

Aus der medizinischen Klinik mit Schwerpunkt Rheumatologie
und Klinische Immunologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Untersuchung zur Relevanz von Interleukin-17 bei
Patienten mit systemischem Lupus erythematoses

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Franziska Rauhut
aus Karlsruhe

Datum der Promotion: 27.02.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	4
1 Einleitung.....	7
1.1 Immunsystem allgemein	7
1.2 T-Helferzellen.....	8
1.3 Th17-Zellen	9
1.4 Mitglieder der IL-17-Familie.....	11
1.5 Negative Regulierung der Th17-Zellen.....	12
1.6 Interleukin-27.....	12
1.7 IL-17 bei systemischem Lupus erythematodes	13
1.8 Autoimmunität.....	14
1.9 Systemischer Lupus erythematodes	15
2 Aufgabenstellung.....	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Probenmaterial	19
3.2 Laborausrüstung.....	20
3.3 Zellkultur	22
3.3.1 Stimulationsbedingungen	22
3.3.2 Inkubation.....	22
3.3.3 Fixierung und Permeabilisierung	24
3.4 Durchflusszytometrie	25
3.4.1 Methode und Prinzip	25
3.4.2 Durchführung.....	27
3.4.2.1 Antikörperfärbung.....	27
3.4.3 Statistische Auswertung	29
3.5 ELISA.....	29
3.5.1 Methode und Prinzip	29
3.5.2 Durchführung der IL-17-ELISA-Analyse.....	30
3.5.3 Durchführung der IL-27-ELISA-Analyse.....	31
3.5.4 Statistische Auswertung	32
4 Ergebnisse.....	33

4.1 Analyse der IL-17 und IL-27-Konzentrationen im Serum von SLE-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen mittels ELISA	33
4.1.1 Charakterisierung der Patienten-Kohorte.....	33
4.1.2 Analyse der IL-17-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten und Kontrollgruppen	37
4.1.3 Subgruppenanalyse der IL-17-Serumkonzentrationen bei Frauen	39
4.1.4 Analyse der IL-27-Serumkonzentrationen von SLE-Patienten, gesunden Kontrollen und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen	41
4.1.5 Kein Zusammenhang der IL-17-, IL-27-Serumspiegel der SLE-Patienten mit paraklinischen Daten	43
4.1.6 Keine Assoziation der Stärke der Immunsuppression der SLE-Patienten mit den IL-17, IL-27-Serumkonzentrationen	45
4.1.7 IL-17-, IL-27-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten mit und ohne Lupusnephritis	46
4.2 Effekt der Aktivierung von T-Zellen durch Kurzzeitstimulation auf die Sekretion von IL-17 und IFNγ	48
4.2.1 Charakterisierung der Patienten-Kohorte bezüglich des Krankheitsaktivitätsindex SLEDAI	49
4.2.2 Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Detektion der Th17-Zellpopulation	53
4.2.3 Vergleich des Stimulationserfolges mit Staphylococcus Enterotoxin B im Vollblut und in PBMCs	55
4.2.4 Besserer Stimulationserfolg nach polyklonaler T-Zellstimulation mit Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) als mit PMA/ Ionomycin.....	56
4.2.5 Höhere Effektivität einer Stimulationsdauer von 6 h als über 24 h.....	57
4.2.6 Darstellung der Stimulationskontrolle und der Stimulation mit anderen Antigenen.....	58
4.2.7 Spontane IL-17-Sekretion	60
4.2.8 IL-17-Frequenzen bezogen auf CD3+/CD4+ T-Zellen bei SLE-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen Autoimmun-erkrankungen.....	61
4.2.9 IL-17-Frequenzen bezogen auf aktivierte CD3+/CD4+ T-Zellen (CD40 Ligand+) bei SLE-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen.....	63

4.2.10 Vergleich des Stimulationserfolges mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der IFN γ -Frequenzen bei SLE-Patienten und gesunden Spendern ..	64
4.2.11 Ratio der IL-17/ IFN γ -positiven Zellen in aktivierten T-Zellen.....	65
4.2.12 Durchflusszytometrische Analyse der IL-17-Frequenzen nach T-Zellstimulation mit viralen Antigenen CMV und Adenovirus	66
4.2.13 Keine Assoziation der IL-17-Frequenzen bzw. IL-17/ IFN γ Ratio der SLE-Patienten mit klinischen Parametern	68
4.2.14 Einfluss der Krankheitsaktivität auf die IL-17- / IFN γ -Sekretion	69
4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	71
5 Diskussion	72
5.1 Die Rolle des IL-17 bei SLE	72
5.1.1 IL-17 Serumspiegel sind bei SLE- Patienten erniedrigt.....	74
5.1.2 Patientinnen, aber nicht männliche Patienten mit SLE zeigten erhöhte IL-17-Serumspiegel.....	77
5.1.3 Inhibiert Interleukin-27 die IL-17-Expression bei Patienten mit SLE und gesunden Probanden?	79
5.1.4 Zeigen SLE-Patienten und Gesunde eine ähnliche Th17/ Th1 Balance?	81
5.1.5 Welcher Stimulus beeinflusst die Th1/Th17-Balance bei SLE-Patienten?...	82
5.1.6 Haben die Veränderungen bei den T-Zellen einen Einfluss auf die Autoantikörperproduktion?.....	85
5.1.7 Macht eine therapeutische Anwendung eines Anti-human-IL-17- Antikörpers Sinn?.....	86
6 Literaturverzeichnis	89
7 Abbildungsverzeichnis	96
8 Tabellenverzeichnis	98
9 Abkürzungsverzeichnis	99
10 Eidesstattliche Versicherung.....	101
11 Publikation	102
12 Lebenslauf	103
13 Danksagung.....	105

Zusammenfassung

Der systemische Lupus erythematoses (SLE) ist eine schubweise verlaufende, chronisch entzündliche Autoimmunkrankheit, die zahlreiche Organsysteme befällt und die durch den Nachweis von Autoantikörpern, insbesondere gegen nukleäre Antigene charakterisiert ist. Die Produktion von Zytokinen, insbesondere des proinflammatorischen Interleukins (IL)-17 scheint eine pathogene Rolle im Fortschreiten der Erkrankung zu spielen und wird von einer spezifischen Untergruppe von T-Helferzellen produziert (Th17-Zellen). Die Differenzierung zu Th17-Zellen wird vermutlich durch das anti-inflammatorisch wirksame IL-27 beeinflusst.

Ziel dieser Studie ist die Relevanz der Zytokine IL-17, IL-27 und der Th17-Zellen bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern (healthy donors, HD) und anderen Autoimmunerkrankungen (other autoimmune diseases, OAD) zu untersuchen. Dafür wurden T-Zellen aus dem Blut von 21 SLE-Patienten, 21 HD und 12 Patienten mit OAD isoliert und mit viralen und bakteriellen Antigenen stimuliert. Die Frequenzen der Interferon γ produzierenden Th1-Zellen und der Th17-Zellen nach Stimulation wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie ermittelt. Die Serumkonzentrationen von IL-17 und IL-27 wurden mittels Enzyme linked immuno assay (ELISA) bei 131 SLE-Patienten, 42 HD und 37 Patienten mit OAD ermittelt. Die IL-17-Serumkonzentrationen der SLE-Patienten waren im Vergleich zu gesunden Probanden in dieser Kohorte nicht erhöht, sie korrelierten nicht mit den Frequenzen der im peripheren Blut zirkulierenden Th17-Zellen oder der Krankheitsaktivität. Es konnten keine Zusammenhänge mit anderen klinischen oder paraklinischen Daten festgestellt werden. Die Subgruppenanalyse der IL-17-Serumanalyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den IL-17-Serumkonzentrationen der weiblichen SLE-Patienten und den gesunden Spenderinnen. Die IL-27-Serumanalyse ergab, dass gesunde Probanden die höchsten Serumkonzentrationen aufwiesen und die Serumkonzentrationen der SLE-Patienten signifikant niedriger waren. Die durchflusszytometrische Untersuchung des Vollbluts ergab, dass die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen der SLE-Patienten, nach Stimulation mit Staphylococcus enterotoxin B (SEB) sich nicht

unterschieden von den IL-17-Frequenzen der HD. Die Patienten mit OAD erreichten im Vergleich die höchsten Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen, die sich signifikant von denen der HD unterschieden. Die Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen der HD waren signifikant höher als die der SLE-Patienten. Ebenso ergab die Ratio, gebildet aus den Frequenzen der IL-17 und der IFN γ produzierenden Zellen, einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Spendern und SLE-Patienten.

Die Frequenzen der Th17-Zellen und IL-17-Serumkonzentrationen waren bei SLE-Patienten und HD vergleichbar, die Frequenzen von Th1-Zellen und die IL-27-Serumkonzentrationen waren jedoch bei SLE-Patienten signifikant niedriger im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe.

Diese Untersuchung zeigt, dass bei der untersuchten Kohorte von SLE-Patienten ein Ungleichgewicht der Th1/ Th17-Zellen im peripheren Blut vorliegt. Trotz niedriger IL-27-Serumkonzentrationen wies nur eine Untergruppe der untersuchten Patienten erhöhte IL-17-Serumkonzentrationen auf.

Schlagwörter: Interleukin-17 (IL-17), IL-27, Th17-Zellen, Th1/Th17 Ungleichgewicht

Abstract

Systemic Lupus Erythematoses (SLE) is an autoimmune disease characterized by the production of autoantibodies and immune complexes deposition. However there is growing evidence that cytokines production as Interleukin 17 (IL-17), a pro-inflammatory cytokine, has a pathogenic role in this disease. Data suggests that a specific IL-17 producing T-cell type (Th17 cells) might play an important role; their differentiation might be controlled by IL-27, an anti-inflammatory cytokine. The aim of the study is to analyze the relevance of IL-17, IL-27 and Th17 cells in SLE patients compared to healthy donors (HD) and the specificity to SLE patients by comparing with other autoimmune diseases (OAD).

Therefore, the frequencies of Th1 and Th17 of 21 SLE patients, 21 HD and 12 patients with OAD were analyzed by flow cytometry after stimulation with viral and bacterial antigens. The concentration of IL-17 and IL-27 were measured by enzyme linked immuno assay (ELISA) in the serum of 131 SLE patients, 42 HD and 37 OAD.

IL-17 concentrations in sera of SLE patients were not increased compared to HD nor did they correlate to frequencies of IL-17 in the peripheral blood or disease activity. Analysis of only female SLE patients revealed significant differences in IL-17 concentrations of the sera compared to female healthy donors. IL-27 concentrations in sera of SLE patients were significantly lower than in sera of HD.

Our results showed that the frequencies of Th17 cells after stimulation between SLE patients and HD were similar; but the frequencies of Th1 were significantly lower in SLE patients compared to HD. The concentration of IL-17 in the sera of SLE patients was comparable with those from HD; while IL-27 was significantly lower in SLE patients compared to HD. Interestingly neither of the concentration of IL-17 nor IL-27 in the serum correlated with disease activity or any clinical data analyzed. This study showed that rather than a disturbance in Th17 cells in SLE, there is a disbalance between Th1 and Th17 cells which is consistent with a low IL-27 concentration in serum of the patients.

Keywords: Interleukin-17 (IL-17), Th17-cells, IL-27, Th1-cells, Th1/Th17-disbalance

1 Einleitung

1.1 Immunsystem allgemein

Das Immunsystem des Menschen dient der Abwehr von Pathogenen und toxischen, körpereigenen Zellen, es teilt sich auf in unspezifisches und spezifisches Immunsystem. Die entwicklungsgeschichtlich ältere, unspezifische (angeborene) Immunität, ist von Geburt an einsatzbereit und übernimmt die Sofortreaktion des Immunsystems als Antwort auf das Eindringen von pathogenen Erregern. Den zellulären Anteil des unspezifischen Immunsystems bilden Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (dendritic cells, DC) und Natürliche Killer (NK)-Zellen [1]. Mittels Phagozytose eliminieren die Granulozyten und Makrophagen Pathogene, die sie über spezielle Rezeptoren (Toll-like receptor) und die Mannoserezeptoren (Bakterien) erkennen. Natürliche Killer-Zellen können virusinfizierte oder veränderte, körpereigene Zellen durch Sekretion von Perforinen und Granzymen abtöten [1]. Den humoralen, also löslichen Anteil, bilden Effektormoleküle wie Lysozym, Komplement, Akutphasenproteine und Interferone [2].

Das spezifische Immunsystem ist in der Lage spezifische Strukturen der Erreger zu erkennen und gezielt zelluläre und molekulare Abwehrmechanismen zu bilden [3]. Ob die Abwehr primär zellulär oder humoral reagieren soll, wird durch das spezifische Zytokinmilieu am Entzündungsort bestimmt. Den zellulären Anteil bilden hierbei die Lymphozyten, dazu zählen die B-Lymphozyten, die für die Bildung von Antikörpern verantwortlich sind und T-Lymphozyten, die die zellvermittelte Immunabwehr steuern. Im Unterschied zur unspezifischen Immunabwehr können die B- und T-Zellen hochspezifisch auf ihr jeweiliges Antigen reagieren und klonal expandieren. Antikörper binden spezifisch an Antigene und können sie dadurch unschädlich machen, die Antikörper-sezernierenden Zellen, heißen Plasmazellen, sie entwickeln sich aus Antigen-stimulierten B-Lymphozyten [1]. Antikörper, die lösliche Form des B-Zellrezeptors (B-cell-receptor, BCR) zählen zur humoralen Abwehr. Sowohl B- als auch T-Zellen tragen besondere Strukturen auf ihrer Oberfläche: aus zwei Glykoproteinketten

bestehende Antigen-Rezeptoren, die von Zelle zu Zelle unterschiedlich sein können. T-Zellen werden anhand ihrer Oberflächenmoleküle in zwei Gruppen aufgeteilt: zytotoxische T-Zellen, die das Oberflächenmolekül CD8 (cluster of differentiation) exprimieren und T-Helferzellen, die das CD4-Molekül an ihrer Oberfläche tragen. Zytotoxische T-Zellen sind in der Lage veränderte Zellen von gesunden Zellen zu unterscheiden, an Hand der auf der Oberfläche nahezu aller (kernhaltiger) Zellen des Organismus exprimierten MHC-1 Moleküls (Major Histocompatibility Complex) welches im Zellinnern auftretende körpereigene oder fremde Proteine an der Zelloberfläche präsentiert. Zytotoxische T-Zellen sind so selektioniert, dass sie üblicherweise nicht an Zellen binden, die körpereigene Proteine präsentieren. Diesen Schutz vor Angriffen durch das eigene Immunsystem nennt man Selbsttoleranz. Ist eine Zelle hingegen mit einem Virus infiziert, oder unterliegt einer Mutation und präsentiert dadurch körperfremde oder neuartige Proteine, sorgt die zytotoxische T-Zelle für den Zelltod der jeweiligen Zelle. Zytotoxische T-Zellen sezernieren außerdem Interferon γ , um Makrophagen zu aktivieren.

1.2 T-Helferzellen

T-Helferzellen werden anhand der von ihnen ausgeschütteten Zytokine in Untergruppen aufgeteilt, Th1-Zellen, die an der zellulären Immunantwort beteiligt sind und Th2-Zellen, die an der humoralen Immunantwort beteiligt sind. Eine weitere Untergruppe bilden die Th17-Zellen, die IL-17 sezernieren und eine Rolle bei der Regulierung von Entzündungsvorgängen spielen. Th1-Zellen fällt in dieser Unterteilung die Aufgabe zu die zellvermittelte Entzündungsreaktion auszulösen, in dem sie IL-2, Interferon γ und Tumornekrosefaktor α (TNF α) sezernieren und damit Makrophagen und zytotoxische T-Zellen aktivieren. Dieser Prozess wird vorrangig durch IL-12 gesteuert und durch Aktivierung des signal transducer and activator of transcription 4 (STAT-4) Signalwegs [4].

Th2-Zellen interagieren mittels folgender Zytokine: IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und zellständiger Moleküle und führen zur Aktivierung und Differenzierung von B-

Lymphozyten, zusätzlich werden Mastzellen, sowie basophile und eosinophile Granulozyten stimuliert. IL-4 spielt dabei eine besondere Rolle im Rahmen der Aktivierung und Differenzierung von B-Zellen, es führt zu einem Klassenwechsel der Antikörper zu IgA, IgG, IgE. B-Lymphozyten werden durch Th2-Zellen stark angeregt, die humorale Immunantwort wird durch IL-4 bestimmt, IL-6 verstärkt diese Tendenz. Gleichzeitig hemmt IL-4 die Aktivierung von Makrophagen und IL-10 reduziert die Produktion von IFN γ in T-Zellen und Makrophagen [5]. Die Zytokine der Th1- und Th2-Untergruppen inhibieren gegenseitig den Ablauf der jeweiligen Reaktionskaskade.

Eine weitere Untergruppe der T-Zellen stellen die regulatorischen T-Zellen (T-reg-Zellen) dar, ihre Aufgabe ist es die Aktivierung des Immunsystems zu modifizieren um eine überschießende Immunantwort zu verhindern und die Selbsttoleranz zu erhalten, dadurch verhindern sie das Entstehen von Autoimmunerkrankungen [6]. Anhand ihrer Oberflächenmoleküle können sie verschiedenen T-Zellgruppen zugeteilt werden CD4 $^+$ /CD25 $^+$ T-reg-Zellen, Th3-Lymphozyten und Natürliche Killer Zellen (NK-Zellen). Die meisten T-reg-Zellen, werden im Thymus konditioniert, als eine eigenständige und reife T-Zell-Subpopulation und entstehen nicht aus naiven T-Zellen nach Antigen-Kontakt in der Peripherie [7, 8]. Natürliche T-reg-Zellen exprimieren als Oberflächenmarker CD4 $^+$, CD25 $^+$ und spezifisch im Zellinnern den Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (FOXP3), sie spielen eine wichtige Rolle bei physiologischen und pathologischen Abläufen der Immunantwort und sind Gegenstand der Forschung zur Prävention und Behandlung von Autoimmunerkrankungen [7]. CD4 $^+$ /CD25 $^+$ T-reg-Zellen sekretieren die Zytokine IL-4, IL-10 und TGF β . Eine zweite Population an T-reg-Zellen, TR1-Zellen, entsteht in der Peripherie, sie sezernieren IL-10, IFN γ , TGF β und IL-5, aber kein IL-2 oder IL-4. Mittels TGF β und IL-10 kann sowohl die zellvermittelte als auch die humorale Immunantwort unterdrückt werden.

1.3 Th17-Zellen

CD4 $^+$ Lymphozyten, die IL-17 produzieren (Th17-Zellen) scheinen eine wichtige Rolle bei der Regulierung von Entzündungsvorgängen zu spielen und werden mit

Autoimmunerkrankungen assoziiert, die genauen Mechanismen sind noch nicht vollständig verstanden [9]. Es wurde zunächst angenommen, dass Th1-Zellen hauptsächlich für Entzündungsprozesse bei Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn, Multiple Sklerose und systemischer Lupus erythematodes verantwortlich sind. Die Annahme, dass Th17-Zellen hauptverantwortlich dafür sind, entstand durch die Untersuchung von IL-12 und IL-23, beide haben eine gemeinsame Untereinheit IL-12p40, im Mausmodell wurde daraufhin untersucht, dass bei Auslöschung der Untereinheit IL-12p40, diese Mäuse eine Resistenz gegen Autoimmunerkrankungen zeigten. Im Vergleich dazu, zeigten IFN γ (-/-)(knock-out) Mäuse unveränderte Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen [10, 11]. Bei Ausschaltung des Th1-Differenzierungswegs mittels Ausschaltung der entscheidenden Zytokine IL-12 (p35), IL-12 R β 2, IFN γ gR und STAT-1 (signal transducer and activator of T cells 1) wurde die Rolle von Th1-Zellen als regulierend nicht als fördernd für Autoimmunität eingeschätzt [12]. Fehlt den Mäusen die Untereinheit IL-12p35 des IL-12, ist die Differenzierung von Th1-Zellen erwartungsgemäß nicht möglich, trotzdem entwickelten die Mäuse Autoimmunerkrankungen wie rheumatoide Arthritis und Multiple Sklerose. Wohingegen Mäuse denen die IL-23-spezifische Untereinheit p19 fehlt, die also in der Lage sind Th1-Zellen zu differenzieren, eine Resistenz gegen Autoimmunerkrankungen zeigen. Es muss also eine weitere T-Zelluntereinheit geben, die durch IL-23 stimuliert wird und eine wichtige Rolle in der Ausbildung von Autoimmunerkrankungen spielt [13]. Die Differenzierung zu Th17-Zellen ist von vielen, zusammenspielenden Faktoren abhängig und nicht vollends geklärt. *In vitro* erfolgt sie TCR vermittelt, in Abhängigkeit von der Anwesenheit von TGF β und IL-6, oder IL-21 [14]. IL-23 wird nicht grundsätzlich für die Differenzierung benötigt, jedoch für das Überleben. Nach Aktivierung mit TGF β und IL-6 exprimieren naive T-Zellen auf der Zelloberfläche den IL-23 Rezeptor, der die weitere Stimulation der differenzierten Zellen zulässt [4]. Th17-Effektorzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie IL-17 A und IL-17F sekretieren, nach Stimulation mit TGF β und IL-6 [4].

Manel *et al.* zeigte im Mausmodell, dass die Differenzierung zu IL-17 produzierenden Zellen durch die stimulierte Aktivierung von ROR γ t mittels TGF β und IL-6 oder IL-21 ablief [15]. Im Vergleich dazu zeigte humanes Nabelschnurblut keine erhöhte IL-17-Expression nach Stimulation mit TGF β und IL-6, wohl aber nach Stimulation mit TGF β und IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 [15]. Weitehrhin wurde im Mausmodell einer aktuellen

Studie zur Folge, ein Differenzierungsweg mittels des Transkriptionsfaktors I κ B ζ , in Zusammenhang mit ROR γ t und ROR α , ohne den Einfluss von TGF β und IL-6 nachgewiesen. Dabei bindet I κ B ζ in Kooperation mit ROR γ t und ROR α direkt an die regulatorische Region des IL-17A Genes, an die non coding sequences 2, ein regulatorisches Element in der IL-17-Promoter-Region und erhöht die IL-17a Genexpression [4, 16].

Ein weiterer Transkriptionsfaktor scheint auch eine Rolle zu spielen, der Interferon Regulatory Factor 4 (IRF4), welcher durch den Einfluss von IL-21 an den IL-17-Promoter bindet und mit ROR γ t interagiert und somit die IL-17-Transkription erhöht. IRF4 hat auch Einfluss auf die Balance zwischen FOXP3, ROR α , ROR γ t und somit auf die Differenzierungswege, der CD4⁺ Zellen zu T-regulatorischen oder Th17-Zellen. Ein Transkriptionsfaktor der RUNX-Familie hat laut Zhang *et al.* ebenfalls Einfluss auf die Differenzierung zu Th17-Zellen, die Aktivierung von ROR γ t durch TGF β allein oder im Zusammenspiel mit IL-6 und Runx1 erlauben optimale Th17-Differenzierungsbedingungen [17]. Die Differenzierung zu Th17-Zellen bleibt weiterhin abschließend zu klären.

1.4 Mitglieder der IL-17-Familie

Als Mitglieder der IL-17-Familie gelten IL-17A, welches auch als IL-17 gilt, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (IL-25) und IL-17F. IL-17 A und F sind die am Besten charakterisierten, sie bestehen entweder als Homodimer, oder als IL-17A/ IL-17F Heterodimer. Die Aktivierung dieser beiden Mitglieder der IL-17-Familie führen zu einer starken proinflammatorischen Immunantwort und induzieren die Produktion von IL-6, Chemokine (C-C motif) (CCL3) und granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) in Makrophagen, IL-17A aktiviert ebenfalls Chemokine (C-C motif) 2,3 (CCL2,CCL3), granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), IL-1 β , IL-9 in CD4⁺-Zellen [18]. Beide führen zu einer erhöhten Aktivität von neutrophilen Granulozyten und können eine erhöhte Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen (MMP) bewirken wie, MMP-1, MMP-3, MMP-9, MMP-13, ebenso wie IL-17A und IL-17F gelten sie als

gewebeschädigend und können Einfluss auf die Pathogenese des SLE und anderer Autoimmunerkrankungen ausüben [19-23].

1.5 Negative Regulierung der Th17-Zellen

Bisher wurde die Frage ob Th17-Zellen pathogen oder auch protektiv wirken kontrovers diskutiert [24-26]. Die Art der Immunantwort ist abhängig von der Art des auslösenden Antigens. Die Aktivierung von Th17-Zellen zur IL-17-Sekretion kann in protektiver Wirkung die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten auslösen oder eine nicht regulierte, heftige Entzündungsreaktion auslösen. Um ein Gleichgewicht zwischen der protektiven und der pathogenen Wirkung zu finden, muss es regulierende Faktoren geben. Dazu gehört auch das Zytokin IL-27, aus der IL-12-Familie, welches u.a. von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert wird [27].

1.6 Interleukin-27

IL-27 ist ein Mitglied der IL-12-Familie und wird von aktivierten Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert. Es ist ein heterodimeres Zytokin, das sich aus den Untereinheiten IL-27 α (IL-27p28) und IL-27 β (IL-27Ebi3) zusammensetzt [28]. Es bindet an den entsprechenden IL-27-Rezeptor auf naiven T-Zellen und die Signaltransduktion erfolgt über die Phosphorylierung folgender Signaltransduktionsfaktoren ab: Janus-Kinase-1 (JAK-1), JAK-2, STAT-1, STAT-3, STAT-4 und STAT-5 in T-Zellen, NK-Zellen und Monocyten (STAT-3 nur in Mastzellen) [29]. Nach der Aktivierung von STAT-1 und STAT-3, exprimieren naive T-Zellen den IL-27-Rezeptor [30]. Durch die Aktivierung von STAT-1 mittels JAK-1, oder JAK-2 wird gleichzeitig die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen gefördert. Weiterhin inhibiert IL-27 die Produktion von IL-2 und IL-6, und hemmt dadurch die IL-6 abhängige Aktivierung von STAT-3 und die Expression von

ROR γ t. Und führt somit zu einer niedrigeren Differenzierungsrate von Th17-Zellen, *in vivo* und *in vitro* [4]. In Tiermodellen verschiedener Autoimmunerkrankungen führte eine Verminderung von entweder IL-27 oder IL-27R zu einer Exazerbation der Pathogenese, die durch die erhöhte Anzahl an IL-17 produzierenden Zellen zu Stande kam [31]. Zusätzlich zur Regulierung durch IL-27 haben andere T-Helferzellpopulationen Einfluss auf die Differenzierung von Th17-Zellen, IFN γ produzierende Zellen erhöhen den Transkriptionsfaktor T-bet, der die Aktivierung von ROR γ t herabsetzt und somit eine Verminderung der Th17-Zelldifferenzierung bewirkt. Ebenso hat die Erhöhung von GATA-3 (Transkriptionsfaktor der Th2-Zellen), initiiert durch die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13, die eine ROR γ t-Expression verhindern, einen negativ regulierenden Effekt auf die Th17-Zelldifferenzierung [4]. Außerdem nehmen T-reg-Zellen Einfluss auf die Differenzierung der Th17-Zellen: die T-reg-Zelldifferenzierung ist abhängig von TGF β , welches FOXP3 aktiviert. Nun kommt es auf die Anwesenheit von IL-6 an, ob die Differenzierung zu Gunsten der Th17-Zellpopulation ausgeht, oder in Richtung der Treg-Zellpopulation.

1.7 IL-17 bei systemischem Lupus erythematodes

Verschiedenen Studien zu Folge waren die IL-17-Plasma- bzw. Serumkonzentrationen und die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen bei Patienten mit SLE erhöht [19, 21, 23, 32]. Eine positive Korrelation der IL-17-Plasma- bzw. Serumkonzentrationen bzw. der Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen mit der Krankheitsaktivität mittels des SLEDAIs wurde ebenfalls in verschiedenen Studien nachgewiesen [21, 23]. Ebenso wurden Th17-Zellen und CD3 $^{+}$ /CD4 $^{-}$ /CD8 $^{-}$ T-Zellen in Biopsien von SLE-Patienten mit Lupusnephritis nachgewiesen [19]. Vermutet wird, dass IL-17 produzierende Zellen in entzündlich veränderte Gewebe infiltrieren und akkumulieren und eine pathogene Rolle in der lokalen Immunantwort spielen [33].

Durch entzündungsbedingte Gewebedestruktion entstehen Nukleinsäure enthaltende Immunkomplexe, diese stimulieren dendritische Zellen im Plasma zur Sekretion von IFN α , IL-6, IL-23. Diese steigern wiederum die IL-17-Sekretion, indem die Zytokine IL-6,

IL-21, IL-23, die STAT-3 vermittelt über eine Transkription der ROR γ t, die Differenzierung der IL-17 produzierenden Zellen bewirken. Weiterhin scheint bei SLE-Patienten eine erhöhte Phosphorylierung des STAT-3 Transkriptionsfaktors vorzuliegen, der nötig ist um die Differenzierung der IL-17 produzierenden Zellen zu bewirken [34]. Somit ergibt sich eine positive Feedback-Schleife, mehr IL-17, erhöht durch seine proinflammatorische Wirkung die Gewebedestruktion so dass mehr Nukleinsäure aus den zerstörten Zellkernen freigesetzt wird. Diese bilden wiederum Komplexe mit den anti-nukleären Autoantikörpern, gebildet von autoreaktiven Plasmazellen, die durch autoreaktive B-Zellen aktiviert werden. IL-17 scheint Einfluss auf B-Zellen zu haben, indem es deren Überleben, Proliferation und Plasmazelldifferenzierung fördert [21]. In *in vitro* Stimulationen erhöhte der Einfluss von IL-17 auf B-Zellen die Produktion der Anti-dsDNA-Antikörper bei SLE-Patienten [35]. Somit scheint IL-17 die Pathogenese durch lokale Entzündungsreaktionen, aber eben auch im Spektrum der Autoantikörperbildung zu beeinflussen.

