pro-apoptotische Effekte auf Neutrophile (Ghavami *et al.* 2004). Welche Funktion dieses Protein im Nickelmodell ausübt, ist nicht klar. Da dieses Protein lediglich in unbehandelten (Ni^{low} -) Zellen nicht exprimiert wurde, deutet darauf hin, dass selbst intradermale Injektionen von NaCl bereits nach 3 Stunden in B-Zellen der Milz zellulären Stress induziert. Metastasin, war das zweite lediglich in Ni^{low} -B-Zellen nicht exprimierte Protein. Metastasin ist ein weiteres Calcium-bindendes Protein und spielt eine Rolle im Zellzyklus (Tulchinsky *et al.* 2005). Es wird von Tumorzellen exprimiert und reguliert die Zellproliferation durch den Übergang zwischen der G1 und S-Phase (Sherbet *et al.* 1998). Welche Konsequenzen die Expression für die Toleranzübertragung durch B-Zellen hat, ist nicht klar.

Bei der Analyse der Proteinexpression fiel auf, dass lediglich Ni^{low} -B-Zellen auf die Immunisierungen durch *de novo*-Translation unterschiedlicher Proteine reagierten, während Ni^{high} -B-Zellen als wenig responsiv erschienen. Konnten in ruhenden B-Zellen dieser Ni^{high} -Mäuse noch im Autoradiogramm differenziell regulierte Proteine entdeckt werden (Abb. 3.5.1), waren Ni^{high} -B-Zellen nach Immunisierung in diesem Hinblick nicht responsiv. Biologisch ist es für eine sterbende Zelle offenbar wenig sinnvoll, Proteine neu zu translatieren.

4.3. Die Rolle der Apoptose bei der Toleranzinduktion

Aufgrund der auffälligen Veränderungen von Ni^{high} -B-Zellen, welche auf eine erhöhte Apoptosesensibilität hindeuten, und der Literaturhinweise wurde die Frage untersucht, ob das Apoptose-induzierende Rezeptor-Ligandenpaar Fas und FasLigand für die Toleranzinduktion gegen Nickel benötigt wird.

Im Maus-Ohrschwellungstest konnte gezeigt werden, dass weder Fas- noch FasLigand-defiziente Mäuse durch die orale Nickelgabe gegen Nickel tolerisiert werden konnten (Abb. 3.2.1). Diese Befunde der vorliegenden Arbeit gliedern sich in eine Reihe weiterer Arbeiten ein. In diesen Arbeiten wurde die Rolle der Fas-induzierten Toleranz durch unterschiedliche Modelle belegt (Ferguson *et al.* 2002; Gao *et al.* 1998; Hill *et al.* 1999; Schwarz *et al.* 1998).

In zwei Arbeiten mit abweichenden Ergebnissen wurde die durch UVB-Strahlung induzierte Toleranz gegen das Kontaktallergen Dinitrofluorbenzol (DNFB) untersucht (Schwarz *et al.* 1998; Hill *et al.* 1999). Durch UVB- Bestrahlung und anschließende Applikation von DNFB auf die bestrahlte Haut war es möglich, eine spezifische Toleranz zu induzieren, die von einem intakten Fas-FasLigand-System abhängig war. Unklar blieb in diesen Arbeiten allerdings, welche Zellen Fas exprimieren müssen. In beiden Arbeiten wurden unter abweichenden

Bedingungen Adoptivtransferexperimente mit Zellen aus UVB-bestrahlten und DNFB-toleranten Tieren durchgeführt. Hill *et al.* zeigten, dass die T-Zellen dieser Spendermäuse FasLigand exprimieren müssen um eine Toleranz zu übertragen. Im Gegensatz dazu kommen Schwarz *et al.* zu dem Schluss, nicht nur FasLigand sondern auch Fas muss in Empfänger-mäusen exprimiert werden, wodurch die UV-induzierte Toleranz in diese Mäuse übertragen werden kann. In der Arbeit von Schwarz *et al.* sind es FasLigand-exprimierende T-Zellen der DNFB-toleranten Mäuse, die nach Adoptivtransfer in unbehandelte Empfänger dort dendritische Zellen töten. Die Antwort, ob diese Mechanismen auch in den ursprünglich bestrahlten und mit DNFB behandelten Tiere abläuft bzw. welche Zellen Fas exprimieren müssen, bleiben diese Arbeiten größtenteils schuldig. Weitere, die Beantwortung der Fragen erschwerende Punkte sind die für Zelltransfers eingesetzten hohen Zellzahlen und die Verwendung unseparierter Milzzellen. Durch die Verwendung von lediglich 10^3 aufgereinigten B-Zellen konnte in der vorliegenden Arbeit dieses Problem vermieden werden. Die von Ferguson *et al.* untersuchte Toleranz gegen das Hapten Trinitrophenol (TNP) zeigte, dass *in vitro* mit TNP-beladene Zellen Fas exprimieren müssen um nach i.v. Injektion in unbehandelte Empfänger eine Toleranz gegen dieses Antigen zu induzieren.

Dies unterstützt die hier vorliegenden und weitergehenden Ergebnisse zur Fas-Abhängigkeit der Toleranzinduktion. Durch den Transfer isolierter Zellen konnte gezeigt werden, dass B-Zellen den Apoptose-induzierenden Rezeptor Fas exprimieren müssen um eine Toleranz gegen Nickel zu übertragen (Abb. 3.2.2). Nachdem dies gezeigt wurde, konnten die Voraussetzungen für die Apoptoseinduktion sowie die Konsequenzen der B-Zellapoptose näher untersucht werden.

4.4. Voraussetzungen für die Toleranzübertragung durch B-Zellen

Nachdem die an der Toleranzinduktion durch Ni^{high} -B-Zellen beteiligten Zelltypen, iNKT-Zellen und dendritische Zellen, feststanden, wurde die Frage untersucht, ob die Induktion der B-Zellapoptose durch FasLigand-exprimierende Zellen durch eine Bestrahlung *ex vivo* ersetzt werden kann. Damit verbunden wurde die Frage untersucht, ob durch die *ex vivo*-Beladung von B-Zellen aus unbehandelten Spendern mit NiCl_2 eine Tolerogenität induziert werden kann.

Wie in Abb. 3.3.6.2 gezeigt wurde, war es nicht möglich, durch B-Zellen unbehauelter Spender (Ni^{low}), die für 16 Stunden in Gegenwart von NiCl_2 kultiviert wurden, eine Toleranz zu induzieren. Andererseits war es ausreichend, nach γ -Bestrahlung mit 6 Gy dieser B-Zellen eine Toleranz zu übertragen. Daraus kann zunächst geschlossen werden, dass die Apoptose-

induktion eine Voraussetzung für die Tolerogenität von B-Zellen ist. Diese Schlussfolgerung wird durch die bereits diskutierten Vorbefunde einer erhöhten Apoptosesensibilität der tolerogenen Ni^{high}-B-Zellen gestützt. Während in diesen Zellen die Herabsetzung der bcl-2 und bcl_{xl}-Expression und erhöhte Fas-Expression die Apoptose dieser Zellen ermöglicht, wurden in dem in Abb. 3.3.6.2 genannten Experiment diese Veränderungen durch die Apoptose-induzierende γ -Bestrahlung ersetzt. Wie ebenfalls aus Abb. 3.3.6.1 ersichtlich ist, war die durch bestrahlte oder zusätzlich mit Ni-beladene B-Zellen induzierte Toleranz spezifisch gegen Nickel. Die genannten Befunde deuten erneut auf eine duale Wirkung von Nickel hin. Nickel funktioniert einerseits, indem es durch Proteinbindung Neoantigene formiert, andererseits führt Nickel zur Absenkung der Apoptoseschwelle.

Aufgrund des weiteren in Abb. 3.3.6.2 dargestellten Befundes, dass die Bestrahlung von Ni^{very low}-B-Zellen für eine Toleranzinduktion nicht ausreichend war, kann ferner geschlossen, dass die durch B-Zellen aufgenommene Menge Nickel eine weitere Voraussetzung für die Toleranzinduktion ist. Dieser Schluss wird indirekt durch die gemessenen und in Abb. 3.3.4 dargestellten Unterschiede des Nickelgehaltes bestätigt. Mit Hilfe der Atomabsorptionsspektroskopie konnten signifikante Unterschiede im Nickelgehalt der Milzen von Ni^{very low}- und Ni^{low}-Mäusen festgestellt werden (Abb. 3.3.4). Diese Milzen enthalten erfahrungsgemäss etwa 60 % B-Zellen. Allerdings konnten durch Anfärbung von Nickel mit dem Fluoreszenzfarbstoff Newport Green und der Durchflusszytometrie keine Unterschiede im Nickelgehalt von Ni^{very low}- und Ni^{low}-B-Zellen festgestellt werden (Abb. 3.3.5). Wie bereits in Abschnitt 3.3.6 erläutert wurde, konnte für die Messung des Nickelgehaltes in Einzelzellsuspensionen die AAS-Messung nicht angewendet werden. Die Isolierung von B-Zellen erfordert die Bindung dieser Zellen an Antikörper-konjugierte Metallpartikel. Zusätzlich muss die Zellsuspension durch die Metallmatrix der MACS-Sortiersäule geführt werden. Es wurde angenommen, dass durch diese *ex vivo*- Manipulation der Zellen in der empfindlichen AAS-Messung das Signal durch starkes Hintergrundrauschen zu überlagert wird.

Aus diesen Ergebnissen kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Aufnahme von Nickel durch B-Zellen ein weiterer Faktor für die Toleranzinduktion durch diese Zellen ist. Eine wichtige Funktion der B-Zellen für die Toleranz ist offenbar der Transport und die Bereitstellung von Nickel-Proteinkomplexen, was ihrer physiologischen Funktion als antigen-präsentierende Zelle entspricht. Dies allein ist allerdings nicht ausreichend. Für eine Toleranzinduktion durch B-Zellen müssen diese für die Apoptoseinduktion sensibilisiert werden. Ni^{high}-B-Zellen waren durch ihren Phänotyp (bcl-2^{niedrig}, bcl_{xl}^{niedrig}, Fas^{hoch}) bereits Apoptose-sensibel, in Ni^{low}-B-Zellen wurde dies durch die γ -Bestrahlung erzielt.

Wie in Abb. 4.4 schematisch dargestellt ist, kann anhand der bisherigen Befunde folgende Arbeitshypothese aufgestellt werden:

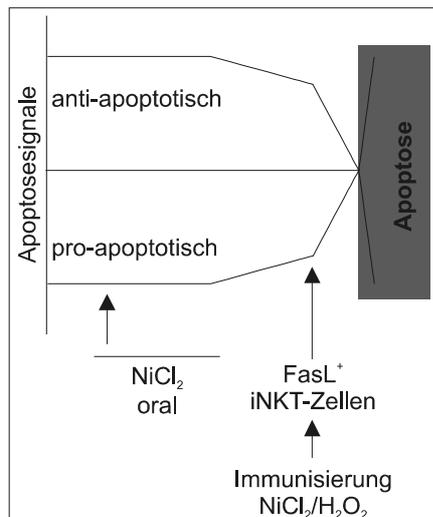


Abb. 4.4. Arbeitshypothese (II): Senkung der Schwelle zur Apoptoseinduktion.