1.8 Autoimmunität

Der Autoimmunität zu Grunde liegend, ist eine überschießende Reaktion des Immunsystems, irrtümlicherweise wird körpereigenes Gewebe als fremd erkannt und es kommt zu schwerwiegenden Entzündungsvorgängen die gegen den eigenen Körper gerichtet sind. Präsentierte, körpereigene Proteine (Autoantigene) werden vom gesunden Immunsystem als solche erkannt und nicht bekämpft. Dieser Erkennungsmechanismus wird als Selbsttoleranz bezeichnet. Wird eine Immunantwort durch ein Autoantigen ausgelöst und führt zur Aktivierung des Immunsystems gegen körpereigene Proteine, spricht man von einer Autoimmunerkrankung [36]. Hierbei wird zwischen einer systemischen oder organspezifischen Immunreaktion auf das entsprechende Autoantigen unterschieden. Die Folge ist die Bildung von Autoantikörpern, die durch (autoreaktive-)Plasmazellen produziert werden. Im Falle einer systemischen Erkrankung sind diese gegen Zellbestandteile gerichtet, welche ubiquitär in den Körperzellen exprimiert werden oder sich gegen Zellen spezifischer

Organe richten [1]. Der Verlust der Immuntoleranz und die damit verbundene Abwehrreaktion, führt letztendlich zur Zerstörung von körpereigenen Zellen und Organen. In Folge dessen, kann es zu Organversagen und letztendlich zum Tod des Patienten kommen [36].

1.9 Systemischer Lupus erythematodes

Der systemische Lupus erythematodes gehört zu den Kollagenosen und ist eine schubweise verlaufende, chronisch entzündliche Autoimmunerkrankung, die zahlreiche Organsysteme befällt. Dabei werden Autoantikörper gegen Bestandteile des Zellkerns und des Zytoplasmas gebildet. Bei neun von zehn Erkrankten handelt es sich um Frauen, das Prädilektionsalter liegt zwischen dem 15. und 30. Lebensjahr [37]. Die Prävalenz beträgt in Mitteleuropa 12,5: 100 000 Frauen und in den USA 1: 1000 Frauen [37]. Ein Großteil der Patienten zeigt Hauterscheinungen, wie das charakteristische Schmetterlingserythem, das ca. 50% der Patienten ausbildet und vor allem nach Sonnenexposition auftritt. Diskoide Hautveränderungen treten bei 15-20% der SLE-Patienten auf. Vaskulitische Läsionen und Gelenkschmerzen treten bei fast allen Patienten im Verlauf der Erkrankung auf, zumeist jedoch ohne Destruktionen, Gelenkdeformitäten ähnlich der rheumatoiden Arthritis treten bei ca. 10% der SLE-Patienten auf. Zu einer Nierenbeteiligung (Nephritis) kommt es im Verlauf der Krankheit bei der Hälfte der Patienten, wobei es verschiedene Schweregrade im Verlauf (subklinisch bis rapid- progressiv) gibt. Die schwere proliferative Lupusnephritis führt zu einer signifikanten Abnahme der Nierenfunktion und hat Ödeme und Hypertonie zur Folge. Beteiligungen des Nervensystems können das zentrale, autonome und periphere Nervensystem betreffen, es können migräne-ähnliche Kopfschmerzen, Depressionen, kognitive Störungen, Psychosen und organische Psychosyndrome auftreten, im peripheren Bereich kann es zu sensomotorischen Störungen kommen. Weiterhin kann es zu kardiologischen Störungen kommen; die koronare Herzkrankheit und Hypertonie erhöhen das Mortalitätsrisiko der SLE-Patienten. Das Risiko für einen SLE-Patienten auch im jüngeren Alter einen Myokardinfarkt zu erleiden ist neunfach höher, im Vergleich zu Gesunden [37]. Im aktiven Krankheitsschub kann es zu einer Pleuritis,

einer Perikarditis, und/ oder einer Pleuroperikarditis kommen. Hämatologisch kann häufig eine Anämie, Lymphopenie und Thrombozytopenie beobachtet werden. Durch die Grunderkrankung, die immunsuppressive Therapie und die immunologischen Störungen werden bakterielle, virale und mykotische Infektionen bei SLE-Patienten begünstigt und haben eine hohe Mortalitätsrate [38].

Als Auslöser werden bestimmte virale Infektionen und UV-Bestrahlung diskutiert [2]. Dem heterogenen Krankheitsbild, liegt ein größtenteils einheitlicher Prozess zu Grunde, die Produktion von Autoantikörpern gegen Bestandteile des Zellkerns, des Zytoplasmas und der Zelloberfläche (Anti-dsDNA, Anti-Sm, Anti-Ro, Anti-RNP) [39, 40], diese haben eine hohe Spezifität für SLE und ihre Titer korrelieren häufig mit der Krankheitsaktivität. Antikörper gegen U1RNP, Ro/SS-A (Antigen des Zytoplasmas) und La/SS-B (Antigene des Zellkerns), können erhöht sein, Diese Autoantikörper sind jedoch nicht nur spezifisch für den SLE, ebenso wie Cardiolipin und Rheumafaktor [41]. Die Kombination der untersuchten Autoantikörper ergeben eine diagnostische Hilfestellung auch für Subgruppen des SLE. Die Bildung von Autoantikörpern führt zur Ausbildung von Immunkomplexen, die basierend auf einer Vaskulitis bzw. lokalen Entzündungsreaktion zur Ablagerung in verschiedenen Geweben und zur Aktivierung des Komplementsystems führen. Es folgt die Freisetzung von zytotoxischen und immunmodulatorisch wirksamen Substanzen. Grundlegend für die Autoantikörperbildung ist unter anderem eine generalisierte polyklonale B-Zell-Aktivierung [21, 42], die als Folge des Zytokinungleichgewichtes zwischen Th1- und Th2-Zytokinen betrachtet werden kann. SLE-Patienten weisen im Vergleich zu Gesunden eine verminderte Anzahl von IFN γ produzierenden Th1-Zellen auf. Weiterhin verfügen sie über eine erhöhte Anzahl von Th2-Zellen, Monozyten und B-Zellen, die IL-6 und IL-10 produzieren [43]. Th1-Zytokine steuern die Immunreaktion in Richtung zellulärer Immunantwort, wohingegen Th2-Zytokine die humorale Immunantwort stärken und die zelluläre Immunantwort mittels IL-10 hemmen. Die Bildung von Autoantikörpern ist eines von 11 Kriterien, nach denen die ACR (American College of Rheumatology) die Erkrankung an SLE festlegt, die 1997 überarbeitete Version (Tabelle 2). Jedoch ist die Früherkennung des SLE auch weiterhin erschwert durch die sehr unterschiedliche Ausprägung des Krankheitsbildes und dadurch, dass die für die Prognose sehr ungünstige Organbeteiligung der Nieren, des zentralen Nervensystems (ZNS) und der Lungen erst im weiteren Krankheitsverlauf auftreten. Durchschnittlich

wird die Krankheit erst 2 Jahre nach dem Auftreten der ersten Symptome erkannt. Die durchschnittliche 10-Jahres-Überlebensrate beträgt 90% [37].

Tabelle 1.1 Kriterien der SLE-Diagnostik nach [2]

Kriterium
Schmetterlingserythem
diskoider Lupus
Photosensitivität
Schleimhautulzerationen
Arthritis
Serositis
Glomerulonephritis
neurologische Symptome
hämatologische Befunde
immunologische Befunde
antinukleäre Antikörper

Sind vier der elf Kriterien erfüllt, gilt die Diagnose des SLE als gesichert.

Die Krankheitsaktivität der SLE-Patienten wurde mittels des SLEDAI (Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index) eingestuft

2 Aufgabenstellung

Bisher wurde vermutet, dass das Zytokin IL-17, ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin, eine pathogenetische Relevanz beim SLE einnimmt, es liegen mehrere Studien vor, in denen erhöhte IL-17-Serumspiegel bei SLE-Patienten nachgewiesen werden konnten [21, 23, 25, 44]. In dieser Untersuchung sollte überprüft werden, inwieweit die IL-17-Sekretion von CD4+ Zellen durch virale, bakterielle und Auto-Antigene stimuliert werden können und ob dabei Unterschiede zwischen SLE-Patienten, Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen und gesunden Probanden nachzuweisen sind.

Mittels Durchflusszytometrie sollen die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen und der IFN γ produzierenden Zellen als klassisches Th1-Zytokin ermittelt werden. Die Ergebnisse werden in Bezug auf klinische und paraklinische Daten analysiert. Untersucht werden die Zytokinexpressionen bezüglich der klinischen Bedeutung eines aktiven Lupusschubes, ob eine CD4+- Antwort auf virale, bakterielle und Auto-Antigene erfolgt. Die Zytokin-Frequenzen wurden in Zusammenhang mit den klassischen Aktivitätsmarkern des SLE wie dem SLEDAI, Komplement und Anti-dsDNA-Antikörper analysiert. Weiterhin wurde untersucht, ob ein Zusammenhang zwischen den Th17-Frequenzen und den IL-17-Serumkonzentrationen besteht, hierfür wurden Serumanalysen mit Hilfe des Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) durchgeführt. Außerdem sollen weitere Seren von SLE-Patienten, die im Zeitraum von 2007-2009 gesammelt wurden, auf ihre IL-17- und IL-27-Serumkonzentrationen untersucht werden. In dieser Arbeit wird eine weit größere Gruppe an Patienten untersucht, als bisher in der Literatur vorliegenden Studien. Die Analyse der IL-17-Serumkonzentrationen bzw. -Frequenzen wird sowohl im Serum, als auch im Vollblut erfolgen und weiterhin in Bezug gesetzt werden, zu dem anti-inflammatorisch wirkenden Zytokin IL-27 und dem möglichen Zusammenhang in der Th17-Differenzierung.

3 Material und Methoden

3.1 Probenmaterial

Die Patientenproben wurden von der Rheumatologischen Station der Charité Berlin Mitte und der Poliklinik der Charité zur Verfügung gestellt (Charitéplatz 1, 10117 Berlin Mitte). Alle untersuchten Patientenproben von SLE-Patienten erfüllten die Klassifikationskriterien der "American College of Rheumatology" (ACR). Die gesunde Kontrollgruppe setzte sich aus Labor- und Klinikpersonal und nicht im medizinischen Bereich tätigen Personen zusammen. Die Gruppe der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen setzte sich aus Patienten mit Sjögren-Syndrom, systemischer Sklerodermie, Riesenzellvaskulitis, Polymyositis, Mischkollagenosen (Mixed Connective Tissue Disease; MCTD), Morbus Wegener, Anti-Synthetase-Syndrom und Churg-Strauss-Vaskulitis zusammen, die entsprechend die jeweiligen Klassifikationskriterien erfüllten. Die Blutspenden waren freiwillig und die Erlaubnis zur Blutentnahme wurde erteilt. Ein Ethikvotum der Charité Berlin lag vor und ist konform mit der Deklaration von Helsinki. Für die durchflusszytometrische Untersuchung wurden jeweils 10-15 ml Blut in natriumheparinisierten Röhrchen des Vacutainersystems (Beckton Dickinson Labware Franklin Lakes, USA) und jeweils 5 bis 8,5 ml Serum für weitere Serumuntersuchungen (SST-Röhrchen, Vacutainer System, BD) entnommen. 131 Seren von 77 SLE-Patienten, 41 Seren von gesunden Probanden und 37 Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) wurden mittels ELISA untersucht. Im Vollblut wurden die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen mittels Durchflusszytometrie bei 21 SLE-Patienten, 21 gesunden Spendern und 12 Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen untersucht, tabellarisch wird die Charakteristik der Patienten und gesunden Spender im Ergebnisteil aufgeführt. Die Krankheitsaktivität der SLE-Patienten wurde mittels des SLEDAI eingestuft.

3.2 Laborausrüstung

Alle Arbeiten wurden im Labor der Sicherheitsklasse S1 im Deutschen Rheumaforschungszentrum Berlin (DRFZ) durchgeführt. Die für die Durchführung der Experimente notwendige Laborausrüstung wird in der Tabelle 3.1 aufgeführt und die verwendeten Puffer sind in der Tabelle 3.2 aufgeführt.

Tabelle 3.1 Verwendete Laborausrüstung

Geräte	Typ	Firma	Herkunft
sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus	Deutschland, Hanau
CO ₂ -Inkubator	Hera cell 240i	Heraeus	Deutschland, Hanau
Zentrifugen	Multifuge X3R	Heraeus	Deutschland, Hanau
	Biofuge fresco	Heraeus	Deutschland, Hanau
Pipetierhilfe	Pipetus akku	Hirschmann	Deutschland, Ebestadt
	Multipipette 5-150 µl	Abimed Discovery	Deutschland, Langenfeld
	Pipetman 0,2-1000µl	Abimed Discovery	Deutschland, Langenfeld
Vakuumpumpe		Neuberger	Deutschland, Freiburg
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences	USA, Franklin Lakes NJ
CellStar-Röhrchen		Greiner bio-one	Österreich, Kremsmünster
Filter	Cell Trics 30 µl	Partec	Deutschland, Münster
FACS-Röhrchen	Corning Costar	Corning	USA, New York
Falcon-Röhrchen	15ml, 50 ml	BD Biosciences	USA, Franklin Lakes NJ
Zellkulturständer		Nalgene	USA, Rochester NY

Tabelle 3.2 Verwendete Pufferlösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung	Hersteller
PBS phosphatgepufferte Saline pH 7,2-7,4	2,7 mM Kaliumchlorid 1,5mM Kaliumhydrogen- phosphat 137mM Natriumchlorid 8,1 mM Dinatriumhydrogen- phosphat	DRFZ, Berlin, Deutschland
		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
PBS/ BSA PBS mit 0,5% (w/V) bovines Serumalbumin	5g/l bovines Serumalbumin in PBS	Biomol, Hamburg, Deutschland
		DRFZ, Berlin, Deutschland
PBS/BSA/Azid	0,01% NaH ₃ in PBS/BSA	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
FACS Lysing Fixierungslösung		BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
FACS- Permeabilisierungslösung		BD Biosciences Franklin Lakes, NJ, USA
Erythrozyten-Lyse-Puffer		DRFZ, Berlin, Deutschland
		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
		Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS/BSA/EDTA	0,4% 0,5 molares EDTA in PBS/ BSA	DRFZ, Berlin, Deutschland
		Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
		Roth, Karlsruhe, Deutschland

3.3 Zellkultur

3.3.1 Stimulationsbedingungen

Zur Stimulation des Vollblutes wurde je 1ml heparinisiertes Vollblut in sterilen Zellkulturröhrchen Cellstar (Greiner bio-one) mit anti-human-CD28 (5µl/ml) versetzt. Zur Stimulation wurden folgende Antigene in verschiedenen Konzentrationen genutzt:

- Humanes Cytomegalievirus (CMV)
 - Epstein-Barr-Virus (EBV)
 - Adenovirus
 - Histonenmix 1,2,3,
 - Nukleosomen,
 - SmD, SmD HI1
 - Staphylococcal enterotoxin B (SEB)
- Unstimulierte Kontrollen wurden mit H₂O und DMSO versetzt.

3.3.2 Inkubation

Die Proben wurden für sechs Stunden im Zellkulturständer im CO₂-Inkubator bei 37°C , 5% CO₂ inkubiert. Nach zwei Stunden wurde die Sekretion unspezifisch durch Brefeldin A inhibiert, um IL-17 im Zellinneren einzuschließen. Am Ende der Inkubationszeit wurden 100 µl je Probe EDTA (20 mM) hinzugegeben und die Zellsuspension homogenisiert. Die Zellen wurden anschließend für 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert.

Tabelle 3.3 Antigene

Antigen	in Lösung	Firma	Konzentration
Brefeldin A	In Ethanol	Sigma	2µl/ ml Blut
anti-human CD28	in Ethanol	BD Pharmingen	5µl/ ml Blut
H ₂ O steriles, destilliertes H ₂ O		DRFZ	20µl/ ml Blut
DMSO Dimethylsulfoxid		DRFZ	16µl/ ml Blut
Cytomegalie-Virus	In Aqua dest.	Miltenyi	1 µg/ ml je Peptid 20µl/ ml Blut
Epstein-Barr-Virus	In Aqua dest.	Miltenyi	1 µg/ ml je Peptid 20µl/ ml Blut
Histonenmix1 Histonenmix2 Histonenmix3	In 10% DMSO und PBS	DRFZ, 8 Peptide	5µg/µl 16µl/ ml Blut
Nukleosomen	20 µg/ml	<i>Dr. G. Hausdorf, Charité, Präparation aus Hühner- erythrozyten, beschrieben unter Bruns et al. 2000</i>	40µl/ ml Blut
SmD1 ₈₃₋₁₁₉ -Peptid	5 µg/ml	<i>Dr. G. Hausdorf, Charité synthetisches Peptid, beschrieben unter Riemekasten et al. 1998</i>	6µl/ ml Blut
SEB	In PBS	Sigma	1 µg/ ml je Peptid 20µl/ ml Blut
Adenovirus	In Aqua dest.	Miltenyi	1 µg/ ml je Peptid 20µl/ ml Blut

3.3.3 Fixierung und Permeabilisierung

Es folgt eine Fixierung der Zellen mit formaldehydhaltiger Lösung und eine chemische Permeabilisierung der Zellwand um anschließend die Zytokine (u.a. IL-17) intrazellulär anzufärben. Die Fixierung erfolgt mit 9 ml/ Probe FACS Lysing Solution (BD Biosciences, Immunocytometry Systems) mit anschließender Inkubation für 10 min bei RT. Dabei kommt es durch den Formaldehydgehalt in der Lysing Lösung zu einer Quervernetzung der Proteine und damit zur Fixierung der produzierten Zytokine im Zytosol. Die Proben werden für 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Die Zellen werden anschließend in PBS/ BSA/ Azid resuspendiert und gewaschen (zentrifugiert für 10 min bei 1500 U/ min und dekantiert um den Überstand zu entfernen). Zur Permeabilisierung werden die Zellpellets in 0,5 ml FACS permeabilizing solution (BD Biosciences, Immunocytometry Systems) resuspendiert und inkubieren für 10 min bei RT. Es folgt ein Waschschrift wie oben beschrieben und nach der Zentrifugation folgt das Dekantieren des Überstandes und die Resuspension in 1 ml PBS/ BSA/ Azid. Für die durchflusszytometrische Messung werden die Proben über Nacht bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

3.4 Durchflusszytometrie

3.4.1 Methode und Prinzip

Durchflusszytometrische Analyse

(FACS Fluorescence Activated Cell Sorting)

Die Durchflusszytometrie ermöglicht eine gleichzeitige Analyse mehrerer physikalischer Parameter einer Zelle und dient der Detektion von zelleigenen intra- und extrazellulärer Moleküle. Zur Analyse werden die Zellen einer Einzelzellsuspension durch hydrodynamische Fokussierung wie an einer Perlenkette an einem gebündelten Laserstrahl geeigneter Wellenlänge vorbei geleitet.

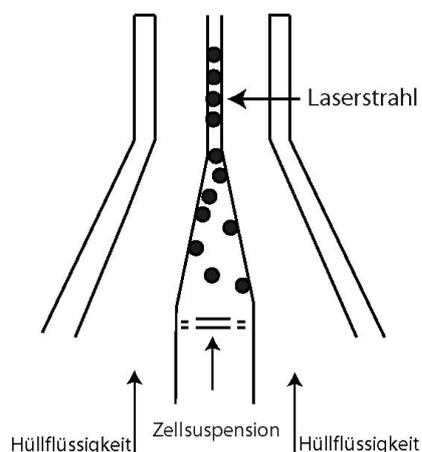


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung zur Durchflusszytometrie

Die Zellsuspension wird vom Durchflusszytometer aufgenommen und durch die Hüllflüssigkeit hydrodynamisch fokussiert, somit gelangen die Zellen hintereinander zur

Messküvette, in der der Laserstrahl seitlich auf die Zellen trifft. Das eintreffende monochromatische Laserlicht wird aufgrund der physikalischen Eigenschaften der Zelle mit unterschiedlicher Qualität und Quantität gestreut. Das Vorwärtstreulicht (FSC) bei dem der Laserstrahl in einem Winkel von 180° auf den Detektor trifft, ist abhängig von der Querschnittsfläche des beleuchteten Partikels und liefert Informationen über die Zellgröße. Das Seitwärtstreulicht (SSC) wird in einem Winkel von 90° zum Laserstrahl gemessen und ist durch den Refraktionsindex des Partikels bedingt. Der SSC erlaubt Aussagen über die Granularität der Zelle. Die Signale werden über ein System von optischen Spiegeln, Filtern und Verstärkern von Photoelektronenvervielfachern (PMTs) detektiert und können mit entsprechender Analysesoftware ausgewertet werden. Mit Hilfe dieser beiden Parameter lassen sich die wichtigsten Leukozytenpopulationen über ihre Größe und Granularität unterscheiden. Die Fluoreszenzmessung wird genutzt um oberflächliche und intrazelluläre Moleküle einer Zelle zu detektieren. Die Zellen werden mit spezifischen Antikörpern markiert, welche mit Fluorochromen konjugiert sind. Die Fluorochrome werden durch das entsprechende Laserlicht angeregt und emittieren Licht. Dies wiederum wird von Detektoren (PMTs) im Messbereich in einen elektrischen Impuls umgewandelt und computergestützt analysiert. Jede, der so von den Detektoren registrierten Ereignisse entspricht einer Zelle und kann in einem Dot-Plot (Punktwolkendarstellung) zweidimensional dargestellt werden. Im Dot-Plot können nun polygonale Regionen definiert werden, um bestimmte Zellpopulationen auszuwählen.

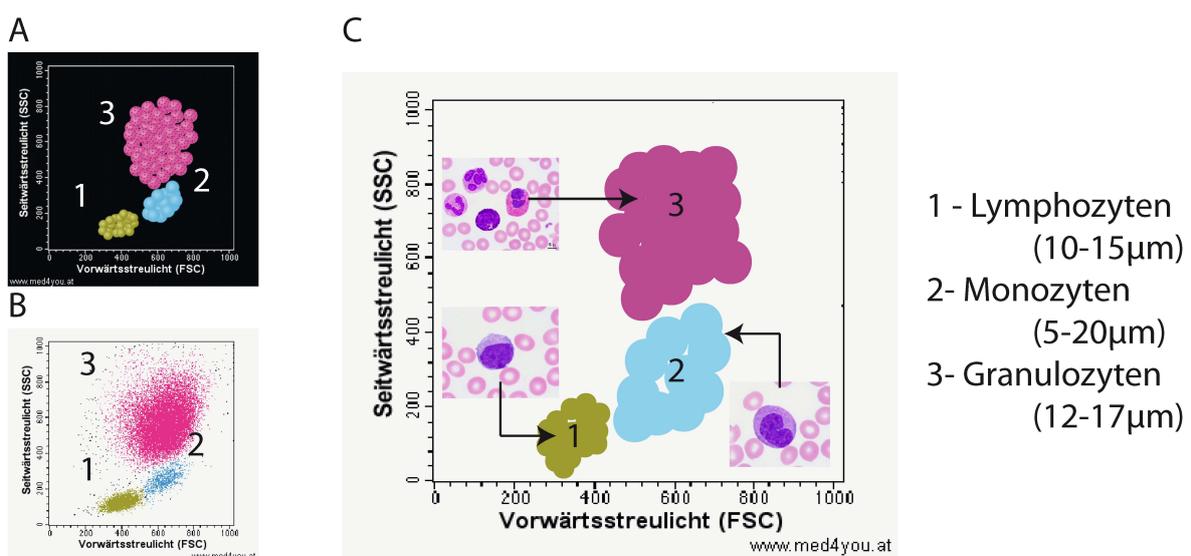


Abbildung 3.2 Verteilung der Zellpopulationen
entsprechend ihrer Streulichteigenschaften im Dotplot

Durch die gleichzeitige Färbung mit mehreren Fluoreszenzfarbstoffen, deren Emissionsmaxima sich unterscheiden, sowie durch den Einsatz verschiedener Laser, dichromatischer Spiegel- und optischer Filtersysteme und Detektoren kann die Expression mehrerer Moleküle einer Zelle gleichzeitig ermittelt werden. Bei der computer-gestützten Verarbeitung der Informationen werden Messbereiche eingegrenzt, das sogenannte „Gating“. Gating bezeichnet eine vom Anwender durchgeführte Selektion bestimmter Zellpopulationen. So ist es möglich, durch ein elektronisches Fenster in der Darstellung aller Zellen im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht nur eine bestimmte Population, z.B. die Lymphozyten, in einer nachgeordneten Darstellung bzw. Analyse auf verschiedene Fluoreszenzeigenschaften hin zu untersuchen.

3.4.2 Durchführung

Die durchflusszytometrische Messung wurde am BD FACS Canto II durchgeführt, dieses Gerät verfügt über drei Laser: Blau (488nm), Rot (633nm) und Violett (405nm). Folgende Farbstoffe wurden in dieser Messung verwendet: Fluoreszein Isothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Perdinin Chlorophyll-Protein (PerCP) und Allophycocyanin (APC) und Pacific Blue. Für jede Probe wurden 100.000 CD4⁺/CD3⁺ Zellen aufgenommen. Zur Datenanalyse wurden die IFN γ ⁺/CD40 Ligand⁺/CD3⁺/CD4⁺ oder IL-17⁺/CD40 Ligand⁺/CD3⁺/CD4⁺ Ereignisse bestimmt und in Prozent der gesamten CD3⁺ oder CD4⁺ T-Zellen angegeben.

3.4.2.1 Antikörperfärbung

Für die durchflusszytometrische Messung wurde jeweils in einem Volumen von 100 μ l Zellsuspension die Färbung durchgeführt. Die fixierten Zellen wurden am nächsten Tag mittels Partec Filter in Eppendorf Tubes (1,5ml) überführt. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml PBS/ BSA/ Azid gewaschen (Zentrifugation 1500 U/min für 10min). Anschließend wird das Zellpellet in 100 μ l PBS/ BSA/ Azid resuspendiert und entsprechend die Antikörper hinzugegeben. Die Zellen werden für 20 min bei RT im Dunkeln inkubiert. In Tabelle 3.4 sind die genutzten Antikörper aufgeführt.

Tabelle 3.4 Antikörper

Antikörper	Klon	Farbstoff	Konzentrationen	Hersteller
CD19	4G7	FITC	1:100	BD Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD14	MP9	FITC	1:100	BD Franklin Lakes, New Jersey, USA
CD4	TT1	PerCP	1:1000	DRFZ
IL-17	Bio 64 CAP P17	PE	1:20	eBioscience San Diego, CA, USA
INF γ	4S.B3	Pacific Blue	1:40	eBioscience San Diego, CA, USA
CD3	UCHT-1	FITC	1:500	DRFZ
CD154	acD40L	APC	1:40	Miltenyi Bergisch Gladbach, Deutschland
IL-4		PE	1:200	DRFZ
IL-4	MP4-25D2	PE	1:200	BD Franklin Lakes, New Jersey, USA
IL-10	JES3-9D7	Pacific Blue	1:20	BD Franklin Lakes, New Jersey, USA
Beriglobin			1:50	<i>Chiron Behring</i> Marburg, Deutschland

Zu der Matrix mit Fluorochrom-gekoppelten Antikörpern wurde Beriglobin (*Chiron Behring GmbH & Co*, Marburg, Deutschland) in Tabelle 3.4 genannter Konzentration hinzugegeben. Beriglobin blockiert die Fc-Rezeptoren der Zellen und verhindert so unspezifische Antikörperbindungen. Der Inkubation mit der Färbematrix folgt ein Waschriff mit PBS/ BSA/ Azid und Zentrifugation bei 1500 U/min für 10 min. Nach Absaugen des Überstandes werden die Zellpellets in 300 μ l PBS/ BSA/ Azid resuspendiert und in FACS-Röhrchen (*Corning Costar*, *Corning NY* und *Sarstedt*) überführt. Die Steuerung des Geräts und Kompensation der Daten erfolgte mit der

FACS-Diva Software (BD, Heidelberg, Deutschland). Das Protokoll der Stimulation in der vorliegenden Arbeit entspricht im Wesentlichen der T-Zellstimulation beschrieben bei Suni et al. [45]

3.4.3 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der durchflusszytometrischen Daten wurde die Software „FlowJo“ (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA), das Microsoft Programm Excel (Microsoft Corporation, Redmon, Washington, USA) und das Auswertungsprogramm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) für Windows/ Mac angewendet. Angewendete statistische Tests werden im Ergebnisteil erläutert. Bei allen durchgeführten statistischen Tests wurde ein p-Wert $< 0,05$ als signifikant angenommen. In den Graphen und im Text wird jeweils der ermittelte Median Wert angegeben.

3.5 ELISA

3.5.1 Methode und Prinzip

Zur Analyse der Konzentration von IL-17 und IL-27 im Serum von SLE-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen wurde das ELISA-Verfahren (enzyme-linked immunosorbent assay) angewendet. Für die Konzentrationsbestimmung von IL-17 und IL-27 wurden jeweils kommerzielle Kits verwendet, welche der Sandwichtechnik entsprechen.