Die orale Verabreichung von NiCl_2 führt zu einer gleichzeitigen Absenkung anti-apoptotischer Signale und Verstärkung pro-apoptotischer Signale. Dies führt zu einer Senkung der Apoptoseschwelle, welche nach Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ zur Apoptose führt.

Für die Induktion der Apoptose sind zwei Faktoren nötig. Oral verabreichtes NiCl_2 stellt einen nötigen Faktor dar. Es wird durch Lymphozyten aufgenommen und führt dort zu einer Herabsetzung von Überlebenssignalen (bcl_{x1} , bcl-2 , siehe Abb. 3.1.3), was in diesem Stadium bereits die „Weichen in Richtung Apoptose“ stellt. Die Immunisierung durch intradermale Injektion von $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ als zweiter nötiger Faktor bewirkt die Aktivierung von p53, wodurch das pro-apoptotische Protein bax aufreguliert wird (Abb. 3.3.1.2). Ob die bax-Aufregulation primär eine Folge der Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ ist oder, wie später diskutiert wird, durch die von iNKT-Zellen initiierte FasLigand/Fas-Interaktion ausgelöst wird, ist nicht klar.

4.5. Die Rolle dendritischer Zellen

4.5.1. Phänotyp dendritischer Zellen

In Abschnitt 3.1.2 wurde gezeigt, dass dendritische Zellen aus Ni^{high} -Mäusen eine erhöhte Expression des Multilektinrezeptors DEC-205 aufweisen. DEC-205 wird von $\text{CD8}\alpha^+$ DZ exprimiert und ist an der Phagozytose und Endozytose beteiligt (Bonifaz *et al.* 2002). In der Abwesenheit von Reifungsstimuli präsentieren DEC-205^+ DZ phagozytiertes Antigen nach DEC-205-vermittelter Aufnahme an T-Zellen und induzieren so die Bildung regulatorischer

T-Zellen (Bonifaz *et al.* 2002; Hawiger *et al.* 2001; Mahnke *et al.* 2003). DEC-205 wird auch auf Epithelzellen des Thymuskortex exprimiert. Dort konnte gezeigt werden, dass die Beseitigung apoptotischer Thymozyten durch DEC-205 vermittelt wird (Small *et al.* 2003). Ob DEC-205 für die Induktionsphase der Nickeltoleranz eine funktionelle Bedeutung hat, ist unklar. Denkbar wäre, dass DEC-205 auch hier an der Beseitigung apoptotischer B-Zellen beteiligt ist, die auch im Rahmen ihrer Lebensspanne in nicht-immunisierten Mäusen anfallen.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die auf Ni^{high}-B-Zellen erhöhte CD38-Expression (Abb. 3.1.2). Die Expression von CD38 auf B-Zellen steuert durch Ca²⁺-Freisetzung in Vorläufer-DZ die Migration dieser Zellen vom Blut in die Peripherie sowie die Migration reifer DZ aus Entzündungsherden in die Lymphknoten (Partida-Sanchez *et al.* 2004). Aufgrund dieser Hinweise ist es denkbar, dass CD38 dendritische Zellen als *come-get-me*-Signal anlockt. Diese *come-get-me*-Signale werden von apoptotischen Zellen exprimiert und locken Phagozyten an, die diese schließlich aufzunehmen (Übersicht in Grimsley *et al.* 2003).

4.5.2 Phagozytose

Eine wichtige Funktion dendritischer Zellen ist die Fähigkeit, im *Ruhezustand*, d.h. ohne zuvor aktiviert zu werden, Antigene aus ihrer Umgebung aufzunehmen und zu präsentieren. Nach Adoptivtransfer von Milzzellen aus Ni^{high}- oder Ni^{low}-Mäusen und anschließender Immunisierung mit NiCl₂ / 1% H₂O₂ waren ca. 40 % der Empfänger-DZ positiv für den Fluoreszenzmarker CFSE (Abb. 3.3.1.1). Daraus kann geschlossen werden, dass Antigene der ursprünglich CFSE-markierten Spenderzellen von dendritischen Zellen des Empfängers aufgenommen wurden. Es konnten jedoch keine Unterschiede im Anteil CFSE-positiver DZ nach Adoptivtransfer der unterschiedlichen Milzzellen (Ni^{high} bzw. Ni^{low}) und folgender Immunisierung mit NiCl₂ / H₂O₂ festgestellt werden (Abb. 3.3.2.2). Einem Konzept von Steinman (Steinman *et al.* 2003) folgend, sind dendritische Zellen im *Ruhezustand* in der Lage, apoptotische Zellen zu phagozytieren und so die Bildung regulatorischer T-Zellen anzustoßen. Unter diesem Gesichtspunkt ist es nicht überraschend, dass, obwohl die Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ für die B-Zellapoptose nötig ist, im Phagozytoseassay (Abb. 3.3.2.2) keine Unterschiede in der Effizienz von NiCl₂ oder NiCl₂/H₂O₂ beobachtet werden können. Wie in Abb. 3.3.1.1 zu sehen ist, führte bereits die Immunisierung mit NiCl₂ (ohne H₂O₂) zu einem Anteil von circa 40 % apoptotischer B-Zellen in der Milz. Dieser hohe Hintergrund wurde im Phagozytoseassay (Abb. 3.3.2.2) mit gemessen. Dies bedeutet, geringe Unterschiede in der Aufnahme CFSE-positiver Zellen könnten zum Teil durch diesen Hintergrund überdeckt werden.

Offenbar ist die Art der Immunisierung für die Apoptose von Ni^{high}-Zellen entscheidend, nicht aber für die Aufnahme der Zellen. Es kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass dendritische Zellen des Empfängers Protein und damit den Fluoreszenzmarker CFSE von vitalen Spenderzellen übernommen haben. Dieser Vorgang wurde zuvor von Harshyne beschrieben (Harshyne *et al.* 2003). Dendritische Zellen sind demnach in der Lage, durch intimen Kontakt mit vitalen Zellen Bereiche der Plasmamembran zu übernehmen ohne die „Spenderzelle“ töten zu müssen, dieser Vorgang wird als „nibbling“ bezeichnet. Angesichts der Vorbefunde, dass nur die Immunisierung mit NiCl₂ und H₂O₂ zur B-Zellapoptose führt und diese nötig ist um die Toleranz von Spender- auf Empfängerzellen weiterzugegeben (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003b), ist diese Möglichkeit recht unwahrscheinlich.

4.5.3. Tolerogene dendritische Zellen

An die Untersuchung der Aufnahme apoptotischer Zellen schloss sich die Frage an, ob Ni^{high}-B-Zellen zur Bildung tolerogener dendritischer Zellen führen. Dies wäre die logische Konsequenz aus der Phagozytose. Zu diesem Zweck wurden erneut Adoptivtransferexperimente durchgeführt. Ni^{high}-B-Zellen wurden in unbehandelte Empfänger übertragen, die 24 Stunden nach der Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ als Spender dendritischer Zellen eingesetzt wurden. Dendritische Zellen dieser Mäuse wurden in eine weitere Gruppe von Mäusen übertragen und diese schließlich auf die Induktion einer Toleranz getestet. Wie in Abb. 3.3.3 dargestellt ist, führte die i.v. Injektion von Ni^{high}- nicht aber Ni^{low}-B-Zellen zur Bildung dendritischer Zellen, die in der Lage waren, ihrerseits eine Toleranz zu induzieren. Dies bedeutet einerseits, dass dendritische Zellen eine funktionelle Bedeutung für die Toleranz gegen Nickel besitzen. Des weiteren können aus diesem Ergebnis weitere Schlüsse auf die durch Roelofs-Haarhuis *et al.* untersuchte „infektiöse Toleranz“ gezogen werden. Diese zeigten, dass B-Zellen nach Adoptivtransfer und Immunisierung der Empfänger in der Lage sind, die Bildung regulatorischer T-Zellen anzustoßen, die ihrerseits die Toleranz weiterübertragen können (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003a). Wie aus der Literatur bekannt ist, sind dendritische Zellen in der Lage, nach Aufnahme apoptotischer Zellen die Bildung regulatorischer T-Zellen zu induzieren (Sato *et al.* 2002). Daraus kann gefolgert werden, dass dendritische Zellen ein weiterer Schritt in der „infektiösen Toleranz“ von Ni^{high}-B-Zellen zu T-Zellen darstellen.

In einem ähnlichen Ansatz wiesen Ferguson und Mitarbeiter dendritische Zellen nach, welche nach Injektion apoptotischer, mit dem Hapten Trinitrophenol Zellen eine spezifische Toleranz gegen dieses Antigen auf unbehandelte Mäuse übertragen konnten. Bei dieser Zellpopulation

handelte es sich um CD8 α -exprimierende dendritische Zellen (Ferguson *et al.* 2002). Der exakte Phänotyp dieser tolerogenen dendritischen Zellen ist im System der Nickeltoleranz bislang nicht bekannt. Aus den Befunden, dass apoptotische B-Zellen *in vivo* aufgenommen werden, kann allerdings geschlossen werden, dass es sich bei den verantwortlichen Phagozyten um CD8 α ⁺ dendritische Zellen handelt, wie es von anderen Arbeiten vorgeschlagen wird (Ferguson *et al.* 2002; Iyoda *et al.* 2002). Obwohl CD11c⁺ DZ generell in der Lage sind Partikel wie etwa Dextran aufzunehmen, sind nur CD8 α ⁺ DZ in der Lage, apoptotische Zellen zu phagozytieren (Iyoda *et al.* 2002) und später an MHC-I und MHC-II restringierte T-Zellen zu präsentieren (Sato *et al.* 2002). Bislang unveröffentlichte Daten von X.Wu zeigen, dass Ni^{high}-Mäuse sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺ Treg-Zellen besitzen, was ebenfalls für eine Beteiligung dieser DZ-Population spricht (X.Wu, persönliche Kommunikation). Wie Morelli *et al.* zeigten, phagozytieren CD8 α -negative DZ der „*marginal zone*“ apoptotisches Material und exprimieren daraufhin CD8 α (Morelli *et al.* 2003). Offenbar kommt der „*marginal zone*“ eine besondere Rolle in der Induktion der peripheren Toleranz zu. Afferente Blutgefäße münden in der Milz im sog. Randsinus (*marginal sinus*). Da der Übergang von Zellen aus den afferenten Blutgefäßen in die „*marginal zone*“ nicht reguliert wird, wie etwa der Eintritt in Lymphknoten, sind dendritische Zellen an diesem anatomischen Ort der Milz strategisch günstig platziert. Ankommende Zellen, wie apoptotische Zellen, müssen dort die um die Blutgefäße lokalisierten DZ passieren, was die Erkennung und Phagozytose begünstigt. Dendritische Zellen der Empfänger von Ni^{high}-B-Zellen transduzierten bereits 24 Stunden nach einer Immunisierung mit NiCl₂ und H₂O₂ ein tolerogenes Signal (Abb. 3.3.3). Es konnte bislang nicht nachgewiesen werden, ob die auf den Ersttransfer der Ni^{high}-B-Zellen folgende Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ für Bildung tolerogener DZ notwendig ist. Dies wäre indirekt zu erwarten, da diese Immunisierung bereits zuvor für die Apoptose der B-Zellen entscheidend ist (Abb. 3.3.1.1).

4.6. Die Rolle von iNKT-Zellen für die Induktion der Toleranz durch B-Zellen

4.6.1. Regulatorische, zytotoxische iNKT-Zellen in der Nickeltoleranz

Ein Teil der vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Frage, durch welche Zellen in Ni^{high}-B-Zellen Apoptose induziert wird. Roelofs-Haarhuis *et al.* zeigten kürzlich, dass iNKT-Zellen für die Toleranzübertragung durch B-Zellen benötigt werden (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003; Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004). Auch in der Literatur werden iNKT-Zellen mit der Toleranz in Verbindung gebracht (Wang *et al.* 1991; Sharif *et al.* 2001; Sonoda *et al.* 2002, und andere).

Es wurde daher überprüft, ob iNKT-Zellen das Apoptose-induzierende Protein FasLigand exprimieren müssen um durch B-Zellen Toleranz übertragen zu können.

Zu diesem Zweck wurden Adoptivtransferexperimente durchgeführt, in denen Ni^{high}-B-Zellen allein oder gemeinsam mit iNKT-Zellen FasLigand-defizienter Mäuse in Mäuse übertragen wurden, welche keine eigenen iNKT-Zellen besitzen (Abb. 3.4.1.3; ein Schema dieses Transfersystems ist in Abb. 3.4.1.2 dargestellt).

Mit diesem Assaysystem konnte nachgewiesen werden, dass iNKT-Zellen für die Toleranz-induktion durch Ni^{high}-B-Zellen den funktionellen FasLigand exprimieren müssen (siehe Abb. 3.4.1.3). Somit konnte erstmals demonstriert werden, dass iNKT-Zellen durch die Induktion Fas-vermittelter Apoptose an der Induktion einer Toleranz beteiligt sind.

Bislang wurden iNKT-Zellen ausschließlich durch ihre Fähigkeit große Mengen der Zytokine IL-4 und IL-10 zu produzieren, mit der Induktion einer Toleranz in Verbindung gebracht. Die vermutlich meisten Untersuchungen der Mechanismen von iNKT-Zellen wurden an den Autoimmunerkrankungen des Typ-I-Diabetes und der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis durchgeführt (siehe auch Abschnitt 1.3.2). Diese Reaktionen werden durch IFN- γ sezernierende Th1-Zellen vermittelt. Die Aktivierung von iNKT-Zellen durch den exogenen Liganden α -GalCer führte zur Ausschüttung von IL-4 und IL-10 was wiederum die Bildung von IFN- γ produzierenden Th1-Effektorzellen zugunsten von IL-4/IL-10 produzierenden Th2-Zellen verschob (Burdin *et al.* 1999). Ob darüber hinaus iNKT-Zellen weitere Proteine exprimieren müssen, wurde in diesen Arbeiten nicht näher untersucht. Ebenso ist aus der Literatur nicht bekannt, ob die Zytokine IL-4 und IL-10 für die Toleranzinduktion weitere Funktionen ausüben. Möglich ist, wie später noch diskutiert wird, dass durch NKT-Zellen ausgeschüttetes IL-4 autokrin die Expression von FasLigand reguliert.

Wie in Abschnitt 3.4.3 geschildert wurde, konnte durch γ -bestrahlte, und daher apoptotische, Ni^{high}-B-Zellen eine Toleranz auch ohne die Anwesenheit von iNKT-Zellen induziert werden. Aus diesem Befund kann zunächst der Schluss gezogen werden, dass die Bestrahlung von Ni^{high}-B-Zellen die Funktion von iNKT-Zellen ersetzt. Zusätzlich kann gefolgert werden, dass iNKT-Zellen lediglich für die Apoptoseinduktion benötigt werden. Dieser Befund schließt eine über die B-Zellapoptose hinausgehende Funktion der durch iNKT-Zellen ausgeschütteten Zytokine IL-4 und IL-10 (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004) aus. Zuvor konnte gezeigt werden, dass es nach *ex vivo*-Beladung mit NiCl₂ und γ -Bestrahlung von B-Zellen unbehandelter (Ni^{low}-) Spender möglich war, in Wildtypempfänger eine Toleranz gegen Nickel zu übertragen (Abb. 3.3.6.1). Diese Empfängermäuse besaßen iNKT-Zellen. In Abschnitt 3.4.3.

wurde daher getestet, ob so behandelte B-Zellen für die Toleranzübertragung iNKT-Zellen benötigen. Wie in Abb. 3.4.3. dargestellt ist, war es nicht möglich, durch Ni-beladene und bestrahlte B-Zellen unbehandelter Spender ohne iNKT-Zellen eine Toleranz zu induzieren. Aus diesem Befund können mehrere mögliche Schlüsse gezogen werden. Wahrscheinlich ist, dass Ni^{high}-B-Zellen nach der Apoptoseinduktion durch γ -Bestrahlung ihrerseits Zytokine wie IL-4 oder IL-10 ausschütten, die iNKT-Zellen ersetzen. Diese Möglichkeit wird durch Daten von Gao *et al.* unterstützt. Diese zeigten, dass Lymphozyten rasch nach Apoptoseinduktion IL-10 sezernieren (Gao *et al.* 1998).

4.6.2. Migration von NKT-Zellen und Regulation der FasLigand-Expression

Unter physiologischen Bedingungen besitzen NKT-Zellen wie andere Lymphozyten eine niedrige Expression von FasLigand. Obwohl bekannt ist, dass iNKT-Zellen FasLigand-vermittelte Apoptose in Tumorzellen induzieren können (Lisbonne *et al.* 2004), ist wenig über die Regulation von FasLigand bekannt. Wie in Abschnitt 3.4.2 beschrieben, wird nicht die FasLigand-Expression auf den NKT-Zellen reguliert. Stattdessen führten alle getesteten intradermale Injektionen in die Flanke der Mäuse zu einer drei- bis fünffachen Migration FasLigand-exprimierender iNKT-Zellen in die drainierenden Lymphknoten und auch in die Milz (Abb. 3.4.2). Dieser Einstrom zytotoxischer FasLigand-exprimierender iNKT-Zellen konnte 24 Stunden nach Immunisierung beobachtet werden. Damit einhergehend konnte ein Anstieg der Gesamtzahl von NKT-Zellen festgestellt werden. Die Zahl dieser Zellen sank 48 Stunden nach Immunisierung bereits unter die Ausgangszellzahl um 72 Stunden später zum Ausgangsniveau zurückzukehren.

Ursprünglich wurde dieses Phänomen der rasch nach Aktivierung abnehmenden Zahl von NKT-Zellen auf Apoptose zurückgeführt, ein dem von klassischen T-Zellen als „*activation-induced cell death*“ bekannter Mechanismus eine Immunreaktion zu limitieren (Crowe *et al.* 2003). Wie sich später herausstellte, regulieren NKT-Zellen nach Aktivierung den T-Zellrezeptor herunter, so dass sie nicht mehr als NKT-Zellen sondern vielmehr als NK-Zellen zu erkennen wären, die den Marker NK.1.1 exprimieren aber keinen T-Zellrezeptor besitzen (Crowe *et al.* 2003).

Wie aus Abb. 3.4.2. ersichtlich ist, zeigt der Influx FasLigand⁺ NKT-Zellen in Milz und drainierenden Lymphknoten die gleiche Kinetik. Im Vergleich zur Migration in die Lymphknoten ist der Lymphozyteneintritt in die Milz nicht reguliert, was den Eintritt von NKT-Zellen in die Milz erklären kann.

NKT-Zellen führen sowohl Funktionen der erworbenen Immunität wie auch an der angeborenen Immunität aus (Kronenberg *et al.* 2002). Eine Voraussetzung einer erfolgreichen Pathogenabwehr ist die schnelle Aktivierung von Zellen der angeborenen Immunität, wie NKT-Zellen. Es ist daher erklärlich, dass NKT-Zellen durch eine Vielzahl unterschiedlicher Stimuli wie der getesteten Kochsalzinjektion aktiviert werden, bzw. zur Migration angeregt werden. Aus der Literatur sind keine Daten einer vergleichbaren Migration von NKT-Zellen bekannt. Es bleibt zu prüfen, ob NKT-Zellen auch durch andere Traumata, wie durch Injektionen verursachte Gewebsschäden zur Migration angeregt werden.

Letztlich bleibt der Ursprung der Milz und Lymphknoten infiltrierenden NKT-Zellen ungeklärt. Die größte Zahl iNKT-Zellen findet sich in der Leber (Emoto *et al.* 2003). Wie in Abschnitt 3.4.3 dargestellt, sind bereits apoptotische Ni^{high}-B-Zellen in der Lage auch ohne iNKT-Zellen eine Toleranz zu induzieren. Dies bedeutet, die Funktion von iNKT-Zellen kann tatsächlich auf die Zytotoxizität zurückgeführt werden. Für die Induktion der Toleranz durch Ni^{high}-B-Zellen werden iNKT-Zellen benötigt, welche IL-4 und IL-10 sezernieren können (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004). Aus der Literatur ist bekannt, dass durch NKT-Zellen ausgeschüttetes IL-4 autokrin die FasLigand-Expression positiv reguliert (Kaneko *et al.* 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass die von Roelofs-Haarhuis beschriebene IL-4 / IL-10 Produktion proximal der B-Zellapoptose agieren. Ob diese Zytokine die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Proteinen der Ni^{high}-B-Zellen zugunsten der Apoptose verschieben, wie es die Aufregulation von bax nach Immunisierung mit NiCl₂/H₂O₂ (Abb. 3.3.2) zeigt, ist nicht bekannt. Hier sind durch die Verwendung von genetisch manipulierten Mausstämmen als NKT-Zellspender und der im Rahmen dieser Arbeit begonnenen B-Zell-Proteomanalyse (siehe Abschnitt 3.5) weitere Erkenntnisse zu erwarten.