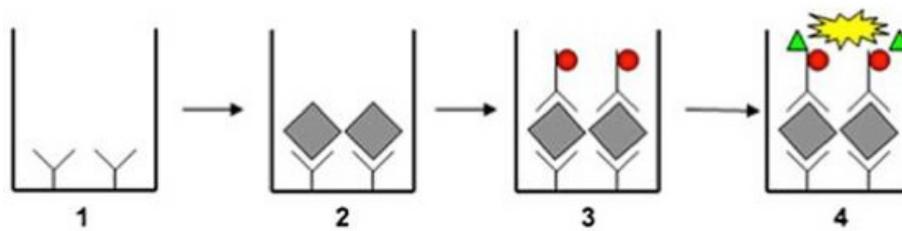


Abbildung 3.3 Schematische Darstellung zur Sandwich-ELISA-Technik [46]

- 1) Die Mikrotiterplatte wird mit einem Antigen-spezifischen Antikörper beschichtet, dieser ist immobilisiert
- 2) Das zu testende Probenmaterial wird hinzugegeben, das Antigen bindet an die spezifischen Antikörper auf der Mikrotiterplatte
- 3) Ein enzymgekoppelter, antigen-spezifischer Antikörper wird hinzugegeben
- 4) Zugabe eines Substrates löst Farbumschlag des Enzyms aus

Durch Waschschriffe wird ungebundenes Material vom Assay entfernt. Die Farbreaktion ist mittels spektrophotometrischer Messung detektierbar. Hierfür wird eine Verdünnungsreihe von einem Standard hergestellt, dessen Ausgangskonzentration bereits bekannt ist. Durch Extrapolation kann nach Ermittlung der Standardkurve auf die unbekannt Konzentrationen geschlossen werden.

3.5.2 Durchführung der IL-17-ELISA-Analyse

Zur Ermittlung der IL-17-Serumkonzentrationen der SLE-Patienten, gesunden Probanden und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen wurde das ELISA-Kit Human IL-17A BMS2017MST (Firma Bender MedSystems Österreich, Wien) verwendet. Es wurden Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen mit dem Coating-Antikörper nach Herstellerangaben über Nacht bei 4° C abgedeckt inkubiert. Es folgte ein Waschschriffe mit PBS/ 0,05% Tween 20, wobei unspezifische Bindungen durch das Detergens Tween 20 verhindert werden. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurden die Platten für eine Stunde bei RT mit PBS/ 1% BSA (bovines Serum Albumin) / 0,1% Tween 20 geblockt. Mit dieser Blocking-Lösung von jeweils 250µl pro Vertiefung wurde die Platte für 3 Stunden bei RT inkubiert. Es folgte ein zweifacher Waschschriffe mit PBS/ 0,05% Tween 20. Zur Lösung des humanen IL-17A Standard-Proteins wurde, der nach Herstellerangaben aliquotierte und bei -20°C aufbewahrte Standard in

destilliertem Wasser gelöst und somit eine anfängliche Konzentration von 200 pg/ ml erreicht. Es folgte eine 1:2 Verdünnung der Standard-Lösung mit der im Kit mitgelieferten Verdünnungslösung. Bei der Standard-Erstellung kommt es somit im höchstkonzentrierten Standard zu einer Konzentration von 100 pg/ ml und der geringsten Konzentration 1 pg/ ml humanen IL-17A Standard-Proteins in acht Verdünnungsschritten. Die Verdünnungsreihe des Standards sowie die gemessenen Seren wurden jeweils im Doppelansatz gemessen. Nach der Zugabe der zu analysierenden Proben und des Standards wird je Vertiefung 50µl Biotin-Konjugat mit PBS/ 5% BSA/ 0,05% Tween 20 (Assay buffer) in Tabelle 3.2/ 3.3 zugefügt und die Platten für 2 Stunden bei RT inkubiert. Als Blindprobe diente die Verdünnungslösung. Es folgte ein vierfacher Waschschrift mit der Waschlösung und die Zugabe des Streptavidin-HRP (horseradish peroxidase) welches zuvor in 0,01% in PBS/ 5% BSA/ 0,05% Tween 20 gelöst wurde und nun 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach viermaligen Waschen der Platte mit der Waschlösung wird jeweils 100µl der Substratlösung zugefügt: Tetramethylbenzidine (TMB) flüssiges Substrat für ELISA. Es kommt zu einem blauen Farbumschlag, die chemische Reaktion wurde mittels einer Säure gestoppt und es ergibt sich ein gelber Farbumschlag. Nach ca. 10 Minuten wird die Reaktion durch die Zugabe von 2 molarer Schwefelsäure mit jeweils 100 µl pro Vertiefung gestoppt. Die Extinktion wurde am Spektralphotometer EMAX Endpoint ELISA microplate reader, (Molecular devices Sunnyvale, CA, USA) bei einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

3.5.3 Durchführung der IL-27-ELISA-Analyse

Zum Nachweis der Serumkonzentration des Interleukins 27 wurde das Human IL-27 ELISA Ready-Set-Go Kit (eBioscience, San Diego, CA, USA) angewendet. Hochbindende Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Corning Costar 9018, Lowell, MA, USA) wurden mit 100 µl/ Vertiefung des gelösten Capture-Antikörper (gelöst in Coating buffer 10X PBS) über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Platte fünfmal mit der Waschlösung PBS/0,05% Tween 20 gewaschen. Nach Angaben des Herstellers wurde der im Kit mitgelieferte Assay Diluent im Verhältnis 1:5 mit sterilem, destillierten

Wasser verdünnt, um die Platte mit 200µl pro Vertiefung zu blocken. Eine Verdünnungsreihe des Standards mit der höchsten Konzentration des Standardproteins von 8000pg/ ml wurde in jeweils 1:2- facher Verdünnung in sechs Verdünnungsschritten auf jeder Platte aufgetragen, entsprechend ist die geringste Konzentration in der letzten Verdünnung 63 pg/ ml. Alle anderen Vertiefungen wurden mit je 100µl pro Vertiefung des Patientenserums in Doppelansätzen versehen. Eine Verdünnung des Serums wurde nicht vorgenommen, da in orientierenden Vorversuchen gezeigt wurde, dass es zu falsch negativen Aussagen kommt. Es folgte eine Inkubationszeit von 2 Stunden bei RT, die Platte wurde dabei abgedeckt. Wiederholtes Waschen mit dem Waschpuffer PBS/ 0,05% Tween 20 um alle ungebundenen Proteine und die Platte zu entfernen und weiterhin folgte die Zugabe des zweiten Biotin-konjugierten Antikörpers, der in Assay-Diluent des Herstellers gelöst, mit 100 µl pro Vertiefung für eine Stunde bei RT inkubiert. In fünf Waschschritten wurde die Platte wieder gewaschen. Danach wurde die Platte für 30 Minuten bei RT mit dem Avidin-HRP (horseradish peroxidase)-Enzym inkubiert und nach mehrmaligem Waschen ein Entwicklungspuffer hinzugefügt. Der in diesem Kit mitgelieferte Entwicklungspuffer war Tetramethylbenzidine (TMB) und löste eine Farbreaktion aus, die nach 15 Minuten mit 50 µl pro Vertiefung Phosphorsäure (1M) H₃PO₄ gestoppt wurde. Die Extinktion wurde am Spektralphotometer (Molecular devices EMAX Endpoint ELISA Microplate Reader) mit einer Wellenlänge von 450nm gemessen.

3.5.4 Statistische Auswertung

Alle mittels ELISA ermittelten Daten wurden mit Hilfe der Programme Molecular devices EMAX Endpoint ELISA Microplate Reader, Microsoft Programm Excel (Microsoft Corporation, Redmon, Washington, USA) und des Auswertungsprogramm GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA) für Windows/ Mac ausgewertet. Angewendete statistische Tests werden im Ergebnisteil erläutert. Bei allen durchgeführten statistischen Tests wurde ein p-Wert < 0,05 als signifikant angenommen.

4 Ergebnisse

4.1 Analyse der IL-17 und IL-27-Konzentrationen im Serum von SLE-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen mittels ELISA

In vorangegangenen Studien wurde das Zytokinprofil von SLE-Patienten untersucht, es wurden erhöhte Th17-Frequenzen und Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten festgestellt, die im Zusammenhang mit der Pathogenese der Krankheit zu stehen scheinen [21, 25, 32, 47]. In dieser Untersuchung wurde geprüft, ob es einen Zusammenhang der IL-17-Serumkonzentrationen und der Frequenzen der zirkulierenden Th17-Zellen im peripheren Blut mit klinischen und paraklinischen Daten gibt.

Weiterhin wurde untersucht, ob es einen Zusammenhang mit den Serumkonzentrationen des inhibitorisch wirkenden IL-27 gibt und der Einfluß auf die IL-17-Sekretion. Ebenso wurde untersucht, ob dieser Entzündungsmarker auch in anderen Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt. 131 Seren von 77 SLE-Patienten, 41 Seren von gesunden Spendern und 37 Seren von Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) wurden auf die Serumkonzentrationen von IL-17 und IL-27 untersucht.

4.1.1 Charakterisierung der Patienten-Kohorte

Bei der Analyse der Korrelation der Krankheitsaktivität, gemessen am SLEDAI mit den klinischen Parametern wie Alter, Geschlecht, Anti-dsDNA-Antikörpern und C3-Komplement (C3), zeigt sich für die Gruppe der SLE-Patienten ein zu erwartendes Ergebnis. Die Höhe des SLEDAIs korreliert positiv mit dem Anti-dsDNA-Antikörpertiter ($p=0,095$, $r=0,2359$) und negativ mit der Höhe der C3-Werte ($p<0,0001$, $r=-0,3857$; siehe Abbildung 4.1a, b und c). Die mittels des Spearman-Tests erhobenen Ergebnisse

sind jeweils signifikant. Von den 131 untersuchten Patienten wiesen 86 Patienten einen SLEDAI über 6 auf und 45 Patienten wiesen einen SLEDAI kleiner 6 auf und wurden an Hand der Krankheitsaktivität, gemessen mit Hilfe des SLEDAI in eine aktive und eine gering aktive Gruppen aufgeteilt, ein SLEDAI ≥ 6 gilt als aktiv und ein SLEDAI kleiner 6 als nicht aktiv bzw. gering aktiv.

Tabelle 4.1 Charakterisierung der SLE-Patienten

Anzahl	131
männlich	26
weiblich	105
Alter in Jahren (Mittelwert mit Standardabweichung)	38 \pm 14,2
SLEDAI (Mittelwert)	8,3 \pm 5,5
BSG (Mittelwert)	45,75
C3 Komplement (Mittelwert)	81,31
dsDNA (Mittelwert)	111,31
Patienten ohne Immunsuppression	7
Patienten mit Prednisoloneinnahme (<7,5mg/ Tag) und/ oder Antimalaria-therapie und/ oder Rituximab > 12 Monate	8
Patienten mittlere Prednisolondosis (>7,5<30 mg/Tag) und/ oder Azathioprin, Methotrexat	35
Patienten mit hoher Prednisolondosis (>30<100 mg/ Tag) und/ oder Mycophenolat-Mofetil bzw.Cyclophosphamid Boli	62
Patienten mit Biologikatherapie im letzten Jahr	16
Patienten mit sehr hoher Prednisolondosis (>100mg/ Tag) und/ oder Cyclophosphamid oral	3

Tabelle 4.2 Charakterisierung der gesunden Spender

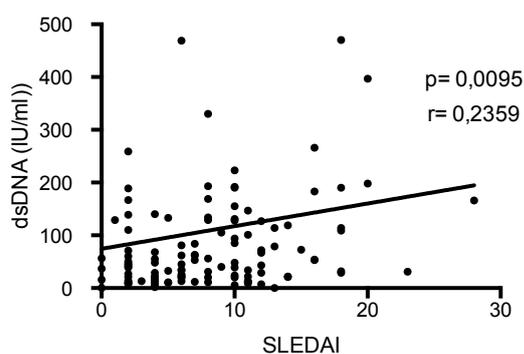
Anzahl	42
männlich	6
weiblich	36
Alter in Jahren (Mittelwert mit Standardabweichung)	28±6,6

Tabelle 4.3 Charakterisierung der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD)

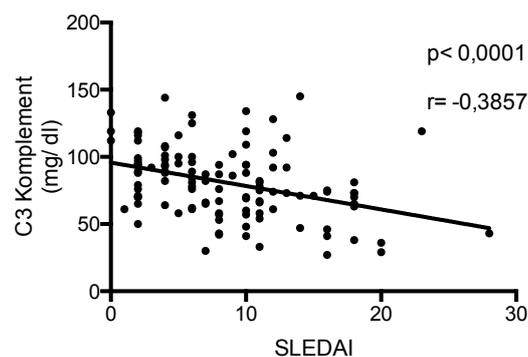
Anzahl	37
männlich	7
weiblich	30
Alter in Jahren (Mittelwert mit Standardabweichung)	55± 13
systemische Sklerodermie (SSc, diffuse Form)	14
Sjögren-Syndrom	3
Riesenzellvaskulitis	1
Overlap Sklerodermie/ Polymyositis	2
Mischkollagenosen (Mixed connective tissue disease, MCTD)	8
Morbus Wegener	6
Anti-Synthetase-Syndrom	2
Churg Strauss-Vaskulitis	1
Patienten ohne Immunsuppression	6
Patienten mit Prednisolondosis (<7,5mg/ Tag) und/ oder Antimalariatherapie, bzw. Rituximab > 12 Monate	2

Patienten mittlere Prednisolondosis (>7,5<30mg/Tag) und/ oder Azathioprin bzw. Methotrexat	6
Patienten mit hoher Prednisolondosis (>30<100mg/ Tag) und/ oder Mycophenolat-Mofetil bzw. Cyclophosphamid Boli	20
Patienten mit Biologikatherapie im letzten Jahr	2
Patienten mit sehr hoher Prednisolondosis (>100mg/ Tag) und/ oder Cyclophosphamid oral	1

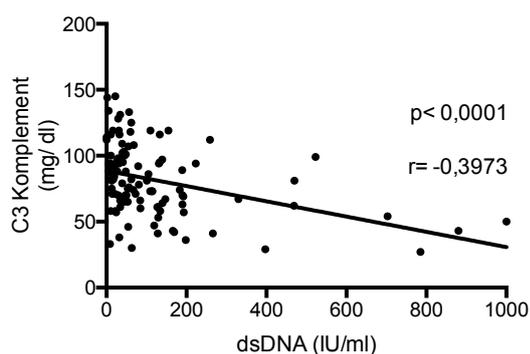
Abb. 4.1a)



b)



c)

**Abbildung 4.1: Korrelationen der Krankheitsaktivität, gemessen am SLEDAI**

und a) dem Titer der Anti-dsDNA-Antikörper (dsDNA-Ak) ($n = 120$) b) C3-Komplement-Spiegeln ($n = 114$ Paare) c) sowie zwischen der Höhe des Antikörpertiters der Anti-dsDNA-Antikörper mit den C3-Serumkonzentrationen ($n = 110$ Paare). Angewendet wurde jeweils der Spearman-Rangkorrelationstest.

4.1.2 Analyse der IL-17-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten und Kontrollgruppen

Im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe waren die IL-17-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten im Serum nicht erhöht. Seren in denen kein IL-17 nachgewiesen werden konnte, sind in dieser Kohorte mit 0 pg/ ml angegeben. Die Nachweisgrenze für BMS 2012HS, das Nachfolgekit der Fa. Bender Medsystems wird vom Hersteller mit 0,01 pg/ ml angegeben. Obwohl in der Serumanalyse mittels ELISA kein nachweisbarer Unterschied zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden festgestellt werden konnte, wurde in 32% der SLE-Patientenseren eine nachweisbare Serumkonzentration ($c > 0,01$ pg/ ml) gemessen, im Vergleich dazu jedoch nur bei 19% der gesunden Kontrollgruppe. Die IL-17-Serumkonzentrationen korrelierten nicht mit der Krankheitsaktivität gemessen mit Hilfe des SLEDAIs ($p = 0,15$ $r = -0,13$). Der Mittelwert der gesunden Kontrollgruppe liegt bei 2,74 pg/ ml ($\pm 12,00$), bei SLE-Patienten bei 2,06 pg/ ml ($\pm 4,41$). Die Abbildung 4.2 lässt erkennen, dass es eine Gruppe innerhalb der SLE-Patientengruppe gibt, die erhöhte IL-17-Serumkonzentrationen aufwies, 21 von 131 SLE-Patienten (16%) zeigten IL-17-Serumkonzentrationen > 5 pg/ ml und bei 17 dieser 21 SLE-Patienten lag ein aktives Krankheitsgeschehen (SLEDAI ≥ 6) vor, im Vergleich hatten 4 von insgesamt 42 gesunden Spendern (9,5%) IL-17-Serumkonzentrationen > 5 pg/ ml. Innerhalb der gesunden Kontrollgruppe liegt die obere Standardabweichung des Mittelwerts bei 5 pg/ ml. Alle Werte > 5 pg/ ml werden in dieser untersuchten Kohorte als erhöht angesehen. In Abbildung 4.2 wurde die Serumkonzentration 5pg/ ml an Hand einer horizontalen Linie dargestellt. Das Ergebnis der ELISA Untersuchung zeigt keinen Unterschied zwischen der gesunden Kontrollgruppe und den SLE-Patienten, was sich möglicherweise daraus ergibt, dass die Untersuchung in unstimulierten Proben erfolgte. Daraufhin ergibt sich die Fragestellung, ob die Th17-Zellantwort nach Stimulation der T-Zellen mit verschiedenen Antigenen einen Unterschied ergibt.

Tabelle 4.4 Mittelwerte der IL-17-Serumkonzentrationen der jeweiligen Gruppe

mit Standardabweichung, die Konzentrationen sind angegeben in pg/ ml und wurden mittels ELISA ermittelt.

SLE IL-17	2,06± 4,4 pg/ ml
OAD IL-17	2,5± 9,5 pg/ ml
HD IL-17	2,7± 12 pg/ ml

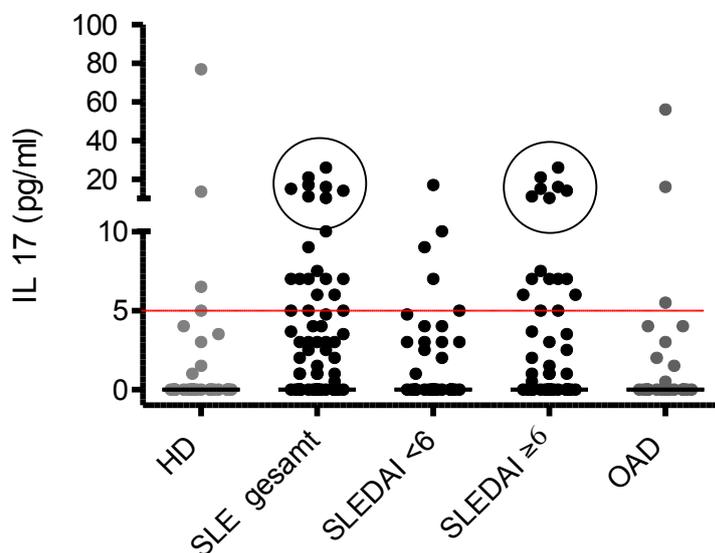


Abbildung 4.2: Unterschiede der IL-17-Konzentrationen zwischen SLE-Patienten, gesunden Kontrollen und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen.

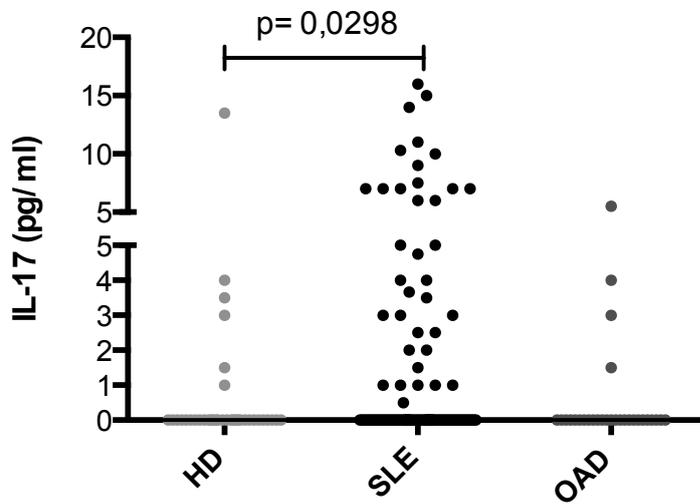
Dargestellt sind die IL-17-Konzentrationen im Serum der gesunden Kontrollgruppe (HD) (n= 42), SLE-Patienten (n= 131), aufgeteilt in Pat. mit aktivem Krankheitsgeschehen (SLEDAI≥ 6) und Pat. mit nichtaktivem Krankheitsgeschehen (SLEDAI<6) und Pat. mit anderen Autoimmunerkrankungen OAD (n=37), angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, dargestellt ist jeweils der Median der einzelnen Gruppen, der Median in allen Gruppen ist 0.

Wie in Abbildung 4.2 dargestellt ist, wies ein Teil der SLE-Patienten Serumkonzentrationen auf, die oberhalb der Nachweisgrenze liegt, 89 der 131 untersuchten Seren zeigten eine Serumkonzentration >0,01 pg/ ml, jedoch nur 9 der gesunden Spender zeigten ebenfalls eine Serumkonzentration >0,01 pg/ ml. Die Auswertung mit Hilfe des Chi-Square Tests ergab keinen signifikanten Unterschied im Verhältnis der jeweiligen Gruppe.

4.1.3 Subgruppenanalyse der IL-17-Serumkonzentrationen bei Frauen

Auf Grund der ungleichen Geschlechterverteilung und der unterschiedlichen Ausbildung des Krankheitsbildes des SLE bei Männern und Frauen, erfolgte eine Analyse aller weiblichen Studienteilnehmer. Die Gruppe der weiblichen SLE-Patienten hatte ein durchschnittliches Alter von 38,1 (\pm 13,5) Jahren, 72 der 105 Patientinnen wiesen ein aktives Krankheitsgeschehen auf (SLEDAI \geq 6), dies entspricht 69% der untersuchten weiblichen SLE-Patienten. Die gesunden Spenderinnen (n=36) waren durchschnittlich 27,3 Jahre alt (\pm 6,5). Die Patientinnen der Gruppe mit anderen Autoimmunerkrankungen waren im Durchschnitt 55,3 (\pm 13,4) Jahre alt. Bezogen auf ausschließlich weibliche Studienteilnehmer, war ein signifikanter Unterschied in den IL-17-Serumkonzentrationen zwischen den gesunden Spenderinnen und den SLE-Patientinnen erkennbar, siehe Abbildung 4.3a). Die IL-17-Serumkonzentrationen der SLE-Patientinnen waren signifikant erhöht (p=0,0298). Die IL-27-Serumkonzentrationen in Abbildung 4.3b) zeigten dieselbe Verteilung wie bei der Analyse aller Studienteilnehmer, die gesunde Kontrollgruppe zeigte signifikant höhere IL-27-Serumkonzentrationen im Vergleich zu den SLE-Patientinnen (p= 0,0286).

a)



b)

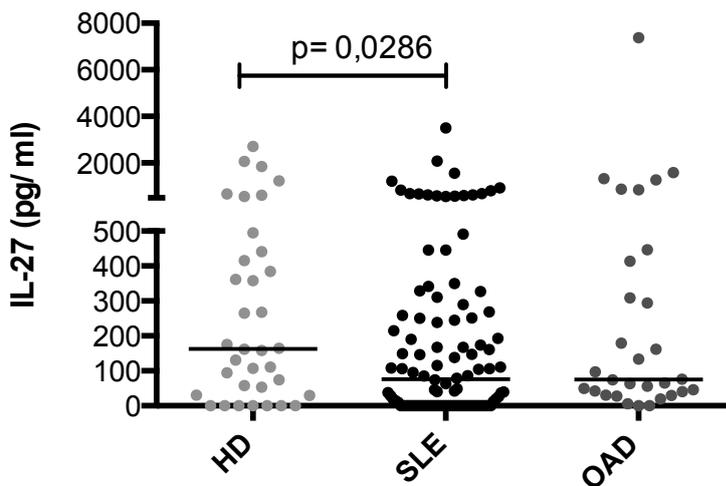


Abbildung 4.3: Darstellung der signifikanten Unterschiede der weiblichen Probanden

a): Analyse der IL-17-Serumkonzentrationen der weiblichen SLE-Patientinnen ($n = 105$) im Vergleich zu gesunden Spenderinnen (HD) ($n = 36$), und Patientinnen mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) ($n = 30$), angewendet wurde der Mann-Whitney-Test. Angezeigt ist der Median in allen Gruppen und in Abbildung 4.3b) sind die IL-27-Serumkonzentrationen der weiblichen Studienteilnehmer dargestellt. SLE ($n = 104$), HD ($n = 36$), OAD ($n = 30$) angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist der Median in allen Gruppen.

4.1.4 Analyse der IL-27-Serumkonzentrationen von SLE-Patienten, gesunden Kontrollen und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen

Die Untersuchung der IL-27-Serumspiegel der Gruppe der SLE-Patienten im Vergleich zu der Gruppe der gesunden Probanden und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Gruppe der SLE-Patienten und der Gruppe der gesunden Spender. Die Serumkonzentrationen der gesunden Kontrollgruppe waren signifikant höher im Vergleich zu den SLE-Patienten ($p=0,005$). In Abbildung 4.4 ist der Medianwert angezeigt. Für die Gruppe der gesunden Spender lag dieser bei 170,3 pg/ ml, der Maximalwert in der Gruppe der gesunden Spender, betrug 10 453 pg/ ml. Im Vergleich dazu lag der Median der IL-27-Konzentration der SLE-Patienten bei 56 pg/ ml, die maximale Serumkonzentration in der Gruppe der SLE-Patienten betrug 7375 pg/ ml. Es zeigte sich kein Unterschied der IL-27-Serumkonzentrationen der Patientengruppe mit anderen Autoimmunerkrankungen im Vergleich zu denen, der SLE-Patienten (74 pg/ ml) und zu den gesunden Probanden.

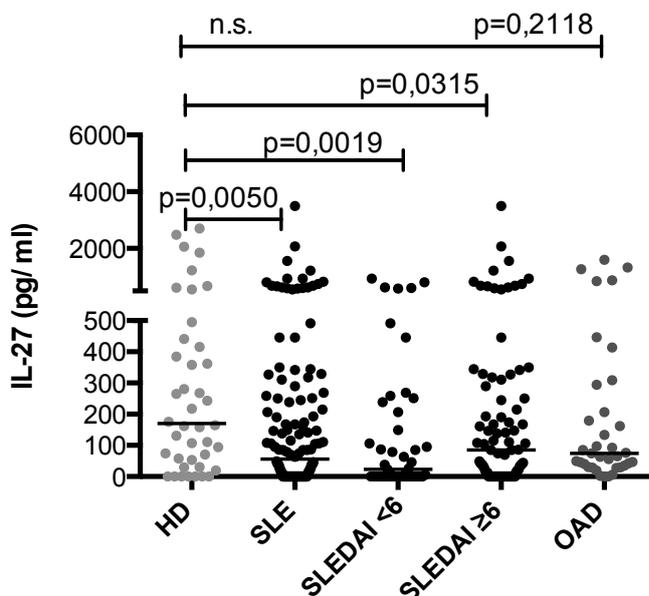


Abbildung 4.4: Darstellung der IL-27-Serumspiegel bei SLE-Patienten und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) im Vergleich zu gesunden Spendern (HD)

Gesunde haben signifikant höhere IL-27-Spiegel als Patienten mit SLE, angewendet wurde der Mann-Whitney-Test und dargestellt ist der Median der jeweiligen Gruppe. SLE ($n= 130$), OAD ($n= 37$) und gesunde Spender (HD) ($n= 42$)

Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, wiesen Patienten mit inaktivem bzw. gering aktivem SLE (SLEDAI < 6) und mit aktivem SLE (SLEDAI \geq 6) signifikant niedrigere IL-27-Spiegel auf als die gesunde Kontrollgruppe. Nicht aktive Patienten erreichten eine geringere IL-27-Serumkonzentration (Median 24 pg/ml) als Patienten im aktiven Krankheitszustand (85 pg/ml). Zwischen den aktiven und den nicht aktiven bzw. gering aktiven SLE-Patienten gab es keinen signifikanten Unterschied ($p=0,1007$). Die signifikant verminderte IL-27-Expression der SLE-Patienten korrelierte nicht mit der Krankheitsaktivität, gemessen mit Hilfe des SLEDAIs ($p=0,1524$, $r=0,1267$), siehe Abb. 4.5.

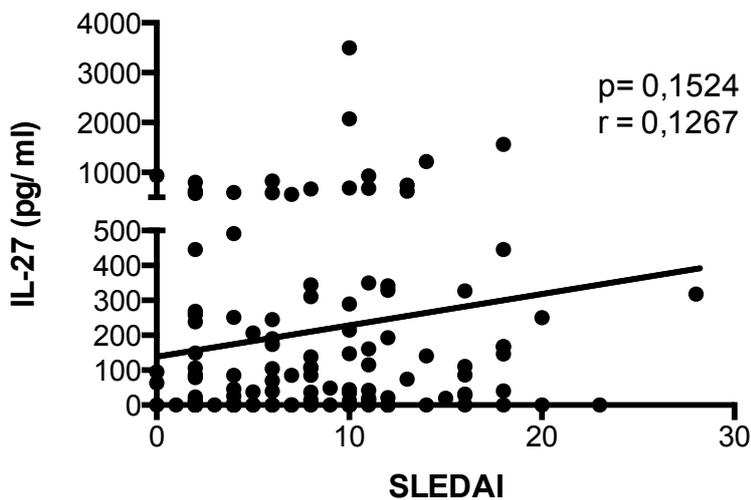


Abbildung 4.5: Darstellung der Krankheitsaktivität

gemessen am SLEDAI in Bezug auf die IL-27-Serumkonzentrationen der SLE-Patienten ($n= 129$ Paare). Der Spearman-Test wurde angewendet.