4.6.3. Wechselwirkungen von iNKT-Zellen und B-Zellen

NKT-Zellen sind für ihre Fähigkeit bekannt, die Zytokine IL-4, IL-10 und IFN- γ auszuschütten. Es ist generell anerkannt, dass IL-4 und IFN- γ teilweise gegensätzliche Funktionen ausüben und zueinander in antagonistischer Beziehung stehen. Dies bedeutet, dass die Produktion dieser Zytokine klar reguliert sein muss. Wie Hayakawa *et al.* zeigten, waren NKT-Zellen nach Stimulation des T-Zellrezeptors und CD40Ligand in der Lage IFN- γ zu sezernieren, die gleichzeitige Blockade von CD40 verhinderte die IFN- γ Produktion (Hayakawa *et al.* 2001). Eine der auffälligsten phänotypischen Veränderungen von Ni^{high}-B-

Zellen ist die stark herabgesetzte Expression von CD40. Es ist daher denkbar, dass die herabgesetzte CD40-Expression auf Ni^{high}-B-Zellen in iNKT-Zellen die Ausschüttung der Th2-Zytokine IL-4 und IL-10 anregt und die Ausschüttung von IFN- γ blockiert. Es ist interessant zu erfahren, ob die Injektion von rekombinantem IFN- γ die Toleranzinduktion durch B-Zellen inhibieren kann. Gleichmaßen könnte durch gezielten Einsatz von B-Zellen aus Zytokinrezeptor-defizienten Mausstämmen näheren Aufschluss über die Frage bringen, welche Zytokine auf B-Zellen einwirken müssen. So inhibiert IFN- γ die Apoptose von B-Zellen (Buschle *et al.* 1993) und führt in B-Zellen zu anhaltender Expression des anti-apoptotischen Proteins bcl-2 (Tangye *et al.* 1997). Des weiteren agiert IFN- γ als B-Zellwachstumsfaktor und hebt durch eine negative Regulation von IL4-R die B-Zellapoptose-induzierende Wirkung von IL-4 auf (Byron *et al.* 1991).

Wie Abb. 3.1.2 darstellt, weisen B-Zellen der „*marginal zone*“ eine erhöhte CD1d-Expression auf. Diese MZ B-Zellen sind in der „*marginal zone*“ resident und sitzen dort in direkter Umgebung zu den bereits erwähnten dendritischen Zellen. Es ist bekannt, dass MZ B-Zellen für die Induktion der okularen Toleranz, dem sogenannten ACAID-Modell (siehe auch Abschnitt 1.3.3) nötig sind, in dem sie dort mit iNKT-Zellen interagieren (Faunce *et al.* 2001; Sonoda *et al.* 2002). MZ B-Zellen sind es auch, welche nach vierwöchiger oraler Ni-Gabe eine erhöhte CD1d-Expression aufweisen (Abb. 3.1.2). Ob diese kleine B-Zellsubpopulation der Milz eine funktionelle Bedeutung hat, indem durch CD1d:TZR-Interaktion zwischen diesen Zellen und iNKT-Zellen diese aktiviert werden, ist noch ungewiss. Im ACAID-Modell konnte gezeigt werden, dass MZ B-Zellen über noch unbekannte Mechanismen Antigen von immigrierenden antigenpräsentierenden Zellen übernehmen. In diesem System wird vermutlich Antigen auf B-Zell-CD1d an iNKT-Zellen präsentiert und diese daraufhin aktiviert. Obwohl bislang einige wenige endogene CD1d-Liganden identifiziert wurden (Zhou *et al.* 2004), ist es für die untersuchten Toleranzmodelle ebenso wie für die oral induzierte Nickeltoleranz noch völlig unklar, welche Antigene durch iNKT-Zellen tatsächlich erkannt werden.

4.7. Sind die Mechanismen der Toleranzinduktion für Nickel allgemeingültig ?

Die orale Gabe von Nickel induziert eine Toleranz, in dem B-Zellen, iNKT-Zellen und dendritischen Zellen interagieren. Aus unterschiedlichen Gründen ist Nickel ein spezielles Antigen und daher nicht ohne weiteres mit den vielfach studierten Proteinantigenen wie Ovalbumin vergleichbar. Es drängt sich daher die Frage auf, inwiefern die Mechanismen der Toleranzinduktion gegen Nickel auf andere Antigene übertragbar sind. Eine Besonderheit von

Nickel ist die Fähigkeit an verschiedene Proteine und Zellen zu binden. Man kann davon ausgehen, dass die Bindung von Nickel an B-Zellen und die Aufnahme durch diese poly- oder sogar pan-klonal erfolgt, d.h. diese Zellen keine Spezifität für Nickel aufweisen, da Nickel in der Lage ist, an unterschiedliche Aminosäurereste zu binden und so Proteine zu vernetzen (Draeger *et al.* 2004). Eine weitere besondere Eigenschaft von Nickel ist die Verursachung von DNA-Schäden und die Inhibition der DNA-Reparatur (Danadevi *et al.* 2004 und andere). Einfach ausgedrückt, Nickel verursacht Schäden und blockiert deren Reparatur. Diese Eigenschaft ist von Proteinantigenen nicht anzunehmen.

Die Senkung der Schwelle zur Apoptose führt offenbar zur Beseitigung dieser Zellen auch im Ruhezustand. Von diesem Umstand ist auszugehen, da Ni^{high}-Mäuse nach vierwöchiger Ni-Gabe, ohne immunisiert zu werden, Nickel-spezifische regulatorische T-Zellen besitzen (Artik *et al.* 2001). Wahrscheinlich begünstigt Nickel die Induktion der Toleranz durch eine Verkürzung der Lebensspanne der B-Zellen. Die Genotoxizität von Nickel, wie sie von anderen Arbeiten nachgewiesen wurde, sowie die Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen, worauf auch Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hindeuten (in 4.2.1 diskutiert), würden zu diesem Effekt maßgeblich beitragen.

Die Bildung autoreaktiver, regulatorischer T-Zellen, also Effektorzellen der Selbsttoleranz, wird durch die Aufnahme apoptotischer Zellen und Präsentation durch DZ gesteuert. Es daher recht wahrscheinlich, dass gealterte oder beschädigte Zellen, wie solche unter dem Einfluss von NiCl₂, zu diesem Prozess der Selbsttoleranz beitragen. Nickel bereitet B-Zellen offenbar für die Apoptose vor, was einfach ausgedrückt, zu deren „vorzeitiger Alterung“ führt – sie werden vorzeitig als apoptotische Zellen durch Phagozytose beseitigt.

Es kann davon ausgegangen werden, dass die weiteren Schritte in der Bildung regulatorischer Nickel-spezifischer T-Zellen, wie sie von Roelofs-Haarhuis *et al.* 2003 beschrieben wurden, den aus der Literatur beschriebenen, und in Abschnitt 4.5. diskutierten Mechanismen entsprechen. Offenbar sind die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mechanismen der Toleranzinduktion den Mechanismen der Selbst-Toleranz weitgehend entsprechend. Eine Möglichkeit, die letztendlich formell bewiesen werden muss, ist das die von anderen beschriebene Toxizität von Nickel und dessen Fähigkeit, den B-Zellphänotyp zu modulieren, zur vorzeitigen Alterung der B-Zellen führt. Die Eigenschaft an verschiedene Proteine und Zellen zu binden, würde dementsprechend zu einer mit der Aufrechterhaltung der Selbsttoleranz verbundenen Induktion einer auch gegen Nickel gerichteten Toleranz führen.

4.8. Modell einer von B-Zellen ausgehenden Toleranzinduktion gegen Nickel

Basierend auf den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Schritte der Toleranzinduktion gegen Nickel, können diese in einem Modell zusammengefasst werden: Die erhöhte Nickelexposition durch oral Gabe von NiCl_2 führt in Ni^{high} -B-Zellen zur stabilen Aufnahme von Ni-Ionen, welche intra- und extrazellulär Proteinkomplexe bilden und so zur Formation von Neoantigenen führen (Gleichmann *et al.* 1999). Die zelluläre Nickelaufnahme führt über die Aufregulation von Fas sowie der Herabregulation von bcl-2 , bcl_{xl} sowie des kostimulatorischen Moleküls CD40 zu einer Erhöhung der Apoptosesensibilität dieser Zellen.

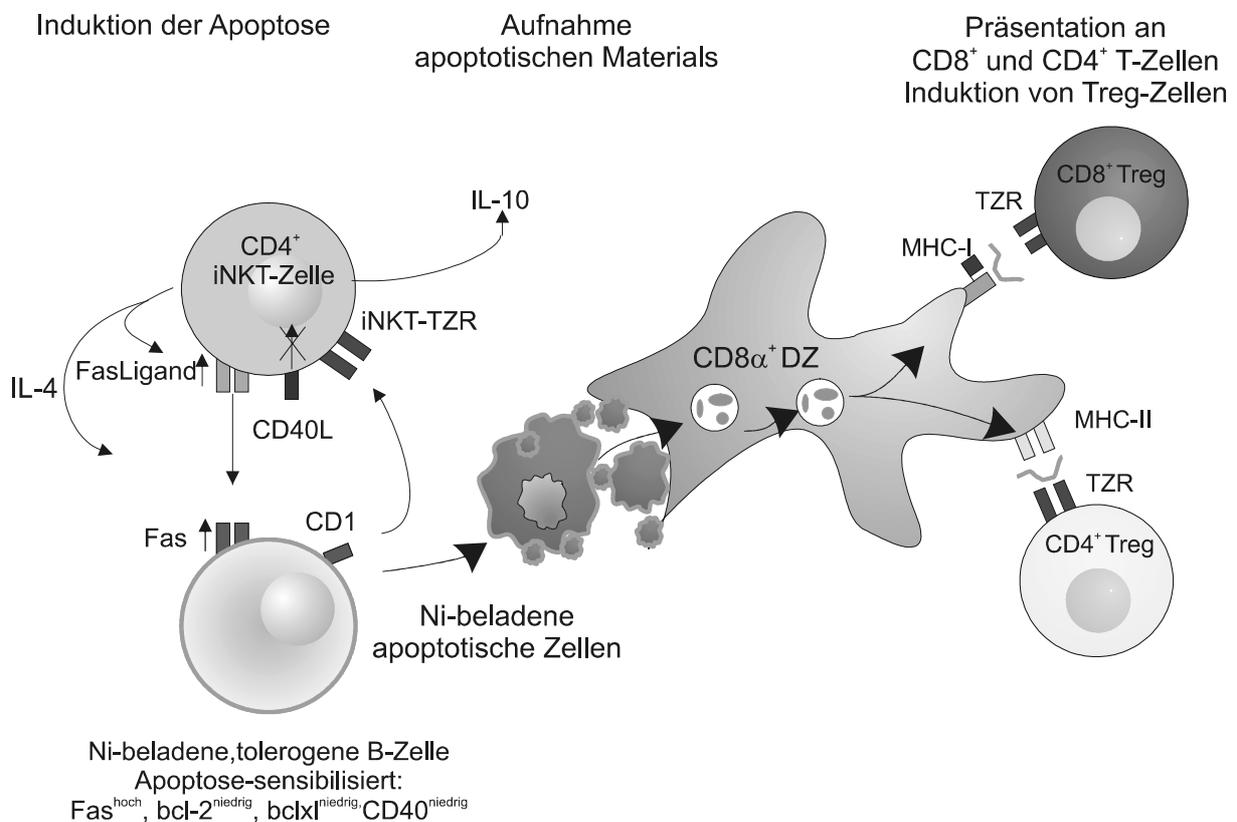


Abb. 4.6. Modell der Interaktionen von iNKT-Zellen, B-Zellen und dendritischen Zellen für die Induktion der Nickeltoleranz.