4.1.5 Kein Zusammenhang der IL-17-, IL-27-Serumspiegel der SLE-Patienten mit paraklinischen Daten

Weiterhin wurden die Ergebnisse der ELISA-Analyse mit klinischen und paraklinischen Daten wie Alter, Geschlecht, SLEDAI, Glukokortikoidtherapie, Therapie mit Immunsuppressiva, Laborwerten wie C3-Komplement und Antikörpertiter gegen Doppelstrang-DNA (dsDNA) in Bezug gesetzt. Die Daten wurden auch auf Korrelation miteinander untersucht. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den IL-17 positiv (>0 pg/ ml) und negativ getesteten Seren und den klassischen krankheits-assoziierten Aktivitätsmarkern wie SLEDAI ($p=0,6872$), Antikörpertiter gegen Doppelstrang-DNA ($p=0,8288$), und Serum-C3 ($p=0,7880$) erkennbar (siehe Abbildung 4.6). Ebenso wies die Auswertung der IL-27 positiv (> 63 pg/ ml) und IL-27 negativ (< 63 pg/ ml) getesteten Seren keine signifikanten Unterschiede auf bezüglich SLEDAI ($p=0,1690$), Anti-dsDNA-Antikörpertiter ($p=0,7743$) und Serum-C3 ($p=0,8334$) auf. Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, die Graphen in der Abbildung 4.6 zeigen jeweils den Medianwert an.

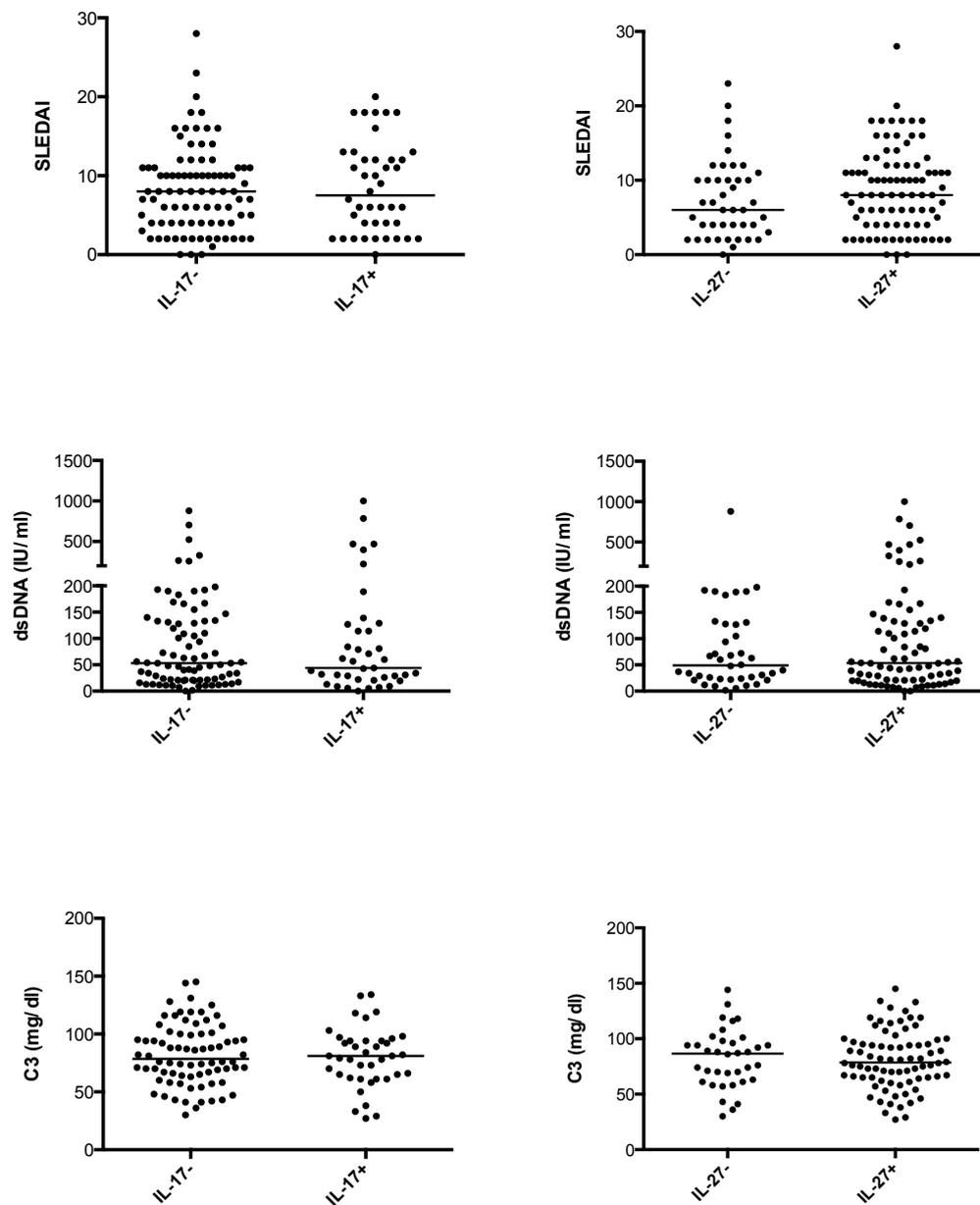


Abbildung 4.6: Darstellung der Aktivitätsparameter SLEDAI, Antikörpertiter der dsDNA-Antikörper und C3-Komplement

Es besteht keine Korrelation zwischen IL-17 und IL-27-Serumkonzentrationen und klinischen Krankheitsaktivitätsmarkern, angezeigt ist jeweils auf der Y-Achse der Diagramme in Bezug gesetzt zu den IL-17-positiv- und negativgetesteten Seren und mit den IL-27-positiv- und negativ-getesteten Seren der SLE-Patienten (n=131) auf der X-Achse. In negativ-getesteten Seren konnten mit den hier angewendeten Tests keine nachweisbaren Zytokinkonzentrationen nachgewiesen werden. Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist jeweils der Median.

4.1.6 Keine Assoziation der Stärke der Immunsuppression der SLE-Patienten mit den IL-17-, IL-27-Serumkonzentrationen

Das Ziel der immunsuppressiven Therapie ist es das aktive Krankheitsgeschehen mit akuten Entzündungsprozessen zu vermindern. Daher wurde vermutet, dass die immunsuppressive Therapie auch Einfluss auf die Parameter der Entzündung und auch die IL-17-Serumkonzentration hat. Die Kohorte der SLE-Patienten wurde unterteilt in Patienten unter niedriger, mittlerer und hoher immunsuppressiver Therapie. Gruppe 1, niedrige Immunsuppression (IS) umfasste alle Patienten, die keine Immunsuppression erhielten und Patienten mit Prednisoloneinnahme $\leq 7,5$ mg/ Tag und Antimalariatherapeutika. Gruppe 2 (mittlere IS) umfasste Patienten mit einer Prednisoloneinnahme von $>7,5-30$ mg/ Tag und/ oder Azathioprin- und/ oder Methotrexateinnahme. Gruppe 3 (hohe IS) beinhaltete Patienten mit einer Prednisoloneinnahme > 30 mg/ Tag, Mycophenolat-Mofetil- (MMF) und/ oder Cyclophosphamideinnahme und/oder Biologikatherapie. In der Abbildung 4.7a) ist der Median der IL-17-Serumkonzentrationen dargestellt. Es zeigten sich hier keine Zusammenhänge zwischen dem Grad der Immunsuppression und dem IL-17-Serumspiegel. Wie in Abb. 4.7b) dargestellt, wiesen Patienten mit niedriger Immunsuppression die höchsten IL-27-Serumkonzentrationen auf. Der Median der IL-27-Serumkonzentrationen lag bei Patienten mit niedriger Immunsuppression bei 110 pg/ ml, bei Patienten mit mittlerer Immunsuppression bei 27,63 pg/ ml, und bei Patienten mit hoher Immunsuppression bei 66,25 pg/ ml. Statistisch zeigte sich zwischen den 3 Gruppen kein signifikanter Unterschied.

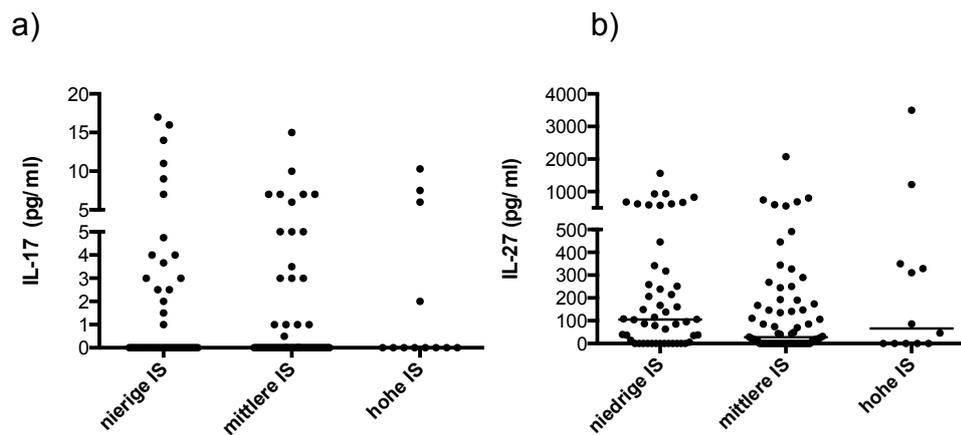


Abbildung 4.7: Zytokinserumlevel der SLE-Patienten mit Immunsuppression:

niedrige Immunsuppression (IS): Patienten ohne IS, Prednisolon $\leq 7,5$ mg, Antimalariatherapie n= 50,

mittlere IS: Prednisolon $>7,5 \leq 30$ mg und/ oder Azathioprin und/ oder Methotrexat n=69,

*hohe IS: Prednisolon >30 mg, Mycophenolat-Mofetil (MMF) und/ oder Cyclophosphamid, Biologikatherapie (n=12)
Angewendet wurde der ANOVA- Test, angezeigt ist der Median in jeder Gruppe.*

4.1.7 IL-17-, IL-27-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten mit und ohne Lupusnephritis

Eine Nierenbeteiligung ist für die Prognose des SLE von großer Bedeutung, histologisch werden 6 Klassen unterschieden. In Abb. 4.8a) sind die Konzentrationen von IL-17 im Serum der Patienten dargestellt entsprechend der Nierenbeteiligung: ohne Nierenbeteiligung (NB), Klasse IV-Lupusnephritis und histologisch andere oder nicht klassifizierbare Typen der Lupusnephritis.

Klassifikation der Lupusnephritis an Hand der International Society of Nephrology/ Renal Pathology Society (ISN/ RPS) 2003 [48]

- I minimale mesangiale Lupusnephritis
- II mesangial proliferative Glomerulonephritis
- III fokale proliferative Lupusnephritis
- IV diffus proliferative Lupusnephritis
- V membranöse Lupusnephritis
- VI fortgeschrittene sklerosierende Lupusnephritis

Die Nierenbeteiligung hatte keinen Einfluß auf die IL-17-Serumkonzentration in dieser Kohorte. Patienten mit der schwersten Form der Lupusnephritis, Klasse IV, wiesen ähnliche IL-17-Serumkonzentrationen auf, wie Patienten ohne Nierenbeteiligung. Der Median-Wert für die IL-17-Serumkonzentrationen der Patienten ohne Nierenbeteiligung betrug 0 pg/ml, ebenso, wie der Median der Patienten mit Klasse IV Lupusnephritis und der, der anderen histologischen Gruppen. Wie in Abb. 4.8b) dargestellt, wiesen SLE-Patienten mit Nephritis Klasse IV signifikant höhere IL-27-Serumkonzentrationen auf als Patienten ohne Nierenbeteiligung ($p < 0,05$) oder andere histologische Typen ($p < 0,05$).

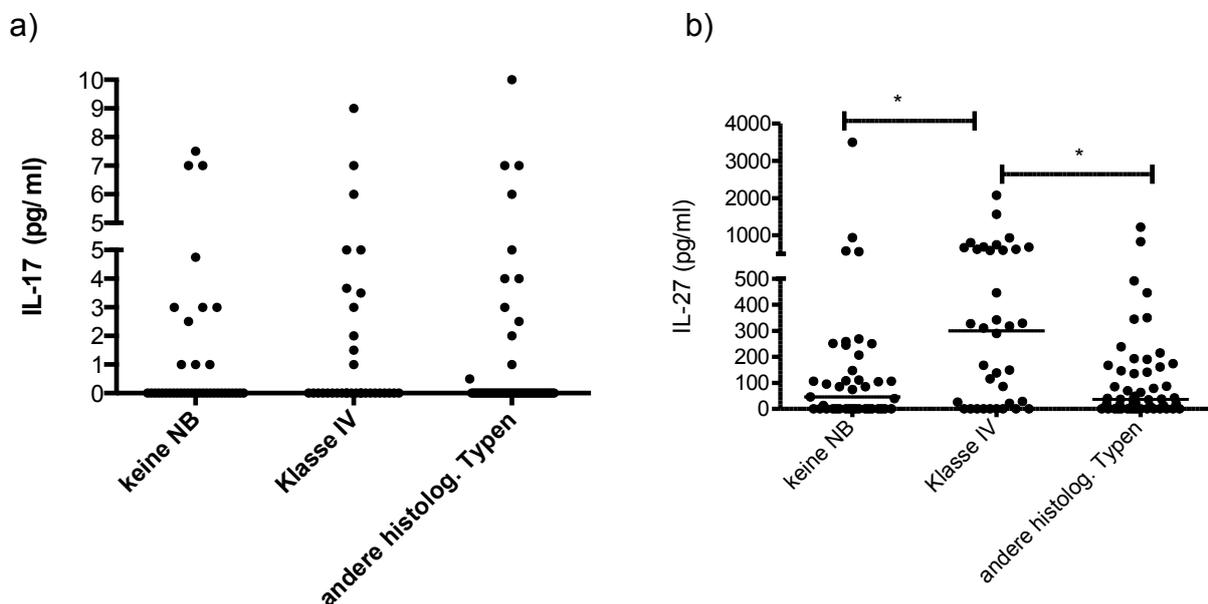


Abbildung 4.8: IL-17 und IL-27-Serumkonzentrationen entsprechend der Nierenbeteiligung

4.8 a) und b): zeigt die IL-17- und IL-27-Serumkonzentrationen der SLE-Patienten ohne Nierenbeteiligung (NB) ($n = 42$), bzw. Klasse IV Lupusnephritis ($n = 36$) und andere histologische Klassen ($n = 53$). Angewendet wurde der ANOVA-Test, angezeigt ist jeweils der Median. (* entspricht $p < 0,05$)

4.2 Effekt der Aktivierung von T-Zellen durch Kurzzeitstimulation auf die Sekretion von IL-17 und IFN γ

Ausgehend von der Untersuchung der Seren mittels ELISA, in der sich keine erhöhten IL-17-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten zeigten, wurde im Anschluss mittels Stimulation der T-Zellen eine durchflusszytometrische Untersuchung im Vollblut durchgeführt. Um zu prüfen, ob es Unterschiede in der in vitro T-Zellantwort von SLE-Patienten und gesunden Kontrollen gibt, wurden Vollblut-Stimulationen mit verschiedenen Antigenen durchgeführt und die Sekretion der Zytokine IL-17 und IFN γ gemessen. Ein Sekretionsinhibitor (Brefeldin A) wurde verwendet, um die Zytokine im Zellinneren zu bewahren und diese wurden mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper intrazellulär gefärbt. Durch vorher festgelegte Analysefenster (Gates) und definierte Zellzahlen kann eine quantitative Aussage über die Frequenz der zytokinproduzierenden Zellen getroffen werden. Die angegebenen Frequenzen beziehen sich jeweils auf 100.000 CD3+/CD4+ T-Zellen beziehungsweise die darin enthaltenen CD40 Ligand+ T-Zellen.

Die Analysen der CD3+/CD4- T-Zellen ergaben, dass prozentual weniger CD40 Ligand+ Zellen nachweisbar waren, weshalb die Analyse in CD3+/CD4+ Zellen erfolgte. Ebenso wurden IL-17 produzierende Zellen nur in den CD40 Ligand+ Zellen ermittelt. Die Stimulation der T-Zellen erfolgte im Vollblutansatz mit verschiedenen Antigenen, um zu prüfen, ob es zu einer erhöhten Sekretion der Zytokine IL-17 und IFN γ bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern kommt. Die Zellen wurden mit den viralen Antigenen Cytomegalievirus, Epstein-Barr-Virus und dem Adenovirus stimuliert, ebenso wurden Versuche der Stimulation mit Histonen, Nukleosomen und SmD1-Peptiden unternommen, bei denen sich jedoch nach Stimulation in dieser Kohorte keine Zytokinantworten zeigten. Zur Vereinheitlichung der Methodik und Etablierung eines effektiven Protokolls im durchflusszytometrischen Nachweis antigenspezifischer T-Zellen nach Kurzzeitstimulation, wurden Versuche zur Etablierung des Stimulationsprotokolls durchgeführt.

4.2.1 Charakterisierung der Patienten-Kohorte bezüglich des Krankheitsaktivitätsindex SLEDAI

Die Gruppe der SLE-Patienten, die durchflusszytometrisch analysiert wurden (n= 21), wurde an Hand der Krankheitsaktivität gemessen mit Hilfe des SLEDAI in eine aktive und eine nicht aktive bzw. gering aktive Gruppen aufgeteilt. In Abbildung 4.9 ist dargestellt, wie sich die Krankheitsaktivität auf die klinischen Parameter Anti-dsDNA-Antikörpern und C3-Komplement auswirkt. Aktive Patienten wiesen einen niedrigeren Serumspiegel an C3-Komplement auf, als weniger aktive Patienten (aktive SLE-Patienten: Mittelwert: 88,4 mg/ dl SD: 27,56, nicht aktive SLE-Patienten: Mittelwert: 108,5 mg/ dl SD: 20,45, $p=0,0617$). Der Anti-dsDNA-Antikörpertiter ist signifikant ($p=0,0035$) höher in der Gruppe der aktiven SLE-Patienten (Mittelwert: 137,2 IU/ ml SD: 135,7) im Vergleich zur Gruppe der nicht aktiven SLE-Patienten (Mittelwert: 24,03 IU/ ml, SD: 16,56), angewendet wurde der Mann-Whitney-Test.

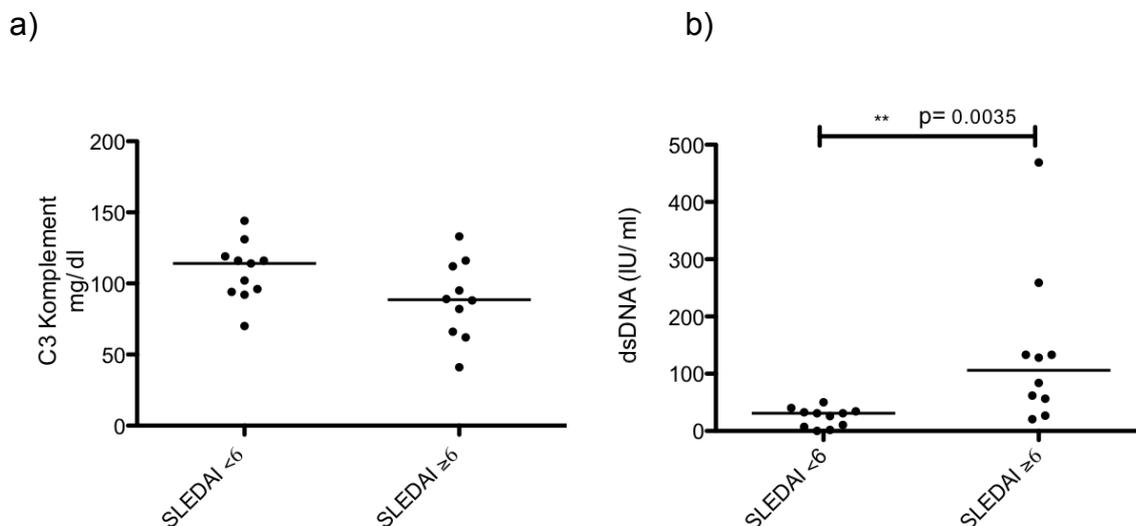


Abbildung 4.9: Darstellung des Zusammenhangs zwischen aktivem Krankheitsgeschehen und a) der Höhe der C3-Serumkonzentrationen und b) der Höhe der Antikörpertiter der Anti-dsDNA-Antikörper

Die SLE-Patienten sind dargestellt als aktive SLE-Patienten (n=10), nicht aktive SLE-Patienten (n=11) Vollblut wurde 6 Stunden mit dem Antigen SEB (1µl/ ml) stimuliert. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3+, CD4+, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist der Median.

Tabelle 4.5 Charakterisierung der SLE-Patienten (FACS-Analyse)

Anzahl	21
männlich	0
weiblich	21
Alter in Jahren (Mittelwert mit Standardabweichung)	42,9± 14,14
SLEDAI (Mittelwert)	5,6± 5
BSG (Mittelwert)	30.41
C3 Komplement (Mittelwert)	98.95
dsDNA (Mittelwert)	77.93
IL-17 ELISA (Mittelwert) in pg/ml	1,73± 2,1
IL-27 ELISA (Mittelwert) in pg/ml	193± 467,7
IL-17 (Median) in pg/ml	0
IL-27 ELISA (Median) in pg/ml	40
% IL-17/ CD40 Ligand+/ CD3+/CD4+(Median der Frequenz)	1.6
% IL-17/ CD3+/CD4+ (Median der Frequenz)	0.21
Ratio %IL-17/% IFN γ / CD40 Ligand+ (Median)	0.14

**Tabelle 4.6 Charakterisierung der PATienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD)
(FACS-Analyse)**

Anzahl	12
männlich	5
weiblich	7
Alter in Jahren (Mittelwert mit Standardabweichung)	54± 13,79
IL-17 ELISA (Mittelwert) in pg/ ml	2,1± 4,6
IL-27 ELISA (Mittelwert) in pg/ ml	697,4± 2107
IL-17 (Median) in pg/ ml	0
IL-27 ELISA (Median) in pg/ ml	45
% IL-17/ CD40 Ligand+/ CD3+/CD4+(Median der Frequenz)	0,29
% IL-17/ CD3+/CD4+ (Median der Frequenz)	0,2900
Ratio %IL-17/% IFN γ / CD40 Ligand+ (Median)	0,15

Tabelle 4.7 Charakterisierung der gesunden Spender (FACS-Analyse)

* aktivierte Th-Zellen = CD3+CD4+CD40 Ligand+

Th-Zellen = CD3+CD4+

Anzahl	21
männlich	2
weiblich	19
Alter in Jahren (Mittelwert mit Standardabweichung)	29,14± 7,4
IL-17 ELISA (Mittelwert) in pg/ml	5,2± 16,76
IL-27 ELISA (Mittelwert) in pg/ml	354,4± 444,4
IL-17 (Median) in pg/ml	0
IL-27 ELISA (Median) in pg/ml	218
% IL-17/ CD40 Ligand+/ CD3+/CD4+(Median der Frequenz)	1,36
% IL-17/ CD3+/CD4+ (Median der Frequenz)	0,19
Ratio %IL-17/% IFN γ / CD40 Ligand+ (Median)	0,053

4.2.2 Gating-Strategie zur durchflusszytometrischen Detektion der Th17-Zellpopulation

Gating:

Die unterschiedlichen Zell-Populationen, die im Vorwärtsstreulicht (FSC) und im Seitwärtsstreulicht (SSC) angezeigt werden, wurden wegen der Anzahl der Events im oberen Bereich beschränkt, im Analysefenster (Gate) angezeigt sind der prozentuale Anteil der Lymphozyten aller erfassten Events, siehe FACS-Abb 4.10. Die angegebenen Prozentzahlen beziehen sich auf die innerhalb dieses Fensters liegenden Zellen.

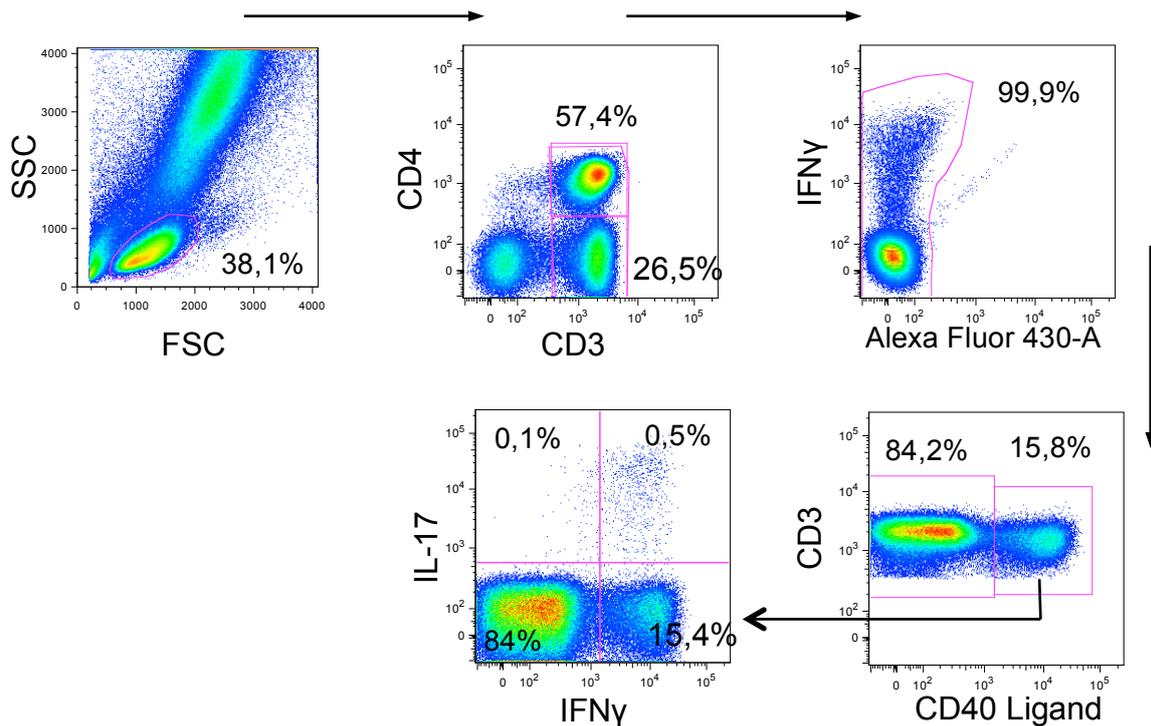


Abbildung 4.10: Darstellung der Gating-Strategie am Beispiel eines gesunden Spenders

Vollblut wurde 6 Stunden mit dem Antigen SEB (1 μ l/ml) stimuliert. Der Sekretionsinhibitor Brefeldin A wurde nach 2 Stunden zugefügt. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3, CD4, CD40 Ligand und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ gefärbt.

Die Auswertung erfolgte nach Anlegen kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten an Hand der FSC/SSC- Eigenschaften, sowie auf aktivierte CD3+/CD4+ Zellen. Es wurde nach den T-Zellspezifischen Oberflächenmerkmalen CD3+/CD4+ sortiert und weiterhin nur noch CD3+/CD4+ T-Zellen analysiert. Zur Elimination von autofluoreszierenden Zellen wurden die CD3+/CD4+ Zellen in einem Diagramm in einem nicht genutzten Kanal Alexa Fluor 430 dargestellt und ein Gate um die IL-17+/Alexa Fluor 430- Population gezogen. CD40 Ligand, oder auch CD154 ist ein Protein, das als Oberflächenmarker u.a. auf aktivierten T-Zellen zu finden ist. Um die aktivierten T-Zellen einzugrenzen, wurde ein Gate um die CD3+/CD40 Ligand+ Population im Diagramm gesetzt, dieses Gate wurde in der unstimulierten Probe H₂O gesetzt und in die stimulierte Probe kopiert um eine vergleichbare Position der Gates zu setzen. Die Frequenzen der zytokinproduzierenden Zellen von IL-17 und IFN γ werden in Prozent angegeben, bezogen auf aktivierte CD3+/CD40L+ aller CD3+/CD4+ Zellen der Lymphozyten. Die Analyse erfolgte bei allen mit verschiedenen Antigenen stimulierten und unstimulierten Proben.

4.2.3 Vergleich des Stimulationserfolges mit Staphylococcus Enterotoxin B im Vollblut und in PBMCs

Die durchflusszytometrische Untersuchung kann sowohl mit Patientenproben im Vollblut als auch in zuvor aufgereinigten Proben und den verbliebenen mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) erfolgen. Mit Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) stimulierte Vollblutproben von Patienten und Gesunden wiesen höhere Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen auf als in isolierten PBMCs der selben Patienten und Gesunden nachzuweisen waren (im Vollblut 4,3% der aktivierten T-Zellen im Vergleich zu 2,8% der aktivierten T-Zellen in PBMCs) siehe Abb. 4.11, deswegen wurden im weiteren Verlauf Vollblutproben analysiert.