Die CD1-TZR-Interaktion zwischen Ni^{high} -B-Zellen und iNKT-Zellen führt zur IL-4 und IL-10-Produktion (links). Unter dem Einfluß von IL-4 induzieren FasLigand-exprimierende iNKT-Zellen in bereits Apoptose-sensiblen Ni^{high} -B-Zellen Apoptose (links). Apoptotische B-Zellen werden daraufhin durch dendritische Zellen der Milz phagozytiert (Mitte) und Ni-komplexe dieser Zellen an CD4^+ und CD8^+ T-Zellen präsentiert, was die Bildung regulatorischer T-Zellen zur Folge hat (rechts).

Wie bereits von anderen beschrieben wurde, werden CD4^+ iNKT-Zellen für die Induktion der Toleranz benötigt (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004). Die Interaktion zwischen den CD40 schwach exprimierenden und CD1d-positiven Ni^{high} -B-Zellen und dem T-Zellrezeptor der

iNKT-Zellen aktiviert diese und führt zur Ausschüttung von IL-4 und IL-10, wie es in Teilen von Roelofs-Haarhuis *et al.* gezeigt wurde (Roelofs-Haarhuis *et al.* 2004). Nicht bekannt ist, welches Antigen durch B-Zellen auf den CD1-Molekülen präsentiert wird und ob diese CD1d-TZR-Interaktion der Auslöser für die IL-4/IL-10-Produktion ist.

Die Funktion des durch iNKT-Zellen ausgeschütteten IL-10 ist nicht klar. Möglich wäre, dass IL-10 auf dendritische Zellen einwirkt, in dem es die Reifung durch NiCl₂ und H₂O₂ verhindert. Für IL-4 existieren in der Literatur Hinweise, dass IL-4 die FasLigand-Expression auf NKT-Zellen autokrin aufreguliert (Kaneko *et al.* 2000).

Das Zusammenspiel dieser genannten Faktoren führt zur beobachteten Apoptose von Ni^{high} B-Zellen. Ni^{high}-B-Zellen werden daraufhin durch dendritische Zellen der Milz aufgenommen. Höchstwahrscheinlich handelt es sich bei diesen um CD8 α -exprimierende DZ, da nur diese DZ-Population in der Lage ist, apoptotische Zellen zu phagozytieren (Iyoda *et al.* 2002). Es ist ebenfalls für CD8 α ⁺ DZ gezeigt worden, dass über sie über den Mechanismus der „*cross-presentation*“ die Differenzierung von CD8⁺ und CD4⁺ T-Zellen zu regulatorischen T-Zellen bewirken (Sato *et al.* 2002). Diese T-Zellen sind es schließlich, welche in der Effektorphase die Toleranz vermitteln. Von regulatorischen T-Zellen ist bekannt, dass die Funktion von antigenpräsentierenden Zellen durch die Inhibition von CD40 auf diesen Zellen inhibieren (Li *et al.* 1999a; Liu *et al.* 1999).

5. Ausblick

Neben den in dieser Arbeit geschilderten Interaktionen von B-Zellen, dendritischen Zellen und iNKT-Zellen in der Induktion der Nickeltoleranz, bleiben noch eine Reihe von Fragen offen, die den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätten:

Das Migrationsverhalten der im untersuchten Modell beteiligten iNKT-Zellen bleibt größtenteils ungeklärt. Es ist beispielsweise nicht untersucht, durch welche Mechanismen iNKT-Zellen in die Lymphknoten und Milz gelangen. Ebenso ist es bislang nicht geklärt, welchen Ursprung diese migrierenden iNKT-Zellen haben. Denkbar wäre es, dass die Leber als das Organ mit dem größten Anteil von NKT-Zellen einen abrufbaren Pool dieser Zellen darstellt, von wo schließlich NKT-Zellen nach Stimulation in die lymphatischen Organen auswandern und regulatorische Funktionen wahrnehmen. Es konnte noch nicht formell nachgewiesen werden, dass iNKT-Zellen, B-Zellen und dendritische Zellen für die Induktion der Nickeltoleranz miteinander interagieren. In welchem anatomischen Bereich dies in der Milz geschieht und ob diese Zellen dort Cluster bilden, ist noch unklar.

Die Untersuchung des Proteoms von Ni^{high}-B-Zellen und der, durch Immunisierung hervorgerufenen Veränderungen konnten im Rahmen dieser Arbeit nur begonnen werden. Durch die Identifikation in Ni^{high}-B-Zellen regulierter Proteine mittels Massenspektrometrie eröffnen sich weitere Einblicke in die Beteiligung von B-Zellen am Prozess der immunologischen Toleranz. Ermöglicht werden insbesondere weitere Einblicke in die Funktionsweise von Nickel, B-Zellen zu schädigen, und so für die Apoptose zu sensibilisieren. Noch nicht geklärt werden konnte, ob orales Nickel die Lebensspanne der B-Zellen verkürzt

Aus der dargestellten Arbeit ergeben sich Hinweise, dass B-Zellen der Milz-Randzone, der sog. „*marginal zone*“, an der Toleranzinduktion beteiligt sind, wie es im Modell der okular induzierten Toleranz, dem ACAID-Modell gezeigt wurde. Welche Rolle die B-Zellen der „*marginal zone*“ für die Toleranzinduktion spielen, bleibt offen.

6. Zusammenfassung

Nickel wird in einer Vielzahl von Gegenständen des täglichen Umgangs verarbeitet. In industrialisierten Ländern ist Nickel eine der häufigsten Ursachen der allergischen Kontaktdermatitis beim Menschen, dennoch ist der größte Teil der Bevölkerung nicht gegen Nickel allergisch. Es wird angenommen, dass der orale Kontakt mit Nickel, beispielsweise über Aufnahme durch die Nahrung, eine immunologische Toleranz gegen dieses Schwermetall erzeugt.

In einem Tiermodell kann durch vierwöchige orale Gabe einer hohen Dosis von NiCl_2 eine gegen Nickel spezifische Toleranz erzeugt werden, diese verhindert die Immunisierung und damit die Auslösung einer allergischen Reaktion gegen Nickel. Diese Toleranz ist durch Lymphozyten der Milz, und zwar sowohl durch T-Zellen als auch durch B-Zellen auf syngene Empfänger übertragbar. Während die Toleranzinduktion durch sog. regulatorische T-Zellen intensiv untersucht wird, ist über die Fähigkeit von B-Zellen zur Toleranzinduktion und die zugrunde liegenden Mechanismen wenig bekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der Toleranzinduktion durch B-Zellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die orale Verabreichung von Nickel zu einer Reihe von phänotypischen Veränderungen der B-Zellen führt. B-Zellen dieser Mäuse wiesen eine Dysregulation anti- und pro-apoptotischer Proteine auf, welche zu einer herabgesetzten Schwelle der Apoptoseinduktion führten.

Es wurde daher die Hypothese aufgestellt, dass Apoptose ein Mechanismus der Toleranzübertragung durch B-Zellen ist. In der Tat konnten apoptotische B-Zellen oral toleranter Mäuse nach Übertragung in syngene Empfänger und Immunisierung mit $\text{NiCl}_2/\text{H}_2\text{O}_2$ nachgewiesen werden.

Dendritische Zellen wurden durch die Übertragung von tolerogenen B-Zellen in die Lage versetzt, ihrerseits die Toleranz gegen Nickel in weitere Empfängertiere zu übertragen. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass invariante NKT-Zellen durch die FasLigand-vermittelte Apoptoseinduktion in B-Zellen an der Toleranzinduktion beteiligt sind. B-Zellen oral-behandelter Tiere waren nach γ -Bestrahlung in der Lage, auch in Abwesenheit von iNKT-Zellen Toleranz zu induzieren, daher konnte die Funktion der iNKT-Zellen auf die FasLigand-vermittelte Apoptoseinduktion reduziert werden.

Die funktionelle Bedeutung der erniedrigten CD40-Expression der tolerogenen B-Zellen für die Toleranzinduktion wurden durch den Befund unterstrichen, dass B-Zellen aus unbehandelten Mäusen auch nach γ -Bestrahlung nicht in der Lage waren, ohne die Hilfe von iNKT-Zellen Toleranz gegen Nickel zu induzieren. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen des Proteoms tolerogener B-Zellen begonnen. Die bislang vorliegenden Ergebnisse deuten auf eine durch orale Nickelverabreichung veränderte Expression, die Apoptose- und Proliferation regulierenden, was die erhöhte Apoptosesensibilität dieser Zellen unterstrich.

7. Literaturverzeichnis

- Accapezzato,D., Francavilla,V., Propato,A., Paroli,M., und Barnaba,V. (2003) Mechanisms inducing or controlling CD8+ T cell responses against self- or non-self-antigens. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987, 99-106.
- Adler,A.J., Marsh,D.W., Yochum,G.S., Guzzo,J.L., Nigam,A., Nelson,W.G., und Pardoll,D.M. (1998) CD4+ T cell tolerance to parenchymal self-antigens requires presentation by bone marrow-derived antigen-presenting cells. *J Exp. Med.* 187, 1555-1564.
- Albert,M.L., Sauter,B., und Bhardwaj,N. (1998) Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature.* 392, 86-89.
- Alnemri,E.S., Livingston,D.J., Nicholson,D.W., Salvesen,G., Thornberry,N.A., Wong,W.W., und Yuan,J. (1996) Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell.* 87, 171-176.
- Armitage,R.J., Tough,T.W., Macduff,B.M., Fanslow,W.C., Spriggs,M.K., Ramsdell,F., und Alderson,M.R. (1993) CD40 ligand is a T cell growth factor. *Eur. J. Immunol.* 23, 2326-2331.
- Artik,S., Haarhuis,K., Wu,X., Begerow,J., und Gleichmann,E. (2001) Tolerance to nickel: oral nickel administration induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. *J. Immunol.* 167, 6794-6803.
- Artik,S., Nowak,M., Wu,X., Haarhuis,K., Esser,C., und Gleichmann,E. (2000) Tolerance induction to nickel, a common contact sensitizer. *Immunobiology.* 203, 189.
- Artik,S., von Vultée,C., Gleichmann,E., Schwarz,T., und Griem,P. (1999) Nickel allergy in mice: enhanced sensitization capacity of nickel at higher oxidation states. *J. Immunol.* 163, 1143-1152.
- Banchereau,J., Briere,F., Caux,C., Davoust,J., Lebecque,S., Liu,Y.J., Pulendran,B., und Palucka,K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18, 767-811.