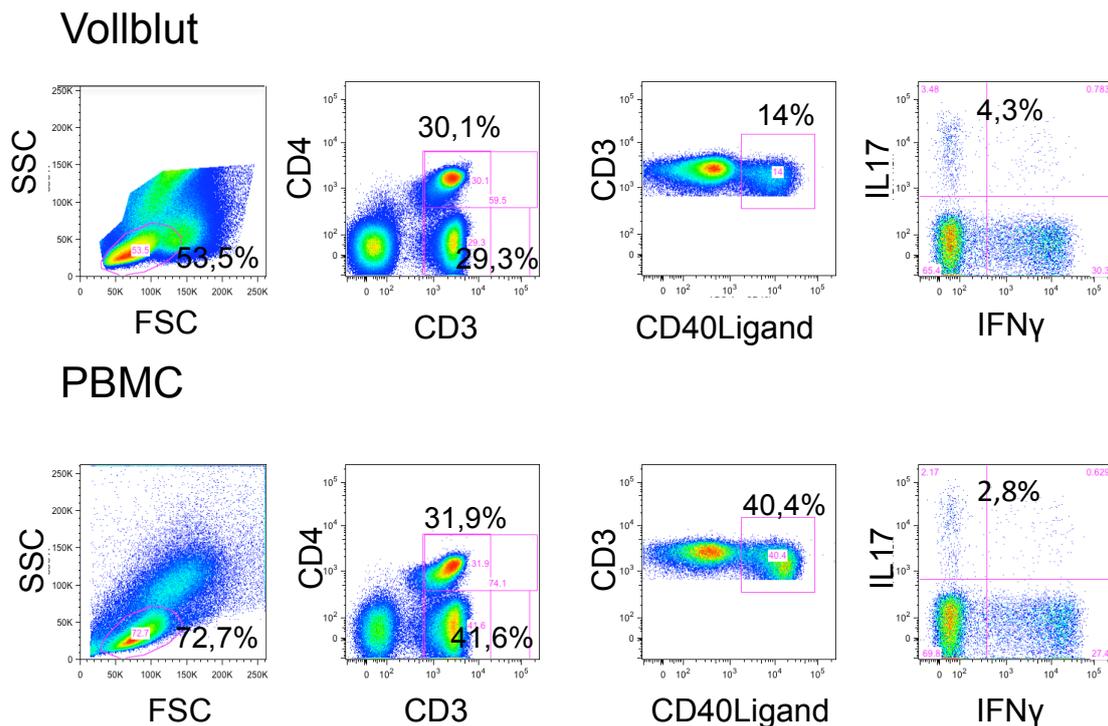


Abbildung 4.11: Vergleich der Frequenzen der IL-17/IFN γ doppelpositiven Zellen in PBMCs und Vollblut

Dargestellt sind das Lymphozytengate, die Sortierung nach CD3+/CD4+ T-Zellen und Auswahl der aktiven CD40 Ligand positiven T-Zellen, zur vergleichenden Beurteilung der IL-17/IFN γ -doppelpositiven T-Zellen; Vollblut bzw. PBMCs eines gesunden Spenders nach Stimulation mit SEB, nach einer Inkubationsdauer von 6 Stunden und Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A nach 2 Stunden.

4.2.4 Besserer Stimulationserfolg nach polyklonaler T-Zellstimulation mit Staphylococcus Enterotoxin B (SEB) als mit PMA/ Ionomycin

Zur polyklonalen Stimulation der T-Zellen können sowohl SEB als auch PMA/ Ionomycin verwendet werden. Im Vorversuch wurde ein besseres Stimulationsergebnis im Vollblut mit SEB erlangt. Wie in Abb. 4.12 gezeigt, konnten höhere Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen nach der polyklonalen Stimulation der T-Zellen mit SEB (1,792% IL-17 produzierende Zellen der aktivierten Th-Zellen) im Vergleich zu der Stimulation mit PMA/Ionomycin (0,1534% IL-17 produzierende Zellen der aktivierten Th-Zellen) nachgewiesen werden.

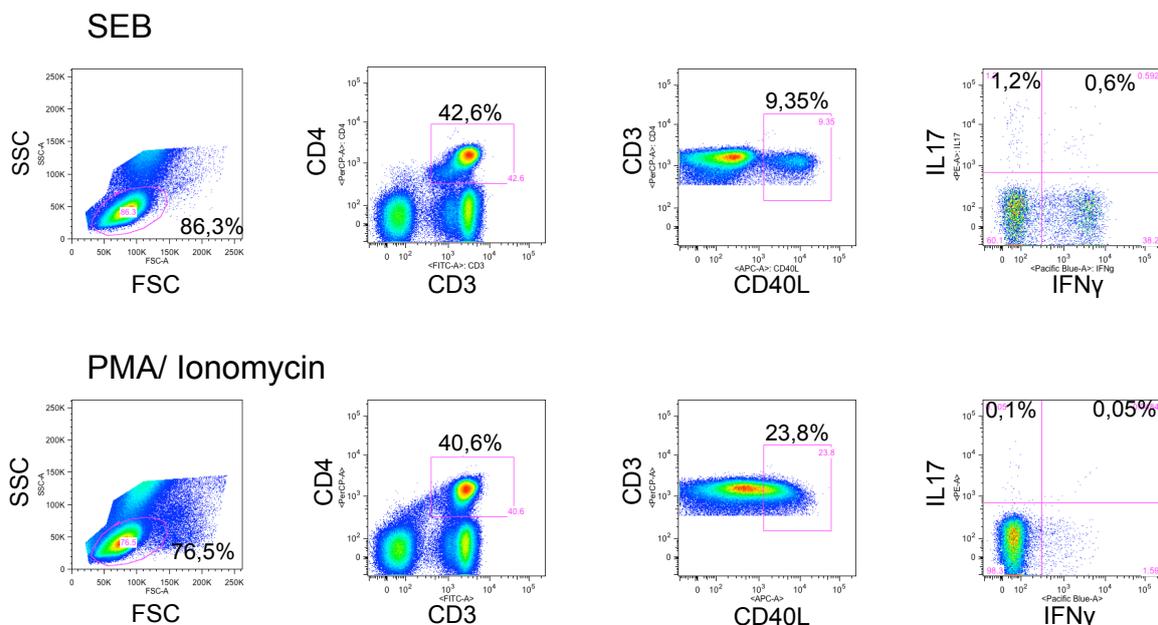


Abbildung 4.12: Höhere Effektivität der Stimulation mit PMA

Dargestellt ist jeweils das Lymphozytengate, das Analysefenster um die CD3+/CD4+ T-Zellpopulation, das Analysefenster der aktiven CD40 Ligand positiven T-Zellen und im Vergleich die IL-17/ IFN γ - doppeltpositiven T-Zellen nach Stimulation der selben Blutprobe eines gesunden Spenders mit SEB und mit PMA/ Ionomycin, nach sechsständiger Inkubation, Brefeldin A wurde nach 2 Stunden Inkubation zugefügt.

4.2.5 Höhere Effektivität einer Stimulationsdauer von 6 h als über 24 h

Die Stimulationsdauer wurde auf sechs Stunden festgelegt, da eine längere Stimulationsdauer dazu führte, dass nach Färbung der Oberflächenmoleküle die CD3+/CD40 Ligand+ Population schlechter abzugrenzen war und die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen abnahmen. Nach 6-stündiger Stimulation konnten Frequenzen von 4,223% IL-17 produzierender Zellen der Th-Zellen nachgewiesen werden, nach 24-stündiger Stimulation konnten Frequenzen von 0,542% der Th-Zellen als IL-17 produzierende Zellen nachgewiesen werden.

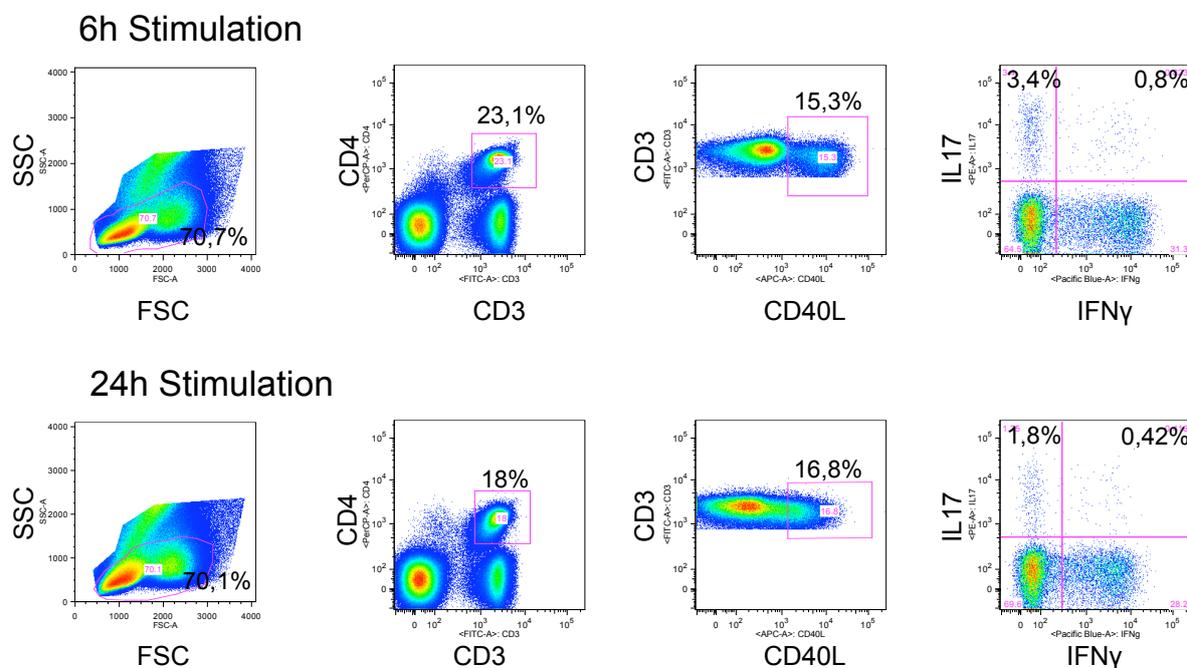


Abbildung 4.13: Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen eines gesunden Spenders nach 6h Stimulationsdauer bzw. 24h Stimulationsdauer

Vollblut wurde 6 Stunden und 24 Stunden mit dem Antigen SEB ($1\mu\text{l}/\text{ml}$) stimuliert. Der Sekretionsinhibitor Brefeldin A wurde nach 2 Stunden zugefügt. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3+, CD4+, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Die Auswertung erfolgte nach Anlegen kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten an Hand der FSC/SSC-Eigenschaften, sowie auf aktivierte CD3+/CD4+ Zellen.

4.2.6 Darstellung der Stimulationskontrolle und der Stimulation mit anderen Antigenen

Als Färbekontrolle diente für jede analysierte Blutprobe die mit H₂O bzw. DMSO versetzte Probe, als Leerprobe. Die Leerprobe zu jeder Analyse zeigte, ob im unstimulierten bzw. voraktivierten Zustand der Probe IL-17 produzierende Zellen vorhanden sind. In Abb. 4.14 ist die Stimulation der Vollblutprobe eines SLE-Patienten mit den Antigenen Cytomegalie-Virus (CMV), Adeno-Virus 5 (Adeno), SEB und der mit H₂O versetzten Probe angezeigt. Im linken Analysefenster ist jeweils die Population der aktivierten Th-Zellen (CD3+/CD40 Ligand+) angezeigt, im rechten Analysefenster sind die Frequenzen der IL-17/ IFN γ doppelpositiven Zellen der aktivierten T-Zellen dargestellt. In der mit H₂O versetzten Probe war keine aktivierte T- Zellpopulation abzugrenzen, die Frequenzen der IL-17/ IFN γ doppelproduzierenden Zellen betrug 0 %. Die Stimulation mit CMV hatte bei diesem Patienten eine Aktivierung der T-Zellen zur Folge und es waren erhöhte Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen (72,3% der aktivierten Th-Zellen) zu erkennen, die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen betrug 0,42 % der aktivierten Th-Zellen. Nach der Stimulation mit Adenovirus 5 waren nur sehr geringe Frequenzen an aktivierten Th-Zellen zu erkennen, die sich aus IFN γ produzierenden Zellen zusammensetzten. Der größte Stimulationserfolg, gemessen an den Frequenzen der IL-17/ IFN γ doppelpositiven Zellen, wurde mit der Stimulation der T-Zellen mit SEB erreicht (5,94% IL-17 produzierende Zellen innerhalb der aktivierten Th-Zellen).

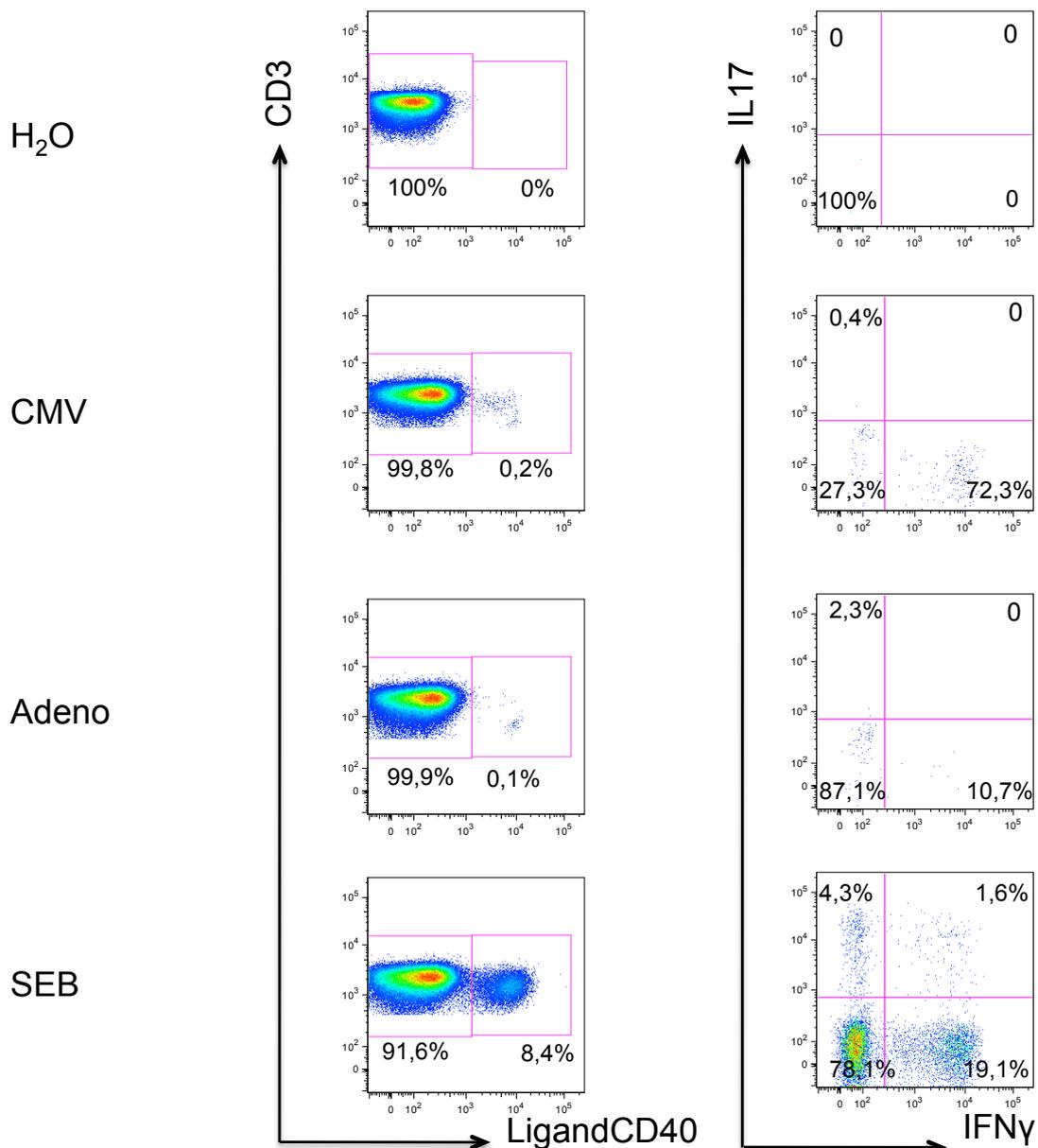
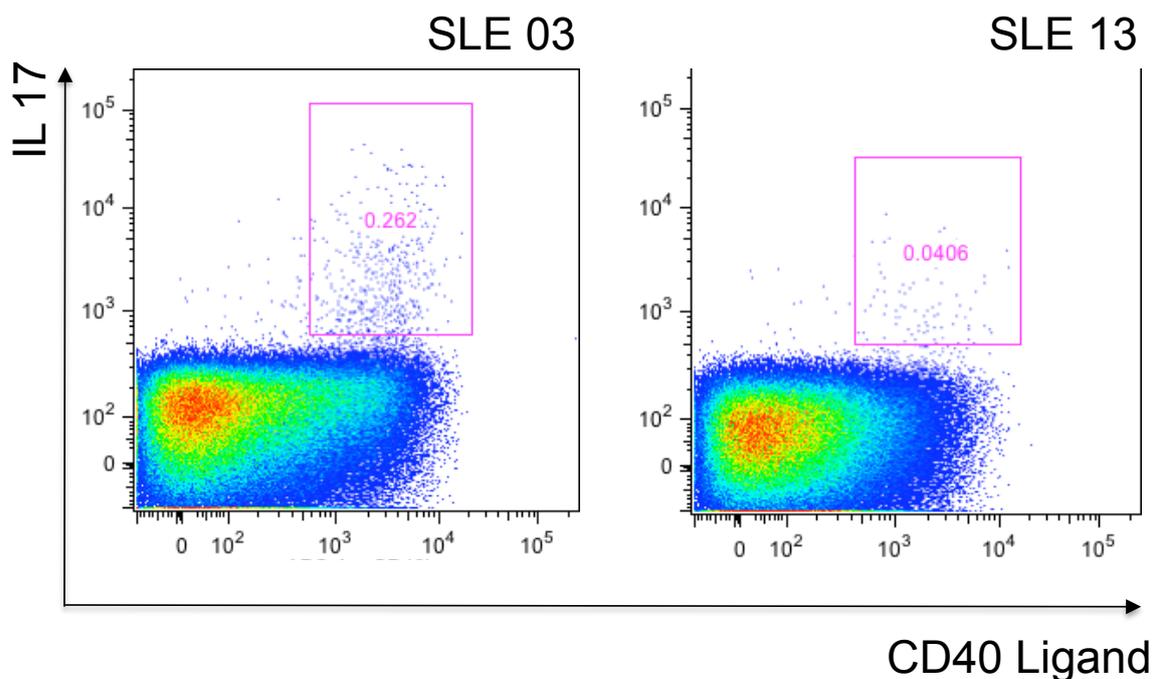


Abbildung 4.14: Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen eines SLE-Patienten

Vollblut wurde 6 Stunden mit den Antigenen CMV, Adeno oder SEB stimuliert, der Sekretionsinhibitor Brefeldin A wurde nach 2 Stunden zugefügt. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3, CD4 und CD40 Ligand und intrazellulär die Zytokine IL-17 und IFN γ nachgewiesen. Die Auswertung erfolgte nach Anlegen kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten an Hand der FSC/SSC-Eigenschaften, sowie auf aktivierte CD3+/CD4+ Zellen.

4.2.7 Spontane IL-17-Sekretion

Unter den 21 untersuchten SLE-Patienten wiesen drei SLE-Patienten eine spontane IL-17-Sekretion in der unstimulierten Probe (H₂O) auf, im Vergleich dazu konnte in keiner unstimulierten Blutprobe der 21 gesunden Spender eine Th17-Aktivität festgestellt werden. Abbildung 4.15 zeigt die spontane IL-17-Sekretion in unstimulierten Proben der drei SLE-Patienten und im Vergleich eine unstimulierte Probe eines SLE-Patienten, ohne spontane IL-17-Sekretion. Bei zwei der drei voraktivierten SLE-Patienten mit spontaner IL-17 Sekretion, lag ein aktives Krankheitsgeschehen vor (mittlerer SLEDAI= 9,5 SD: 0,5). Die IL-17-Serumkonzentrationen in der ELISA-Untersuchung lagen für diese drei Patienten zwischen 3,5- 6 pg/ ml, der Median in der gesamten SLE-Patientengruppe beträgt 0 pg/ ml. Weiterhin auffällig ist ein sehr hoher Serumspiegel für Anti-dsDNA-Antikörper bei Patient SLE 13. Alle drei SLE-Patienten erhielten eine mittlere immunsuppressive Therapie, d.h. Prednisolon >7,5 mg/ Tag < 30mg/ Tag und/ oder Azathioprin und/ oder Methotrexat.



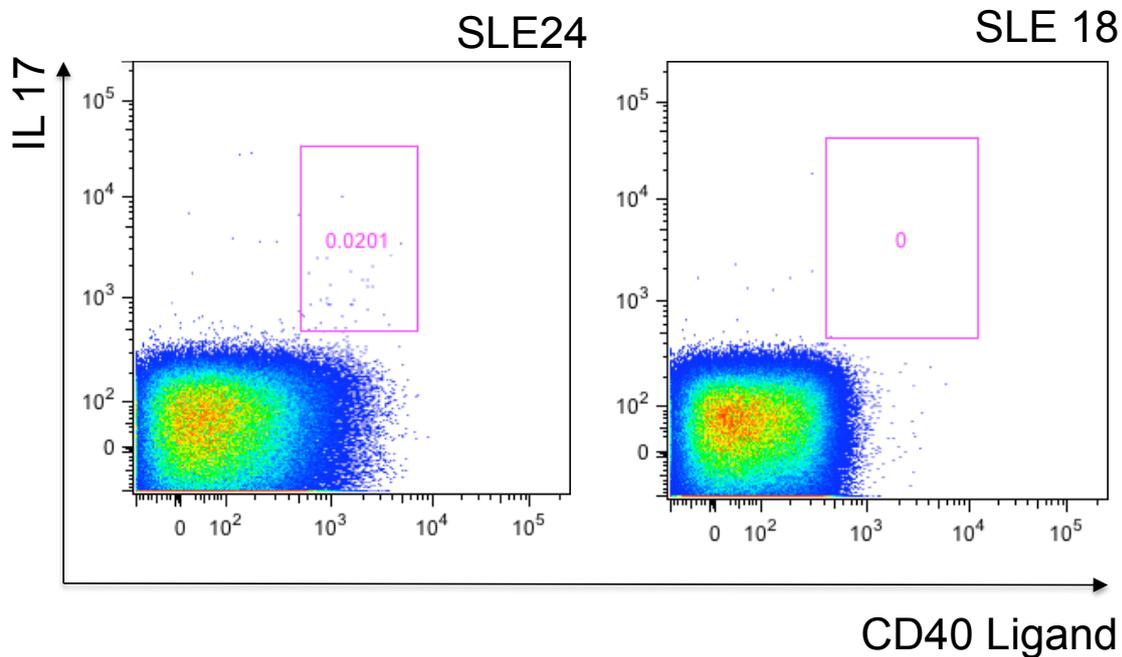


Abbildung 4.15: Spontane IL-17-Sekretionen bei drei SLE- Patienten in unstimulierten Proben nach 6 Stunden Inkubation

Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3+, CD4+, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Die Auswertung erfolgte nach Anlegen kombinierter Analysefenster auf Lymphozyten an Hand der FSC/SSC- Eigenschaften, sowie auf aktivierte CD3+/CD4+ Zellen. Beispielhaft als unstimulierte Probe ohne IL-17- Spontansekretion ist IL-17/CD40 Ligand Dotplot des SLE- Patienten SLE18 gezeigt.

4.2.8 IL-17-Frequenzen bezogen auf CD3+/CD4+ T-Zellen bei SLE-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen

Nach Stimulation der Vollblutproben mit verschiedenen Antigenen ergibt sich für die Stimulation mit SEB die stärkste T-Zellantwort. Nachfolgend ist die prozentuale Anzahl der IL-17 produzierenden Zellen bezogen auf 100.000 CD3+/CD4+ der untersuchten Proben dargestellt. Alle Proben wurden in 6-stündiger Inkubation mit SEB stimuliert und durchflusszytometrisch ausgewertet. Wie in Abbildung 4.16 gezeigt, besteht ein geringer Unterschied der Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen der SLE-Patienten (Median: 0,21) und der gesunden Kontrollgruppe (Median: 0,19,

p=0,6416), die Medianwerte der SLE-Patienten und der gesunden Spender ergeben annähernd eine ähnliche Frequenz. Die Gruppe der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OADs) erreicht die höchsten Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen (Median: 0,29) innerhalb der gateden CD3+/CD4+ Zellen (0,29 % der CD4+- Zellen).

Tabelle 4.8 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der IL-17-Frequenzen

bezogen auf die CD3+/CD4+ T- Zellen. Angegeben ist jeweils der Median.

Th-Zellen = CD3+CD4+

Patientengruppen	Median	Range
SLE % IL-17/ CD3+/CD4+ (Median der Frequenz)	0.21	0,02- 0,77
OAD % IL-17/ CD3+/CD4+ (Median der Frequenz)	0,29	0,13- 0,73
HD % IL-17/ CD3+/CD4+ (Median der Frequenz)	0,19	0,02- 0,56

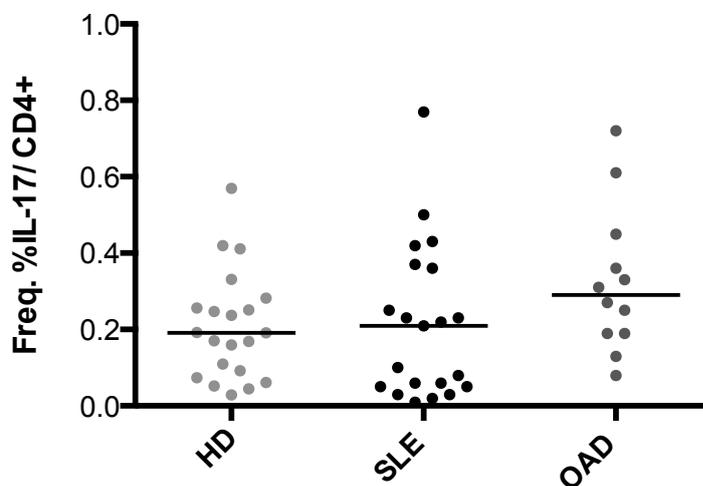


Abbildung 4.16: Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der Th17-Frequenzen

bezogen auf CD3+/CD4+ T- Zellen bei SLE- Patienten (n= 21), gesunden Spendern (HD) (n=21) und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) (n= 12). Die Stimulation erfolgte mit SEB. Angewendet wurde der Mann-Whitney- Test, angezeigt ist der Median.

4.2.9 IL-17-Frequenzen bezogen auf aktivierte CD3+/CD4+ T-Zellen (CD40 Ligand+) bei SLE-Patienten, gesunden Spendern und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen

Untersucht wurden, nach polyklonaler Stimulation mit SEB für 6 Stunden, die Frequenzen der aktivierten CD3+/CD4+ Zellen der SLE-Patienten, der gesunden Spender und der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen, die mittels des Aktivitätsmarkers CD40 Ligand kenntlich gemacht wurden. Zur weiteren Analyse wurden die CD40 Ligand+ Zellen in einem Analysefenster erfasst und die IL-17-Frequenzen bezogen auf die CD40 Ligand+ Zellen verglichen. In Abb. 4.17 ist dargestellt, dass die CD40L+ Zellen der SLE-Patienten eine mediane Frequenz von 1,6% (Mittelwert: 2,04, SD: 1,456) der CD40L+ Zellen haben, die Frequenz der gesunden Spender liegt im Median bei 1,4% (Mittelwert: 1,39 SD: 0,7547) und der Median der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen bei 2,2% (Mittelwert: 2,462 SD: 1,278). Der Unterschied der Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen bezogen auf aktivierte T-Zellen zwischen den gesunden Spendern und der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen ist signifikant ($p=0,0193$).

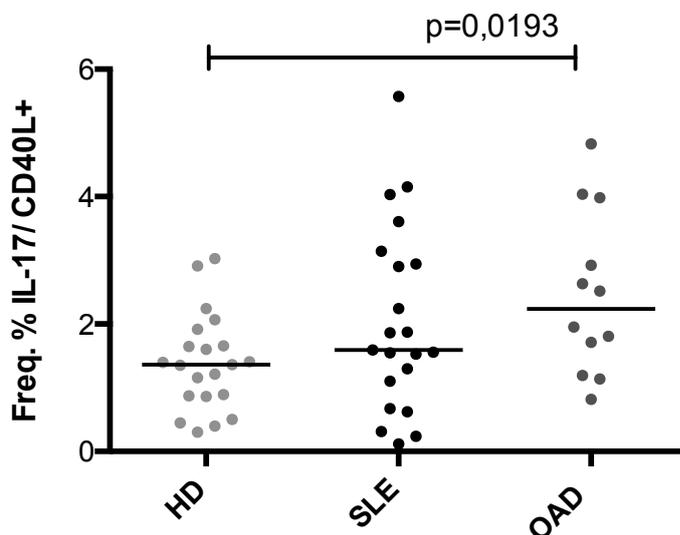


Abbildung 4.17: IL-17-Frequenz bezogen auf aktivierte CD3+/CD4+ T-Zellen

Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse bei gesunden Spendern (HD) ($n=21$), SLE-Patienten ($n=21$) und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) ($n=12$), nach Stimulation mit SEB. Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist der Median.

4.2.10 Vergleich des Stimulationserfolges mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der IFN γ -Frequenzen bei SLE-Patienten und gesunden Spendern

Die IL-17-Produktion zeigte auch nach Stimulation der T-Zellen nahezu gleiche Frequenzen in der Gruppe der SLE-Patienten und der gesunden Spender. Zur Überprüfung des Stimulationserfolges wurde zeitgleich die Produktion des Zytokins IFN γ gemessen, die IFN γ -Produktion der gesunden Spender war signifikant ($p=0,0006$) höher als bei SLE-Patienten, siehe Abb. 4.18.