- Barceloux, D.G. (1999) Nickel. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 37, 239-258.
- Basu, S., Binder, R.J., Suto, R., Anderson, K.M., und Srivastava, P.K. (2000) Necrotic but not apoptotic cell death releases heat shock proteins, which deliver a partial maturation signal to dendritic cells and activate the NF-kappa B pathway. *Int. Immunol.* 12, 1539-1546.
- Bates, S. und Vousden, K.H. (1999) Mechanisms of p53-mediated apoptosis. *Cell Mol. Life Sci.* 55, 28-37.
- Becker, Y. (2003) Milestones in the research on skin epidermal Langerhans/dendritic cells (LCs/DCs) from the discovery of Paul Langerhans 1868-1989. *Virus Genes.* 26, 131-134.
- Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Miller, J.F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R., und Heath, W.R. (2002) The CD8alpha⁺ dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J. Exp. Med.* 196, 1099-1104.
- Bjorck, P., Banchereau, J., und Flores-Romo, L. (1997) CD40 ligation counteracts Fas-induced apoptosis of human dendritic cells. *Int. Immunol.* 9, 365-372.
- Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Rivera, M., Nussenzweig, M.C., und Steinman, R.M. (2002) Efficient Targeting of Protein Antigen to the Dendritic Cell Receptor DEC-205 in the Steady State Leads to Antigen Presentation on Major Histocompatibility Complex Class I Products and Peripheral CD8⁺ T Cell Tolerance. *J. Exp. Med.* 196, 1627-1638.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 248-254.
- Brigl, M. und Brenner, M.B. (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* 22, 817-890.
- Buhlmann, J.E., Foy, T.M., Aruffo, A., Crassi, K.M., Ledbetter, J.A., Green, W.R., Xu, J.C., Shultz, L.D., Roopesian, D., und Flavell, R.A. (1995) In the absence of a CD40 signal, B cells are tolerogenic. *Immunity.* 2, 645-653.

- Burdin,N., Brossay,L., und Kronenberg,M. (1999) Immunization with alpha-galactosylceramide polarizes CD1-reactive NK T cells towards Th2 cytokine synthesis. *Eur. J. Immunol.* 29, 2014-2025.
- Buschle,M., Campana,D., Carding,S.R., Richard,C., Hoffbrand,A.V., und Brenner,M.K. (1993) Interferon gamma inhibits apoptotic cell death in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J. Exp. Med.* 177, 213-218.
- Byron,K.A., Varigos,G.A., und Wootton,A.M. (1991) Recombinant interferon-gamma inhibits the expression of IL-4 receptors on human lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 307-311.
- Carey,G.B., Donjerkovic,D., Mueller,C.M., Liu,S., Hinshaw,J.A., Tonnetti,L., Davidson,W., und Scott,D.W. (2000) B-cell receptor and Fas-mediated signals for life and death. *Immunol. Rev.* 176, 105-115.
- Cavallo,D., Ursini,C.L., Setini,A., Chianese,C., Piegari,P., Perniconi,B., und Iavicoli,S. (2003) Evaluation of oxidative damage and inhibition of DNA repair in an in vitro study of nickel exposure. *Toxicol. In Vitro.* 17, 603-607.
- Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Margulies, D. H., Shevach, E. M., und Strober, W. *In Vitro Assays for Mouse Lymphocyte Function in Current Protocols in Immunology* John Wiley & Sons New York
- Croft,M., Joseph,S.B., und Miner,K.T. (1997) Partial activation of naive CD4 T cells and tolerance induction in response to peptide presented by resting B cells. *J Immunol.* 159, 3257-3265.
- Crowe,N.Y., Uldrich,A.P., Kyparissoudis,K., Hammond,K.J., Hayakawa,Y., Sidobre,S., Keating,R., Kronenberg,M., Smyth,M.J., und Godfrey,D.I. (2003) Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J. Immunol.* 171, 4020-4027.
- Cuzner,M.L. und Opdenakker,G. (1999) Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. *J. Neuroimmunol.* 94, 1-14.

- Danadevi,K., Rozati,R., Saleha,B.B., und Grover,P. (2004) In vivo genotoxic effect of nickel chloride in mice leukocytes using comet assay. *Food Chem. Toxicol.* 42, 751-757.
- Donis-Hernandez,F.R., Parkhouse,R.M., und Santos-Argumedo,L. (2001) Ontogeny, distribution and function of CD38-expressing B lymphocytes in mice. *Eur. J. Immunol.* 31, 1261-1267.
- Draeger,H., Wu,X., Roelofs-Haarhuis,K., und Gleichmann,E. (2004) Nickel allergy versus nickel tolerance: can oral uptake of nickel protect from sensitization ? *J. Environ. Monit.* 6, 2-4.
- Emoto,M. und Kaufmann,S.H. (2003) Liver NKT cells: an account of heterogeneity. *Trends Immunol.* 24, 364-369.
- Fadok,V.A., Voelker,D.R., Campbell,P.A., Cohen,J.J., Bratton,D.L., und Henson,P.M. (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* 148, 2207-2216.
- Fang,W., Nath,K.A., Mackey,M.F., Noelle,R.J., Mueller,D.L., und Behrens,T.W. (1997) CD40 inhibits B cell apoptosis by upregulating bcl-xL expression and blocking oxidant accumulation. *Am. J. Physiol.* 272, C950-C956.
- Faunce,D.E., Sonoda,K.H., und Stein-Streilein,J. (2001) MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction. *J. Immunol.* 166, 313-321.
- Faunce,D.E. und Stein-Streilein,J. (2002) NKT cell-derived RANTES recruits APCs and CD8⁺ T cells to the spleen during the generation of regulatory T cells in tolerance. *J. Immunol.* 169, 31-38.
- Ferguson,T.A., Herndon,J., Elzey,B., Griffith,T.S., Schoenberger,S., und Green,D.R. (2002) Uptake of apoptotic antigen-coupled cells by lymphoid dendritic cells and cross-priming of CD8⁺ T cells produce active immune unresponsiveness. *J. Immunol.* 168, 5589-5595.
- Fillatreau,S., Sweenie,C.H., McGeachy,M.J., Gray,D., und Anderton,S.M. (2002) B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* 3, 944-950.

- Funaro,A., Morra,M., Calosso,L., Zini,M.G., Ausiello,C.M., und Malavasi,F. (1997) Role of the human CD38 molecule in B cell activation and proliferation. *Tissue Antigens*. 49, 7-15.
- Gao,Y., Herndon,J.M., Zhang,H., Griffith,T.S., und Ferguson,T.A. (1998) Antiinflammatory effects of CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 188, 887-896.
- Ghavami,S., Kerkhoff,C., Los,M., Hashemi,M., Sorg,C., und Karami-Tehrani,F. (2004) Mechanism of apoptosis induced by S100A8/A9 in colon cancer cell lines: the role of ROS and the effect of metal ions. *J. Leukoc. Biol.* 76, 169-175.
- Gleichmann,E., Pape,T., Wulferink,M., und Griem,P. (1999) What do T cells recognize in adverse immune reactions to chemicals? *Toxicological sciences*. 48, 104-110.
- Godfrey,D.I., Pellicci,D.G., und Smyth,M.J. (2004) Immunology. The elusive NKT cell antigen-is the search over? *Science*. 306, 1687-1689.
- Grewal,I.S. und Flavell,R.A. (1996) A central role of CD40 ligand in the regulation of CD4+ T-cell responses. *Immunol. Today*. 17, 410-414.
- Griffith,T.S., Yu,X., Herndon,J.M., Green,D.R., und Ferguson,T.A. (1996) CD95-induced apoptosis of lymphocytes in an immune privileged site induces immunological tolerance. *Immunity*. 5, 7-16.
- Gumperz,J.E., Roy,C., Makowska,A., Lum,D., Sugita,M., Podrebarac,T., Koezuka,Y., Porcelli,S.A., Cardell,S., Brenner,M.B., und Behar,S.M. (2000) Murine CD1d-restricted T cell recognition of cellular lipids. *Immunity*. 12, 211-221.
- Hammond,K.J., Poulton,L.D., Palmisano,L.J., Silveira,P.A., Godfrey,D.I., und Baxter,A.G. (1998) alpha/beta-T cell receptor (TCR)⁺CD4⁻CD8⁻ (NKT) thymocytes prevent insulin-dependent diabetes mellitus in nonobese diabetic (NOD)/Lt mice by the influence of interleukin (IL)-4 and/or IL-10. *J. Exp. Med.* 187, 1047-1056.
- Han,M., Hannick,L.I., DiBrino,M., und Robinson,M.A. (1999) Polymorphism of human CD1 genes. *Tissue Antigens*. 54, 122-127.
- Harshyne,L.A., Zimmer,M.I., Watkins,S.C., und Barratt-Boyes,S.M. (2003) A role for class a scavenger receptor in dendritic cell nibbling from live cells. *J. Immunol.* 170, 2302-2309.

- Hawiger,D., Inaba,K., Dorsett,Y., Guo,M., Mahnke,K., Rivera,M., Ravetch,J.V., Steinman, R.M., und Nussenzweig,M.C. (2001) Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo. *J. Exp. Med.* 194, 769-780.
- Hayakawa,Y., Takeda,K., Yagita,H., Van Kaer,L., Saiki,I., und Okumura,K. (2001) Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 co-stimulatory pathways. *J. Immunol.* 166, 6012-6018.
- Heath,W.R. und Carbone,F.R. (2001) Cross-presentation, dendritic cells, tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 47-64.
- Hess,S. und Engelmann,H. (1996) A novel function of CD40: induction of cell death in transformed cells. *J. Exp. Med.* 183, 159-167.
- Hill,L.L., Shreedhar,V.K., Kripke,M.L., und Owen-Schaub,L.B. (1999) A critical role for Fas ligand in the active suppression of systemic immune responses by ultraviolet radiation. *J. Exp. Med.* 189, 1285-1294.
- Hill,S., Edwards,A.J., Kimber,I., und Knight,S.C. (1990) Systemic migration of dendritic cells during contact sensitization. *Immunology.* 71, 277-281.
- Holländer,G.A., Castigli,E., Kulbacki,R., Su,M., Burakoff,S.J., Gutierrez-Ramos,J.C., und Geha,R.S. (1996) Induction of alloantigen-specific tolerance by B cells from CD40-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 4994-4998.
- Hostynek,J.J. (2002) Nickel-induced hypersensitivity: etiology, immune reactions, prevention and therapy. *Arch. Dermatol. Res.* 294, 249-267.
- Hu,W., Feng,Z., und Tang,M.S. (2004) Nickel (II) enhances benzo[a]pyrene diol epoxide-induced mutagenesis through inhibition of nucleotide excision repair in human cells: a possible mechanism for nickel (II)-induced carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 25, 455-462.
- Igarashi,H. und Sakaguchi,N. (1997) Telomerase activity is induced in human peripheral B lymphocytes by the stimulation to antigen receptor. *Blood.* 89, 1299-1307.

- Ishii,N., Moriguchi,N., Nakajima,H., Tanaka,S., und Amemiya,F. (1993) Nickel sulfate-specific suppressor T cells induced by nickel sulfate in drinking water. *J. Dermatol. Sci.* 6, 159-164.
- Iyoda,T., Shimoyama,S., Liu,K., Omatsu,Y., Akiyama,Y., Maeda,Y., Takahara,K., Steinman,R.M., und Inaba,K. (2002) The CD8⁺ dendritic cell subset selectively endocytoses dying cells in culture and in vivo. *J. Exp. Med.* 195, 1289-1302.
- Janeway, C. A. and Travers, T. *Immunobiology* Current Biology Ltd./Garland Publishing Inc. London 2004
- Ju,S.T., Matsui,K., und Ozdemirli,M. (1999) Molecular and cellular mechanisms regulating T and B cell apoptosis through Fas/FasL interaction. *Int. Rev. Immunol.* 18, 485-513.
- Kaneko,Y., Harada,M., Kawano,T., Yamashita,M., Shibata,Y., Gejyo,F., Nakayama,T., und Taniguchi,M. (2000) Augmentation of Valpha14 NKT cell-mediated cytotoxicity by interleukin 4 in an autocrine mechanism resulting in the development of concanavalin A-induced hepatitis. *J. Exp. Med.* 191, 105-114.
- Kaul,S.C., Takano,S., Reddel,R.R., Mitsui,Y., und Wadhwa,R. (2000) Transcriptional inactivation of p53 by deletions and single amino acid changes in mouse mot-1 protein. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 279, 602-606.
- Kimber,I. und Dearman,R.J. (2002) Allergic contact dermatitis: the cellular effectors. *Contact Dermatitis.* 46, 1-5.
- Kobayashi,E., Motoki,K., Uchida,T., Fukushima,H., und Koezuka,Y. (1995) KRN7000, a novel immunomodulator, and its antitumor activities. *Oncol. Res.* 7, 529-534.
- Koppi,T.A., Tough-Bement,T., Lewinsohn,D.M., Lynch,D.H., und Alderson,M.R. (1997) CD40 ligand inhibits Fas/CD95-mediated apoptosis of human blood-derived dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 27, 3161-3165.
- Kronenberg,M. und Gapin,L. (2002) The unconventional lifestyle of NKT cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 557-568.
- Kurts,C., Cannarile,M., Klebba,I., und Brocker,T. (2001) Dendritic cells are sufficient to cross-present self-antigens to CD8 T cells in vivo. *J. Immunol.* 166, 1439-1442.

- Kurts,C., Miller,J.F., Subramaniam,R.M., Carbone,F.R., und Heath,W.R. (1998) Major histocompatibility complex class I-restricted cross-presentation is biased towards high dose antigens and those released during cellular destruction. *J Exp. Med.* 188, 409-414.
- Lauber,K., Blumenthal,S.G., Waibel,M., und Wesselborg,S. (2004) Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses. *Mol. Cell.* 14, 277-287.
- Lee,H.O. und Ferguson,T.A. (2003) Biology of FasL. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14, 325-335.
- Lee,J.W., Bae,S.H., Jeong,J.W., Kim,S.H., und Kim,K.W. (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp. Mol. Med.* 36, 1-12.
- Li,J., Liu,Z., Jiang,S., Cortesini,R., Lederman,S., und Suci-Foca,N. (1999a) T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J. Immunol.* 163, 6386-6392.
- Li,X.C., Li,Y., Dodge,I., Wells,A.D., Zheng,X.X., Turka,L.A., und Strom,T.B. (1999b) Induction of allograft tolerance in the absence of Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 163, 2500-2507.
- Liden,C. und Carter,S. (2001) Nickel release from coins. *Contact Dermatitis.* 44, 160-165.
- Lipsky,P.E., Attrep,J.F., Grammer,A.C., McIlraith,M.J., und Nishioka,Y. (1997) Analysis of CD40-CD40 ligand interactions in the regulation of human B cell function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 815:372-83., 372-383.
- Lisbonne,M., Hachem,P., Tonanny,M.B., Fourneau,J.M., Sidobre,S., Kronenberg,M., Van Endert,P., Dy,M., Schneider,E., und Leite-de-Moraes,M.C. (2004) In vivo activation of invariant V alpha 14 natural killer T cells by alpha-galactosylceramide sequentially induces Fas-dependent and -independent cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* 34, 1381-1388.
- Liu,N., Wang,Y., und Ashton-Rickardt,P.G. (2004) Serine protease inhibitor 2A inhibits caspase-independent cell death. *FEBS Lett.* 569, 49-53.
- Liu,Z., Tugulea,S., Cortesini,R., Lederman,S., und Suci-Foca,N. (1999) Inhibition of CD40 signaling pathway in antigen presenting cells by T suppressor cells. *Hum. Immunol.* 60, 568-574.

- Lombardi,G., Sidhu,S., Batchelor,R., und Lechler,R. (1994) Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science*. 264, 1587-1589.
- Lund,F.E., Solvason,N.W., Cooke,M.P., Health,A.W., Grimaldi,J.C., Parkhouse,R.M., Goodnow,C.C., und Howard,M.C. (1995) Signaling through murine CD38 is impaired in antigen receptor-unresponsive B cells. *Eur. J. Immunol.* 25, 1338-1345.
- Lynn,S., Yew,F.H., Chen,K.S., und Jan,K.Y. (1997) Reactive oxygen species are involved in nickel inhibition of DNA repair. *Environ. Mol. Mutagen.* 29, 208-216.
- Lyons,A.B. (2000) Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J. Immunol. Methods.* 243, 147-154.
- Mahnke,K., Guo,M., Lee,S., Sepulveda,H., Swain,S.L., Nussenzweig,M., und Steinman,R.M. (2000) The dendritic cell receptor for endocytosis, DEC-205, can recycle and enhance antigen presentation via major histocompatibility complex class II-positive lysosomal compartments. *J. Cell Biol.* 151, 673-684.
- Mahnke,K., Qian,Y., Knop,J., und Enk,A.H. (2003) Induction of CD4⁺/CD25⁺ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood*.
- Marsden,V.S. und Strasser,A. (2003) Control of apoptosis in the immune system: Bcl-2, BH3-only proteins and more. *Annu. Rev. Immunol.* 21, 71-105.
- Martin,F. und Kearney,J.F. (2002) Marginal-zone B cells. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 323-335.
- Matzinger,P. (1994) Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* 12:991-1045, 991-1045.
- McLellan,A., Heldmann,M., Terbeck,G., Weih,F., Linden,C., Brocker,E.B., Leverkus,M., und Kampgen,E. (2000) MHC class II and CD40 play opposing roles in dendritic cell survival. *Eur. J. Immunol.* 30, 2612-2619.
- Miyamoto,K., Miyake,S., und Yamamura,T. (2001) A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing T_H2 bias of natural killer T cells. *Nature*. 413, 531-534.

- Morelli,A.E., Larregina,A.T., Shufesky,W.J., Zahorchak,A.F., Logar,A.J., Papworth,G.D., Wang,Z., Watkins,S.C., Falo,L.D., Jr., und Thomson,A.W. (2003) Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production. *Blood*. 101, 611-620.
- Morita,M., Motoki,K., Akimoto,K., Natori,T., Sakai,T., Sawa,E., Yamaji,K., Koezuka,Y., Kobayashi,E., und Fukushima,H. (1995) Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice. *J Med. Chem.* 38, 2176-2187.
- Nagata,S. und Golstein,P. (1995) The Fas death factor. *Science*. 267, 1449-1456.
- Niederhorn,J.Y. (2002) Immune privilege in the anterior chamber of the eye. *Crit Rev. Immunol.* 22, 13-46.
- Nielsen,N.H. und Menné,T. (1993) Nickel sensitization and ear piercing in an unselected Danish population. *Glostrup Allergy Study. Contact Dermatitis*. 29, 16-21.
- Nunez,G., Merino,R., Grillot,D., und Gonzalez-Garcia,M. (1994) Bcl-2 and Bcl-x: regulatory switches for lymphoid death and survival. *Immunol. Today*. 15, 582-588.
- Ogasawara,H., Takeda-Hirokawa,N., Sekigawa,I., Hashimoto,H., Kaneko,Y., und Hirose,S. (1999) Inhibitory effect of interleukin-16 on interleukin-2 production by CD4⁺ T cells. *Immunology*. 96, 215-219.
- Oka,Y., Rolink,A.G., Andersson,J., Kamanaka,M., Uchida,J., Yasui,T., Kishimoto,T., Kikutani,H., und Melchers,F. (1996) Profound reduction of mature B cell numbers, reactivities and serum Ig levels in mice which simultaneously carry the XID and CD40 deficiency genes. *Int. Immunol.* 8, 1675-1685.
- Pawankar,R., Yamagishi,S., Takizawa,R., und Yagi,T. (2003) Mast cell-IgE-and mast cell-structural cell interactions in allergic airway disease. *Curr. Drug Targets. Inflamm. Allergy*. 2, 303-312.
- Peterson,S.R., Kurimasa,A., Oshimura,M., Dynan,W.S., Bradbury,E.M., und Chen,D.J. (1995) Loss of the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase in DNA double-strand-break-repair mutant mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 3171-3174.

- Porcelli,S.A. (1995) The CD1 family: a third lineage of antigen-presenting molecules. *Adv. Immunol.* 59, 1-98.
- Qin,S., Cobbold,S.P., Pope,H., Elliott,J., Kioussis,D., Davies,J., und Waldmann,H. (1993) "Infectious" transplantation tolerance. *Science.* 259, 974-977.
- Read,S., Mauze,S., Asseman,C., Bean,A., Coffman,R., und Powrie,F. (1998) CD38⁺ CD45RB^{low} CD4⁺ T cells: a population of T cells with immune regulatory activities in vitro. *Eur. J. Immunol.* 28, 3435-3447.
- Reid,S.D. und Harnett,M.M. (1997) CD40 signalling in B cell apoptosis and rescue. *Biochem. Soc. Trans.* 25, 299S-
- Roelofs-Haarhuis,K., Wu,X., und Gleichmann,E. (2003a) Tolerogenic APC require NKT cells to induce T cell tolerance towards nickel. *Immunobiology.* 208, 86-
- Roelofs-Haarhuis,K., Wu,X., und Gleichmann,E. (2004) Oral Tolerance to Nickel Requires CD4(+) Invariant NKT Cells for the Infectious Spread of Tolerance and the Induction of Specific Regulatory T Cells. *J Immunol.* 173, 1043-1050.
- Roelofs-Haarhuis,K., Wu,X., Nowak,M., Fang,M., Artik,S., und Gleichmann,E. (2003b) Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. *J. Immunol.* 171, 2863-2872.
- Ryckman,C., Vandal,K., Rouleau,P., Talbot,M., und Tessier,P.A. (2003) Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J. Immunol.* 170, 3233-3242.
- Salnikow,K., Davidson,T., Kluz,T., Chen,H., Zhou,D., und Costa,M. (2003) GeneChip analysis of signaling pathways effected by nickel. *J Environ. Monit.* 5, 206-209.
- Sato,K., Yamashita,N., und Matsuyama,T. (2002) Human peripheral blood monocyte-derived interleukin-10-induced semi- mature dendritic cells induce anergic CD4⁺ and CD8⁺ T cells via presentation of the internalized soluble antigen and cross-presentation of the phagocytosed necrotic cellular fragments. *Cell Immunol.* 215, 186-