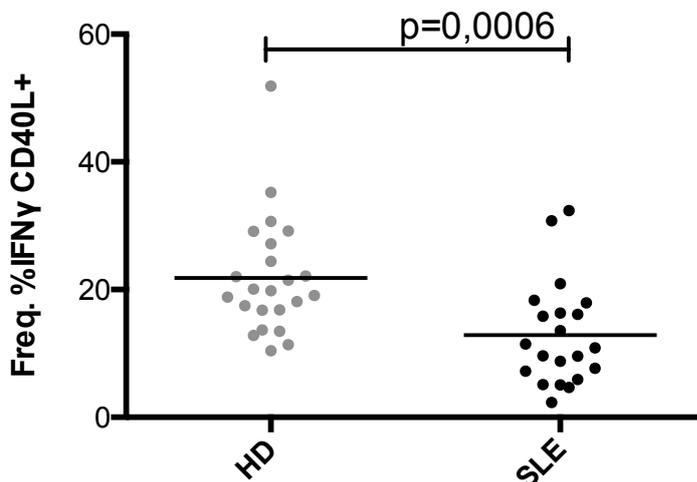


Abbildung 4.18: Darstellung der IFN γ -Produktion nach T-Zellstimulation bezogen auf CD40 Ligand+ T-Zellen bei SLE-Patienten (n= 21) und gesunden Spendern(HD) (n= 21).

Vollblut wurde 6 Stunden mit dem Antigen SEB (1 μ l/ ml) stimuliert. Die Zugabe des Sekretionsinhibitors Brefeldin A erfolgte nach 2 Stunden. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3+, CD4+, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist der Median.

Die intrazelluläre Färbung von Interferon γ dient als Kontrolle der Effizienz der Aktivierung. Die Frequenzen der Zytokine IL-17 und IFN γ nach Stimulation der T-Zellen mit verschiedenen Antigenen waren bei SLE-Patienten geringer, als bei gesunden Spendern, die Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen waren signifikant niedriger, als bei gesunden Spendern, dennoch waren höhere IL-17-Frequenzen in der Gruppe der SLE-Patienten nachzuweisen. Die gemessenen Frequenzen der beiden Zytokine

IL-17 und IFN γ wurden in der jeweiligen Gruppe miteinander ins Verhältnis gesetzt. Die gebildete Ratio stellt die Balance zwischen Th17- und Th1- Zellaktivität dar.

4.2.11 Ratio der IL-17/ IFN γ -positiven Zellen in aktivierten T-Zellen

Für die untersuchten Gruppen der SLE-Patienten, gesunden Spender (HD) und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) wurde jeweils die Ratio an Hand der Frequenzen der IL-17 und der Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen erhoben. Daraus ergab sich eine Ratio, die die IL-17-Frequenz bezogen auf stimulierte T-Zellen angibt. Bei allen untersuchten Proben wurden höhere Frequenzen für IFN γ als für IL-17 gemessen, d. h. die sich ergebende Ratio ist immer <1 . Dabei zeigt sich in Abbildung 4.19 ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0001$) zwischen den gesunden Spendern (Median: 0,07) und den SLE- Patienten (Median: 0,13) für die Ratio: IL-17-Produktion in aktivierten T-Zellen und IFN γ -Produktion. Die Gruppe der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (Median: 0,14) unterschied sich signifikant von der Gruppe der gesunden Spender ($p = 0,0003$).

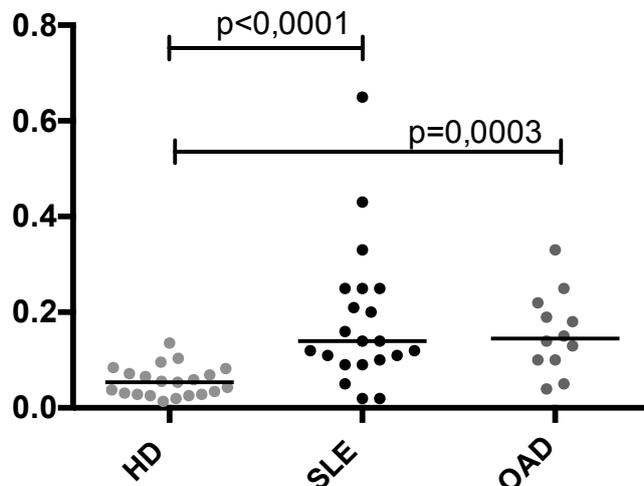


Abbildung 4.19: Darstellung der Ratio der IL-17-Frequenzen der CD4+/ CD40 Ligand+ T-Zellen und der Frequenzen von Interferon γ der CD4+/ CD40 Ligand + T-Zellen

Vollblut wurde 6 Stunden mit dem Antigen SEB ($1\mu\text{l}/\text{ml}$) stimuliert, gesunde Spender (HD) ($n= 21$), SLE-Patienten ($n= 21$), OAD ($n= 12$). Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3+, CD4+, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist der Median.

4.2.12 Durchflusszytometrische Analyse der IL-17-Frequenzen nach T-Zellstimulation mit viralen Antigenen CMV und Adenovirus

Nach Stimulation mit viralen Antigenen, wie Cytomegalievirus und Adenovirus 5 zeigte sich eine geringe IL -17-Sekretion bei SLE-Patienten. Bei gesunden Probanden konnten nach der Stimulation mit Adenovirus 5 erhöhte Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen in gesunden Probanden nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 4.20a) gezeigt, nach Stimulation mit Adenovirus, wurden signifikant ($p=0,0001$) höhere Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen in der Gruppe der gesunden Spender (Median: 0,07 Mittelwert: 0,08 SD: 0,07) im Vergleich zu den Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen der SLE-Patienten (Median: 0,01 Mittelwert: 0,25 SD: 0,05) nachgewiesen. Abbildung 4.20b) zeigt die Unterschiede der Frequenzen der zytokinproduzierenden Zellen nach Stimulation mit CMV. Es bestand kein signifikanter Unterschied in der Reaktion der IL-17 produzierenden Zellen, zwischen der Gruppe der SLE-Patienten (Median: 0 Mittelwert: 0,02 SD: 0,06) und der

gesunden Spender (Median: 0 Mittelwert: 0 SD: 0). Ebenso bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen der SLE-Patienten und der gesunden Spender.

a) Adenovirus

b) CMV

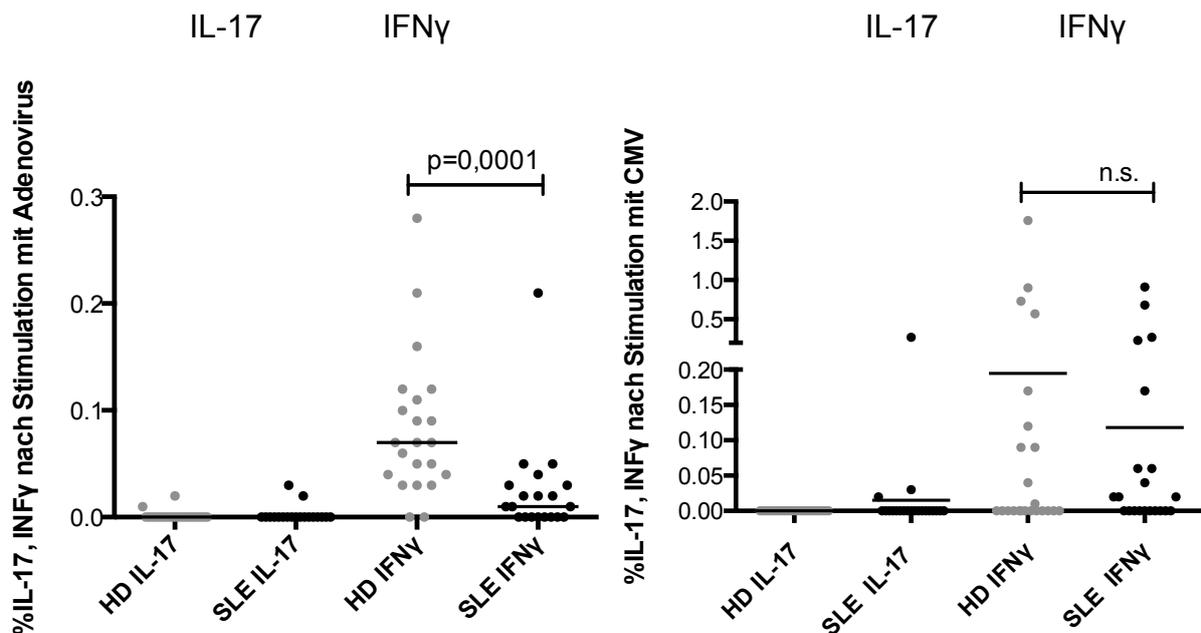


Abbildung 4.20 Vergleich der IL-17- und IFN γ -Frequenzen von SLE-Patienten (n= 19) und gesunden Spendern (HD) (n= 18) bezogen auf CD 40Ligand+ T-Zellen nach Stimulation mit viralen Antigenen

Vollblut wurde 6 Stunden mit dem Antigen Adenovirus 5 (20 μ l/ml) stimuliert in Abbildung 4.20a) und mit dem Antigen Cytomegalievirus (CMV 20 μ l/ml) in Abbildung 4.20 b) gezeigt ist der Vergleich der IL-17- und IFN γ -Frequenzen nach Stimulation von SLE-Patienten (n= 20) und gesunden Spendern (HD) (n= 17) bezogen auf CD40 Ligand+ T-Zellen. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3+, CD4+, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist der Median.

4.2.13 Keine Assoziation der IL-17-Frequenzen bzw. IL-17/ IFN γ Ratio der SLE-Patienten mit klinischen Parametern

Die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen der SLE-Patienten wiesen nach Analyse mittels Spearman-Test keinen Zusammenhang mit Aktivitätsmarkern wie SLEDAI ($p=0,28$, $r=-0,24$), C3-Komplement ($p=0,31$, $r=-0,23$) und der Immunsuppression ($p=0,97$, $r=0,008$) auf, siehe Abbildung 4.20. Ebenso zeigte sich kein Zusammenhang zwischen der IL-17/ IFN γ Ratio und klinischen Parametern wie SLEDAI ($p=0,48$, $r=-0,16$), C3-Komplement ($p=0,47$, $r=-0,16$) und Anti-dsDNA-Antikörpertiter ($p=0,11$, $r=-0,22$) (Daten ohne Abbildung). Eine signifikante negative Korrelation ergab sich bei der Analyse der IL-17-Frequenzen im Zusammenhang mit der Höhe des Anti-dsDNA-Antikörpertiters. Abbildung 4.21 zeigt die negative Korrelation der IL-17-Frequenzen aufgetragen auf der X-Achse, gegen den Antikörpertiter der Anti-dsDNA- Antikörper auf der Y-Achse.

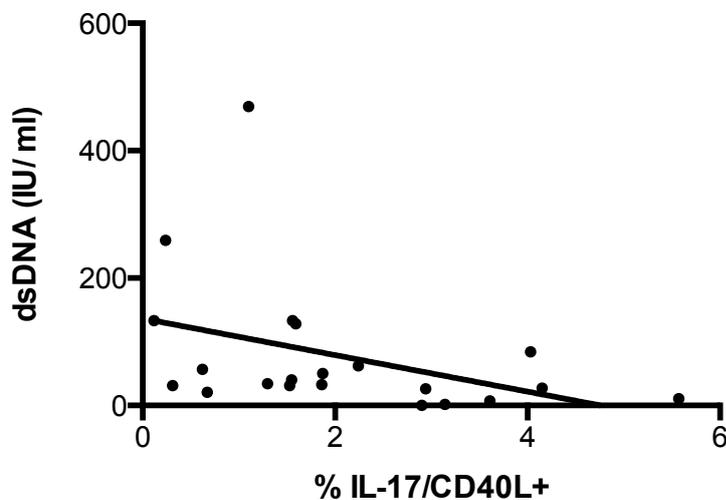


Abbildung 4.21: Darstellung der IL-17-Frequenzen bezogen auf CD40 Ligand+ T-Zellen in Korrelation zu der Höhe des Antikörpertiter der Anti-dsDNA-Antikörper ($n=21$ Paare) $p=0,016$, $r=-0,52$

Vollblut wurde 6 Stunden mit dem Antigen SEB ($1\mu\text{l}/\text{ml}$) stimuliert. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3, CD4, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Angewendet wurde der Spearman-Test.

4.2.14 Einfluss der Krankheitsaktivität auf die IL-17- / IFN γ -Sekretion

Nachfolgend ist graphisch dargestellt, wie sich die Krankheitsaktivität, gemessen am SLEDAI, zuerst auf die IL-17-Frequenzen bezogen auf alle T-Zellen (CD3+/CD4+), dann bezogen auf aktivierte T-Zellen (CD40 Ligand+) und außerdem bezogen auf die IL-17/ IFN γ Ratio auswirkt. Abbildung 4.22a) zeigt, dass es keinen Unterschied der IL-17-Frequenzen bezogen auf CD3+/CD4+ Zellen bei aktiver (Median: 0,17) und nicht aktiver bzw. gering aktiver Krankheitsaktivität gibt (Median: 0,21 bei SLEDAI \leq 6). Ebenso verhält es sich für die IL-17-Frequenzen bezogen auf aktivierte T-Zellen ($p=0,21$) (Abb. 4.22b). Der Median der Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen der nicht aktiven bzw. gering aktiven SLE-Patienten beträgt 1,87%, die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen der aktiven Patienten lag bei 1,33%, siehe Abbildung 4.22b). Die Ratio, gebildet aus den IL-17-Frequenzen und den IFN γ -Frequenzen der aktivierten T-Zellen, unterscheidet sich nicht, im aktiven Krankheitszustand (Median: 0,11) vom nicht aktiven Krankheitszustand (Median: 0,14).

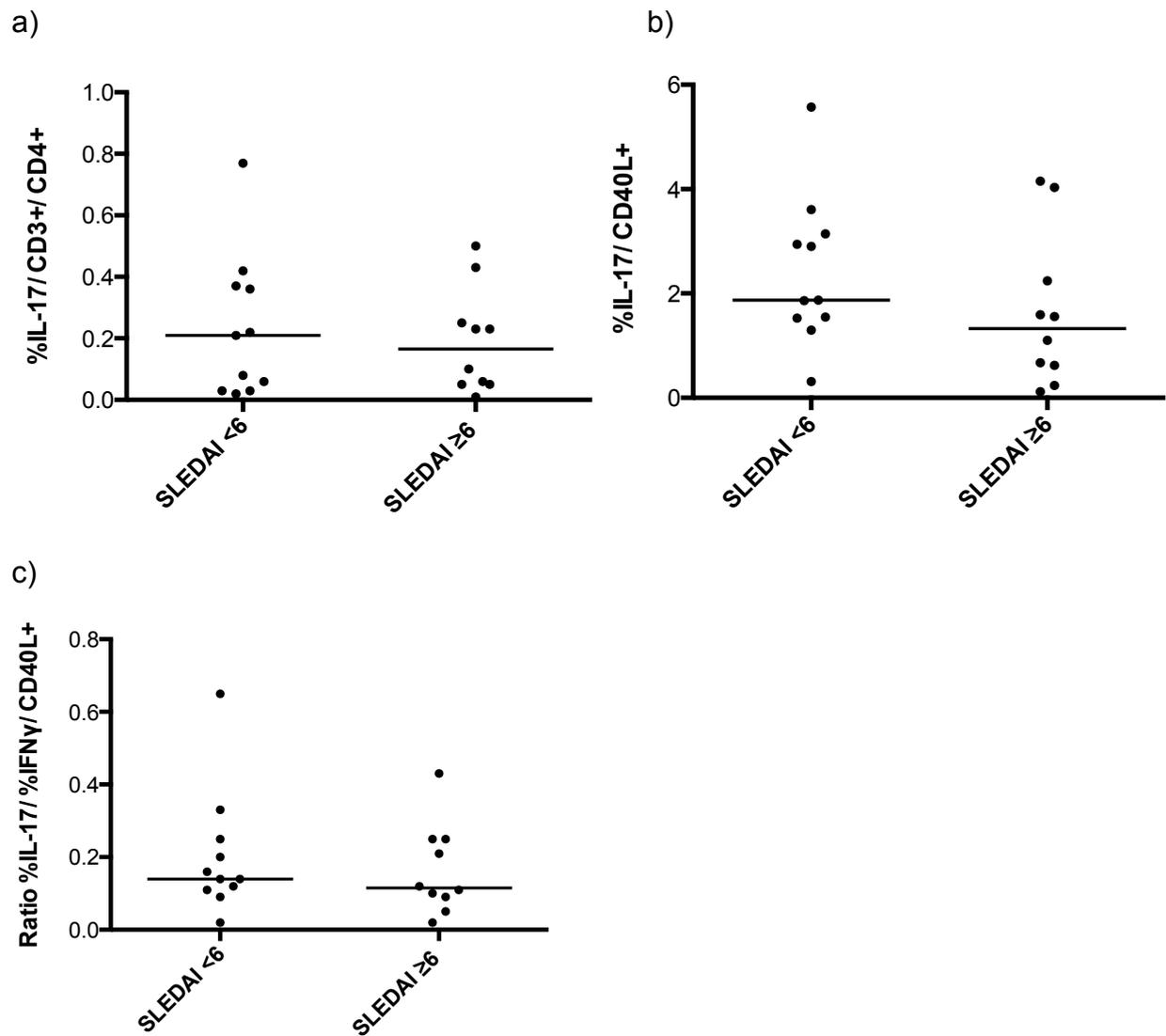


Abbildung 4.22: Darstellung des Einflusses des aktiven Krankheitsgeschehen auf a) die IL-17-Frequenzen bezogen auf alle CD3+/CD4+ Zellen und b) die IL-17-Frequenzen bezogen auf alle CD40 Ligand+/ CD3+/CD4+ Zellen und c) die IL-17/ IFN γ -Ratio

aktive SLE-Patienten (n=10), nicht aktive SLE-Patienten (n=11) Vollblut wurde 6 Stunden mit dem Antigen SEB (1 μ l/ml) stimuliert. Nach Erythrozytenlyse, Fixierung und Permeabilisierung der Zellen wurden auf der Oberfläche die Antigene CD3+, CD4+, CD40 Ligand gefärbt und intrazellulär die Zytokine IL-17, IFN γ . Angewendet wurde der Mann-Whitney-Test, angezeigt ist der Median.

4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Untersuchung der Seren ergab, dass die IL-17-Serumkonzentrationen der SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden in dieser Kohorte nicht erhöht waren, sie korrelierten nicht mit den Frequenzen der im peripheren Blut zirkulierenden Th17-Zellen oder der Krankheitsaktivität, gemessen mit Hilfe des SLEDAl. Es konnten keine Zusammenhänge mit anderen klinischen oder paraklinischen Daten festgestellt werden. Die Subgruppenanalyse der IL-17-Serumanalyse ergab einen signifikanten Unterschied zwischen den IL-17-Serumkonzentrationen der weiblichen SLE-Patienten und den gesunden Spenderinnen. Die IL-27-Serumanalyse ergab, dass gesunde Probanden die höchsten Serumkonzentrationen aufwiesen und die Serumkonzentrationen der SLE-Patienten signifikant niedriger waren, als die der gesunden Probanden. Die durchflusszytometrische Untersuchung des Vollbluts nach Kurzzeitstimulation mit verschiedenen Antigenen ergab, dass die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen der SLE-Patienten, nach Stimulation mit (SEB) sich nicht unterschieden von den Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen der gesunden Spender. Die Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) erreichten im Vergleich die höchsten Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen, die sich signifikant von denen der gesunden Spender unterschieden. Die Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen der gesunden Spender waren signifikant höher als die der SLE-Patienten. Ebenso ergab die Ratio, gebildet aus den Frequenzen der IL-17 und der IFN γ produzierenden Zellen, einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Spendern und SLE-Patienten.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle des IL-17 bei SLE

Der systemische Lupus erythematoses ist unter anderem durch eine gestörte T-Zellhomöostase gekennzeichnet [6]. Es wurde beschrieben, dass Patienten mit aktivem Krankheitsgeschehen sowohl erhöhte Frequenzen an zirkulierenden Th17-Zellen [22, 23, 25] als auch erhöhte IL-17-Serumkonzentrationen aufwiesen [23, 25]. In dieser Arbeit wurde auf Ebene der zytokinproduzierenden T-Zellen im Vollblut und der Zytokinkonzentrationen im Serum untersucht, ob Unterschiede im Th17-Profil und der IFN γ -Expressionen bei Patienten mit SLE im Vergleich zu gesunden Spendern oder anderen Autoimmunerkrankungen nachzuweisen waren. Es konnten keine Unterschiede zwischen SLE-Patienten und gesunden Spendern festgestellt werden, bezüglich der Frequenzen IL-17 produzierender T-Zellen und der IL-17-Serumkonzentrationen. Jedoch konnten signifikant niedrigere IFN γ -Expressionen in CD3+/CD4+-Zellen bei SLE-Patienten nachgewiesen werden. IFN γ gilt als das Markerzytokin der Th1-Differenzierung und ist ein proinflammatorisch wirkendes Zytokin [49]. In der Untersuchung von Niesner *et al.* [49] wurde gezeigt, dass eine Autoregulation der Th1-Zellen durch den Transkriptionsrepressor *twist1* stattfindet, indem die Expression von IFN γ , TNF α und IL-2 vermindert wird. Dieser fungiert als endogener Regulator. Bisher wurden im Mausmodell und bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn und Colitis Ulzerosa erhöhte *twist1*-Expressionen nachgewiesen, die auf wiederholte Stimulation der Th1-Zellen und eine Rolle der Th1-Zellen an der Pathogenese dieser Erkrankungen hindeuten. Die Expression von IFN γ vermindert die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th17-Zellen, so dass ein niedriger IFN γ - Spiegel eine Verschiebung zu Gunsten der Th17-Zellen bewirkt [9, 14]. In der vorliegenden Untersuchung konnte diese Verschiebung zu Gunsten der Th17-Zelluntergruppe bei SLE-Patienten nicht beobachtet werden. Es waren jedoch Unterschiede zwischen den SLE-Patienten in dieser Kohorte und den Gesunden, bezüglich der Th1-Zelluntergruppe zu erkennen. So scheint es, dass beim SLE

Mechanismen wirken, die zu einer Dysregulation zwischen Effektor- und regulierenden T-Zellen führen, so dass die Th1- bzw. T-reg- Zellfraktion vermindert vorkommen, jedoch nicht zwangsläufig einen Anstieg der Th17-Zellen zur Folge haben [50, 51]. Die Störung der Balance der T-Zellfraktionen Th1, T-reg und Th17 scheinen während des aktiven Krankheitsgeschehens eine Rolle in der Pathogenese des SLE zu spielen [52] und die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten ebenfalls verminderte Th1-Frequenzen bei SLE-Patienten und keine Veränderung der Th17-Frequenzen. In der Literatur weisen einige Studien daraufhin, dass bei SLE-Patienten IL-17 eine Rolle in der Progression des Krankheitsgeschehens spielt, so dass für SLE-Patientengruppen mit hohen IL-17-Serumkonzentrationen bzw. IL-17-Frequenzen eine Anti-IL-17-Therapie erfolgsversprechend sein kann [53]. In dieser Untersuchung konnten keine erhöhten IL-17-Serumkonzentrationen für SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern nachgewiesen werden, so dass die Aussicht auf therapeutische Erfolge in der IL-17-Therapie durch die vorliegende Studie nicht bestätigt werden können. Eine veränderte Ratio der Th1-Zellen zu Th17-Zellen von SLE-Patienten wurde ebenfalls bei anderen Autoren [22] nachgewiesen, hier wurden erhöhte Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen, aber unveränderte Th1-Frequenzen ermittelt. Andere Untersuchungen gingen auf das Verhältnis der T-reg-Zellen zu den Th17- Zellen bei SLE-Patienten ein, die T-reg/Th17 Ratio schien bei SLE-Patienten, besonders im aktiven Krankheitszustand, vermindert im Vergleich zu Gesunden [52, 54].

Der Einfluss der T- regulatorischen Zellen auf die Pathogenese des SLE wurde in dieser Arbeit nicht analysiert. Es wurde berichtet, dass auch diese CD4+CD25^{high}FOXP3+ T-Zellen Effektorzytokine wie IL-17 und IFN γ bilden können. Bemerkenswert dabei ist, dass die IL-17 produzierenden Zellen innerhalb der CD4+CD25^{high}FOXP3+ T-Zellen bei SLE-Patienten vermindert sind [6, 55]. Der genaue Einfluss ist nicht abschließend geklärt und ist nicht weiterer Bestandteil dieser Untersuchung gewesen.

5.1.1 IL-17 Serumspiegel sind bei SLE- Patienten erniedrigt

In dieser Untersuchung wurden 131 Seren von SLE-Patienten auf ihre IL-17 Serumkonzentrationen untersucht; die Serumkonzentrationen in unserer Kohorte waren niedriger als bei den gesunden Spendern. Die hier ermittelten IL-17-Konzentrationen weichen teils von zuvor publizierten Ergebnissen ab.

Tabelle 5.1 Studien zu IL-17

SLE systemischer Lupus erythematoses, pSLE pädiatrischer systemischer Lupus erythematoses, m. NB mit Nierenbeteiligung, o. NB ohne Nierenbeteiligung, HD gesunde Spender

Studie	Teilnehmer	Ergebnis IL-17-Konzentration	Methode
Wong <i>et al.</i> 2008 Clinical Immunology	40 SLE- Pat. mit Nierenbeteiligung (NB)	SLE m. NB 22,44 pg/ ml	IL-17 ELISA Plasma R&D Systems
	40 SLE- Pat. Ohne Nierenbeteiligung (NB)	SLE o. NB 25,14 pg/ ml	
	40 gesunde Spender (HD)	HD 6,55 pg/ ml	
Rana <i>et al.</i> 2012 Lupus	40 Pat. mit pädiatrischem SLE (pSLE)	pSLE 766,95 pg/ml	IL-17 ELISA Serum Diacclone
	20 gesunde Spender (HD)	HD 172,7 pg/ml	
Zhao <i>et al.</i> 2009 Mol Biol Rep	57 SLE- Pat. (SLE)	SLE 23,82 pg/ ml	IL-17 ELISA Serum R&D Systems
	30 gesunde Spender (HD)	HD 16,98 pg/ ml	
Chen <i>et al</i> 2012 Lupus	24 SLE- Pat. (SLE)	SLE 7,26 pg/ ml	IL-17 ELISA Serum eBioscience
	12 gesunde Spender (HD)	HD 0,82 pg/ ml	

Die Mediane der IL-17-Serum- bzw. Plasmakonzentrationen in den oben genannten Studien variieren allerdings auch untereinander. Im Vergleich zu den oben genannten Studien [23, 25, 44, 56] weichen die Ergebnisse der IL-17-Serumkonzentrationen dieser Kohorte um das mindestens 7-fache ab. Diese Diskrepanz könnte durch die unterschiedliche Krankheitsaktivität der Patienten in den Kohorten zustande gekommen sein, beziehungsweise der Größe und damit der Repräsentanz der untersuchten Gruppe an Patienten. Der Einfluss der Krankheitsaktivität auf die IL-17-Serumkonzentrationen ist in sofern schwierig zu bewerten, da die in den oben genannten Studien diesbezüglich nicht einheitlich sind.

In der Untersuchung von Chen *et al.* [44] wurden nur aktive Patienten (SLEDAI $16,4 \pm 3,9$) eingeschlossen, wodurch die im Vergleich zu den vorliegenden Messwerten erhöhten IL-17-Serumkonzentrationen bedingt sein könnten. Die Patienten in der hier untersuchten Kohorte wiesen im Vergleich dazu einen durchschnittlichen SLEDAI von 8 auf. Die Krankheitsaktivität scheint also Einfluss auf die IL-17-Serumkonzentrationen zu haben. Die untersuchten Seren der vorliegenden Studie waren sowohl von Patienten im aktiven und nichtaktiven bzw. geringaktiven Krankheitszustand. Obwohl die Unterschiede zwischen den publizierten Studien und unserer Untersuchung ggf. durch die unterschiedliche Krankheitsaktivität zu Stande gekommen sein könnte, zeigte sich innerhalb unserer Kohorte kein signifikanter Unterschied in den IL-17 Serumkonzentrationen von aktiven und nichtaktiven bzw. geringaktiven Patienten, die keine Korrelation zur Krankheitsaktivität aufwiesen. Auch konnten in den Studien von Chen *et al.* und Zhao *et al.* keine Korrelationen der IL-17-Serumkonzentrationen mit der Krankheitsaktivität bestätigt werden [25, 44]. Im Widerspruch dazu konnten Wong *et al.* [23] eine signifikante positive Korrelation der IL-17-Plasmakonzentrationen und des SLEDAIs nachweisen. Fraglich bleibt in wie weit bzw. in welcher Phase des aktiven Krankheitsgeschehens eine erhöhte IL-17-Serumkonzentration nachweisbar ist, da keine Informationen über die Krankheitsdauer vorhanden sind.