- Sauter,B., Albert,M.L., Francisco,L., Larsson,M., Somersan,S., und Bhardwaj,N. (2000b) Consequences of Cell Death: Exposure to Necrotic Tumor Cells, but Not Primary Tissue Cells or Apoptotic Cells, Induces the Maturation of Immunostimulatory Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 191, 423-434.
- Schutte,B., Nuydens,R., Geerts,H., und Ramaekers,F. (1998) Annexin V binding assay as a tool to measure apoptosis in differentiated neuronal cells. *J. Neurosci. Methods.* 86, 63-69.
- Schwarz,A., Grabbe,S., Grosse Heitmeyer,K., Roters,B., Riemann,H., Luger,T.A., Trinchieri,G., und Schwarz,T. (1998) Ultraviolet light-induced immune tolerance is mediated via the Fas/Fas-ligand system. *J. Immunol.* 160, 4262-4270.
- Sharif,S., Arreaza,G.A., Zucker,P., Mi,Q.S., Sondhi,J., Naidenko,O.V., Kronenberg,M., Koezuka,Y., Delovitch,T.L., Gombert,J.M., Leite-De-Moraes,M., Gouarin,C., Zhu,R., Hameg,A., Nakayama,T., Taniguchi,M., Lepault,F., Lehuen,A., Bach,J.F., und Herbelin,A. (2001) Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide treatment prevents the onset and recurrence of autoimmune Type 1 diabetes. *Nat. Med.* 7, 1057-1062.
- Sherbet,G.V. und Lakshmi,M.S. (1998) S100A4 (mts1) calcium binding protein in cancer growth, invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 18, 2415-2421.
- Shi,X., Dalal,N.S., und Kasprzak,K.S. (1992) Generation of free radicals from lipid hydroperoxides by Ni²⁺ in the presence of oligopeptides. *Arch. Biochem. Biophys.* 299, 154-162.
- Small,M. und Kraal,G. (2003) In vitro evidence for participation of DEC-205 expressed by thymic cortical epithelial cells in clearance of apoptotic thymocytes. *Int. Immunol.* 15, 197-203.
- Smith-Sivertsen,T., Tchachtchine,V., und Lund,E. (2002) Environmental nickel pollution: does it protect against nickel allergy? *J. Am. Acad. Dermatol.* 46, 460-462.
- Sonoda,K.H., Exley,M., Snapper,S., Balk,S.P., und Stein-Streilein,J. (1999) CD1-reactive natural killer T cells are required for development of systemic tolerance through an immune-privileged site. *J. Exp. Med.* 190, 1215-1226.

- Sonoda,K.H., Faunce,D.E., Taniguchi,M., Exley,M., Balk,S., und Stein-Streilein,J. (2001) NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance. *J. Immunol.* 166, 42-50.
- Sonoda,K.H. und Stein-Streilein,J. (2002) CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance. *Eur. J. Immunol.* 32, 848-857.
- Stein-Streilein,J., Sonoda,K.H., Faunce,D., und Zhang-Hoover,J. (2000) Regulation of adaptive immune responses by innate cells expressing NK markers and antigen-transporting macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 67, 488-494.
- Steinman,R.M., Hawiger,D., Liu,K., Bonifaz,L., Bonnyay,D., Mahnke,K., Iyoda,T., Ravetch,J., Dhodapkar,M., Inaba,K., und Nussenzweig,M. (2003) Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 987, 15-25.
- Steinman,R.M., Kaplan,G., Witmer,M.D., und Cohn,Z.A. (1979) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. *J. Exp. Med.* 149, 1-16.
- Stohs,S.J. und Bagchi,D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
- Strasser,A., O'Connor,L., und Dixit,V.M. (2000) Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69, 217-245.
- Tang,A., Judge,T.A., und Turka,L.A. (1997) Blockade of CD40-CD40 ligand pathway induces tolerance in murine contact hypersensitivity. *Eur. J. Immunol.* 27, 3143-3150.
- Tangye,S.G. und Raison,R.L. (1997) Human cytokines suppress apoptosis of leukaemic CD5+ B cells and preserve expression of bcl-2. *Immunol. Cell Biol.* 75, 127-135.
- Thierse,H.J., Moulon,C., Allespach,Y., Zimmermann,B., Doetze,A., Kuppig,S., Wild,D., Herberg,F., und Weltzien,H.U. (2004) Metal-protein complex-mediated transport and delivery of Ni²⁺ to TCR/MHC contact sites in nickel-specific human T cell activation. *J. Immunol.* 172, 1926-1934.

- Tokino,T. und Nakamura,Y. (2000) The role of p53-target genes in human cancer. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 33, 1-6.
- Tulchinsky,E.M., Grigorian,M.S., Ebralidze,A.K., Milshin,M.I., und Lukanidin,E.M. (2005) Structure of gene mts1, transcribed in metastatic mouse tumor cells. *gene.* 87, 219-223.
- van Hoogstraten,I.M., Andersen,K.E., von Blomberg,B.M., Boden,D., Bruynzeel,D.P., Burrows,D., Camarasa,J.G., Dooms Goossens,A., Kraal,G., Lahti,A., Menné,T., Rycroft,R.J.G., Shaw,S., Todd,D., Vreeburg,K.J., Wilkinson,J.D., und Scheper,R.J. (1991) Reduced frequency of nickel allergy upon oral nickel contact at an early age. *Clin. Exp. Immunol.* 85, 441-445.
- van Hoogstraten,I.M., Boden,D., von Blomberg,M.E., Kraal,G., und Scheper,R.J. (1992) Persistent immune tolerance to nickel and chromium by oral administration prior to cutaneous sensitization. *J. Invest. Dermatol.* 99, 608-616.
- van Hoogstraten,I.M., Boos,C., Boden,D., von Blomberg,M.E., Scheper,R.J., und Kraal,G. (1993) Oral induction of tolerance to nickel sensitization in mice. *J. Invest. Dermatol.* 101, 26-31.
- van Kooten,C. und Banchereau,J. (2000) CD40-CD40 ligand. *J. Leukoc. Biol.* 67, 2-17.
- Vermes,I., Haanen,C., Steffens-Nakken,H., und Reutelingsperger,C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods.* 184, 39-51.
- Wang,Y., Pontesilli,O., Gill,R.G., La Rosa,F.G., und Lafferty,K.J. (1991) The role of CD4+ and CD8+ T cells in the destruction of islet grafts by spontaneously diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 527-531.
- Watanabe-Fukunaga,R., Brannan,C.I., Copeland,N.G., Jenkins,N.A., und Nagata,S. (1992) Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 356, 314-317.
- Wilson, K. and Goulding, K. H. in *Methoden der Biochemie Thieme Stuttgart 1991*
- Wozniak,K. und Blasiak,J. (2004) Nickel impairs the repair of UV- and MNNG-damaged DNA. *Cell Mol. Biol. Lett.* 9, 83-94.

- Wu,D.Y., Segal,N.H., Sidobre,S., Kronenberg,M., und Chapman,P.B. (2003) Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells. *J Exp. Med.* 198, 173-181.
- Zhao,J., Yan,Y., Salnikow,K., Kluz,T., und Costa,M. (2004b) Nickel-induced down-regulation of serpin by hypoxic signaling. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 194, 60-68.
- Zhou,D., Mattner,J., Cantu,C., III, Schrantz,N., Yin,N., Gao,Y., Sagiv,Y., Hudspeth,K., Wu,Y.P., Yamashita,T., Teneberg,S., Wang,D., Proia,R.L., Lavery,S.B., Savage,P.B., Teyton,L., und Bendelac,A. (2004) Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells. *Science.* 306, 1786-1789.
- Zink, C. (Hrsg.) *Pschyrembel Klinisches Wörterbuch* Walter de Gruyter New York 1998
- Zubiaur,M., Guirado,M., Terhorst,C., Malavasi,F., und Sancho,J. (1999) The CD3-gamma delta epsilon transducing module mediates CD38- induced protein-tyrosine kinase and mitogen-activated protein kinase activation in Jurkat T cells. *J. Biol. Chem.* 274, 20633-20642.
- Zupo,S., Rugari,E., Dono,M., Taborelli,G., Malavasi,F., und Ferrarini,M. (1994) CD38 signaling by agonistic monoclonal antibody prevents apoptosis of human germinal center B cells. *Eur. J. Immunol.* 24, 1218-1222.

8. Anhang

Schriftenverzeichnis

Tagungsbeiträge:

Haarhuis, K., X. Wu, M. Nowak, and E. Gleichmann. (2000)

De novo sensitization to nickel: the inability of NiCl₂ to sensitize is due to its inability to induce costimulation. Joint annual meeting of the German and Dutch Societies of Immunology (DGfI und NVvI), Düsseldorf. *Immunobiology* 203:264

Wu, X., Haarhuis, M., M. Nowak, S. Artik, and E. Gleichmann (2001)

Oral administration of nickel induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. Jahrestagung der DGfI, Dresden. *Immunobiology* 204:211

Haarhuis, K., X. Wu, M. Nowak, and E. Gleichmann (2001)

Antigen-presenting cells (APCs) of nickel-tolerant mice transfer tolerance and are hypostimulatory in mixed lymphocyte reaction (MLR). Oral administration of nickel induces a high frequency of anergic T cells with persistent suppressor activity. Jahrestagung der DGfI, Dresden. *Immunobiology* 204:205

Haarhuis, K., X. Wu, M. Nowak, F. Kopp, S. Artik, and E. Gleichmann (2003)

Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T cells that is driven by immunization. Annual meeting of the Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Frankfurt. *Arch Dermatol Res* 294:481

M. Nowak, F. Kopp, S. Artik, and E. Gleichmann (2003)

The role of Fas:FasLigand-induced apoptosis in Nickel tolerance. Tagung: "Tolerance versus allergy with emphasis on nickel", Düsseldorf

M. Nowak, F. Kopp, S. Artik, and E. Gleichmann (2004)

The role of Fas:FasLigand-induced apoptosis in Nickel tolerance. Tagung: „Molecular Mechanisms in Environmental Medicine, 1st International Conference“, Düsseldorf

Originalarbeiten:

Haarhuis, K., X. Wu, M. Nowak (2002). Nickeltoleranz versus Nickelallergie. *Immunologie aktuell* 2:254.

Roelofs-Haarhuis, K., Wu, X., Nowak, M., Fang, M., Artik, S., und Gleichmann, E. (2003) Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. *J. Immunol.* 171:2863-2872.

Wu, X., K.Roelofs-Haarhuis, J. Zang, M. Nowak, J.Buer, and E. Gleichmann. The higher oral uptake of nickel, the less susceptible to immunization with nickel, and the more potent the suppressor T cell activity. *Manuskript in Vorbereitung.*

Nowak, M., Kopp, F., Roelofs-Haarhuis, K., Wu, X., and E. Gleichmann
FasLigand-expressing iNKT cells mediate apoptosis of B cells for the induction of tolerance to nickel. *Manuskript in Vorbereitung.*

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und diese in der vorliegenden oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht habe.

(Michael Nowak)

Düsseldorf, den 9. Mai 2005