Rana *et al.* [56] wiesen sehr hohe Serumkonzentrationen bei ausschließlich sehr jungen Patienten nach, die positiv mit dem SLEDAI korrelierten. Anzunehmen ist, dass der teils sehr aggressive Krankheitsverlauf bei Kindern dafür verantwortlich ist, dass sehr hohe Serumkonzentrationen im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen nachzuweisen waren [57, 58], weiterhin auffällig sind auch die sehr hohen IL-17-Serumkonzentrationen der gesunden Kinder, wie es zu diesen hohen Konzentrationen kam,

bleibt unklar. In der hier vorliegenden Untersuchung wurden ausschließlich in Therapie befindliche Patienten analysiert. Es wurden keine Korrelationen der IL-17-Konzentrationen abhängig von der Art, Dauer oder Menge der verwendeten Immunsuppression nachgewiesen, dies stützt die Ergebnisse anderer Studien [6, 23]. In der Untersuchung von Chen *et al.* korrelierten die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen positiv mit dem SLEDAI, die IL-17-Serumkonzentrationen korrelierten nicht mit dem SLEDAI. Und auch bei Chen *et al.* zeigte sich keine Korrelation der Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen mit den IL-17 Serumkonzentrationen [44].

Die fehlenden Zusammenhänge zwischen Serumkonzentrationen und SLEDAI sowie Frequenzen und Serumkonzentrationen zeigen auch, dass diese Beobachtungen weiter geklärt werden müssen. Völlig unklar bleibt aktuell, inwieweit die Krankheitsaktivität mit den Serumkonzentrationen zusammenhängt.

Die Diskrepanz der gemessenen Serumkonzentrationen der oben aufgeführten Studien [25, 44, 56] zu der in dieser Studie untersuchten Kohorte, hängt vermutlich u.a. mit der abweichenden Krankheitsaktivität der Kohorte, den vorausgegangenen therapeutischen Maßnahmen und dem Alter der Patienten ab. Die Anzahl der untersuchten Proben der verschiedenen Untersuchungen variierte stark, in der vorliegenden Studie wurden 131 Seren von SLE-Patienten untersucht und stellt somit eine repräsentative und gut abgesicherte Untersuchung der IL-17-Serumkonzentrationen dar. Die Wahl des ELISA-Systems, beziehungsweise des Herstellers und Art der Lagerung des Probenmaterials können zusätzlich einen Einfluss auf die Ergebnisse bzw. Abweichungen zu anderen Studien haben. Auch hier wurden in den Studien unterschiedliche Messsysteme eingesetzt, die gegebenenfalls zu verschiedenen Normwerten führen.

5.1.2 Patientinnen, aber nicht männliche Patienten mit SLE zeigten erhöhte IL-17-Serumspiegel

Die Subgruppenanalyse der weiblichen Studienteilnehmer in dieser Kohorte ergab ein anderes Bild, als die Untersuchung der gesamten Gruppe der SLE-Patienten.

Die IL-17-Serumkonzentrationen der SLE-Patientinnen waren signifikant höher im Vergleich zu gesunden Spenderinnen.

79% der untersuchten SLE-Seren stammten von Patientinnen, wodurch die geschlechtsspezifische Häufung von ca. 80% weiblicher Patienten aller Erkrankten nachvollzogen wird. Die Gründe für die geschlechtsspezifische Prädilektion sind nicht abschließend geklärt, wobei der spezifische Einfluss von Sexualhormonen auf die SLE-Pathogenese wiederkehrend diskutiert und u.a. in klinischen Untersuchungen, Tiermodellen und *in vitro* untersucht wurde. Rider *et al.* [59] haben bei der *in vitro* Untersuchung von T-Zellen weiblicher SLE-Patienten herausgefunden, dass diese unter Einfluss von Östradiol (auch Estradiol oder E2) eine signifikant erhöhte Expression des Oberflächenmarkers CD40 Ligand ausbilden, im Vergleich zu den T-Zellen gesunder Spenderinnen. Weibliche Sexualhormone bewirken über bisher nicht bekannte Mechanismen eine erhöhte CD40 Ligand (CD40L)- Expression, die eine Hyperaktivität der entsprechenden T-Zellen bewirken kann [59]. CD40L gilt als Marker der Aktivität für CD4+- T-Zellen [60, 61].

Die höheren IL-17-Serumkonzentrationen bei SLE-Patientinnen könnten also Folge der erhöhten Aktivierungsbereitschaft der CD4+ T-Zellen sein, die in eine erhöhte IL-17-Produktion mündete.

Östradiol bindet über zwei Rezeptorsubtypen (ER α und ER β) an T-Zellen, die beide jeweils auf den T-Zellen von SLE-Patientinnen und gesunden Spenderinnen vorkommen, wobei ER α in geringerem Maße bei SLE-Patientinnen vorkommt. Nur bei SLE-Patientinnen führt der Einfluss des Östradiols zu CD40L-Expression und Calcineurinbildung [62]. Andere Untersuchungen zeigten weiterhin, dass die intrazelluläre Expression der Rezeptorsubtypen (ER α und ER β) in T-, B- und NK-Zellen nachzuweisen sind. Die Wirkung des Östradiols ist abhängig von der Konzentration, dem Zeitpunkt der Administration und dem Zelltyp. Es kann somit sowohl

proinflammatorisch als auch antiinflammatorisch wirken. Bisher konnte bei Menschen keine direkte Auswirkung auf Th17-Zellen nachgewiesen werden und die Ergebnisse aus Mausmodellen waren widersprüchlich [63].

Der Zeitpunkt zu dem die Erkrankung eintritt, scheint bei Frauen auf einen Einfluss der Sexualhormone hinzudeuten. Das Risiko vor der Pubertät den Ausbruch der Erkrankung zu Erleiden liegt für Frauen im Verhältnis zu Männern bei 3:1, diese Ratio steigt während des gebärfähigen Alters auf 10:1 an und sinkt nach der Menopause wieder auf 8:1 ab [64].

Sexualhormone haben Einfluss auf das angeborene und adaptive Immunsystem und die Anzahl der B- und T-Lymphozyten, Antigenpräsentation und Zytokinproduktion [65]. So ist anzunehmen, dass bei SLE-Patientinnen entweder ein höherer Östrogen-Spiegel nachzuweisen wäre, als bei gesunden Spenderinnen, oder aber der gleiche Östrogen-Spiegel, die bei SLE entscheidend veränderten B- und T-Zellen stärker in Richtung einer proinflammatorischen Zytokinantwort moduliert. In der Untersuchung von Jacobi *et al.* [66] konnten erhöhte Prolaktinspiegel bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Die Prolaktinfreisetzung wird u.a. durch Östrogen gesteuert. Nach *in vitro* Stimulation von PBMCs von SLE-Patienten wirkt sich die Zugabe von Prolaktin positiv auf die Immunglobulinfreisetzung aus. So dass ein Zusammenspiel der Sexualhormone und anderer Stimuli auf die Krankheitsaktivität bei humanem SLE vermutet werden, jedoch noch nicht abschließend geklärt sind.

Im Mausmodell verstärken sich die autoimmunen Symptome bei Gabe von Östrogen wohingegen die Zugabe von Androgenen den Krankheitsverlauf mildern konnte [67]. Weiterhin war auffällig, dass 69% der untersuchten SLE-Patientinnen ein aktives Krankheitsgeschehen aufwiesen, im Gegensatz zu 50% der männlichen SLE-Patienten mit aktivem Krankheitsgeschehen und 65% Aktiven bei allen SLE-Patienten. Die Frage, ob die höheren IL-17-Serumkonzentrationen geschlechtsspezifisch, durch die Wirkung des Östradiols oder vom aktiven Krankheitsgeschehen abhängig waren, bleibt weiterhin zu klären.

5.1.3 Inhibiert Interleukin-27 die IL-17-Expression bei Patienten mit SLE und gesunden Probanden?

Im Zusammenhang mit der Entdeckung der pleiotropen Rolle des IL-27, das Einfluss auf die Th1 und Th17-Differenzierung nimmt, wurde vermutet, dass auch das Zytokin IL-27 eine Rolle im Pathomechanismus des SLE spielt. Zum einen übt IL-27 einen inhibitorischen Einfluss auf die Differenzierung von naiven Th-Zellen zu Th17-Zellen aus [27], [68, 69] und zum anderen fördert es die Th1-Zelldifferenzierung [30].

In der hier vorliegenden Untersuchung wurden niedrigere IL-27-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten als bei gesunden Probanden nachgewiesen. Es konnte keine Korrelation zum Krankheitsaktivitätsindex SLEDAI in der untersuchten Kohorte nachgewiesen werden. Weiterhin konnten keine Unterschiede bezüglich der immunsuppressiven Therapie und der IL-27-Serumkonzentrationen gefunden werden. Bei SLE-Patienten mit Nephritis Klasse IV jedoch fanden sich signifikant höhere IL-27-Serumkonzentrationen als bei SLE-Patienten ohne Nierenbeteiligung oder anderen histologischen Typen der Nephritis. Eine weitere aktuelle Studie wies nach, dass SLE-Patienten höhere IL-27-Expressionen im Urin aufweisen, als gesunde Probanden und diese invers mit dem SLEDAI korrelierten [70].

Weiterhin zeigte eine Microarray-Untersuchung der glomerulären Genexpression bei MRL/lpr-Mäusen, einem Lupus-Mausmodell, einen hohen Spiegel an Epstein-Barr-Virus induziertes Gen 3 (Ebi3), einer Untereinheit des IL-27 [71]. Ähnliche Ergebnisse zeigte eine Studie von Li *et al.* [72] dort wurden, wie in unserer Kohorte, die IL-27-Serumkonzentrationen von SLE-Patienten und gesunden Probanden untersucht und signifikant niedrigere IL-27-Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden gefunden. Im Gegensatz zu den Ergebnissen der hier vorliegenden Untersuchung ergab eine Subgruppenanalyse durch Li *et al.*, dass die SLE-Patienten mit Lupusnephritis signifikant niedrigere IL-27-Serumkonzentrationen aufwiesen als SLE-Patienten ohne Lupusnephritis.

Im Unterschied zu unseren Daten wurden in der Untersuchung von Li *et al.* ausschließlich unbehandelte SLE-Patienten untersucht.

Gründe für die abweichenden Beobachtungen könnten im verschiedenen Probenmaterial und Nachweismethodik liegen. Es scheint also eine Assoziation in der Bildung oder der Verarbeitung des IL-27 in Nieren und Urin zu geben, dies bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Ursache für die hier nachgewiesenen erhöhten IL-27- Serumkonzentrationen bei SLE-Patienten mit Lupusnephritis könnte sein, dass IL-27 in der Niere produziert wird. Bei Patienten mit Nierenbeteiligung könnte das Vorhandensein proinflammatorisch wirkender Zellen im entzündeten Gewebe eine endogene Regulation mittels erhöhter IL-27 Produktion zur Folge haben. Dafür würde auch die erhöhten IL-27-Urinkonzentrationen bei Kwan *et al.* [70] sprechen, die vermutlich früher im Urin als im Serum ansteigen würden.

Die IL-27 produzierenden Zellen müssten demnach einen IL-17-Rezeptor aufweisen, um auf den Anstieg reagieren zu können. Die bekannten IL-27 Produzenten wie Makrophagen und dendritische Zellen tragen den ubiquitär vorkommenden IL-17-Rezeptor ebenfalls [73]. Die Mechanismen der Wirkung des IL-27 über den IL-27-Rezeptor (WSX-1 oder TCCR), der ubiquitär auf T-Zellen, B-Zellen, Natürlichen Killer- Zellen, dendritischen Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Mastzellen vorkommt, und somit eine erhöhte IL-27 Expression induzieren könnte, sind noch nicht abschließend geklärt [33]. Obwohl in der hier vorliegenden Untersuchung keine erhöhten IL-17 Serumkonzentrationen bei Patienten mit Lupusnephritis nachgewiesen werden konnten, fanden Crispin *et al.* [19] IL-17+ und CD3+/CD4-/CD8- Zellen in Nierenbiopsien von SLE- Patienten, die zeigten, dass sich IL-17 produzierende Zellen in chronisch durch Autoimmunprozesse entzündetem Geweben befinden und vermutlich zur Aufrechterhaltung der Entzündung beitragen. Ob IL-27 als Gegenspieler der Th17- Zellproliferation ein potentiell Ziel für die Therapie Th17 zellvermittelter Erkrankungen darstellt [74], bleibt zu klären. Auf Grundlage der hier ermittelten Daten scheint eine IL-27-Therapie sinnvoll. Die hier untersuchten SLE-Patienten weisen eine verminderte Konzentration an IL-27 auf. Ob es dazu kommt, weil entweder weniger IL-27 gebildet wurde, oder mehr IL-27 verbraucht wurde, ist bisher unklar. Eine Substitution auf eine normale Serumkonzentration könnte als Therapieansatz erwogen werden.

5.1.4 Zeigen SLE-Patienten und Gesunde eine ähnliche Th17/ Th1 Balance?

Die Relation der Th17-Zellen zu Th1-Zellen bei SLE-Patienten und Gesunden wurde untersucht, weil vermutet wird, dass das Ungleichgewicht der T-Helferzell-Untergruppen eine Rolle in der Exazerbation des Krankheitsgeschehens spielt. Die Untersuchung der T-Helferzell-Untergruppen bezüglich der Expression der Zytokine IL-17 und IFN γ ergab, dass die Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen bei SLE Patienten gegenüber gesunden Kontrollpersonen signifikant vermindert waren. Anhand dieser beiden T-Helferzell-Untergruppen wurde eine Ratio der ermittelten Zytokin-frequenzen gebildet. Die Th17-Zellen wurden hier definiert durch die ermittelten IL-17-Frequenzen bezogen auf Zellen mit den Oberflächenmarkern CD3 $^{+}$,CD4 $^{+}$ und CD40Ligand $^{+}$ und Th1-Zellen wurden definiert an Hand der IFN γ produzierenden T-Zellen mit den selbigen Oberflächenmarkern.

In dieser Kohorte ergab sich eine signifikant höhere, um das 3-fache erhöhte Th17/ Th1 Ratio bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern. Dies stimmt mit bereits publizierten Daten von Hagiwara, Shah und Dolff *et al.* überein, die eine ähnliche Verminderung der Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen bei Patienten mit SLE fanden [6, 22, 43]. Daraus lässt sich ableiten, dass das Differenzierungspotential für Th1-Zellen aus T-Zellen bei SLE-Patienten vermindert ist, gegebenenfalls zu Gunsten einer relativ höheren Th17-Zelldifferenzierungsrate.

Im Widerspruch zu den hier erbrachten Ergebnissen ergab die Untersuchung von Shah *et al.* [22], dass die Frequenzen der IL-17 produzierenden T-Zellen der SLE-Patienten signifikant höher waren, als die der Gesunden, während bei den Frequenzen der IFN γ produzierenden T-Zellen keine Unterschiede festzustellen waren. Shah *et al.* wendeten zur T-Zellstimulation PMA/ Ionomycin an, welches unspezifischere Zytokinantworten zur Folge hat, als das in der vorliegenden Untersuchung verwendete SEB. Dies könnte die höheren Frequenzen an IL-17 produzierenden Zellen bei SLE-Patienten erklären. Diese relative Verschiebung der T-Zellbalance in Richtung der IL-17 produzierenden Zellen könnte zur Pathogenese des SLE beitragen. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass bei BXD $_2$ - Mäusen in der Milz neue Keimzentren gebildet wurden, in denen IL-17 $^{+}$ T-Zellen auf IL-17Rezeptor $^{+}$ (IL-17R) B-Zellen treffen und diese dann Autoantikörper gegen

ds-DNA und Histone bildeten, die bei IL-17R- BXD₂- Mäusen ausblieb [75]. Daraus kann man ableiten, dass auch beim humanen SLE ein Zusammenhang zwischen IL-17 produzierenden Zellen und der Produktion von Autoantikörpern bestehen könnte. Weiterhin finden sich sowohl in den Nierengeweben von SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung, als auch in anderen Zielorganen des Lupus im Mausmodell IL-17 produzierende T-Zellen, die bei der Verstärkung und dem Fortbestehen der Immunantwort eine Rolle spielen. Zur Stützung der Annahme, dass IL-17 Einfluss auf B-Zellen in Form von Autoantikörperbildung hat, zeigten Dong *et al.*, dass es zu einem Anstieg des totalen IgG, Anti-dsDNA, IgG und IL-6 durch PBMCs von SLE-Patienten kommt, wenn man diese mit IL-17 inkubiert [76]. Die verminderten Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen bei SLE-Patienten und die Verschiebung der T-Zelldifferenzierungskapazität zugunsten IL-17 produzierender Zellen wurde ebenfalls in Proben von glomerulären und interstitiellen Nierengewebe von SLE-Patienten beschrieben [77]. Die relativ erhöhte Frequenz von Th17-Zellen nach SEB-Stimulation kann ein Hinweis darauf sein, dass solche Zellen häufiger als bei Gesunden in die verstärkte Differenzierung von B-Lymphozyten zu Plasmablasten involviert sind [21] und somit zur Verschiebung des Zytokinmilieus bei SLE-Patienten beitragen. Dies fördert die Antikörperproduktion durch B-Zellen und trägt somit zum Fortschreiten der entzündungsbedingten Schädigungen bei.

5.1.5 Welcher Stimulus beeinflusst die Th1/Th17-Balance bei SLE-Patienten?

In der vorliegenden Untersuchung wurde die Durchflusszytometrie angewendet, um nach polyklonaler und antigenspezifischer Stimulation von Vollblutproben die Frequenzen der IL-17 und IFN γ produzierenden T-Zellen bei Patienten im Vergleich zu Gesunden nachzuweisen. Mittels Mehrfachfärbung im selben Ansatz konnten auch T-Zellen identifiziert werden, die beide Zytokine produzierten. In der vorliegenden Untersuchung wurden CD4⁺ Zellen monoklonal mit anti-human-CD28 und weiterhin mit verschiedenen viralen (CMV, EBV und Adenovirus) und bakteriellen Antigenen (SEB) stimuliert, um die Frequenzen der Zytokine Interleukin-17 und IFN γ mittels Durchflusszytometrie nachzuweisen. Es wurden keine Unterschiede in den Frequenzen

der IL-17 produzierenden Zellen zwischen den Gruppen der SLE-Patienten, der gesunden Kontrollpersonen und der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen festgestellt. Die Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen waren bei gesunden Spendern nach Stimulation mit SEB signifikant höher als bei SLE-Patienten. Die vorliegenden Ergebnisse stützen die Untersuchungen anderer Autoren [6, 54]. Kleczynska *et al.* konnten ebenfalls keine Unterschiede zwischen den Frequenzen der IL-17 produzierenden T-Zellen zwischen SLE-Patienten und gesunden Probanden nachweisen. Die Studie von Dolff *et al.* zeigte, ebenso wie unsere Daten, dass sich die Frequenzen der IL-17 produzierenden T-Zellen bei SLE-Patienten und gesunden Probanden nicht unterscheiden. Die Frequenzen der IFN γ produzierenden Zellen waren allerdings bei SLE-Patienten signifikant niedriger als bei gesunden Probanden. Um eine T-Zellantwort zu induzieren, wird zumeist ein stark stimulierendes polyklonales Antigen wie SEB oder PMA/ Ionomycin gewählt. Die hier verwendeten viralen Stimuli wirkten diesbezüglich deutlich schwächer. Die in unserer Studie angewendeten viralen Stimuli lösten keine erhöhten antigenspezifischen Immunantworten in Form von Zytokinexpressionen bei SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern aus. Bei gesunden Spendern konnten Reaktionen nach Stimulation mit Adenoviren in Form von erhöhten IFN γ -Frequenzen im Vergleich zur unstimulierten Probe nachgewiesen werden.

Gründe dafür könnten sein, dass die Dauer der Stimulation mit 6h nicht lang genug für eine Zytokinreaktion war und die Spiegel der nachzuweisenden Zytokine sehr niedrig sind. Das in dieser Untersuchung verwendete SEB zeigt üblicherweise im Vergleich eine schwächere Zytokinantwort als die Stimulation mit PMA/ Ionomycin, welches in mehreren Studien [44, 50] verwendet wurde, die signifikant höhere Frequenzen der IL-17 produzierenden T-Zellen im Blut von SLE-Patienten im Vergleich zu gesunden Spendern nachweisen konnten. Die Stimulation mit SEB führt zu einer restrikten T-Zellrezeptor (TCR)-Aktivierung, indem es zu einer Quervernetzung der TCR-Moleküle auf der Oberfläche von CD4 $^+$ und CD8 $^+$ T-Zellen kommt [78]. Die Aktivierung mit PMA/ Ionomycin hat eine Aktivierung der T-Zellen unabhängig ihrer Antigenpezifität zur Folge. Diese unspezifische Aktivierung der intrazellulären Signalkette führt zu einer scheinbar stärkeren, jedoch auch unspezifischeren Zytokinproduktion. Die *ex vivo* Stimulation wurde in Vollblut durchgeführt, um möglichst physiologische Stimulationsbedingungen zu gewährleisten. Zudem waren fast alle der untersuchten

SLE-Proben lymphopen, so dass durch die Analyse von Vollblut weitere Zellverlusten vermieden wurden. Die Stimulationsdauer lag im Rahmen der erprobten 6-8h mit Zugabe des Brefeldin A nach 2 h Stimulationsdauer [45, 61, 79], so dass das Risiko von Abweichungen, die durch unterschiedliche Proliferationsraten entstehen könnten, vermindert wurde, im Gegensatz zu längerdauernden Stimulationen [79]. In einer anderen Studie wurden in der Untersuchung unstimulierter humaner SLE-T-Zellen ebenfalls spontane IL-17 Produktionen nachgewiesen [19], wie sie auch in der hier untersuchten Kohorte auftraten. In weiteren Studien wurden in Biopsien von Nierengewebe von SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung IL-17 produzierende CD3+/CD4-/CD8- Zellen identifiziert. Diese kommen auch im peripheren Blut von Gesunden und SLE-Patienten vor, wurden jedoch bei SLE-Patienten als erhöht nachgewiesen [19, 33]. Drei von 31 SLE-Patienten dieser Kohorte wiesen spontane IL-17-Expression in unstimulierten Proben auf. Bei zwei der drei SLE-Patienten mit der spontanen IL-17-Sekretion, lag ein aktives Krankheitsgeschehen vor (mittlerer SLEDAI= 9,5 SD: 0,5). Weiterhin auffällig war ein sehr hoher Serumspiegel für ds-DNA-Antikörper bei einem der drei SLE-Patienten (SLE 13). Die Beschränkung der untersuchten Zellen auf CD3+/CD4+ schließt IL-17 produzierende CD3+/CD4-/CD8- T-Zellen als IL-17 produzierende Zellen in der hier vorliegenden Untersuchung aus. Ursächlich könnte eine T-Zellantwort, auch durch die bei Nalbandian und Tsokos nachgewiesenen CD3+/CD4-/CD8- T-Zellen *in vivo* sein, die einen Anstieg der IL-17-Frequenzen im peripheren Blut zur Folge hatte. Weiterhin ist die Auswahl des Probenmaterials in Bezug auf die Lokalisation der IL-17 produzierenden Zellen zu berücksichtigen. Die Untersuchung des peripheren Blutes bei einer systemischen Erkrankung wie SLE, erlaubt einen Überblick auf Veränderungen der zirkulierenden Zellen. Eine Einschränkung für die Repräsentanz der Untersuchung des peripheren Blutes bleibt, dass die Aktivierung der T-Zellen vermutlich in den entzündlich veränderten Geweben stattfindet und nur die Minderheit der entsprechenden Lymphozyten im peripheren Blut zirkuliert. T-Zellen aus den entzündungsbedingt veränderten Geweben, beispielsweise der Nieren oder der Milz von SLE-Patienten scheinen eine höhere Aktivierungsbereitschaft zu haben [33], so dass sowohl das Zytokinprofil der Zellen des peripheren Blutes als auch zusätzlich gewebeinfiltrierende Zellen in Zielorganen des SLE analysiert werden müssten, um ein wirklich repräsentatives Bild zu bekommen. Die Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen in dieser Kohorte unterschieden sich nicht

zwischen SLE-Patienten und gesunden Spendern und eine IL-17-Blockade scheint damit an Hand dieser Daten nicht vielversprechend als potentielles Therapietarget bei SLE-Patienten. Abweichende Ergebnisse erzielte Chen *et al.*, jedoch umfasste die untersuchte Patientengruppe ausschließlich hoch aktive Patienten (SLEDAI >16), so dass gegebenenfalls die hohe Krankheitsaktivität zu höheren *in vitro* generierbaren Th17-Frequenzen führte [44]. Einhergehend mit den oben aufgeführten Ergebnissen der Serumanalyse konnten in der vorliegenden Untersuchung auch auf Einzelzellebene keine Unterschiede der Th17-Zell-Frequenzen im peripheren Blut zwischen den Gruppen festgestellt werden.

5.1.6 Haben die Veränderungen bei den T-Zellen einen Einfluss auf die Autoantikörperproduktion?

Systemischer Lupus erythematoses ist der Prototyp einer systemischen Autoimmunerkrankung, die durch hohe Entzündungsaktivität und ein hyperaktives Immunsystem gekennzeichnet ist und deren Etiologie nicht abschließend geklärt ist.

Die Interaktionen autoreaktiver T- und B-Zellen führen zur Bildung von Autoantikörpern, wobei CD4+ T-Zellen mittels Zytokinen und anderer co-stimulierender Signale die B-zellabhängige Produktion von Autoantikörpern fördern. Dieses Syndrom aus vielfachen genetischen und molekularen Veränderungen [42], beinhaltet eine polyklonale B-Zellhyperaktivität. Ob diese Hyperaktivität durch intrinsische Faktoren bedingt ist, oder das Fehlen von immunregulatorischen Faktoren ursächlich ist, oder die Veränderung als sekundärer Effekt einer hyperaktiven, entzündlich veränderten Umgebung zu Stande kommen, ist bisher unklar [42]. Auch kann die veränderte Zytokinsekretion anderer Zellen des Immunsystems zu der Bildung von Autoantikörpern durch B-Zellen führen. Im Gegensatz zu Gesunden ist die Regulation der B-Zellreifung und Differenzierung verändert, die Mechanismen der Immuntoleranz, die im gesunden Immunsystem die Bildung von autoreaktiven B-Zellen verhindern, sind beschädigt [42]. T-Zellen, die die Immunantwort der B-Zellen regulieren, spielen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie des SLE. Durch sie wird die Bildung der Autoantikörper gesteuert und sie sind in der Lage die bei SLE betroffenen Gewebe zu infiltrieren [19]. Es konnte

nachgewiesen werden, dass B-Zellen von SLE-Patienten eine erhöhte Anti-ds-DNA-Antikörper Produktion aufweisen, wenn sie mit IL-17 kultiviert wurden [35]. Eine weitere aktuelle Studie beschreibt, dass IL-17 alleine oder in Kombination mit BAFF (B-cell activating factor) die Überlebensrate und die Proliferation von B-Zellen und ihre Differenzierung zu Antikörper-produzierenden Zellen fördert [21]. Diese Beobachtung eröffnet einen neuen Einblick in die pathogene Rolle des IL-17 bei SLE, denn die veränderte B-Zellaktivität ist ebenfalls Voraussetzung für entzündungsbedingte Gewebeschädigungen. Der pathogene Mechanismus zwischen scheinbar stimulationsmüden T-Zellen und hyperaktiven B-Zellen bei SLE-Patienten ist bisher nicht abschließend geklärt [80]. Die niedrigeren Frequenzen der IL-17 produzierenden Zellen bei SLE-Patienten in dieser Kohorte hat ggf. den Grund, dass die *ex vivo* stimulierten T-Zellen weniger sensitiv bzw. produktiv auf die Stimulation reagiert haben, als die T-Zellen der gesunden Spender.

5.1.7 Macht eine therapeutische Anwendung eines Anti-human-IL-17-Antikörpers Sinn?

Das Zytokin IL-17 scheint in der Pathogenese des SLE eine wichtige Rolle zu spielen, insbesondere bei aktivem Krankheitsgeschehen und im Zusammenhang mit Nierenbeteiligung im Krankheitsbild des SLE. Der Therapieansatz, mittels Infusion eines Anti-IL-17-Antikörpers die Aktivität dieses proinflammatorischen Zytokins einzuschränken, kann nach den Ergebnissen in der hier vorliegenden Studie als nicht uneingeschränkt sinnvoll erachtet werden, da in der Untersuchung des Serums und des peripheren Blutes keine Unterschiede festgestellt werden konnten. Crispin *et al.* fanden jedoch CD3+/CD4-/CD8- T-Zellen und IL-17 produzierende CD4+ T-Zellen in T-Zellinfiltraten des Nierengewebes von SLE-Patienten mit Nierenbeteiligung. Dies macht sie verdächtig, als Effektorzellen an der Gewebeschädigung entscheidend beteiligt zu sein. SLE-Patienten ohne erhöhte IL-17-Serumkonzentrationen sind entsprechend nicht gleich geschützt vor IL-17 induzierter Gewebeschädigung beispielsweise des Nierengewebes.

Bisher wurden Phase I- und Phase II- Studien zur therapeutischen Anwendung von Anti-IL-17-Antikörpertherapie durchgeführt, um die Auswirkungen auf das Krankheitsbild der chronischen mittleren bis schweren Psoriasis und den Verlauf der rheumatoiden Arthritis zu untersuchen. Die verwendeten Antikörper Ixekizumab (humaner Anti-IL-17-monoklonaler Antikörper) und monoklonalen Anti-IL-17-Antikörpers (LY2439821) wurden Patienten mit chronischer mittlerer bis schwerer Psoriasis und Patienten mit rheumatoider Arthritis verabreicht [81-83]. Es konnten signifikante Verbesserungen der Krankheitsaktivität in der mit Anti-IL-17-Antikörper behandelten Patientengruppe festgestellt werden, im Vergleich zu der mit Placebo-behandelten Patientengruppe. Die Verbesserungen waren dosisabhängig und es wurden keine lebensbedrohlichen, beziehungsweise nachhaltig beeinträchtigenden Nebenwirkungen festgestellt. Die Anwendung eines Anti-IL-17-Antikörpers in der SLE-Therapie verspricht eine selektivere Hemmung IL-17-vermittelter Immunreaktionen, im Vergleich zu aktuell angewendeten Therapieformen mit Glukokortikoiden oder nicht-biologischen Therapieformen. Um genauere Aussagen über die Sicherheit und Tolerabilität von therapeutischen Anti-IL-17-Antikörper zu machen, müssten weitere Studien über einen längeren Zeitraum durchgeführt werden.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit zwar von Gesunden abweichende Th17/Th1 Ratios festgestellt, wobei die absolute Anzahl induzierbarer Th17-Zellen sowie Serumkonzentrationen von IL-17 unverändert waren. Bei weiblichen Patienten konnten erhöhte IL-17-Serumkonzentrationen festgestellt werden im Vergleich zu gesunden Spenderinnen. Die Gegenüberstellung mit ähnlichen Studien ergab Abweichungen größeren Umfangs hinsichtlich der IL-17-Konzentrationsmessungen im Serum, die eventuell durch Unterschiede in den Kohorten erklärbar sind (Alter, Krankheitsaktivität), währenddessen die Daten zum Verhältnis Th17/Th1 in der Größenordnung der bereits publizierten Daten liegen.

Dies belegt zum einen die Notwendigkeit der Standardisierung von Immunassays, insbesondere funktioneller T-Zellassays um die Vergleichbarkeit solcher Studien zukünftig zu gewährleisten. Zum anderen kann es als Hinweis für die Heterogenität der Erkrankung und ihrer Pathomechanismen hinsichtlich Alter, Ethnizität usw. der untersuchten Patientenkollektive gelten. Unter Berücksichtigung der in der Entwicklung befindlichen Anti-IL-17-Therapie bedeutet dies, dass unter Berücksichtigung der bereits

publizierten Daten die Therapie wohl für einen großen Teil der Patienten eine sinnvolle Intervention darstellen könnte. In unserer Kohorte gab es für einen Großteil der Patienten keinen deutlichen Anhaltspunkt für dysregulierte IL-17-Produktion. Es bleibt vorerst offen, ob eine solche Therapie eventuell auch bei diesen Patienten wirken könnte. In der hier vorliegenden Studie wurden lediglich Blutzellen und Serum untersucht, die nicht notwendigerweise die Immunprozesse in den sekundären lymphatischen Organen oder in situ Lymphozytenaktivierung in den entzündeten Geweben widerspiegeln müssen. Nichtsdestotrotz zeigen die vorliegenden Daten eine Rolle der untersuchten Zellpopulationen beim SLE und bieten Hinweise für neue therapeutische Ansätze.

6 Literaturverzeichnis

1. Lüllmann-Rauch R, Taschenlehrbuch Histologie. 2003.
2. Burmester G-R, Ulrichs T, Pezzutto A, Taschenatlas der Immunologie. 2006.
3. Borghans JA, N.A., De Boer RJ, How Specific Should Immunological Memory Be? *The Journal of Immunology.*, 1999. Nr. 163: p. S. 569-575
4. Perry D, Ammon B Peck, Wndy C. Caramo, Laurence Morel and Cuong Q. Nguyen, The Current Concept of TH17 Cells and Their Expanding Role in Systemic Lupus Erythematosus. Hindawi Publishing Corporation Arthritis Volume 2011, Article ID 810649, 10 pages, 2010. Volume 2011.
5. Holländer GA, Immunologie, Grundlagen für Klinik und Praxis. 1. Auflage. Elsevier, München 2006.
6. Dolf SMB, Huitema M, Limburg P, Kallenberg C, Abdulahad W, Disturbed Th1, Th2, Th17 and Treg balance in patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Immunology*, 2011. 141: p. 197-204.
7. Sakaguchi S, Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol*, 2005. 6(4): p. 345-52.
8. Yang J, Chu Y, Yang X, Gao D, Zhu L, Yang X, Wan L, Li M Th17 and natural Treg cell population dynamics in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum*, 2009. 60(5): p. 1472-1483.
9. Harrington LE, H.R., Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. and Source, Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol*. 2005 Nov;6(11):1123-32. Epub 2005 Oct 2., 2005.
10. Langrish CL, C.Y., Blumenschein WM, et al. , IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 2005. 201(2): p. 233- 240.
11. Cua DJ, S.J., Chen Y, Blumenschein WM, et al., Interleukin-23 rather than Interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain *Nature*, 2003. 421: p. 744- 748.
12. Bettelli E, C.Y.G.W., Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006. 441(7090): p. 235-8.
13. Stockinger B, Veldhoen M, Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; 19:281–286, 2007. 19:281–286; 19:281–286.
14. Veldhoen M, R.J.H., 1, R.M.L. Christopher J. Atkins, 3, and and Brigitta Stockinger1, TGFb in the Context of an Inflammatory Cytokine Milieu Supports

- De Novo Differentiation of IL-17-Producing T Cells. *Immunity* 24, 179–189, February 2006 ©2006 Elsevier Inc., 2006.
15. Manel N, Derya Unutmaz, and Dan R Littman, The differentiation of human TH-17 cells requires transforming growth factor- β and induction of the nuclear receptor ROR γ T. *Nat Immunol.* 2008 June; 9(6): 641–649. Published online 2008 May 4. doi: 10.1038/ni.1610, 2008.
 16. Okamoto K, Y.I., Masatsugu OH, Masahiro Yamamoto, Tomohiro Morio, Kazuhiro Aoki, Keiichi Ohya, Anton M. Jetten, Shizuo Akira, Tatsushi Muta, Hiroshi Takayanagi, IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* (impact factor: 34.48). 04/2010; DOI: 10.1038/nature08922, 2010.
 17. Zhang F, M.G., Strober W, Interactions among the transcription factors Runx1, ROR γ T and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17–producing T cells. *Nat Immunol*, 2008. 9: p. 1297-1306.
 18. Weaver C, Hatton RD, Mangan PR, Harrington LE, IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineage. *Annual Review of Immunology*, 2007. 25: p. 821- 852.
 19. Crispin JC, O.M., Bayliss G, Cohen RA, Van Beek CA, Stillman IE, Kyttaris VC, Juang YT, Tsokos GC:, Expanded Double Negative T Cells in Patients with Systemic Lupus Erythematosus Produce IL-17 and Infiltrate the Kidneys. *Journal of Immunology*, 2008. 181(12): p. 8761-8766.
 20. Mok M, W.H., Lo Y and Lau CS, The relation of interleukin 17 (IL-17) and IL- 23 to Th1/Th2 cytokines and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Journal of Rheumatology*, 2010. 37(10): p. 2046- 2052.
 21. Doreau A, B.A., Bastid J, Riche B, Trescol-Biemont MC, Ranchin B, Fabien N, Cochat P, Pouteil-Noble C, Trolliet P, Durieu I, Tebib J, Kassai B, Ansieau S, Puisieux A, Eliaou JF, Bonnefoy-Berard N: , Interleukin 17 acts in synergy with B cell-activating factor to influence B cell biology and the pathophysiology of systemic lupus erythematosus. *Nat Immunology*, 2009. 10: p. 778- 785.
 22. Shah K, L.W., Lee S, Kim S, Kang S, Craft J, Kang I, Dysregulated balance of Th17 and Th1 cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis research and therapie*, 2010.
 23. Wong CK, L.L., Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW, Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: Implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. *Clinical Immunology*, 2008. 127: p. 385-393
 24. Cooper A, IL-17 and anti-bacterial immunity: protection versus tissue damage. *Eur J Immunol.*, 2009. 39(3): p. 649-52.
 25. Zhao XF, P.H., Yuan H et al., Increased serum interleukin 17 in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep.*, 2010. 37: p. 81-85.
 26. AlShwaimi E, Berggreen E, Furusho H et al, IL-17 Receptor A Signaling Is Protective in Infection-Stimulated Periapical Bone Destruction. *The Journal of Immunology*, 2013. 191(4): p. 1785-91.

27. Yoshida H, M.Y., Regulation of immune responses by interleukin- 27. *Immunological Reviews*, 2008. 226(1): p. 234-247.
28. Stumhofer JS, Hunter CA, Advances in understanding the anti- inflammatory properties of IL- 27. *Immunol Lett*, 2008. 17: p. 123-130.
29. Villarino A, Huang E, Hunter CA, Understanding the pro- and anti- inflammatory properties of IL- 27. *Journal of Immunology*, 2004. 173(2): p. 715- 720.
30. Yoshida H, N.M., Miyazaki Y, Interleukin 27: a double edged sword for offense and defense. *Journal of Leukocyte Biology*, 2009. 86(6): p. 1295-1303.
31. Hunter CA, New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nature Reviews Immunology* 5, 521-531 (July 2005) 2005.
32. Wong C, Ho CY, Li EK, Lam CW, Elevation of proinflammatory cytokine (IL- 18, IL- 17, IL- 12) and Th2 cytokine (IL- 4) concentrations in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2000. 9: p. 589- 593.
33. Nalbandian A, C.J.C., Tsokos GC, Interleukin- 17 and systemic lupus erythematosus: current concepts. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009.
34. Harada T, K.V., Li Y, Juang YT, Wang Y and Tsokos GC, Increased expression of STAT3 in SLE T cells contributes to enhanced chemokine- mediated cell migration. *Autoimmunity* 2007. 40(1): p. 1-8.
35. Dong G, Y.R., Shi W et al., IL-17 induces autoantibody overproduction and peripheral blood mononuclear cell overexpression of IL-6 in lupus nephritis patients. *Chinese Medical Journal*, 2003. 116(4): p. 543-8.
36. Janeway CJ, Travers P, Walport M, et al., *The Immune System in Health and Disease*. 2001(5th edition).
37. Hiepe F, B.G., *Klinik und Diagnostik des systemischen Lupus erythematosus*. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 1996. 121: p. 1095-1100.
38. Donadio JV Jr, H.G., Berstralh EJ, Holley KE, Prognostic determinants in lupus nephritis: a long-term clinicopathologic study. *Lupus*, 1995. 4(2): p. 109-15.
39. Hughes G, Autoantibodies in lupus and its variants: experience in 1000 patients. *Br Med J.*, 1984. 289(6441): p. 339- 342.
40. Tan EM, S.P., Carr RI, Kunkel GH, Deoxybonucleic acid (DNA) and antibodies to DNA in the serum of patients with systemic lupus erythematosus *J Clin invest. J clin Invest*, 1966. 45(11): p. 1732- 1740.
41. Munves EF, Schur PH, Anibodies to Sm and RNP. Prognosticators of disease involvement. *Arthritis and Rheumatism*, 1983. 26(7): p. 848-53.
42. Dörner T, Giesecke C, Lipsky P, Mechanisms of B cell autoimmunity in SLE. *Arthritis research and therapie*, 2011.
43. Hagiwara E, Gourley MF MD2, Lee S BS1, Klinman DM MD, PhD1,*, Disease severity in patients with systemic lupus erythematosus correlates with an increased ratio of interleukin-10: Interferon- γ -secreting cells in the peripheral blood. *Arthritis and Rheumatism*, 1996. 39(3): p. 379-385.

44. Chen D-Y, C.Y.-M., Wen M-C, Hsieh T-Y, Hung W-T, Lan J-L, The potential role of Th17 cells and Th17 related cytokines in the pathogenesis of lupus nephritis. *Lupus*, 2012: p. 1-12.
45. Suni MA, Picker Louis j., Maino Vernon C, Detection of antigen-specific T cell cytokine expression in whole blood by flow cytometry. *Journal of Immunological Methods*, 1997. 212: p. 89-98.
46. Rodrigo M, Iost1, W.C.S., Joao M. Madurro3, Ana G. Brito-Madurro 4, Lucas F. Ferreira5, Frank N. Crespilho1, Recent advances in nano-based electrochemical biosensors: application in diagnosis and monitoring of diseases. *Frontiers in Bioscience*, 2011. E3(January 1): p. 663-689.
47. Crispin JC, T.G., IL-17 in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. 2010: p. 4.
48. Weening JJ, D.A.V., Schwartz MM, et al., The Classification of Glomerulonephritis in Systemic Lupus Erythematosus Revisited. *J Am Soc Nephrol*, 2004. 15: p. 241-250.
49. Niesner U, I.A., 1 Marko Janke,1 Cornelia Doebis,2 Christoph Loddenkemper,4 Maria H. Lexberg,1 Katharina Eulenburg,2 Stephan Kreher,1 Juliana Koeck,1 Ria Baumgrass,1 Kerstin Bonhagen,6 Thomas Kamradt,6 Philipp Enghard,1 Jens Y. Humrich,1 Sascha Rutz,1 Ulf Schulze-Topphoff,7 Orhan Aktas,7 Sina Bartfeld,1 Helena Radbruch,7 Ahmed N. Hegazy,1 Max Löhning,2 Daniel C. Baumgart,8 Rainer Duchmann,5 Martin Rudwaleit,5 Thomas Häupl,2 Inna Gitelman,9 Veit Krenn,3 Joachim Gruen,1 Jochen Sieper,2 Martin Zeitz,5 Bertram Wiedenmann,8 Frauke Zipp,7 Alf Hamann,2 Michal Janitz,10 Alexander Scheffold,1 Gerd R. Burmester,2 Hyun D. Chang,1 and Andreas Radbruch1, Autoregulation of Th1-mediated inflammation by twist1. *Journal of Experimental Medicine*, 2008: p. 1889-1901.
50. Henriques A, I.L., Couto M, Pedreiro S et al. Frequency and functional activity of Th17, Tc17 and other T-cell subsets in Systemic Lupus Erythematosus. *Cellular Immunology*, 2010. 264: p. 97-103.
51. Gomez- Martin D, D.-Z.M., Vanoye G, Crispin JC, Alocer- Varela J, , Quantitative and functional profiles of CD4+ lymphocyte subsets in systemic lupus erythematosus patients with lymphopenia. *Clinical and Experimental Immunology*, 2011. 164: p. 17-25.
52. Ma J, Y.J., Tao X, Wang J, Zheng SG, The imbalance between regulatory and IL- 17- secreting CD4+ T- cells in lupus patients. *Clin Rheumatol*, 2010. 29(11): p. 1251-1258.
53. Garrett- Sinha L, John S, Gaffen S, IL- 17 and the Th17 lineage in systemic lupus erythematosus. *Current Opinion in Rheumatology* 2008. 20: p. 519- 525.
54. Kleczynska W, Bogdan J, Plutecka H, Milewski M, Sanak M, Musial J, Imbalance between Th17 and regulatory T- cells in systemic lupus erythematosus. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2011. 49(4): p. 646-653.
55. Koenen HJ, Smeets RL, Vink PM, Rijssen van E, Boots AM, Joosten I, Human CD25highFoxp3pos regulatory T cells differentiate into IL-17-producing cells. *Blood*, 2008. 112: p. 2340- 2352.

56. Rana A, Minz R, Aggarwal R, et al., Gene expression of cytokines (TNF- α , IFN- γ), serum profiles of IL-17 and IL-23 in paediatric systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 2012: p. 1-8.
57. Tucker LB, U.A., Fernandez M, et al. , Adolescent onset of lupus results in more aggressive disease and worse outcomes: results of a nested matched case-control study within LUMINA, a multiethnic US cohort (LUMINA LVII) *Lupus*, 2008. 17(4).
58. Font J, C.R., Espinosa G, et al. , Systemic lupus erythematosus (SLE) in childhood: analysis of clinical and immunological findings in 34 patients and comparison with SLE characteristics in adults. . *Ann Rheum Dis.*, 1998. 57(8): p. 456-459.
59. Rider V, J.S., Evans M, Asfar Z, Abdou NI, Estrogen increases CD40 ligand expression in T cells from women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.*, 2001. 28(12): p. 2644- 2649.
60. Schoennbrunn A, F.M., Kohler S, Keye J, Dooms H, Moewes B, Dong J, Lodenkemper C, Sieper J, Wu P, Romagnani C, Matzmohr N, Thiel A, A Converse 4-1BB and CD40 Ligand Expression Pattern Delineates Activated Regulatory T Cells (Treg) and Conventional T Cells Enabling Direct Isolation of Alloantigen-Reactive Natural Foxp3+ Treg. *The Journal of Immunology*, 2012. 189: p. 5985-5994.
61. Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, and A. Thiel, Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nature Medicine*, 2005. 11: p. 1118-1124.
62. Rider V, L.X., Peterson G, Kimler BF, Abdou NI, Differential expression of estrogen receptors in women with systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol.*, 2006. 33(6): p. 1093- 1101.
63. Pierdominici M, O.E., Estrogen Impact on Autoimmunity Onset and Progression: the Paradigm of Systemic Lupus Erythematosus. *INTERNATIONAL TRENDS IN IMMUNITY*, 2013. 1(22-34).
64. Kassi E, M.P., Estrogen Receptor Signaling and Its Relationship to Cytokines in Systemic Lupus Erythematosus. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2010. 2010: p. 14.
65. Nussinovitch U, Shoenfeld Y, The role of gender and organ specific autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 2012. 11(6-7): p. A377-A385.
66. Jacobi AM, Zur Bedeutung des Prolaktins für Pathogenese und Krankheitsverlauf bei systemischem Lupus erythematoses (SLE). 2000. edoc Server der Humbold Universität zu Berlin
67. Schwartzman- Morris J, Putterman C, Gender Differences in the Pathogenesis and Outcome of Lupus and of Lupus Nephritis. *Clinical and Developmental Immunology*, 2012.
68. Diveu C, M.G.M., Boniface K, et al., IL- 27 blocks RORc expression to inhibit lineage commitment of Th17 cells. *The Journal of Immunology*, 2009. 182(9): p. 5748-5756.

69. Murugaiyan G, M.A., Lopez- Diego R, et al., IL- 27 is a key regulator of IL- 10 and IL- 17 production by human CD4+ T cells. *Journal of Immunology*, 2009. 183(4): p. 2435-2443.
70. Kwan BC, Tam, L. S., Lai, K. B., et al., The gene expression of type 17 T- helper cell- related cytokines in the urinary sediment of patients with systemic lupus erythematosus. *Rheumatology*, 2009. 48: p. 1491- 1497.
71. Teramoto K, Negoro N, Kitamoto K, Iwao T, Iwao H, Okamura M, Miura K, Microarray analysis of glomerular gene expression in murine lupus nephritis. *Journal of Pharmacological Sciences*, 2008. 106(1): p. 56-67.
72. Li TT, Z.T., Chen GM, Zhu QQ, Tao JH, Pan HF, Ye DQ, Low level of serum Interleukin 27 in patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Investigative Medicine*, 2010. 58(5): p. 737-9.
73. Onishi RM, G.S., Interleukin-17 and its target genes: mechanisms of interleukin-17 function in disease. *Immunology*, 2010. 129(3): p. 311-321.
74. Stumhofer JS, A.L., Wilson EH et al., Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nature Immunology*, 2006. 7(9): p. 937- 945.
75. Hsu HC, Y.P., Wang J et al., Interleukin 17- producing T helper cells and interleukin 17 orchestrate autoreactive germinal center development in autoimmune BXD2 mice. *Nature Immunology*, 2008. 9(2): p. 166-175.
76. Dong C, TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. . *Nature Reviews Immunology* 2008. 8(5): p. 337-48.
77. Wang Y, S.I., * Y Chino,* D Goto,* I Matsumoto,* H Murata,* A Tsutsumi,* T Hayashi,* K Uchida,† J Usui,‡ K Yamagata,‡ and T Sumida*, Laser microdissection-based analysis of cytokine balance in the kidneys of patients with lupus nephritis. *Clinical and Experimental Immunology*, 2010. 159(1): p. 1-10.
78. Dinges MM, O.P., Schlievert PM, Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2000. 13(1): p. 16-34.
79. Nomura LE, W.J., Maecker HT, Optimization of whole blood antigen-specific cytokine assays for CD4(+) T cells. *Cytometry*, 2000. 40(1): p. 60-68.
80. Huang YP, P.L.H., Miescher PA, Zubler RH, Correlation of T and B cell activities in vitro and serum IL-2 levels in systemic lupus erythematosus. *The Journal of Immunology*, 1988. 141(3): p. 827-833.
81. Papp KA, L.C., Menter A, et al. , Brodalumab, an Anti- Interleukin-17- Receptor Antibody for Psoriasis. *The New England Journal of Medicine*, 2012. 366(13): p. 1181-1189.
82. Leonardi C, M.R., Zachariae C, et al., Anti-Interleukin-17 Monoclonal Antibody Ixekizumab in Chronic Plaque Psoriasis. *The New England Journal of Medicine*, 2012. 366(13): p. 1190-1199.
83. Genovese MC, Van den bosch V, Roberson SA, Bojin S, Biagini IM, Ryan P, Sloan- Lancaster J, LY2439821, a humanized anti-interleukin-17 monoclonal antibody, in the treatment of patients with rheumatoid arthritis: A phase I

randomized, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept study. *Arthritis and Rheumatism*, 2010. 62(4): p. 929- 939.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1 Schematische Darstellung zur Durchflusszytometrie	25
Abbildung 3.2 Verteilung der Zellpopulationen	26
Abbildung 3.3 Schematische Darstellung zur Sandwich-ELISA-Technik [46].....	30
Abbildung 4.1: Korrelationen der Krankheitsaktivität, gemessen am SLEDAI	36
Abbildung 4.2: Unterschiede der IL-17-Konzentrationen zwischen SLE-Patienten, gesunden Kontrollen und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen.....	38
Abbildung 4.3: Darstellung der signifikanten Unterschiede der weiblichen Probanden	40
Abbildung 4.4: Darstellung der IL-27-Serumspiegel bei SLE-Patienten und Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD) im Vergleich zu gesunden Spendern (HD).....	41
Abbildung 4.5: Darstellung der Krankheitsaktivität.....	42
Abbildung 4.6: Darstellung der Aktivitätsparameter SLEDAI, Antikörpertiter der dsDNA-Antikörper und C3-Komplement.....	44
Abbildung 4.7: Zytokinserumlevel der SLE-Patienten mit Immunsuppression:.....	46
Abbildung 4.8: IL-17 und IL-27-Serumkonzentrationen entsprechend der Nierenbeteiligung	47
Abbildung 4.9: Darstellung des Zusammenhangs zwischen aktivem Krankheitsgeschehen und a) der Höhe der C3-Serumkonzentrationen und b) der Höhe der Antikörpertiter der Anti-dsDNA-Antikörper	49
Abbildung 4.10: Darstellung der Gating-Strategie am Beispiel eines gesunden Spenders	53
Abbildung 4.11: Vergleich der Frequenzen der IL-17/IFN γ doppelpositiven Zellen in PBMCs und Vollblut	55
Abbildung 4.12: Höhere Effektivität der Stimulation mit PMA	56
Abbildung 4.13: Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen eines gesunden Spenders nach 6h Stimulationsdauer bzw. 24h Stimulationsdauer.....	57
Abbildung 4.14: Nachweis antigenspezifischer T-Helferzellen eines SLE-Patienten.....	59
Abbildung 4.15: Spontane IL-17-Sekretionen bei drei SLE- Patienten in unstimulierten Proben nach 6 Stunden Inkubation.....	61
Abbildung 4.16: Darstellung der durchflusszytometrischen Analyse der Th17-Frequenzen.....	62
Abbildung 4.17: IL-17-Frequenz bezogen auf aktivierte CD3+/CD4+ T-Zellen.....	63

Abbildung 4.18: Darstellung der IFN γ -Produktion nach T-Zellstimulation bezogen auf CD40 Ligand+ T-Zellen bei SLE-Patienten (n= 21) und gesunden Spendern(HD) (n= 21).64

Abbildung 4.19: Darstellung der Ratio der IL-17-Frequenzen der CD4+/ CD40 Ligand+ T-Zellen und der Frequenzen von Interferon γ der CD4+/ CD40 Ligand + T-Zellen.....66

Abbildung 4.20 Vergleich der IL-17- und INF γ -Frequenzen von SLE-Patienten (n= 19) und gesunden Spendern (HD) (n= 18) bezogen auf CD 40Ligand+ T-Zellen nach Stimulation mit viralen Antigenen67

Abbildung 4.21: Darstellung der IL-17-Frequenzen bezogen auf CD40 Ligand+ T-Zellen in Korrelation zu der Höhe des Antikörpertiter der Anti-dsDNA-Antikörper (n= 21 Paare) p= 0,016,68

Abbildung 4.22: Darstellung des Einflusses des aktiven Krankheitsgeschehen auf a) die IL-17-Frequenzen bezogen auf alle CD3+/CD4+ Zellen und b) die IL-17-Frequenzen bezogen auf alle CD40 Ligand+/ CD3+/CD4+ Zellen und c) die IL-17/ IFN γ -Ratio70

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1 Verwendete Laborausüstung	20
Tabelle 3.2 Verwendete Pufferlösungen	21
Tabelle 3.3 Antigene	23
Tabelle 3.4 Antikörper	28
Tabelle 4.1 Charakterisierung der SLE-Patienten.....	34
Tabelle 4.2 Charakterisierung der gesunden Spender	35
Tabelle 4.3 Charakterisierung der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD)	35
Tabelle 4.4 Mittelwerte der IL-17-Serumkonzentrationen der jeweiligen Gruppe	38
Tabelle 4.5 Charakterisierung der SLE-Patienten (FACS-Analyse).....	50
Tabelle 4.6 Charakterisierung der Patienten mit anderen Autoimmunerkrankungen (OAD).....	51
Tabelle 4.7 Charakterisierung der gesunden Spender (FACS-Analyse)	52
Tabelle 4.8 Ergebnisse der durchflusszytometrischen Untersuchung der IL-17-Frequenzen	62
Tabelle 5.1 Studien zu IL-17	74

9 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACR	American College of Rheumatology
Adeno	Adeno-Virus
Ak	Antikörper
Anti-La-Ak	Autoantikörper gegen Zellkernantigen La(SS-B)
Anti-RNP	Autoantikörper gegen Ribonukleoprotein
Anti-Ro-Ak	Autoantikörper gegen zytoplasmatisches und Kernantigen "Robair"
Anti-Sm-Ak	Autoantikörper gegen Zellkernantigen "Smith"
APC	Allophycocyanin
BCR	B-Zell-Rezeptor
BSA	Bovines Serum-Albumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	beziehungsweise
C3	Faktor des Komplementsystems
CD	cluster of differentiation
CMV	Cytomegalie-Virus
DC	dendritische Zellen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	doppelsträngige DNA
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
et al.	und Mitarbeiter
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluoreszein Isothiocyanat
FOXP3	forkhead box P3
FSC	forward scatter/ Vorwärtsstreulicht
ggf.	gegebenenfalls
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony stimulating factor
HD	gesunde Spender
HRP	horseradish peroxidase
i.E.	Internationale Einheiten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRF	Interferon regulatory factor
ISN	International Society of Nephrology
JAK	Janus-Kinase

L	Ligand
M	molar
MCTD	Mischkollagenosen (mixed connective tissue disease)
mg	Milligramm
MHC	Major histocompatibility Complex
ml	Milliliter
mM	milliMolar
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
NK	Natürliche Killer-Zellen
nm	nanometer
OAD	andere Autoimmunerkrankungen
PBMCs	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
pg	pico-gramm
PMTs	Photoelektronenvervielfacher
ROR	Retinoic acid-related orphan receptor
RPS	RenalPathology Society
RT	Raumtemperatur
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SEB	Staphylococcus Enterotoxin B
SLE	Systemischer Lupus erythematosus
SLEDAI	Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity Index
SSC	sideward scatter/ Seitwärtsstreulicht
STAT	Signal transducer activator of transcription
Tab.	Tabelle
TGF	tissue growth factor
Th	T-Helfer
TNF	Tumor necrosis factor
TR1	type 1 regulatory T-cells
Treg	T-regulatorische Zellen
U/min	Umdrehungen/ Minute
u.a.	unter anderem
vs.	versus

10 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Franziska Rauhut, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

Untersuchung zur Relevanz von Interleukin-17 bei Patienten mit systemischem Lupus erythematoses

selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

11 Publikation

Anteilerklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Franziska Rauhut hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Rauhut F., Cheng Q., Alexander T., Burmester G.-R., Hiepe F., Schneider S.
Charité -Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, Medizinische Klinik III mit Schwerpunkt
Rheumatologie & klinische Immunologie, Berlin

IL-17 and IL-27 serum levels in human SLE: What can they tell us?

Posterpräsentation beim 39. Kongress der deutschen Gesellschaft für Rheumatologie in
München 2011

Unterschrift der Doktorandin

12 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

13 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Professor Dr. Falk Hiepe für die Überlassung des Themas sowie für die umfassende Betreuung der Arbeit, vielen Dank für die Geduld und die Ausdauer. Weiterhin bedanke ich mich bei Fr. Dr. Sandra Schneider für die Erarbeitung des Themas und die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten. Bei allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hiepe möchte ich mich für die Zusammenarbeit bedanken.

Besonders danke ich Fr. Dr. Bimba F. Hoyer, die sich an meine Seite stellte, als es am dringendsten war.

Ich danke meinem Triumvirat Stefanie Schmidt, Dr. Capucine Daridon und Dr. Henrik Mei für die Kraft, immerwährende Unterstützung und Ermunterung.

Jan-Erik danke ich für seine Geduld und die Navigation im Chaos.

Bei Mathias Schweitzer-Hubi möchte ich mich für die vielen konsequenten Arbeitsstunden bedanken. Meinen Brüdern Jan-Hinnerk, Frederik und Niklas danke dafür, dass sie immer für mich da sind.

Mein größter Dank gilt meinen lieben Eltern für ihre Hilfe und ihre Unterstützung und für alles.